

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES ANTISEPTIQUES

1/ DEFINITIONS

1.1 ASEPSIE - ANTISEPSIE

Un milieu est dit septique lorsqu'il contient des microorganismes : il est dit aseptique dans le cas contraire.

Des conditions rigoureuses d'asepsie sont requises en milieu hospitalier dans les services dits à haut risque (réanimation, chirurgie) (57). Dans les salles d'opération, on cherche par tous les moyens possibles à éviter la contamination du champ opératoire (tenues spéciales du personnel, stérilisation du matériel, préparation du malade).

Le perfectionnement le plus spectaculaire dans ce domaine est sans doute la mise au point du « flux laminaire » qui assure au niveau du bloc opératoire, un environnement aseptique « débarrassé de la quasi totalité des bactéries » (76).

L'antisepsie est définie « comme une opération au résultat momentané permettant au niveau des tissus vivants, dans la limite de leur tolérance, d'éliminer ou de tuer les microorganismes et/ou d'inactiver les virus en fonction des objectifs fixés.

Le résultat de cette opération est limité aux microorganismes et/ou virus présents au moment de l'opération » (2).

L'antisepsie fait appel à l'usage des antiseptiques, qui doivent répondre à des critères d'activité mais aussi d'innocuité. Les antiseptiques sont utilisés :

- Dans un but curatif lors des infections de la peau ou des muqueuses
- Dans la prévention des infections hospitalières

Selon l'objectif souhaité l'antisepsie prophylactique utilisera des produits et des méthodes très différentes.

L'antiseptique idéal doit répondre aux qualités suivantes :

- Effet bactéricide
- Large spectre
- Non-sensibilité aux substances interférentes
- Rémanence
- Faible toxicité et bonne tolérance dans les conditions habituelles d'emploi

Les antiseptiques sont des médicaments destinés à détruire les microorganismes présents sur les tissus vivants (peau saine, muqueuses et plaies). Ils relèvent de la pharmacopée française.

1.2 DESINFECTION

La désinfection est définie comme une opération, au résultat momentané, permettant d'éliminer ou de tuer les microorganismes et/ou les virus indésirables portés par des milieux inertes contaminés, en fonction des objectifs fixés. Le

résultat de cette opération est limité aux microorganismes présents au moment de l'opération (2).

L'usage du terme « décontamination » en synonyme de « désinfection » est prohibé, car les décontaminants s'utilisent sur du matériel souillé (matériel médico-chirurgical, médico-secouriste,...) contrairement aux désinfectants qui s'utilisent sur des surfaces inertes.

1.3 DECONTAMINANTS

La décontamination est définie comme une opération, au résultat momentané permettant d'éliminer, ou d'inhiber les microorganismes indésirables en fonction des objectifs fixés. Le résultat de cette opération est limité aux microorganismes présents au moment de l'opération ; Les termes « de vie », « de mort » et de « tuer » appliqués aux microorganismes, se réfèrent à la capacité ou à l'incapacité définitive de réplication du matériel génétique des microorganismes.

1.4 STERILISATION

La stérilisation est l'opération qui a pour but de tuer les microorganismes contenus dans une préparation.

Le matériel traité est dit stérile lorsque le résultat est acquis, c'est à dire lorsque aucun microorganisme n'est revivifiable ou n'est capable de se développer (1).

Le résultat devrait être permanent ce qui requiert un emballage imperméable à toute recontamination avec une tolérance de non-stérilité de 10^{-6} (un objet non rigoureusement stérile sur un million).

Les difficultés d'éviter la recontamination conduisent à définir une date de péremption.

La mort ou l'inactivation pour une bactérie est bien une perte irréversible de son pouvoir de reproduction (croissance et division).

Les agents utilisés pour assurer la stérilisation sont :

- Physiques : température (chaleur sèche – chaleur humide), les radiations
- Chimiques

1.5 DEFINITIONS COMPLEMENTAIRES

❖ Antiseptique

Produit ou procédé utilisé pour l'antisepsie dans des conditions définies. Si le produit ou le procédé est sélectif, ceci doit être précisé. Ainsi un antiseptique ayant une action limitée aux champignons est désigné par antiseptique à action fongicide.

❖ Désinfectant

C'est un produit ou un procédé utilisé pour la désinfection ou la décontamination dans des conditions définies.

Si le produit est sélectif, ceci doit être précisé. Ainsi un désinfectant ayant une action limitée aux bactéries est désigné par : désinfectant à action bactéricide.

❖ Bactéricide

Produit ou procédé ayant la propriété de tuer les bactéries dans des conditions définies.

❖ Bactériostase

C'est l'état d'une population bactérienne dont la multiplication est momentanément inhibée.

❖ Bactériostatique

C'est un produit ou un procédé ayant la propriété d'inhiber momentanément des bactéries dans des conditions définies.

❖ Antibactérien

Ceci qualifie un produit ou un procédé dont on ne précise pas si son activité est bactéricide ou bactériostatique.

❖ Fongicide

C'est un produit ou un procédé ayant la propriété de tuer les champignons, y compris leurs spores dans des conditions à préciser.

❖ Fongistase

Etat d'une population fongique dont le développement est momentanément inhibé.

❖ Fongistatique

Produit ou procédé ayant la propriété d'inhiber momentanément le développement des champignons dans des conditions définies.

❖ Antifongique

Qualifie un produit ou un procédé dont on ne précise pas si son activité est fongicide ou fongistatique.

❖ Sporicide

Produit ou procédé ayant la propriété de tuer les spores bactériennes dans des conditions définies (2).

2/ MECANISMES D’ACTION DES ANTISEPTIQUES ET DESINFECTANT SUR LES BACTERIES ET LES CHAMPIGNONS

Les mécanismes d’action des produits antibactériens autre que les antibiotiques restent encore généralement peu connus.

L’intérêt de leur étude est apparu particulièrement avec la mise en évidence accrue de souches résistantes aux antiseptiques.

Ces molécules sont capables d’être responsables d’effets très variés d’où la difficulté de distinguer parmi les perturbations observées quelle est celle responsable de la perturbation primaire et donc de mettre en évidence un mécanisme particulier.

Il est d’autre part difficile d’étudier ces molécules comme cela se pratique avec les antibiotiques car leurs actions sont multiples et variables selon les doses.

Dans des conditions bien précises, quelques actions spécifiques peuvent être rapportées. Pour des raisons pratiques, il apparaît plus simple d’étudier pour chaque classe chimique, les différents mécanismes d’action connus.

Ainsi on peut classer ces agents antimicrobiens autre que les antibiotiques en deux catégories à savoir les produits potentiellement létaux et ceux non létaux mais inhibiteurs de croissance (**tableau I**) .

Tableau 1 : Spectre d'activité et mode d'action des principales classes d'antiseptiques et désinfectants (54)

Groupes	Exemples	Activité antimicrobienne		
		Bactéries	Spores bactériennes	Champignons
Acridine	Dérivés d'acridine	Bactériostatique	Inactif	?
Alcool	Alcool (éthanol) Alcools éliphatiques Alcools aromatiques	Bactéricide	inactif	Fongicide ?
Aldéhyde	Formaldéhyde Glutaraldéhyde	Bactéricide lent Bactéricide rapide	Lentement sporicide Sporicide	Fongicide ? Fongicide
Ammoniums quaternaires et autres cationiques	Chlorure de benzalkonium Chlorure de cétylpyridinium	Bactéricide et bactériostatique plus actif sur les bactéries à gram positif	Inactif	Variable (fongistatique)
Chlorhexidine	Sels de chlorhexidine Digluconate, diacétate)	Bactéricide ou bactériostatique	Inactif	Lentement actif (fongistatique)
Chlore Composés chlorés Iode et composés iodés	Hypochlorite de sodium Chloramine T..... Iode PVP iodée	Bactéricide Bactéricide	Sporicide à dose élevée ?	Fongicide Fongicide
Mercuriels	Thiomersal Mercurochrome Nitromersol	Bactériostatique	Inactif	Fongistatique

Oxydants	Peroxyde d'oxygène Permanganate de K ozone	Bactéricide	Sporicide	Fongicide
Colorants	Vert brillant Violet cristal Magenta Vert malachite	Bactériostatique actif sur les bactéries à gram positif	Inactif	Fongistatique
Phénols et dérivés Bis phénols et apparentés	Phénols-crésols chlorophénols Hexachlorophène – triclosan	Bactéricide ou bactériostatique Bactéricide ou bactériostatique	Peu ou pas actif Inactif	Fongicide ou fongistatique Fongistatique

Parmi les produits potentiellement létaux, on distingue :

- Les composés chimiquement très réactifs qui se caractérisent par une action brutale, rapide, temporaire et souvent non spécifique (poison protoplasmique) ; pourront se rattacher à ce groupe les oxydants, avec l'eau oxygénée, les halogènes (chlore, iode) et l'oxyde d'éthylène, les acides et bases fortes, les aldéhydes, le phénol.
- Les composés chimiquement stables à action spécifique, groupe comprenant les ammoniums quaternaires, les dérivés phénoliques autres que le phénol, la chlorhexidine, l'hexamidine, l'hexétidine, la dibromo-propanidine et les acridines.

Les produits non létaux mais seulement inhibiteurs de croissance comprennent essentiellement les métaux (mercuriels, dérivés du cuivre, du zinc, de l'argent etc...) et les colorants.

2.1 LES PRINCIPALES CIBLES DES ANTISEPTIQUES ET DESINFECTANTS

Selon leur nature et la concentration utilisée, les antiseptiques et les désinfectants ont une ou plusieurs cibles.

Mais dans la majeure partie des cas, l'accès à la cible nécessite le franchissement de la paroi cellulaire qui est un obstacle à la fois physique et chimique.

Les divers types d'organisation de la paroi chez les micro-organismes conditionnent l'accès aux principales cibles et sont donc responsables de la spécificité d'accès de certains de ces agents antimicrobiens (**figure 1**).

Salton (68) a décrit cinq étapes dans l'action des agents antimicrobiens :

- Adsorption sur la cellule suivie de la pénétration dans la paroi ;
- Réactions complexes avec la membrane cytoplasmique conduisant à sa désorganisation ;
- Sortie des composés de faible poids moléculaire du cytoplasme ;
- Dégradation des protéines et des acides nucléiques ;
- Lyse de la paroi causée par les enzymes autolytiques.

Ce schéma s'applique plus particulièrement aux agents nombreux qui interagissent avec la membrane cytoplasmique.

La séquence des événements peut être différente avec d'autres principes actifs.

Mais dans tous les cas, la première étape implique l'adsorption de l'agent antimicrobien à la surface cellulaire.

2.1.1 Adsorption à la surface cellulaire

Il y a une trentaine d'années, **Giles** et ses collaborateurs ont tenté de définir des modèles d'interaction de l'agent antimicrobien et de la cellule bactérienne entière (35). Cinq profils d'adsorption isotherme différents ont été obtenus. Ils permettaient de préjuger de l'action d'une molécule testée. Cette détermination en a fait reçu peu d'applications car seul un faible nombre de produits a été testé.

Il faut noter que la présence de charges électro-négatives à la surface cellulaire favorise la fixation de dérivés cationiques.

2.1.2 Action au niveau de la paroi

Seules les bactéries à Gram négatif sont susceptibles de voir la paroi spécifiquement altérée (au niveau de la membrane externe) par les mêmes produits qui agissent au niveau de la membrane cytoplasmique.

2.1.3 Action sur la membrane cytoplasmique

La membrane cytoplasmique reste le site principal d'action des antiseptiques et désinfectants.

Elle assure le métabolisme énergétique de la cellule et est responsable du transport et du maintien des métabolites à l'intérieur de la cellule (42).

La première atteinte par une molécule antimicrobienne consiste en une modification de la perméabilité de cette membrane et en la libération des constituants cellulaires.

L'ion potassium est le premier élément à apparaître lorsque la membrane cytoplasmique est lésée.

Les acides aminés, purines, pyrimidines et pentoses, puis des macromolécules, protéines et acides nucléiques s'échappent des cellules traitées en fonction de la taille des lésions produites.

Si la drogue n'est pas trop concentrée, et si son action n'est pas trop prolongée, l'altération peut être réversible et la fuite du matériel intracellulaire ne provoquera qu'une inhibition de croissance bactériostase ou fongistase.

Un deuxième type d'action au niveau de la membrane peut consister en une inhibition de la production d'énergie.

L'influence des antiseptiques et désinfectants sur la force protonique a permis de caractériser quelques molécules dans le groupe des phénoliques

mais aussi des antiseptiques comme le salicylanilide et ses dérivés bromés, chlorés et mixtes.

D'autres mécanismes d'action possibles au niveau de la membrane consistent en une interférence avec la chaîne de transport des électrons ou avec des enzymes membranaires impliquées dans la production d'énergie.

Jusqu'ici, ces processus n'ont concerné que divers antimicrobiens de potentialités variées et ils ne semblent pas s'appliquer aux antiseptiques ou désinfectants les mieux-connus.

Les membranes cytoplasmiques des levures et des moisissures se caractérisent par la présence de stérols (ergostérol). Chez ces organismes, l'inhibition de la biosynthèse d'ergostérol par divers composés tels que les triazolés (miconazole) entraîne un effet fongistatique dans la mesure où la paroi est perméable à ces composés. D'autres antifongiques actifs sur les moisissures, les dermatophytes et aussi des bactéries interagissent également avec la membrane cytoplasmique en bloquant le transport des précurseurs des biosynthèses (84).

2.1.4 Action au niveau du cytoplasme

Le cytoplasme comporte quatre cibles potentielles pour les agents antimicrobiens qui auront pu franchir le double obstacle que constituent la paroi et membrane cytoplasmique : le cytoplasme lui-même, les enzymes et plus généralement les protéines cytoplasmiques, les acides nucléiques et les ribosomes.

Malgré de très nombreuses études, il n'a pas été mis en évidence une enzyme cible spécifique responsable de la mort cellulaire (42).

2.1.4.1 Coagulation irréversible des constituants cytoplasmiques

Il s'agit du mécanisme provoquant la mort la plus rapide, d'où le terme utilisé dans les années 1930 de « poison cytoplasmique ». Les constituants dénaturés sont essentiellement les protéines et les acides nucléiques. Ce type d'action intervient dans divers procédés de désinfection.

2.1.4.2 Action sur le métabolisme et les enzymes

L'inactivation des enzymes peut être due à leur dénaturation dans le cas de la coagulation citée ci-dessus.

Mais il peut y avoir une inactivation ménagée liée par exemple à une réaction au niveau des groupements thiols (mercuriels, métaux lourds) ou au niveau d'autres fonctions (hydroxylées, carboxyliques, aminés). Ces phénomènes sont généralement mal identifiés.

2.1.4.3 Interactions avec les acides nucléiques

Beaucoup d'antibiotiques agissent sur ces cibles.

Avec les produits non antibiotiques, il semble que les effets bactériostatiques des acridines, du formaldéhyde et du phényléthanol leur soient imputables.

Mais les effets létaux du formol et de l'alcool phényl éthylique impliquent d'autres cibles.

2.1.4.4 Interactions avec les ribosomes

Bien qu'ils constituent la cible de nombreux antibiotiques, les ribosomes ne peuvent être considérés comme des cibles de choix des antibactériens non antibiotiques (42).

3/ CLASSIFICATION

Il est possible de définir un certain nombre de groupes d'agents désinfectants ou antiseptiques sur la base de leur parenté chimique et de leur mode d'activité précédemment défini. Nous insisterons sur les plus utilisés (26, 29, 53).

3.1 OXYDANTS

Les oxydants exercent leur action par libération d'oxygène naissant qui réagit avec les protéines et les systèmes enzymatiques cellulaires. Ils sont fortement inactivés par les matières organiques (26).

3.2 EAU OXYGÉNÉE ET DÉRIVÉS

L'eau oxygénée et tous les composés susceptibles de donner naissance à de l'eau oxygénée sont des antiseptiques puissants. L'eau oxygénée en solution aqueuse est un désinfectant des plaies mais sa décomposition rapide au contact des tissus limite son efficacité (9). Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), en solution de 10 volumes et le permanganate de potassium ($KMnO_4$) en solution aqueuse à 0,01 % sont utilisés comme antiseptiques.

3.3 CHLORE ET DERIVES

Le chlore est un antiseptique découvert par **O. W. HOLMES** à Boston en 1835 et utilisé par **SEMMELWEIS** à Viennes en 1847 (**13**).

Le chlore, sous forme de gaz dans diverses combinaisons chimiques, est l'un des antiseptiques les plus connus. Il est universellement employé pour la stérilisation des eaux de boisson, des eaux de piscine, le traitement des eaux polluées et des objets contaminés (**Tableau II**).

Tableau II : Différentes formes de chlore en solution dans l'eau

CHLORE	COMPOSITION	FORMULE	ACTIVITE
Chlore libre	Chlore élémentaire Acide hypochloreux	Cl_2 HClO	+++ (maximale)
Chlore libre	Chlore élémentaire Acide hypochloreux Hypochlorites	Cl_2 HClO ClO^-	++ (suivant teneur en HClO)
Chlore combiné	Monochloramine Dichloramine Trichloramine	NH_2Cl NHCl_2 NCl_3	+ (faible)
Chlore total	Chlore élémentaire Acide hypochloreux Hypochlorites	Cl_2 HClO ClO^-	++ (suivant teneur en HClO)

Sous forme gazeuse, le chlore est un produit dangereux de manipulation délicate. Parmi les composés liquides, les hypochlorites et les chloramines sont les plus répandus. L'hypochlorite de calcium ou chlorure de chaux est un mélange d'hypochlorite, de chlorure et d'hydroxyde de calcium.

L'hypochlorite de sodium, mieux connu sous le nom d'eau de javel, produit inventé en France en **1789** par **BERTHOLLET** titre 10 à 20 degré chlorométrique (le degré chlorométrique exprime le nombre de litres de chlore dégagé par kilogramme de produit) (**13**).

Un autre composé du chlore, le dioxyde de chlore est un désinfectant actif utilisé dans la stérilisation de l'eau. Il est capable en outre de supprimer les goûts désagréables en détruisant les substances qui les engendrent. En thérapeutique, on fait appel à des solutions d'hypochlorite plus diluées comme la liqueur de Labarraque ou soluté de Dakin.

Les chloramines constituent une seconde catégorie de composés chlorés. Les atomes d'hydrogène de leur groupement aminé, sont remplacés par des atomes de chlore. Les chloramines ont une activité plus prolongée que les hypochlorites mais leur efficacité est généralement moins élevée. Tous les composés chlorés agissent selon un mécanisme rigoureusement semblable en formant de l'acide hypochloreux (ClOH).

L'oxygène naissant libéré au cours de cette réaction a un pouvoir oxydant intense. La plupart des micro-organismes sont tués instantanément à son contact. Les formes sporulées sont plus résistantes ; elles exigent pour leur inactivation des doses 100 fois plus élevées (**26**).

3.4 IODE

Son action est principalement fongicide et bactéricide. L'iode est utilisé depuis longtemps en solution alcoolique :

- Teinture d'iode à 5% ;
- Alcool iodé 1%

Cependant l'iode libre a l'inconvénient d'être toxique et irritant pour les tissus. Le plus utilisé est la polyvinylpyrrolidone iodée (PVP-I) (**13**).

- 4%
- 10%
- 1% en ophtalmologie.

Elle appartient à la classe pharmacologique des antiseptiques à large spectre ; groupe des oxydants halogénés. C'est un polymère soluble dans l'eau et pratiquement insoluble dans les solvants tels que le chloroforme ou le tétrachlorure de carbone. Elle se comporte en effet comme une protéine plasmatique vis-à-vis de l'eau, avec pour résultat une absorption (41).

3.5 LES ALCOOLS

On distingue :

- Des monoalcools (éthylque, méthylque, propylque, isopropylque, benzylique) ;
- Des dialcools (glycol).

Ils sont bactéricides sur les formes végétatives des bactéries. Ils agiraient par dénaturation des protéines, cette action exigeant une certaine quantité d'eau, ainsi l'alcool éthylque légèrement dilué (60° - 70°C) est plus actif que l'alcool absolu (13).

3.6 METALX LOURDS ET LEURS SELS

Tableau III : Principaux métaux et sels de métaux lourds (26)

METAL		USAGE
-------	--	-------

	<i>COMPOSES</i>	
MERCURE	1. <u>INORGANQUES</u> Chlorure mercurique Biodure de mercure Cyanure de mercure Oxyde de mercure	Pommade antiseptique Utilisé anciennement comme antisphyllitique Désinfectant des instruments de chirurgie Pommades ophtalmiques
	2. <u>ORGANQUES</u> ▪ <u>Aromatiques</u> Mercurochrome..... Mercurobutol (Mercryl®) Borate de phényl Mercure (Merfène®) ▪ <u>Aliphatiques</u> : Merthiolate de sodium (Merseptyl®).....	Antiseptique de la peau et des muqueuses Antiseptique externe et vaginal Antiseptique de la peau et des muqueuses Antiseptique de la peau et des muqueuses désinfection des instruments chirurgicaux conservateur biologique
ARGENT	Nitrate d'argent Préparations colloïdales minérales ou organiques	En solution à 1% contre l'ophtalmie gonococcique du nouveau-né Principalement en oto-rhino-laryngologie et en ophtalmologie ; collyre, instillations nasales ; injections urétrales
CUIVRE	Sulfate de cuivre	Collyre, pommades ; puissant antifongique
ZINC	Sulfate de zinc	Collyre
OR	Chlorure d'or Cyanure d'or	Intérêt historique : autrefois utilisés contre la tuberculose

3.6.1 Dérivés du Mercure (26)

Ils sont de deux types :

- Sels et composés inorganiques qui ont un effet irritant, voire toxique :
chlorure mercurieux (calomel), oxycyanure de mercure, oxyde jaune de mercure ;
- Les dérivés organiques ou organomercuriels sont beaucoup mieux

tolérés. Le mercure s'y trouve lié à un atome de carbone d'une chaîne aliphatique (alkylmercuriels) ou d'un aromatique (arylmercuriels).

Les principaux sont :

- Le mercurothiolate sodique ou thiomersal (Merthiolate[®], Merseptyl[®])
- La mercuréscéine sodique ou merthiomine (Mercurochrome) ;
- Le nitrate de phénylmercure (Merfène) ;
- Le mercurobutol (Mercryl[®]).

3.6.2 Dérivés de l'argent (26)

Ils doivent, semble-t-il, leur activité à l'ion Ag^+ qui se fixe sur divers groupements des protéines (notamment enzymatique) et de l'ADN.

On utilise divers sels minéraux et organiques (surtout le nitrate, parfois le tartrate, le lactate), les protéinates d'argent et l'argent colloïdal.

Un complexe argent-sulfadiazine est proposé dans le traitement des brûlures.

3.6.3 Dérivés du cuivre et du zinc

Ils sont aujourd'hui peu employés. On utilise encore l'association sulfate de cuivre et sulfate de zinc sous forme d'eau de Dalibour ou de pommade de Dalibour.

Le sulfate de zinc est présent dans la formule de divers collyres et préparation à usage ophtalmique (26).

3.7 Les Agents tensioactifs (26, 53)

On les appelle aussi des surfactifs, ce sont des composés bipolaires, hydrosolubles dont la molécule comporte un pôle hydrophobe et un pôle hydrophile. Trois types de surfactifs selon leur charge électrique.

3.7.1 Tensioactifs cationiques de charge positive

Ils sont les plus importants. Ce sont des ammoniums quaternaires, de structure pentavalente avec un azote dont l'un des radicaux fixés sur cette sur cette chaîne est une longue chaîne carbonée linéaire ou cyclique.

Exemple :

- Bromure de cétyltriméthyl ;
- Ammonium (Cétavlon[®]);
- Bromure de cethexonium (Biocidan[®]);
- Chlorure de benzalkonium (Sterlane[®]);
- Chlorure de cétylpyridinium.

3.7.2 Tensioactifs cationiques de charge négative

Ils sont surtout des détergents ; leur activité est modérée. C'est pourquoi, ils sont utilisés en association pour renforcer l'action d'autres antiseptiques en favorisant leur dissolution ou leur préparation. D'où certaines associations comme le Mercryl Laurylé[®], mélange de lauryl sulfate de sodium et du mercurobutol (53).

3.7.3 Tensioactifs amphotères

Le pôle hydrophile comporte à la fois une charge positive et une charge négative.

Ces tensioactifs sont plus actifs sur les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif. *Pseudomonas* ou *Serratia* peuvent se développer dans les solutions de ces produits (26).

3.8 Les savons

Ce sont des sels sodiques ou potassiques d'acide gras de poids moléculaire élevé. Comme exemple, on peut citer :

- Acide oléique
- Acide linoléique
- Acide ricinoléique.

Le ricinoléate de sodium possède des propriétés antiseptiques propres, et est utilisé en hygiène buccopharyngée (53).

3.9 Les Phénols

Découverts par **LISTER** en **1867**, les composés phénoliques sont doués de propriétés bactériostatiques ou bactéricides marquées grâce à leur fonction phénol.

Ces composés sont remplacés actuellement par des antiseptiques moins caustiques.

Sels de sodium et de potassium potentialisent leur action tandis que les matières organiques les inhibent (26).

3.10 La Chlorhexidine

C'est un antiseptique à large spectre appartenant à la famille des Biguanides et est souvent employé sous forme de sels solubles. On utilise le digluconate (Hibitane[®]) en solution aqueuse ou alcoolique où son activité est meilleure.

Les matières organiques, les pH alcalins et les tanins les inhibent alors que les ammoniums quaternaires les renforcent (26).

La chlorhexidine est active sur les bactéries à Gram positif et sur le *Candida albicans*.

Sa toxicité en cas de contact accidentel avec la cornée au cours de son utilisation cutanée (Hibiclens[®]) a été signalée par PHINNEY (60).

La chlorhexidine est utilisée en contactologie à de faibles concentrations (0,005 à 0,01%) auxquelles elle est moins toxique que le chlorure de benzalkonium. La dilution ne doit pas être réalisée avec du sérum physiologique car elle précipite avec les chlorures (64).

3.11 Les Carbanilides

Ce sont des diphenylurées. Le trichlorocarbanilide, le dérivé trichloré est le plus utilisé (9) et constitue le principe actif de plusieurs spécialités : Cutisan[®], Nobacter[®], Septivon[®], Solubacter[®]). C'est un antiseptique bactériostatique actif seulement sur les bactéries à Gram positif et de façon minime sur les bacilles Gram négatif. L'association avec les savons et les détergents est favorable (38, 39).

3.12 Les Salicylanides

Les salicylanides (ou salicylanilides) sont des amides de l'acide salicylique et d'aniline. Ce sont les dérivés di et tribromés qui sont les plus utilisés. Nous avons aussi des dérivés chlorés et difluorométhylés.

Ces produits sont souvent utilisés en association avec les phénols et les ammoniums quaternaires. Ce sont des antiseptiques bactériostatiques qui agissent surtout sur les bactéries Gram positif et sont de toxicité faible. Ce sont des produits sous forme de savons (26, 66).

3.13 Hexamidine

L'hexamidine (Hexomidine[®]) est un antiseptique actif surtout sur les bactéries Gram positif (13).

3.14 Les Colorants

Ce sont des antiseptiques bactériostatiques à usage local pour la plupart d'entre eux mais certains sont utilisés par voie digestive. Plusieurs séries chimiques peuvent être distinguées :

- Les dérivés du triphénylméthane

- Vert malachite, vert brillant : utilisés dans le traitement des plaies superficielles ;
- Violet de gentiane : désinfectant à usage externe.

Ces antiseptiques sont actifs sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif.

- Les dérivés de l'acridine (aminacrine, poflavine, diflavine, acriflavine) : ne sont que bactériostatiques aux concentrations d'utilisation.
- L'éosine est un dérivé de la fluorescéine dont l'activité antibactérienne est très faible (9).

3.15 8-hydroxy-quinoléine

Ce sont des antiseptiques à large spectre, bactériostatiques, plus actifs sur les bactéries à Gram positif.

Leur activité serait liée à leur pouvoir chélateur sur les ions métalliques. Leur particularité réside dans le fait que certains sont utilisés comme antiseptiques de la peau et des muqueuses (8-hydroxy-quinoléine, oxyquinol et le chlorquinaldol) par contre d'autres sont utilisés pour le traitement d'infections urinaires intestinales (nitroscoline, clioquinol, méthyloxine, chlorquinaldol, broxyquinoline) (25).

4/ LA RESISTANCE MICROBIENNE A L'ACTION DES ANTISEPTIQUES ET DES DESINFECTANTS

Les microorganismes ont un pouvoir d'adaptation considérable dont l'une des manifestations la plus spectaculaire concerne les agents inhibiteurs.

Ainsi, un agent antimicrobien que ce soit un antibiotique, un antiseptique ou un désinfectant n'a pas une activité identique sur tous les microorganismes, certains étant sensibles et d'autres résistants à son action.

La sensibilité et la résistance microbiennes sont des notions basées sur l'éventail des réponses des différentes espèces ou souches aux antimicrobiens.

Les réponses sont déterminées dans des conditions précises concernant les paramètres qui interviennent sur l'activité propre des produits.

Parmi ces conditions, le pH, la température, la présence de substances organiques peuvent modifier fortement l'activité des antiseptiques et des désinfectants.

D'une manière générale, la réponse d'un microorganisme à un antimicrobien est définie in vitro par deux valeurs : la concentration minima inhibitrice (**CMI**), plus faible concentration du produit qui inhibe totalement en 18 ou 24 heures la multiplication du microorganisme, et la concentration minima létale (**CML**) plus faible concentration du produit capable de détruire un certain nombre de cellules du microorganisme dans un temps déterminé.

Une population microbienne est résistante à un antiseptique ou à un désinfectant quand la CML (ou la CMI) de ce produit vis à vis de la plupart des populations microbiennes.

On considère deux niveaux dans l'intensité de la résistance microbienne suivant les conséquences pratiques qui en découlent : les bas niveaux de résistance et hauts niveaux de résistance.

Les premiers correspondent à des CML inférieures à la concentration requise d'utilisation du produit. L'incidence pratique de cette résistance est faible puisque le produit est toujours actif dans les conditions normales d'utilisation sur le microorganisme.

Il peut exister cependant dans ce cas, un risque non négligeable d'échec lors de l'utilisation du produit soit que le microorganisme continue à s'adapter pour atteindre un haut niveau de résistance, soit que le produit est utilisé dans des conditions limitant son activité (présence de substances interférentes...).

Les hauts niveaux de résistance correspondent à des CML supérieures à la concentration requise d'utilisation.

L'incidence pratique est alors considérable puisque le produit inactif et que le microorganisme peut être sélectionné à son contact.

Dans le cas des antiseptiques et des désinfectants, la CML est spécifiée en fonction de chaque type de micro-organisme. Ainsi pour les bactéries, il s'agit de la concentration minima bactéricide (CMB) qui, selon l'AFNOR, est définie comme la plus faible concentration du produit capable de tuer in vitro (dans les conditions totalement standardisées) en 5 minutes 10^5 bactéries par ml dans une population en contenant 10^8 par ml.

Les valeurs des CMI et des CMB des antiseptiques et des désinfectants vis-à-vis des principales espèces peuvent être déterminées avec précision grâce à des méthodes standardisées. Les travaux réalisés à ce sujet permettant de faire un bilan relativement satisfaisant de la sensibilité et de la résistance des principales espèces.

Par contre, les données sont rares et fragmentaires en ce qui concerne les virus, les levures ou moisissures et les spores bactériennes, essentiellement pour des raisons méthodologique et technique.

On distingue deux types de résistance microbienne aux antimicrobiens : la résistance intrinsèque ou naturelle et la résistance acquise.

4.1 LA RESISTANCE INTRINSEQUE OU NATURELLE

La résistance intrinsèque ou naturelle est une caractéristique innée des cellules appartenant à une espèce microbienne ou à un groupe d'espèces. Elle est immuable à de très rares exceptions près (mutants devenant sensibles).

Elle est donc prévisible, c'est une caractéristique stable de certaines espèces ou groupes microbiens vis-à-vis d'un antimicrobien.

Cette résistance naturelle permet de définir le spectre d'activité qui rassemble pour un produit donné (ou un groupe de produits) les espèces naturellement sensibles et naturellement résistantes. Un résumé du spectre d'activité des différents antiseptiques et désinfectants est donné dans ce tableau.

Tableau IV : Spectre d'activité antimicrobienne des antiseptiques et des désinfectants

	Bactéries à Gram		Mycobactéries	Spores bactériennes	Levures ou champignons
	Positif	Négatif			
Alcool 70°	++	++	++	0	+
Aldéhydes	+++	+++	++	+	+++
Ammoniums	+++	+	0	0	+

4aires					
Carbanilides	+	0	NP	NP	0
Chlorhexidine	+++	++	0	0	+
Chlore	+++	+++	++	++	++
Hexachlorophène	+++	+	0	0	+
Iode	+++	+++	++	++	++
Dérivés mercuriels	++	++	0	0	+

Phénoliques Activité variable selon les composés

Légende

Activité létale forte : + + +

moyenne : + +

faible : +

nulle : 0

non précisé : NP

La structure de la surface du microorganisme intervient beaucoup sur sa résistance naturelle.

Ainsi les bactéries à Gram négatif possèdent une enveloppe externe sont plus résistantes que les bactéries à Gram négatif ne possédant pas une telle membrane.

Les mycobactéries dont la paroi comporte une structure externe très dense protectrice ont une résistance naturelle particulièrement importante.

Dans un même groupe structural, les variations peuvent être importantes. Ainsi parmi les bacilles à Gram négatif, les *Pseudomonas* et en particulier

Pseudomonas aeruginosa sont naturellement plus résistants que la plupart des entérobactéries. D'autre part des variations, l'ampleur et la fréquence sont souvent moindres que dans le cas précédent, sont également possibles dans une même famille en fonction des genres ou espèces.

C'est ainsi que *Klebsiella pneumoniae* est moins sensible à l'hexétidine et à la chlorhexidine que *Escherichia coli*.

Le **tableau V** donne une illustration de ces phénomènes sous forme de CMI.

Tableau V : Activité comparée de quelques antiseptiques et désinfectants sur des
souches bactériennes

	CMI (mg/l)			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Alcool phényléthylique	1250	2500 - 5000	2500	2500

Chlorocrésol	625	1250	1250	625
O-phényl-phénol	100	1000	500	500
Hexachlorophène	0,5	250	12,5	12,5
Triclosan	0,1	> 300	5	5
Héxétidine	0,4 – 12,5	100 – 300	64 - 425	> 10.000
Chlorhexidine	0,5 – 1	5 – 60	1	5 – 10
Chlorure de benzalkonium	0,5	250	32	32
Cetrimide	4	64 - 128	16	16
Thiomersal	0,2	8	4	4
Nitrate de phénylmercure	0,1	1 – 5	0,5	0,5

Ainsi, la résistance intrinsèque de la cellule bactérienne apparaît corrélée au type de structure externe de cette cellule.

La présence d'une enveloppe externe (bactéries à Gram négatif) ou d'une couche de cires (mycobactéries) l'augmente en général très significativement.

Mécanisme de la résistance intrinsèque

Le site d'action le plus important des antiseptiques et des désinfectants est la membrane cytoplasmique. La membrane est altérée ou détruite ce qui a pour conséquence la perte par la cellule de ses constituants vitaux.

Par ailleurs de nombreuses enzymes membranaires sont inactivées et le métabolisme respiratoire. Ces effets sont le plus souvent létaux mais leur intensité est fonction de la concentration du produit.

La membrane cytoplasmique bactérienne a la sensibilité aux antiseptiques et désinfectants qu'il s'agisse d'une bactérie à Gram positif ou d'une bactérie à Gram négatif, voire d'une mycobactérie.

La résistance intrinsèque est donc en relation avec le degré de protection de la membrane cytoplasmique dans la bactérie (65).

Chez les bactéries à Gram positif, elle est presque directement en contact avec le produit car il se fixe sur la couche de peptidoglycane revêtue d'acides techoïques et de lipides à laquelle la membrane cytoplasmique est intimement liée.

Chez les bactéries à Gram négatif au contraire, la membrane cytoplasmique n'est pas liée au peptidoglycane et surtout l'enveloppe externe constitue un écran important. Sa structure est assez différente de celle de la membrane cytoplasmique ; elle contient en particulier moins de phospholipides, plus de protéines et le lipopolysaccharide (LPS) (13).

Pour être actif, le produit doit se fixer sur l'enveloppe externe et la traverser.

Ces phénomènes sont fonction de la structure et de la polarité de la molécule d'une part et d'autre part de la composition de l'enveloppe. En effet, les molécules hydrophobes interagissent avec le LPS et les lipides tandis que les molécules hydrophiles dépendent également des porines qui leur sont indispensables pour traverser la membrane.

Chez les souches résistantes ces mécanismes sont affectés, voire totalement inhibés.

L'enveloppe externe est donc une barrière de perméabilité très importante dans laquelle la structure du LPS et sa teneur ainsi que la densité et la surface des canaux de porines sont des éléments prédominants.

Leur rôle dans la résistance naturelle a été démontré en étudiant des souches chez lesquelles ces structures ont été modifiées qualitativement et

quantitativement grâce à des variations génotypiques (mutants, acquisition de plasmides) ou phénotypiques ou par des moyens chimiques.

Ainsi des mutants *d'Escherichia coli* et de *Salmonella typhimurium* ayant un LPS modifié dans sa structure et diminué quantitativement sont plus sensibles que la souche sauvage, en particulier aux ammoniums quaternaires (64, 65).

Ces particularités permettent de comprendre les raisons de la plus grande résistance de *Pseudomonas aeruginosa* (52).

Ainsi les canaux des porines sont plus étroits que chez les entérobactéries si bien que les substances hydrophiles sont absorbées d'une façon plus sélective (83).

La résistance intrinsèque ou naturelle aux antiseptiques et aux désinfectants est donc un phénomène important qui dépend du microorganisme et du type de molécule.

Elle entraîne l'inactivité totale ou partielle d'un produit ou plus souvent d'une famille de produits. Elle est prévisible et d'intensité constante pour un principe actif et une espèce microbienne donnée si bien qu'elle permet de définir pour chaque produit un spectre d'activité et de rationaliser les associations de principes actifs de manière à mettre au point des formules ayant le spectre d'activité le plus étendu possible.

Elle représente un danger quand, chez certains microorganismes, son niveau vis-à-vis d'un produit est proche de la concentration active de ce produit.

En effet, celui-ci peut en principe être utilisé mais une baisse légère de son activité peut rendre ces microorganismes insensibles. Il s'agit d'un danger non négligeable car les circonstances diminuant l'activité des antiseptiques et des désinfectants sont nombreuses : présence d'inhibiteurs des principes

actifs, mauvaise conservation, microorganismes constituant un biofilm (18, 43, 71)

Parmi les bactéries, les bacilles à Gram négatif opportunistes dont les *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. cepacia*...), les *Proteus* indole positifs et *Providencia* et les mycobactéries sont généralement impliqués dans ces phénomènes.

Chez les bacilles à Gram négatif, l'essentiel de la résistance intrinsèque est dû à la présence de l'enveloppe externe. Les structures moléculaires impliquées et les interactions mises en jeu sont à notre avis insuffisamment étudiées car leur connaissance devrait permettre d'améliorer les principes actifs et les formulations des antiseptiques et des désinfectants pour obtenir une meilleure activité et donc une diminution du niveau de la résistance intrinsèque.

Dans le cas des autres micro-organismes et en particulier des mycobactéries et des virus, les connaissances sont encore moins avancées malgré l'urgence de lutter efficacement contre certains d'entre eux.

4.2 LA RESISTANCE ACQUISE

Elle est due à un événement imprévisible qui, au sein d'une espèce microbienne de sensibilité homogène à un antimicrobien, a pour conséquence l'apparition d'une souche (ou de quelques) de cette espèce ayant une sensibilité diminuée. Quand les concentrations actives du produit sur la souche devenue résistante sont supérieures à celles habituellement utilisées, cette souche pourra être sélectionnée lors de l'utilisation du produit.

Ce phénomène est bien connu et il est surveillé en permanence dans le cas des antibiotiques actifs sur les bactéries ou sur les levures (antibiotiques

fongicides) car il crée un problème majeur pour le traitement des infections par ces micro-organismes.

La résistance acquise aux antimicrobiens est due à des variations génétiques se produisant chez de rares souches dans une population microbienne constituée d'une seule espèce. Ces variations se traduisent par des modifications biochimiques de la cellule qui ont pour conséquence la diminution de la sensibilité.

La résistance acquise est donc la résultante d'un mécanisme génétique ayant pour base soit le noyau de la cellule (résistance acquise chromosomique), soit un plasmide (résistance acquise extrachromosomique ou plasmidique), et d'un mécanisme biochimique. Ces deux mécanismes sont liés et complémentaires car l'événement génétique est indispensable et la modification biochimique qui en résulte détermine l'intensité et la spécificité de la résistance.

Les antiseptiques et les désinfectants, comme les autres antimicrobiens sont exposés au phénomène de résistance acquise. Cependant son importance apparaît actuellement plus restreinte que dans le cas des antibiotiques spécifiquement actifs sur les bactéries ou sur les levures. Néanmoins, un certain nombre d'observations permet de faire le point sur les mécanismes mis en jeu et sur l'épidémiologie de ces résistances.

4.2.1 La résistance acquise chromosomique aux antiseptiques et aux désinfectants.

L'événement a lieu spontanément sur un gène du noyau de la cellule bactérienne. Il s'agit d'une mutation qui conduit à une modification stable et héréditaire du gène concerné.

Le produit du gène muté est lui-même modifié. S'il intervient dans l'activité de l'antimicrobien, cette dernière sera presque toujours diminuée et la cellule dans laquelle la mutation s'est produite deviendra résistante.

Généralement la résistance est acquise lorsque la mutation a lieu sur des gènes structuraux de la cellule qui codent soit pour un élément de la cible, soit pour un élément de fixation ou de perméation du produit.

Dans le cas des antiseptiques ou des désinfectants et chez les bactéries, les quelques études validées montrent que ce dernier élément est pratiquement toujours impliqué. Il s'agit donc dans la majorité des cas d'une acquisition de résistance due à des modifications de la membrane externe chez des bactéries à Gram négatif.

Le mécanisme biochimique de la résistance chromosomique bactérienne a donc pour base principale, sinon exclusive, une modification de la membrane cellulaire empêchant la fixation ou la pénétration du produit.

Chez le mutant, la composition de la membrane externe est différente par rapport à celle de la souche sauvage naturelle.

Ainsi chez des mutants de *Serratia marcescens* résistants au chlorure de benzalkonium, la membrane externe est constituée de 30% de lipides neutres alors que leur proportion normale chez cette espèce est de 5% (16). Cet excès empêche la fixation du produit qui redevient actif sur la même souche. Elle est en relation avec d'autres espèces (*Pseudomonas cepaciae*, *Providencia stuarti*...) avec une modification de l'hydrophobicité de la surface cellulaire (27, 56).

L'incidence de ces modifications sur la fixation des produits, voire sur leur pénétration quand ils empruntent la voie hydrophobe est évidente. L'autre possibilité est une mutation des gènes codant pour les porines, entraînant des modifications qualitatives et quantitativement de ces protéines.

De tels mutants ne semblent pas avoir été observés à l'état naturel. Par contre ils peuvent être obtenus au laboratoire (7, 64).

La résistance chromosomique peut en effet être obtenue expérimentalement en réalisant la croissance de souches sensibles en présence de concentrations sublétales croissantes d'un antiseptique ou d'un désinfectant. Les produits pour lesquels l'acquisition de résistance a été possible dans ces conditions sont variés : chlorhexidine, ammoniums quaternaires, eau oxygénée, formol (45), chloramine 80 et formol (80), chlorhexidine et polyvinyl – pyrrolidone iodée (54)...

Les bactéries pouvant acquérir une résistance par ces procédés sont des bacilles à Gram négatif opportunistes (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia*...) plus rarement des Staphylocoques.

Le niveau de résistance maximum obtenu et le nombre de passages nécessaires à cet effet dépendent du produit et de l'espèce bactérienne.

L'acquisition de la résistance s'accompagne dans toutes ces expériences d'un changement des propriétés de surface des cellules mesurables par leur degré d'hydrophobicité et par des variations de leur teneur en acides gras, lipides ou composés ioniques. Cependant, il est important de remarquer que ces phénomènes sont parfois spontanément réversibles. En effet, après des cultures répétées en absence du produit, certaines bactéries peuvent retrouver leur sensibilité initiale (45, 54). L'acquisition de la résistance dans ces conditions expérimentales peut donc être instable et réversible lorsque l'agent sélectionnant n'est plus présent. Cette instabilité limite probablement l'importance sur le plan pratique de telles bactéries résistantes. Par ailleurs sur le plan des bases génétiques du phénomène l'instabilité et la réversibilité observées infirment une variation mutationnelle au sens strict. Il pourrait s'agir d'un phénomène adaptatif gouverné par des gènes chromosomiques.

4.2.2 La résistance extra-chromosomique aux antiseptiques et désinfectants

Les souches microbiennes ayant acquis une résistance extra-chromosomique hébergent des plasmides R (facteurs de résistance).

Ces éléments génétiques sont fréquents chez les bactéries. Ce sont de petites molécules d'ADN, indépendantes de l'ADN chromosomique (ADN extra-chromosomique) mais qui sont conservées dans la descendance d'une bactérie car elles ont une réplication autonome régulée avec celle du chromosome. Par ailleurs, les plasmides peuvent se transmettre d'une bactérie à une autre (plasmides autotransférables) grâce à des processus de transfert particulièrement efficaces chez les bacilles à Gram négatif et chez les Staphylocoques.

Les plasmides R véhiculent des gènes de résistance dont le produit confère la résistance à un ou plusieurs antibactériens. Rappelons également que des gènes plasmides peuvent beaucoup plus rarement être intégrés de manière réversible au chromosome de la bactérie qu'il s'agisse soit des gènes transposables soit de plasmide intégré. Ainsi, étant donné ces propriétés, la résistance plasmidique est infectieuse (en raison de sa transférabilité) et multiple (plusieurs gènes conférant chacun la résistance à un type d'antimicrobien sont portés par un même plasmide).

Dans le cas des antibiotiques antimicrobiens, la résistance extra-chromosomique est fréquente et variée, en particulier chez les bacilles à Gram négatif et chez les staphylocoques (32). Les différentes composantes des mécanismes mis en jeu sont bien étudiées sur le plan moléculaire et épidémiologique (structure des gènes, structure et propriétés des plasmides,

bases biochimiques de la résistance). Ces données sont encore très fragmentaires en ce qui concerne les antiseptiques et les désinfectants, probablement en raison de la faible incidence pratique actuelle des souches résistantes.

Aspects génétiques et biochimiques

Pour de gènes et de plasmides impliqués dans la résistance bactérienne aux antiseptiques et aux désinfectants sont décrits.

Les gènes *q.a.c* et les plasmides de la famille *p.s.k 1* mis en évidence chez des souches de *Staphylococcus aureus* et de *Staphylococcus epidermidis* et les gènes *mer* sont les éléments les mieux connus.

- Les gènes *q.a.c* et les plasmides *p.s.k*

Les gènes *q.a.c* sont présents chez des Staphylocoques multirésistants aux antibiotiques. Il s'agit généralement de souches de *S. aureus* résistants à la méthicilline (MRSA) ou de *S. epidermidis*. Quatre gènes *q.a.c* ont été identifiés : *q.a.c A*, *q.a.c B*, *q.a.c C*, *q.a.c D* (51). Ils gouvernent tous la résistance aux ammonium quaternaires (*q.a.c* = « quaternary ammonium compounds ») et pour la plupart à d'autres produits (49).

Les gènes *q.a.c A* et *q.a.c B* ont une grande homologie de leurs séquences nucléotidiques. Ils confèrent des niveaux de résistance élevés aux ammoniums quaternaires et aux agents intercalants et colorant (bromure d'éthidium et acriflavine). Le gène *q.a.c* est responsable en outre d'une résistance aux diamidines et à la chlorhexidine (49).

Les gènes *q.a.c C* et *q.a.c D* d'abord différenciés, sont maintenant considérés comme identiques (49). Ils confèrent une résistance dont le niveau

est plus faible que le précédent et qui concerne les ammoniums quaternaires et le bromure d'éthidium seulement.

En fait, il existe donc deux familles de gènes *q.a.c* chez les staphylocoques : la famille de *q.a.c A* et *q.a.c B* et la famille de *q.a.c C*. Le produit de *q.a.c A* ou de *q.a.c B* est une protéine ayant un poids moléculaire d'environ 50Kda et constituée de 514 acides aminés, la protéine codée par *q.a.c C* en comprend seulement 110.

Dans les deux cas, cependant, les protéines ont les mêmes propriétés conférant la résistance.

Elles provoquent l'efflux de l'antimicrobien ; cette activité est dépendante de la force motrice des protons et s'exerce vis-à-vis des produits cationiques et lipophiles (49).

Les plasmides vecteurs de gènes *q.a.c* sont largement répandus chez les staphylocoques multirésistants.

Pour *q.a.c A* et *q.a.c B*, ce sont surtout les plasmides transférables de la famille de *p.s.k1* ; certains d'entre eux portent également les gènes responsables de la résistance aux antibiotiques tels que les pénicillines, les aminosides ou le triméthoprim et à des métaux lourds (74).

Les gènes *q.a.c C* ou *q.a.c D* peuvent être portés par de petits plasmides non transférables (*q.a.c C*) ou de grands plasmides conjugatifs (*q.a.c.D*) codant également pour la résistance aux aminosides (49). Dans de rares cas, *q.a.c.A* peut être intégré au chromosome chez des souches de *S. aureus* (37).

- Les gènes *mer*

La résistance aux dérivés mercuriels est, chez les bactéries, aussi fréquente que la résistance aux antibiotiques.

Carbone-mercure dans le cas d'un composé organique du mercure et aussi de plusieurs gènes de régulation (*mer D*) ou de transport (*mer P* et *mer T*).

Les opérons *mer* contenant à la fois les gènes *mer A* codant pour l'HR et *mer B* codant pour l'OL sont dits à spectre large car les composés organiques et minéraux du mercure peuvent être transformés en mercure métallique inoffensif pour la bactérie.

Le plus étudié est celui porté par le plasmide R 831 b du groupe d'incompatibilité Inc M.

Les opérons *mer* ne contenant que le gène *mer A* sont dits à spectre étroit.

Deux sont très étudiés : l'un est associé au transposon Tn 501 porté des plasmides du groupe d'incompatibilité Inc F II, l'autre au transposon Tn 501 d'abord mis en évidence sur des plasmides chez *Pseudomonas aeruginosa*. Ils constituent en particulier des modèles très intéressants pour l'étude des mécanismes de régulation de la transcription (50).

Chez les bactéries à Gram positif, la résistance au mercure est également fréquente. Le plasmide pI 258 isolé chez *S. aureus* est le modèle le plus étudié. Il comprend les régions *mer A* codant pour l'HR et *mer B* codant pour l'OL et le gène de régulation *mer R* (73, 81).

Mer A et *mer B* sont adjacents sur pI 258 et n'hybrident pas avec les gènes codés par les transposons Tn 21 et Tn 501 des bactéries à Gram négatif. L'HR a une séquence d'acides aminés différente de celle codée par Tn 21 mais présente avec cette dernière des zones de grande homologie au niveau du site actif et du domaine de liaison FAD et au NADPH (72).

Aspect épidémiologique

Parmi les dix principales familles d'antiseptiques et de désinfectants largement utilisés, la résistance plasmidique est inégalement répartie et décrite.

Elle est bien documentée sur le plan moléculaire en particulier en ce qui concerne d'une part les sels de mercure (*gènes mer*), et d'autre part les ammoniums quaternaires et les colorants (*gènes q.a.c*).

Un résumé de principales résistances actuellement décrites est donné dans le tableau III.

La grande majorité des résistances plasmidiques sont mises en évidence chez des souches de *S. aureus*, d'entérobactéries et de *Pseudomonas aeruginosa* responsables d'infections nosocomiales.

Chez ces bactéries, les gènes de résistance peuvent être associés sur un même plasmide à des gènes de résistance aux antibiotiques (**44, 55, 72**).

Il y a dans ce cas un risque de sélection croisée de souches résistantes soit par l'utilisation de l'un des antiseptiques (ou désinfectants), soit par celle des antibiotiques vis-à-vis desquels elles sont résistants (**44**).

Tableau VI : Résistances plasmidiques aux antiseptiques et désinfectants

Familles	Bactéries	Mécanisme génétique et biochimique
<u>Ammoniums quaternaires</u>	<i>S. aureus</i> <i>Staphylococcus spp</i> <i>E. coli</i> <i>k. pneumoniae</i>	Gènes <i>q.a.c</i> plasmides <i>p.s.k</i> efflux augmenté
<u>Métaux lourds</u>		
<u>Phénols</u>		
- Hexachlorophène	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> <i>Salmonella spp</i> <i>S. aureus</i>	Plasmides Modification de surface
- Triclosan		
<u>Biguanides</u>		
- Chlorhexidine	<i>Pseudomonas</i>	Gènes <i>q.a.c</i> plasmides <i>p.s.k</i> efflux augmenté
<u>Colorants</u>		
- Sels d'acridine	<i>S. aureus</i>	Gènes <i>q.a.c</i> plasmiques <i>p.s.k</i> efflus augmenté
- Bromure d'éthidium		

<u>Amidines</u>	<i>S. aureus</i>	Gènes <i>q.a.c</i> plasmides <i>p.s.k</i> efflux augmenté
<u>Aldèhydes</u>	<i>S. marcescens</i>	Déshydrogénase

Tableau VII : Les classes de résistance plasmidiques aux dérivés mercuriels :

répartition chez les espèces bactériennes

Espèces bactériennes	Résistance à	
	Hg ⁺⁺	R – Hg ⁺
<i>S. aureus</i>	+	+
<i>E. coli</i>	+	+
<i>S. typhimurium</i>	+	+
<i>K. pneumoniae</i> / <i>Serratia spp</i>	+	+
<i>Proteus spp</i> / <i>Providencia spp</i>	+	-
<i>P. aeruginosa</i>	+	+

Hg⁺⁺ : dérivés minéraux du mercure

R – Hg⁺ : dérivés organiques du mercure

+

 : résistance plasmidique

-

 : absence de résistance plasmidique

Tableau VIII : Résistances plasmidiques aux métaux lourds autre que le mercure

Métal	Bactéries hébergeant le plasmide
Argent (Ag^{++})	<i>E. coli</i> <i>Salmonella typhimurium</i>
Arsenic (As^{+++}) et Antimoine (Sb^{+++})	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>
Cadmium (Cd^{++})	<i>S. aureus</i> <i>Alcaligenes eutrophus</i>
Cobalt (Co^{++})	<i>E. coli</i>
Cuivre (Cu^{++})	<i>E. coli</i>
Nickel (Ni^{++})	<i>E. coli</i>
Plomb (Pb^{++})	<i>S. aureus</i>
Zinc (Zn^{++})	<i>S. aureus</i>

Chez les bactéries à Gram négatif, les gènes de résistance au mercure sont organisés en opéron. L'opéron mer comprend le gène de régulation mer TP qui code pour le transport du mercure mercurique (Hg^{++}) à travers la

membrane et le gène mer A qui produit une réductase NADPH dépendante (HR) capable de réduire Hg^{++} en sa forme métallique volatile Hg^0 .

D'autres gènes additionnels peuvent compléter cet ensemble. Il s'agit surtout de gène mer B qui produit une enzyme inductible, l'organomercurelyase (OL), capable de couper la liaison.

CHAPITRE II : METHODES D'ETUDES DE L'ACTIVITE IN VITRO **DES ANTISEPTIQUES SUR LES BACTERIES ET LES** **CHAMPIGNONS**

1/ PRINCIPALES METHODES

1.1 METHODE DU COEFFICIENT PHENOL

Cette méthode ancienne utilise le phénol comme désinfectant standard et le bacille typhique comme germe-test. Ce choix date de l'époque où le principal désinfectant en usage était le phénol et la maladie infectieuse la plus répandue, la fièvre typhoïde.

La technique consiste à comparer dans les conditions identiques l'action d'une série de dilution de la substance à tester sur la croissance de *Salmonella typhi* par rapport à celle d'une série de dilution du phénol.

Cette méthode qui a longtemps prévalu est critiquable, d'une part parce que l'action du phénol sur les microorganismes n'est pas obligatoirement comparable à celle du désinfectant que l'on étudie et, d'autre part, parce que la sensibilité du bacille typhique choisi comme souche standard n'est pas nécessairement la même que celle d'une autre espèce (23).

1.2. METHODE DITE DES PORTE-GERMES

Les bactéries sont fixées sur des substances inertes dites porte-germes puis mises au contact du désinfectant à étudier ou de ses dilutions durant un temps donné.

On recherche par culture si les micro-organismes ont résisté ou survécu à l'agent antimicrobien.

Ces portes-germes sont des bandelettes de papier filtre de qualité standard que l'on immerge dans une culture de 24 heures en bouillon d'une bactérie-test.

Ils sont utilisés tels quels à l'état humide ou après dessiccation durant 24 heures à 37°C (23).

1.3. METHODE DE FILTRATION SUR MEMBRANE

Cette méthode est fondée sur la filtration des différentes concentrations d'antiseptiques ou de désinfectants en présence de l'inoculum bactérien.

Ces membranes, lavées plusieurs fois sont ensuite déposées sur un milieu de culture contenant le neutralisant.

La méthode de filtration sur membrane est en général choisie en l'absence de neutralisant efficace, plusieurs lavages pouvant suffire pour éliminer l'antiseptique.

Elle permet d'apprécier la vitalité de toutes les bactéries mises en contact de l'antiseptique mais ne convient pas pour les antiseptiques non filtrables (47, 68).

1.4. METHODE D'ETUDE PAR UN ENSEMENCEUR A SITES MULTIPLES

On utilise un enseigneur en Plexiglas comportant 32 tiges de 3 mm de diamètre. Ces tiges immergées à 0,5 cm dans un liquide aqueux transportent une goutte qui, déposée sur une plaque d'agar, donne un spot d'environ 6 à 7 mm de diamètre. On dispose également de plaques en Plexiglas creusées et 64 cupules pouvant contenir 1ml de liquide aqueux.

Pour chaque expérience on dispose :

- de 2 enseigneurs
 - l'un pour mettre l'inoculum au contact de l'antiseptique
 - l'autre pour répliquer les survivants ;
- de 2 plaques
 - l'une qui reçoit les inocula
 - l'autre qui contient les différentes dilutions de l'antiseptique et du tampon pH 7 (pour la numération des bactéries de l'inoculum).

Ce matériel, après lavage soigneux, est stérilisé à l'oxyde d'éthylène ou par irradiation.

La technique de l'enseigneur à sites multiples a été adaptée à la recherche de la Concentration Minima Bactéricide (CMB) des antiseptiques ; la CMB correspond à une bactéricidie de 99,99%.

La méthode donne des résultats comparables à ceux de la classique méthode des suspensions bactériennes et à ceux de la filtration sur membrane.

Elle permet soit d'étudier l'activité d'une même substance sur un grand nombre de souches, soit de comparer simultanément plusieurs substances (30).

1. 5. METHODE DE DENOMBREMENT

Sur les équipements des industries alimentaires ou des laboratoires, l'action des désinfectants est appréciée par un dénombrement des germes à l'aide d'un procédé suivant :

1. 5.1 Méthode des empreintes

On utilise du ruban adhésif dont on applique une surface mesurée sur le matériau à examiner.

On le fait adhérer par pression de la main puis, l'ayant détaché, on le dépose sur un milieu de culture gélosé et sec durant quelques dizaines de secondes.

Après incubation à la température optimale de culture des bactéries sont recherchées, on dénombre les colonies. Cette méthode donne d'excellents résultats pour rechercher les salmonelles, les staphylocoques pathogènes, les streptocoques, les entérobactéries à l'aide de milieux sélectifs.

Les techniques plus récentes comme le pétrifilm permettent une récupération directe des germes sur un substrat de culture (38).

1.5.2 Détermination de l'activité bactéricide après neutralisation de l'antiseptique

La méthode de dilution-neutralisation est maintenant utilisée pour supprimer les effets bactériostatiques, fongostatiques... des produits antiseptiques.

L'efficacité du neutralisant doit être appréciée au cours d'un essai préliminaire. Ce n'est qu'après ce test que l'on peut passer à l'essai proprement dit et déterminer la concentration minimale bactéricide simple et en présence de substances interférentes (38).

1.5.3 Méthode par écouvillonnage

Pour l'examen des surfaces irrégulières, on a recours à des écouvillons de coton hydrophile ou d'alginate de sodium. On mouille préalablement les zones à explorer. Dans ces conditions on arrive à récupérer 50% des micro-organismes (23).

1.5.4 Epreuve de rinçage

L'épreuve de rinçage permet de rechercher d'une façon pratique l'action des ammoniums quaternaires sur des surfaces contaminées. Elle consiste à utiliser de petits gobelets que l'on remplit en premier lieu avec du lait écrémé auquel, on ajoute un mélange de *Staphylococcus aureus* et d'*Escherichia coli*. Après 15 mn de contact le gobelet est vidé, rempli avec la solution d'ammonium quaternaire puis vidé à nouveau.

On dénombre les bactéries présentes sur les parois internes après écouvillonnage et culture.

Le même essai est réalisé sur un gobelet témoin sans antiseptique (23).

2/ FACTEURS PHYSIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES INFLUANT SUR L'ACTIVITE DES ANTISEPTIQUES.

Dès leurs premiers travaux plusieurs auteurs ont pris conscience du rôle du milieu environnant et de divers facteurs sur la détermination de l'activité des antiseptiques et désinfectants (8).

Diverses tentatives ont abordé l'étude des lois de la désinfection (42), mais il est vite apparu qu'aucune loi générale ne pouvait être établie : non seulement chaque principe actif se comporte comme une entité particulière, mais encore, toute association avec d'autres substances (actives ou non) et toute modification de paramètre expérimental modifie la loi régissant l'activité du produit en fonction de la concentration et du temps d'exposition.

Néanmoins, un certain nombre de données a été établi, qui doivent être connues de l'expérimentateur pour une bonne interprétation d'un essai. Les facteurs les plus importants qui influent sur l'activité des antiseptiques et désinfectants sont au nombre de cinq.

2.1 LA CONCENTRATION

D'un produit à l'autre, l'effet de la dilution est extrêmement variable.

Le coefficient de dilution ou exposant concentration « n » qui correspond à la pente de la droite représentant le temps d'action du produit en fonction de sa concentration (ordonnées logarithmiques) est d'autant plus élevé que la perte

d'activité par dilution est grande.

L'exposant concentration peut varier de 10 (pour les phénols, alcools) à 1 (mercuriels, ammoniums quaternaires) en passant par 2 pour la chlorhexidine (8)..

2.1 LA TEMPERATURE

D'une façon générale l'activité croît avec la température. Ce facteur joue de façon très variable d'un principe actif à l'autre (36).

2.2 LA PRESENCE DE MATIERE ORGANIQUE

Selon la nature de l'agent antimicrobien, l'interférence de la matière organique est imputable à une véritable réaction chimique (oxydation ou réduction notamment) qui consomme le produit actif, soit à des phénomènes d'adsorption de surface qui réduisent sa disponibilité pour les micro-organismes à atteindre.

C'est la raison qui a conduit les auteurs à introduire dans les essais d'abord du sang, du sérum ou du lait, puis pour mieux standardiser les conditions expérimentales, de l'extrait de levure et ou de l'albumine bovine.

Les oxydants (hypochlorites, iode etc.) et les produits chimiquement réactifs (phénols, acides etc.) sont particulièrement inhibés par la présence de protéines.

2.3 LES ELECTROLYTES

L'influence du pH est considérable, puisqu'il modifie à la fois les charges à la surface cellulaire et celles du produit lorsque la molécule active est ionisable. En général, seules franchissent les enveloppes cellulaires les formes non ionisées. Mais l'ionisation peut favoriser le passage des molécules possédant deux sites ionisables (33).

Il est souhaitable d'établir pour chaque formulation le pH optimal d'action et de s'assurer que les conditions d'utilisation normale du produit ne le placeront pas à un pH défavorable à son activité.

D'autres électrolytes, et notamment les ions bivalents (Ca^{++} et Mg^{++}) qui sont associés à la dureté de l'eau, interviennent de façon prépondérante dans l'activité des antiseptiques des et désinfectants (18).

D'une part, il peut se former des complexes insolubles ou inactifs entre les ions et les principes actifs chélateurs ; d'autre part, ces ions étant associés à l'organisation des bi-couches phospholipidiques qui constituent les membranes (membrane cytoplasmique et, chez les bactéries à Gram négatif, membrane externe), ils renforcent la cohésion de ces structures en limitant le passage transmembranaire (48, 56).

C'est la raison pour laquelle des agents complexants comme l'EDTA sont souvent associés aux formulations (64) afin de réduire l'interférence de l'eau dure sur l'activité bactéricide en particulier chez les bactéries à Gram négatif.

2.4 LES ADDITIFS ET COMPOSANTS DES EXCIPIENTS

Diverses macromolécules et notamment des polymères comme les polyvinyl pyrrolidones, des polyéthylène glycols ou des condensats d'alcools gras sont connues pour leur aptitude à réduire l'activité des agents antimicrobiens. Un effet retard est recherché (ex : PVP iodée), mais plus

souvent ces composés sont des additifs permettant de réduire la fluidité de la formulation et d'obtenir une viscosité satisfaisante pour l'usage prévu.

Lorsque des préparations moussantes sont formulées, divers tensio-actifs sont introduits. Certains d'entre eux (anioniques et cationiques notamment) possèdent des propriétés antibactériennes propres (18). D'autres sont plutôt des inhibiteurs de l'activité antimicrobienne et sont d'ailleurs souvent utilisés comme « neutralisants » dans les essais.

De par leurs propriétés physiques, toutes ces substances modifient considérablement l'activité des principes actifs.

CHAPITRE III : PROCEDURES DE VALIDATION ET DEFINITIONS **DE QUELQUES PARAMETRES DE VALIDATION (15)**

La définition des critères de qualité destinés à valider une technique de dosage a fait l'objet du travail d'un groupe d'experts.

Sur la base des données expérimentales provenant de l'application du protocole de validation de techniques et de l'exploitation des résultats de différents programmes de contrôle de qualité intra et interlaboratoires, des limites acceptables sont proposées.

Ces limites sont destinées à juger de la qualité d'une technique de dosage et à la valider en fonction de sa reproductibilité et de sa justesse.

Pour chaque analyte, sont rapportés le domaine de mesure, les valeurs applicables à titre indicatif, les trois niveaux de concentration des préparations de contrôle à utiliser pour l'évaluation ainsi que l'intervalle des valeurs dans

lequel elles peuvent être choisies et les limites de répétabilité et de reproductibilité exprimées en termes de CV en pourcentage.

Le respect des règles d'assurance qualité des laboratoires oblige à la validation des techniques en préalable et à le justifier. Il s'agit d'un pré-requis indispensable dans le cadre de l'accréditation des laboratoires. Cette opération s'effectue en deux étapes : l'évaluation des performances de la technique suivie de leur validation pour vérifier leur conformité à des normes. Ces exigences sont réglementaires, mais le référentiel permettant de définir les qualités souhaitables d'une technique d'analyse n'existe pas.

Le guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale indique que c'est aux biologistes qu'incombe le choix des méthodes optimisées utilisées dans un grand nombre de laboratoires et recommandées par les sociétés scientifiques nationales ou internationales de biologie ou dans le cas échéant validées par lui-même à condition qu'elles permettent, dans la mesure du possible, le transfert des résultats et que des procédures opératoires doivent être techniquement validées afin d'assurer la qualité des résultats.

La commission de validation de techniques de la SFBC avait proposé en 1986 un protocole de validation accompagné de normes d'acceptabilité établies pour une vingtaine d'analytes.

Ce protocole a été largement utilisé et a permis un dialogue fructueux entre les différents partenaires de la biologie médicale : biologistes entre eux, biologistes et industriels, biologistes et cliniciens, biologistes et partenaires administratifs. Il est apparu très vite que le nombre d'analytes décrits dans ce document était insuffisant. C'est pourquoi les initiateurs du premier projet ont souhaité rassembler un groupe de travail, sous l'égide de la SFBC, pour réactualiser et proposer des critères de validation dans un domaine plus

étendu. Ce document permet la définition des normes d'acceptabilité (limites de reproductibilité, de justesse et exactitude pour une centaine d'analytes et des niveaux de concentration pertinents choisis pour correspondre le plus souvent à des niveaux de décision médicale différents.

Les paramètres de la validation sont :

- Linéarité et domaine d'utilisation
- Répétabilité et reproductibilité
- Limite de détection
- Précision
- Exactitude
- Sensibilité

1/ LINEARITE OU DOMAINE D'ANALYSE

Evaluation de la limite haute et basse de la relation linéaire existant entre la concentration de l'analyte observé et la dilution effectuée.

La linéarité d'une méthode analytique est sa capacité à donner des résultats directement proportionnels à la concentration de l'analyte dans les échantillons.

Ces caractéristiques sont déterminées en appliquant la méthode à une série d'échantillons dont les concentrations en analyte couvrent tout le domaine d'utilisation proposé. Il faut analyser chaque dilution en triple, répéter l'essai, le cas échéant, dans d'autres conditions de temps.

2/ LIMITE DE DETECTION

C'est la plus petite quantité ou concentration qui peut être distinguée, avec une probabilité connue, d'un blanc de la réaction réalisé dans les mêmes conditions. Elle est égale à k fois l'écart-type de précision, mesuré sur le blanc. Si le nombre de valeur = 30, la valeur de 3 est retenue pour k.

$LD = S \times k$

LD = limite de détection

S = écart-type

k = facteur dépendant du nombre de mesures effectuées

3/ PRECISION

C'est le degré d'accord entre les résultats obtenus lors d'essais différents. Elle est mesurée par la dispersion des résultats individuels de part et d'autre de la moyenne et elle est généralement représentée par l'écart-type ou par le coefficient de variation calculé après avoir appliqué la méthode complète de façon répétée à un certain nombre d'échantillons identiques sur le même lot homogène du produit à analyser.

4/ REPETABILITE ET REPRODUCTIBILITE

Evaluation de la dispersion des résultats obtenus à partir des aliquotes d'un même spécimen distribuées dans une même série d'analyse (répétabilité), ou dans des séries différentes (reproductibilité).

4.1 REPETABILITE

La mesure de la variation des résultats obtenus au sein d'un même laboratoire caractérise la précision obtenue lorsque la méthode est répétée par le même analyste dans les mêmes conditions (réactifs, matériel, réglage, laboratoire) dans un court intervalle de temps. Il faut calculer les variances de chaque série de mesure, puis la variance intra-série et l'écart-type (S) en utilisant les formules :

$$V = \frac{V_1 (n_1 - 1) + V_2 (n_2 - 1) + \dots}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) + \dots}$$

$$S = \sqrt{V}$$

4.2 REPRODUCTIBILITE

C'est la précision de la méthode lorsqu'elle est appliquée dans des conditions différentes, généralement dans des laboratoires différents, à des échantillons distincts, théoriquement identiques, prélevés sur le même lot homogène de produit à analyser.

La comparaison des résultats par différents analystes, avec un matériel différent, à des dates différentes, peut aussi fournir des informations précises à cet égard.

Calculer la moyenne et l'écart-type des valeurs obtenues pour un même spécimen au cours des séries indépendamment effectuées en exploitant les formules :

$$m = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - m)^2}{n - 1}}$$

x_i = chaque valeur n = nombre total de valeurs

S = écart-type m = moyenne

4 – 3 SPECIFICITE

C'est l'aptitude d'une méthode à mesurer la concentration de l'analyte sans interférence de la part des autres constituants de l'échantillon.

La sélectivité (ou l'absence de la sélectivité) peut s'exprimer par l'erreur systématique constatée dans les résultats obtenus avec l'analyte en présence des concentrations escomptées des autres constituants, par comparaison des résultats obtenus en l'absence de ces substances.

4 – 4 SENSIBILITE

C'est l'aptitude de la méthode à détecter de petites variations de concentration. Elle est représentée par la pente de la courbe d'étalonnage. On doit éviter de donner à ce terme un sens plus général englobant la limite de détection et / ou de dosage.

4 – 5 EXACTITUDE ET JUSTESSE

Evaluation de l'exactitude d'une méthode B par rapport à une méthode A reconnue pour sa fiabilité (technique de référence), avec des spécimens de contrôle.

L'exactitude d'une méthode est le degré de concordance entre les résultats obtenus et la vraie valeur de la grandeur mesurée.

Remarque :

Toutes ces caractéristiques ne sont pas toujours applicables à toutes les méthodes d'essai ni à tous les produits à analyser.

Dans tous les cas, chacune des caractéristiques de performance applicable à la méthode analytique doit faire l'objet d'une évaluation fondée sur des données expérimentales.

1/ MATERIELS

1.1 CADRE D'ETUDE

Notre étude a été effectuée au Laboratoire National de Contrôle des Médicaments (LNCM) qui est situé en face de la porte centrale de l'Hôpital

Aristide Le Dantec. Le Laboratoire National de Contrôle des Médicaments a pour mission d'assurer le contrôle technique des médicaments.

Ce laboratoire comporte quatre sections :

- section physico-chimie
- section microbiologie
- section Vaccins
- section toxicologie

1.2 APPAREILLAGE ET VERRERIE

- Tubes de 5ml, de 10ml, de 15ml
- Tubes à hémolyse
- Fiole de 100ml
- Anses
- Bêchers
- Vortex
- Boîtes de pétri
- Ampoule à décanter
- Pipettes de 1ml, 5ml, 10ml
- Portoirs
- Flacons de 100ml
- Appareil de stérilisation à chaleur sèche
- Appareil de stérilisation à chaleur humide
- Balance Sartorius ou balance Metler
- Etuve selecta
- Turbidimètre
- Bain- marie

- Compteur de colonies
- Microscope simple de marque XSZ
- Incubateur Jouan
- Centrifugeuse Jouan
- pH-mètre
- Chronomètre

1.3 REACTIFS ET MILIEUX DE CULTURE

1.3. 1 Réactifs

- Eau distillée stérile
- Eau physiologique stérile à 9 g de Na Cl dans 1000 ml d'eau distillée
- Neutralisants :
 - ✓ Préparation contenant Lecithine 0.5 + Tween 80 à 3%
 Pour obtenir la Lecithine , nous avons utilisé un œuf de poule de moins de 10 jours et nous avons récupéré le jaune dans une éprouvette graduée et compléter à 100 ml avec de l'eau distillée stérile jusqu'à obtenir une solution de lecithine . La stérilisation a été faite par filtration sur membrane de 0.22 µm.
 La solution de polysorbate 80 à 3 % a été stérilisée aussi par filtration sur membrane .
 Nous avons mélangé les deux solutions dans les même proportions . Cette préparation est utilisée pour neutraliser l'activité du chlorure de beuzalkonium sur les germes .
 - ✓ Solution de thiosulfate de sodium 0.5 %
 Nous avons fait dissout 0.5 g de thiosulfate dans 100 ml d'eau distillée stérile , la stérilisation se fait à l'autoclave à °C à

l'autoclave 120 °C pendant 15 mn.

Cette solution est utilisée pour neutraliser l'activité de la PVP-I sur les germes .

✓ Solution de L-Cysteine 0.15 %

Après dissolution de 0.15 g de L-Cysteine dans 100 ml d'eau distillée stérile , la stérilisation se fait à l'autoclave à 120 °C pendant 15 mn. Cette solution est utilisée pour neutraliser l'activité de l'oxyde de zinc et du mercurochrome sur les germes.

✓ Solution de Lecithine à 0.5 %

Cette solution est utilisée pour neutraliser l'activité de l'acide para hydroxy benzoïque .

- Substance interférente de référence : mélange albumine – extrait de levure.

Albumine bovine desséchée : préparons une solution à 3 % (m/v), ajuster, si nécessaire, par l'hydroxyde de sodium à pH 6.8 – 7 ; la stérilisation se faisant par filtration sur membranes,

Extrait de levure deshydraté pour bactériologie : préparons une solution à 15 % (m/v), ajuster par l'hydroxyde de sodium à pH 7, stériliser à l'autoclave 15 mn à 120 °C.

Préparons le mélange : mélangeons aseptiquement 100 ml de solution d'albumine et 20 ml de solution d'extrait de levure . On obtient une solution à 2.5 % de chaque composant

1.3.2 Milieus de culture

- Gélose MH

Composition

Infusion de viande de bœuf	300g/l
Bio-case	17,5g/l
Amidon	1,5g/l
Gélose	17g/l

pH = 7,3

Préparation

Nous avons mis 38g de poudre dans 1litre d'eau distillée, puis mélangé et chauffer en agitant.

Nous avons porté à ébullition environ 1mn, réparti et stérilisé 116°C pendant 15mn.

Toute surchauffe doit être évitée.

Remarques

Avant utilisation, il est conseillé de sécher les boîtes 10 à 30mn à l'étuve à 35°C pour éliminer l'excès d'humidité et ramener le milieu à la température normale d'incubation.

En effet certains germes fragiles ne résistent pas à des variations de température et risquent de ne pas se développer

.

- Gélose pour entretien des souches

Peptone trypsique de Caséine	15g
Peptone de soja	5g
Chlorure de sodium	5g

Agar-Agar en poudre	18g
Eau distillée	1000ml

Après dissolution dans l'eau à ébullition, le pH a été ajusté à 7,2 ; la stérilisation à 120°C pendant 20mn, ensuite nous avons réparti le milieu dans des flacons, puis le milieu a été coulé en boîtes de pétri.

- Gélose pour dénombrement des bactéries

Extrait de levure déshydraté	2.5 g
Peptone tryptique de caseine	5 g
Glucose Agar- Agar en poudre	18 g
Eau distillée qsp	1000 ml

Après dissolution dans l'eau à ébullition, le pH a été ajusté à 7,2 ; la stérilisation à 120°C pendant 20mn, ensuite nous avons réparti le milieu dans des flacons, puis gardé en surfusion 40°C 45°C , puis le milieu a été coulé en boîtes de pétri.

- Bouillon pour la préparation de l'inoculum de *Bacillus*

Extrait de levure	2,5g
Tryptone	5g
Glucose	1g
H ₂ O	1000ml

Après dissolution des différentes pesées dans l'eau, le pH a été ajusté à 7,2 puis la préparation a été répartie dans les tubes à essai (10ml/tube) et la stérilisation a été faite à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

- Gélose pour préparation des spores de *Bacillus*

Extrait de viande	10g	
Extrait de levure	2g	
MnSO ₄ H ₂ O	0,04g	= 40mg
Aga- Agar en poudre	25g	
H ₂ O	1000ml	

Toutes ces différentes pesées sont dissoutes dans de l'eau à ébullition.

Le pH est ajusté à 7,2

L'autoclavage se fait à 120°C pendant 20mn

Puis le milieu est réparti dans les boîtes de pétri . Laisser refroidir

- Gélose pour le dénombrement des spores de *Bacillus*

Acides aminés provenant de l'hydrolyse acide de la

caséine dépourvue de vitamines	1g
--------------------------------	----

Amidon soluble	1g
----------------	----

Glucose	2,5g
---------	------

Extrait de levure	5g
-------------------	----

FeSO ₄	0,1g
MnSO ₄ H ₂ O	0,0001g = 0,1mg
Agar- Agar en poudre	18g
H ₂ O	1000ml

Après dissolution dans l'eau à ébullition, le pH est ajusté à 6,8.

La répartition dans les tubes est à raison de 15ml/tube .

- Gélose Sabouraud

Bacto Neopeptone	10g
Bacto Dextrose	20g
Bacto Agar	20g
Eau distillée	1000ml

Après dissolution, le mélange a été porté à ébullition. Puis nous l'avons réparti dans des flacons de 150ml.

La stérilisation a été faite à l'autoclave à 180°C pendant 20mn..

- Gélose pour dénombrement de levures

Extraitde levures	20g
Glucose	20g
Agar-agar en poudre	18g

Eau distillée qsp 1000ml

Le pH a été ajusté à $6,8 \pm 0,1$

Après, le mélange a été porté à ébullition lentement.

Ensuite, la gélose a été répartie dans des flacons de 150ml. La stérilisation a eu lieu à l'autoclave à 120°C pendant 20mn.

1.4 LES SOUCHES DE REFERENCE

Escherichia coli ATCC 25922

Enterococcus faecalis ATCC 29212

Staphylococcus aureus ATCC 29213

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Candida albicans ATCC 24433

Bacillus subtilis ATCC 9372

On peut se les procurer auprès des centres de collection : American Type Culture Collection.

Des contrôles de pureté ont été effectués à toutes les étapes de culture les différentes souches c'est-à-dire lors de la préparation des lots de semence ou lors de repiquages pour l'obtention de suspensions bactériennes destinées aux essais.

La pureté est vérifiée par isolement (méthode des stries) sur une ou plusieurs boîtes de milieu et par observation microscopique après coloration de Gram pour toutes les souches de référence utilisées.

L'identité de la souche est vérifiée selon les méthodes classiques au moyen de galeries d'identification.

▪ 5 LES ANTISEPTIQUES

1.5.1 Polyvinyl pyrrolidone iodée

● Caractères

Poudre amorphe brun – jaune à brun – rouge , soluble dans l'eau et dans l'alcool, pratiquement insoluble dans l'acétone .

● Identification

- Spectrophotométrie d'absorption dans l'Infrarouge par rapport au spectre de référence de la PVP-I de la Pharmacopée Européenne ,
- Dissoudre 10mg de PVP-I dans 10 ml d'eau et ajouter 1ml de la solution d'amidon : coloration bleue intense
- 0.1g de PVP-I dans 1ml d'eau , ajouter goutte à goutte une solution de sulfite de sodium jusqu'à ce que la solution devienne incolore , ajouter 2ml de solution de dichromate de potassium et 1ml de HCl : précipité brun – clair .

● Dosage

Un gramme de PVP-I dans un flacon à bouchon rodé contenant 150 ml d'eau, ajouter par mouvements circulaires pendant 1 heure, ajouter 0.1 ml d'acide acétique dilué, et titrer par le thiosulfate de sodium en présence de solution d'amidon

Un millilitre de thiosulfate de sodium correspond à 12,69 mg d'iode disponible .

Nous avons utilisé la bétadine, solution dermique à 10% (Laboratoire Sarget) en dilution aqueuse 1/5 , 1/10...

1.5.2 Chlorure de benzalkonium

□ *Caractères*

Poudre blanche à blanc – jaunâtre ou masses gélatineuses , hygroscopiques , blanc – jaunâtre , savonneuses au toucher, très solubles dans l'eau et dans l'alcool.

Le chlorure de benzalkonium donne par chauffage une masse limpide qui fond .

La solution de chlorure de benzalkonium est un liquide limpide incolore ou légèrement jaunâtre , miscible à l'eau et à l'alcool . Elle forme une mousse abondante par agitation .

● Identification

Dissoudre 2 g de chlorure de benzalkonium dans de l'eau et compléter à 100ml avec le même solvant .

Dans une ampoule à décanter introduire 25 ml de cette solution , ajouter 25 ml de chloroforme .

● Dosage

Nous déterminons la masse volumique de la solution de chlorure de benzalkonium , prélevons 4 g puis complétons à 100 ml avec de l'eau .

Dans une ampoule à décanter , 25 ml de cette solution , 25 ml de chloroforme, 10 ml d'hydroxyde de sodium 0.1 N et 10ml d'une solution récemment préparée d'iodure de potassium à 50 g /l .

Nous agitons énergiquement , laissons reposer et rejetons la phase chloroformique.

Nous agitions avec 10 ml de chloroforme 3 fois et rejetons les couches chloroformiques .

A la couche aqueuse , ajoutons 40 ml d' HCl ,

Laissons refroidir et titrez par l'iodate de potassium jusqu'à quasi-disparition de la coloration brun –foncé .

Nous avons utilisé Pharmatex , crème unidose de Innothera laboratory.

1.5.3 Oxyde de zinc

- **Caractères**

C'est une poudre lisse , amorphe , légère , blanche ou blanc – jaunâtre , pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'alcool.

L'oxyde de zinc se dissout dans les acides minéraux dilués de PM 81.4.

L'oxyde de zinc utilisé est la pommade de Dermocuire® ; pour extraire le principe actif , il faut extraire 2 g de cette pommade dans un mélange Cyclohexane - acide chlorhydrique dilué dans des proportions 50 / 50. Nous recueillons la phase aqueuse pour les tests .

1.5.4 Acide para hydroxy benzoïque

- **Caractères**

L'acide para hydroxy benzoïque est peu soluble dans l'eau et est utilisé comme conservateur dans les lotions et crèmes cutanées .

Il se présente sous forme de poudre blanche cristalline ou de cristaux incolores peu soluble dans l'eau bouillante , soluble facilement dans l'alcool, l'éther et dans les huiles grasses L'acide para hydroxy benzoïque étant la poudre de NISAPULVOL® , le principe actif est obtenu en dissolvant la poudre dans 50 ml de méthanol

1.5.5 Mercurochrome

Il est encore appelé mercurésceïne ou merbromine.

Il se présente en solutions hydro-alcooliques ou hydro-acétoniques à 1% et 2% pour application locale, en particulier pour le nettoyage et l'antisepsie de la peau et notamment des plaies superficielles :

- pommade à 0,5%
- solution aqueuse à 20% en application pré-opératoire

Nous avons utilisé la solution aqueuse de mercurochrome à 3%

2/ TESTS PREALABLES

Chaque lot de boîtes préparées a été incubé à l'étuve pendant 24 heures pour vérifier la stérilité.

Il en est de même que pour les neutralisants, l'eau physiologique, l'eau distillée stérile, la substance interférente de référence qui seront ensemencés sur la gélose stérile.

Les souches de référence à utiliser ont été après régénération identifiées suivant leurs caractères morphologiques (aspect des colonies, état frais, coloration de Gram...).

Les appareils ont été validés par un contrôle technique quotidien.

3/ METHODE DE DILUTION – NEUTRALISATION

3.1 PRINCIPE DE LA METHODE

Il est indispensable de s'assurer de la mort des bactéries c'est à dire que les bactéries éventuellement survivantes doivent pouvoir se multiplier et donner naissance à des colonies.

Cette méthode est couramment utilisée pour la mise en œuvre des neutralisants.

Cela revient à éliminer toute activité bactériostatique, fongistatique, sporostatique résiduelle des antiseptiques.

L'efficacité de ces neutralisants doit être appréciée au cours d'un essai préliminaire, ce n'est qu'après ce test que l'on peut passer à l'essai proprement dit et déterminer la concentration bactéricide, bactéricide en présence de substance interférente, fongicide et sporicide.

3-2 MODE OPERATOIRE

Nous avons réalisé trois dilutions de chaque produit, pour chaque dilution nous avons effectué trois groupes de six essais.

3.2.1 Détermination de l'activité bactéricide et bactéricide en présence de substance interférente

3.2.1 1 Préparation de l'inoculum

Après 3 repiquages successifs sur milieu gélosé, nous avons réalisé une suspension homogène dans une phase liquide (eau physiologique stérile) avec un agitateur de type vortex (30 secondes environ). Ensuite nous avons

aseptiquement prélevé un volume défini de cette suspension puis ajusté sa turbidité par rapport à un tube de référence de 0.5 Mac Farland en diluant avec de l'eau physiologique.

La suspension ajustée devait contenir $1 \text{ à } 3.10^8$ cellules/ml

3.2.1 .2 Essais préliminaires

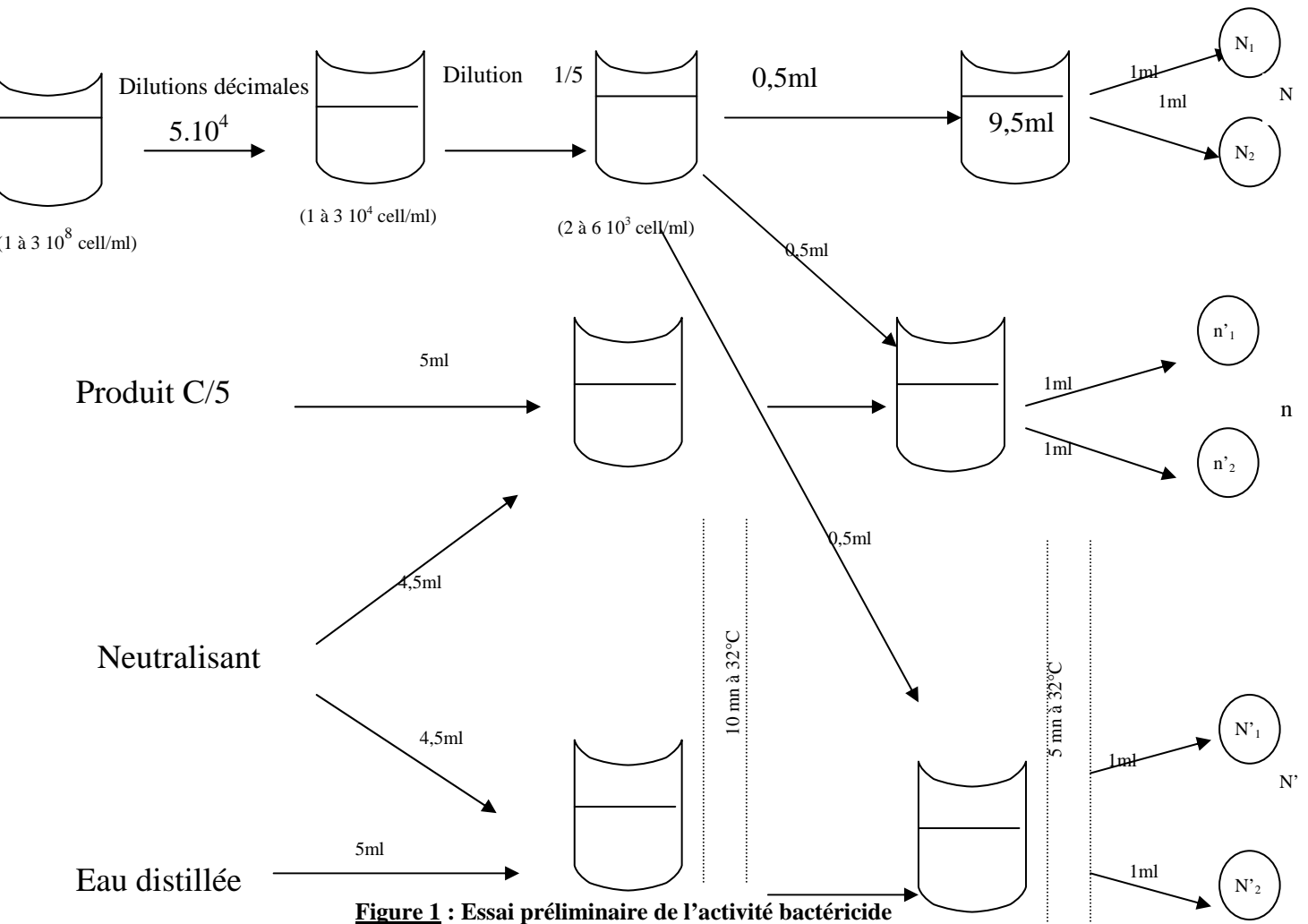
Pour chaque type de souche, on a mis en contact le produit essayé à sa plus forte concentration et le neutralisant convenable. (**figure 1**)

On a ajouté alors la suspension bactérienne , puis laissé en contact 5 mn à 32 °C avant de dénombrer les bactéries survivantes.

Un témoin est réalisé dans les mêmes conditions en plaçant la suspension bactérienne dans un mélange : eau distillée - neutralisant.

On a ensuite retenu pour chacune des souches le neutralisant qui permet d'obtenir comparativement au témoin au moins 50% des bactéries survivantes.

Nous avons ensuite vérifié que **n'** (nombre de colonies dans les essais) est supérieur ou égal à 0,5 **N'** (nombre de colonies dans les témoins). Si cette condition n'est pas remplie, le neutralisant n'a pas été validé et l'essai a été rejeté.



3.2.1 .3 Essais proprement dits

Pour chacune des souches, nous avons mis en contact à 32°C les cellules bactériennes et le produit dilué à 5 concentrations différentes dans l'eau physiologique stérile.

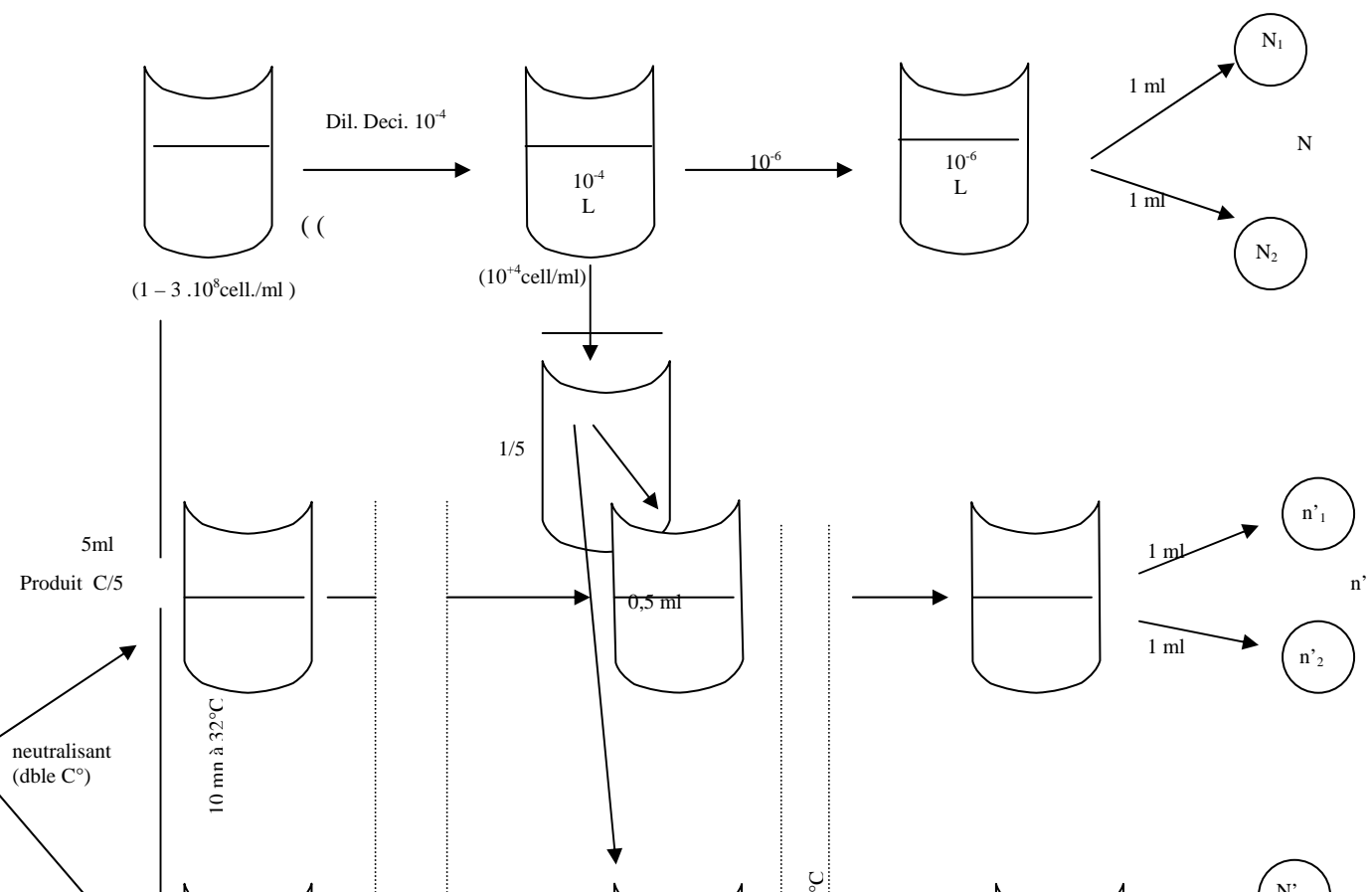
Au bout de 5mn exactement, nous avons transféré une fraction du mélange dans le neutralisant. Après 10mn, nous avons dénombré les bactéries survivantes.

Les résultats ont été confrontés à ceux d'un témoin obtenu par dénombrement des bactéries de la suspension utilisée dont la dernière dilution était effectuée en présence du neutralisant.

Cet essai est effectué avec une suspension bactérienne parfaitement définie 1 à $3 \cdot 10^8$ cellules/ml, pour être reproductible et pour permettre d'apprécier l'activité bactéricide selon les critères retenus. (**figure 2**)

Pour rechercher la réduction de 10^5 fois du nombre de cellules viables, l'antiseptique a été mis en présence de 10^7 cellules/ml. Si en 5mn l'activité bactéricide est produite, il reste 10^2 cellules viables/ml.

Nous avons ensuite procédé à un transfert.



L : liquide de suspension des bactéries C : concentration bactéricide maximale prévue N : neutralisant
--

Figure 2 : Essai proprement dit et répétition simultanée de l'essai préliminaire
3.2.2 Détermination de l'activité sporicide

- Préparation des spores de *Bacillus*

Le bouillon de la préparation de l'inoculum avec 10^6 spores a étéensemencé. L'incubation a été faite à 30°C.

Après le transfert de 2 à 3 ml de cette culture dans deux boites de pétri contenant la gélose pour préparation de spore, la boite a subi diverses inclinaisons de façon à ce que l'inoculum vienne en contact avec la totalité de la surface de la gélose : l'excès est jeté.

Les boites sont incubées à 30°C pendant 3 jours.

A partir du 3^{ème} jour, l'état de la culture a été observé au microscope pour voir la sporulation.

La Gram sporulation 8 à 10 jours.

Puis 4 lavages successifs sont réalisés avec de l'eau distillée par centrifugation à 3000 tours/mn pendant 10mn.

La dernière suspension a été transférée dans un flacon à vis et chauffée à 75°C pendant 10mn.

- Préparation de la suspension de spore 2 à 6.10^3 spores

0,5ml de la suspension de spores dans 0,5ml d'eau distillée. La turbidité doit être de 0,5 Mac Farland.

3.2.2.1 Essai préliminaire

Cet essai a permis la validation du neutralisant. La suspension de spores contient 1 à 3.10^8 cellules/ml. (**figure 3**)

- **Dénombrement de contrôle**

A partir de la suspension de 0,5Mc Farland, 4 dilutions décimales avec de l'eau physiologique stérile, puis une autre 1/5 et une autre au 1/10 (0,5 de suspension + 9,5ml d'eau distillée) ont été effectuées.

Deux fois 1ml de la dernière dilution ont été transférés dans 15 à 20ml de gélose pour dénombrement de spores (**N_I**).

- **Dénombrement d'essai**

Dans un tube , nous avons mélangé 0,5ml d'antiseptique et 9ml de neutralisant, l'incubation se faisant à 75°C pendant 10mn.

Puis après ajout de 0,5ml de la suspension au 1/5 (contenant 2 à 6.10^3 cellules/ml), agitation et incubation à 75°C pendant 5mn. On distribue deux fois 1ml dans la gélose pour dénombrement de spores (**n'**).

- **Dénombrement témoin**

Eau distillée	0,5ml
---------------	-------

Neutralisant	9ml
--------------	-----

L'incubation se faisant à 75°C pendant 10mn

Puis 0,5ml de suspension de spores au $1/5$ est ajouté au mélange. Après agitation, le mélange est mis au bain marie à 75°C pendant 5mn.

Deux fois 1ml du mélange ont été coulés dans 15 à 20ml de gélose (N')

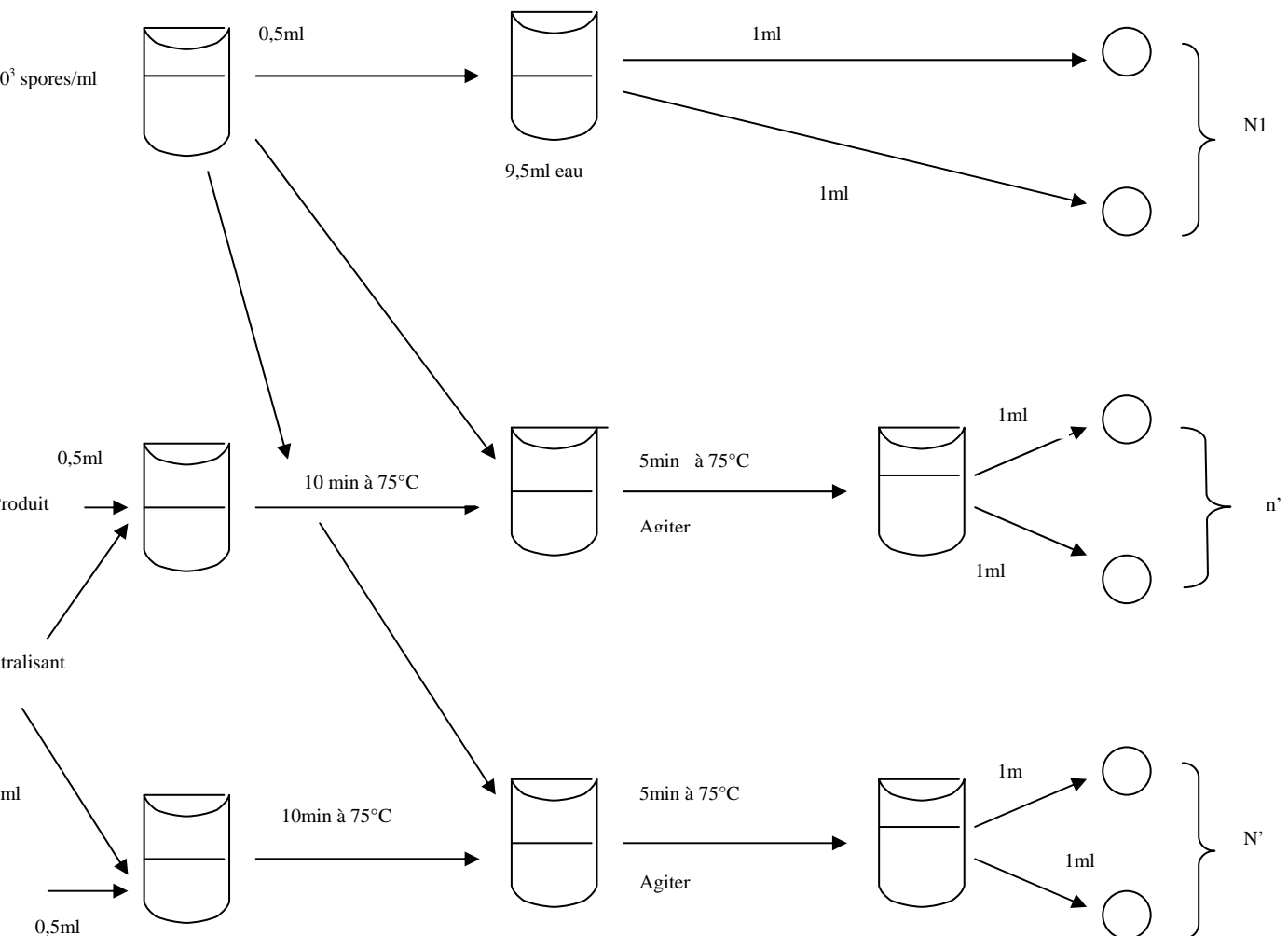


Figure 3 : Essai préliminaire de l'activité sporicide

3.2.2.2 Essai proprement dit

- Dénombrement de contrôle

Cinq dilutions décimales de la suspension à 0,5 Mac Farland ont été effectuées.

Deux fois 1ml de la dernière dilution ont été distribués dans 15 à 20ml de gélose pour dénombrement de spores (**N**).

-Dénombrement d'essai

Nous avons mélangé 5 ml d'antiseptique, 4 ml d'eau distillée, 1 ml de suspension 0.5 Mac Farland.

Le mélange est mis au bain marie à 75°C pendant 5mn.

Un ml du mélange est transféré dans 9ml de neutralisant.

L'incubation a été de 5mn à 75°C.

Deux fois 1ml est coulé dans le gélose pour dénombrement de spores (**n**).

L'incubation des boîtes à l'étuve a été de 30°C pendant 72h.

les colonies apparues après 72h d'incubation sont comptées et les moyennes de **n** faites

n ≤ **N** / 10 . Les conditions de validité des résultats :

$$n' \geq 0,5 N'$$

$$100 \leq N_1 \leq 300 \text{ colonies}$$

N₁ = moyenne des colonies du dénombrement contrôle

n' = moyenne des colonies du dénombrement d'essai

N' = moyenne des colonies du dénombrement témoin

3.2.3 Détermination de l'activité fongicide

3.2.3.1 _____ Essai préliminaire (figure 4)

- *Dénombrement de contrôle = préparation de l'inoculum*

Un inoculum de 0,5 Mac Farland de turbidité a été préparé avec de l'eau physiologique et une souche de *Candida albicans* ATCC 24 433 obtenue après repiquages successifs sur gélose Sabouraud.

Quatre dilutions décimales avec de l'eau physiologique, puis au 1/5 (contenant $2 - 6.10^3$ cellules/ml) et enfin une autre au 1/10.

Deux fois 1ml de cette dernière dilution ont été mises dans 2 boîtes de pétri de 15 à 20ml de gélose pour dénombrement levures.

- *Dénombrement d'essai*

Nous avons réalisé un mélange

4,5ml de neutralisant

5ml de produit à tester dilué au 1/5

L'incubation a été faite pendant 10mn à 32°C au bain marie.

0,5ml de la dilution contenant $2 - 6.10^3$ cellules/ml a été ajouté.

Le temps de contact a été de 15mn à 20°C ou 32°C.

Deux fois 1ml de la dilution ont été coulés dans 15ml à 20ml de gélose pour dénombrement.

- *Dénombrement témoin*

Nous avons mis en contact : neutralisant 4,5ml

 Eau distillée 5ml

Après incubation nous avons ajouté 0,5ml de suspension contenant 2 à 6.10^3 cellules/ml

Agitation contact pendant 15mn à 32°C.

Nous avons coulé dans 2 boîtes de gélose pour dénombrement. Les boîtes ont été incubées pendant 48 heures à 37°C.

Suspension de
levures

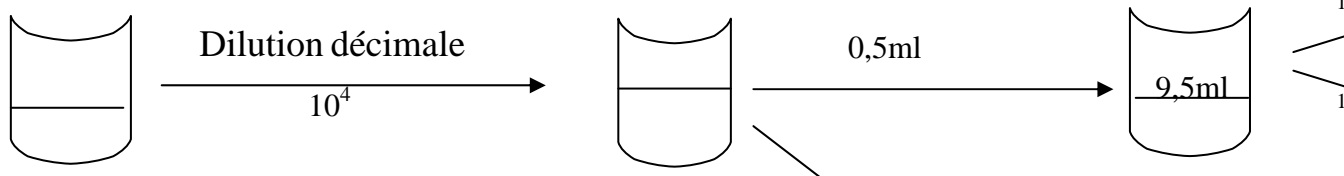


Figure 4 : Essai préliminaire de l'activité fongicide

3.2.3.1 Essai proprement dit

- *Dénombrement de contrôle*

A partir de la suspension à 0,5 Mac Farland, nous avons effectué 5 dilutions décimales.

Deux fois 1ml de la dernière dilution sont distribués dans 2 boîtes de gélose.

Nous avons mis en contact 1 ml de la suspension à 10^4 cellules/ml avec 9ml de neutralisant.

Après incubation, nous avons coulé dans 2 boîtes de pétri (1 ml chaque).

- *Dénombrement essai proprement dit*

Nous avons réalisé un mélange : 5ml du produit à tester

4ml d'eau distillée

1ml de suspension à 0,5 Mac Farland

Le mélange a été porté au bain marie à 32°C pendant 15mn.

1ml du mélange a été transféré dans 9ml de neutralisant.

L'incubation a été faite à 32°C pendant 10mn.

Puis 2 boîtes de gélose ont été coulées. (**figure 5**)

Ensuite les boîtes ont été déposées dans l'étuve à 37°C pendant 48 heures.

Les colonies ont été comptées et les moyennes faites.

Les conditions de validité des résultats

$$N' > 0,5N$$

$$n' < N'/10$$

N = moyenne du dénombrement de contrôle

n' = moyenne du dénombrement d'essai

N' = moyenne du dénombrement témoin

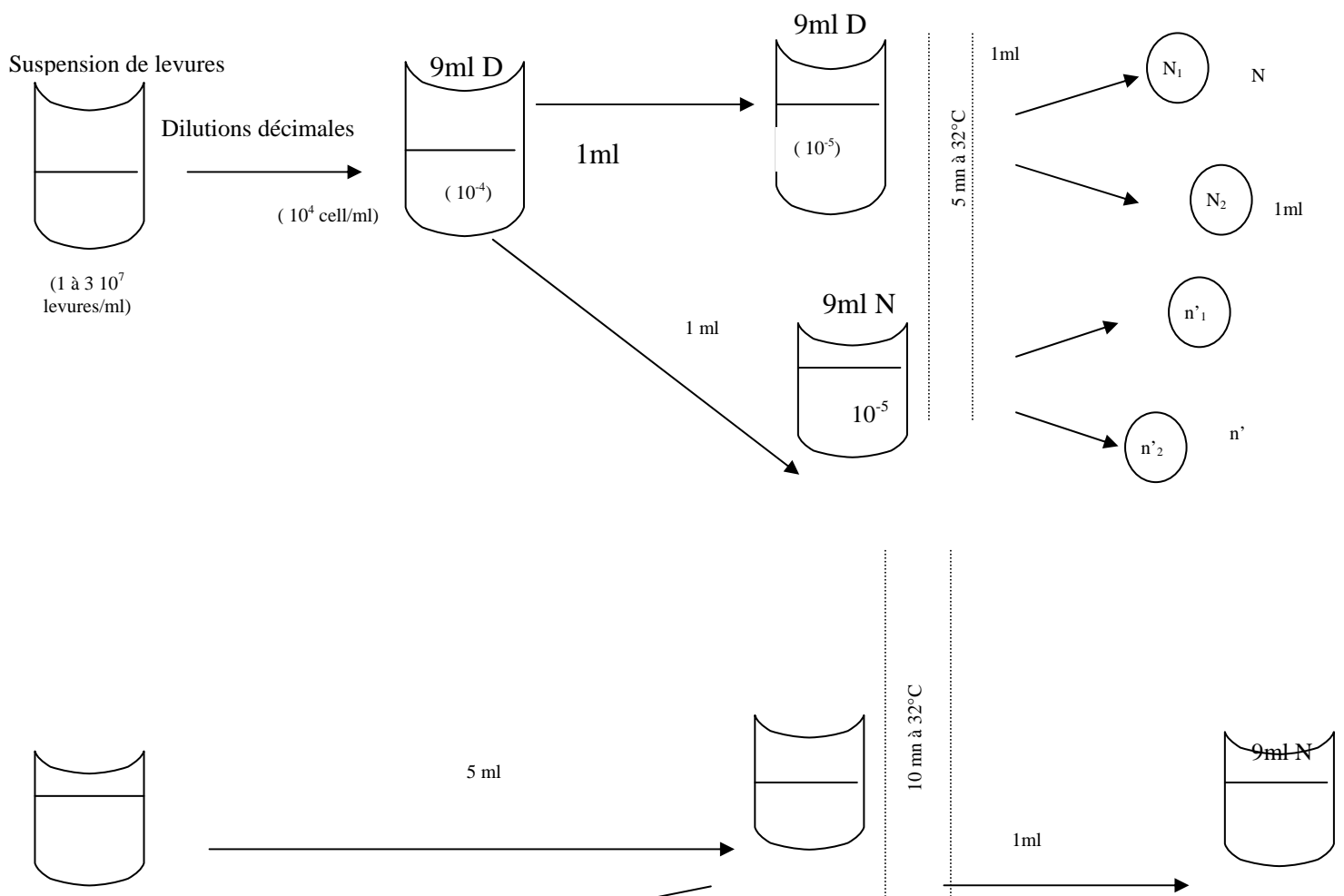


Figure 5 : Essai proprement dit de détermination de l'activité fongicide**1/ TESTS PREALABLES**

Après la lecture des boîtes non ensemencées et des boîtes ensemencées (eau physiologique, eau distillée stérile, neutralisants, substance interférente), nous n'avons vu aucun développement de germes; donc ces réactifs et milieux sont stériles et peuvent être validés avant utilisation.

2/ RESULTATS DES ESSAIS PRELIMINAIRES

Ces essais nous ont permis de dire que la technique de dilution – neutralisation des normes AFNOR est bien adaptée pour le contrôle de l'activité de tous les produits que nous avons testés après l'obtention de résultats répétitifs

Tableau I : Essais préliminaires de la polvinylpyrrolidone iodée

SOUCHES	Neutralisant : Thiosulfate de sodium à 0.5%	
	N'	n'
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	457	422
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	215	99
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	125	57
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	133	51
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	104	26

<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372	118	65
------------------------------------	-----	----

N' = nombre de colonies du dénombrement témoin

n' = nombre de colonies du dénombrement essai

Pour toutes les souches, N' est supérieur à n' : la solution de thiosulfate de sodium à 0.5 % est le neutralisant validé et on peut dire que la méthode de dilution – neutralisation est bien efficace et adaptée pour l'étude de la PVP- I.

Tableau II : Essais préliminaires du Chlorure de benzalkonium

SOUCHES	Neutralisant : Lecithine 0.5 % + Tween 80 3%	
	N'	n'
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	188	16
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	145	58
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	136	27
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	115	92
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	129	95
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372	179	153

N' = nombre de colonies du dénombrement témoin

n' = nombre de colonies du dénombrement essai

Pour toutes les souches, N' est supérieur à n' : le mélange Lecithine 0.5% + Polysorbate 80 à 3% est le neutralisant validé et on peut dire que la méthode de dilution – neutralisation est bien efficace et est adaptée pour l'étude du chlorure de benzalkonium.

Tableau III : Essais préliminaires de l'Oxyde de zinc

SOUCHES	Neutralisant : L-Cystéine 0.15 %	
	N'	n'
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	89	22
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	137	45
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	168	57
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	111	68
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	98	53
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372	104	99

N' = nombre de colonies du dénombrement témoin

n' = nombre de colonies du dénombrement essai

Pour toutes les souches, N' est supérieur à n' : la solution de L – Cystéine à 0.15 % est le neutralisant validé et on peut dire que la méthode de dilution – neutralisation est bien efficace et adaptée pour l'étude de l'oxyde de zinc.

Tableau IV : Essais préliminaires de l'Acide para hydroxy benzoïque

	Neutralisant : Lecithine 0.5 %
--	--------------------------------

SOUCHES	N'	n'
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	83	81
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	108	87
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	97	54
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	121	75
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	102	23
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372	133	126

N' = nombre de colonies du dénombrement témoin

n' = nombre de colonies du dénombrement essai

Pour toutes les souches, N' est supérieur à n' : la solution de Lécithine à 0.5 % est le neutralisant validé et on peut dire que la méthode de dilution – neutralisation est bien efficace et adaptée pour l'étude de l'acide para hydroxy benzoïque.

Tableau V : Essais préliminaires du Mercurochrome

SOUCHES	Neutralisant : L Cystéine 0.15 %	
	N'	n'
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	105	48
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	136	89
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	92	25

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	169	148
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	57	32
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372	135	118

N' = nombre de colonies du dénombrement témoin

n' = nombre de colonies du dénombrement essai

Pour toutes les souches, N' est supérieur à n' : la solution de L- Cystéine à 0.15 % est le neutralisant validé et on peut dire que la méthode de dilution – neutralisation est bien efficace et adaptée pour l'étude du Mercurochrome.

3/ RESULTATS DES ESSAIS PROPREMENT DITS

Expression des résultats

- Moyenne des groupes

$$m_j = \frac{\sum_{j=1}^{n_j} Y_{ij}}{n_j}$$

- Variance des répétitions à l'intérieur du groupe j

$$s_j^2 = \frac{\sum_{j=1}^{n_j} (Y_{ij} - m_j)^2}{n_j - 1}$$

L'écart type à l'intérieur du groupe j est donné par s_j

- Variance de répétabilité

$$S_r^2 = \frac{\sum_{j=1}^k S_j^2}{k}$$

- Variance inter groupe

$$S_g^2 = \frac{\sum_{j=1}^k (m_j - \mu)^2}{k-1} - \frac{S_r^2}{n}$$

$$\mu = \frac{\sum_{j=1}^k m_j}{k}$$

μ = moyenne des moyennes de groupe

- Variance de reproductibilité

$$S_R^2 = S_r^2 + S_g^2$$

Il peut arriver que la valeur calculée pour S_g^2 soit négative, on remplace par zéro la valeur négative trouvée.

Habituellement, on exprime les erreurs de répétabilité et de reproductibilité sous forme de coefficient de variation.

Répétabilité : $CV_r = 100 S_r / \mu$

Reproductibilité : $CV_R = 100 \text{ SR} / \mu$

G₁ : Groupe 1

G₂ : Groupe 2

G₃ : Groupe 3

Tableau VI : Activités de la PVP-I sur les souches de référence à la concentration C

<div> <div>Souches</div> <div>Statistiques</div> </div>	<i>E. coli</i> ATCC 25922			<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853			<i>E. faecalis</i> ATCC 29212			<i>S. aureus</i> ATCC 29213			<i>C. albicans</i> ATCC 24433			<i>B. subtilis.</i> ATCC 9372		
	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃
Essai 1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Essai 2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Essai 3	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Essai 4	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Essai 5	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Essai 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
m _j	0.1	0.3	0.1	0.5	0.3	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S ² _j	0.1	0.2	0.1	0.7	0.6	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S ² _r	0.19			0.54			0			0			0			0		
μ	0.21			0.38			0			0			0			0		
S ² _g	0			0			0			0			0			0		
SR ²	0.19			0.54			0			0			0			0		
CV _r	0.10			0.12			0			0			0			0		

CVR	0.10	0.12	0	0	0	0
-----	------	------	---	---	---	---

La concentration active de la PVP-I est efficace presque sur toutes les souches de référence.

La variance des répétitions à l'intérieur de chaque groupe d'essais est nulle ;

La variance inter-groupe est nulle.

Les coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité sont tous < 15%.

Tableau VII : Activités de la Polyvinyl pyrrolidone iodée sur les souches de référence à la concentration C/5

Souches	<i>E. coli</i> ATCC 25922			<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853			<i>E. faecalis</i> ATCC 29212			<i>S. aureus</i> ATCC 29213			<i>C. albicans</i> ATCC 24433			<i>B. subtilis.</i> ATCC 9372		
	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃
Essai 1	1	1	0	4	2	1	2	1	3	2	1	3	0	2	0	7	8	7
Essai 2	2	1	1	2	4	2	0	1	2	1	2	1	1	0	1	8	7	7
Essai 3	3	1	0	2	3	2	1	0	0	1	1	2	2	1	2	8	7	7
Essai 4	2	1	3	2	2	3	1	2	1	3	0	1	0	1	1	7	8	7
Essai 5	1	2	1	4	1	2	0	2	1	0	2	0	1	1	0	7	7	8
Essai 6	0	0	0	2	1	1	2	1	2	2	3	1	1	2	1	6	6	6
m _j	0.6	1.3	0.8	2.6	2.1	1.8	1	1.1	1.5	1.5	1.5	1.3	0.8	1.1	0.8	7.1	7.1	7
S ² _j	2.0	0.5	0.6	1.0	1.3	0.5	0.7	0.3	1.6	0.2	0.5	1.1	0.7	0.8	1.3	0.5	1	0.4
S ² _r	0.15			0.21			0.8			1.2			0.56			0.3		
μ	0.9			2.16			1.2			1.43			0.9			7.0		

S^2_g	0.01	0	0.002	0.001	0	0
SR^2	0.16	0.21	0.80	1.2	0.56	0.3
CVr	0.11	0.06	0.10	0.24	0.01	0.0003
CVR	0.12	0.07	0.14	0.10	0.16	0.22

La dilution 1/5 de la PVP-I s'est révélée encore active sur la plupart des souches de référence testées, la dilution entraînant une augmentation de la quantité d'iode non complexée.

La variance des répétitions à l'intérieur de chaque groupe d'essais n'est pas significative même si elle n'est pas nulle ; les coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité < 15% sauf avec quelques rares germes (*C. albicans* ATCC 24433 et *Bacillus subtilis* ATCC 9372).

Tableau VIII : Activités de la Polyvinyl pyrrolidone iodée sur les souches de référence à la concentration C/10

Souches	<i>E. coli</i> ATCC 25922			<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853			<i>E. faecalis</i> ATCC 29212			<i>S. aureus</i> ATCC 29213			<i>C. albicans</i> ATCC 24433			<i>B. subtilis.</i> ATCC 9372		
	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃
Essai 1	7	8	8	22	23	23	10	10	9	10	12	11	9	7	10	12	10	11
Essai 2	8	6	7	20	24	22	12	09	13	13	10	11	9	11	9	10	12	9
Essai 3	6	5	6	24	19	19	10	11	11	12	12	12	10	9	8	11	9	11
Essai 4	5	7	8	20	18	20	11	12	10	10	13	10	8	10	11	12	11	13
Essai 5	8	5	7	22	18	17	12	10	10	11	12	11	9	8	8	10	11	13
Essai 6	7	6	5	19	20	18	10	11	12	10	11	10	9	8	8	10	10	10
m _j	6.8	6.1	6.8	21	20	19	11	11	11	11	12	11	9	8	9	11	10	12
S^2_j	1.3	1.3	3.5	3.4	0.6	1.2	1.8	1.4	2.8	1.4	1.4	1.4	0.4	2.2	1.6	1.8	1.8	2.6
S^2_r	2			5.5			2			1.4			1.4			1.8		
μ	6.1			20			10			10			9			10		
S^2_g	0.01			0.02			0			0			0.06			0.09		
SR^2	2.1			5.5			2			1.4			1.5			1.8		
CVr	0.10			0.13			0			0			0.14			0.05		
CVR	0.11			0.18			0			0			0.13			0.13		

Avec la dilution 1/10 de la PVP-I, nous avons observé une activité faible sur les souches.

Les valeurs des coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité des essais ont été trouvées normales (*P aeruginosa* ATCC 27853 CV > 15%).

Tableau IX : Activités du chlorure de benzalkonium sur les souches de référence à la concentration C

Souches	<i>E. coli</i> ATCC 25922			<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853			<i>E. faecalis</i> ATCC 29212			<i>S. aureus</i> ATCC 29213			<i>C. albicans</i> ATCC 24433			<i>B. subtilis.</i> ATCC 9372		
	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃
Essai 1	2	1	0	3	2	4	2	1	0	0	1	2	0	0	0	9	8	7
Essai 2	1	1	1	1	2	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	8	7	8
Essai 3	1	0	2	2	5	2	0	0	0	2	1	0	0	1	1	7	8	9
Essai 4	0	1	1	3	4	2	0	0	0	1	0	1	0	0	0	9	8	8
Essai 5	1	1	1	2	2	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	8	9	8
Essai 6	1	1	1	4	5	4	0	0	1	2	1	0	0	0	1	7	9	7
m _j	1	0.9	1	3	3	3	0.5	0	0	1	0.5	0.5	0	0.3	0.3	8	8	8
S ² _j	2.0	0.5	0.6	1.0	1.3	0.5	0.7	0.3	1.6	0.2	0.5	1.1	0.7	0.8	1.3	0.5	1	0.4
S ² _r	0.19			0.54			0			0			0			0		
μ	0.9			3			0			0			0			0		
S ² _g	0			0			0			0			0			0		
SR ²	0.19			0.54			0			0			0			0		
CV _r	0.10			0.12			0			0.15			0			0		
CVR	0.10			0.12			0			0.14			0			0		

Le chlorure de benzalkonium n'est pas sporicide et est peu fongicide, n'est pas efficace sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ;

La variance des répétitions à l'intérieur de chaque groupe d'essais est toujours nulle ; les coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité <15%.

Tableau X : Activités du chlorure de benzalkonium sur les de référence à la concentration C/5

Souches	<i>E. coli</i> ATCC 25922			<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853			<i>E. faecalis</i> ATCC 29212			<i>S. aureus</i> ATCC 29213			<i>C. albicans</i> ATCC 24433			<i>B. subtilis.</i> ATCC 9372		
Statistiques	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃
Essai 1	10	10	10	16	16	14	2	1	1	2	2	3	2	3	1	12	10	11
Essai 2	9	9	10	15	16	17	1	2	3	3	2	3	2	1	3	11	12	11
Essai 3	10	9	10	15	15	15	1	1	2	2	2	2	2	2	1	11	10	12
Essai 4	11	10	9	17	12	12	2	2	2	2	3	1	1	2	1	10	10	10
Essai 5	9	9	9	16	14	15	2	1	1	1	4	2	2	1	2	12	13	12
Essai 6	9	11	9	14	15	14	3	3	1	2	1	3	2	2	3	10	11	10
m _j	9	9	9	15	14	14	2	1.5	1.6	2	2	2.1	2	2	1.8	11	10	11
S ² _j	1.3	1.3	1.3	3.4	6.8	6.1	1.2	1.4	2.8	1.4	1.4	1.4	0.4	2.2	1.6	2.1	1.8	2.6
S ² _r	1.5			2			2.4			0.83			1			0.5		
μ	9			14			1.8			2			1.6			10.5		
S ² _g	0.2			0			0.1			0			0.04			0		
SR ²	1.7			2			2.5			0.83			1			0.5		
CV _r	0.12			0.10			0.20			0.14			0			0.10		
CVR	0.11			0.13			0.10			0.25			0.13			0.22		

La dilution 1/5 du chlorure de benzalkonium n'a pas donné des résultats satisfaisants, car nous avons une activité minime limitée à *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *C. albicans* ATCC 24433.

Les essais de répétabilité et de reproductibilité sont dans les limites standards (<15%).

TableauXI : Activités du chlorure de benzalkonium sur les souches de référence à la concentration C/10

Souches	<i>E. coli</i> ATCC 25922			<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853			<i>E. faecalis</i> ATCC 29212			<i>S. aureus</i> ATCC 29213			<i>C. albicans</i> ATCC 24433			<i>B. subtilis.</i> ATCC 9372		
	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃
Essai 1	10	11	11	16	17	15	5	7	7	6	5	7	5	4	4	24	21	21
Essai 2	11	12	10	17	15	15	7	7	5	5	7	5	4	5	5	21	23	22
Essai 3	11	10	12	15	15	17	5	7	7	5	6	5	5	5	6	23	22	24
Essai 4	10	11	11	17	16	15	7	5	8	7	6	7	5	4	5	24	24	25
Essai 5	11	12	10	15	15	16	7	5	8	7	7	5	5	5	5	22	22	24
Essai 6	12	10	10	17	15	15	7	8	7	5	7	7	4	4	4	22	23	21
m _j	11	10	10	16	15	15	6.5	6.5	7.1	6.2	6	5.8	4.5	4.5	5	23	22	23
S ² _j	0.6	1.8	1.3	2.4	0.1	1.3	0.7	0.3	0.5	0	0.2	0.1	0.5	2.6	0.7	1.5	0.8	1.4
S ² _r	0.36			2.1			0.66			1.9			0.78			2.1		
μ	10.2			15.3			7.5			7			4.6			22.6		
S ² _g	0.5			1.3			0.45			0.02			0			0.01		
SR ²	0.86			3.1			0.1			1.92			0.12			0.54		
CV _r	0.19			0.12			0			0			0.02			0		
CVR	0.12			0.12			0			0			0.01			0		

Le chlorure de benzalkonium à la dilution 1/10 n'a montré aucune activité, les solutions diluées de ce produit sont souvent contaminées.

Les valeurs des coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité ont été jugées satisfaisantes.

Tableau XII : Activités de l'oxyde de zinc sur les souches de référence à la concentration C

Souches	<i>E. coli</i> ATCC 25922			<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853			<i>E. faecalis</i> ATCC 29212			<i>S. aureus</i> ATCC 29213			<i>C. albicans</i> ATCC 24433			<i>B. subtilis.</i> ATCC 9372		
	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃
Essai 1	1	1	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	1
Essai 2	1	2	0	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1
Essai 3	0	0	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1
Essai 4	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2
Essai 5	1	0	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
Essai 6	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2
m _j	0.5	0.1	1	1.8	1	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.3	1.3	1.3
S ² _j	0	0.1	0.6	0.5	1.3	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	2.1	1.8
S ² _r	0.76			1.20			0.60			0.50			0.54			1.50		
μ	0.6			1.2			0			0			0			1.3		
S ² _g	0			0.2			0			0			0			0.21		
SR ²	0.76			1.40			0.60			0.50			0.54			0.71		
CV _r	0.21			0.15			0.12			0.03			0.10			0.14		
CVR	0.21			0.15			0.12			0.03			0.10			0.14		

L'oxyde de zinc à sa concentration d'utilisation donne une meilleure activité avec les *Candida* et les cocci Gram positif qu'avec les bactéries Gram négatif, néanmoins nous avons une activité sur ces germes ; son activité sporicide aussi a été révélée.

Les coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité <15% sauf pour *E. coli* ATCC avec 21%.

Tableau XIII : Activités de l'oxyde de zinc sur les souches de référence à la concentration

C/5

Souches	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>C. albicans</i> ATCC 24433	<i>B. subtilis.</i> ATCC 9372

Statistiques	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃
Essai 1	4	5	5	3	2	2	2	2	2	4	4	4	2	2	2	7	7	7
Essai 2	5	5	5	2	3	2	2	2	2	4	4	4	2	2	2	7	7	7
Essai 3	5	5	5	3	3	3	2	2	2	4	3	4	2	2	1	7	7	7
Essai 4	5	5	5	3	3	3	2	2	2	4	4	4	2	1	2	7	7	7
Essai 5	5	5	5	3	3	3	2	2	2	4	4	4	2	2	2	7	7	7
Essai 6	5	5	5	3	3	3	2	2	2	4	4	4	1	2	2	7	7	7
m _j	4.9	5	5	2.8	2.8	2.7	2	2	2	4	3.8	4	1.8	1.8	1.8	7	7	7
S ² _j	1.3	0.3	1.5	0.5	0.1	2.4	2.1	0.6	0.5	1.1	0.4	0	0.6	1.4	0.6	1.3	0.1	0.7
S ² _r	0.76			0.56			0.08			1.2			0.38			0.25		
μ	0.49			2.7			2			3.9			1.8			7		
S ² _g	0			0.01			0.04			1.2			.066			0		
SR ²	0.49			0.25			0.14			1.5			1.8			1.02		
CV _r	0.14			0.20			0.18			0.46			0.35			0.13		
CVR	0.14			0.20			0.18			0.46			0.35			0.13		

L'oxyde de zinc, après une dilution au 1/5 ne montre pas d'action sur les germes de référence, des phénomènes de résistance ont été décelés presque avec la quasi – totalité des souches testées.

De ce fait les valeurs des coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité signalent toujours des valeurs > à celle standard

Tableau XIV : Activités de l'oxyde de zinc sur les souches de référence à la concentration C/10

Souches	<i>E. coli</i> ATCC 25922			<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853			<i>E. faecalis</i> ATCC 29212			<i>S. aureus</i> ATCC 29213			<i>C. albicans</i> ATCC 24433			<i>B. subtilis.</i> ATCC 9372		
	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃
Essai 1	12	11	12	5	5	5	7	7	7	8	8	7	4	4	4	14	13	14
Essai 2	12	12	12	5	5	5	7	7	7	7	8	8	4	4	4	14	14	14
Essai 3	12	10	12	5	5	6	7	8	8	7	7	8	4	4	4	14	14	14
Essai 4	10	12	10	5	5	5	7	7	7	8	7	8	4	4	4	14	14	14
Essai 5	12	12	12	5	5	6	8	7	7	8	8	7	4	4	4	13	14	14

Essai 6	10	10	10	5	5	5	7	7	7	8	8	8	4	4	4	14	14	14
m_j	11	10	11	5	5	5.2	7.1	7.1	7.1	7.5	7.5	7.5	4	4	4	13	13	14
S^2_j	0.5	1.6	0.3	1.6	0.4	0.2	0.5	1.6	0.8	2.4	1.2	0.9	0.5	0.5	0.2	1.5	0.8	1.0
S^2_r	0.10			0.16			0.12			0.45			0.38			0.45		
μ	10.5			5.1			7.1			7.5			4			13.2		
S^2_g	0.05			0.25			0.44			1.6			0.15			0		
SR^2	0.15			0.41			0.56			2.03			0.23			0.45		
CV_r	0.21			0.14			0.12			0.56			0.11			0.19		
CVR	0.13			0.12			0.34			0.49			0.11			0.11		

Il en est de même que pour la dilution 1/10, l'oxyde de zinc dilué n'est pas actif, avec l'apparition des phénomènes de résistance.

La variance des répétitions à l'intérieur de chaque groupe d'essai est élevée.

Les essais de répétabilité et de reproductibilité ont été satisfaisants, vu les valeurs des coefficients de variation.

Tableau XV : Activité de l'acide para hydroxy benzoïque sur les souches de référence à la concentration C

Souches	<i>E. coli</i> ATCC 25922			<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853			<i>E. faecalis</i> ATCC 29212			<i>S. aureus</i> ATCC 29213			<i>C. albicans</i> ATCC 24433			<i>B. subtilis.</i> ATCC 9372		
	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃
Essai 1	0	1	2	5	4	4	1	0	0	1	0	0	0	0	0	17	17	17
Essai 2	1	2	0	4	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	17	18
Essai 3	0	0	0	4	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	17	17
Essai 4	0	0	0	5	5	4	0	1	0	0	1	0	0	0	0	17	17	17
Essai 5	0	0	0	4	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	17	17
Essai 6	0	0	0	4	4	4	1	1	0	1	1	0	0	0	0	17	17	17
m_j	0	0	0	4.5	4.8	4	0.3	0.3	0	0.3	0.2	0	0	0	0	18	17	18
S^2_j	0.2	0.5	1.4	1.6	0.7	0	1.7	0.8	0	0.6	0.1	0	0	0	0	0.2	0	0.5
S^2_r	1.54			0.3			2.1			1.3			0			0.1		
μ	0			4.5			0.2			0.09			0			17		

S ² _g	0.04	0.04	0.2	0.2	0	0.02
SR ²	1.58	0.34	.2.3	2.3	0	0.1
CV _r	0.16	0.06	0.14	0.14	0	0.01
CVR	0.16	0.06	0.14	0.14	0	0.01

La concentration active d'utilisation de l'acide para hydroxy benzoïque est peu actif contre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, est très antifongique et non actif sur *B. subtilis* ATCC 9372 ;

La variance des répétitions à l'intérieur des groupes d'essais n'est pas significative ;

Les coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité <15% sauf pour quelques rares germes (*E.coli* ATCC25922 avec des CV > 15%).

Tableau XVI : Activités de l'acide para hydroxy benzoïque sur les souches de référence à la concentration C/5

Souches Statistiques	<i>E. coli</i> ATCC 25922			<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853			<i>E. faecalis</i> ATCC 29212			<i>S. aureus</i> ATCC 29213			<i>C. albicans</i> ATCC 24433			<i>B. subtilis.</i> ATCC 9372		
	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃
Essai 1	1	1	0	7	8	7	4	4	4	5	5	5	2	1	2	25	25	24
Essai 2	2	1	1	8	8	8	4	4	4	4	4	5	1	1	2	24	25	25
Essai 3	0	0	1	9	8	8	5	4	5	5	5	5	2	1	2	25	25	26
Essai 4	2	2	0	7	7	8	4	4	4	5	5	5	2	1	1	25	25	25
Essai 5	1	1	2	8	7	7	4	4	4	5	5	5	1	2	1	25	25	25
Essai 6	0	2	0	7	8	8	4	4	4	5	5	5	2	2	2	25	25	25
m _j	0.3	0.3	0.1	1.5	2.1	0.8	4.1	4	4.1	4.8	4.8	5	1.7	1.4	1.7	24	25	25
S ² _j	0.8	0.4	1.6	2.1	0.2	0.8	0.5	1.3	0.6	0.2	2.6	0.5	0.6	0.7	1.3	2.3	1.8	0.5
S ² _r	0.18			0.27			0.42			0.78			0.12			1.3		
μ	0.2			2			4			3.1			1.5			24.6		
S ² _g	0			0.06			0.1			0.05			0			0.05		
SR ²	0.18			0.35			0.50			0.82			0.12			0.12		
CV _r	0.14			0.21			0.13			0			0.24			0.11		
CVR	0.09			0.14			0.09			0			0.32			0.11		

L'acide para hydroxy benzoïque diluée au 1/5 n'a montré aucune activité contre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, mais fongistatique et pas d'action sur *B. subtilis* ATCC 9372 ; la variance intra – essai donne quelquefois des valeurs élevées ;

Les coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité étant <15% à quelques exceptions près (*Candida albicans* ATCC 24433, *P. aeruginosa* ATCC 27853).

Tableau XVII : Activités de l'acide para hydroxy benzoïque sur les souches de référence à la concentration C/10

Souches	<i>E. coli</i> ATCC 25922			<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853			<i>E. faecalis</i> ATCC 29212			<i>S. aureus</i> ATCC 29213			<i>C. albicans</i> ATCC 24433			<i>B. subtilis.</i> ATCC 9372		
	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃
Essai 1	5	5	5	10	11	10	9	9	9	7	8	8	5	5	5	30	31	31
Essai 2	5	5	6	11	11	10	9	9	9	7	7	7	5	5	5	30	30	31
Essai 3	5	5	6	11	10	11	9	9	9	7	7	7	5	5	5	31	31	32
Essai 4	6	5	5	10	10	10	9	9	9	7	7	7	5	5	5	32	31	31
Essai 5	5	5	5	11	11	10	9	9	9	7	7	7	5	5	5	31	31	31
Essai 6	5	5	6	11	11	11	9	8	8	7	7	7	5	5	5	31	31	31
m _j	5.2	5	5.8	10	10	10	9	8.1	8.1	7	7.2	7.2	5	5	5	31	31	31
S ² _j	0.6	1.5	0.3	1.6	0.8	1.7	2.1	0.5	1.8	0.3	0.6	1.6	0.5	0.8	0.8	0.6	0	0.4
S ² _r	0.20			0.06			1.50			0.45			0.66			1.25		
μ	5.2			10			8.5			7.1			5			31		
S ² _g	0			0.08			0.5			0.04			0			0.08		
SR ²	0.20			0.14			2			0.49			0.66			1.33		
CV _r	0.22			0.10			0.14			0.23			0.05			0.35		
CVR	0.22			0.10			0.14			0.23			0.05			0.35		

La dilution 1/10 de l'acide para hydroxy benzoïque montre un nombre de survivants très élevé contre toutes les souches de référence ;

La variance intra – groupe est faible ;

Les coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité sont déterminés par les effets de résistance.

Tableau XVIII : Activités du mercurochrome sur les souches de référence à la concentration C

Souches	<i>E. coli</i> ATCC 25922			<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853			<i>E. faecalis</i> ATCC 29212			<i>S. aureus</i> ATCC 29213			<i>C. albicans</i> ATCC 24433			<i>B. subtilis</i> ATCC 9372		
	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃	G ₁	G ₂	G ₃
Essai 1	8	9	9	12	12	12	5	5	5	5	5	5	7	7	7	8	7	8
Essai 2	9	9	9	12	11	12	5	5	5	5	5	5	7	7	7	8	8	8
Essai 3	9	8	8	12	12	12	5	5	5	5	5	5	7	7	7	8	7	7
Essai 4	9	9	9	12	12	12	5	5	5	5	5	5	7	7	7	7	7	8
Essai 5	9	9	9	12	12	12	5	5	5	5	5	5	7	7	7	8	7	8
Essai 6	9	9	9	12	12	12	5	5	5	5	5	5	7	7	7	8	8	8
m _j	9	9	9	12	12	12	5	5	5	5	5	5	7	7	7	7.8	7.5	7.9
S ² _j	0.1	0	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.4	0.1
S ² _r	0.7			0.02			1.4			0.66			1.5			1.33		
μ	9			12			5			5			7			7.6		
S ² _g	0			0			0			0			0			0.05		
SR ²	0.7			0.02			1.4			0.66			1.5			1.33		
CV _r	0.06			0.10			0.07			0			0			0.25		
CVR	0.06			0.10			0.07			0			0			0.36		

Le Mercurochrome n'a pas montré une bactéricidie, ni une fongicidie, ni une sporicidie mais plutôt, il ya une inhibition de croissance des souches de référence étudiées ; la variance inter-essais est nulle ;

Les coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité < 15% sauf pour quelques rares germes (*Bacillus subtilis* ATCC 9372 CV > 15%).

Ce produit dilué donc n'aura donc pas d'effets sur ces souches de référence.

1/ ETUDE COMPAREE DES DIFFERENTES METHODES

1-1 METHODE DE DILUTION – NEUTRALISATION NORMES AFNOR

NFT 72-150, NFT 72-170, NFT 72-200, NFT 72-230.

1-1-1 Validité des essais préliminaires

Nous avons prouvé par des essais préliminaires qui sont tous validés, que la plupart des antiseptiques utilisés dans ce travail étaient facilement neutralisés lorsque le neutralisant idéal était utilisé. C'est donc bien une action bactéricide, bactéricide en présence de substances interférentes, fongicide, sporicide qui ont été mises en évidence lors des essais proprement dits selon respectivement les normes NFT 72-150, NFT 72-170, NFT 72-200, NFT 72-230.

Néanmoins nous devons signaler que les effets bactériostatiques, fongistatiques et sporostatiques sont possibles si l'antiseptique a une affinité pour les structures externes du microorganisme.

L'essai préliminaire selon les normes AFNOR (2, 3, 4, 5) est insuffisant pour mettre en évidence les effets bactériostatiques, fongistatiques, sporostatiques dus à la présence du produit sur le corps du microorganisme.

On peut aussi considérer à la limite que la fixation irréversible d'un antiseptique sur la paroi d'une bactérie ou d'un champignon conduit à des effets bactériostatiques, fongistatiques et sporostatiques prolongés équivalents à des effets bactéricides, fongicide, et sporicide vrais.

1-1-2 Validité des essais proprement dits

Des essais réalisés en parallèle plusieurs fois dans le même laboratoire avec le même équipement mais à des jours différents ont montré une bonne reproductibilité des résultats.

Les trois groupes d'essais répondent aux conditions de reproductibilité.

Il nous est permis également d'entreprendre des études comparatives et d'apprécier des variations même faibles de l'activité bactéricide des antiseptiques. Il nous est enfin permis de considérer les résultats ainsi acquis comme des données scientifiques valables.

1-1-3 Avantages de la méthode de dilution neutralisation NFT 72-150, NFT 72-170, NFT 72-200, NFT 72-230

- **Pas de matériel onéreux**
- **Facile à mettre en œuvre**
- **Résultats fidèles (répétable, reproductibles)**

Il n'existe de nombreuses méthodes permettant d'évaluer l'activité bactéricide des antiseptiques mais, la plupart de ces méthodes , si elles peuvent donner des résultats intéressants, précis et reproductibles, peuvent être difficilement mises en œuvre pour tester un grand nombre de souches bactériennes en raison de leur complexité ou de leur coût.

Or il ne peut être intéressant de connaître l'activité de tel ou tel antiseptique non pas seulement sur des souches de référence mais aussi sur des souches isolées quotidiennement dans tel ou tel hôpital, ne serait ce que juger de l'intérêt ou non de l'utilisation de tel ou tel produit dans des circonstances épidémiologiques ou écologiques données ; il peut être souhaitable de faire pour les antiseptiques ce qui se fait couramment pour les antibiotiques.

L'utilisation d'un ensemencement à sites multiples et effectuée depuis 1959 pour étudier l'activité bactériostatique de ces substances. Nous avons tenté dans ce travail d'adapter la technique à l'étude du pouvoir bactéricide d'un antiseptique. Elle permet d'étudier l'activité d'une même substance sur un grand nombre de souche, soit de comparer simultanément plusieurs substances.

Ces méthodes de bonnes reproductibilité donnent des résultats comparables et similaires à la norme AFNOR.

1-1-4 Limites

Les normes AFNOR, même si elles sont normalisées, reproductibles ont un inconvénient de taille ; elles n'étudient que les comportement des souches référencées de collection.

Elles ne sont pas les plus adéquates pour l'étude d'un grand nombre de souches et de plusieurs antiseptiques.

Nous reprochons à ces normes AFNOR, un éventail trop restreint de souches bactériennes, même si des souches testées (*S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *B. subtilis*) sont assez représentatives pour l'étude des différentes activités déterminées du fait de leur présence dans les infections courantes.

Les souches référence utilisées sont considérées comme des souches de référence internationales.

1-2 AUTRES METHODES

Il a été décrit une micro méthode calquée sur les méthodes AFNOR. Une micro méthode inspirée des techniques utilisées pour des antibiotiques de principe identique aux méthodes de l'AFNOR a été mise au point.

2/ ANALYSE DES RESULTATS

Une difficulté apparaît lorsqu'on veut comparer les résultats que nous avons obtenus avec ceux des autres auteurs.

Même si les normes AFNOR font autorité en la matière, il existe de très nombreuses méthodes de détermination de l'activité des antiseptiques. Elles répondent souvent à des objectifs variés, et il n'est pas toujours possible de les comparer les unes aux autres.

Les valeurs des CMB données dans la littérature sont très nombreuses et très variables ; les techniques, les souches et les substances utilisées sont très différentes. Les comparaisons sont donc difficiles.

2-1 Polyvinyl pyrrolidone iodée (PVP-I)

La polyvinyl pyrrolidone iodée (PVP-I) est un très bon antiseptique, les CMB sont généralement comprises entre 240 et 1.000 mg/l (54, 72).

Dans notre étude, comme nous avons utilisé des souches de référence qui ont pour particularité leur extrême sensibilité et dont le profil de sensibilité est connu, la polyvinyl pyrrolidone iodée 10% a été active sur toutes les souches même à la dilution au 1/10^{ème} (la concentration d'iode non complexé augmentera en fonction de la dilution) (9).

Si l'utilisation de l'iode peut à la longue sélectionner des souches résistantes (AFNOR), il ne faut pas cependant surestimer ce phénomène dont la fréquence est faible, compte tenu de la large diffusion de ces produits.

Quelques effets de résistance de la polyvinyl pyrrolidone iodée ont été obtenus avec *P. aeruginosa* ATCC 27853, ce qui confirme les travaux de Michel et Ollé J (54).

La technique des normes AFNOR NFT72-150, NFT72-170, NFT72-200, NFT72-230 a été bien adaptée pour la détermination des différentes activités de la polyvinyl pyrrolidone.

Les essais ont été validés vu les valeurs des coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité.

La variance des répétitions à l'intérieur des groupes d'essais n'étant pas significative.

2-1-2 Chlorure de benzalkonium

Le chlorure de benzalkonium fait partie de la famille des ammoniums quaternaires. C'est un bon antiseptique de par son activité bactéricide puissant.

Pour Surgot et al., la CMB du chlorure de benzalkonium est de 6,25mg/l sur les souches de *Staphylococcus aureus*.

Il est sporostatique à la concentration de 0,0005% à la température ambiante (42).

Une étude de Russels montre que les ammoniums quaternaires sont fongistatiques mais peu fongicides.

Il faudra être attentif à l'utilisation des ammoniums quaternaires en raison de leur faible activité antimicrobienne sur les *Pseudomonas aeruginosa* qui est une espèce responsable de la contamination hospitalier.

Le chlorure de benzalkonium est volontiers contaminé par les bactéries (57)

Ces résultats sont affirmés par des travaux réalisés à Montpellier le 24 Janvier 1995 par une équipe du laboratoire de Innotech International. Aucune résistance n'a été retrouvée pour *Staphylococcus aureus* (21).

2-1-3 L'acide parahydroxybenzoïque

L'acide para hydroxy benzoïque, (Nisapulvol® poudre) est un produit efficace surtout sur *Staphylococcus aureus* et sur les champignons.

Néanmoins, l'apparition des résistances est observée avec les spores.

Pour ce produit nous n'avons pas obtenu de variations inter-essais mais quelques variations inter-groupe ; tous les essais ont été répétables leur non reproductibilité peut être due à la démarche surtout concernant la stérilisation du matériel de travail et les autres facteurs influençant tels que la température, le pH...

2-1-4 L'oxyde de zinc

L'oxyde de zinc est efficace sur toutes les souches testées, il présente une activité sporicide, fongicide, bactéricide, mais l'activité bactéricide est diminuée en présence de protéines.

Mais après dilution, l'activité est devenue faible.

Les résultats des essais sont superposables à ceux des travaux antérieurs (75).

2-1-5 Le mercurochrome

Notre étude a confirmé la littérature par le fait que le Mercurochrome est bactériostatique et fongistatique. parce qu'avec toutes les souches testées, nous n'avons obtenu aucune activité.

Il faudra préconiser l'utilisation rationnelle des antiseptiques mercuriels en particulier et en général tous les métaux lourds. Ceci pour éviter la sélection de souches microbiennes résistantes au mercure et surtout aux antibiotiques (ces deux types de résistance étant souvent associées) (22)

Les résultats de la répétabilité et la reproductibilité des essais nous ont permis de dire que la méthode de dilution – neutralisation est efficace pour

**l'évaluation de l'activité du
15%).**

mercurochrome, solution 3%.(CVr et CVR <

Dans ce travail, nous avons entrepris l'évaluation d'une méthode fiable pour le
contrôle de l'activité des antiseptiques in vitro.

L'efficacité bactériologique sera appréciée au moyen de la conformité des produits aux normes AFNOR de préfixe NF T- 72 relatives aux antiseptiques et désinfectants (dans l'attente des normes européennes en cours), ces normes permettant à la fois de déterminer les concentrations minimales, d'évaluer et de comparer les produits ; mais elles sont insuffisantes car ne supportent aucune extrapolation à des souches non citées dans les normes (exemple les souches référencées de collection), malgré leur reproductibilité et leur normalisation.

Ainsi par cette méthode, nous avons déterminé l'activité bactéricide, bactéricide en présence de substances interférentes, fongicide et sporicide de cinq médicaments antiseptiques.

Pour une meilleure appréciation des paramètres de validation , il nous a semblé intéressant d'étudier l'activité de ces médicaments antiseptiques sur des souches de référence qui sont des souches de référence dont le profil de sensibilité est connu (des souches American Type Culture Collection : ATCC) .

Les produits que nous avons testés in vitro :

- Mercurochrome à 3% , solution
- Oxyde de zinc, Dermocuire[®] , pommade

- Benzyl paraben, Nisapulvol[®], poudre
- Chlorure de benzalkonium, Pharmatex[®], crème
- Polyvinyl pyrrolidone iodée, Bétadine dermique 10%[®], solution

Toutes les normes d'assurance qualité ont été respectées durant toutes les étapes de nos manipulations. Pour cela, nous avons assuré chaque étape en validant les appareils utilisés par des fiches techniques de contrôle, les milieux de culture, les réactifs, les souches de référence (identification morphologique, biochimique et caractères cultureux).

Les résultats des essais préliminaires nous ont permis de dire que la méthode de dilution-neutralisation des normes AFNOR est bien adaptée et est efficace pour le contrôle microbiologique de l'activité de tous les médicaments antiseptiques que nous avons effectués.

Pour la détermination des activités, nous avons effectué 3 dilutions de chaque produit antiseptique c'est-à-dire :

- Le produit non dilué
- Une dilution au 1/5^{ème}
- Une dilution au 1/10^{ème}

Parmi les médicaments testés seuls **l'oxyde de zinc** et la **polyvinyl pyrrolidone iodée** sont actifs sur toutes les souches de référence utilisées (*Staphylococcus aureus* ATCC 25213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 24433, *Bacillus subtilis* ATCC 9372) à la concentration active.

Le chlorure de benzalkonium est bactéricide et fongicide mais ne possède aucune activité sur les spores de *Bacillus subtilis*.

Le **Benzylparaben** est actif sur les bactéries mais pas sur les champignons et les spores.

Le **Mercurochrome** à 3% est bactériostatique et fongistatique.

La présence de substance interférentes diminue l'activité bactéricide de tous les médicaments testés.

Pour la validation des essais nous nous sommes focalisés davantage sur les critères de fidélité (répétabilité et reproductibilité des essais). Cela n'exclut pas les autres paramètres.

Pour cela nous avons remarqué que les résultats des essais proprement dits permettent de juger la procédure de la méthode comme satisfaisante, compte tenu des valeurs des coefficients de variation de répétabilité (0,12%) et de ceux de reproductibilité (0,05%).

En conclusion d'un travail très remarquable, le choix d'un produit implique un travail long et minutieux d'étude de dossiers.

La stratégie de choix des médicaments et des désinfectants est délicate. Il sera préférable de conclure des marchés pour l'achat de ces produits sur deux ans au

moins, car la connaissance des noms et des protocoles d'utilisation des produits nouveaux sont difficiles à intégrer par les soignants et demeurent la garantie de l'optimisation des procédures d'antisepsie et de désinfection.

La décision d'achat se portera sur les produits présentant le meilleur compromis entre efficacité microbiologique, absence de toxicité, acceptabilité, facilité de manipulation et moindre coût.

1- Adair, F.W., S.G. Geftic, And J. Gelger. 1969

Resistance of *Pseudomonas* to quaternary ammonium compounds

I Growth in benzalkonium chlorid solution.

Appl. Microbiol. 18: 299 – 302

2- AFNOR (Association française de normalisation) : vocabulaire

Recueil de normes françaises.

NF T 72 – 150, Paris, 1989 2^e édition p 3 – 5

3- AFNOR :

Antiseptiques et désinfectants utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau et neutralisables.

Détermination de l'activité bactéricide (méthode par dilution-neutralisation).

Recueil des normes françaises NF T 72 – 150, Paris, 1989 2^e édition p 32 – 52

4- AFNOR :

Antiseptiques et désinfectants utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau et neutralisables.

Détermination de l'activité bactéricide en présence de substances interférentes (méthode par dilution-neutralisation).

Recueil des normes françaises NF T 72 – 170, Paris, 1989 2^e édition p 74

5- AFNOR :

Antiseptiques et désinfectants utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau et neutralisables.

Détermination de l'activité fongicide (méthode par dilution-neutralisation).

Recueil des normes françaises NF T 72 – 200, Paris, 1989 2^e édition

6- AFNOR :

Antiseptiques et désinfectants utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau et neutralisables.
Détermination de l'activité sporicide (méthode par dilution-neutralisation).

Recueil des normes françaises NF T 72 – 230, Paris, 1989 2^e édition p 210

7- Ames Gfl, Spudich En, Nikaido H.

Protein composition of the outer membrane of *Salmonella typhimurium* : effect of Lipopolysaccharide mutation.

J. Bact. , 1974 ; 117 : 406 – 416

8- Bean H. S.

Types and characteristics of disinfectants.

J. Applied Bacteriol. 1967 ; 30 : 6 – 16.

9- Berkeman R. L., Holland B W., Anderson R. L.

Incrused bactericidal activity of dilute preparations of povidone iodine solutions.

J. Clin Microbiol 1982 ; 15 : 635 – 638.

10- Berkeman (R. L.), Lewins (S.), Alen (J. R.)

Pseudobacteremia attributed to contamination of povidone iodine with *Pseudomonas cepaciae*.

Ann. Int. Med., 1981, 95 ; 32 – 36.

11- Bloomfied SF, Arthur M.

Development of methods for preparing bacterial test suspension with repeatable and reproducible resistance to antiseptics and disinfectants.

12- Bordero A.

Sites et modes d'action des antiseptiques et des désinfectants sur les bactéries. *Thèse de doctorat vétérinaire*, Nantes, 1990

13- Bourlioux P.

Biochimie fonctionnelle des structures bactériennes.

In : Bactériologie médicale (le Minor L, Veron M eds) Médecine Sciences Flammarion, Paris, (1989) 23 – 51.

14- Brown, M. R. W. 1975.

The role of the cell envelope in résistance, P. 71 – 99.

In M. R. W. Brown (ed.), Résistance of Pseudomonas aeruginosa. John Wyky & Sons, Ltd., Chichester, England

15- Caporal-Gautier J. et J. M. Nive

Guide de validation analytique.

Rapport d'une commission SFSTP I. Méthodologie.

16- Chaplin CE.

Bacterial resistance to quaternary ammonium disinfectants.

In Bact 1952, 63 : 453 – 458

17- Cremieux A.

Méthode d'étude in vitro des antiseptiques et désinfectants méthodes par dilution-neutralisation : évaluation et critique.

Revue de l'Inst. Pasteur de Lyon. 1978, t11, n°3 pp 433 – 444.

18- Cremieux A., Guiraud H., Bonnaveiro N., Benjelloul D.

Inhibition de l'activité bactéricide de la PVP Iodée et du chlorure benzalkonium par des tensioactifs non ioniques et ampholytes.

J. Pharm Belg 1982 ; 37 : 263 – 266.

19- Cookson, B. D. 1994.

Antiseptic resistance in méthicillin – resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging problem, p. 227 – 234.

In proceedings of the 7th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, Germany.

20- Davies A, Roberts W.

The cell wall of chlorhexidine resistant *Pseudomonas*.

Biochem J 1969 ; 112 : 63 - 78 .

21- Diop A.

Caractères phénotypiques de différentes souches bactériennes nosocomiales isolées au service gynécologique obstétrique de HALD

Thèse pharm., Dakar ; 1994, n°82

22- Dieng C. T.

Prophylaxie et prévention des infections nosocomiales.

Thèse pharm. 1998 ; n°27.

23- Druilles J. A., Chantefort (M.), Huet (R.)

Activité bactéricide de quelques antiseptiques.

Revue de l'Inst. Pasteur de Lyon 1986 ; 19 : 217 – 231

24- Dupas H., Nougayrede Ph., Perrin G.

Contrôle de l'activité bactéricide des désinfectants.

Ann Microbiol (Paris) 1975 ; 126B : 51 - 61

25- Duval J.

Activité bactéricide des principales familles d'antiseptiques.

Synthèse des résultats obtenus par le groupe « antiseptique ».

Revue de l'Inst. Pasteur de Lyon, t 11, n°3, pp 457 – 468.

26- Duval J.

Les agents antibactériens antiseptiques et désinfectants

In (Leminor L, et Veron N. Bacterio – med.), 2^{ème} ed., Flammarion Médecine – Sciences, Paris 1989, pp 178 – 188).

27- El Moug T., Rogers Dt, Furr Jr, El Falaha Bm, Russel Ad.

Antiseptic – induced changes in the cell surface of a chlorhexidine – sensitive and a chlorhexidine – resistant strain of *Providencia Stuartii*.

J Antimicrob Chemother 1985 ; 16 : 685 – 689.

28- Fabiani G.

Place de l'antisepsie et de la désinfection dans la lutte contre les infections hospitalières.

Revue du praticien, 1980, 30, 51.

29- Favero S. M. and Bond W. W.

Chap 24 Sterilization, Disinfection 1986 ; and Antisepsis in the Hospital

In (Manual of clinical Microbiology fifth. Edition Washington 1991, pp 183 – 200).

30- Fleurette J., J. Freney, M – E Reverdy

Antisepsie et Désinfection.

Editions ESKA p 19.

31- Fleurette J., Transy M. J., Flandrois J. P., Brun Y., Lauras E.

Evaluation de l'activité bactéricide du chlorure de benzalkonium au moyen d'un ensemenceur à sites multiples.

Path Biol 1973 ; 21 : 845 – 850.

32- Foster T. J.

Plasmid – determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria.

Microbiol Rev 1987 ; 47 : 361 – 409.

33- Furet Y. X., Deshusses J., Pechère J. C.

Transport of perfloroxacin accross the bacterial cytoplasmic membrane in quinolone susceptible *Staphylococcus aureus*.

Antimicrob Agents Chemother 1992 ; 36 : 2506 – 2511

34- German A.

Etude de l'activité bactéricide d'une polyvinylpyrrolidone iodée. *Agressologie, 1973, 141,* pp 39 – 47.

35- Giles Ch., Mac Ewan Th., Nakhwo Sn.

Smith – Studies in adsorption. XI - A system of classification mechanisms and measurement of specific surface aereas of solids.

J Chem Society 1960 ; 3973 – 3993.

36- Giles Ch., Smith D., Huitson A.

A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm I
Theoretical.

J. Colloid Interfacial Science 1974 ; 47 : 755 – 765

37- Gillepsie Mt., Lyon Br., Skurray Ra.

Gentamicin and antiseptic resistance in epidemic methillin – resistant
Staphylococcus aureus.

Lancet 1989 p 503.

38- Grebus C., Cremieux A., Jacquet – Francillon M. L., Dumenil G.

Détermination de l'activité bactéricide du chlorure de benzalkonium par numération des
survivants après neutralisation de l'antiseptique.

Path. Biol. 21, 1971, n°8 : 851 – 859.

39- Halley R. W. and all.

The nation wide nosocomial infection.

Ann. J. Epidemiol. 1985, 121 – 167.

40- Hamilton WA.

Membrane active antimicrobial compounds.

In : Inhibition and destruction of the microbial cell. (Hugo WB ed). Academic press.

London (1984) ; 77 – 93.

41- Horn et Ditter

Physical chemical fundamentals of the microbicida action of povidone iodine.

International Symposium of povidone university of kentucky 17 – 20 April 1983, p120 – 140.

42- Hugo W. B., Russel Ad.

Mode of action of non-antibiotic antibacterial agents. In : WB Hugo, AD Russel (eds).

Pharmaceutical microbiology. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1992 : 288 – 294.

43- Hoff J. C. Akine E. W.

Microbial resistance to disinfectants mechanisms and significance.

Environ Heath Perspect 1986 ; 67 : 7 – 13.

44- Joly, B. 1995.

La résistance microbienne à l'action des antiseptiques et désinfectants, P 52 – 65.

In J. Fleurette, J. Freney and M. E-Reverdy (ed.), Antiseptie et désinfection. Edition ESKA, Paris, France.

45- Kirchoff H.

Zur Resistungteigerung von microorganismen gegenüber Desinfektions

Mittel. Besuradh Wes desinf 1964 ; 11 : 153 –157.

46- Komura I., Okeba T. Et Isaki, K.

Mechanism of mercuric chloric resistance in microorganisms II NADPH dependant reduction of mercuric chlorid by a multiple drug resistance strain of *E. coli*.

J. Biochem Tokyo, 1970, 70, pp 835 – 901.

47- Lambin S., Desvignes A., Lelvan G.

Application de la technique de filtration sur membrane à la détermination de l'activité bactéricide partielle et totale de quelques substances à l'égard de *Pseudomonas aeruginosa*. Comparaison des résultats obtenus avec ceux fournis par d'autres méthodes.
Ann. Pharm. Franç., 1972, 30 : 255 – 262.

48- Leive, L. 1974.

The barrier function of the Gram negative envelope.
Ann. N. Y. Acad sci. 235 : 109 – 129.

**49- Little John T. G., Di Berardino D., Messeroti L. J., Spiers S. J.,
 Scurray R. A.**

Structure and evolution of a family of genes encoding antiseptic and disinfectant resistant in *Staphylococcus aureus*.
Gene 1990 ; 1 : 56 – 66.

50- Livrelli Y., Lee I. W., Summers A. O.

In vivo DNA protein interactions at the divergent mercury resistance *mer* (promoters).
J. Biol. Chem 1983 ; 268 : 2623 – 2631.

51- Lyon BR, Skurray R. A.

Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* : genetic basis.
Microbiol Rev. 1987 ; 51 : 88 – 134.

52- Meadow PM.

Wall and membrane structures in the genus *Pseudomonas*.
In : Genetics and Biochemistry of (Clarke P)

53- Meyer A. et Coll.

Les agents antimicrobiens.
In : Cours de Microbiologie Médicale. 1991 ; 199 - 217.

54- Michel G., Olle J., Lalavrette C.

Emergence de résistance à l'égard de la chlorhexidine et de la polyvinylpyrrolidone iodée (PVP I).

Etude in vitro, 1979, pp 15 – 25.

55- Misra T. K.

Bacterial resistance in organic mercury salts and organomercurials.

Plasmid 1992 ; 27 : 4 – 26.

56- Nagai I., Ogase H.

Absence of role for plasmids in resistance to multiple disinfectants in three strains of bacteria.

J. Hosp Inf 1990 ; 15 : 149 – 155.

57- Nakashima A. R., McCaughy M. A., Martone W. J.

Epidemic septic arthritis caused by *Serratia marcescens* and associated with a benzalkonium chlorid antiseptic.

J. Clin. Microbiology , 1987, 25 : 1014 – 1018.

58- Offret G. et Dhermy P.

Les collyres antiseptiques.

Journal français d'ophtalmologie, 1986 ; 9, 791- 903

59- Pharmacopée Française

Monographie préparations antiseptiques

Note Pharmacopoea : Juillet 1985. Additif à la X^{ème} édition : K Janvier 1990.

60- Phinney R. B., Mondino B. J., Holbauer I. D., Meisler M.,

Langston R. H. S., Forstet S. L., Beness S. C.

Corneal edema related to accidental hibiclen exposure.

American Journal of Ophtalmology, 1988, 106 : 210 – 215.

61- Reverdy M. E., Bes M., Nervi C., Martra A., Fleurette J.

Activity of four antiseptics (acriflavine, benzalkonium chloride, chlorhexidine digluconate and hexamidine disethionate) and ethidium bromide on 392 strains representing 26 *Staphylococcus species*.

Med Microbiol Lett 1992 ; 1 : 56 – 63.

62- Russel, A. D., J. R. Furr, And W. J. Pugh

Sequential loss of outer membrane lipopolysaccharide and sensitivity of *Escherichia coli* to antibacterial agents.

***Jnt J. Pharm.* 35 : 427 – 233**

63- Russel, A. D.

Antifungal activity of biocides.

In : A. D. Russel, W. B. Hugo, and GAF. Ayliffe (ed), Principales and pratic of disinfection, preservation and sterilization, 3rd ed.

In press. Blackwell, Science, Oxford, England.

64- Russel, A. D. And J. R. Furr. 1996.

Biocides mechanisms of antifungal action and fungal resistance

Sci. Prog. 79 : 27 – 48

65- Russel, A. D. And J. R. Furr.

Susceptibility of porin and LPS – deficient strains of *Escherichia coli* to some antiseptics and disinfectants.

J Hosp Infect 1986 ; 8 : 47-56.

66- Ryter A.

Structure et anatomie fonctionnelle

In : bactériologie médicale (Le Minor L, Veron M eds) Médecine Sciences Flammarion, Paris, (1989) 3 – 22.

67- Saint – Yreix P.

Les antiseptiques à l'hôpital Pellegrin G.

Thèse Pharm., Bordeaux II, 1990, n° 7.

68- Salton M.R.J.

Lytic agents, cell permeability and monolayer penetrability.

J Gen Physiol 1968 ; 52 : 227 – 252.

69- Sébastien F.

L'utilisation des membranes filtrantes en microbiologie. Détermination de l'activité bactéricide des substances antiseptiques, contrôles de stérilité.

Thèse université, Pharmacie France.

70- Silva, S. Misra. 1988.

Plasmid. Mediated heavy metal resistances.

Annu. Rev. Microbiol. 42 : 711 – 743.

71- Stickler, D. J., Thomas B.

Antiseptic and antibiotic resistance in gram negative bacteria causing urinary tract infection.

J. Clin. Path., 1980, 33, pp 288 – 296.

72- Summers A. O.

Organization, expression and evolution of genes for mercury resistance.

Ann. Rev. Microbiol 1986 ; 40 : 607 – 634.

73- Surgot M., Fleurette J. et Reverdy M. E.

Utilisation d'une microméthode pour l'étude de l'activité bactéricide des antiseptiques et désinfectants.

Revue de l'Inst. Pasteur de Lyon. 1982 ; t 15 n°2 : 241 – 252.

74-Tetaz T. J., Luke R. K. J.

Plamid controled resistant to copper in *E. coli*

J Bact 1983; 154 : 1263 – 1268.

75- Thiam M.

Détermination de l'activité bactéricide fongicide et sporicide de cinq formes d'antiseptiques sur des souches référencées de collection au Laboratoire National de Contrôle des Médicaments.

Thèse Pharm., Dakar, 2000, n°68

76- Traoré B.

Détermination de la CMB de quatre antiseptiques et d'un désinfectant sur des souches bactériennes d'origine hospitalière.

Thèse Pharm. ; Dakar, 1996, n° 43.

77- Van Cuyck-Gandre, H., G. Molin, And Y. Cenetienpo. 1985.

Etude de la résistance plasmidique aux antiseptiques. Mise au point de méthodes.

Pathol. Biol. 33 : 623 – 627.

78- Vassault A., Grafmeyer D., Naudin C. et al et les membres de la commission Validation de techniques de la SFBC.

Protocole de validation de technique (Document B).

Ann. Biol Clin. 1986 ; 44 : 686 – 745

79- Vassault A., Dumont G., Labbé D.

Définitions des critères des qualités d'une méthode d'analyse.

Le Moniteur Internat 1992 ; 26 : 20 – 33.

80- Ville B.

Possibility of development of resistance to disinfectants of micro organisms.

ZBL BAKT HYG I ABT ORIG 1976 ; 162 : 217 - 220

81- Weiss A. A., Murphy S. D., Siber S.

Mercury and organomecurial resistances determined by plasmids in *S. aureus*.

J. Bacteriol 1977 ; 132 : 197 – 208.

82- White, D. C. 1997.

Antifungal drug resistance in *Candida albicans*.

ASM Neurs 63 : 427 – 433.

**83- Woodruff W. A., Parr Tr, Hancock Rew, Hanne L., Nicas Tj,
Iglewski B.**

Expression in *Escherichia coli* and function of porin protein of *Pseudomonas aeruginosa*.

J Bact 1986 ; 167 : 473-479

**84- Yamaguchi H., Uchida K., Hiratani T., Hara T., Fukuyesu H.,
Kazuno Y., Inouye S.**

In vitro actitivity of ME 1401, a new antifungal agents.

Antimicrob Agents Chemother 1986 ; 30 : 705 – 712.

85- Yasuda-Yasuki, Y. S. Namiki-Kanie, And Y. Hachisaka. 1978.

Inhibition of germination of *Bacillus subtilis* spores by alcohols, P. 113 – 116

In G. Chambliss, and J. C. Vary (ed.), Spores VII. American Society for Microbiology, Washington, D. C.