

éviter l'émergence de souches résistantes aux macrolides poussant à l'utilisation de molécules de dernier recours comme les kétolides.

INTRODUCTION

Pendant longtemps, les antibiotiques ont fait preuve d'efficacité, notamment, dans la lutte contre les infections bactériennes qui sévissent dans les couches fragilisées de la population. Mais une remise en cause de cette efficacité s'opère de plus en plus parce que certaines infections, dont celles respiratoires, se sont montrées récidivantes comme peuvent en témoigner les chiffres de certains services hospitaliers (ORL, pédiatrie). Ce sont des infections qui surviennent généralement de façon périodique, et plusieurs agents bactériens peuvent en être responsables. Mais notre étude sera orientée spécifiquement vers des bactéries très virulentes, les streptocoques, qui ont longtemps montré une sensibilité vis-à-vis des molécules comme les macrolides. A noter que les macrolides font partie, jusqu'à présent, des molécules prescrites en première intention.

Normalement l'efficacité thérapeutique devrait être garantie avec comme condition majeure, le respect de la posologie et de la durée du traitement. Tel n'est pas le cas puisqu'il est de constatation quotidienne dans tout laboratoire de bactériologie, que de nombreuses souches de streptocoques ne se comportent plus conformément à ce que le spectre d'activité des macrolides permettrait de supposer. En effet, depuis l'introduction successive en thérapeutique des différentes molécules de macrolides, la sensibilité des streptocoques à ces antibiotiques a beaucoup évolué, de sorte que le pourcentage de souches résistantes est actuellement important.

C'est dans cette optique que nous avons fait une étude comparée des CMI pour voir l'évolution des sensibilités de certaines souches de streptocoques vis-à-vis des macrolides. Et cette étude représente une opportunité de tester des molécules récentes comme les kétolides,

supposées être de dernier recours dans le traitement de ces infections respiratoires.

Nous espérons, par les résultats obtenus, apporter notre modeste contribution au renforcement de la crédibilité du médicament en général et de cette famille d'antibiotiques en particulier, que sont les macrolides.

En effet, ces résultats permettront d'une part aux cliniciens en cas d'urgence de prescrire la molécule la plus efficace, d'autre part aux pharmaciens d'assurer un suivi et des conseils adéquats afin de prévenir et d'atténuer les risques de résistance bactérienne.

PREMIERE
PARTIE :
GENERALITES

I. CARACTERES GENERAUX DES STREPTOCOQUES

1. Définition

Les streptocoques appartiennent à la famille des *Streptococcaceae* comprenant deux principaux genres : *Streptococcus* et *Enterococcus*.

Ce sont des **cocci à Gram positif** disposés le plus souvent **en chaînettes** :

- qui ont un métabolisme aérobio-anaérobio facultatif
- qui sont exigeants en nombreux facteurs de croissance: le sang ajouté aux géloses permet leur multiplication *in vitro*. Cette multiplication (ou croissance) peut être favorisée par l'apport de CO₂ ou par une atmosphère anaérobio.

Ces caractères morphologiques et métaboliques les distinguent des staphylocoques. Les entérocoques sont proches des streptocoques (même morphologie et métabolisme anaérobio), à la différence que ces germes peuvent se multiplier sur des milieux de culture ordinaires.

En microbiologie médicale on classe les streptocoques en se basant sur plusieurs critères :

- le pouvoir hémolytique
- l'équipement antigénique
- les caractères biochimiques.

2. Classification des streptocoques

Les différentes espèces de streptocoques peuvent être classées et identifiées d'après les critères cités ci-dessus:

- ***Le type d'hémolyse*** produit sur gélose au sang:

- hémolyse incomplète: streptocoques α -hémolytiques
- hémolyse complète: streptocoques β -hémolytiques
- pas d'hémolyse: streptocoques γ -hémolytiques.

- ***L'équipement antigénique:*** un antigène de la paroi, le polyoside C permet de définir plusieurs groupes, selon **Rebecca Lancefield**: A, B, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, O, P, R, S, T, U, V.

Certains streptocoques, dépourvus de polyoside C, sont dits "non groupables".

- ***Les caractères biochimiques*** qui permettent d'individualiser des espèces dans le genre: *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*...

II. STREPTOCOCCUS PYOGENES

Streptococcus pyogenes (Rosenbach, 1884), streptocoque β -hémolytique du groupe A, représente le type même de bactérie pathogène pour l'homme.

1) Caractères bactériologiques

➤ Morphologie

Ce sont des cocci à Gram positif, disposés en chaînettes, immobiles, non sporulés, apparaissant parfois capsulés.

➤ Caractères de culture

Streptococcus pyogenes est un germe exigeant, aérobio-anaérobio facultatif. Pour sa culture, l'adjonction de sang dans le milieu est utile à cause de l'action catalasique de l'hémoglobine.

Sur gélose au sang, les colonies sont petites, transparentes et entourées d'une zone d'hémolyse franche et complète : **β -hémolyse**.

En milieu liquide la culture prend l'aspect de « mie de pain ». La température optimale de croissance se situe entre 35° et 37°C. Le pH qui doit être voisin de 7,2 impose d'utiliser des milieux tamponnés.

→ *Caractères antigéniques*

Parmi les nombreuses substances antigéniques diffusibles, certains ont une importance bactériologique et pathogénique.

- **La streptolysine O** lyse la membrane des érythrocytes et d'autres cellules (leucocytes et plaquettes) en se liant au cholestérol. Elle est antigénique et suscite la formation d'anticorps nommés **antistreptolysine O** (ASLO) dont l'élévation des titres sériques constitue un bon marqueur d'infection streptococcique.
- **La streptolysine S** est produite par de nombreux streptocoques des groupes A, C, G mais aussi E, H et L. Elle n'est pas antigénique.
- **La hyaluronidase** a un effet lytique sur la substance de base du tissu conjonctif et se comporte, de ce fait, comme un facteur favorisant la diffusion de l'infection.
- **La streptokinase** active la transformation du plasminogène en plasmine qui lyse la fibrine et s'oppose ainsi à la formation de barrières fibrineuses autour des lésions tissulaires où se développent les streptocoques : c'est également un facteur de diffusion comme l'hyaluronidase.
- **La streptodornase** ou **DNAse** dégrade les acides nucléiques. Elle n'a pas d'effet cytotoxique car elle ne pénètre pas dans les cellules eucaryotes.

- Les toxines érythrogènes provoquent une éruption érythémateuse et de la fièvre.

☛ *Caractères biochimiques*

Les streptocoques du groupe A sont dépourvus de catalase et d'oxydase ce qui confirme le genre *Streptococcus* et l'étude antigénique caractérise le groupe A.

Ils se distinguent parmi les streptocoques β hémolytiques par leur sensibilité à la bacitracine.

2) Habitat et pouvoir pathogène

Streptococcus pyogenes est un **germe strictement humain** à l'origine d'infections streptococciques qui peuvent être non invasives ou invasives et de complications post-streptococciques qui surviennent à distance de l'infection aiguë.

Les **pharyngites** ou **angines** sont les manifestations les plus fréquentes des infections streptococciques aiguës.

III. STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

Isolé pour la première fois par Pasteur en 1881 et en raison de son important pouvoir pathogène pour l'homme, ce germe fut l'objet de nombreux travaux depuis la fin du 19^{ème} siècle.

L'étude de cette bactérie fut à l'origine de nombreuses découvertes concernant les mécanismes de pathogénicité, la réponse immunitaire à médiation humorale, les transferts génétiques (découverte de la transformation bactérienne dont l'étude a permis de montrer que l'ADN est le support de l'information génétique).

Depuis quelques années, on assiste à l'émergence de **souches de sensibilité diminuée à la pénicilline**.

1. Caractères bactériologiques

Morphologie

Les pneumocoques sont des diplocoques à Gram positif en forme de « flamme de bougie » ou de « 8 », parfois associés en courtes chaînettes.

Caractères culturaux

Ces germes sont aérobies-anaérobies facultatifs, à métabolisme fermentatif, catalase négative dont la culture exige des milieux riches et sur gélose au sang : ils forment de petites colonies entourées d'une zone d'**hémolyse a..**

➤ *Caractères antigéniques*

Des antigènes capsulaires de structure polyosidique déterminent plusieurs sérotypes de pneumocoques.

Un polyoside C est présent dans la paroi ainsi que des protéines M et R.

La substance C des pneumocoques précipite en présence d'une protéine sérique appelée CRP (C reactive protein) dont la concentration s'élève chez les sujets atteints d'une affection inflammatoire ou d'une infection bactérienne.

➤ *Caractères biochimiques*

Les pneumocoques sont dépourvus de catalase et d'oxydase comme tous les streptocoques.

Les colonies ont tendance à s'autolyser rapidement et cette tendance est accélérée par la présence d'agents tensioactifs comme les sels biliaires.

2. Habitat et pouvoir pathogène

Streptococcus pneumoniae est une bactérie commensale des voies respiratoires supérieures de l'homme souvent à l'origine d'**infections otorhinolaryngologiques** (otites moyennes aiguës, sinusites aiguës), de **pneumopathies communautaires** et de **méningites purulentes**.

IV. NOTION DE SENSIBILITE

1. Généralités

La sensibilité bactérienne aux antibiotiques est un paramètre important d'identification qui se détermine par l'**antibiogramme**.

Cet examen de routine permet de comparer la valeur de la **CMI** (concentration minimale inhibitrice) d'un antibiotique par rapport à celle de deux concentrations critiques c et C (mg/l ou $\mu\text{g}/\text{ml}$) fixées conventionnellement. Cette comparaison permet de savoir si la bactérie est **sensible, intermédiaire ou résistante**.

La mise en évidence de l'effet d'un antibiotique vis-à-vis d'une souche bactérienne est simple et macroscopique. La détermination de la CMI fait référence à l'inhibition macroscopique, et plusieurs méthodes sont utilisées :

- **la méthode de dilution en milieu solide** consiste à incorporer l'antibiotique à une concentration donnée dans la gélose, maintenue liquide à 42°C.

Une série de boîtes de Pétri est préparée avec des concentrations d'antibiotique variant selon une progression géométrique de base 2. Puis sont préparées les différentes suspensions bactériennes qui sont alors distribuées dans les microcupules métalliques.

Des tiges métalliques stériles plongent dans chaque cupule. Puis par un mouvement de translation sont déposées les différentes bactéries sous le même volume à la surface du milieu gélosé ou solide. Après avoir

ensemencé la série de boîtes, celles-ci sont incubées dans une étuve jusqu'au lendemain pour faire la lecture.

- **la méthode de diffusion ou des disques en milieu solide** est la plus simple. Elle consiste à ensemencer en surface d'un milieu solide par inondation de la souche à tester puis à déposer des disques comprenant un antibiotique à une certaine concentration.

La boîte ainsi préparée est mise à l'étuve à 37°C. Il est possible de voir la croissance bactérienne ainsi que des zones d'inhibition circulaires à proximité de chaque disque. Plus la zone d'inhibition est grande, plus grande est la sensibilité de la souche bactérienne testée vis-à-vis de l'antibiotique étudié.

- **E-test** : un gradient de concentrations d'antibiotique est obtenu dans une bandelette plastifiée. Il suffit de déposer l'une de celle-ci (une bandelette par antibiotique) à la surface d'une boîte de Pétri ensemencée par la suspension bactérienne déjà préparée puis, après 24 heures d'incubation à 37°C, de lire directement la valeur de la CMI.

2. La résistance bactérienne

2-1. *Définition*

Pour être efficace, un antibiotique doit parvenir au contact de la bactérie, ce qui implique qu'on tienne compte, dans la prescription, des données pharmacologiques telles que la posologie, la voie d'introduction, la diffusion tissulaire et le métabolisme de la molécule.

Il doit ensuite pénétrer dans la bactérie, n'y être ni détruit ni modifié, se fixer à une cible et perturber ainsi la physiologie bactérienne.

Si l'une de ces conditions n'est pas remplie, l'antibiotique, même correctement administré, se révèlera inefficace.

Ce phénomène appelé résistance est lourd de conséquences et doit être, si possible, dépisté au laboratoire.

2-2. *Les différents types de résistance bactérienne*

On connaît des résistances naturelles, programmées sur le génome bactérien, donc fixes et constantes à l'intérieur du taxon. A ce titre, elles constituent un critère d'identification.

On connaît aussi des résistances acquises, consécutives à des modifications de l'équipement génétique chromosomique ou plasmidique. Elles ne concernent que quelques souches d'une même espèce mais peuvent s'étendre : leur fréquence varie dans le temps mais aussi dans l'espace. Elles constituent un marqueur épidémiologique.

Quand on étudie la sensibilité d'une souche à plusieurs antibiotiques, on détermine son phénotype de résistance aux antibiotiques.

Si la souche n'exprime que des résistances naturelles, on dit qu'elle appartient au phénotype « sauvage » ou sensible.

Si des résistances acquises ont modifié sa sensibilité, elle exprime un phénotype de résistance qu'on peut identifier et dont on doit tenter de déterminer le mécanisme.

Ces phénotypes sont souvent désignés par les initiales des antibiotiques devenus inactifs.

2-3. Exemples de résistance bactérienne

■ La résistance du pneumocoque aux β -lactamines

Cette résistance est détectée au laboratoire en testant l'activité de l'oxacilline. Elle est due à une modification des PLP acquise par transformation.

Les PLP (protéines de liaison à la pénicilline) sont des enzymes qui interviennent dans l'assemblage du peptidoglycane de la paroi. La fixation des bêta-lactamines inactive leurs fonctions enzymatiques. La bactérie, ainsi privée de paroi, devient très sensible aux systèmes autolytiques.

La résistance est due à la diminution d'affinité de ces PLP, soit par augmentation de leur production, soit par synthèse de nouvelles PLP de très faible affinité.

■ La résistance bactérienne aux macrolides (9, 20)

- Résistance intrinsèque

Ce type de résistance est caractéristique des germes à Gram (-), en particulier les *Pseudomonas sp.* et les *Acinetobacter sp.*

- Résistance acquise

Il existe 3 mécanismes de résistance acquise aux macrolides :

- la modification de la cible
- l'inactivation
- l'efflux.

a. Résistance par modification de la cible (gènes *erm*)

Le mécanisme le plus fréquent à ce niveau est une méthylation de l'adénine au niveau de l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S.

La production de l'enzyme responsable de cette méthylation (*méthylase*) se fait sous le contrôle des gènes *erm*.

Cette méthylation confère une résistance croisée vis-à-vis non seulement de tous les macrolides mais aussi de 2 autres classes d'antibiotiques qui agissent en partie à ce même site, à savoir les lincosamides et la streptogramine de type B, d'où le nom de résistance **MLS_B**.

Les 4 classes de gènes majoritairement représentés chez les micro-organismes pathogènes sont : *ermA*, *ermB*, *ermC* et *ermF*.

Les gènes *ermB* sont essentiellement retrouvés chez les streptocoques et entérocoques.

La résistance est transmise par des plasmides. Son expression phénotypique peut être de 2 types :

- *Phénotype constitutif* : elle s'exprime de façon permanente, rendant alors la bactérie d'embrée insensible aux macrolides, lincosamides et streptogramines.
- *Phénotype inductible* : elle requiert la présence de l'antibiotique pour s'exprimer.

b. Résistance par inactivation de l'antibiotique

Ce mécanisme, assez rare, implique la production d'enzymes (estérases et phosphotransférases) modifiant les macrolides au point de réduire fortement leur affinité pour le ribosome. Ce type de résistance est également transmis par des plasmides.

c. Résistance par efflux de l'antibiotique

La résistance par efflux est le mécanisme de résistance le plus fréquent chez *Streptococcus pyogenes*, mais il est également présent chez *Streptococcus pneumoniae*.

Ce mécanisme confère la résistance aux macrolides à 14 et 15 atomes et repose sur l'acquisition d'un gène *MefA* porté par un transposon.

Les macrolides à 16 atomes et les lincosamides restent donc actifs sur les souches possédant un mécanisme d'efflux actif.

V. LES ANTIBIOTIQUES

1. Définition d'un antibiotique

Les antibiotiques sont, dans le sens le plus commun de ce terme, les médicaments des maladies infectieuses bactériennes ou mycosiques, c'est-à-dire des agents antimicrobiens non ou relativement peu toxiques pour l'organisme, de sorte que l'on peut, au moins pour la plupart d'entre eux, les administrer par voie générale, condition nécessaire au traitement de la majorité des infections.

Les antibiotiques peuvent être d'origine naturelle, hémisynthétique ou totalement synthétique.

2. Classification des antibiotiques à utiliser

2-1. *Les macrolides*

Les macrolides sont des antibiotiques bactériostatiques à spectre étroit et possédant une structure hétérosidique.

Ce sont des molécules utilisées dans le traitement des infections à Gram (+) ainsi que dans les infections causées par les mycoplasmes ou certains germes intracellulaires (*Legionella*, *Chlamydia spp.*).

L'érythromycine, le chef de file, est à l'origine de la synthèse de nouvelles molécules dérivées introduites au début des années 90, les « néomacrolides » (azithromycine, clarithromycine, spiramycine) de même activité antibactérienne.

La montée alarmante des niveaux de résistance de *Streptococcus pneumoniae* fait remettre en cause le bien-fondé de l'usage de l'érythromycine et ses dérivés dans le traitement de première intention des infections respiratoires en l'absence d'une suspicion raisonnable de la présence d'un germe atypique.

2-1.1. Structure générale des macrolides

Tous les macrolides doués d'une activité antibactérienne significative présentent une structure chimique commune constituée d'un macrocycle lactonique comprenant un ensemble de 14, 15 ou 16 atomes.

Ce sont en effet ces éléments structuraux qui expliquent les différences réelles entre molécules et qui, d'ailleurs, ont été pris en compte par les chimistes qui ont synthétisé ces dérivés.

Il est donc essentiel de comprendre que tous les macrolides utilisés actuellement en clinique, à l'exception de l'érythromycine, ont été obtenues par modification chimique dirigée à partir de l'érythromycine ou d'autres produits naturels de la classe des macrolides.

La première grande famille est celle constituée par les molécules comprenant 14 ou 15 atomes dans le cycle et dont le chef de file est l'érythromycine elle-même (figure 1).

Outre le sucre aminé attaché en position 5 du macrocycle, toutes ces molécules possèdent un sucre neutre, le cladinose, attaché en position 3.

L'érythromycine possède par ailleurs une fonction cétone en position 9 du macrocycle.

Les autres molécules de la famille, à l'exception de la clarithromycine, ne possèdent en effet plus cette fonction.

La deuxième famille est celle constituée des molécules à 16 atomes dans le cycle macrolactonique (figure 2).

Ces molécules ne possèdent pas de fonction cétone dans leur cycle et le sucre correspondant au cladinose n'est pas attaché directement au macrocycle mais est lié à la désosamine.

Cette famille, dont le chef de file est la spiramycine, comprend plusieurs molécules très utilisées de par le monde, telles la josamycine et la rokitamycine.

La miocamycine fait partie de cette famille et en est un dérivé semi-synthétique obtenu à partir de la midécamycine, dont la structure est proche de la josamycine.

► 14 / 15 ATOMS

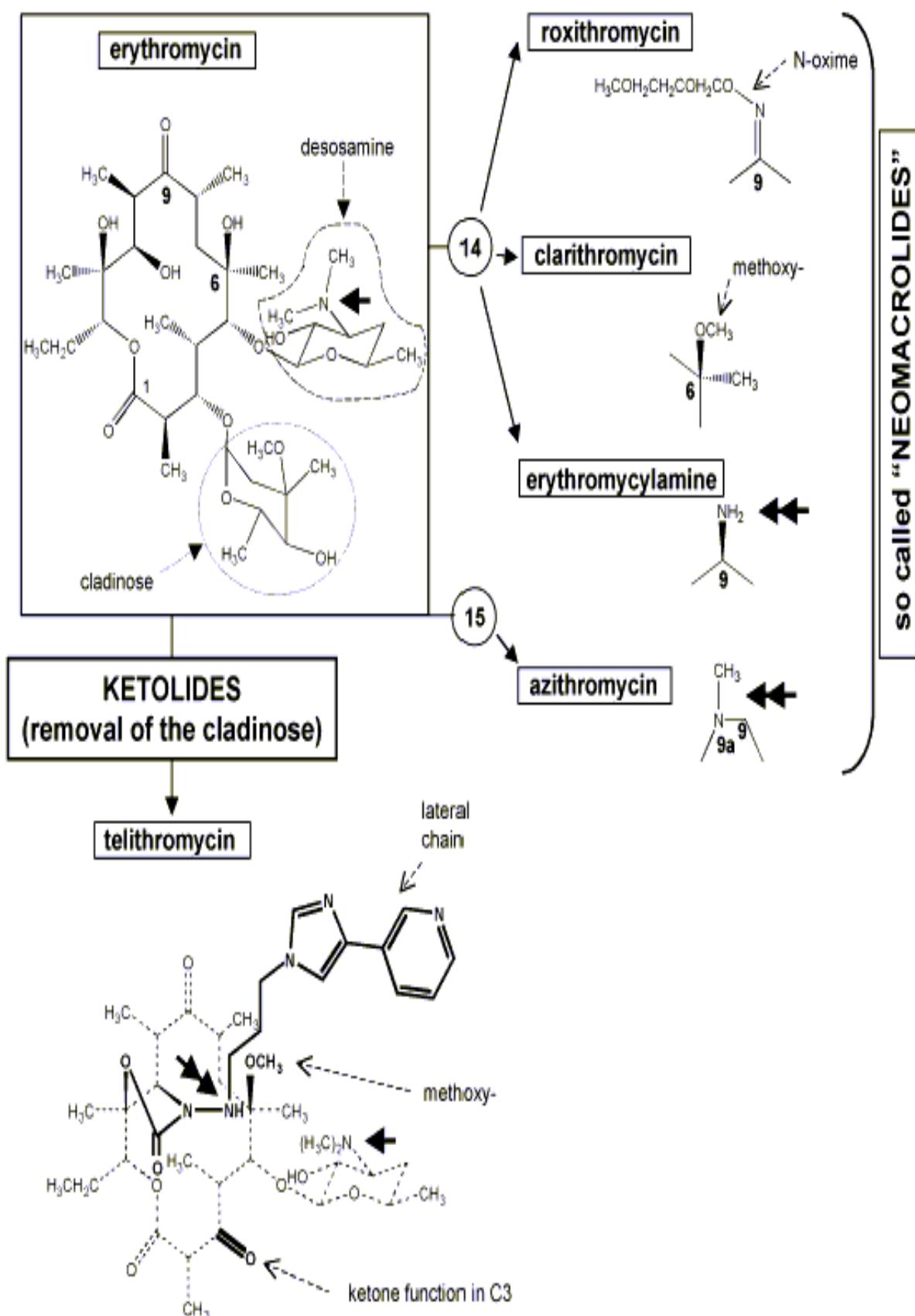


Figure 1 : Structure des macrolides à 14\15 atomes (3)

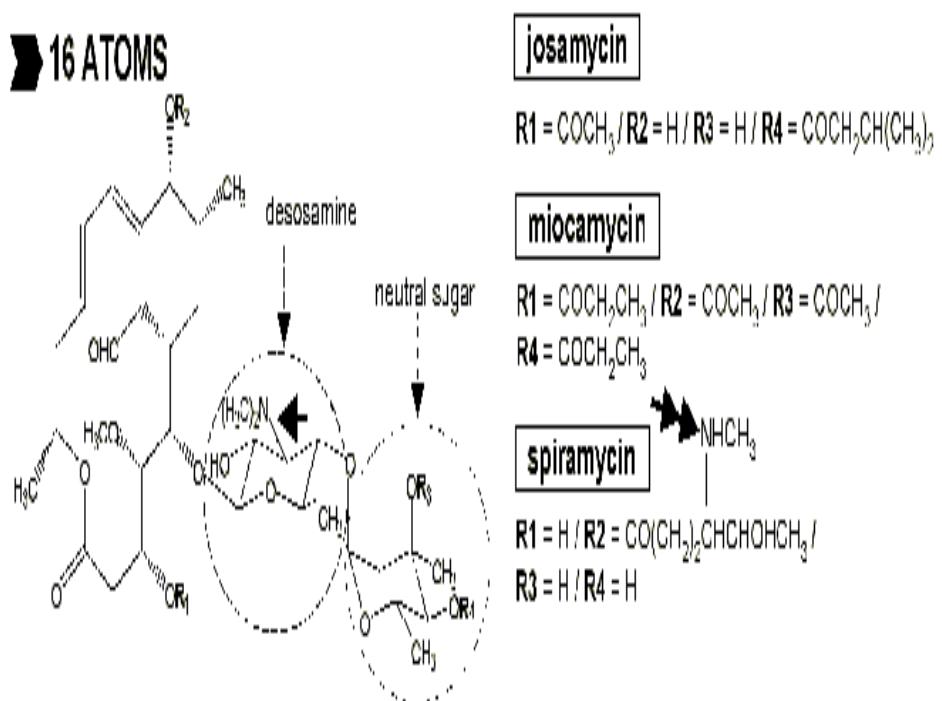


Figure 2 : Structure des macrolides à 16 atomes (3)

2-1.2. Spectre d'action des macrolides

D'une façon générale, tous les macrolides ont un spectre d'action tourné principalement vers les Gram (+).

En effet, ils pénètrent mal au travers de la membrane externe des Gram (-) à quelques exceptions notables mais d'un grand intérêt médical.

Les macrolides sont aussi actifs vis-à-vis de *Mycoplasma spp.* et de divers germes atypiques (*Rickettsia, Borrelia, Mycobactéries*).

2-1.3. Mécanisme d'action des macrolides (3, 11, 20)

Les macrolides doivent leur activité antibiotique à leur liaison à la sous-unité 50 S du ribosome bactérien, et plus précisément au niveau du complexe 23 S du rRNA en établissant des contacts limités mais précis entre une zone du domaine II (hairpin 35) et la boucle de la peptidyl-transférase dans le domaine V, ces deux régions formant une poche adaptée aux macrolides et à d'autres antibiotiques.

La liaison des macrolides et à ce site entraîne une inhibition de la synthèse protéique.

Ce mode d'action implique que les macrolides sont essentiellement bactériostatiques, sauf à concentration très élevée.

2-1.4. Usage clinique des antibiotiques

Le spectre d'activité des macrolides, pour lequel il faut aujourd'hui prendre en compte les niveaux de résistance des souches considérées autrefois comme sensibles, et les propriétés

pharmacologiques de ces molécules permettent de mieux fixer aujourd’hui les indications des macrolides actuellement disponibles sur le marché.

Les infections où les macrolides sont indiscutablement un traitement de première intention sont les suivantes :

- Infections génitales et notamment celles à *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma urealyticum* et *Chlamydia trachomatis*.
- Pneumonies atypiques, en raison de la bonne activité tant vis-à-vis de germes intracellulaires comme *Legionella pneumophila* ou *Chlamydia pneumoniae* que vis-à-vis des Mycoplasmes en général.
- Prophylaxie et traitement des infections à *Mycobacterium avium* chez les patients atteints de SIDA.
- Traitement de l’ulcère gastrique causé par *Helicobacter pylori*.
- Coqueluche et diphtérie.
- Infection de la peau et des tissus mous.
- Infections des voies respiratoires et de la sphère ORL.

2-1.5. Les différentes molécules de macrolides utilisées

Erythromycine

Décrise en 1952 par McGuire et al. sous le nom d'ilotycine, l'érythromycine est restée longtemps le principal macrolide d'usage clinique courant, tant en Europe qu'en Amérique du Nord.

Cependant, à partir des années 1985-1990, nous avons assisté à l'introduction successive et rapide de nouvelles molécules dérivées de l'érythromycine et regroupées sous le nom de « néomacrolides ».

Sur le plan pharmacologique, l'érythromycine présente une biodisponibilité très variable en raison de son instabilité en milieu acide, et ses taux sériques sont dès lors peu prédictibles lorsqu'elle est administrée par voie orale.

Par ailleurs, elle présente une demi-vie sérique courte rendant nécessaire des administrations multiples si l'on veut maintenir le plus longtemps possible sa concentration sérique au-dessus de la CMI du germe en cause, ce qui est indispensable en fonction de la pharmacodynamie de ces molécules.

Clarithromycine

Ce dérivé de l'érythromycine A, obtenu dans les laboratoires de Taisho Pharmaceutiques Co. au Japon, est caractérisé par le remplacement de la fonction alcool en C6 par un groupe méthoxy (O-CH₃).

Développé ensuite par Abbott aux USA et en Europe, la clarithromycine présente le même spectre d'activité que

l'érythromycine, mais ses CMI sont plus basses d'une, deux ou même parfois plusieurs dilutions.

Dans ce cadre, la clarithromycine présente un intérêt particulier vis-à-vis de *Legionella pneumophila*, *Helicobacter pylori*, et *Mycobacterium avium intracellulare*.

Cette molécule est intrinsèquement stable en milieu acide et permet donc d'obtenir des taux sériques plus élevés et plus constants que l'érythromycine.

2-1.6. Les kétolides

⊕ Présentation

La synthèse des premiers kétolides, réalisée vers le début des années 1990, a correspondu à une démarche rationnelle initiée dans les laboratoires de Roussel-Uclaf en France et destinée à répondre très précisément au problème de l'émergence de résistance des pneumocoques à l'érythromycine et, partant, aux néomacrolides (3, 47).

La première observation fut que la narbomycine, un macrolide d'origine naturelle peu actif contre les souches de pneumocoques sensibles à l'érythromycine, avait une activité comparable vis-à-vis des souches résistantes.

Au départ de cette molécule, le « design » chimique a visé à augmenter l'activité tout en maintenant les avantages apportés par les

néomacrolides en ce qui concerne l'acido-résistance, l'accumulation tissulaire et l'absence d'interférences médicamenteuses.

Néanmoins les kétolides présentent quelques particularités structurales, à savoir (6, 11, 12, 46) :

- La présence d'une chaîne **C11-C12 carbamate** qui augmente l'affinité pour les cibles ribosomales, améliore l'activité antibactérienne sur les bactéries à Gram (+), et diminue l'impact de la résistance par efflux.
- La substitution de la fonction 3-hydroxyl par la fonction **3-kéto** ; cette nouvelle fonction empêche l'induction de la résistance MLS_B et permet l'activité des kétolides sur les cocci à Gram (+) possédant le gène *erm*.
- La présence d'une fonction **6-méthoxy** qui évite l'inactivation de la fonction 3-kéto.
- La présence d'une chaîne latérale **butyl-imidazolyl-pyridinyl**.
- La substitution du sucre neutre, la L-cladinose, par la **D-désosamine**.

Cette nouvelle structure permet aux kétolides d'exercer une activité intrinsèque contre les germes respiratoires, d'éviter l'induction d'une résistance MLS_B, et de préserver l'activité contre les souches MLS_B-résistantes.

Des kétolides ont déjà été synthétisés :

- la téolithromycine (Ketec[®])

- la céthromycine (actuellement en phase III de développement) également active contre les souches résistantes aux macrolides (30, 42).

✿ ***Mécanisme d'action*** (11, 18, 28, 46)

Les kétolides inhibent la synthèse des protéines en se fixant sur le site de la peptidyl tranférase de la sous-unité ribosomale 50 S de la bactérie. Les kétolides se lient avec les ribosomes bactériens avec affinité supérieure à celle des macrolides.

Les kétolides font preuve d'une bonne efficacité vis-à-vis des germes aérobies Gram (+) et certains germes aérobies Gram (-) et sont actifs contre les souches résistantes de *Streptococcus pneumoniae* parmi lesquelles, les souches *mefA* et *ermB*.

✿ ***La téolithromycine***

Le 9 Juillet 2001, la commission européenne a délivré une autorisation de mise sur le marché (AMM), valable dans toute l'union européenne pour la téolithromycine (Ketec®). Cette décision se fondait sur l'avis favorable et sur le rapport d'évaluation adopté par le comité des spécialités pharmaceutiques le 29 Mars 2001. Le titulaire de l'AMM responsable de ce médicament est Hoechst Marion Roussel (1, 2, 14, 35, 45, 47).

La téolithromycine est, en fait, le chef de file des kétolides puisqu'elle a été synthétisée en première (figure 3). Son mécanisme d'action s'apparente à celui des macrolides bien que des différences au niveau moléculaire puissent exister : la téolithromycine agit par blocage

de la traduction de l'ARN au niveau de la fraction ribosomale 23 S et certaines données indiquent également qu'elle est capable de bloquer la formation de la sous-unité 30 S.

Les indications de la téolithromycine sont (19, 21) :

1. chez les malades de plus de 18 ans

- pneumonies communautaires de gravité modérée ou légère
- exacerbations aiguës de bronchites chroniques
- sinusites aiguës
- angines \ pharyngites, dues au streptocoque β -hémolytique du groupe A.

2. chez les malades de 12 à 18 ans

angines \ pharyngites, dues au streptocoque β -hémolytique du groupe A.

✿ *La résistance aux kétolides* (27, 44, 46)

Le mécanisme de résistance s'apparente à celui des macrolides puisque le phénomène de modification de la cible y intervient. Il se caractérise par une méthylation des nucléotides spécifiques de l'ARNr dont la synthèse des enzymes responsables (méthylases) est codée par les gènes *ermN* (monométhylation) et *ermE* (diméthylation).

Le type de méthylation des nucléotides spécifiques de l'ARNr détermine le degré de résistance bactérienne aux kétolides.

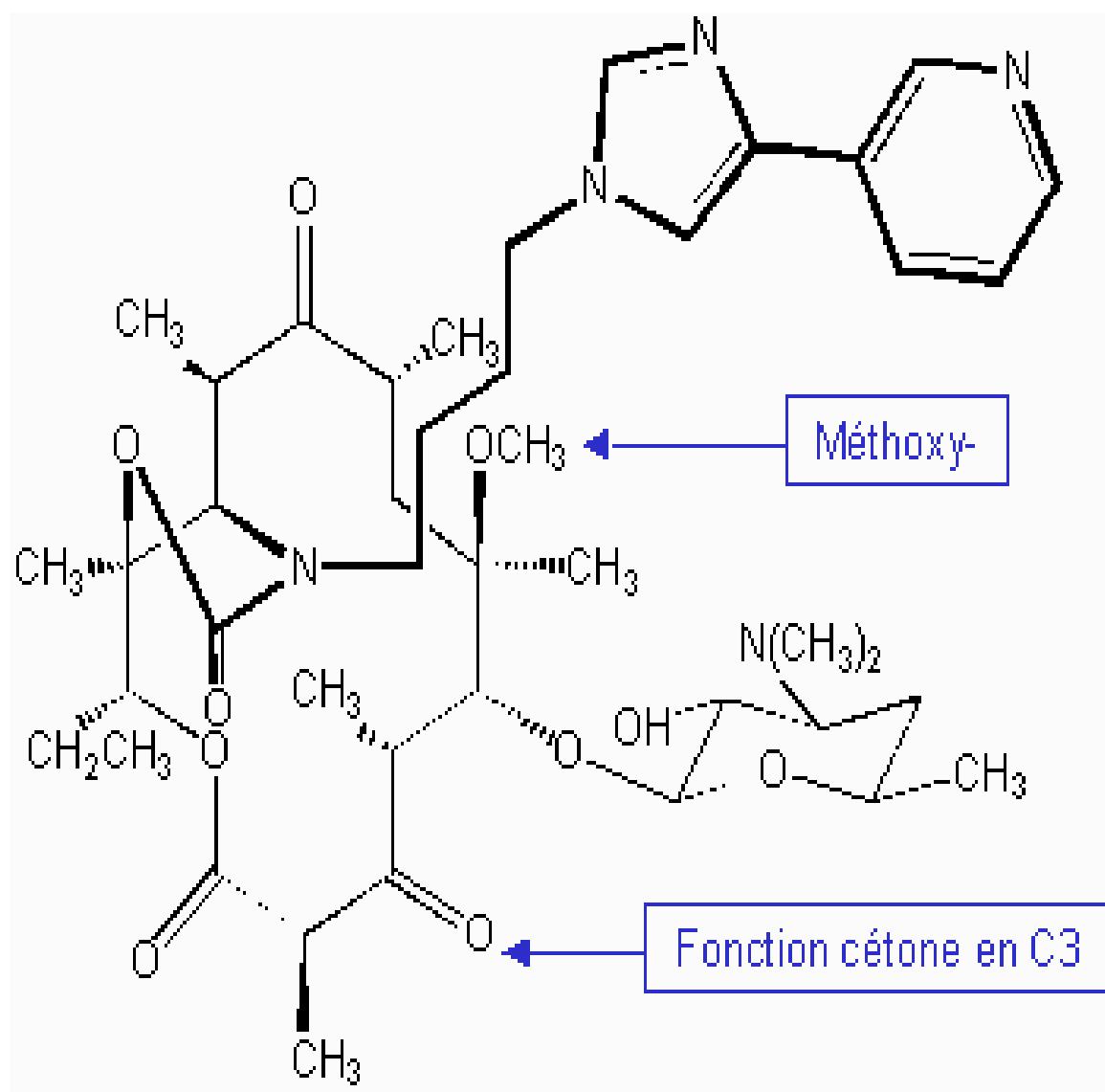


Figure 3 : structure de la téliithromycine (3)

2-2. Les autres molécules

► *Les bêta-lactamines*

Les β -lactamines sont des antibiotiques bactéricides et sont divisées en deux groupes, les pénicillines et les céphalosporines.

Les pénicillines comprennent les pénicillines naturelles des groupes G et V, les pénicillines du groupe M avec l'oxacilline utilisées dans les infections dues aux staphylocoques et streptocoques et les autres produits d'origine synthétique ou hémisynthétique.

La cible des β -lactamines est constituée par des enzymes intervenant dans les dernières étapes de la synthèse de la paroi bactérienne.

La paroi des bactéries à Gram (+) est généralement assez épaisse : 20-80 nm. Elle est constituée en majeure partie par le peptidoglycane qui contient d'autres constituants, les acides teichoïque et teichuronique.

Les enzymes qui interviennent dans la synthèse du peptidoglycane sont les PLP (Protéines Liant la pénicilline) : il s'agit de transglycolases, de transpeptidases et de carboxypeptidases.

En général, la paroi des bactéries à Gram (+) se laisse pénétrer sans difficulté par les bêta-lactamines, car le peptidoglycane ne s'oppose pas au passage de molécules d'aussi petite taille.

► *Les lincosamides*

Les lincosamides, représentés à l'heure actuelle par la lincomycine et son dérivé 7-chloro-7-déoxy, la clindamycine sont des inhibiteurs de la synthèse protéique qui se lient à la sous-unité 50 S des ribosomes bactériens et inhibent l'étape de transpeptidation des chaînes en croissance.

En raison de leur site de fixation commun sur les ribosomes, les lincosamides sont les antagonistes des macrolides et des phénicolés.

La principale résistance d'intérêt clinique est celle de type croisé avec les macrolides et streptogramines (résistance MLS_B).

Les lincosamides couvrent principalement les Gram (+) et les anaérobies.

DEUXIEME
PARTIE :
MATERIEL ET
METHODES

I. MATERIEL

1. Cadre de l'étude

Ce travail a été réalisé à l'unité de recherche et de biotechnologie bactérienne (**Micro CSB system**) du laboratoire de bactériologie- virologie du centre hospitalier universitaire Aristide Le Dantec (**HALD**).

2. Souches bactériennes

Nous avons travaillé sur deux espèces bactériennes:

- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus pyogenes*.

Les souches ont été isolées d'infections respiratoires hautes (sinusites bactériennes, otites aiguës, pharyngites...) et basses (pneumonies communautaires, transformations aiguës de bronchites chroniques...).

Ces souches ont été isolées de différents prélèvements:

- expectorations
- liquide de lavage broncho-alvéolaire
- prélèvements de gorge...

Streptococcus pneumoniae et *Streptococcus pyogenes* étant des germes exigeants, les méthodes de conservation de longue durée ont été utilisées pour diminuer les risques de pertes des souches gardées.

La conservation a été faite à -70°C.

Nous avons utilisé une culture en phase de croissance. La conservation a été faite dans 0,5 ml d'un bouillon nutritif adapté dans un cryotube rangé dans un portoir et placé immédiatement à -70° C.

En cas de besoin, la décongélation a été effectuée rapidement à température ambiante pendant quelques minutes.

Les milieux de conservation utilisés ont été les suivants :

- Bouillon cœur-cervelle + glycérol
- Lait écrémé
- Gélose au sang cuit coulée en pente.

3. Matériel pour l'isolement

- gélose trypticase-soja
- gélose Müller-Hinton (MH)
- anse de platine
- bec Bunsen alimenté par une bouteille de gaz
- boîtes de Pétri
- sang de cheval lysé
- gentamycine
- jarre d'incubation
- générateur de gaz carbonique ou bougie
- étuve à 37°C
- autoclave.

4. Matériel pour l'identification

- lames porte-objet
- microscope optique

- peroxyde d'hydrogène 3%
- microplaques CSB streptocoques
- disques d'optochine
- désoxycholate de sodium
- disques de bacitracine.

5. Matériel pour la détermination de la CMI

- souches viables de 24 heures
- milieux de culture (GSO, GSC)
- tubes à hémolyse stériles
- écouvillons stériles
- tubes Mac-Farland 0.5 et 4
- eau physiologique
- boîtes de Pétri
- antibiotiques :

► *CMI par dilution sur gélose:*

- érythromycine
- clarithromycine
- téolithromycine
- pénicilline.

► *E-test:*

- clindamycine

6. Matériel d'exploitation des résultats : logiciel **WHONET V.**

II. METHODES

1. ISOLEMENT

Les souches bactériennes ont été recueillies de leurs milieux de conservation précédemment décrits. Une suspension bactérienne a été formée avec l'eau physiologique puis centrifugée. La suspension formée a été par la suite ensemencée sur le milieu de culture correspondant :

- GS0 pour *Streptococcus pyogenes*
- GSC genta pour *Streptococcus pneumoniae*

NB : La formule de la GSC genta est la suivante :

- milieu d'étude : gélose trypticase-soja.....30g
- solvant : eau distillée.....1 litres
- gentamycine.....12µl.

2. IDENTIFICATION

2.1 *Streptococcus pneumoniae*

2.1-1 Examen macroscopique des colonies

Streptococcus pneumoniae donne sur gélose au sang cuit, de petites colonies mucoïdes ou à dépression centrale, transparentes, rondes, et développant une hémolyse de type alpha (alpha-viridans).

2.1-2 Examen microscopique

A partir d'une colonie, nous avons confectionné un frottis qui a été ensuite coloré au Gram. L'observation microscopique à l'objectif à immersion montre des diplocoques Gram-positifs lancéolés, en flamme de bougie, capsulés. Il s'agit là d'une morphologie généralement caractéristique du pneumocoque.

2.1-3 Test de la catalase

- *Principe*

La catalase est une enzyme qui hydrolyse le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène.

- *Technique*

A partir des colonies prélevées avec soin de la gélose, nous avons réalisé un frottis. Nous y avons déposé quelques gouttes de

péroxyde d'hydrogène à 3%: la libération d'oxygène se matérialise par la production de bulles.

- *Interprétation*

- **Réaction positive:** production de bulles = présence de **catalase**
- **Réaction négative:** pas de bulles = absence de **catalase**.

- *Résultats*

Streptococcus pneumoniae est **catalase négatif**.

Le test de la catalase ne doit pas être réalisé sur des colonies vieilles de plus de 24 heures, ces dernières peuvent donner des réactions faussement négatives, puisque l'enzyme ne se retrouve que dans des cultures viables.

2.1-4 Le test de sensibilité à l'optochine

- *Principe*

Les colonies de *Streptococcus pneumoniae* sont sensibles à l'optochine (chlorhydrate d'éthylhydrocupréine), alors que les autres streptocoques et en particulier les streptocoques non groupables alpha-hémolytiques ne le sont pas.

- ***Technique***

Une boîte de gélose au sang a été inoculée avec une culture pure présumée de *Streptococcus pneumoniae*.

Sur les deux premiers quadrants de la gélose, un disque d'optochine a été déposé. Incubation à 35°C + 5 à 10 % de gaz carbonique pendant 18 heures environ.

Une zone d'inhibition autour du disque d'optochine a été recherchée: sa présence signe une réaction positive. Une mesure du diamètre de la zone d'inhibition a été faite par la suite.

- ***Interprétation***

- Une zone d'inhibition supérieure ou égale à 14 mm de diamètre oriente vers le germe *Streptococcus pneumoniae*.
- Une absence d'inhibition oriente généralement vers les streptocoques alpha-viridans autres que *S. pneumoniae*.
- Une zone d'inhibition < 14 mm de diamètre fait appel à des tests complémentaires.

Certaines souches de *Streptococcus pneumoniae* ne sont pas inhibées par l'optochine.

De plus, certains streptocoques alpha-viridans donnent de faibles zones d'inhibition.

2.1-5 Test de solubilité dans la bile

▪ *Principe*

Les colonies de *Streptococcus pneumoniae* sont dissoutes ou lysées en 30 mn en présence d'une solution de 10% de désoxycholate de sodium.

▪ *Technique*

Deux méthodes sont utilisées:

- une méthode en boîte de pétri
- une méthode en tube.

✓ La méthode en boîte de pétri

Sur une culture présumée de *Streptococcus pneumoniae*, nous avons déposé une ou deux gouttes d'une solution de désoxycholate de sodium à 10% sur une colonie alpha-hémolytique caractéristique, mucoïde ou à dépression centrale.

Nous avons incubé la boîte à l'étuve à 35°C pendant 2 heures, couvercle vers le haut, légèrement entrouvert pour accélérer l'évaporation du réactif.

Après séchage du réactif, nous avons examiné l'endroit où le réactif a été déposé afin de rechercher la présence ou la lyse de la colonie (l'hémolyse alpha-viridans demeure, mais la colonie disparaît).

✓ La méthode en tube

Avec 1 ml d'une solution de NaCl à 0,85%, nous avons préparé une suspension bactérienne de turbidité égale à celle du tube 1.0 de Mac-Farland.

Nous avons réparti la solution en quantités égales dans deux tubes de verre baptisés respectivement "test" et "témoin".

Dans le tube "test", nous avons ajouté 3 à 4 gouttes de désoxycholate de sodium à 10%, et dans le tube "témoin", 3 à 4 gouttes de NaCl à 0,85%. Après avoir mélangé, nous avons incubé les deux tubes à 35°C pendant 2 heures.

Nous avons comparé l'éclaircissement du tube "test" avec celui du tube "témoin".

La sensibilité à l'optochine et la lyse par les sels biliaires sont spécifiques aux pneumocoques.

2.1-6 Microméthode d'identification des streptocoques (Micro CSB Streptocoques)

Il s'agit d'une méthode miniaturisée permettant la mise en évidence d'activités enzymatiques, de la fermentation des sucres et de la croissance en milieu hostile. Avec 15 tests biochimiques, il permet de faire un diagnostic de groupe ou d'espèces de Streptocoques (non groupables).

○ *Principe*

La technique consiste à ensemencer des plaques présentant des cupules qui renferment des substrats déshydratés destinés à la

mise en évidence d'activités enzymatiques ou d'assimilation de substrats carbonés en milieu approprié (fermentation) ou hostile.

Des puits sontensemencés avec un inoculum qui reconstitue le milieu.

Après incubation, la lecture des réactions est effectuée directement (virage de l'indicateur coloré utilisé) ou après addition de réactifs de révélation.

L'identification se fait à l'aide d'un tableau de lecture.

- *Composition du coffret*

Le coffret Micro CSB Strepto se compose de :

- 20 galeries Micro CSB Streptocoques
- 20 milieux MEVAG Streptocoques
- 1 fiche technique.

En outre, il faut disposer de matériel non fourni :

- écouvillon
- pipette Pasteur
- huile de paraffine
- tube 4 Mc Farland
- KOH 40 %
- alpha-naphtol 6 %
- créatinine 1 % .

- ***Conservation***

Les microplaques se conservent à 2-8° C. La date limite d'utilisation est imprimée sur l'emballage.

- ***Mode d'emploi***

Préparer une suspension bactérienne de turbidité égale à celle de l'étalon 4 Mc Farland dans 1 ml d'eau distillée stérile avec une boîte entière de culture de 24 heures sur gélose au sang (par écouvillonnage) ;

- ✓ Distribuer environ 3 à 4 gouttes d'inoculum bactérien par cupule, de VP à BHS.
- ✓ Verser le reste de la suspension bactérienne dans 1 ml de MEVAG Streptocoque à mélanger.
- ✓ Ensemencer les cupules de ARA à GLY avec le MEVAG ainsi inoculé (3 à 4 gouttes par cupule).
- ✓ Fermer les cupules ADH et tous les sucres avec 2 gouttes d'huile de paraffine.
- ✓ Incuber à 37° C sur un plateau recouvert de papier buvard imbibé d'eau.
- ✓ Lire après 4 heures puis après 18 heures d'incubation.

Tableau I : Lecture des réactions

Tests	Substrats	Réactions / Enzymes	Réactifs à Ajouter	Résultats Positifs	Résultats Négatifs
VP	Glucose + pyruvate	Production d'acétoïne	-1 goutte de KOH -1 goutte de créatinine -1 goutte de α -naphtol	Rose-rouge	incolore
ESC	esculine	β -glucosidase		noir	incolore
ADH	arginine	Arginine dihydrolase		rouge	jaune
BHS	glucose	Croissance en milieu hypersalé		jaune	violet
ARA	L-arabinose				
MAN	Mannitol				
SOR	Sorbitol				
TRE	Tréhalose				
RAF	Raffinose	fermentation		jaune	rouge
SOS	Sorbose				
INU	Inuline				
LAC	Lactose				
RIB	Ribose				
AMD	Amidon				
GLY	glycérol				

2.2 *Streptococcus pyogenes*

2.2-1 Examen macroscopique des colonies

Streptococcus pyogenes donne sur gélose au sang ordinaire (GSO) des colonies lisses, translucides, entourées d'une zone d'hémolyse totale de type bêta.

2.2-2 Examen microscopique

Ce sont des cocci Gram positifs disposés en chaînettes.

2.2-3 Test de la catalase (cf *S. pneumoniae*)

Streptococcus pyogenes est catalase-négatif.

2.2-4 Test de sensibilité à la bacitracine

▪ *Principe*

Les colonies de streptocoques bêta-hémolytiques du groupe A sont généralement sensibles à la bacitracine. Il en est de même pour les microcoques et les stomatocoques, alors que les staphylocoques coagulase-négatifs sont résistants.

C'est un test de présomption.

■ *Technique*

1 ml de bouillon trypticase soja a été inoculé par une culture pure de streptocoques bêta-hémolytiques de manière à avoir une turbidité égale à celle du tube 0.5 de la gamme de Mac-Farland.

Nous avons plongé un écouvillon stérile dans l'inoculum ainsi préparé et après l'avoir essoré sur les rebords du tube, nous avons ensemencé une gélose au sang sur deux plans.

Nous avons ensuite déposé à la surface de la gélose un disque de bacitracine.

La boîte a été incubée pendant 24 heures à 35°C en anaérobiose. Après une lecture a été faite.

■ *Interprétation*

- La présence d'une zone d'inhibition oriente vers les streptocoques bêta-hémolytiques du groupe A.
- Une absence d'inhibition oriente vers des streptocoques bêta-hémolytiques autres que ceux du groupe A.

Les streptocoques alpha-viridans peuvent également être inhibés par la bacitracine.

2.2-5 Microméthode d'identification des Streptocoques (cf. *Streptococcus pneumoniae*).

3. DETERMINATION DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

La concentration minimale inhibitrice (CMI) d'un antibiotique est la plus faible concentration d'un antibiotique inhibant en 18 à 24 heures la multiplication des bactéries.

Elle est aussi définie comme la plus faible concentration inhibant toute culture bactérienne visible à l'œil nu.

Cette CMI permet de classer une souche bactérienne en plusieurs catégories :

- **Sensible** à l'action d'un antibiotique lorsque la CMI est < à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique;
- **Résistante** à l'action d'un antibiotique lorsque la CMI est trop élevée pour être atteinte *in vivo*, sans utiliser des doses toxiques;
- **Intermédiaire** si la CMI se situe entre les deux extrêmes.

3.1- Méthode de dilution sur gélose

3.1-1. Principe

Cette méthode utilise un appareil dénommé "**Inoculateur Multipoint**" qui permet de déterminer la CMI d'un antibiotique incorporé à différentes concentrations dans la gélose de culture.

Cet appareil effectue sur la gélose un dépôt de la suspension bactérienne qui, après 24 à 48 heures à l'étuve à 37°C, donne la CMI en comparant avec les cultures des autres boîtes de Pétri.

Il est plus aisé de commencer par la plus petite concentration d'antibiotique.

Et cette CMI va donc correspondre à la première boîte dont le dépôt n'a pas donné de culture.

3.1-2 Mode opératoire

- *Préparation de la solution mère de l'antibiotique à étudier*

Pour chaque antibiotique à étudier, nous sommes tenus de connaître le solvant, le diluant et l'activité spécifique de la poudre disponible.

Dans notre étude, la concentration choisie était de **10.240 µg/ml** pour la solution mère pour un volume de 10 ml à préparer, ce qui nous permet donc de déterminer la masse **M** de poudre d'antibiotique à peser :

$$M = V \times C / As$$

V= volume à préparer

C= concentration de la solution mère

As= activité spécifique de la poudre.

- Répartir cette solution mère obtenue dans des tubes Nunc*, en raison de 1 ml (plutôt recueillir plus d'1 ml pour éviter les pertes).
 - Conserver ces tubes Nunc* à -70°C.
-
- ***Préparation de la gamme de dilution de l'antibiotique***
- Distribuer **1 ml** de diluant dans **18** tubes à hémolyse puis transvaser dans le premier tube, le contenu d'un tube Nunc* renfermant 1 ml de la solution mère.
 - Agiter ce mélange pour homogénéiser. Ce tube contient maintenant 2 ml d'une solution concentrée à 10.240 µg/2ml, soit **5120 µg/ml**. Dans ce tube, nous avons réalisé une dilution au demi (**1/2**) de la solution mère d'antibiotique.
 - Prélever 1 ml de ce premier tube à hémolyse puis l'ajouter dans le deuxième tube. Ce second tube contient alors un volume $V = 2$ ml d'une solution concentrée à $5120 \mu\text{g}/2 \text{ ml}$, soit **2560 µg/ml**.
 - Procéder ainsi de suite jusqu'à une concentration égale à **0,04µg/ml**.
 - Enfin, chacun des 18 tubes doit contenir 1 ml de solution.

- ***Dilution de l'antibiotique dans la gélose***

- Verser le contenu du premier tube à hémolyse (1 ml d'une solution concentrée à 5120 $\mu\text{g}/\text{ml}$) dans la boîte de Pétri puis y ajouter 19 ml de gélose.
- Avec cette dilution au **1/20**, la concentration est égale à **256 $\mu\text{g}/\text{ml}$** .
- Laisser sécher à température ambiante.
- Appliquer la même procédure sur les autres boîtes de telle sorte que la dernière concentration soit égale à **0,002 $\mu\text{g}/\text{ml}$** .

- ***Préparation de l'inoculum des souches à étudier***

- Mélanger quelques colonies à de l'eau physiologique de façon à obtenir une turbidité comparable à l'étalon 0,5 de l'échelle Mac-Farland.
- Effectuer ensuite une dilution avec cette suspension.

- ***Ensemencement et application des antibiotiques***

- Remplir chaque cupule de l'inoculateur multipoint avec la suspension en notant l'ordre de succession des cupules.
- Brancher l'inoculateur puis effectuer les dépôts automatiques sur chaque boîte de Pétri.

- Sécher les boîtes à la température ambiante puis incuber à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures.

- ***Lecture***

Comparer les cultures obtenues dans les boîtes de Pétri en débutant par la boîte contenant la plus faible concentration d'antibiotiques vers la plus grande concentration. La CMI correspond à la concentration de l'antibiotique dans la première boîte où le dépôt n'a pas donné de colonie.

3.2- E-test

3.2-1 Principe

Le E-test est une technique de détermination directe de la CMI qui associe les caractéristiques des méthodes de dilution et de diffusion en milieu gélosé.

Des bandelettes inertes de 50 mm de long et 5 mm de large, calibrées par un gradient de concentrations de l'antibiotique, couvrant une zone de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32 mg/l, sont déposées à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec la souche bactérienne.

L'inhibition de la croissance se traduit par la présence d'une ellipse dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI.

Une échelle de lecture imprimée sur la face supérieure de la bandelette permet une interprétation rapide.

3.2-2 Mode opératoire

- ***Préparation de l'inoculum***

L'inoculum est préparé en réalisant une suspension de colonies obtenues d'une culture pure de 18 à 24 heures.

La suspension est calibrée à l'échelle 0.5 de Mac-Farland.

- ***Ensemencement***

Le E-test se fait de préférence dans des boîtes de Pétri de 150 millimètres de diamètre, ce qui permet de déposer une seule bande. Le coulage de la gélose permet d'avoir une épaisseur de 4 mm. Une fois le milieu solidifié, les boîtes sont séchées à l'étuve. L'ensemencement en nappes se fait par écouvillonnage.

- ***Application des bandes E-test***

- Faire sortir le paquet de bandes E-test du freezer et le laisser revenir à la température ambiante avant de l'ouvrir. Il faut 30 mn si le stockage se fait à **-20°C**.
- Vérifier s'il n'y a ni fente ni trou (ne pas l'utiliser en cas de dommage).

- Retirer les bandes avec une pince par la partie supérieure où il est marqué **E**. Eviter de toucher la zone chargée avec la main.
- Placer les bandes dans la cassette d'insertion des bandes.
- Etant donné que chaque puits peut contenir 20 bandes, mettre le type d'antibiotique par puits.
- Remplir les puits de la cassette suivant le profil de l'espèce à tester.
- Prélever bande par bande à l'aide de l'applicateur et les déposer à la surface de la gélose.
- Les boîtes sont immédiatement incubées à 37°C en anaérobiose pendant 18 heures.

- ***Lecture***

- Après incubation, la croissance bactérienne est inhibée à une concentration égale à la CMI. Celle-ci est définie par l'intersection de l'ellipse avec l'échelle imprimée sur la face supérieure de la bandelette.
- La lecture ne présente pas de difficulté lorsque la zone d'inhibition est symétrique.

- L'observation d'un décrochage ou "*dip*" dans la zone de lecture impose de lire la CMI en extrapolant la courbe de l'ellipse.
- La présence de colonies "squatters" doit être analysée. Il peut s'agir d'une résistance hétérogène, de l'émergence de mutants résistants ou d'un mélange bactérien.
- L'existence d'une hémolyse sur gélose au sang peut rendre délicate l'estimation de la CMI et ne doit pas interférer avec la lecture.
- La présence d'une croissance bactérienne en ligne le long de la bandelette n'a pas une signification bactériologique, elle est certainement due à une gélose insuffisamment séchée avant le dépôt de la bandelette.
- Les points d'intersection sur la bandelette peuvent être asymétriques: la CMI correspond donc à la plus haute concentration lue sur la règle.

Dans tous les cas, une souche de référence doit être étudiée en parallèle afin de servir de contrôle.

- ***Stockage des bandes E-test***

■ Les paquets d'E-test sont stockés au freezer à -20°C.

- Après ouverture d'un paquet, les bandes inutilisées doivent être gardées dans des tubes de stockage hermétiques contenant un dessicateur et placées à -20°C.
- Il faut toujours s'assurer que le dessicateur est bleu avant l'installation de la bande.
- Marquer les tubes de stockage avec une étiquette indiquant la date de péremption, le numéro de lot et le code de l'antibiotique.
- Ne stocker que le même type d'antibiotique par tube.

4. CONTROLE DE QUALITE DES TESTS DE SENSIBILITE

Les normes utilisées ont été celles de NCCLS :

- ✿ Obtenir les souches de contrôle de qualité de source pure :
 - *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
 - *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619
- ✿ Entretenir correctement les souches de contrôle de qualité en les conservant selon deux méthodes :
 - ☛ **en stock culture** pour l'utilisation fréquente des souches
 - ☛ **à -70°C dans les cryotubes avec billes** pour une conservation de longue durée.

Dans toutes les séries de dilution sur gélose et de E-test, ces souches ont été testées en parallèle pour le contrôle de qualité afin de valider les tests de sensibilité. Leurs résultats ont été lus en premier lieu.

Les contrôles de qualité ont été effectués à plusieurs niveaux:

- par une simple vérification de la date de péremption des milieux de culture et de tout réactif à utiliser.
- par un stockage correct des milieux de culture, et des disques par un relevé quotidien de la température du freezer et du réfrigérateur.
- par une manipulation correcte avec respect des normes du protocole.

5. ANALYSE DES RESULTATS DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

Le logiciel **WHONET V** a servi à l'analyse des résultats.

5-1. Définition

Le logiciel **WHONET** est une série de programmes informatiques qui facilite la gestion des résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques de germes bactériens. Son but est l'établissement de réseaux nationaux et internationaux de surveillance permanente de la résistance sur une grande échelle.

5-2. Critères d'interprétation des résultats

5-2.1. Valeurs critiques des antibiotiques

Tableau 2 : valeurs critiques des différentes molécules utilisées .

<u>Germes</u>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>			<i>Streptococcus pyogenes</i>		
	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>R</u>
<u>Antibiotiques</u>						
Erythromycine	$\leq 0,25$	0,5	≥ 1	$< 0,25$	0,25 - 1	>1
Clarithromycine	$\leq 0,25$	0,5	≥ 1	$< 0,25$	0,25 - 1	>1
Téthromycine	$\leq 0,5$	1 - 2	≥ 2	$\leq 0,5$	1 - 2	>2
Pénicilline	$< 0,06$	0,06 - 0,5	≥ 1	$< 0,06$	0,06 - 0,5	≥ 1
Clindamycine	$\leq 0,25$	0,5	≥ 1	$< 0,25$	0,25 - 1	>1

5-2.2. Calcul des CMI₅₀ et CMI₉₀

• *Calcul de la CMI₅₀*

C'est la détermination de la médiane par la méthode d'extrapolation linéaire.

Soit A la moitié des souches étudiées, on détermine B et C qui sont les effectifs cumulés respectivement inférieur et supérieur à A des souches inhibées.

B< A< C

D'après le tableau des effectifs cumulés on détermine les CMI $Y < X < Z$ qui sont celles correspondantes à $B < A < C$.

La formule suivante est appliquée :

A - B

X = ----- x (Z - Y) + Y

C - B

Si **X = CMI₅₀**

A = moitié des souches inhibées

B = effectifs cumulés immédiatement inférieurs à A

C = effectifs cumulés immédiatement supérieurs à A

$B < A < C$

Y = CMI de B

Z = CMI de C.

• *Calcul de la CMI₉₀*

Le principe est le même que pour la détermination de la CMI₅₀ à la différence que A= 90 % des souches inhibées.

Si $\mathbf{X} = \mathbf{CMI}_{90}$

A = 90% des souches inhibées

B = effectifs cumulés immédiatement inférieurs à A

C = effectifs cumulés immédiatement supérieurs à A

B < A < C

Y = CMI de B

Z = CMI de C.

TROISIEME
PARTIE :
RESULTATS

I. LES SOUCHES ETUDIEES

Les souches de streptocoques utilisées ont déjà fait l'objet d'études antérieures permettant de déterminer leur profil de sensibilité vis-à-vis des mêmes antibiotiques. L'approche méthodologique était essentiellement basée sur l'antibiogramme standard utilisant les diamètres d'inhibition pour l'expression des résultats.

L'une des études était orientée vers la détermination du profil de sensibilité de 37 souches de *Streptococcus pyogenes*, tandis que l'autre était consacrée à celle de 43 souches de *Streptococcus pneumoniae*.

Ces souches provenaient de divers prélèvements :

- *Streptococcus pyogenes* ($n=37$)

Tableau III : origine des souches de *Streptococcus pyogenes*.

Nature des prélèvements	Nombre de prélèvements
Gorge	17
Plaies	18
Oreilles	2

- *Streptococcus pneumoniae* (n=43)

Tableau IV : Origines des souches de *Streptococcus pneumoniae*.

Nature des prélèvements	Nombre de prélèvements
Ecouvillonnage pharyngé	1
Ecouvillonnage nasal	1
Expectorations	26
Aspirations endotrachéales	9
Aspirations alvéolaires	2
Liquide pleural	1

L’antibiogramme standard avait permis d’avoir les profils de sensibilité suivants :

Tableau V : phénotypes de sensibilité des souches.

Antibiotiques	<i>Streptococcus pyogenes</i> (n= 37)	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (n=43)
Pénicilline	S ¹	MS ²
Erythromycine	S	S (90,7%)
Télithromycine	S	S
Clindamycine	MS	S (97,67%)

¹Phénotype sensible : taux de sensibilité compris entre 90%

²Phénotype modérément sensible : taux de sensibilité compris entre 70% et 90%.

D'après ce tableau, la majorité des souches avaient été sensibles à tous les antibiotiques.

Notre étude s'est interrogée sur ces profils avec une approche, puisque les résultats ont été exprimés en CMI. Elle s'est aussi limitée à un certain nombre de souches :

- 29 souches de *Streptococcus pyogenes*
- 3 souches de *Streptococcus pneumoniae*.

Qu'en est-il à présent de leurs profils de sensibilité avec notre approche ?

II. SENSIBILITE AUX DIFFERENTS ANTIBIOTIQUES

Différents antibiotiques ont été testés sur les souches collectées.

II. 1. *Streptococcus pneumoniae*

Le tableau VI montre le profil de sensibilité aux antibiotiques des pneumocoques en fonction des CMI trouvées.

La figure 4 permet de schématiser la distribution des CMI individuelles ainsi que les taux de souches inhibées.

Tableau VI : Profil de sensibilité aux antibiotiques des pneumocoques en fonction des CMI trouvées.

CMI (µg/ml)	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12
Antibiotiques					
Pénicilline			100%		
Clindamycine				33,3%	66,7%
Erythromycine				100%	
Clarithromycine			33,3%	66,7%	
Télithromycine	66,7%	33,3%			

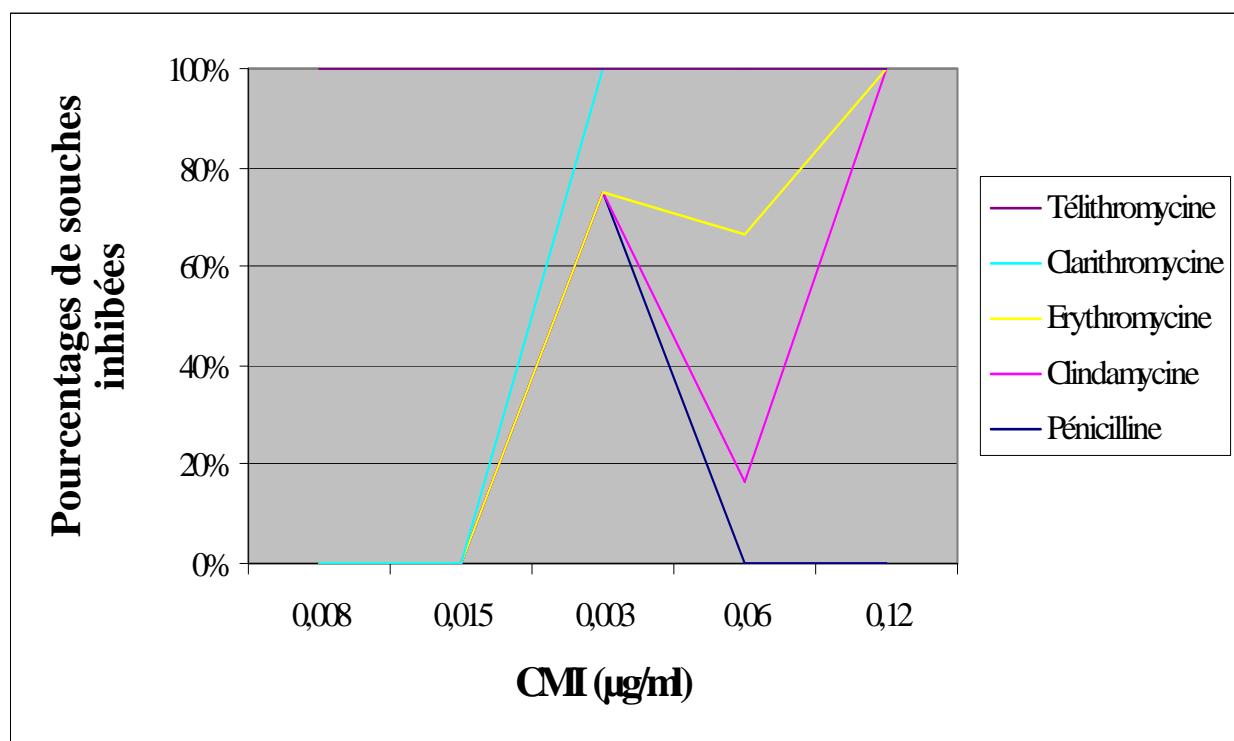


Figure 4 : Courbe d'évolution de la sensibilité des pneumocoques aux antibiotiques en fonction des CMI.

1. Sensibilité aux β -lactamines

La totalité des souches a été inhibée à $0,03\mu\text{g}/\text{ml}$ pour la pénicilline. Les pneumocoques ont été inhibés à une faible CMI $<0,06\mu\text{g}/\text{ml}$ d'où la sensibilité à la pénicilline.

2. Sensibilité aux macrolides

Pour l'érythromycine, la totalité des souches a été inhibée à $0,06\mu\text{g}/\text{ml}$, contrairement à la clarithromycine avec laquelle un début d'inhibition a été obtenue à $0,03\mu\text{g}/\text{ml}$; l'inhibition totale n'a été obtenue qu'à une CMI de $0,06\mu\text{g}/\text{ml}$.

3. Sensibilité aux lincosamides

La clindamycine a aussi fait preuve d'une très grande efficacité contre les souches de pneumocoques. Un début d'inhibition n'a été obtenu qu'à $0,06\mu\text{g}/\text{ml}$ et la totalité des souches a été inhibée à une CMI de $0,12\mu\text{g}/\text{ml}$.

4. Sensibilité aux kétolides

La téthromycine a fait preuve d'une très grande efficacité puisqu'un début d'inhibition a été obtenu à partir d'une concentration plus faible que celle des autres molécules, à savoir CMI $0,008\mu\text{g}/\text{ml}$. Une inhibition de la totalité des souches a été obtenue à $0,015\mu\text{g}/\text{ml}$ qui est toujours très basse.

II. 2. *Streptococcus pyogenes*

Le tableau VII montre le profil de sensibilité aux antibiotiques des souches de *Streptococcus pyogenes*.

La figure 5 montre la distribution des CMI individuelles ainsi que les taux de souches de *Streptococcus pyogenes* inhibées.

Tableau VII : Profil de sensibilité aux antibiotiques des souches de *Streptococcus pyogenes*.

Antibiotiques	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12
Clindamycine					100%	
Erythromycine				13,3%	82,8%	3,45%
Clarithromycine				82,8%	17,2%	
Télithromycine	3,45%	93,1%	3,45%			

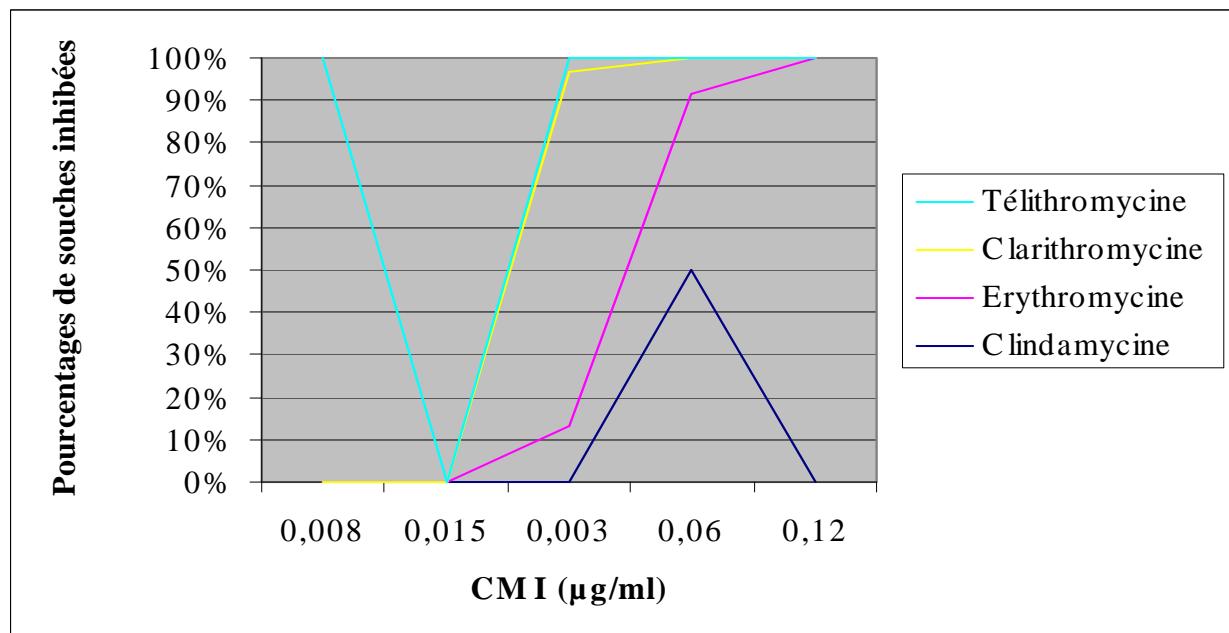


Figure 5 : Courbe d'évolution de la sensibilité de *Streptococcus pyogenes* aux antibiotiques en fonction des CMI.

1. Sensibilité aux macrolides

Les résultats ont montré un début d'inhibition à $0,03\mu\text{g}/\text{ml}$ pour l'érythromycine, et l'inhibition de la totalité des souches n'a été obtenue qu'à $0,12\mu\text{g}/\text{ml}$.

Pour la clarithromycine, une inhibition de la majorité des souches a été obtenue à $0,03\mu\text{g}/\text{ml}$, et l'inhibition totale ne s'est produite qu'à une CMI égale à $0,06\mu\text{g}/\text{ml}$. Cette inhibition totale a été obtenue à une CMI plus basse que celle de l'érythromycine.

2. Sensibilité aux lincosamides

La totalité des souches a été inhibée à une CMI de $0,06\mu\text{g}/\text{ml}$ avec la clindamycine.

3. Sensibilité aux kétolides

Un début d'inhibition a été obtenu à partir d'une concentration très basse de $0,008\mu\text{g}/\text{ml}$ avec la télichromycine, et une inhibition totale des souches s'est produite à une CMI $0,03\mu\text{g}/\text{ml}$. En comparant avec l'étude faite sur les souches de pneumocoques, nous avons remarqué que l'inhibition de la totalité des souches de *Streptococcus pyogenes* s'est produite à une CMI plus élevée.

III. INTERPRETATION DES RESULTATS

Tableau VIII : Valeurs des CMI_{50} et CMI_{90} pour les souches de streptocoques

Antibiotiques	Valeurs critiques ($\mu\text{g/ml}$)		<i>Streptococcus pneumoniae</i>		<i>Streptococcus pyogenes</i>	
	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. pneumoniae</i>	CMI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	CMI_{90} ($\mu\text{g/ml}$)	CMI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	CMI_{90} ($\mu\text{g/ml}$)
Érythromycine	0,25 - 1	0,25 - 1	0,06	0,06	0,06	0,06
Clarithromycine	0,25 - 1	0,25 - 1	0,06	0,06	0,03	0,06
Télithromycine	0,5 - 2	0,5 - 2	0,008	0,015	0,015	0,015
Clindamycine	0,25 - 1	0,25 - 1	0,12	0,12	0,06	0,06
Pénicilline	-	0,06 - 1	0,03	0,03	-	-

Ce tableau montre des CMI_{50} et des CMI_{90} très basses par rapport aux valeurs critiques inférieures, aussi bien pour les souches de *Streptococcus pneumoniae* que pour les souches de *Streptococcus pyogenes*.

- *Streptococcus pneumoniae*

Les CMI_{50} et CMI_{90} de la pénicilline se sont montrées basses par rapport à la CMI 0,06 $\mu\text{g/ml}$. Les souches de pneumocoques ont été fortement inhibées par la pénicilline d'où la considération de ces souches comme étant *pénicilline-sensibles*.

Concernant les CMI_{50} et CMI_{90} des macrolides à 14/15 atomes, elles ont été jugées très faibles par rapport aux bornes inférieures :

- érythromycine : $CMI_{50} = CMI_{90} < 0,25\mu\text{g/ml}$
- clarithromycine : $CMI_{50} < CMI_{90} < 0,25\mu\text{g/ml}$.

Ces souches ont été sensibles aux macrolides 14/15 atomes particulièrement à l'érythromycine d'où le nom de souches *EryS*.

Pour la détermination du phénotype de sensibilité, la sensibilité à la clindamycine aurait été nécessaire puisque l'érythromycine et la clindamycine constituent les principaux marqueurs de phénotype des streptocoques.

Pour la clindamycine, les CMI ont été jugées faibles par rapport à la borne inférieure : $CMI_{50} = CMI_{90} < 0,25\mu\text{g/ml}$. Ces souches ont été sensibles à la clindamycine.

D'après les CMI des macrolides et celles de la clindamycine, les souches de *Streptococcus pneumoniae* ont développé le **phénotype S**.

Le phénotype S des macrolides se caractérise par une sensibilité des souches de streptocoques aux macrolides (érythromycine particulièrement) et à la clindamycine.

Les souches de phénotype S ont été fortement inhibées par la téthromycine puisqu'il n'y a eu aucun mécanisme de résistance qui puisse affecter son activité thérapeutique. Cette forte activité s'est justifié par les valeurs très basses de la CMI_{50} et de la CMI_{90} :

$CMI_{50} < CMI_{90} << 0,5\mu\text{g/ml}$.

- *Streptococcus pyogenes*

Concernant les macrolides (érythromycine et clarithromycine), les CMI_{50} et les CMI_{90} ont été inférieures aux bornes inférieures des valeurs critiques:

$$CMI_{50} = CMI_{90} < 0,25\mu\text{g/ml}.$$

Cette comparaison a permis d'en déduire une forte sensibilité des souches de *Streptococcus pyogenes* aux macrolides. Telle a été la preuve montrant que ces souches ont été aussi *érythromycine-sensibles (EryS)*.

Ces souches de *Streptococcus pyogenes EryS* ont été sensibles à la clindamycine ($CMI_{50} = CMI_{90} < 0,25\mu\text{g/ml}$). Nous avons pu en conclure que ces souches ont aussi développé le *phénotype S*.

Pour la télichromycine, les CMI sont restées toujours basses par rapport aux valeurs critiques ($CMI_{50} = CMI_{90} < 0,25\mu\text{g/ml}$) d'où sa forte efficacité à très basse concentration.

QUATRIEME
PARTIE :
DISCUSSION

I. APPROCHE METHODOLOGIQUE

I.1. SOUCHES DE STREPTOCOQUES

- *Streptococcus pyogenes*

Les souches de *Streptococcus pyogenes* ont déjà été identifiées auparavant avec les techniques classiques d'identification de laboratoire (39) :

- la culture sur gélose au sang
- la coloration au Gram
- le test à la catalase
- le test à l'optochine
- la solubilité à la bacitracine
- la microgalerie CSB streptocoques
- le test d'agglutination.

Toutes ces techniques avaient permis de prouver la conformité des caractères culturaux, morphologiques, métaboliques, biochimiques et antigéniques à ceux de *Streptococcus pyogenes*. Par la suite, ces souches étudiées ont été conservées à -70°C. Cette conservation à long terme présente beaucoup d'avantages notamment dans la conservation de l'authenticité des souches (5, 7, 8, 36, 41).

Après décongélation, une vérification des caractères s'est imposée pour s'assurer de leur fiabilité pour notre étude. Cette vérification s'est limitée à quelques techniques :

- la culture sur gélose au sang
- la coloration au Gram
- le test à l'optochine
- le test à la bacitracine
- la microgalerie CSB streptocoques.

Ces techniques ont permis de confirmer l'authenticité des souches.

- *Streptococcus pneumoniae*

Les souches de *Streptococcus pneumoniae* avaient été aussi identifiées par les techniques classiques (34):

- la culture sur gélose au sang cuit
- la coloration de Gram
- le test à la catalase
- le test à l'optochine
- la solubilité à la bile-esculine
- la lyse par les sels biliaires
- la microgalerie CSB streptocoques
- le test d'agglutination.

Ces techniques d'identification avaient aussi montré la conformité des caractères culturaux, morphologiques, métaboliques, biochimiques et antigéniques à ceux de *Streptococcus pneumoniae*.

La conservation à long terme avait été aussi faite à -70°C.

Après décongélation, la vérification des caractères s'est aussi limitée à certaines techniques :

- la culture sur GSC
- la coloration au Gram
- le test à la catalase
- le test à l'optochine
- la solubilité à la bile-esculine
- la microgalerie CSB streptocoques.

Ces techniques ont permis de vérifier et confirmer l'authenticité des souches de *Streptococcus pneumoniae*.

Par ailleurs, des études faites par *Kellogg et al.*, remettant en cause les tests d'identification de *Streptococcus pneumoniae*, avaient été faites sur 200 isolats : 99 isolats de *Streptococcus pneumoniae* et 101 isolats de streptocoques α -viridans.

Les résultats de ces études avaient montré la fiabilité de la solubilité à la bile-esculine, de la sensibilité à l'optochine et des tests agglutination, malgré les difficultés rencontrées pour trouver des tests plus spécifiques et plus sensibles pour identifier *Streptococcus pneumoniae* (25).

Mais d'autres études plus poussées remettant en cause les tests de routine au laboratoire avaient été faites à Taiwan par *Tsai et al.* Elles avaient abouti à la mise en évidence de deux types de colonies de *Streptococcus pneumoniae* chez un enfant de 2 ans atteint d'une pneumonie communautaire.

Ces 2 colonies avaient présenté différentes sensibilités à l'optochine : l'une des colonies (A) avait été résistante tandis que l'autre (B) avait été sensible.

D'autres tests complémentaires avaient pu être effectués sur ces deux colonies :

- la réaction de Quellung mettant en évidence le sérotype 23F des 2 colonies;
- la solubilité de ces colonies à la bile-esculine ;
- la galerie API montrant la conformité des caractères biochimiques.

Ces travaux avaient montré une certaine ambiguïté dans l'identification de *Streptococcus pneumoniae* d'autant plus que la sensibilité à l'optochine avait montré ses limites (31, 40). Mais ces données ne contredisent pas pour autant les nôtres parce que toutes les conditions avaient été réunies pour faire l'identification. De plus plusieurs séries de tests ont permis de confirmer l'identité des souches.

I.2. LES TESTS DE SENSIBILITE

La volonté d'exprimer nos résultats sous forme de CMI peut s'expliquer par les avantages montrés par celle-ci et les limites des diamètres d'inhibition.

Les diamètres d'inhibition ne permettent d'avoir qu'une idée vague sur la sensibilité des souches d'où leur manque d'explicité. En prenant comme exemples les résultats des études précédentes, une idée du degré d'efficacité des antibiotiques ne peut être donnée :

- les souches de *Streptococcus pyogenes* avaient été *sensibles* à l'érythromycine et à la télihromycine, et *modérément sensibles* à la clindamycine (39);
- les souches de *Streptococcus pneumoniae* avaient été *sensibles* à l'érythromycine, à la télihromycine et à la clindamycine (34).

La CMI va donc au-delà de ces possibilités parce que pour la plupart des marqueurs de phénotype comme l'érythromycine ou la clarithromycine, elle s'est trouvée plus explicite pour exprimer le degré d'efficacité d'un antibiotique (cf. **résultats**). En plus de cela, il y a la possibilité d'établir une relation entre l'activité *in vitro* d'une molécule et celles d'autres molécules de la même famille sur un germe donné comme le pneumocoque (5, 13).

Deux méthodes ont été utilisées dans notre étude pour déterminer les CMI des antibiotiques :

- *la dilution sur gélose*
- *le E-test.*

Ces méthodes présentent beaucoup d'avantages mais aussi des inconvénients à savoir le coût élevé et la délicatesse, de ce fait plusieurs facteurs ont été tenus en compte durant leur application :

- *le choix des antibiotiques*
- *les conditions d'incubation*
- *les critères d'interprétation des résultats.*

- ***Le choix des antibiotiques***

Pour tester la sensibilité des streptocoques, notre choix s'est porté sur des molécules très actives :

- **la pénicilline**
- **l'érythromycine et la clarithromycine**
- **la clindamycine**
- **la téthromycine.**

Le choix d'une méthode dépend des données pharmacocinétiques et/ou des données pharmacodynamiques de la molécule à tester. Généralement ces données ont été tenues en compte par la NCCLS ou le fabricant dans l'établissement des normes d'utilisation.

Dans les études menées par *Davies et al.* utilisant la dilution sur gélose, l'érythromycine, la clarithromycine et la téthromycine ont été incorporées à des concentrations de 0,002 à 64 μ g/ml dans la gélose MH supplémentée de 5% de sang de mouton. Outre la dilution sur gélose, les CMI de la téthromycine avaient été déterminées par la méthode standard de microdilution sur bouillon dans ces mêmes études, parce que cette méthode est recommandée par la NCCLS (8).

De même que pour la pénicilline, la détermination des CMI avait été faite par la microdilution dans les études menées par *Brueggemann et al.* sur l'activité antipneumococcique *in vitro* des β -lactamines (5).

Ces faits ne contredisent pas pour autant notre démarche parce que selon nous, la détermination des CMI peut se faire aussi bien avec la dilution sur gélose qu'avec la méthode standard de microdilution.

En ce qui concerne la clindamycine, la détermination des CMI s'est faite avec le E-test.

Dans les études de *Waites et al.* faites sur 198 souches de *Streptococcus pneumoniae* résistantes aux macrolides isolées chez 109 enfants de Birmingham, les méthodes recommandées pour la clindamycine avaient été l'antibiogramme standard et le E-test selon les normes NCCLS et les normes du fabricant. Les résultats de l'antibiogramme standard et ceux du E-test avaient été concordants à 100% selon les critères d'interprétation NCCLS (41).

Par analogie, une concordance plus évidente peut être notée entre les CMI de la clindamycine trouvées dans notre étude et les diamètres d'inhibition des études précédentes. Une telle concordance peut justifier le choix de la clindamycine pour faire la méthode E-test (34, 39).

- ***Les conditions d'incubation***

Les streptocoques ayant un métabolisme aérobiose-anaérobiose facultatif, l'incubation peut se faire aussi bien à l'air que dans un atmosphère supplémenté de 5% de CO₂.

Dans toutes les séries de dilution sur gélose effectuées dans notre étude, l'incubation à l'air a été faite à 35°C pour favoriser la poussée des souches.

Des études montrant l'influence du type d'incubation sur les résultats avaient été menées par certains auteurs.

L'incubation en anaérobiose, selon *Davies et al.* avait été démontrée comme étant un facteur pouvant être à l'origine de l'augmentation des CMI des macrolides, surtout en ce qui concerne *Streptococcus pneumoniae* (8).

Ce phénomène ne peut s'expliquer que par une acidification par le gaz carbonique modifiant le pH du milieu (pH acide). Les macrolides étant des molécules basiques, une atténuation de leur activité peut s'en suivre et en conséquence, une augmentation des

CMI pouvant témoigner à la longue d'une inefficacité de ces molécules.

Pour plus de sûreté dans la manipulation, une incubation à l'air a été recommandée par la NCCLS. Ce type d'incubation mène à des CMI inférieures à celles de l'incubation en anaérobiose.

En ce qui concerne le E-test, l'incubation a été par contre faite en anaérobiose.

Selon toujours *Waites et al.*, le problème se poserait moins avec cette méthode puisque l'incubation pourrait se faire aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose. Mais pour le cas de *Streptococcus pneumoniae*, le fabricant³ avait recommandé l'incubation en anaérobiose parce que 5 à 10% des souches pourraient ne pas pousser sans CO₂, à la première isolation (8).

Pour les deux méthodes, les conditions d'incubation ont été respectées et l'on peut espérer par la suite avoir des résultats fiables.

- ***Les critères d'interprétation des résultats***

Les valeurs critiques des antibiotiques répertoriées dans le tableau II ont été conformes aux normes NCCLS, sauf le cas de la télichromycine dont les valeurs critiques ont été proposées par le fabricant européen⁴.

³ AB Biodisk, Sweden

⁴ Aventis Hoechst Marion Roussel Anti-infectives, France

Cette dualité avait été tenue en compte dans plusieurs études consacrées à l'activité *in vitro* de la téolithromycine comparée à celles des macrolides (1, 7, 8, 16, 26, 33).

L'intérêt des critères d'interprétation peut être démontré en comparant les résultats de 2 méthodes utilisant les mêmes molécules.

Ayant considéré la dilution sur gélose comme méthode de référence et l'antibiogramme standard comme méthode comparative, une comparaison des résultats peut être faite. Donc, aucune différence d'interprétation n'est apparue parce que des sensibilités aux antibiotiques ont été notées aussi bien pour la dilution sur gélose que pour l'antibiogramme standard (34, 39).

La même observation peut être faite en considérant aussi la méthode E-test comme méthode de référence : les CMI sont superposables aux diamètres d'inhibition puisque des sensibilités ont été aussi notées pour les deux méthodes.

II. LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

II.1. La sensibilité aux β -lactamines

Les souches de *Streptococcus pneumoniae* étudiées ont été *pénicilline-sensibles*. Mais des cas de résistance avaient été notés dans plusieurs pays notamment dans les pays développés.

En Espagne, des études menées sur 203 souches de pneumocoques avaient permis une répartition en souches sensibles (51,7%), intermédiaires (34,5%) et résistantes (13,8%) (32).

Par contre, d'autres études menées sur 180 souches de Singapour avaient permis de déceler un taux de résistance de 63%, et les sérotypes les plus en vue étaient 19F, 23F, 6B et 14 (38).

Des études menées par *García-Rey et al.* en Espagne visaient à établir une relation entre l'augmentation des résistances et la consommation d'antibiotiques. Les résultats ont montré de faibles taux en Guipúzcoa (41,5%), en Séville (42,8%) et en Biscaya (44,4%) et des taux élevés en Zaragoza (68,8%), en Grenade (66,6%), en Salamanca (65,2%), et en Murcia (64,4%).

Parallèlement, une banalisation de la consommation en antibiotiques de la part des populations avait été notée, du fait de la forte accessibilité à ces médicaments (17).

En comparant avec les données recensées dans ces pays, le taux au Sénégal se trouve négligeable probablement du fait de la faible consommation de pénicilline. Cette faible consommation serait due au problème d'accessibilité de la population aux antibiotiques.

Outre la propriété de marqueur de résistance, une relation entre l'activité *in vitro* de la pénicilline et celles d'autres molécules avait pu être établie par certains auteurs.

D'autres études menées en Espagne étaient orientées sur la sensibilité de 1684 souches de *Streptococcus pneumoniae* et de 2039 souches de *Streptococcus pyogenes* aux différentes molécules. Les données avaient montré l'influence de l'augmentation progressive des CMI de la pénicilline sur l'activité des β -lactamines et des macrolides, et de plus cette influence avait été moindre avec l'amoxicilline où il avait été noté une corrélation des CMI (36).

Selon *Brueggemann et al.*, les CMI de la pénicilline pourraient permettre de prédire l'activité antipneumococcique *in vitro* d'autres β -lactamines. Les résultats avaient montré une forte corrélation entre les CMI de la pénicilline et celles de différentes molécules de β -lactamines. Le plus haut degré de corrélation avait été noté entre pénicilline, amoxicilline, et amoxicilline-acide clavulanique dont les CMI sont égales, tandis qu'une faible corrélation existait entre les CMI de la pénicilline et celles des céphalosporines (5, 13, 24).

La sensibilité à la pénicilline pourrait donner une idée sur la sensibilité de nos souches à l'amoxicilline et à l'amoxicilline-acide clavulanique qui sont des molécules très prescrites pour le traitement des infections respiratoires.

II. 2. La sensibilité aux macrolides

- *Streptococcus pyogenes*

Les souches de *Streptococcus pyogenes* ont été sensibles aux macrolides (érythromycine et clarithromycine). L'érythromycine étant un marqueur de résistance, elles ont été donc considérées comme *érythromycine-sensibles (EryS)*.

Des études menées par *Bingen et al.* sur 1500 souches isolées de prélèvements de gorge d'enfants avaient permis de déceler d'une part 6,2% de souches sensibles à l'érythromycine, et d'autre part 3,4% et 2,8% de souches respectivement de phénotypes constitutifs MLS_B et M (4).

Par contre selon *Pérez-Trallero et al.*, environ 20% de souches étaient résistantes aux macrolides parmi 2039 souches de *Streptococcus pyogenes* collectées en Espagne. L'augmentation des taux de résistance serait aussi liée à la consommation accrue en antibiotiques par les populations (36).

Ces données ont permis de constater l'émergence des souches de *Streptococcus pyogenes* résistantes aux macrolides

dans les autres pays, contrairement à ce qui a été enregistré dans notre étude.

Hormis le niveau de consommation faible en antibiotiques, la politique de limitation du traitement à l'usage de la pénicilline pourrait ne pas être exclue, étant donnée la sensibilité du germe à cette molécule. A noter aussi que la pénicilline est économiquement plus accessible que les macrolides.

Devant de tels faits, le recours aux macrolides ne pourrait avoir lieu qu'en cas d'allergie à la pénicilline.

- *Streptococcus pneumoniae*

Les souches de *Streptococcus pneumoniae* étudiées ont été aussi érythromycine-sensibles (EryS). Cette sensibilité aux macrolides a été enregistrée au Sénégal, mais des données recensées dans les pays développés avaient montré l'émergence de souches résistantes.

De faibles taux de résistance avaient été enregistrés dans les pays d'Europe de l'ouest comme l'Allemagne, l'Autriche, le Portugal, alors que les taux élevés avaient été recensés en Espagne, en Italie et en Belgique avec respectivement 33, 24, et 31%. En France, un taux de 53% avait été enregistré. Aux Etats-Unis, les taux avaient varié de 19 à 34% (15, 31, 37).

Dans plusieurs pays, il avait été constaté une variation proportionnelle entre les taux de résistance à la pénicilline et les taux de résistance aux macrolides. Aux Etats-Unis, moins de 5% de souches pénicilline-sensibles avaient été résistantes aux macrolides, contre 30% de souches intermédiaires et plus de 50% de souches résistantes. A Hong Kong, 38% des souches sensibles à la pénicilline avaient été résistantes à l'érythromycine, contre 92% de souches intermédiaires et résistantes. Mais cette tendance pourrait être inversée dans certains pays comme en Espagne où 50% des souches intermédiaires avaient été résistantes aux macrolides, ou au nord de l'Italie où il avait noté 45% de résistance parmi les souches pénicilline-sensibles (10, 17, 22, 26, 31).

En se basant sur ces données, une telle proportionnalité peut s'établir entre la sensibilité à la pénicilline et la sensibilité aux macrolides pour rejoindre cette tendance décrite ci-dessus. Mais aussi comme le cas de la pénicilline, il faut tenir compte du niveau négligeable de consommation de macrolides de la part des populations, et c'est la seule raison qui peut expliquer l'absence de cas de résistance.

II. 3. La sensibilité aux lincosamides

Les souches de streptocoques *EryS* ont été toutes sensibles à la clindamycine d'où l'appartenance au phénotype S. Par ailleurs des cas de résistance avaient été enregistrés dans certains pays.

Selon *Waites et al.*, sur 198 souches de pneumocoques résistantes aux macrolides isolées d'enfants et d'adultes, les souches manifestant le gène *ermB* prédominaient sur les autres (*mefE*). Ces souches étaient donc de phénotype MLS_B parce qu'elles étaient résistantes à la clindamycine (9, 41).

Dans notre étude, aucun cas de résistance n'a été détecté contrairement aux données des pays développés d'où l'opportunité d'utiliser la clindamycine dans le traitement des infections respiratoires. Mais en ce qui nous concerne, une politique de restriction serait aussi nécessaire pour éviter l'éclosion des cas de résistance. De ce fait, cette molécule ne doit être prescrite que dans les cas exceptionnels comme les allergies à la pénicilline et/ou à l'érythromycine.

II. 4. La sensibilité aux kétolides

La télichromycine a été très efficace sur les souches de streptocoques parce que l'inhibition s'est faite à de très faibles concentrations. Cette suprématie a été retrouvée dans plusieurs études consacrées à l'activité *in vitro* de la télichromycine comparée aux autres molécules.

Selon *Jalava et al.*, la télichromycine était très active sur 147 souches de streptocoques (A, C, G) et sur 37 souches de pneumocoques (23).

Selon *Nagai et al.*, sur 175 de *Streptococcus pneumoniae* et 121 souches de *Streptococcus pyogenes*, la télichromycine

ainsi que ses dérivés étaient très actives sur toutes les souches sensibles et résistantes aux macrolides (33).

Malgré cette suprématie, il avait été décrit par certains auteurs l'émergence de souches résistantes et ce phénomène avait été mis en évidence en comparant le pouvoir d'induction de multirésistance de la téthromycine à celui d'autres molécules actives sur les streptocoques.

Selon *Davies et al.*, la téthromycine est un faible inducteur de résistance contrairement aux autres molécules comme l'azithromycine, la clarithromycine, l'érythromycine A, la clindamycine, et la pristinamycine (7).

La faible induction de multirésistance due à la fonction kéto présente des avantages en ce qui concerne l'utilisation de la téthromycine. Les normes d'utilisation doivent être strictes (respect de la posologie et de la durée du traitement) pour éviter l'émergence des souches résistantes. A noter que la téthromycine est une molécule qui n'est pas encore accessible au Sénégal.

CONCLUSION

Les macrolides ont fait preuve d'une très grande efficacité sur les souches de *Streptococcus pyogenes* et sur les souches de *Streptococcus pneumoniae*, ce qui peut convaincre de l'opportunité de l'usage de ces molécules dans le traitement des infections respiratoires.

Les données de notre étude ont montré la possibilité de limiter le traitement à l'emploi de la pénicilline ; cette politique de restriction permet d'éviter la sélection de souches résistantes aux macrolides. Toutefois, il faut signaler que le recours aux lincosamides, qui sont des molécules très puissantes, ne doit avoir lieu qu'en cas d'allergies à la pénicilline et/ou aux macrolides. Il en est de même pour les kétolides réputés être des molécules de dernier recours dans le traitement des infections respiratoires, leur emploi doit se faire avec parcimonie pour éviter l'éclosion des cas de résistance dont le mécanisme fait toujours l'objet de recherches.

Après constat de tels faits, quelques suggestions au corps médical, pourraient être d'une certaine utilité:

- Tout d'abord, tenir compte des références pédagogiques et pratiques s'adaptant le mieux à la situation du pays. Il n'est pas sûr que ce soit la pratique de l'antibiothérapie des pays développés (France, Espagne, Etats-Unis) qui soit la plus judicieuse car selon toute évidence, le Sénégal ne se trouve ni dans la même situation écologique concernant la résistance, ni dans la même situation sociale et économique.

- Ensuite, faire des recommandations pratiques adaptées à notre situation puisque l'exemple des pays développés est à prendre en considération pour éviter des erreurs importantes comme celles déjà indiquées. L'avantage de telles recommandations peut être évalué en terme d'efficacité clinique et d'impact sur le coût du traitement. Le but est de choisir des stratégies acceptables pour la population en termes de coût /efficacité. Les évaluations successives permettront d'adapter et d'améliorer les recommandations au cours des années.
- En plus, à l'instar des pays développés, essayer de limiter l'automédication et la vente de produits d'origine incertaine et/ou mal conservés.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ackermann G, Rodloff AC.

Drugs of the 21th century: telithromycin (HMR 3647), the first ketolide.

J Antimicrob Chemother 2003; 51: 497-511.

2. Balfour JA, Figgitt DP.

Telithromycin.

Drugs 2001; 61 (6): 815-29; discussion 830-1.

3. Bambeke FV, Verhaegen J, Tyteca D, Auckenthaler R, Tulkens PM.

Erythromycine et néomacrolides actuels, usages cliniques et perspectives.

Louvain Med 2000 ; 119 : 259- 286.

4. Bingen E, Fitoussi F, Doit C, and al.

Resistance to macrolide in *Streptococcus pyogenes* in France in pediatric patients.

Antimicrob Agents Chemother 2000; 44 (6): 1453- 1457.

5. Brueggemann AB, Pfaller MA, Doern GV.

Use of penicillin MICs to predict in vitro activity of other β -lactam antimicrobial agents against *Streptococcus pneumoniae*.

J Clin Microbiol 2001; 39 (1): 367- 369.

6. Champney WS, Tober CL.

Structure-activity relationships for six ketolide antibiotics.

Curr Microbiol 2001; 42 (3): 203-10.

7. Davies TA, Dewasse BE, Jacobs MR, Appelbaum PC.

In vitro development of resistance to telithromycin (HMR 3647), four macrolides, clindamycin, and pristinamycin in *Streptococcus pneumoniae*.

Antimicrob Agents Chemother 2000; 44 (2): 414-417.

8. Davies TA, Kelly LM, Jacobs MR, Appelbaum PC.

Antipneumococcal activity of telithromycin by agar dilution, microdilution, E-test, and disk diffusion methodologies.

J Clin Microbiol 2000; 38 (4): 1444-1448.

9. Del Grosso M, Iannelli F, Messina C, Santagati M, and al.

Macrolide efflux genes *mefA* and *mefE* are carried by different genetic elements in *Streptococcus pneumoniae*.

J Clin Microbiol 2002; 40: 774-778.

10. Doern GV, Heilmann KP, Huynh HK, Rhomberg PR, Coffman SL, Brueggemann AB.

Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States during 1999-2000, including a comparison of resistance rates since 1994-1995.

Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 1721-1729.

11. Douthwaite S, Champney WS.

Structures of ketolides and macrolides determine their mode of interaction with the ribosomal target site.

J Antimicrob Chemother 2001; 48 Suppl T1: 1-8.

12. Douthwaite S.

Structure-activity relationships of ketolides vs. macrolides.

Clin Microbiol Infect 2001; 7 Suppl 3: 11-7.

13. Fass RJ, Barnishan J.

Comparison of antimicrobial in vitro activities against *Streptococcus pneumoniae* independent of MIC susceptibility breakpoints using MIC frequency distribution curves, scattergrams and linear regression analyses.

J Antimicrob Chemother 2001; 48: 609-615.

14. Felmingham D.

Evolving resistance patterns in community-acquired respiratory tract pathogens: first results from the PROTEKT global surveillance study. Prospective Resistant Organism Tracking and Epidemiology for the ketolide telithromycin.

J Infect 2002 ; 44 Suppl A: 3-10.

15. Fitoussi F, Doit C, Geslin P, Brahimi N, Bingen E.

Mechanisms of macrolide resistance in clinical pneumococcal isolates in France.

Antimicrob Agents Chemother 2001; 45 : 636-638.

16. Fuchs PC, Barry AL, Brown SD.

In vitro activity of telithromycin against *Streptococcus pneumoniae* resistant to other antibiotics, including cefotaxime.

J Antimicrob Chemother 2002; 49: 399-401.

17. Garcia-Rey C, Aguilar L, Baquero F, Casal J, Dalré R.

Importance of local variations in antibiotic consumption and geographical differences of erythromycin and penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*.

J Clin Microbiol 2002; 40 (1): 159- 164.

18. Garza-Ramos G, Xiong L, Zhong P, Mankin A.

Binding site of macrolide antibiotics on the ribosome: new resistance mutation identifies a specific interaction of ketolides with rRNA .

J Bacteriol 2001; 183 (23): 6898-907.

19. Hammerschlag MR, Roblin PM, Bebear CM.

Activity of telithromycin, a new ketolide antibacterial, against atypical and intracellular respiratory tract pathogens.

J Antimicrob Chemother 2001; 48 Suppl T1: 25-31.

20. Hoban DJ, Wierzbowski AK, Nichol K, Zhanel GG.

Macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Canada during 1998-1999: Prevalence of *mef(A)* and *erm(B)* and susceptibilities to ketolides.

Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 2147-2150.

21. Hoban DJ, Zhanel GG.

Ketolides in the treatment of respiratory infections.

Expert Opin 2002; 3 (3): 227- 297.

22. Ip M, Lyon DJ, Yung RWH, Chan C, Cheng AFB.

Macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Hong Kong.

Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(5): 1578-1580.

23. Jalava J, Kataja J, Seppälä H, Huovinen P.

In vitro activities of the novel ketolide telithromycin (HMR 3647) against erythromycin-resistant *Streptococcus* species.

Antimicrob Agents Chemother 2001; 45 (3): 789- 793.

24. Kaplan SL, Mason EO Jr.

Management of infections due to antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*.

Clin Microb Rev 1998; 11 (4): 628-644.

25. Kellogg JA, Bankert DA, Elder CJ, Gibbs JL, Smith MC.

Identification of *Streptococcus pneumoniae* revisited.

J Clin Microbiol 2001; 39 (9): 3373- 3375.

26. Kozlov RS, Bogdanovitch TM, Appelbaum PC, and al.

Antistreptococcal activity of telithromycin compared with seven other drugs in relation to macrolide resistance mechanisms in Russia.

Antimicrob Agents Chemother 2002; 46 (9): 2963- 2968.

27. Leclercq R.

Will resistance to ketolides develop in *Streptococcus pneumoniae*?

J Infect 2002; 44 Suppl A: 11-6.

28. Liu M, Douthwaite S.

Activity of the ketolide telithromycin is refractory to *erm* monomethylation of bacterial rRNA.

Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 1629-1633.

29. Man'kin AS.

“Ribosomal antibiotics” (article in Russian).

Mol Biol (Mosk) 2001; 35 (4): 597-609.

30. Mason EO Jr, Lamberth LB, Wald ER, Bradley JS, Barson WJ, Kaplan SL.

In vitro activities of cethromycin (ABT-773), a new ketolide, against *Streptococcus pneumoniae* strains that are not susceptible to penicillin or macrolides.

Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 166-169.

31. Mc Gee L, Mc Dougal L, Zhou J, Spratt BG, and al.

Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network.

J Clin Microbiol 2001; 39 (7): 2565-2571.

32. Morosini M, Cantón R, Loza E, Negri M, and al.

In vitro activity of telithromycin against Spanish *Streptococcus pneumoniae* isolates with characterized macrolide resistance mechanisms.

Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(9): 2427-2431.

33. Nagai K, Davies TA, Ednies ML, and al.

Activities of a new fluoroketolide, HMR 3787, and its (Des)-Fluor derivative RU 64399 compared to those of telithromycin, erythromycin A, azithromycin, clarithromycin, and clindamycin against macrolide susceptible or resistant *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*.

Antimicrob Agents Chemother 2001; 45 (11): 3242-3245.

34. Ndoye A.

Données sur la sensibilité aux nouvelles quinolones (lévofloxacine) et kétolides (télihromycine) de souches de *Streptococcus pneumoniae* isolées d'infections respiratoires.

Thèse Pharm, Dakar, 2002; n°79.

35. Nilius AM, Ma Z.

Ketolides: the future of the macrolides?.

Curr Opin Pharmacol 2002; 2 (5): 493-500.

36. Peréz-Trallero E, Fernández-Mazarrasa C, Garia-Rey C, and al.

Antimicrobial susceptibilities of 1684 *Streptococcus pneumoniae* and 2039 *Streptococcus pyogenes* isolates and their ecological relationships: Results of a 1-year (1998-1999) multicenter surveillance study in spain.

Antimicrob Agents Chemother 2001; 45 (12): 3334- 3340.

37. Reinert RR, Lutticken R, Bryskier A, Al-Lahham A.

Macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* in the pediatric population in Germany during 2000-2001.

Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 489-493.

38. Soh WS, Poh CL, Tzer Pin Lin RV.

Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates from pediatric patients in Singapore.

Antimicrob Agents Chemother 2000; 44 (8): 2193- 2196.

39. Soumah Y.

Etude de la sensibilité à la lévofloxacine (fluoroquinolone) et à la télichromycine (kétolide) de souches de *Streptococcus pyogenes* isolées à Dakar.

Thèse Pharm, Dakar, 2002; n°73.

40. Tsai H, Hsueh P, Teng L, Lee P, and al.

Bacteremic pneumonia caused by a single clone of *Streptococcus pneumoniae* with different optochin susceptibilities.

J Clin Microbiol 2000; 38 (1): 458-459.

41. Waites K, Johnson C, Gray B, Edwards K, Crain M, Benjamin W Jr.

Use of Clindamycin Disks to detect macrolide resistance mediated by *ermB* and *mefE* in *Streptococcus pneumoniae* isolates from Adults and Children.

J Clin Microbiol 2000; 38 (5):1731-1734.

42. Weiss K, De Azavedo J, Restieri C, and al.

In vitro activity of a novel ketolide ABT-773 against invasive strains of *Streptococcus pneumoniae*.

J Antimicrob Chemother 2001; 48 (3): 407-9.

43. White RL.

Antibiotic resistance: where do ketolides fit?.

Pharmacotherapy 2002; 22 (1 Pt 2): 18S-29S; discussion 30S-32S.

44. Xiong L, Shah S, Mauvais P, Mankin AS.

A ketolide resistance mutation in domain II of 23 S rRNA reveals the proximity of hairpin 35 to the peptidyl transferase centre.

Mol Microbiol 1999; 31 (2): 633-9.

45. Zhanel GG, Walters M, Noreddin A, and *al.*

The ketolides: a critical review.

Drugs 2002; 62: 1771- 1804.

46. Zhong P, Cao Z, Hammond R, and *al.*

Induction of ribosome methylation in MLS-resistant *Streptococcus pneumoniae* by macrolides and ketolides.

Microb Drug Resist 1999; 5 (3): 183-8.

47. Zhong P, Shortridge V.

The emerging new generation of antibiotic: ketolides.

Curr Drug Targets Infect Disord 2001; 1: 125- 131.