

DICTIONNAIRE DES TECHNIQUES DE MICROBIOLOGIE

2025

Nouvelle édition actualisée

Jean-Noël JOFFIN

GUY LEYRAL

Lexitis Éditions

19 rue Larrey 75005 Paris
www.lexitiseditions.fr

Toute reproduction ou représentation intégrale ou partielle, faite par quelque procédé que ce soit, sans l'autorisation de l'éditeur est illicite et constitue une contrefaçon sanctionnée par les articles L 335-2 et suivants du Code de la propriété intellectuelle. Seules sont autorisées les copies ou les reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective, ainsi que les analyses et courtes citations justifiées par le caractère critique, scientifique ou d'information de l'œuvre dans laquelle elles sont incorporées sous réserve du respect des dispositions légales prévues (L 122-4 et L 122-5, L 122-10 à L 122-12).

ISBN : 978-2-36233-196-1 - Dépôt légal : mars 2025

Cet ouvrage a été imprimé au sein de l'Union européenne sur du papier certifié issu de forêts durablement gérées.

AVANT-PROPOS

Cet ouvrage a été publié par le Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine (CRDP) depuis 1991 grâce avant tout à Guy LEYRAL, coauteur et Jean FIGARELLA, tous deux inspecteurs généraux de l'Éducation nationale, aujourd'hui disparus.

Guy a été l'initiateur de la collection « Biologie technique » du CRDP et a permis son développement au travers des sections technologiques biologiques des lycées et IUT. Malheureusement, la réorganisation du Centre national de documentation pédagogique (CNDP), dont dépendait le CRDP, a conduit à la création du réseau CANOPÉ, qui ne publie plus de documents papier depuis quelques années. Des raisons financières sont en partie la cause de cette désaffectation avec la baisse des ventes des livres.

LEXITIS a accepté de reprendre ce travail pour en assurer la diffusion grâce à son directeur, Martin DE HALLEUX.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient aussi pour leur précieuse contribution : Françoise BOINEAU, Claudine SCHUSTER, Jocelyne REBOUL, Gérard COUTOULY, François RENAUD, Jean-Pierre GUÉHO, Émilie JACQUEMIN, Cédric CIVEL, Antoine GAUDIN, Sylvie LINO-TURQUIN et Joël CNOKAERT qui ont réalisé une lecture très attentive.

Ils remercient également Alberto LERNER pour CHROMagar, Augustin Yvorra de la société I2A, ainsi que les étudiants qui ont contribué aux évolutions de l'ouvrage par leurs remarques ou leurs expérimentations.

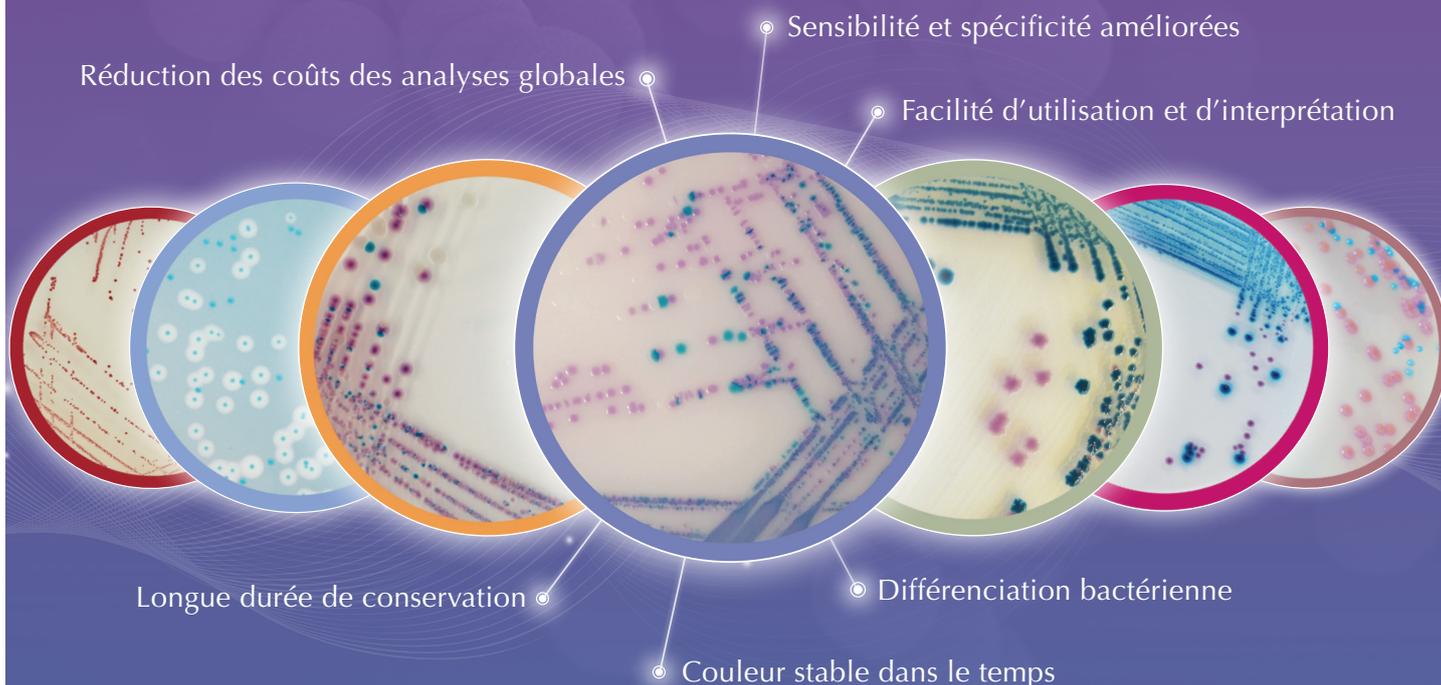
CRÉDITS PHOTOGRAPHIQUES

Les photos dont la source n'est pas indiquée ont été réalisées soit par Jean-Noël JOFFIN, soit par Annie PASSERON et Pascal FRAPERIE, professeurs au lycée Saint-Louis à Bordeaux soit par Pascal PICQUOT et encore Cédric CIVEL, professeur au lycée Paul-Éluard de Saint-Denis. Certaines sont empruntées à Wikipedia ou d'autres sites internet ou des documentations des fabricants.

Les auteurs remercient Pascal PICQUOT, Annie PASSERON et Pascal FRAPERIE pour l'importance de leur contribution.

L'EXPERTISE
CHROMOGÈNE
AU SERVICE DE L'AGROALIMENTAIRE

Une gamme complète...



...disponible en forme déshydratée

Pour *E. coli*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter*, *Bacillus cereus*,
Listeria monocytogenes, *Enterobacteriaceae*, *Clostridium perfringens*, *Yersinia enterocolitica*...

Découvrez tous nos produits sur CHROMagar.com

CHR  **Magar**TM
The Chromogenic Media Pioneer

SOMMAIRE

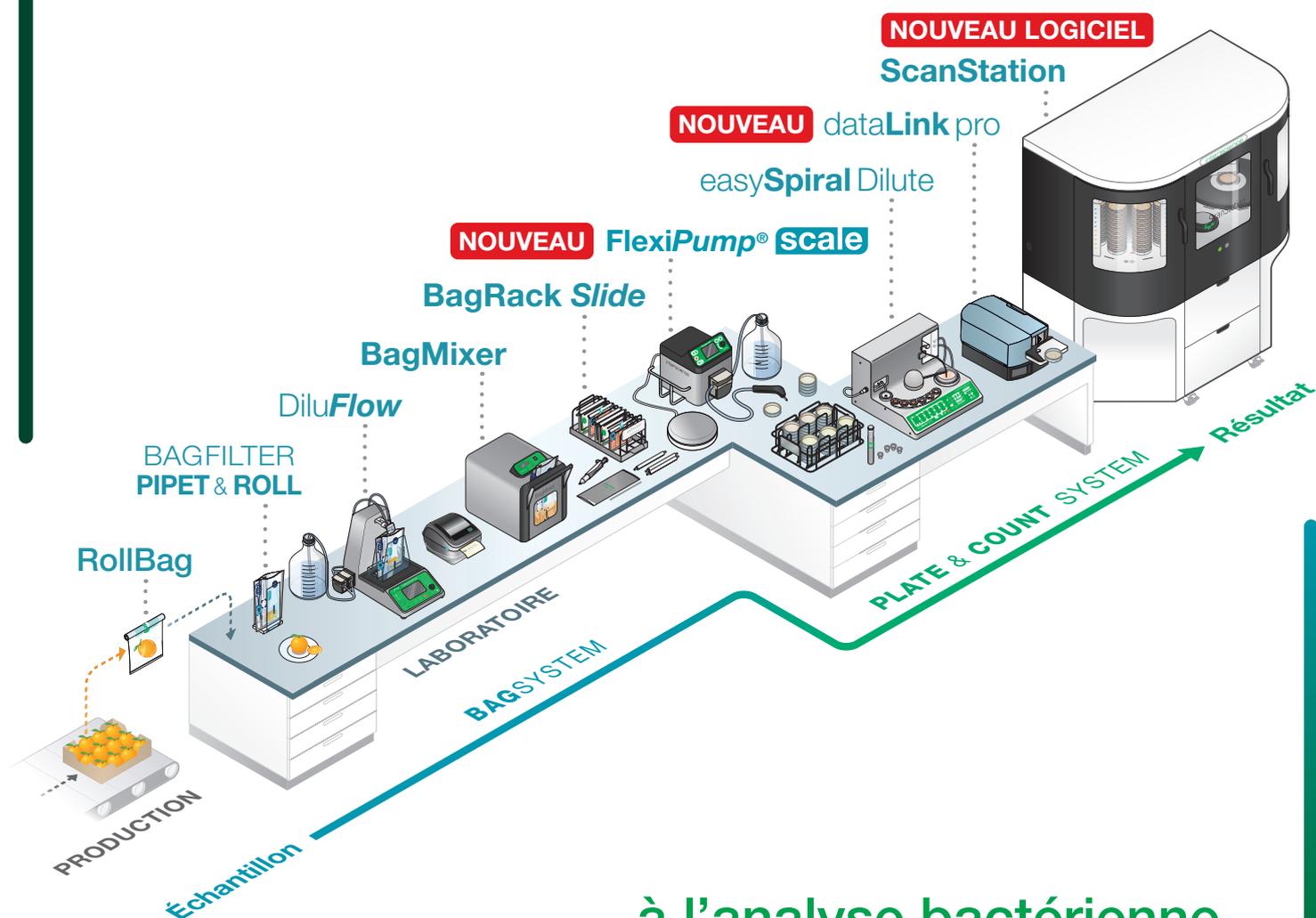
AVANT-PROPOS	1
COMMENT RECHERCHER UN THÈME DONNÉ ?	7
FICHES	9
A	11
▶ Acides nucléiques (DNase)	11
▶ Acides organiques (citrate, malonate, acétate)	13
▶ Antibiotiques – Antibiogramme : orienteur	16
▶ Antibiotiques : généralités	17
▶ Antibiotiques : CMI (concentration minimale inhibitrice)	34
▶ Antibiogramme : choix des antibiotiques en fonction du microorganisme testé (2023)	37
▶ Antibiogramme : méthode des disques	41
▶ Antibiogramme : méthode en cupule à 1 ou 2 concentrations critiques (système type ATB)	81
▶ Antibiogramme des champignons (antifongigramme)	84
▶ Antibiotiques : β -Lactamases	85
▶ Antibiotiques : autres enzymes d'inactivation	101
▶ Antibiotiques : pouvoir bactériostatique et bactéricide des antibiotiques, de leurs associations et du sérum	102
▶ Antiseptiques et désinfectants (biocides)	107
▶ Arylamidases ou aminopeptidases	110
▶ Atmosphère de culture	112
▶ Auxanogramme du carbone et de l'azote	116
▶ Azote minéral (réduction des nitrates et nitrites)	119
▶ Azote organique	123
B	125
▶ Bactériocines	125
▶ Besoins nutritifs (exigences nutritives) et culture microbienne	125
▶ Biologie moléculaire	128

C	137
▶ CAMP-test	137
▶ <i>Candida</i> : tests particuliers d'identification morphologique (blastèse, chlamydozoïdes)	138
▶ Catalase et peroxydases	140
▶ Chromatographie en phase gazeuse	142
▶ Colonies (description des) : examen macroscopique des cultures	144
▶ Conservation des souches	148
D	151
▶ Décarboxylases (LDC, ODC) et arginine-dihydrolase (ADH)	151
▶ Dénombrement (numération)	156
▶ Désaminases (TDA, PDA, LDA)	162
▶ Discrimination (tests de ou d'orientation)	165
E	167
▶ Enrichissement	167
▶ Enzymes	169
▶ Épidémiologie	171
▶ Esculine (hydrolyse de) ou esculinase (β -glucosidase)	171
F	173
▶ Facteurs de croissance	173
▶ Fluorescence	177
G	179
▶ Gamma-glutamyl-transférase (γ -GT)	179
▶ Gaz (production de)	180
▶ Glucides (utilisation des)	181
▶ Glycosidases	189
H	191
▶ Hippurate (hydrolyse de l') (hippuricase)	191
▶ Hygiène des surfaces (contrôle) ou prélèvements de surface	192
I	195
▶ Immunologie : antigènes microbiens	195
▶ Immunologie : utilisation d'anticorps marqués (immunoenzymologie, immunofluorescence, immunochromatographie...)	199
▶ Immunologie : anticorps antimicrobiens et sérodiagnostic	208
▶ Immunologie : identification immunologique des <i>E. coli</i> entéro-pathogènes (EPEC)	211
▶ Immunologie : identification immunologique des <i>Shigella</i>	213
▶ Immunologie : identification immunologique des <i>Salmonella</i>	214
▶ Immunologie : identification immunologique des <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactococcus</i>	217
▶ Immunologie : identification immunologique de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	222

▶ Immunologie : identification immunologique de <i>Vibrio cholerae</i>	222
▶ Indicateurs	223
▶ Inhibiteurs utilisés pour l'identification des microorganismes	225
▶ Inhibiteurs utilisés pour l'isolement	228
▶ Isolement : isolement sélectif	231
K	255
▶ Kligler-Hajna (glucose-lactose-H ₂ S)	255
L	259
▶ L-alanine aminopeptidase (une alternative à la coloration de Gram)	259
▶ Lipides (lipase, tributyrine-hydrolase, lécithinase)	260
▶ Lysine-fer	264
▶ Lysotypes	266
M	267
▶ Mannitol-Mobilité-Nitrates	267
▶ Métabolisme énergétique	269
▶ Microméthodes : galeries miniaturisées	278
▶ Milieux de culture et leur préparation	282
▶ Milieux enrichis	290
▶ Milieux chromogéniques	294
▶ Milieux (composition des)	297
▶ Mobilité	317
▶ Morphologie microbienne	318
▶ Mycoplasmes urogénitaux	329
N	333
▶ Niacin test	333
O	335
▶ Odeur	335
▶ ONPG hydrolase (test ONPG, β -galactosidase, métabolisme du lactose)	335
▶ Oxydase ou cytochrome oxydase	338
P	341
▶ Peptones	341
▶ Phosphatases	345
▶ Pigments	346
▶ Polyosides extracellulaires ou exopolysides (production de)	348
▶ Pouvoir pathogène expérimental	349
▶ Protéases (collagénase...)	349
▶ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : sérogroupage	351

Q	353
▶ Qualité au laboratoire	353
R	369
▶ Réactifs usuels et colorants fiches de préparation	369
▶ RM (test du)	385
S	387
▶ Sécurité au laboratoire de microbiologie	387
▶ Sérogroupage et sérotypage l'identification immunologique	405
▶ Sérum de bœuf coagulé (SBC)	405
▶ Soufre	406
▶ Spectrométrie de masse (MALDI-TOF)	408
▶ <i>Staphylococcus aureus</i> : coagulase (libre)	410
▶ <i>Staphylococcus aureus</i> : tests de coagglutination	411
▶ Stérilisation	413
▶ <i>Streptococcus, Enterococcus, Lactococcus</i> : galerie de Sherman	414
▶ <i>Streptococcus pneumoniae</i> : test de lyse par la bile	415
T	417
▶ Taxonomie	417
▶ Toxinotypie	428
▶ Tryptophanase	430
▶ Type respiratoire	432
U	435
▶ Uréase	435
▶ Urée-tryptophane (ou urée-indole)	437
V	439
▶ VP (Vosges-Proskauer)	439
BIBLIOGRAPHIE	441

Du prélèvement de l'échantillon...



... à l'analyse bactérienne

Interscience fabrique en France depuis plus de 40 ans **une ligne de produits pour assurer des analyses microbiologiques sûres et rapides.**

interscience

COMMENT RECHERCHER UN THÈME DONNÉ ?

Chacun des thèmes ci-dessous renvoie à une fiche du dictionnaire

Anaérobies

Atmosphère de culture
Inhibiteurs utilisés pour l'identification des microorganismes
Inhibiteurs utilisés l'identification
Isolement
Milieux de culture
Milieux enrichis
Milieux composition
Type respiratoire

Antibiotiques et antibiogramme

Antibiogramme : choix des antibiotiques en fonction du microorganisme testé
Antibiogramme : méthode des disques
Antibiogramme des champignons (antifongogramme)
Antibiogramme : méthode en deux concentrations critiques
Antibiotiques : autres enzymes d'inactivation
Antibiotiques : CMI
Antibiotiques : généralités)
Antibiotiques : pouvoir bactériostatique et bactéricide des antibiotiques
Antibiotiques : β -lactamases
Bactériocines

Bacilles Gram +

CAMP-test
Enrichissement
Esculine
Immunologie : anticorps antimicrobiens et sérodiagnostic
Inhibiteurs utilisés pour l'isolement
Isolement
Milieux de culture
Milieux enrichis
Milieux (composition des)
Pouvoir pathogène expérimental
Sérum de bœuf coagulé
Toxinotypie

Bactéries Gram - : voir taxons correspondants

Biologie moléculaire

Épidémiologie

Champignons (Mycètes)

Antibiogramme des champignons (antifongogramme)
Auxanogramme du carbone et de l'azote
Candida
Inhibiteurs utilisés pour l'isolement
Isolement
Milieux de culture
Milieux enrichis
Milieux (composition des)
Odeur
Pigments

Coques Gram + catalase –

Esculine
Immunologie : anticorps antimicrobiens et sérodiagnostic
Immunologie : antigènes microbiens
Immunologie : identification immunologique des *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*
Inhibiteurs utilisés pour l'isolement
Isolement
Milieux de culture
Milieux enrichis
Milieux (composition des)
Pigments
Polyosides extracellulaires
Streptococcus, *Enterococcus*, *Lactococcus* : galerie de Sherman
Streptococcus pneumoniae: lyse par la bile

Culture microbienne

Acides nucléiques (DNase, thermonucléases)
Acides organiques (citrate, malonate, acétate)
Atmosphère de culture
Auxanogramme
Azote minéral (réduction des nitrates et des nitrites)
Azote organique
Besoins nutritifs et culture microbienne
Colonies (description des)
Dénombrement (numération)
Discrimination Enrichissement
Enzymes
Facteurs de croissance
Gaz (production de)

Glucides (utilisation des)
Indicateurs
Inhibiteurs utilisés pour l'identification des microorganismes
Inhibiteurs utilisés pour l'isolement
Isolement
Kligler-Hajna (glucose-lactose-H₂S)
Lipides
Mannitol-Mobilitéé-Nitrate
Métabolisme énergétique
Microméthodes
Milieux chromogènes
Milieux de culture
Milieux enrichis
Milieux (composition des)
Peptones
Pigments
Réactifs usuels et colorants
Soufre
Streptococcus, *Enterococcus*, *Lactococcus* : galerie de Sherman
Type respiratoire
Uréase
Urée-tryptophane
VP

Entérobactérales

Discrimination
Enrichissement
Esculine
Immunologie : anticorps antimicrobiens et sérodiagnostic
Immunologie : antigènes microbiens
Immunologie : identification immunologique des *E. coli* entéropathogènes (EPEC)
Immunologie : identification immunologique des *Shigella*
Immunologie : identification immunologique des *Salmonella*
Inhibiteurs utilisés pour l'identification des microorganismes
Inhibiteurs utilisés pour l'isolement
Isolement
Milieux de culture
Milieux enrichis
Milieux (composition des)
Odeur
Pigments
Type respiratoire

Enzymes

Acides nucléiques (DNase)
Arylamidases ou aminopeptidases
Catalase et peroxydases
Décarboxylases et arginine- dihydrolase (LDC, ODC, ADH)
Désaminases (TDA, PDA, LDA)
Esculine
Gamma-glutamyl-transférase
Glycosidases
Hippurate (hydrolyse de l') (hippuricase)
L-Alanine-aminotransférase
Lipides
Milieux chromogènes
ONPG hydrolase
Oxydase
Phosphatases
Protéases
Réactifs usuels et colorants
Staphylococcus aureus : coagulase (libre)
Tryptophanase
Uréase

Hæmophilus

Facteurs de croissance
Immunologie : antigènes microbiens
Inhibiteurs utilisés pour l'isolement
Milieux de culture
Milieux enrichis
Milieux (composition des)
Type respiratoire

Identifier (voir aussi Métabolisme)

Bactériocines
Biologie moléculaire
Chromatographie en phase gazeuse
Colonies (description des)
Enzymes
Lysotypes
Mobilité
Morphologie microbienne
Odeur
Spectrométrie de masse (MALDI-TOF)
Taxonomie
Toxinotypie

Immunologie

Fluorescence
Immunologie : anticorps antimicrobiens et sérodiagnostic
Immunologie : antigènes microbiens
Immunologie : identification immunologique de *Streptococcus pneumoniae*
Immunologie : identification immunologique de *Vibrio cholerae*
Immunologie : identification immunologique des *E. coli* entéropathogènes

Immunologie : identification immunologique des *Shigella*
Immunologie : identification immunologique des *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*
Immunologie : identification immunologique des *Salmonella*
Immunologie : utilisation d'anticorps marqués

Métabolisme (voir aussi Culture microbienne et Enzymes)

Acides nucléiques (DNase, thermonucléases)
Acides organiques (citrate, malonate, acétate)
Atmosphère de culture
Auxanogramme
Azote minéral
Azote organique
Besoins nutritifs
Colonies (description des)
Discrimination
Épidémiologie
Facteurs de croissance
Gaz (production de)
Glucides (utilisation des)
Indicateurs
Isolement
Kligler-Hajna (glucose-lactose-H₂S)
Lipides
Lysine-fer
Mannitol-Mobilité-Nitrates
Métabolisme énergétique
Microméthodes : galeries miniaturisées
Milieux de culture
Milieux enrichis
Milieux (composition des)
Niacin-test
Odeur
Réactifs usuels et colorants RM (test du)
Sérum de bœuf coagulé
Soufre
Spectrométrie de masse (MALDI-TOF)
Streptococcus, *Enterococcus*, *Lactococcus* : galerie de Sherman
Type respiratoire
Urée-Tryptophane
VP

Mycobactéries

Facteurs de croissance
Fluorescence
Isolement
Milieux de culture
Milieux enrichis
Milieux (composition des)
Niacin-test
Pouvoir pathogène expérimental

Pseudomonas et apparentés

Auxanogramme
Immunologie : antigènes microbiens
Inhibiteurs utilisés pour l'identification des microorganismes
Inhibiteurs utilisés pour l'isolement
Isolement
Odeur
Pigments
Type respiratoire

Qualité et Sécurité

Conservation des souches
Hygiène des surfaces (contrôle)
Qualité
Réactifs usuels et colorants
Sécurité au laboratoire

Réactifs

Réactifs usuels et colorants

Sérogroupe : voir immunologie

Staphylococcus

CAMP-test
Enrichissement
Immunologie : anticorps antimicrobiens et sérodiagnostic
Immunologie : antigènes microbiens
Inhibiteurs utilisés pour l'identification des microorganismes
Inhibiteurs utilisés pour l'isolement
Isolement
Lysotypes
Milieux de culture
Milieux enrichis
Milieux (composition des)
Pigments
Staphylococcus aureus : coagulase (libre)
Staphylococcus aureus : tests de coagglutination
Toxinotypie

Vibrio-Aeromonas

Auxanogramme
Immunologie : anticorps antimicrobiens et sérodiagnostic
Immunologie : antigènes microbiens
Immunologie : identification immunologique de *Vibrio cholerae*
Inhibiteurs utilisés pour l'identification des microorganismes
Inhibiteurs utilisés pour l'isolement
Isolement
Milieux de culture
Milieux enrichis
Milieux (composition des)

FICHES

A

► Acides nucléiques (DNase)

De nombreuses bactéries sont capables d'hydrolyser le DNA. La mise en évidence chez un *Staphylococcus* d'une DNase thermostable suffit à l'identification de l'espèce *aureus*. Chez les Enterobactérales TDA -, seules les souches appartenant au genre *Serratia* sécrètent une DNase. Enfin, la recherche d'une DNase est un critère de l'identification des *Streptococcus* β -hémolytiques, des *Moraxella*, des *Pseudomonas* (seul *aeruginosa* en produit), de *Brevundimonas diminuta*, de *Stenotrophomonas* (ex-*Xanthomonas*) *maltophilia*, de *Vibrio* (DNase +), *Aeromonas* (DNase +), des *Bacillus*, des *Micrococcus*.

Réaction

La réaction catalysée est la suivante : $\text{DNA} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{nucléotides et/ou polynucléotides}$

Il est difficile, en effet, d'affirmer que le stade final est le stade nucléotide. Il s'agit probablement d'une hydrolyse en polynucléotides. La DNase des *Staphylococcus* est, de plus, capable d'hydrolyser des RNA (activité RNase). Remarquer que la DNase recherchée n'est pas active sur le propre DNA des bactéries sécrétrices.

Différents procédés de la recherche

Cette activité peut aussi être recherchée par différents procédés, éventuellement associés :

- recherche de l'activité DNase globale ;
- recherche de l'activité DNase thermorésistante (après chauffage à 100 °C) d'une souche bactérienne, d'un aliment, ou d'une suspension d'aliment.

Réactifs

Les deux réactifs utilisés pour révéler l'action d'une DNase sont :

- **l'acide chlorhydrique HCl** à 1 mol · dm⁻³ qui précipite les molécules du DNA combinées à des protéines ;
- **le bleu de toluidine** qui prend une teinte rose en présence des composés d'hydrolyse du DNA (reste bleu en présence de DNA).

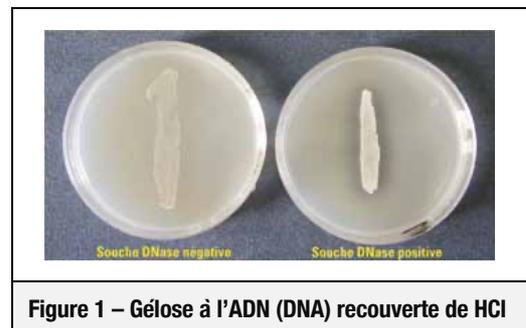
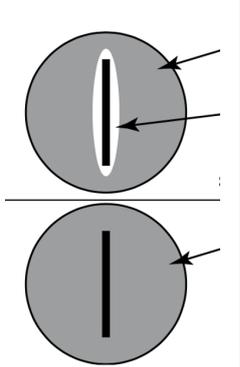
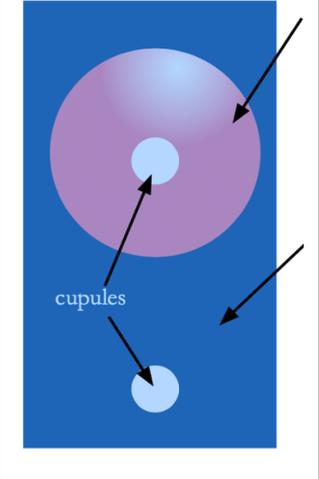


Figure 1 – Gélose à l'ADN (DNA) recouverte de HCl

RECHERCHE CLASSIQUE DE LA DÉSOXYRIBONUCLÉASE (DNase ou ADNase)		
Milieu utilisé et réactifs	Technique	Résultats
<p>Milieu</p> <ul style="list-style-type: none"> • Peptones • DNA dénaturé de thymus <p>Réactifs</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bleu de toluidine ou HCl à $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ <p>Le DNA est précipité par HCl et coloré en bleu par le bleu de toluidine (BT).</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Faire une strie à la surface du milieu (ou éventuellement des touches). • Étuver. • Recouvrir la gélose du réactif choisi (en évitant d'en mettre trop). 	 <p>Clair (HCl) ou rose (BT)</p> <p>L'ADN a disparu autour de la strie : DNase extra-cellulaire +</p> <p>Trouble (HCl) ou bleu (BT)</p> <p>L'ADN n'a pas disparu : pas de DNase extra-cellulaire.</p>

RECHERCHE DE LA THERMONUCLÉASE		
Milieu utilisé et réactifs	Technique	Résultats
<p>Milieu</p> <ul style="list-style-type: none"> • DNA • Bleu de toluidine • Agar • Tampon TRIS pH = 9 • NaCl Ca·Cl₂ <p>Des puits sont creusés dans le milieu à l'aide d'un emporte-pièce ou d'une pipette Pasteur.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • À partir d'une culture en bouillon cœur- cervelle (et non bouillon pour coagulase), placer un aliquote de la culture agitée de 24 h (au bain d'eau à 100 °C durant 15 min). • Prélever une goutte de bouillon bouilli et la mettre dans une cupule. • Faire de même avec une goutte de bouillon non chauffé. • Incuber durant 4 heures à 37 °C et faire une première lecture puis une deuxième à 24 h. <p>Note : la culture peut être remplacée par l'aliment ou une suspension d'aliment.</p>	 <p>Rose : l'ADN a disparu, donc DNASE + (thermorésistante si le bouillon a été chauffé, soit thermonucléase +).</p> <p>Bleu : l'ADN est toujours présent, donc : – si le bouillon n'a pas été chauffé : DNASE – – si le bouillon a été chauffé thermonucléase –</p> <p>cupules</p> <p>La conclusion finale tiendra compte des deux tests réalisés par souche.</p>

Voir aussi : **Enzymes**

► Acides organiques (citrate, malonate, acétate)

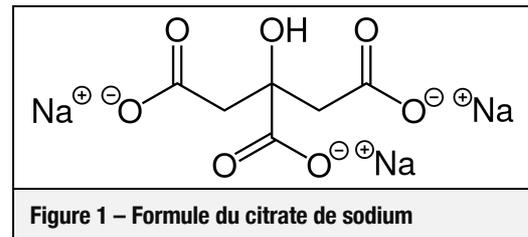
Les acides organiques (ou les anions correspondants) sont des sources de carbone possibles pour de nombreux microorganismes. Dans la pratique courante, rechercher sa capacité à utiliser le citrate est un critère de l'identification d'une entérobactérie ; celle du malonate peut être recherchée dans une galerie complémentaire. Par ailleurs, les résultats **d'auxanogramme** du carbone sont très utilisés dans les galeries d'identification (bacilles Gram- aérobies stricts, levures...), (voir la fiche **Auxanogramme du carbone**).

L'étude de l'utilisation du citrate, celle du malonate et, à un degré moindre, celle de l'acétate (éthanoate) font l'objet de méthodologies particulières présentées ci-dessous.

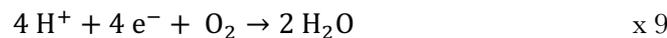
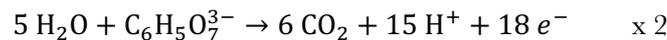
1. Le citrate

Son utilisation est aérobie dans la plupart des cas. Elle suppose que la molécule puisse :

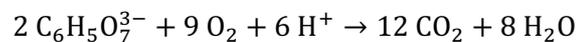
- pénétrer, donc que la bactérie possède une perméase. *E. coli* est citrate – par défaut de perméase ;
- être oxydée avec production d'énergie (cycle de Krebs) ;
- fournir, par diverses transformations utilisant l'énergie produite, les molécules nécessaires à l'élaboration de tous les constituants de la cellule bactérienne.



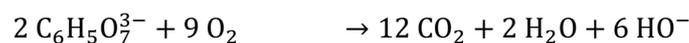
Seul le deuxième aspect semble influencer de façon sensible le pH du milieu. L'oxydation aérobie du citrate répond probablement aux équations suivantes :



Soit en équilibrant les électrons : (soit 36 électrons échangés)



Ou en mettant en évidence les hydroxyles :



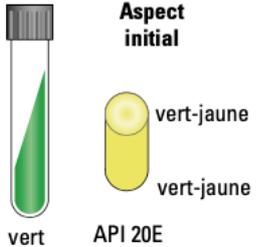
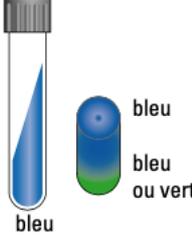
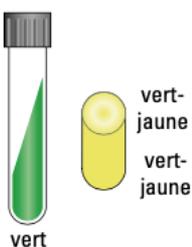
On ne peut exclure une fermentation du citrate, en particulier chez les entérocoques. Il n'y pas alors d'alcalinisation. Sinon l'utilisation du citrate devrait donc se traduire par une alcalinisation du milieu, si le dioxyde de carbone, gaz acide, est effectivement éliminé du tube par le dévissage du bouchon.

Deux techniques coexistent : le milieu *citrate de Simmons* et le milieu *citrate de Christensen*.

Le milieu citrate de Simmons est un milieu solide en pente, ne contenant aucune autre source de carbone que le citrate, les autres constituants étant les ions minéraux indispensables. Ce milieu permet d'affirmer, en cas de résultat positif (culture et virage de l'indicateur), l'utilisation du citrate comme seule source de carbone et d'énergie. Un microorganisme citrate de Simmons positif synthétise tous ses constituants carbonés à partir du carbone du citrate : il n'a donc pas besoin de facteurs de croissance. En revanche, un résultat négatif (absence de culture et de virage de l'indicateur de pH) ne permet pas de préjuger de l'utilisation du citrate dans des conditions de milieu différentes, en particulier en présence de facteurs de croissance comme dans le milieu citrate de Christensen. La technique utilisée pour le caractère citrate doit donc être précisée.



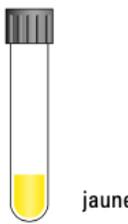
Figure 2 – Exemples de milieu citrate de Simmons après incubation, à gauche négatif sans culture, à droite positif avec culture

UTILISATION DE L'ION CITRATE (CITRATE DE SIMMONS)			
Milieu utilisé et réactifs	Technique	Résultats	
Milieu citrate de Simmons • Citrate • Ions minéraux (ammonium en particulier) • BBT • Agar • Eau Note : le milieu CIT de la galerie API20E et celui de l'entérotube sont identiques au milieu citrate de Simmons. Seul l'agar est absent de la cupule CIT d'API20E	• Ensemencer en déposant la culture, ou la suspension de la culture solide en eau stérile, sur la pente. NE PAS APPORTER DE SUBSTRATS CARBONÉS (peptone des bouillons en particulier). • Incuber 		Le milieu présente de la culture et est alcalinisé : la bactérie est capable d'utiliser le citrate comme seule source de carbone (elle n'a donc pas besoin de facteurs de croissance). Rarement (et souvent en raison d'un bouchon non dévissé) le milieu reste vert.
			Le milieu ne présente pas de culture et le pH n'a pas changé : la bactérie n'est pas capable d'utiliser le citrate comme seule source de carbone (soit elle a besoin de facteurs de croissance, soit elle ne peut pas métaboliser le citrate).
Cause d'erreur • Bouchon mal dévissé car l'aérobiose est nécessaire pour la respiration et le départ du dioxyde de carbone pour révéler l'alcalinisation (et donc éviter l'acidification qu'il provoquerait)			

Le milieu citrate de Christensen est un milieu liquide, conditionné en faible volume, donc très aéré, contenant du glucose en faible quantité et des facteurs de croissance. Le glucose permet le démarrage de la culture, et son catabolisme entraîne, dans un premier temps, une acidification du milieu. Les facteurs de croissance permettent aux bactéries auxotrophes de cultiver. Si les bactéries possèdent l'équipement enzymatique nécessaire à l'utilisation du citrate comme source de carbone et d'énergie, l'oxydation du citrate se traduit par une réalcalinisation du milieu (virage au rouge du rouge de phénol).

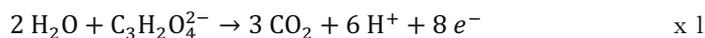
Une bactérie peut donc être citrate de Christensen + et citrate de Simmons – L'inverse n'est pas possible : une souche citrate de Simmons + est obligatoirement citrate de Christensen +.

La deuxième technique est d'usage exceptionnel aujourd'hui, y compris dans les microméthodes qui utilisent le citrate de Simmons en milieu solide ou liquide.

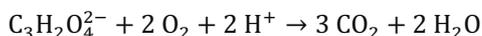
UTILISATION DE L'ION CITRATE (CITRATE DE CHRISTENSEN)			
Milieu utilisé et réactifs	Technique	Résultats	
Milieu citrate de Christensen • Glucose (peu) • Extrait de levure • Citrate • Ions minéraux • Rouge de phénol • Eau	• Ensemencer en déposant la culture, ou la suspension de la culture solide en eau stérile. • Incuber Aspect initial 		Le milieu s'est alcalinisé : la bactérie est capable d'utiliser le citrate comme source de carbone (elle a pu acidifier le milieu au préalable à partir du glucose).
			Le milieu s'est acidifié ou est resté tel quel : la bactérie n'est pas capable d'utiliser le citrate comme source de carbone (elle a pu acidifier le milieu à partir du glucose).

2. Le malonate

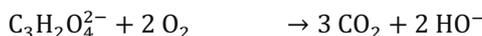
Son utilisation est aérobie. L'oxydation du malonate répond probablement aux équations suivantes :



Soit en équilibrant les électrons : (soit 8 électrons échangés)

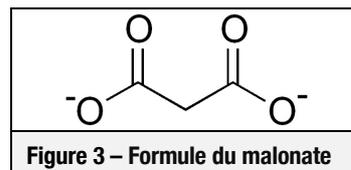


Ou en mettant en évidence les hydroxyles :



L'utilisation du malonate devrait donc se traduire par une **alcalinisation** du milieu si le dioxyde de carbone, acide, est effectivement éliminé du tube par le dévissage du bouchon et ne reste pas dissous dans le milieu. Contrairement au citrate de Simmons, le milieu utilisé contient des facteurs de croissance. Il est conditionné sous un faible volume.

Quant à la voie d'utilisation du malonate par les microorganismes, elle pose problème : en effet, le malonate est connu comme inhibiteur compétitif de la succinate déshydrogénase, enzyme du cycle de Krebs des bactéries aérobies. Pour cultiver dans le milieu, il faut nécessairement un « shunt » de la réaction inhibée ou une enzyme résistante. Le shunt glyoxilique ne permet pas d'expliquer la levée de l'inhibition.



UTILISATION DE L'ION MALONATE		
Milieu utilisé et réactifs	Technique	Résultats
<p>Milieu au malonate</p> <ul style="list-style-type: none"> Malonate de sodium Extrait levure (1 g · L⁻¹) Ions minéraux (ammonium et phosphates en particulier) BBT Eau <p>Le conditionnement est réalisé sous faible volume afin d'assurer une bonne aération du milieu.</p> <p>pH : 6,1 - 6,2</p>	<ul style="list-style-type: none"> Ensemencer en déposant la culture, ou la suspension de la culture solide en eau stérile dans le milieu. Incuber 	<p>Le milieu présente de la culture et est alcalinisé :</p> <p>la bactérie est capable d'utiliser le malonate comme source de carbone et le pouvoir inhibiteur du malonate sur la succinate-déshydrogénase du cycle de Krebs est contourné.</p>
	<p>Aspect initial</p>  <p>vert-jaune</p>	 <p>bleu</p>
<p>Cause d'erreur</p> <ul style="list-style-type: none"> bouchon mal dévissé car l'aérobiose est nécessaire pour la respiration et le départ du dioxyde de carbone pour révéler l'alcalinisation (et donc éviter l'acidification qu'il provoquerait). 		

3. L'acétate ou éthanoate

L'utilisation de l'acétate ou éthanoate (CH₃-COO⁻) comme seule source de carbone est rarement recherchée dans un milieu comparable au citrate de Simmons dans lequel le citrate est remplacé par l'acétate.

Voir aussi : **Auxanogramme**

► Antibiotiques - Antibiogramme : orienteur

Les fiches portant sur les antibiotiques et l'antibiogramme sont rassemblées pour faciliter la lecture. Ce sont :

Généralités

CMI

Comment mesurer la CMI et son rôle.

Choix des antibiotiques en fonction du microorganisme testé

Le spectre d'action des antibiotiques dépend du microorganisme à tester : il faut donc, pour réaliser l'antibiogramme, choisir les antibiotiques à tester.

Méthode des disques

C'est la méthode la plus répandue pour mesurer l'activité des antibiotiques sur les microorganismes.

Méthode à deux concentrations critiques

Méthode qui était utilisée notamment dans les galeries ATB BioMérieux.

Automatisation ou semi-automatisation de l'antibiogramme

Des systèmes permettent d'automatiser en partie la réalisation et la lecture de l'antibiogramme.

Antibiogramme des champignons (antifongigramme)

Les particularités des champignons (mycètes, levures, fungi...) conduisent à utiliser des techniques légèrement différentes pour tester l'action des antibiotiques antifongiques...

β -lactamases

Ce sont les enzymes les plus problématiques vu l'utilisation importante des β -lactamines.

Autres enzymes d'inactivation

Pour les aminosides.

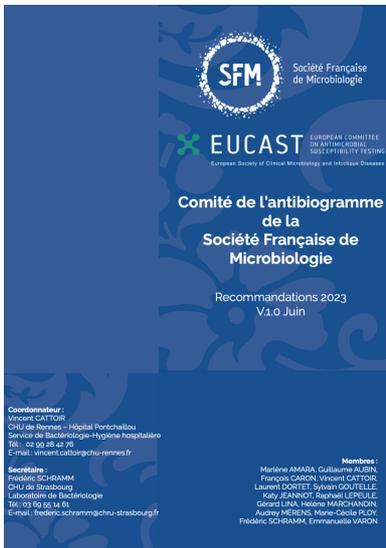
Pouvoir bactériostatique et bactéricide des antibiotiques, de leurs associations et du sérum

► Antibiotiques : généralités

Un document essentiel qu'il faut télécharger sur le site de la Société française de microbiologie (SFM).

<https://www.sfm-microbiologie.org/boutique/>

L'EUCAST (la SFM fait partie de cet organisme européen) est consultable en anglais avec nombre de documents, dont est issu celui de la SFM (en français) : <https://www.eucast.org/>



D'autres sites apportent de nombreuses informations. Parmi ceux-ci, citons :

<http://www.microbes-edu.org/>

<https://www.msmanuals.com/fr/professional/maladies-infectieuses/bact%C3%A9riens-et-m%C3%A9dicaments-antibact%C3%A9riens/revue-g%C3%A9n%C3%A9rale-des-bact%C3%A9riens>

1. Définition proposée

Un antibiotique est :

- une molécule toxique (microbiostatique ou microbicide) pour un groupe cible de microorganismes (bactéries, champignons, virus, parasites eucaryotes...) ; le terme antibiotique est souvent réservé aux antibactériens.
- de mode d'action spécifique ;
- actif à des concentrations faibles, de l'ordre du $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$;
- généralement synthétisé par un microorganisme mais souvent modifié chimiquement ou même synthétisé entièrement par les chimistes.

Les antibiotiques utilisés en pathologie humaine sont en général peu toxiques pour les cellules eucaryotes supérieures. On pourra parler d'antibiotiques antifongiques, antibactériens et, à la limite, antiparasitaires. Pour ces derniers, précisons qu'il existe des antibiotiques antibactériens comme le métronidazole ou les sulfamides qui sont aussi actifs sur certains parasites eucaryotes (toxoplasme, *Plasmodium* du paludisme...).

2. Principaux antibiotiques et leur classification

2.1. Classification

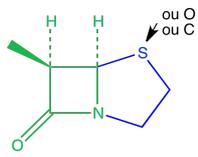
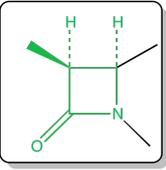
La classification des antibiotiques n'est pas aisée : à l'heure actuelle, les antibiotiques sont regroupés selon leur nature biochimique. Le **tableau 1** présente les grandes classes d'antibiotiques avec les dénominations les plus usuelles. Il inclut les molécules totalement artificielles.

CLASSE D'ANTIBIOTIQUE	EXEMPLES		
Aminosides	Streptomycine, Kanamycine, Gentamicine, Tobramycine, Amikacine		
Antituberculeux	Éthambutol, Isoniazide		
Antifongiques	Amphotéricine B (= fungizone), Nystatine, Fluorocytosine, Kétoconazole		
β-Lactamines	Noyau de type	Classe	Exemples
	Pénicilline	Pénams	Pénicilline G = Benzyl-Pénicilline Pénicilline V (phénoxyméthylpénicilline) : oracilline Pénicilline A (aminopénicilline) : ampicilline, amoxicilline Carboxypénicilline : carnécilline, ticarcilline, témocilline Uréidopénicilline : azlocilline, mezlocilline, pipéracilline Amidinopénicilline : mécillinam Pénicilline M (isoxazoylpénicillines) : oxacilline
		Carbapénèmes	Imipénème, Ertapénème, Méropénème, Doripénème...
		Oxapénèmes	(= clavams) Acide clavulanique
	Céphalosporine	C1G 1 ^{re} génération	Céfadroxil, Céfalexine, Céfazoline, Céfalotine, Céfapirine, Céfaloridine...
		C2G 2 ^e génération	Céfaclor, Céfuroxime, Céfamandole... Céphamycines : Céfoxitine, Céfotétan, Latamoxef
		C3G 3 ^e génération	Céfixime, Céfotaxime, Cefpodoxime, Ceftriaxone, Céfopérazone, Cefsulodine... Nouvelles : Ceftolozane, Ceftazidime...
		C4G 4 ^e génération	Céfépime, Cefpirome
		C5G 5 ^e génération	Ceftaroline, Ceftobiprole
	β-Lactame seul	Monobactames	Aztréonam
Fosfomycine	Fosfomycine		
Glycopeptides	Vancomycine, Téricoplanine		
Imidazolés (5-nitro)	Métronidazole		
Macrolides et apparentés	Macrolides vrais :	Érythromycine, Spiramycine, Josamycine	
	Lincosamides :	Clindamycine, Lincomycine	
	Streptogramines :	Pristinamycine, Virginiamycine	
	Kétolides :	Télithromycine	
Nitrofuranes	Nitrofurantoïne		
Phénicolés	Chloramphénicol		
Polypeptides	Colistine, Bacitracine, Polymyxine		
Quinolones (2^e génération et plus : fluoroquinolones)	1 ^{re} génération (Q1G) :	Acide nalidixique, oxolinique, pipémidique, Rosoxacine	
	2 ^e génération (Q2G) :	Ciprofloxacine, Norfloxacine, Ofloxacine, Péfloxacine	
	3 ^e génération (Q3G) :	Lévofloxacine, Sparfloxacine	
	4 ^e génération (Q4G) :	Moxifloxacine, Gatifloxacine	
Sulfamides et sulfones (diamine-2-4-pyrimidines)	Sulfaméthoxazole Triméthoprim (le Cotrimoxazole est l'association de ces deux molécules)		
Tétracyclines	Tétracycline, Minocycline, Tigécycline		
Oxazolidinones	Linézolide		
Lipopeptides	Daptomycine		
Tableau 1 – Principaux antibiotiques et leur classification			

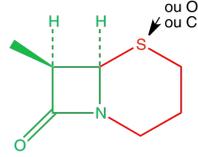
Formules des principaux antibiotiques

β-LACTAMINES

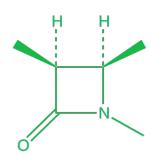
Toutes les β-lactamines possèdent le cycle β-lactame (rarement β-lactone)



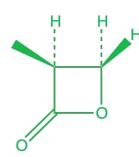
Pénicillines



Céphalosporines

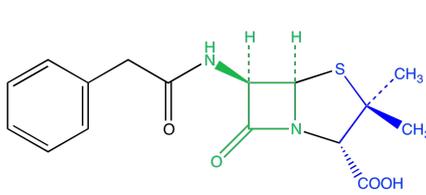
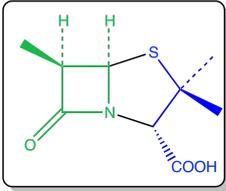


Monobactames

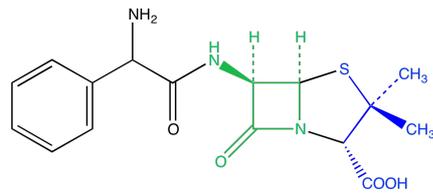


β-lactones

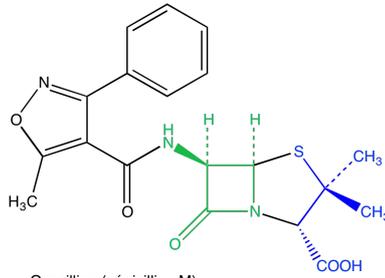
PÉNAMS



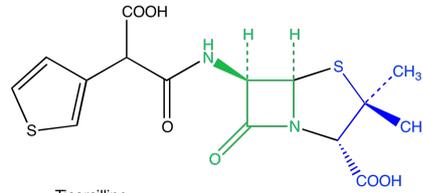
Pénicilline G



Ampicilline (aminopénicillines ou pénicillines A)

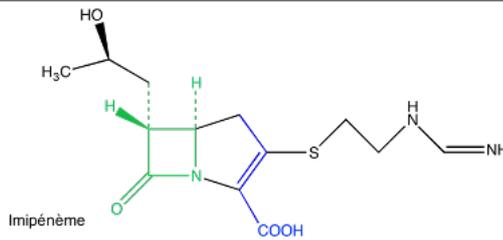
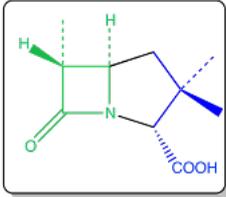


Oxacilline (pénicilline M)



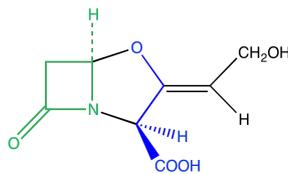
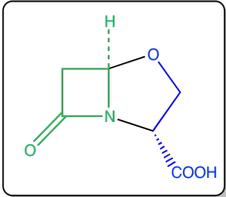
Ticarcilline

CARBAPÉNÈMES



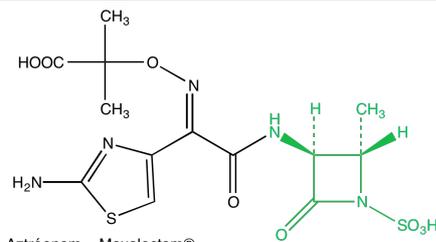
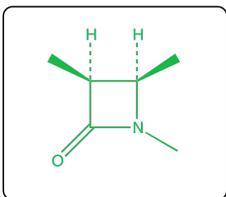
Imipénème

OXAPÉNAMS (CLAVAMES)



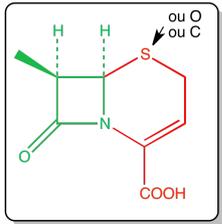
Acide clavulanique

MONOBACTAMS

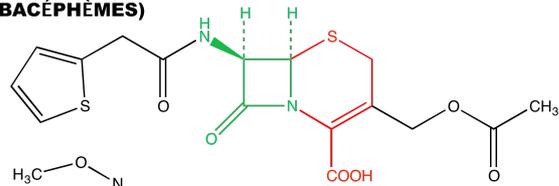


Aztréonam = Moxalactam®

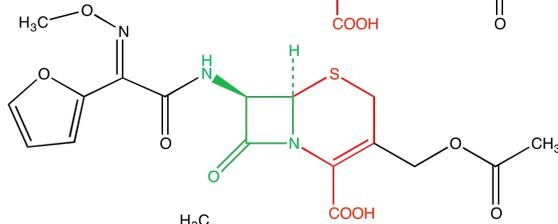
CÉPHALOSPORINES (CÉPHÈMES, OXACÉPHÈMES, CARBACÉPHÈMES)



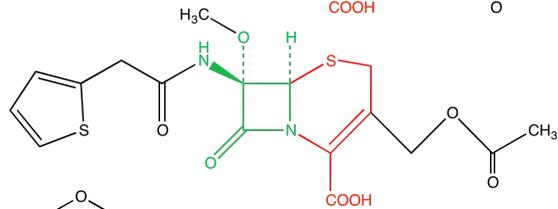
Céphalosporine de 1^{ère} génération.
Ex : céfalotine



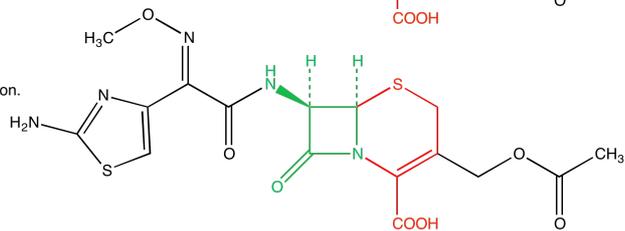
Céphalosporine de 2^{ème} génération.
Ex : Cefuroxime



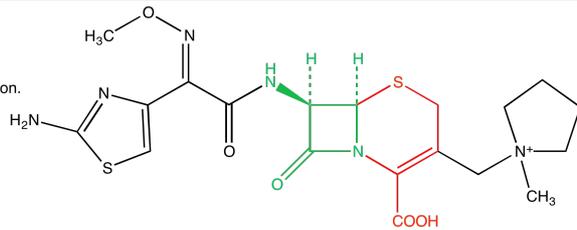
Céphalosporine de 2^{ème} génération
type céphamycine.
Ex : Céfoxitine



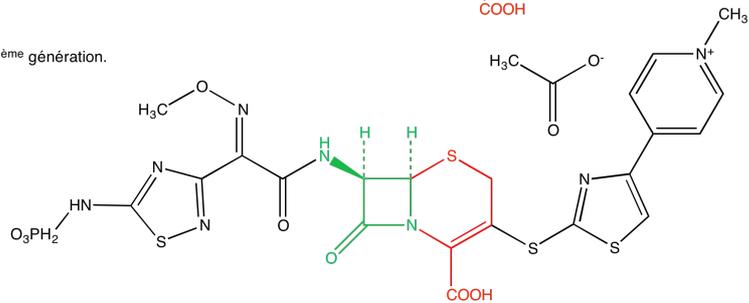
Céphalosporine de 3^{ème} génération.
Ex : Céfotaxime



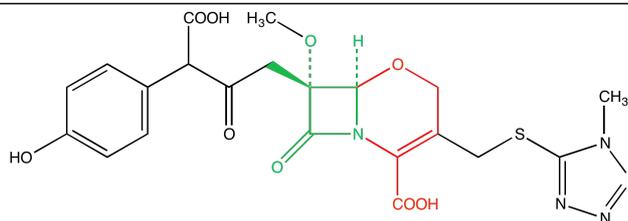
Céphalosporine de 4^{ème} génération.
Ex : Céfépime



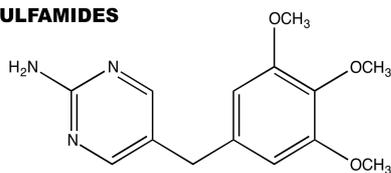
Céphalosporine de 5^{ème} génération.
Ex : Ceftaroline



Oxacéphèmes
Ex: Latamoxef

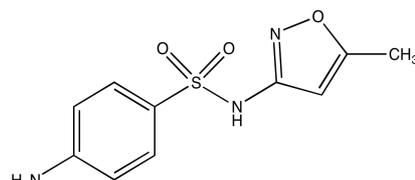


SULFAMIDES



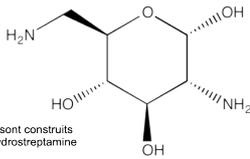
Triméthoprime

L'association des deux
sulfamides =
Cotrimoxazole (Bactrim®)

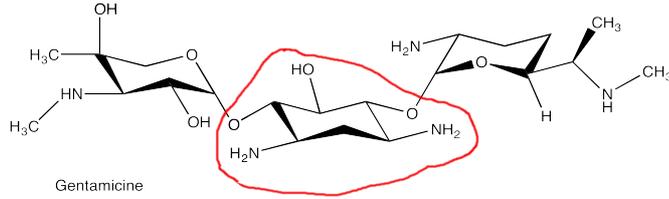


Sulfaméthazole

AMINOSIDES

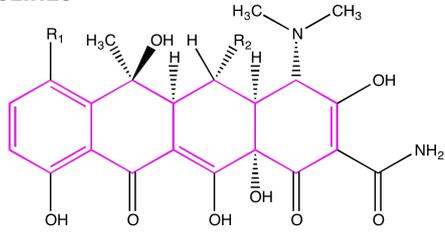


Les aminosides sont construits autour de la déhydrostreptamine



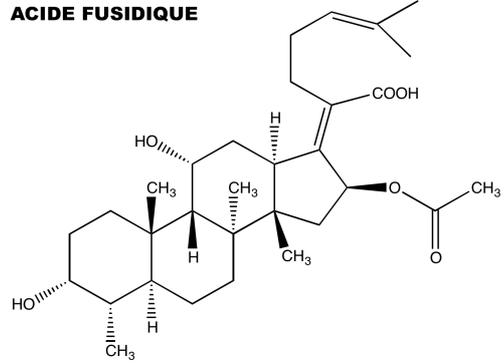
Gentamicine

TÉTRACYCLINES

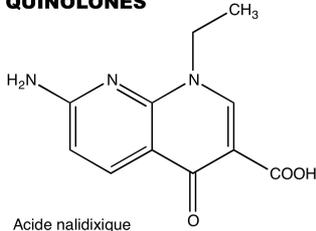


R₁ = H et R₂ = H : tétracycline
 R₁ = Cl et R₂ = H : chlortétracycline (= auréomycine)
 R₁ = H et R₂ = OH : terramycine
 ...

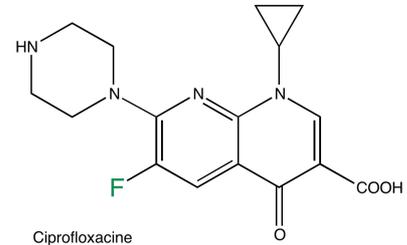
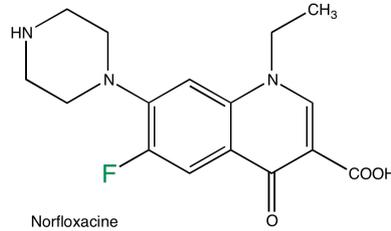
ACIDE FUSIDIQUE



QUINOLONES

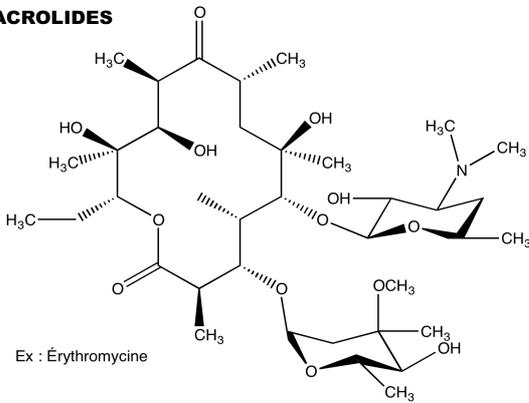


Quinolones de 1^{ère} génération

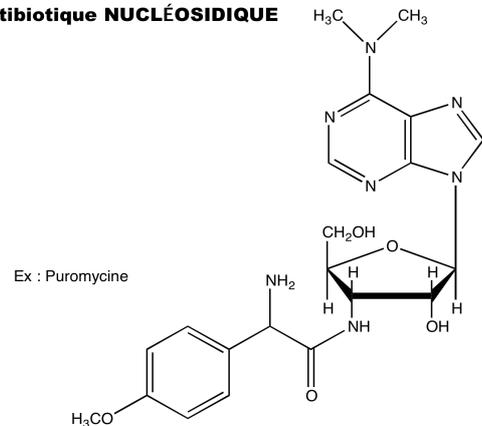


Fluoroquinolones (Quinolones de 2^{ème} génération)

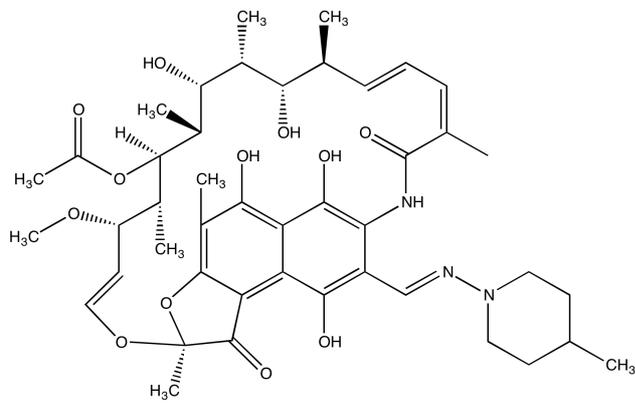
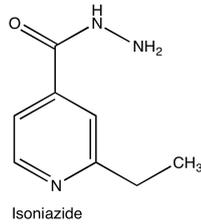
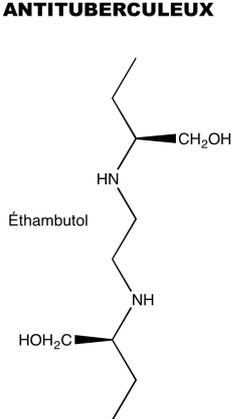
MACROLIDES

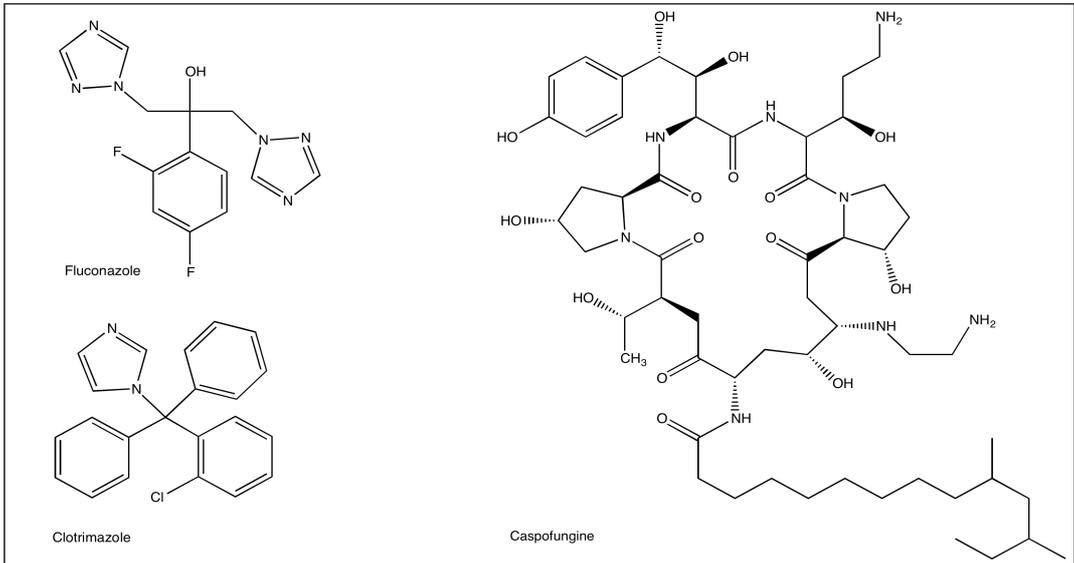
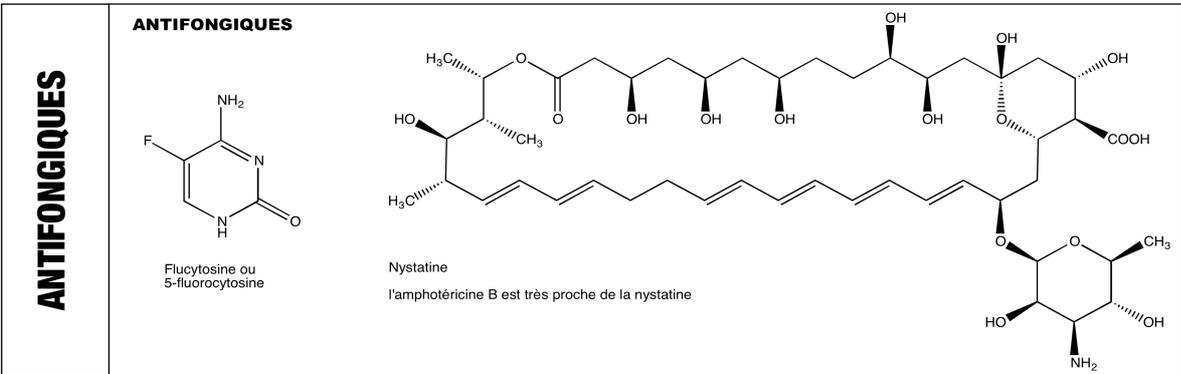
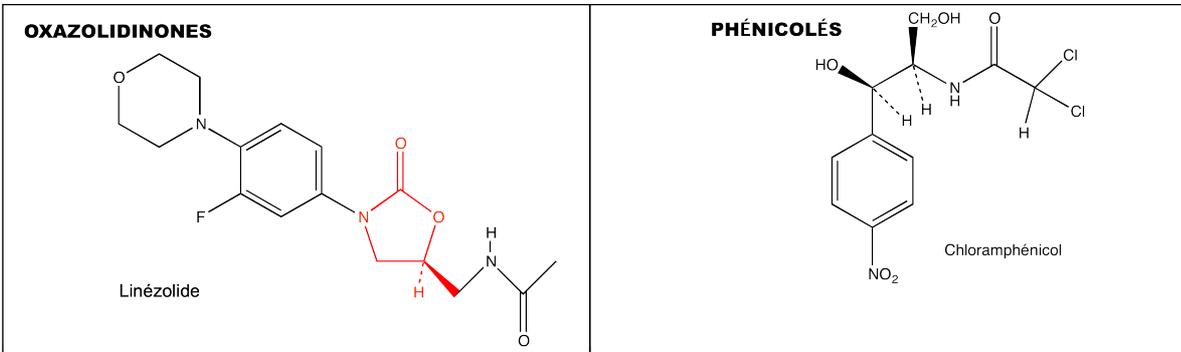
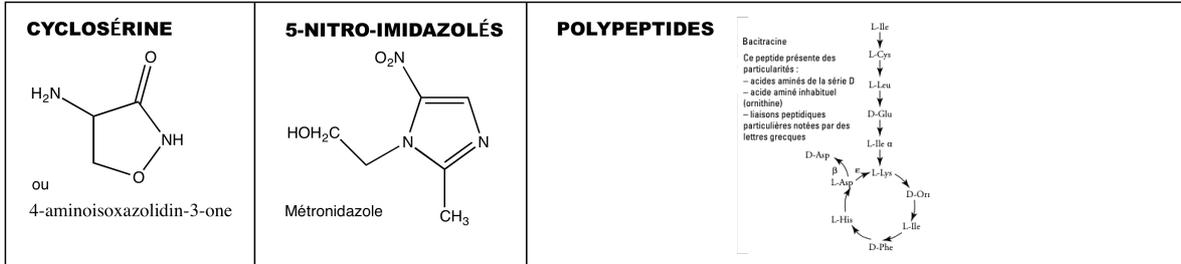
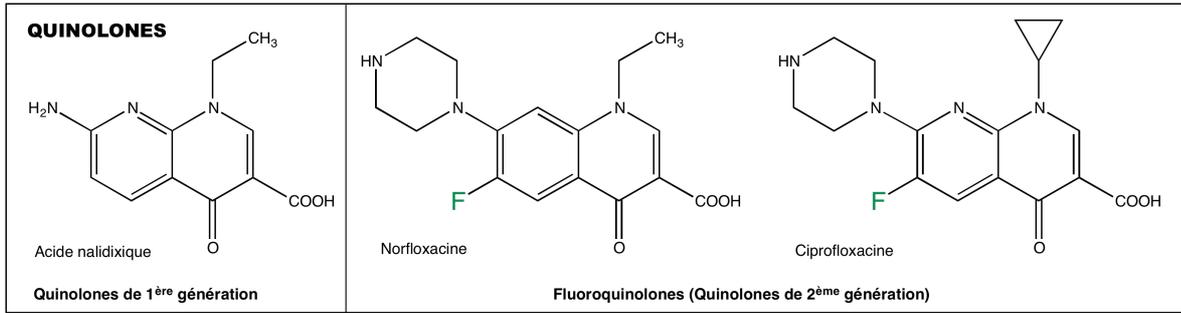


Antibiotique NUCLÉOSIDIQUE



ANTITUBERCULEUX





2.2. Microorganismes producteurs d'antibiotiques

De nombreux êtres vivants peuvent produire des molécules antibiotiques. Toutefois, les bactéries et les champignons en sont les meilleurs producteurs, particulièrement les Actinomycétales, bactéries filamenteuses du sol, avec les genres *Streptomyces*, *Nocardia*.

Voici les microorganismes permettant la synthèse biologique d'un certain nombre d'antibiotiques ou tout au moins de la partie essentielle de la molécule.

Type d'antibiotique	Nom	Microorganisme et date de découverte	Nature (*)	Date	Type de micro-organisme	Production directe	Production suivie de modifications chimiques
Acide aminé	Cyclosérine	<i>Streptomyces orchidaceus</i>	B				
Aminoglycoside	Gentamycine	<i>Micromonospora purpurea</i>	B	1963	Actinomycétales (1) Champignons Eubactériales Total	30	12
Aminoglycoside	Kanamycine	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	B	1956		3	39
Aminoglycoside	Néomycine	<i>Streptomyces fradiae</i>	B	1949		5	0
Aminoglycoside	Paromomycine	<i>Streptomyces rimosus ou krestomuceticus</i>	B	1950		38	51
Aminoglycoside	Streptomycine	<i>Streptomyces griseus</i>	B	1947	(*) B = bactérie, Ch = champignon (1) bactéries des genres <i>Streptomyces</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Micromonospora</i>		
Aminoglycoside	Tobramycine	<i>Streptomyces tenebrarius</i>	B	1967			
Bétalactamine	Pénicilline G	<i>Penicillium chrysogenum ou notatum</i>	Ch	1928			
Bétalactamine	Acide clavulanique	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	B	1974			
Céphalosporine	Céphalosporine C	<i>Cephalosporium acremonium</i>	Ch	1948			
Divers	Cycloheximide	<i>Streptomyces griseus</i>	B				
Divers	Mitomycine C	<i>Streptomyces caespitosus</i>	B				
Divers	Novobiocine	<i>Streptomyces niveus</i>	B				
Divers	Rifamycine	<i>Nocardia mediterranei</i>	B	1957			
Glycopeptide	Vancomycine	<i>Amycolatopsis orientalis</i>	B	1953			
Macrolide	Érythromycine	<i>Streptomyces erythraea</i>	B	1952			
Macrolide	Josamycine	<i>Streptomyces narbonensis</i>	B	1967			
Macrolide	Oléandomycine	<i>Streptomyces antibioticus</i>	B	1954			
Macrolide	Spiramycine	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	B	1954			
Peptide	Bacitracine	<i>Bacillus subtilis</i> (1945)	B	1945			
Peptide	Colistine	<i>Bacillus polymyxa</i> var. <i>colistinus</i>	B	1959			
Peptide	Gramicidine A	<i>Bacillus brevis</i> (1939)	B	1939			
Peptide	Polymyxine B	<i>Bacillus polymyxa</i> (1947)	B	1947			
Peptide	Tyrothricine	<i>Bacillus brevis</i> (1939)	B	1939			
Peptide	Virginiamycine	<i>Streptomyces virginiae</i>	B				
Phénicolés	Chloramphénicol	<i>Streptomyces venezuelae</i>	B	1947			
Polyène	Amphotéricine B	<i>Streptomyces nodosus</i>	B	1955			
Spirolactone	Griséofulvine	<i>Penicillium griseofulvum</i>	Ch				
Stéroïde	Acide fusidique	<i>Fusidium coelcineum ou coccineum</i>	Ch				
Tétracyclines	Chlorotétracycline	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	B	1947			
Divers	Muciorine B	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	B				

3. Le mode d'action des antibiotiques

3.1. Les différentes cibles sur la cellule procaryote

Elles sont présentées dans le schéma de la **figure 1** :

Synthèse de la paroi

Certains antibiotiques interfèrent avec ou se fixent sur une enzyme de la voie de biosynthèse du peptidoglycane et bloquent son activité. De plus, d'autres mécanismes peuvent être mis en jeu.

- β -lactamines (pénicillines céphalosporines et dérivés).
- Cyclosérine, fosfomycine, glycopeptides (vancomycine, teicoplanine, bacitracine).

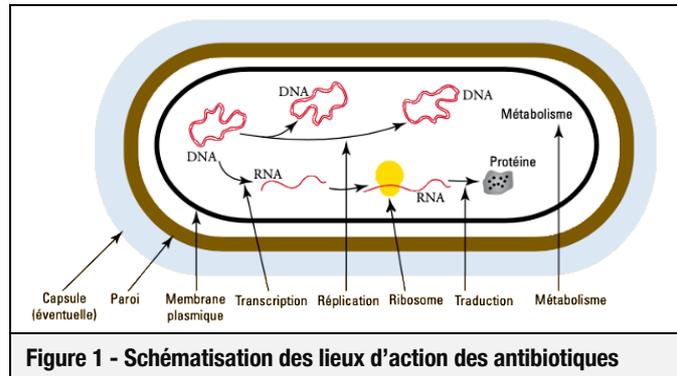


Figure 1 - Schématisation des lieux d'action des antibiotiques

Réplication (synthèse de DNA)

- Mitomycine c, quinolones : bloquent DNA gyrase, entraînant une destruction de DNA.
- 5-nitro-imidazolés et nitrofuranes : provoquent une fragmentation de DNA.
- Novobiocine : empêche la fixation de l'ATP sur DNA gyrase (ou topo-isomérase, enzyme qui assure le passage de la forme super-enroulée de DNA à une forme enroulée).
- 5-Fluorocytosine : antifongique inhibant la synthèse de la thymine entre autres.

Transcription (synthèse des RNA)

- Rifampicine : se fixe sur la sous-unité β de RNA polymérase DNA dépendante.
- 5-Fluorocytosine : antifongique incorporé à la place de la cytosine et altérant ainsi le message.

Traduction (synthèse des protéines)

- Chloramphénicol : se fixe sur la sous-unité 50 S des ribosomes et empêche la fixation du complexe tRNA-AA.
- Streptomycine : se fixe sur RNA 16 S de la sous-unité 30 S du ribosome et empêche l'initiation.
- Autres aminosides : la fixation sur RNA 16 S de la sous-unité 30 S du ribosome empêche l'élongation.
- Tétracyclines : se fixent sur la sous-unité 50 S du ribosome et empêchent la fixation du complexe tRNA-AA.
- Oxazolidinones : se fixent sur la sous-unité 50 S et bloqueraient l'initiation de la synthèse des protéines.
- Érythromycine : se fixe sur la sous-unité 50 S du ribosome et bloque la translocation.
- Josamycine et spiramycine : empêchent la fixation du tRNA-AA sur le ribosome.
- Lincosamides et streptogramines : inactivent la peptidyl-transférase du ribosome.
- Acide fusidique : bloque la translocation.

Membrane

- Tyrocidine et gramicidines : se fixent sur les phospholipides membranaires et désorganisent la membrane.
- Polymyxines et colistine : se fixent sur les phospholipides et les polysides membranaires et désorganisent la membrane.
- Polyènes (amphotéricine B) : antifongiques se fixant sur les stérols membranaires provoquant la formation de pores.
- Imidazole : antifongique bloquant la synthèse des stérols membranaires.
- Lipopeptide (daptomycine) : provoquerait une dépolarisation de la membrane plasmique perturbant la synthèse des protéines.

Antimétabolite

- Sulfamides et 2,4-diaminopyrimidines : inhibent le métabolisme d'un coenzyme, l'acide folique.
- Isoniazide, éthionamide... : inhibent la synthèse des acides mycoliques de la paroi des mycobactéries.
- Éthambutol : inhibe le transfert vers la paroi, à travers la membrane, des acides mycoliques des mycobactéries.
- Mupirocine : inhibe l'isoleucine-tRNA-synthétase.

3.2. Effets des antibiotiques

L'antibiotique peut avoir un effet plutôt bactéricide (il tue) ou plutôt bactériostatique (il arrête la multiplication), cet effet dépendant de sa concentration. L'effet de l'antibiotique est parfois limité aux bactéries en croissance, pour les β -lactamines en particulier.

BACTÉRICIDES	BACTÉRIOSTATIQUES
β -Lactamines (sur bactéries en croissance)	Phénicolés
Vancomycine	Tétracyclines
Polypeptides	Macrolides et Lincosamides
Aminosides	Acide fusidique
Streptogramines	Sulfamides
Quinolones	Rifampicine (plus ou moins bactéricide)
5-Nitro-imidazolés	Synergistines
Polymyxines	Fosfomycine

Tableau 4 – Les antibiotiques bactéricides et les antibiotiques bactériostatiques

4. Résistance des microorganismes aux antibiotiques

La phase d'industrialisation de la production des antibiotiques a pu faire croire, dans les années 1950 à 1960, à l'éradication des maladies infectieuses bactériennes. Malheureusement, très vite sont survenus des échecs thérapeutiques dus à des souches « devenues » résistantes alors qu'elles sont habituellement sensibles. Plus tard, sont apparues les polyrésistances, plus graves encore car elles limitent considérablement les possibilités de traitement et peuvent être transmises à d'autres bactéries sensibles.

La résistance d'une bactérie à un antibiotique peut être **naturelle** ou **acquise**. Elle est naturelle quand elle existe pour les souches dites sauvages (par exemple, *Escherichia coli* est naturellement résistant à la pénicilline G. Par ailleurs, une souche sensible peut acquérir une résistance à un ou plusieurs antibiotiques, soit par mutation, soit par divers transferts génétiques. Les résistances acquises sont généralement observées parmi les souches isolées de milieux dans lesquels une pression de sélection s'impose (l'hôpital par exemple).

4.1. Mode de résistance

Perméabilité limitée à l'antibiotique

Elle est la cause de la résistance des bacilles gram- à la pénicilline G et du bas niveau de résistance des *Streptococcus* aux aminosides (résistance naturelle). Pour les bacilles gram négatif, ce sont des porines de la membrane externe qui contrôlent le passage. Chez *Pseudomonas*, la grande résistance est liée aux difficultés de pénétration des antibiotiques par les porines existantes. Pour d'autres bactéries, certains mutants perdent les protéines facilitant l'entrée de l'antibiotique et deviennent alors résistants (résistance acquise).

Absence de « récepteur » à l'antibiotique, ou diminution de son affinité ou modification de la cible

On explique ainsi la résistance à la streptomycine des bactéries mutantes dont une des protéines du ribosome fixant l'antibiotique a perdu son affinité pour celui-ci. Il en est de même pour des enzymes mutées comme la RNA polymérase, ne fixant plus ou beaucoup moins bien l'antibiotique. C'est aussi le cas de la résistance des *Staphylococcus* à la méticilline ou l'oxacilline par modification de la protéine liant les pénicillines (PIP pour protéine liant la pénicilline ou PbP pour *Penicillin Binding Protein* en anglais), enzymes de la voie de synthèse du peptidoglycane.

Hyperproduction de la cible

L'hyperproduction de la cible peut permettre de séquestrer l'antibiotique et d'abaisser suffisamment sa concentration pour le rendre inactif (« effet éponge »).

Production d'enzymes inactivant les antibiotiques

De nombreuses bactéries développent des enzymes capables de modifier les antibiotiques et de les rendre inactifs :

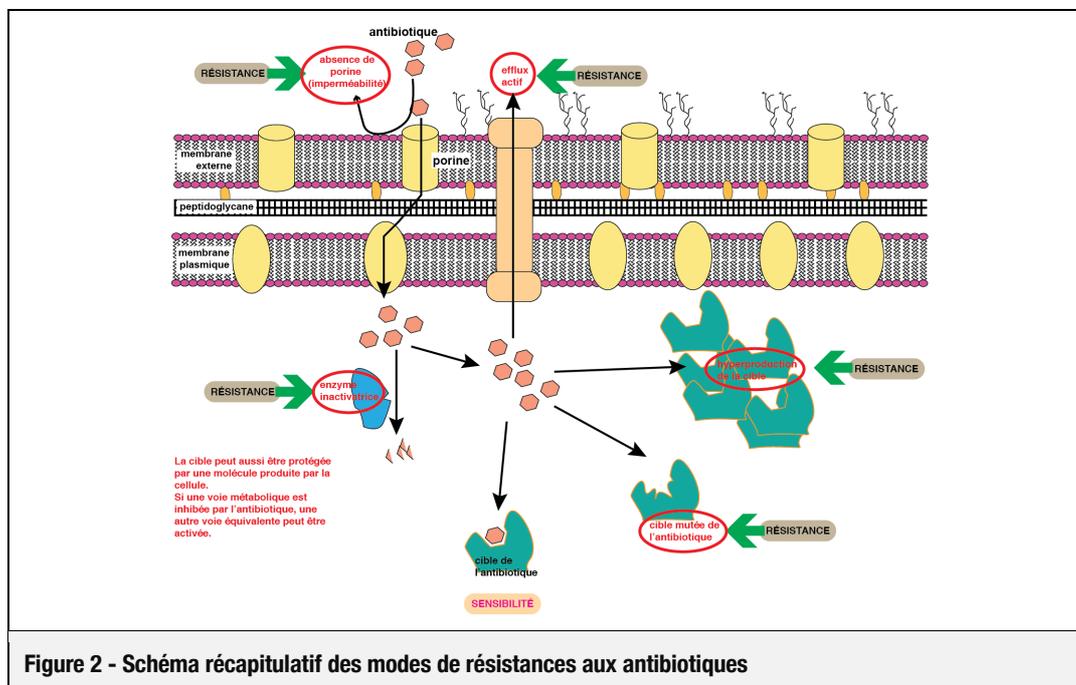
- hydrolyse des β -lactamines par les β -lactamases (pénicillinases et céphalosporinases) ;
- acétylation du chloramphénicol, des tétracyclines, des aminosides...

Utilisation d'une voie métabolique détournée (création d'une fonction de remplacement)

L'antibiotique inhibant une voie métabolique, la bactérie crée une fonction de remplacement en utilisant une autre voie métabolique.

Expulsion active de l'antibiotique

Une pompe membranaire (membrane externe ou membrane plasmique) expulse l'antibiotique vers l'extérieur.



4.2. Acquisition de résistance

Il existe deux possibilités d'acquisition de la résistance :

- Mutation ponctuelle de l'ADN. La résistance acquise concerne alors un seul antibiotique.
- Acquisition d'un plasmide auprès d'une souche déjà résistante. Ce mécanisme permet d'expliquer qu'une résistance à plusieurs antibiotiques puisse être acquise simultanément. En effet, la probabilité d'acquisition d'une multirésistance par mutation est très faible. Ce transfert a été montré au Japon lors d'une infection à *Shigella dysenteriae*. Après le début de l'antibiothérapie, la souche pathogène est apparue très rapidement résistante à trois antibiotiques. Les chercheurs ont pu isoler de l'intestin du même sujet une souche *E. coli* elle-même résistante à ces trois antibiotiques et ont montré qu'il y avait eu transfert d'ADN plasmidique par conjugaison *E. coli* à *Shigella dysenteriae*.

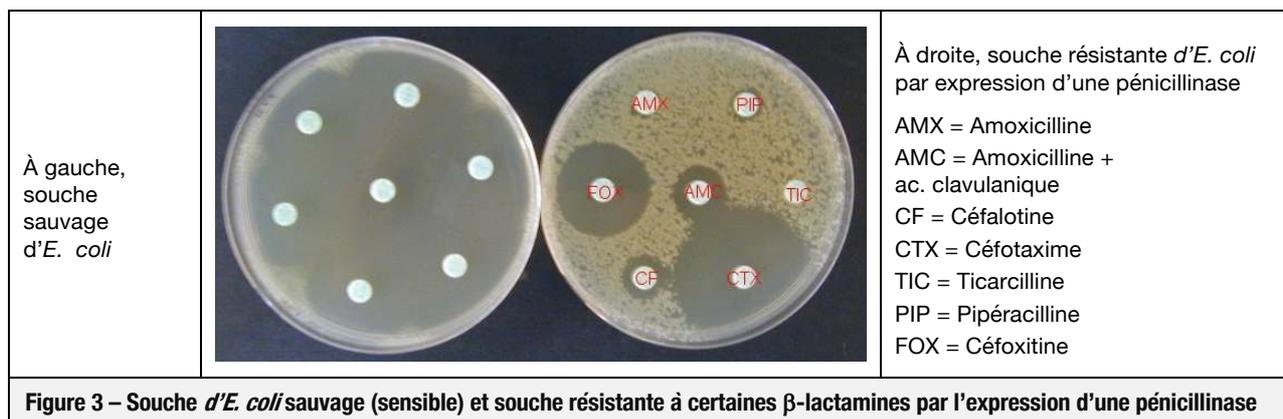
4.3. Problèmes posés par les bactéries résistantes

Si elles sont présentes chez le malade ou dans son environnement, elles seront très rapidement sélectionnées par l'antibiothérapie. Cela signifie que dans la population bactérienne initiale il existe deux types de bactéries, des sensibles et des résistantes, ces dernières étant généralement minoritaires. L'échec thérapeutique peut être dû :

- à la sélection des bactéries pathogènes résistantes ;
- à la sélection, dans la flore commensale, d'une souche capable de donner à la bactérie pathogène un plasmide porteur des résistances.

Aucun remède miracle ne permet d'éviter l'émergence du phénomène. Il est enrayé par des « mesures simples » :

- arrêt ou modification de l'antibiothérapie quand la résistance apparaît ;
- pas de prescription d'antibiotiques majeurs « en ville » (hors de l'hôpital) et limitation des prescriptions ;
- amélioration de l'hygiène hospitalière pour éviter la transmission de souches vectrices de plasmides de résistance ou des souches pathogènes ;
- recherche permanente de nouveaux antibiotiques ou d'inhibiteurs des enzymes d'inactivation ;
- non-utilisation d'antibiotiques dans les élevages en prévention de maladies et traitement des seuls animaux malades.



5. Éléments de thérapeutique et conséquences au laboratoire

5.1. Le choix de l'antibiotique

Ne pas oublier que le but de la technique utilisée c'est de soigner des patients malades. L'antibiogramme doit renseigner le médecin prescripteur au mieux en lui évitant de commettre des erreurs.

5.1.1. Nature de l'agent infectieux

Le choix de l'antibiotique est réalisé de manière très empirique dans la plupart des infections banales : le médecin prescrit, en fonction de l'examen clinique, la molécule dont l'efficacité lui paraît la plus probable (antibiothérapie dite probabiliste). Ce n'est que dans les infections graves ou récidivantes qu'il fait appel au laboratoire qui réalisera l'analyse. Celle-ci implique toujours l'isolement du microorganisme, l'identification et l'antibiogramme (mesure de l'action de différents antibiotiques sur le microorganisme isolé), conduits conjointement. Le laboratoire intervient aussi dans le contrôle de l'efficacité et la surveillance du traitement. Le coût d'une telle opération ne permet pas de l'appliquer à toute infection banale, pour laquelle elle n'est généralement pas justifiée.

Les **tableaux 5 et 6** illustrent le choix des substances les plus actives sur des bactéries pour lesquelles l'étude au laboratoire de l'action des antibiotiques n'est pas systématique (l'antibiotique de remplacement permet en particulier le traitement des patients allergiques en première intention).

Bactéries pour lesquelles l'antibiogramme n'est pas possible

(L'antibiogramme n'est pas réalisable car la culture de la bactérie est très délicate ou impossible actuellement.)

BACTÉRIE	ANTIBIOTIQUE USUEL	ANTIBIOTIQUE DE REMPLACEMENT
<i>Treponema pallidum</i>	Pénicilline G	Tétracycline, Érythromycine
<i>Leptospira</i>	Pénicilline G	Tétracycline
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Érythromycine, Spiramycine	Tétracycline
<i>Chlamydia</i>	Tétracycline	
<i>Rickettsia</i>	Tétracycline	

Tableau 5 – Bactéries pour lesquelles l'antibiogramme est impossible

Bactéries pour lesquelles l'antibiogramme n'est pas indispensable, car sont généralement sensibles

BACTÉRIE	ANTIBIOTIQUE USUEL	ANTIBIOTIQUE DE REMPLACEMENT
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Ampicilline	Érythromycine
<i>Neisseria meningitidis</i>	Pénicilline G, Ampicilline	Chloramphénicol
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Pénicilline G	Érythromycine
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ampicilline	Triméthoprim- sulfaméthoxazole
<i>Clostridium perfringens</i>	Pénicilline G	Clindamycine
<i>Brucella</i>	Tétracycline	Rifampicine, Chloramphénicol
<i>Pasteurella multocida</i>	Pénicilline G	
<i>Campylobacter jejuni</i>	Érythromycine	
<i>Legionella pneumophila</i>	Érythromycine	Rifampicine

Tableau 6 – Bactéries pour lesquelles l'antibiogramme n'est pas indispensable

Bactéries à longue durée de culture

Dans le cas des bacilles tuberculeux de culture longue, l'antibiothérapie est commencée avant le résultat de l'antibiogramme par des techniques particulières.

5.1.2. Propriétés pharmacocinétiques des antibiotiques : facteurs influençant leur concentration dans les liquides biologiques

La diffusion tissulaire

Elle est très variable selon les molécules et doit être prise en compte. Il existe en effet des barrières parfois difficiles à franchir entre les compartiments liquidiens de l'organisme, notamment la barrière hémato-encéphalique au niveau des méninges.

Excrétion

L'élimination de l'antibiotique se fait par deux voies : la bile et l'urine. Certaines molécules sont éliminées très rapidement dans les urines : la concentration nécessaire est atteinte uniquement dans le rein et ces molécules ne seront utilisées que pour les infections urinaires.

La voie d'entrée de l'antibiotique

Elle n'est pas indifférente : la voie orale n'est envisageable que si la molécule est à la fois résistante aux sucs digestifs et absorbée.

BACTÉRIE	ANTIBIOTIQUE USUEL
Acide nalidixique	85 %
Ampicilline	35 %
Chloramphénicol	85 %
Macrolides	50 %
Nitrofurantoïne	90 %
Pénicillines V	50 %
Rifampicine	95 %
Tétracyclines	70 %

Tableau 7 – Absorption digestive de quelques antibiotiques
(extrait de *Antibiothérapie*, Revue des Sciences médicales n° 211/1974) □

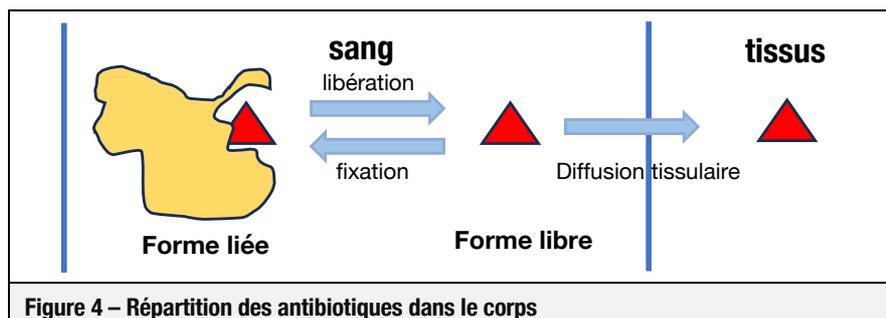
Une concentration sérique élevée est obtenue simplement par intraveineuse ou perfusion. Dans certaines maladies, des injections directes au lieu de l'infection pourront être réalisées : méningites, épanchements...

La liaison avec les protéines sériques

Les antibiotiques, comme tous les médicaments, se distribuent dans le sang entre deux formes :

- la forme libre : le médicament conserve son activité ; c'est la forme libre qui quitte le plasma pour diffuser dans les tissus ;
- la forme liée aux protéines : le médicament est alors inactif car il ne peut quitter les capillaires et diffuser dans les tissus.

La capacité de fixation des protéines est limitée : lorsque tous les sites sont occupés, tout nouvel apport d'antibiotique se traduit par une augmentation de la forme libre. Les deux formes, libre et liée, sont en équilibre, la forme liée étant réversible.



Première conséquence : la forme liée joue un rôle de stockage. En effet, selon la loi d'action de masse, lorsqu'un produit est consommé, un équilibre chimique est déplacé dans le sens de sa production. La forme libre disparaissant du plasma pour diffuser dans les tissus, l'équilibre est déplacé dans le sens 1, c'est-à-dire dans le sens de la libération de la forme libre à partir de la forme liée. L'inactivation de l'antibiotique sous sa forme liée n'est donc que transitoire. La fixation aux protéines module l'action de l'antibiotique en diminuant son activité initiale mais en prolongeant sa durée d'action.

Deuxième conséquence : toute substance ayant une affinité supérieure pour les protéines plasmatiques à celle de l'antibiotique qui y est fixé le remplacera sur les sites de fixation et entraînera sa libération sous forme libre. Ce phénomène explique certaines contre-indications.

Métabolisme

L'antibiotique peut être modifié par des réactions biochimiques chez le patient. Dans certains cas, il sera activé par le métabolisme de l'utilisateur ; dans d'autres cas, le catabolisme du médicament conduit à son inactivation. Ainsi, les 5-nitro-imidazolés doivent être réduits et l'isoniazide doit être acétylé dans l'organisme pour donner leur forme active. Les capacités d'acétylation sont différentes selon les individus : il existe des acétylateurs lents et des rapides...

5.2. La surveillance médicale d'une antibiothérapie

Elle peut être nécessaire en raison d'effets secondaires indésirables. Comme tous les médicaments, les antibiotiques sont susceptibles de provoquer des effets indésirables en perturbant des fonctions de l'organisme, éventuellement vitales. on parle d'effet iatrogène.

Certains antibiotiques possèdent des effets toxiques

- Aminosides : ototoxicité (atteinte de l'oreille conduisant à une surdité).
- Tétracyclines : altèrent la minéralisation de l'os et des dents.
- Polymyxine B : provoque une tubulonéphrite aiguë et ne peut donc être utilisée par voie générale.
- Chloramphénicol : perturbe l'hématopoïèse, provoquant, rarement, une aplasie.
- Néomycine et gentamicine : provoquent une nécrose du tube contourné proximal du rein.
- Antituberculeux : hépatite fréquente.
- Allergies à de nombreux antibiotiques (β -lactamines...).

De nombreux antibiotiques déséquilibrent la flore endogène (microbiote)

Certaines antibiothérapies conduisent à un déséquilibre sévère du microbiote, pouvant être dangereux, sinon mortel. Dans l'intestin, *Clostridioïdes (ex Clostridium) difficile* est inhibé par la flore associée. Certains antibiotiques perturbent cette flore et lèvent l'inhibition, ce qui entraîne le développement de *Clostridioïdes difficile* et l'apparition de colites pseudo-membraneuses.

Les antibiotiques sélectionnent des souches résistantes dangereuses pour tous les malades immunodéprimés d'un établissement de soins.

5.3. Les paramètres de l'étude de l'action des antibiotiques

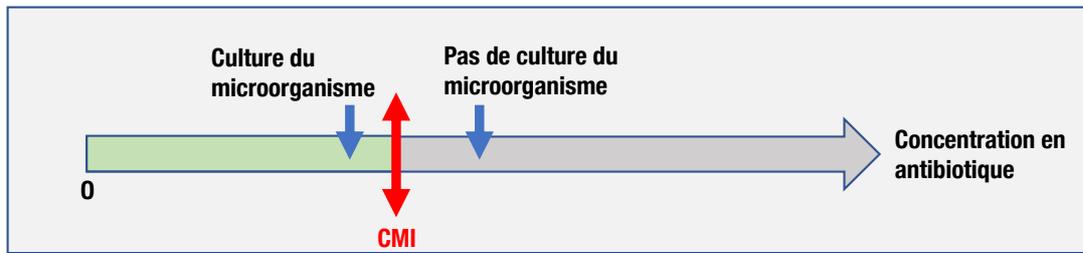
L'étude de l'action des antibiotiques au laboratoire nécessite la définition de plusieurs paramètres.

CMI et CMB

La CMI est la concentration minimale inhibitrice et la CMB est la concentration minimale bactéricide.

D'un point de vue opérationnel, on considère que :

- la CMI est la concentration de l'antibiotique la plus faible pour laquelle la croissance bactérienne n'est plus visible (pas de croissance de la population ; 100 % de survivants) ;
- la CMB est la concentration de l'antibiotique la plus faible permettant d'atteindre un taux de survie égal à 0,01 %, soit 1 survivant pour 10 000 bactéries ensemencées.
- le paramètre le plus utilisé est la CMI car sa mesure est relativement simple que l'on peut représenter ainsi :



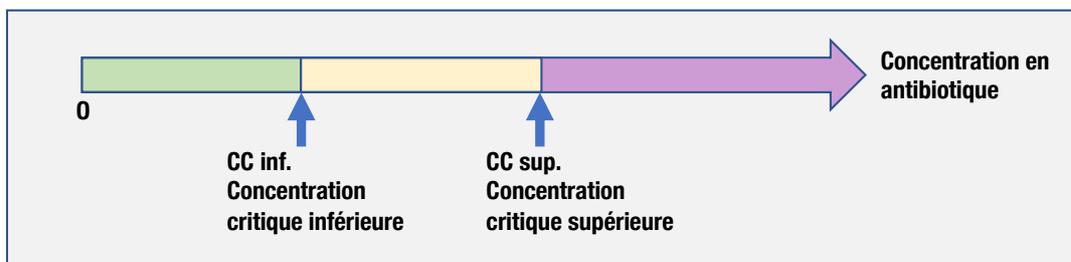
Sensibilité et résistance

La mesure de la CMI permet de déterminer si une souche est sensible ou résistante à l'antibiotique testé.

Pour chaque antibiotique, on a pu mesurer les concentrations sériques obtenues chez l'homme, dans le cadre d'une posologie normale. Pour que l'antibiotique soit efficace, il faut que la concentration obtenue chez le malade soit supérieure à la CMI. Les différentes études statistiques réalisées ont permis de montrer que, pour une même posologie, la concentration sérique varie en fonction de l'état physiologique, de l'âge du malade, de la voie d'administration du médicament...

Pour chaque antibiotique, deux valeurs sont, en général, retenues comme références :

- la **concentration critique supérieure** représentant la concentration maximale moyenne habituellement obtenue chez le malade ;
- la **concentration critique inférieure** représentant la concentration minimale moyenne habituellement obtenue chez le malade.



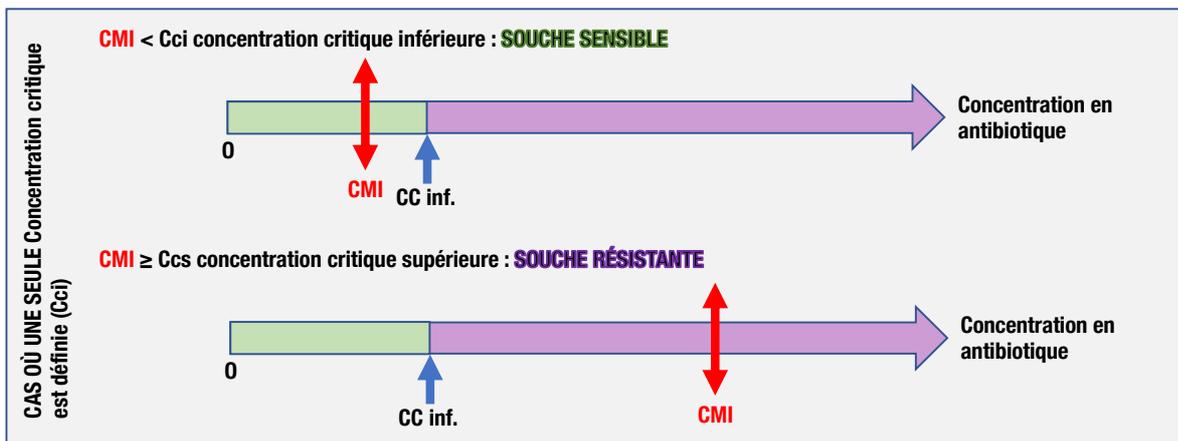
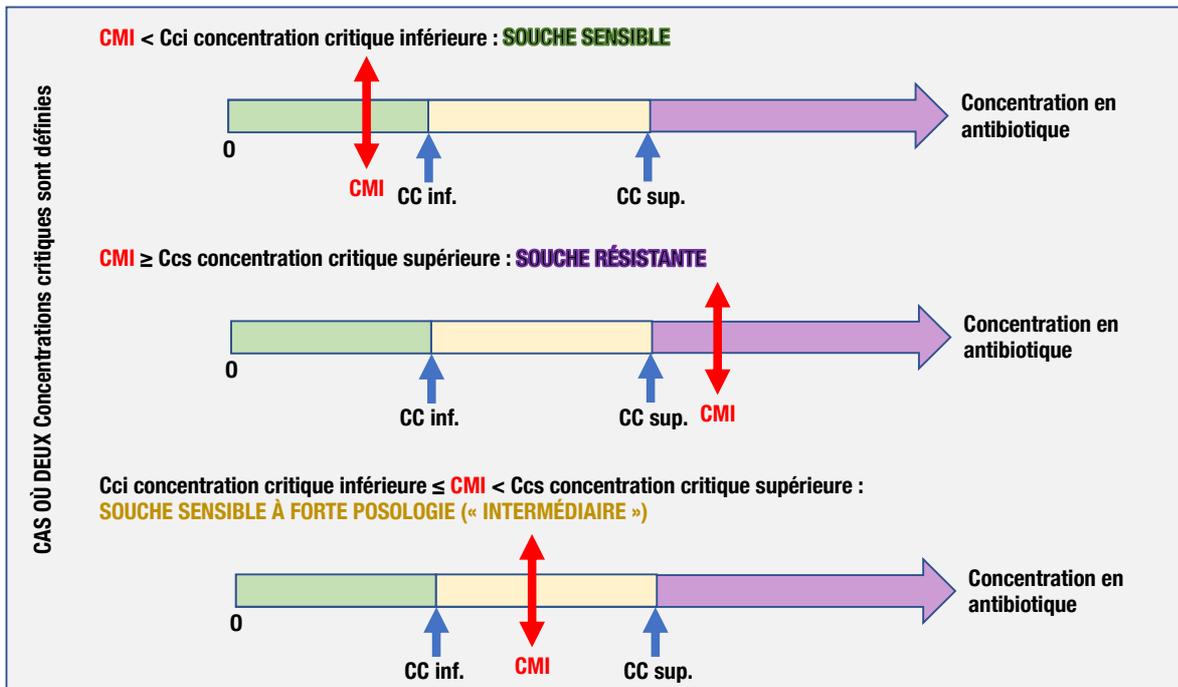
Le but de l'antibiothérapie est de neutraliser ou de détruire chez le malade la bactérie responsable de l'infection. Il faut pour cela que la concentration de l'antibiotique chez le malade soit en permanence supérieure à la CMI.

Les rapports de la bactérie responsable de l'infection avec l'antibiotique peuvent donc être ainsi définis :

- La souche est dite « **résistante** » si la CMI est supérieure à la concentration critique supérieure, c'est-à-dire « qu'elle n'est pas atteinte par un traitement réalisé à l'aide de cet antibiotique » (traitement usuel ou à forte dose) ;
- La souche est dite « **sensible** » si la CMI est inférieure à la concentration critique inférieure, c'est-à-dire « qu'elle est atteinte par un traitement usuel réalisé à l'aide de cet antibiotique » (posologie habituelle) ; La mention « **sensible à posologie standard (SPS)** » est préférée aujourd'hui.
- La souche est dite « **intermédiaire** » si la CMI est comprise entre la concentration critique supérieure et la concentration critique inférieure, c'est-à-dire « qu'elle n'est atteinte par un traitement réalisé à l'aide de cet antibiotique que si la posologie habituelle est augmentée ». La mention « **sensible à forte posologie (SFP)** » est préférée aujourd'hui car correspondant mieux à la réalité de la thérapeutique.

Une autre vision est apportée par les définitions de la SFM :

- « **Sensible à posologie standard** » : la probabilité de succès thérapeutique est élevée dans le cas d'un traitement basé sur la posologie standard de l'antibiotique.
- « **Sensible à forte posologie** » : la probabilité de succès thérapeutique est élevée dès lors que l'antibiotique est utilisé à forte posologie ou si l'antibiotique est fortement concentré au site de l'infection. L'EUCAST formule en « Sensible à forte exposition ».
- **Souches « résistantes »** : la probabilité d'échec thérapeutique est élevée, même lorsque l'antibiotique est utilisé à forte posologie et quel que soit le mode d'administration utilisé.



D'autres paramètres sont utilisés :

- la CI 50 ou concentration inhibitrice 50, concentration d'antibiotique réduisant la population de 50 %. Ce paramètre est peu utilisé ;
- la CMI 50 ou 90, concentration minimale inhibant la croissance de 50 ou 90 % des souches d'une espèce donnée. Il s'agit donc d'un paramètre épidémiologique ;
- la CMB, concentration minimale bactéricide, concentration d'antibiotique tuant 99,99 % de la population initiale ou laissant 0,01 % de survivants. Elle permet de déterminer par le rapport CMI/CMB une éventuelle tolérance de la souche (rapport supérieur à 32) mais reste de précision discutable avec parfois des effets paradoxaux, un antibiotique pouvant devenir bactériostatique à concentration élevée.

5.4. Spectres

La connaissance de l'activité des antibiotiques, aux concentrations thérapeutiques, permet de définir, pour chaque antibiotique, son spectre d'action, ensemble des taxons habituellement sensibles. Ce spectre peut être **étroit** ou **large** selon le nombre de taxons atteints par l'antibiotique. L'ampicilline atteint gram+ et - : cet antibiotique est à large spectre.

La spectinomycine n'atteint que le gonocoque et possède donc un spectre étroit.

6. Fabrication des antibiotiques

La fabrication des antibiotiques n'est pas différente de celle de toute molécule. Les facteurs économiques sont essentiels et déterminent le mode de synthèse. À l'heure actuelle, la complexité des molécules antibiotiques est telle que les méthodes purement chimiques ne sont pas économiquement rentables : la voie biologique reste la voie principale de synthèse de la plupart des antibiotiques. Dans le cas des β -lactamines et des céphalosporines, la partie délicate de la molécule, le noyau β -lactamine, reste fabriquée par des microorganismes.

La découverte de nouveaux antibiotiques s'appuie sur la synthèse chimique de nouvelles molécules, ou de molécules existantes modifiées, et la recherche de nouvelles souches microbiennes synthétisant des antibiotiques. Les nouvelles molécules actives font l'objet de nombreux tests pharmacologiques de non-toxicité et d'efficacité. Seul un petit nombre d'entre elles peuvent être utilisées en thérapeutique. Le mode de synthèse ultérieur de l'antibiotique est déterminé ensuite par des critères purement économiques.

6.1. Sélection des microorganismes producteurs

Les *Streptomyces*, bactéries filamenteuses du sol, sont de bons producteurs d'antibiotiques à côté de certains champignons (*Penicillium*). Ce sont des échantillons de sols du monde entier qui sont la base de la recherche. Après mise en culture, les colonies obtenues sont sélectionnées : les souches non productrices ou productrices de molécules déjà connues sont éliminées. Les souches sélectionnées, soit environ une sur 10 000, font l'objet d'études de production, de pharmacologie, de prix de revient...

Le criblage des souches naturelles est très souvent suivi de l'amélioration génétique des souches sélectionnées, par mutation-sélection ou par manipulation génétique. Ainsi, pour la production de pénicilline, la concentration de l'antibiotique dans le milieu de culture est passée de 1 à 20 mg \cdot dm⁻³ à 40 g \cdot dm⁻³ grâce à l'amélioration du *Penicillium*. Les souches productrices finalement retenues doivent répondre à un certain nombre de critères :

- grande stabilité génétique nécessaire à la production industrielle ;
- capacité de production élevée avec des substrats les moins coûteux possible et des conditions d'extraction simples.

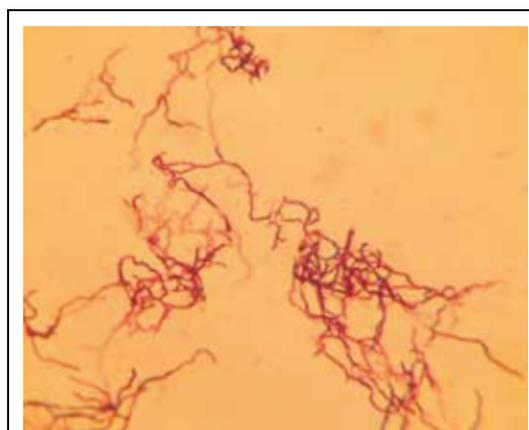


Figure 5 – Aspect microscopique au Gram d'une souche de *Streptomyces*

6.2. Production de l'antibiotique

Elle est identique à toutes les productions industrielles utilisant des microorganismes.

Des niveaux successifs (changements d'échelle) sont utilisés, depuis la production au laboratoire destinée aux études préalables à la production dans des bioréacteurs de 500 m³. Il faut en effet, à chaque étape, un inoculum permettant l'ensemencement de bioréacteurs de volume supérieur, qui est de 1 à 15 % du volume de production.

La culture est très généralement aérobie et l'antibiotique, métabolite secondaire d'utilité peu évidente pour le microorganisme, est produit en fin de croissance. Pour orienter la synthèse, des précurseurs peuvent être ajoutés au milieu de culture. C'est le cas du phényl-acétate pour la production de l'ampicilline : le champignon producteur de pénicilline G va alors produire l'ampicilline.

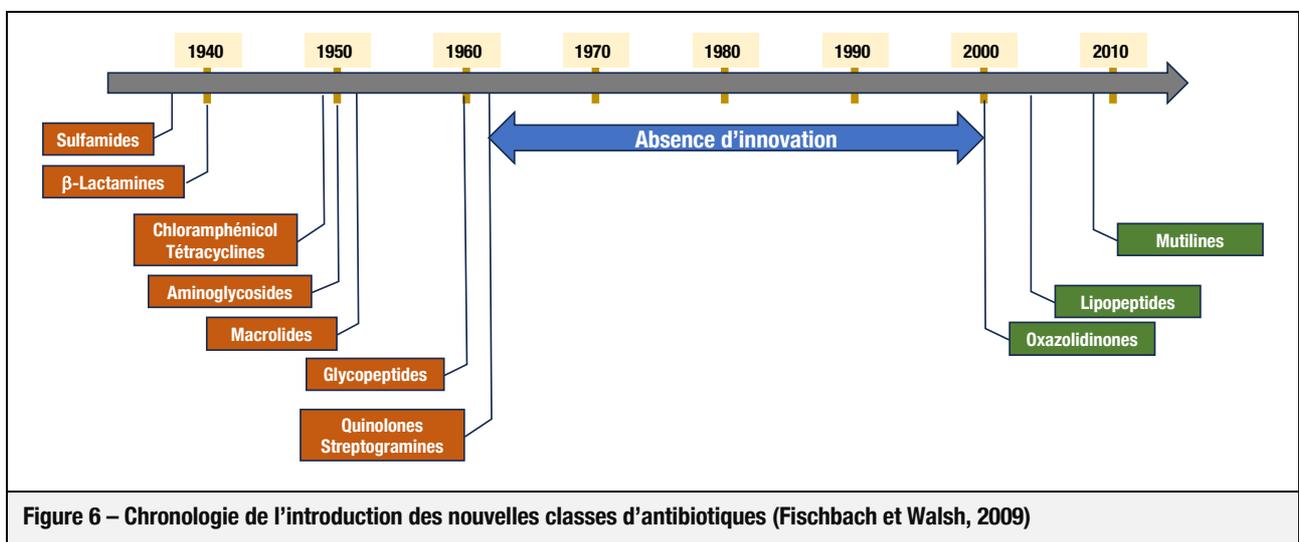
6.3. Extraction de l'antibiotique

Le jus de fermentation, obtenu par décantation, filtration ou centrifugation, subit, selon l'antibiotique à extraire, l'action de solvants et de chromatographies de divers types. En voici quelques exemples.

Phénoxyéthyl pénicilline (oracilline ou pénicilline V)	Virginiamycine	Acide clavulanique
<ul style="list-style-type: none"> Le jus de fermentation est acidifié jusqu'à pH 2 Extraction par l'éthanoate de butyle à 0 °C Lavage à l'eau pour éliminer les molécules les plus hydrophiles Précipitation en sel de potassium Cristallisation dans l'éthanol 	<ul style="list-style-type: none"> Le jus de fermentation est acidifié par de l'acide sulfurique Extraction par la 3-méthyl-2-pentanone Concentration par distillation Précipitation par le n-hexane. Centrifugation. Séchage 	<ul style="list-style-type: none"> Le jus de fermentation filtré est acidifié jusqu'à pH 6,2 Fixation sur résines échangeuses d'anions Élution par une solution de NaCl à 1 mol · dm⁻³ Chromatographie sur résine anionique en gradient de NaCl

UN PETIT POINT D'HISTOIRE

L'introduction des antibiotiques en thérapeutique est très récente... vers 1940 pour les premiers pas de la Pénicilline G et un peu avant pour les sulfamides, c'est à dire moins d'un siècle... La **figure 6** montre clairement le peu de progrès fait depuis les années 1960 dans la découverte et la production d'antibiotiques.



► Antibiotiques : CMI (concentration minimale inhibitrice)

1. Bactériostase et bactéricidie – Définition de la CMI

Les courbes de croissance d'une population bactérienne en présence d'un antibiotique à différentes concentrations font apparaître des modifications importantes par rapport à la courbe témoin.

- **Pour de faibles concentrations** la concentration bactérienne est, à un instant donné, inférieure à la concentration de la courbe témoin. La croissance est donc ralentie (le taux de croissance horaire est réduit) : l'antibiotique a un effet dit « **bactériostatique** »
- **Pour de fortes concentrations** la concentration bactérienne diminue. Le nombre de bactéries tuées est supérieur au nombre de bactéries issues d'une multiplication. La croissance est donc « négative » (le taux de croissance horaire est négatif) : l'antibiotique a un effet dit « **bactéricide** ».
- **Concentration telle que la concentration bactérienne ne varie pas sensiblement par rapport à celle de départ.** Le taux de croissance horaire est nul. Cette concentration, difficile à cerner par cette méthode, est dite « **concentration minimale inhibitrice (CMI)** », concentration la plus faible inhibant 100 % de la croissance bactérienne (équivalent à $3 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ dans le cas de la **figure 1**).

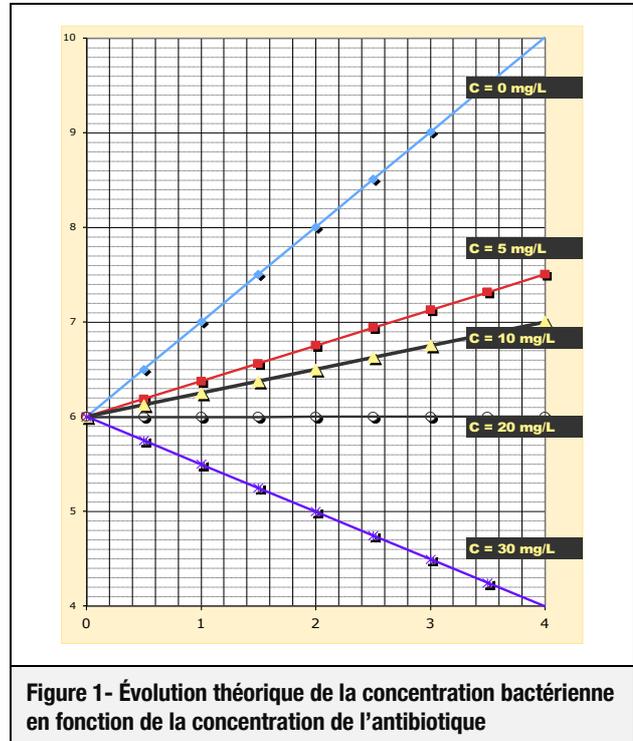


Figure 1 - Évolution théorique de la concentration bactérienne en fonction de la concentration de l'antibiotique

2. Détermination de la CMI par la méthode des dilutions

2.1. En milieu liquide

Le diluant utilisé est un bouillon de Mueller-Hinton à concentrations ioniques ajustées. Il est complété, pour les bactéries de culture difficile, de 5 % de sang de cheval lysé et de 20 mg/L de NAD (noté β -NAD les bases étant liées en β sur les résidus ribose).

Le sang de cheval lysé est préparé par dilution dans un volume identique d'eau désionisée stérile, puis congelé à -20°C une nuit, décongelé, et cela de 3 à 7 fois jusqu'à ce que les cellules soient lysées.

La solution mère de l'antibiotique est préparée à partir d'une poudre commerciale stérile de titre connu et diluée dans un volume adéquat d'eau distillée stérile (ou de diluant adapté) pour obtenir la concentration souhaitée ($1\,024$ ou $2\,048 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$).

Des dilutions sériées d'une solution mère stérile d'antibiotique sont réalisées suivant une progression géométrique de raison $1/2$.

L'inoculum est préparé à partir d'une culture de 24 heures en milieu liquide. Elle est diluée en bouillon de Mueller-Hinton jusqu'à l'obtention d'une opacité de Mac Farland 0,5 (ce qui correspond à 10^8 unités formant colonies (UFC) par cm^3) puis cette suspension est à nouveau diluée au $1/1000$ pour donner l'inoculum.

La méthode peut être appliquée en tubes classiques comme dans la **figure 2** mais on lui préférera une méthode en microplaque pour des raisons pratiques et économiques.

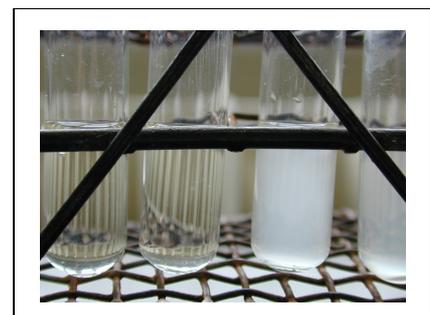


Figure 2 – CMI en milieu liquide avec concentration de l'antibiotique diminuant de gauche à droite
Cliché Pascal Fraperie

Protocole

Des plaques à microtitration stériles peuvent être utilisées. En général la stérilité « machine » suffit. Une plaque à 96 trous permet, par exemple, la détermination de la CMI de 8 antibiotiques vis-à-vis d'une même souche.

Le protocole peut être (nombre de cupules utilisées et volumes modifiables) :

- Dans les cupules des colonnes 1 à 12, introduire, à l'aide d'une pipette à piston équipée d'un embout stérile, 50 μL de bouillon de Mueller-Hinton ;
- Dans la cupule 1, introduire 50 μL de la solution d'antibiotique à la concentration de $256 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$;
- Reporter de cupule en cupule, de 1 à 11, à l'aide d'une pipette à piston équipée d'un cône stérile, 50 μL du mélange qui sera réalisé par aspiration refoulement. La dilution étant au 1/2, le changement du cône n'est pas indispensable.
- 50 μL sont rejetés de la cupule 11.

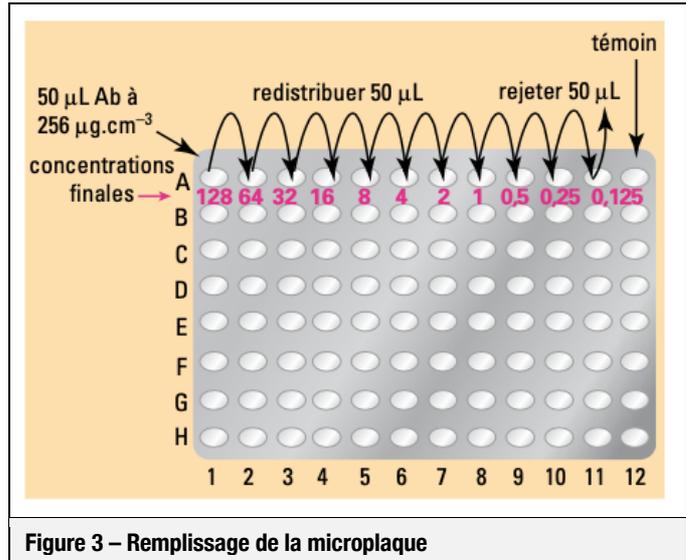


Figure 3 – Remplissage de la microplaque

Les concentrations finales ainsi obtenues vont de $128 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ (cupule 1) à $0,125 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ (cupule 11).

Le volume de chaque cupule doit être de 50 μL ; Vérifier visuellement si les volumes sont bien égaux.

- Ajouter dans chaque cupule de 1 à 12, 50 μL d'inoculum (suspension des bactéries testées en milieu de Mueller-Hinton).

ATTENTION

Les concentrations finales réelles de l'antibiotique doivent tenir compte de la dilution réalisée, au 1/2 ici.

Les concentrations finales sont donc de $64 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ (cupule 1) à $0,063 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ (cupule 11).

- Incuber 18 à 24 heures à la température adéquate ;
- Lire l'opacité, le dépôt au fond du tube ou encore le virage d'un indicateur de pH si le milieu a été additionné de glucose et d'un indicateur de pH.
- Vérifier la cohérence du résultat (l'absence de culture dans un tube implique l'absence pour les concentrations supérieures, sauf cas particulier)

Résultat

La microplaque de la **figure 4** montre un test réalisé sur une souche d'*E. coli* en présence de trois antibiotiques.

La lecture de l'opacité montre clairement la culture bactérienne pour toutes les concentrations testées d'ampicilline et de chloramphénicol.

Pour la céfotaxime, la culture est absente pour les tubes 64, 32, et 16 et présente à 8 et au-delà permettant de conclure à une CMI entre 8 et 16 (pouvant être égale à 8). La souche est donc, en utilisant les concentrations critiques, résistante aux deux premiers antibiotiques et sensible à la céfotaxime.

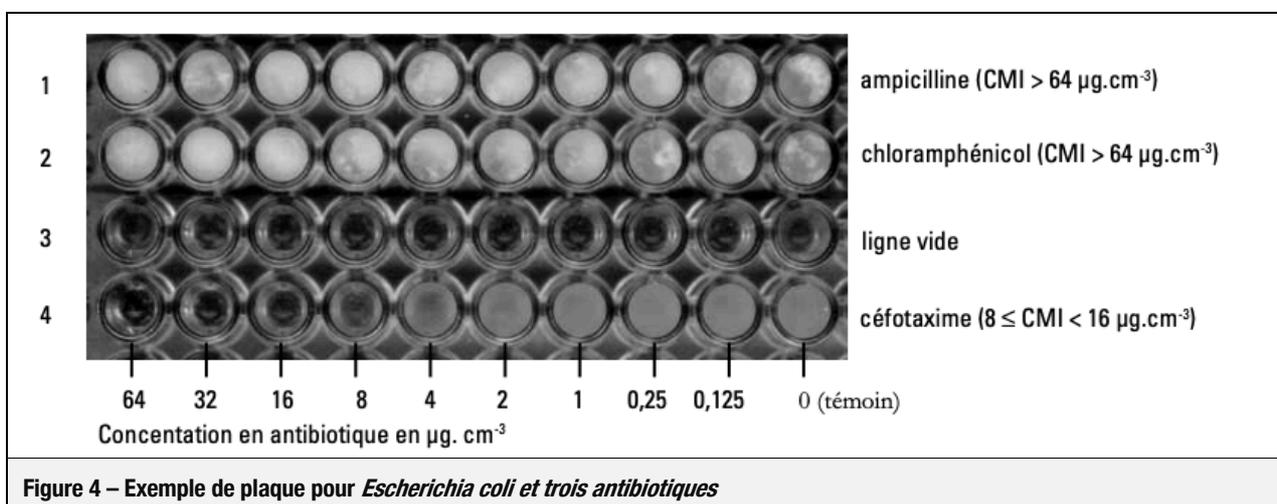


Figure 4 – Exemple de plaque pour *Escherichia coli* et trois antibiotiques

REMARQUE

La technique peut être adaptée à une lecture rapide. Après 3 h 30 d'incubation, ajouter 50 µL d'une solution de TTC (triphényltétrazolium) et placer à l'étuve pour une nouvelle incubation de 30 minutes. La croissance des bactéries se traduit par une réduction du TTC en formozan rouge. En l'absence de culture, la cupule reste incolore. Les volumes indiqués sont évidemment modifiables (on peut passer à 100 µL). Certains fabricants proposent des plaques prêtes à l'emploi contenant des dilutions sous forme déshydratée.

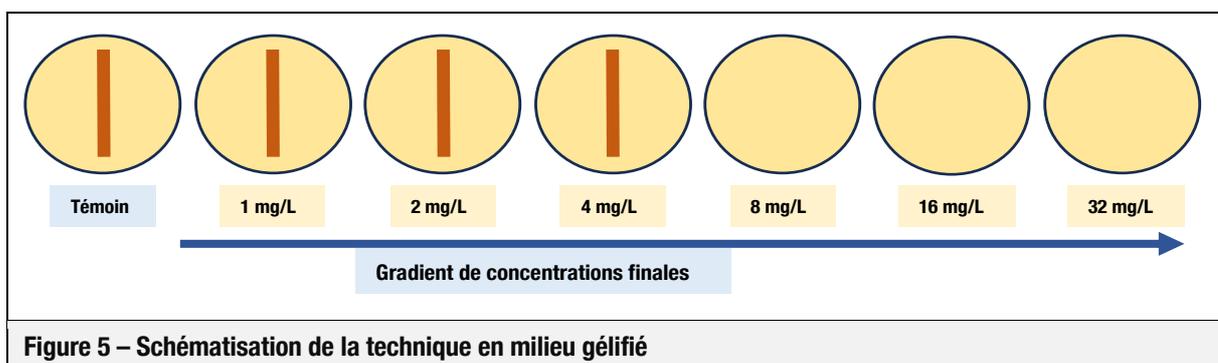
2.2. En milieu gélifié

2.2.1. Méthode en gradient de concentration inclus en gélose

Les dilutions d'antibiotique sont incorporées dans des milieux de Mueller-Hinton gélifiés qui sont ensuite coulés en boîte de Petri.

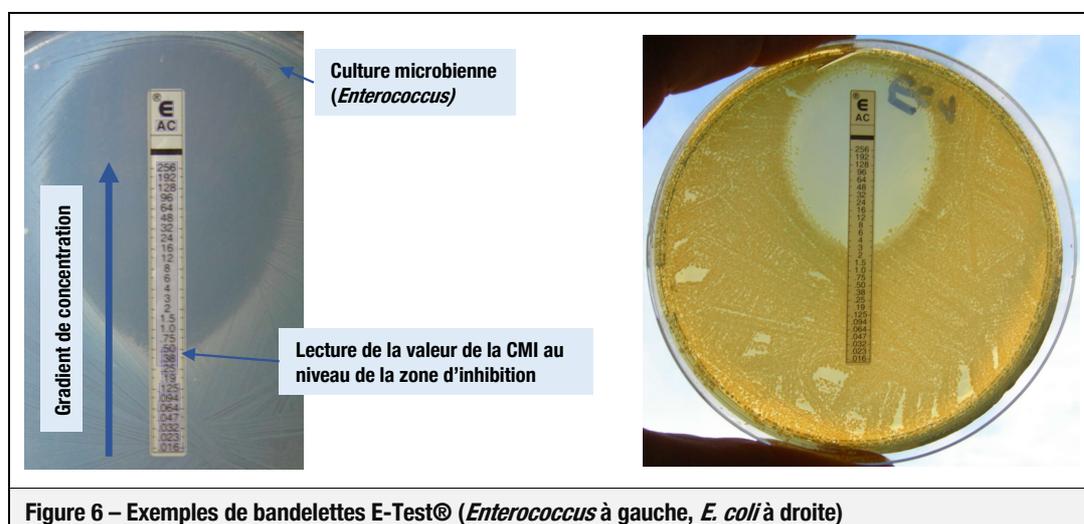
Chaque boîte contient une concentration antibiotique différente.

- Préparer des dilutions d'antibiotique de 1 280 à 2,5 µg · cm⁻³.
- Incorporer un volume de chaque dilution à 9 volumes de gélose de Mueller Hinton.
- Homogénéiser, couler, sécher les boîtes. Les concentrations finales vont de 128 à 0,25 µg · cm⁻³.
- Ensemencer en strie à l'aide d'une anse calibrée de 10 µL en partant d'une suspension à environ 10⁵ microorganismes par mL. Une strie dépose donc 10³ microorganismes (UFC). Chaque strie représentant environ 20 mm, une dizaine de souches peuvent être testées à condition de bien repérer les inoculums.
- Après incubation, la dilution la plus grande inhibant la croissance (aucune colonie sur la strie) d'une souche est notée.



2.2.2. Méthode en gradient de concentration par bandelette type ATB®

La société BioMérieux (qui a acquis BMD SA), commercialise un système ingénieux de détermination de la CMI en milieu solide, repris par d'autres sociétés aujourd'hui. Une bandelette est imprégnée de quantités croissantes d'antibiotique. Elle est placée sur une gélose pour antibiogramme ensemencée classiquement ; l'antibiotique diffuse en formant un gradient important : la zone d'inhibition a la forme d'une ellipse et la lecture est alors directe sur la bandelette là où celle-ci rencontre la zone d'inhibition.



► Antibiogramme : choix des antibiotiques en fonction du microorganisme testé (2023)

Le laboratoire se doit de choisir les bons antibiotiques à tester pour fournir au praticien des résultats exploitables. Le choix se fonde sur des recommandations, en premier lieu celle de l'EUCAST (*The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) qui regroupe les organismes européens comme la Société française de microbiologie (SFM) dont le comité de l'antibiogramme édite chaque année les recommandations pour l'antibiogramme de l'EUCAST (données pharmacologiques, techniques...) depuis 2014.

Pour choisir, il faut tenir compte :

- **de la nature du microorganisme (taxon)**, de façon à utiliser les antibiotiques habituellement actifs. On notera par exemple que les nitroimidazolés sont des antibiotiques actifs seulement chez les anaérobies : en effet, ces bactéries sont les seules à pouvoir réduire la fonction nitro en fonction amine en raison de la production de dihydrogène par une enzyme particulière (pyruvate ferredoxine oxydoréductase). De même, la pénicilline G est inactive sur la plupart des gram⁻.
- **du lieu de l'infection** car l'antibiotique doit y parvenir pour être efficace. Par exemple, pour certains antibiotiques est précisée une utilisation dans les ITU (infections du tractus urinaire).

Des antibiotiques peuvent être testés pour guider l'identification (voir la fiche **Inhibiteurs utilisés pour l'identification**).

Le milieu utilisé doit être choisi en fonction du taxon (Mueller-Hinton, Mueller-Hinton au sang frais 5 % + NAD...).

Une recherche de bêta-lactamase avant l'antibiogramme, par une technique chromogénique par exemple, doit être réalisée pour les microorganismes pour lesquels l'enzyme est constitutive (*Haemophilus*, *Neisseria*). Après réalisation de l'antibiogramme, cette recherche sera réalisée en prélevant les bactéries autour d'un disque de bêta-lactamine.

Le choix « officiel » des antibiotiques est rassemblé dans les tableaux ci-dessous en fonction des taxons identifiés (ou soupçonnés). Ces données proviennent de la SFM. Elles évoluent et une mise à jour est généralement nécessaire à parti du document de la SFM. Une mise à jour sera trouvée sur le site <http://www.techmicrobio.eu>.

Pour chaque taxon figurent deux listes, la liste standard et la liste complémentaire. La première sera utilisée pour une infection classique, la deuxième en cas d'infection sévère chez des patients très atteints. Certains antibiotiques permettent de conclure pour d'autres : ampicilline pour amoxicilline par exemple. Cette approche permet de limiter le nombre d'antibiotiques testés.

Dans le cadre scolaire, il est souvent difficile de tester tous les antibiotiques : choisir dans le tableau en fonction du but de la manipulation, par exemple en prenant un antibiotique par famille si le nombre de disques à choisir est limité.

Ne sont reproduites ici qu'une partie des listes.

Enterobacterales					
LISTE STANDARD		2023	LISTE COMPLÉMENTAIRE		
Acide nalidixique (urines)	NAL	Quinolones 1 ^o gén.	Azithromycine (<i>Salmonella Shigella</i>)	AZM	Macrolides ("vrais")
Amikacine	AMI	Aminosides	Aztréonam	AZT	Bêta-lactamine : Monobactam
Amoxicilline +	AMC	Pénicilline : Aminopénicilline	Céfidérocol	CID	Céphalosporine 5 ^o gén.
Ampicilline (ou Amoxicilline)	AMP	Pénicilline : Aminopénicilline	Ceftaroline ou Ceftobiprole	CTL	Céphalosporine 5 ^o gén.
Cefadroxil ou céfalexine	CDR	Céphalosporine 1 ^o gén.	Ceftolozane-tazobactam	CTT	C3G.et inhibiteur bL
Céfépime	CEP	Céphalosporine 3 ^o gén.	Céfuroxime	CUR	Céphalosporine 2 ^o gén.
Céfixime	CIX	Céphalosporine 3 ^o gén.	Chloramphénicol	CHL	Phénicolés
Céfotaxime ou ceftriaxone	CTA	Céphalosporine 3 ^o gén.	Colistine	COL	Polypeptides
Céfoxitine	CXI	Céphalosporine 2 ^o gén.	Délaflaxacine	DEL	Quinolones 4 ^o gén. (fluoroQ)
Céftazidime	CTZ	Céphalosporine 3 ^o gén.	Éravacycline	ERA	Tétracyclines
Ceftazidime-avibactam	CTV	C3G.et inhibiteur bL	Imipénème-Relebactam	IMR	Pénicilline : Carbapénème + inh.
Ciprofloxacine	CIP	Quinolones 2 ^o gén. (fluoroQ)	Méropénème-vaborbactam	MER	Carbapénème et inhibiteur bL
Cotrimoxazole	TRS	Sulfamides	Moxifloxacine	MOX	Quinolones 4 ^o gén. (fluoroQ)
Ertapénème	ERT	Pénicilline : Carbapénème	Ofloxacine	OFL	Quinolones 2 ^o gén. (fluoroQ)
Fosfomycine	FOS	divers	Péfloxacinine (<i>dépistage</i>)	PEF	Quinolones 2 ^o gén. (fluoroQ)
Gentamycine	GEN	Aminosides	Ticarilline	TIC	Pénicilline : Carboxypénicilline
Imipénème (ou	IMI	Pénicilline : Carbapénème	Ticarilline + Ac.	TIL	Pénicilline : Carboxypénicilline
Lévofloxacine	LEV	Quinolones 2 ^o gén. (fluoroQ)	Tigécycline	TIG	Tétracyclines
Mécillinam	MEC	Pénicilline :	Tobramycine	TOB	Aminosides
Nitrofurantoïne	NIT	Nitrofurane			
Pipéracilline	PIP	Pénicilline : Acyluréidopénicillines			
Pipéracilline Tazobactam	PIT	Pénicilline : Acyluréidopénicillines			
Témocilline		Pénicilline : Carboxypénicilline			
Triméthoprime	TRI	Sulfamides			

<i>Pseudomonas</i>				
LISTE STANDARD		2023	LISTE COMPLÉMENTAIRE	
Amikacine	AMI	Aminosides	Céfidérocol	CID Céphalosporine 5 ^o gén.
Aztréonam	AZT	Béta lactamine : Monobactam	Ceftazidime-avibactam	CTV Céphalosporine 3 ^o gén. + inh. b.
Céfépime	CEP	Céphalosporine 3 ^o gén.	Colistine	COL Polypeptides
Céftazidime	CTZ	Céphalosporine 3 ^o gén.	Fosfomycine	FOS divers
Ceftolozane-tazobactam	CTT	C3G. et inhibiteur bL	Imipénème-Relebactam	IMR Pénicilline : Carbapénème + inh.
Ciprofloxacine	CIP	Quinolones 2 ^o gén. (fluoroQ)	Lévofloxacine	LEV Quinolones 2 ^o gén. (fluoroQ)
Gentamicine	GEN	Aminosides	Méropénème-vaborbactam	MER Pénicilline : Carbapénème + inh.
Imipénème	IMI	Pénicilline : Carbapénème	Ticarilline	TIC Pénicilline : Carboxypénicilline
Méropénème	MER	Pénicilline : Carbapénème	Ticarilline + Ac.	TIL Pénicilline : Carboxypénicilline
Pipéracilline	PIP	Pénicilline : Acyluréidopénicillines		
Pipéracilline + Tazobactam	PIT	Pénicilline : Acyluréidopénicillines		
Tobramycine	TOB	Aminosides		

<i>Acinetobacter</i>				
LISTE STANDARD		2023	LISTE COMPLÉMENTAIRE	
Amikacine	AMI	Aminosides	Ampicilline-Sulbactam	AMS Pénicilline : Aminopénicilline
Céfépime	CEP	Céphalosporine 3 ^o gén.	Céfidérocol	CID Céphalosporine 5 ^o gén.
Céftazidime	CTZ	Céphalosporine 3 ^o gén.	Colistine	COL Polypeptides
Ciprofloxacine	CIP	Quinolones 2 ^o gén. (fluoroQ)	Cotrimoxazole	TRS Sulfamides
Gentamicine	GEN	Aminosides	Méropénème	MER Pénicilline : Carbapénème
Imipénème	IMI	Pénicilline : Carbapénème	Tétracycline ou Minocycline	TET Tétracyclines
Lévofloxacine	LEV	Quinolones 2 ^o gén. (fluoroQ)	Tigécycline	TIG Tétracyclines
Pipéracilline	PIP	Pénicilline : Acyluréidopénicillines		
Pipéracilline Tazobactam	PIT	Pénicilline : Acyluréidopénicillines		
Ticarilline	TIC	Pénicilline : Carboxypénicilline		
Ticarilline + Ac.	TIL	Pénicilline : Carboxypénicilline		
Tobramycine	TOB	Aminosides		

<i>Stenotrophomonas</i>				
LISTE STANDARD		2023	LISTE COMPLÉMENTAIRE	
Céftazidime	CTZ	Céphalosporine 3 ^o gén.	Céfidérocol	CID Céphalosporine 5 ^o gén.
Cotrimoxazole	TRS	Sulfamides		
Lévofloxacine	LEV	Quinolones 2 ^o gén. (fluoroQ)		
Minocycline	MIN	Tétracyclines		
Ticarilline + Ac.	TIL	Pénicilline : Carboxypénicilline		

<i>Bulkolderia cepacia complexe</i>				
LISTE STANDARD		2023	LISTE COMPLÉMENTAIRE	
Céftazidime	CTZ	Céphalosporine 3 ^o gén.	Chloramphénicol	CHL Phénicolés
Cotrimoxazole	TRS	Sulfamides		
Lévofloxacine	LEV	Quinolones 2 ^o gén. (fluoroQ)		
Méropénème	MEM	Pénicilline : Carbapénème		
Minocycline	MIN	Tétracyclines		
Ticarilline + Ac.	TIL	Pénicilline : Carboxypénicilline		

<i>Haemophilus spp.</i>				
LISTE STANDARD		2023	LISTE COMPLÉMENTAIRE	
Acide nalidixique (dépistage)	NAL	Quinolones 1 ^o gén.	Chloramphénicol	CHL Phénicolés
Amoxicilline + Ac.clavul.	AMC	Pénicilline : Aminopénicilline	Ciprofloxacine (ou autre FQ)	CIP Quinolones 2 ^o gén. (fluoroQ)
Ampicilline (ou Amoxicilline)	AMP	Pénicilline : Aminopénicilline	Doxycycline	TET Tétracyclines
Céfotaxime ou Ceftriaxone	CTA	Céphalosporine 3 ^o gén.	Méropénème	MEM Pénicilline : Carbapénème
Cotrimoxazole	TRS	Sulfamides	Rifampicine	RIF divers
Pénicilline G (dépistage)	PHN	Pénicilline : G		
Tétracycline (dépistage)	TET	Tétracyclines		

<i>Neisseria meningitidis</i>				
LISTE STANDARD		2023	LISTE COMPLÉMENTAIRE	
Amoxicilline	AMO	Pénicilline : G	Chloramphénicol	CHL Phénicolés
Céfotaxime (ou ceftriaxone)	CTA	Céphalosporine 3 ^o gén.	Ciprofloxacine (ou autre FQ)	CIP Quinolones 2 ^o gén. (fluoroQ)
Rifampicine	RIF	divers	Pénicilline G	PHN Pénicilline : G

<i>Neisseria gonorrhoeae</i>					
LISTE STANDARD		2023	LISTE COMPLÉMENTAIRE		
Azithromycine	AZM	Macrolides ("vrais")	Céfixime	CIX	Céphalosporine 3 ^o gén.
Ceftriaxone	CTR	Céphalosporine 3 ^o gén.	Gentamycine	GEN	Aminosides
Ciprofloxacine (ou autre FQ)	CIP	Quinolones 2 ^o gén. (fluoroQ)	Ofloxacine ou Norfloxacine	OFL	Quinolones 2 ^o gén. (fluoroQ)
			Tétracycline (dépistage)	TET	Tétracyclines

<i>Staphylococcus</i>					
LISTE STANDARD		2023	LISTE COMPLÉMENTAIRE		
Acide fusidique	FUS	divers	Ceftaroline	CXI	Céphalosporine 5 ^o gén.
Ampicilline (dépistage)	AMP	Pénicilline : Aminopénicilline	Ceftobiprole	CTO	Céphalosporine 5 ^o gén.
Céfoxitine (dépistage)	CXI	Céphalosporine 2 ^o gén.	Chloramphénicol	CHL	Phénicolés
Ciprofloxacine	CIP	Quinolones 2 ^o gén. (fluoroQ)	Dalbavancine Oritavancine...	DAL	Lipoglycopeptide
Clindamycine	CLI	Macrolides-Lincosamides	Daptomycine	DAP	Lipopeptide
Cotrimoxazole	TRS	Sulfamides	Délafoxacine	DEL	Quinolones 5 ^o gén. (fluoroQ)
Érythromycine	ERY	Macrolides ("vrais")	Éravacycline	ERA	Tétracyclines
Gentamycine	GEN	Aminosides	Fosfomycine	FOS	divers
Linézolide	LIN	Macrolides-Oxazolidinones	Kanamycine	KAN	Aminosides
Norfloxacine (dépistage)	NOR	Quinolones 2 ^o gén. (fluoroQ)	Léfamuline	LEF	Pleuromutline
Quinupristine-dalfopristine	QUD	Synergistines (Streptogramines)	Lévofloxacine ou	LEV	Quinolones 3 et 4 ^o gén. (fluoroQ)
Rifampicine	RIF	divers	Minocycline	MNO	Tétracyclines
			Moxifloxacine	MOX	Quinolones 5 ^o gén. (fluoroQ)
			Mupirocine	MUP	divers
			Nitrofurantoïne	NIT	Nitrofuranes
			Oxacilline	OXA	Pénicilline : Isoxazoylpénicilline (M)
			Pénicilline G	PHB	Pénicilline : G
			Tédizolide	TED	Oxazolidinones.
			Teicoplanine *	TEI	Glycopeptides
			Tétracycline (dépistage)	TET	Tétracyclines
			Tigécycline	TIG	Tétracyclines
			Tobramycine	TOB	Aminosides
			Triméthoprime	TRI	Sulfamides
			Vancomycine *	VAN	Glycopeptides

<i>Streptococcus A, B, C ou G</i>					
LISTE STANDARD		2023	LISTE COMPLÉMENTAIRE		
Clindamycine	CLI	Macrolides-Lincosamides	Ciprofloxacine (ou autre FQ)	CIP	Quinolones 2 ^o gén. (fluoroQ)
Érythromycine	ERY	Macrolides ("vrais")	Cotrimoxazole	TRS	Sulfamides
Gentamycine HC?	GEN	Aminosides	Dalbavancine Oritavancine...	DAL	Lipoglycopeptide
Pénicilline G	PHL	Pénicilline : G	Daptomycine	DAP	Lipopeptide
Tétracycline (dépistage)	TET	Tétracyclines	Doxycycline	TET	Tétracyclines
			Linézolide	LIN	Macrolides-Oxazolidinones
			Minocycline	MIN	Tétracyclines
			Nitrofurantoïne	NIT	
			Norfloxacine (dépistage)	NOR	Quinolones 2 ^o gén. (fluoroQ)
			Pristinamycine		Synergistines
			Rifampicine	RIF	divers
			Streptomycine HC?		Aminosides
			Tédizolide	TED	Macrolides-Oxazolidinones
			Teicoplanine *	TEI	Glycopeptides
			Tigécycline		Tétracyclines
			Triméthoprime	TRI	Sulfamides
			Vancomycine	VAN	Glycopeptides

<i>Streptococcus pneumoniae</i>					
LISTE STANDARD		2023	LISTE COMPLÉMENTAIRE		
Ampicilline (ou Amoxicilline)	AMP	Pénicilline : Aminopénicilline	autres bêta-lactamines		
Céfotaxime (ou Ceftriaxone)	CTA	Céphalosporine 3 ^o gén.	Chloramphénicol	CHL	Phénicolés
Ciprofloxacine (ou autre FQ)	CIP	Quinolones 2 ^o gén. (fluoroQ)	Cotrimoxazole	TRS	Sulfamides
Clindamycine	CLI	Macrolides-Lincosamides	Doxycycline	TET	Tétracyclines
Érythromycine	ERY	Macrolides ("vrais")	Gentamycine	GEN	Aminosides
Norfloxacine (dépistage)	NOR	Quinolones 2 ^o gén. (fluoroQ)	Léfamuline	LEF	Pleuromutline
Oxacilline (dépistage)	OXA	Pénicilline : Isoxazoylpénicilline (M)	Linézolide	LIN	Macrolides-Oxazolidinones
Pénicilline G	PHT	Pénicilline : G	Minocycline	MIN	Tétracyclines
Pristinamycine		Synergistines	Rifampicine	RIF	divers
Tétracycline	TET	Tétracyclines			
Vancomycine ou	VAN	Glycopeptides			

Enterococcus				
LISTE STANDARD		2023	LISTE COMPLÉMENTAIRE	
Ampicilline ou Amoxicilline	AMP	Pénicilline : Aminopénicilline	Chloramphénicol	CHL Phénicolés
Gentamycine	GEN	Aminosides	Cotrimoxazole	TRS Sulfamides
Nitrofurantoïne	NIT	Furanes	Daptomycine	DAP Lipopeptide
Teicoplanine *	TEI	Glycopeptides	Éravacycline	ERA Tétracyclines
Vancomycine *	VAN	Glycopeptides	Érythromycine	ERY Macrolides ("vrais")
			Impipénème	IMI Pénicilline : Carbapénème
			Léfamuline	LEF Pleuromutine
			Lévofoxacine ou	LEV Quinolones 3 et 4 ^g én. (fluoroQ)
			Linézolide	LZD Macrolides-Oxazolidinones
			Norfloxacin (dépistage)	NOR Quinolones 2 ^g én. (fluoroQ)
			Quinupristine-dalfopristine	QUD Synergistines (Streptogramines)
			Rifampicine	RIF divers
			Streptomycine	STR Aminosides
			Tigécycline	TIG Tétracyclines
			Triméthoprime	TRI Sulfamides

► Antibiogramme : méthode des disques

1. Principe général

Pour réaliser l'antibiogramme par la méthode des disques, la culture bactérienne est effectuée à la surface d'une gélose spécialement étudiée, la gélose de Mueller Hinton, éventuellement additionnée, dans des cas particuliers, de sang ou d'autres additifs. Des disques préimprégnés d'une dose connue d'antibiotique sont déposés à la surface de la gélose.

L'antibiotique diffuse à partir du disque en créant un gradient de concentration. La détermination du diamètre de la zone d'inhibition permet une estimation de la concentration minimale inhibitrice. Les caractères de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne en seront déduits.

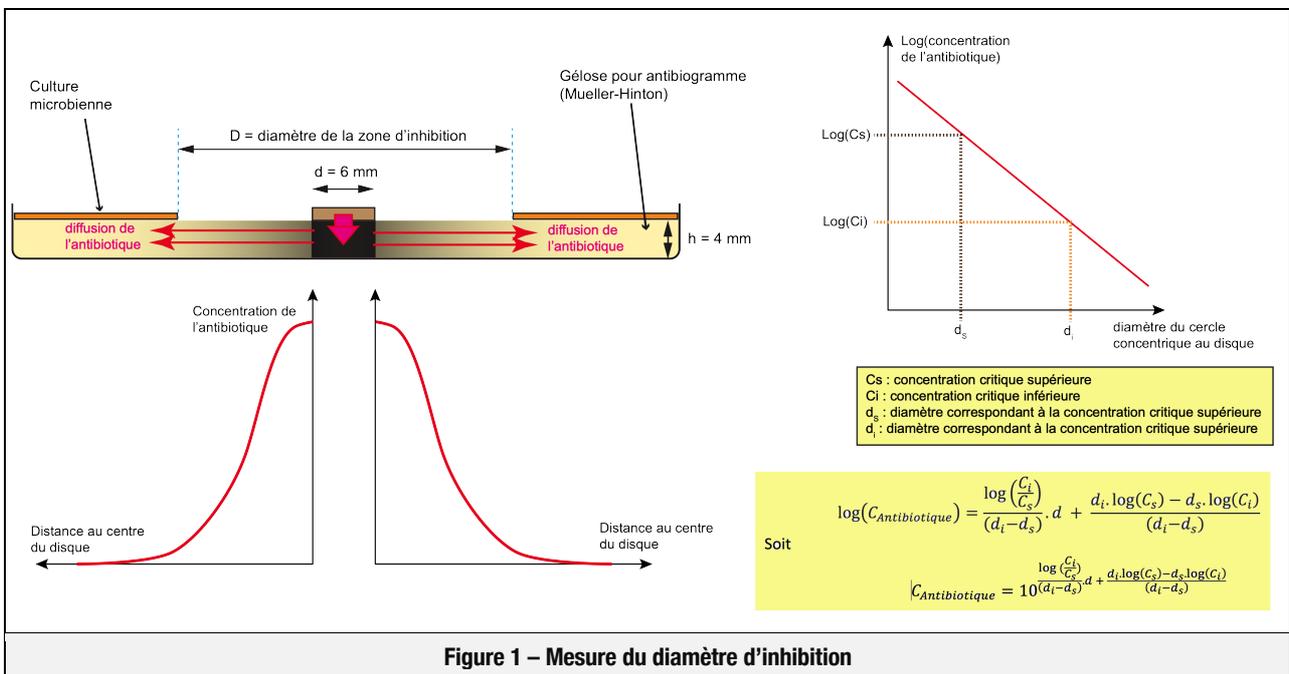
À partir du disque, il est possible de formaliser les mécanismes de la façon suivante : soit m la masse d'antibiotique contenue dans le disque, d son diamètre et h la hauteur de la colonne de gélose sous le disque. La diffusion de l'antibiotique peut être théoriquement séparée en deux temps ; diffusion verticale puis diffusion horizontale :

- **Diffusion verticale** : la diffusion de l'antibiotique donne, dans un premier temps, une concentration initiale C_{initiale} dans un cylindre limité par le disque. Cette concentration dépend de la charge m du disque et du volume du cylindre de gélose donc de la hauteur h de la gélose et du rayon r du disque :

$$C_{\text{Antibiotique}}^{\text{initiale}} = \frac{m_{\text{antibiotique disque}}}{V_{\text{cylindre}}} = \frac{m_{\text{antibiotique disque}}}{\pi r^2 h}$$

Diamètre et charge du disque sont normalisées et doivent donc être identiques d'un fabricant à un autre.

- **Diffusion horizontale** : une diffusion horizontale donne un gradient de concentration dont le maximum se situe au niveau du disque. Cette diffusion se fait à une certaine vitesse : il existe une relation entre le diamètre d'inhibition D de la culture et la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'antibiotique; on peut considérer cette relation, au bout de 24 heures, comme linéaire entre le diamètre et le logarithme de la concentration de l'antibiotique. Elle est toutefois approximative.



Les coefficients des droites sont déterminés par de nombreuses expériences qui permettent l'établissement des droites de concordance. La technique doit être standardisée pour être reproductible. On notera en particulier l'importance, pour le technicien au laboratoire, de la hauteur de la gélose s'il réalise le coulage des boîtes.

Grâce aux droites de concordance, la mesure du diamètre de la zone d'inhibition de la bactérie peut être reliée à la concentration de l'antibiotique : au niveau de la zone d'inhibition, la concentration en antibiotique est la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour cette souche.

2. Technique

La relation entre le diamètre d'inhibition et le logarithme de la concentration en antibiotique ne peut être exploitée que dans des conditions rigoureusement standardisées. Plusieurs facteurs, en effet, sont susceptibles d'influencer les résultats.

Atmosphère anaérobie	Les aminosides sont peu actifs en anaérobiose, les macrolides moins encore. Le métronidazole est perturbé par des traces de dioxygène. Le CO ₂ peut influencer par l'acidification qu'il provoque.
pH	Chaque antibiotique possède un pH optimum d'activité. Si le milieu contient des glucides, leur fermentation par la bactérie peut entraîner une acidification, donc une modification de l'activité de certains antibiotiques.
Protéines	Elles influencent la culture et peuvent inhiber certains antibiotiques.
Ions minéraux	Ils peuvent modifier l'activité antibiotique.
Inoculum microbien	La quantité initiale de bactéries influe sur le résultat.
Thymidine	La thymidine diminue l'action des sulfamides et dérivés. Le sang qui en apporte provoque le même problème.
Gélose Chocolat enrichie	Les différents composants perturbent l'action des sulfamides, de la triméthoprime, des aminosides
Tableau 1- Facteurs influençant les résultats de l'antibiogramme	

Dans la réalisation de l'antibiogramme, il est indispensable d'effectuer un contrôle qualité interne, préconisé par la SFM et obligatoire dans le cadre de l'accréditation.

Il utilise des souches standard pour lesquelles les diamètres des zones d'inhibition sont connus.

Par exemple : pour *E. coli* CIP 7624, les diamètres tolérés pour l'amoxicilline sont de 22,0 à 26,5 mm (disque de charge 25 µg). Il est toutefois nécessaire d'être plus proche de la valeur cible.

En pratique courante, ce contrôle de qualité interne doit être réalisé une fois par mois, mais lors de la première mise en œuvre dans le laboratoire, il doit être quotidiennement 8 à 10 jours consécutifs. Le pH optimum varie selon les antibiotiques.

ANTIBIOTIQUE	pH OPTIMUM
Acide nalidixique	5,5
Ampicilline	5,5
Amphotéricine	De 5,5 à 7
Chloramphénicol	2 à 9
Céfalotine	6,5
Colistine	7,0
Polymyxine	7,0
Gentamicine	8,0
Macrolides	8,25
Nitrofurantoïne	6,0
Pénicillines	6,25
Rifampicine	De 5,5 à 8
Streptomycine	7,75
Tétracyclines	6,25
Vancomycine	8,0
Tableau 2 – pH optimum d'activité de quelques antibiotiques (extrait de « Antibiothérapie », <i>Revue des Sciences médicales</i> n° 211/1974)	

2.1. Le milieu standardisé utilisé : le milieu de Mueller-Hinton

Le milieu de Mueller-Hinton est une gélose riche composée d'infusion de viande de bœuf, d'hydrolysate acide de caséine, d'amidon de maïs. Les concentrations en ions magnésium (entre 0,80 et 1,40 mmol · dm⁻³) et calcium (entre 1,25 et 2,50 mmol · dm⁻³) sont optimisées en raison de leur influence sur la sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux aminosides.

La concentration en thymidine est inférieure à 50 µg · dm⁻³ car elle influe sur la sensibilité aux sulfamides.

L'épaisseur de la gélose doit être de 4 mm car elle influe sur la concentration en antibiotique dans le milieu après addition des disques. Si l'on coule ses géloses, il faut que le volume soit calculé en fonction des boîtes utilisées.

La culture de certaines bactéries exigeantes nécessite des compléments, en particulier du sang et du NAD⁺. L'EUCAST préconise, pour ces microorganismes, une gélose de Mueller-Hinton additionnée de 5 % de sang de cheval défibriné (soit 50 mL · L⁻¹) et d'une solution de NAD⁺ (20 mg · dm⁻³ en concentration finale soit 1 mL · L⁻¹ d'une solution mère à 20 g · dm⁻³ stérilisée par filtration). Ce milieu est identifié par MH-F.

Pour les microorganismes non cités (*Neisseria*, anaérobies strictes, *Helicobacter*... la technique des disques n'est pas applicable. Il faut donc déterminer la CMI).

Noms des taxons	Milieu de départ	Suspension (MF = Mac Farland, étalon d'opacité)	Milieu de suspension	Dilution pour écouvillonnage	Dilution pour inondation	Milieu à utiliser et conditions	Température d'incubation	Atmosphère	Lecture
Souches de culture facile (Entérobactériales, <i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Enterococcus</i>)	Non sélectif	MF 0,5 soit 10 ⁸ par mL	Eau physiologique ou bouillon MH	1/10	1/100	Mueller-Hinton	35 °C ± 1 °C	Air	à 18 h ± 2 h
<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus viridans</i> , <i>Streptococcus A, B, C, G</i> , <i>Listeria</i> , <i>Corynébactéries</i> , <i>Aerococcus</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i>	Milieu d'isolement (gélose au sang frais ou gélose chocolat supplémentée)	MF 0,5 soit 10 ⁸ par mL	Eau physiologique ou bouillon MH	1/10	1/10	Mueller-Hinton + sang de cheval 5 % + NAD	35 °C	Air et CO ₂ 5 %	à 18-24 h
<i>Campylobacter</i>	Milieu d'isolement	MF 0,5 soit 10 ⁸ par mL	Eau physiologique ou bouillon Brucella	1/10	1/10	Mueller-Hinton + sang de cheval 5 % + NAD	41 °C ± 1 °C	Micro-aérophile	à 24 h

Pour les microorganismes non cités, la technique des disques n'est pas applicable. Il faut donc déterminer la CMI dans les milieux indiqués ci-dessous.

Milieux	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> : gélose chocolat supplémentée
	<i>Helicobacter</i> : Mueller-Hinton + sang de cheval 10 % + NAD
	Anaérobies strictes : gélose Brucella + vitamine K1 (1 mg/L) + hémine (5 mg/L) + 5 % sang de mouton

Tableau 3 – Milieux et techniques de dilution à utiliser en fonction du groupe bactérien (Données de l'EUCAST – norme européenne)

2.2. L'inoculum

La densité de l'inoculum doit être elle aussi standardisée, le diamètre de la zone d'inhibition dépendant de l'inoculum initial. En 2014, l'EUCAST préconise **l'écouvillonnage** d'une dilution au 1/10 de la suspension mac Farland 0,5, quelle que soit la bactérie.

Réalisation de l'inoculum

- À partir de l'isolement, réaliser une suspension microbienne d'opacité équivalente à celle d'un bouillon de 18 heures, soit de mac Farland 0,5 (10⁸ bactéries par mL).
- Diluer la suspension selon les indications données dans le tableau 3.

Il convient de s'adapter tant à sa technique qu'au microorganisme testé, ce qui est délicat. Pour une entérobactérie donnant de grandes colonies, la dilution devra être plus importante que pour une entérobactérie donnant de toutes petites colonies...

2.3. Les disques d'antibiotiques

N'importe quel disque stérile disponible dans le commerce et présentant la charge recommandée par l'OMS peut être utilisé :

- disques individuels en papier absorbant de diamètre 6 mm, présentés en cartouche ;
- disques multiples reliés aux branches d'une étoile et donc solidaires les uns des autres (Sobioda, oxoïd) ;
- comprimés «néo-Sensitabs » renfermant les antibiotiques sous forme cristallisée (Eurobio).

Ils doivent être conservés à 4 °C et au sec : les disques de pénicilline G sont totalement inactivés par un séjour de 3 jours à 37 °C en atmosphère humide. Les comprimés représentent la forme la plus stable.

Le choix des disques est fonction de la nature du prélèvement et de la nature de la bactérie à étudier (voir la fiche **Antibiogramme : choix des antibiotiques en fonction du microorganisme testé**).

les disques peuvent être appliqués sur la gélose par un distributeur.

2.4. Technique de l'antibiogramme

Les différentes étapes de la réalisation de l'antibiogramme sont aussi standardisées.

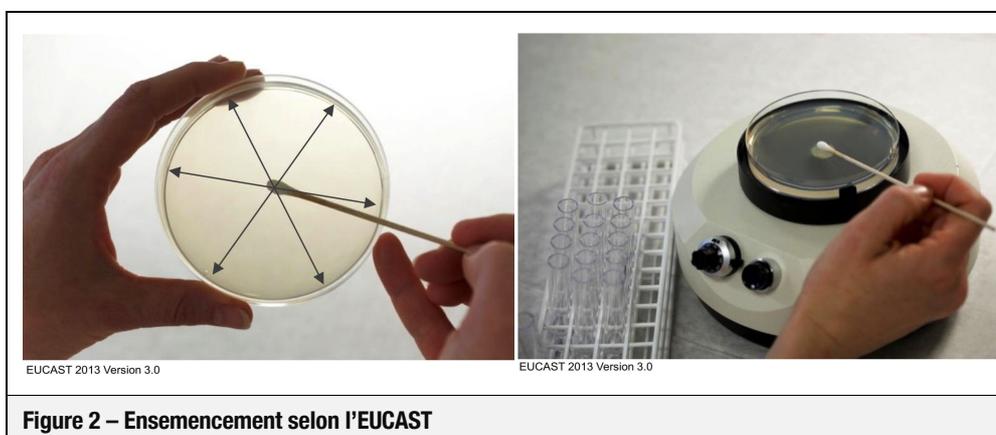
2.4.1. L'ensemencement

Deux techniques sont utilisables : inondation par la suspension préparée ou étalement à l'aide d'un écouvillon trempé dans la suspension. La technique de l'inondation génère des petites gouttelettes plus ou moins visibles qui risquent de contaminer l'environnement de travail. C'est pourquoi la technique de l'écouvillonnage est préférable du point de vue de la sécurité. L'EUCAST estime que c'est la seule technique utilisable.

Quelle que soit la technique utilisée, l'expérience acquise par la réalisation de nombreux antibiogrammes permet d'ajuster les différents paramètres de la réalisation pour obtenir un résultat optimum.

Technique par écouvillonnage

- Tremper l'écouvillon dans la suspension et l'essorer sur les bords.
- Ensemencer la boîte en frottant délicatement l'écouvillon sur la gélose. Tourner plusieurs fois la boîte de façon à croiser les stries. Le séchage est inutile.



2.4.2. Application des disques

Déposer à la surface les disques d'antibiotiques choisis en les appuyant légèrement à l'aide de la pince stérilisée.

Veiller à ne pas chauffer les disques par la pince flambée.

Un disque appliqué ne peut être déplacé.

Les différents disques doivent être distants d'environ 30 mm.

La boîte peut et doit être retournée sans problème.

S'aider des schémas de la **figure 4** (utiliser une photocopie sans réduction mise sous plastique pour éviter une contamination de l'ouvrage) et contrôler le diamètre de 9 cm pour les boîtes standards.

Utiliser un distributeur est plus simple. Veillez au remplissage correct des tubes de disques. Attention de ne pas le contaminer lors de l'application.



2.4.3. Incubation

Les boîtes sont placées dans l'étuve à la température adéquate et sous l'atmosphère nécessaire. L'étape de prédiffusion n'est plus recommandée par le comité de l'antibiogramme.

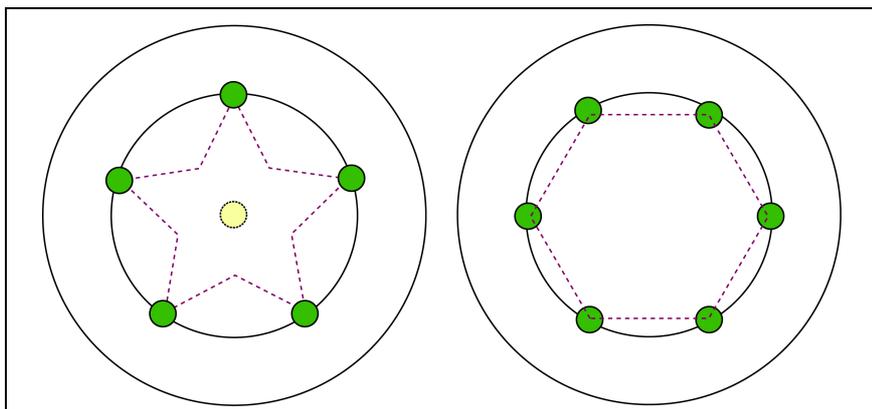


Figure 4 – Schéma d'application des disques sur boîte ronde (le diamètre ne peut être respecté sur le schéma)

2.4.4. Résumé du protocole

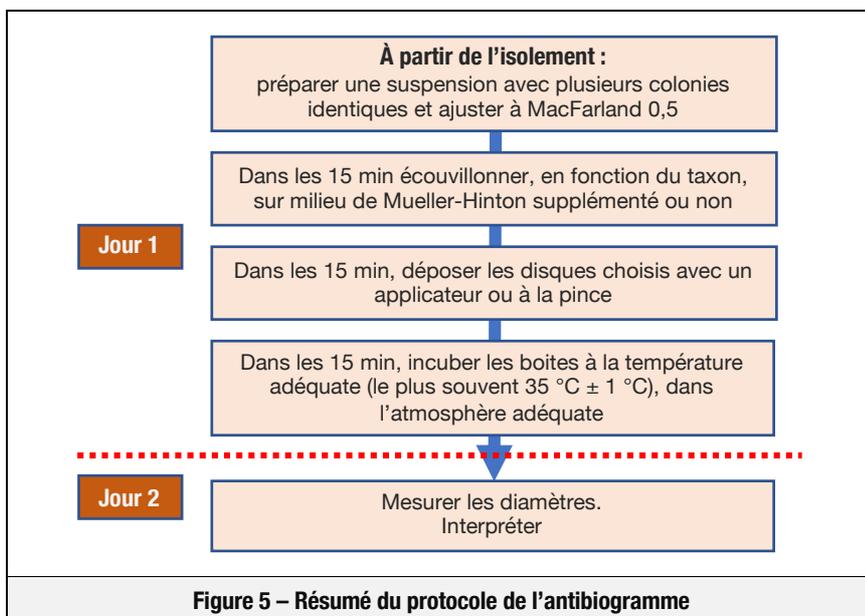


Figure 5 – Résumé du protocole de l'antibiogramme

2.4.5. Contrôle qualité

Régulièrement, un contrôle qualité doit être réalisé afin de s'assurer que tous les paramètres intervenant dans la méthode sont vérifiés.

Il faut :

- une souche test dont les diamètres d'inhibition sont connus (provenant d'une collection reconnue comme ATTC) ;
- le milieu de culture adéquat (Mueller-Hinton éventuellement supplémenté) ;
- un tableau de référence pour les mesures. Le tableau et les références des souches seront trouvés sur le site de l'EUCAST. Un extrait pour *E. coli* est reproduit en page suivante.

Escherichia coli ATCC 25922 [TM(NCTC 12241, CIP 76.24, DSM 1103, CCUG 17620, CECT 434)]

Souche sauvage

Milieu : gélose de Mueller-Hinton, ensemencement par MacFarland 0,5, incubation dans l'air à 35 °C ± 1 °C pendant 18 ± 2 h, lecture des zones d'inhibition au point de non-croissance en regardant vu de l'arrière de la boîte sur une zone sombre en lumière réfléchie.

Antibiotiques	CMI (mg/L)		Charge du disque	Diamètres d'inhibition (mm)	
	Cible	Limites acceptables		Cible	Limites acceptables
Acide nalidixique	2	1-4	30	25	22-28
Amikacine	1-2	0,5-4	30	22-23	19-26
Amoxicilline	4	2-8	20	21	18-24 ¹
Amoxicilline-acide clavulanique ^{2,3}	4	2-8	20-10	21	18-24 ¹
Ampicilline	4	2-8	10	18-19	15-22 ¹
Ampicilline-sulbactam (concentration fixe) ^{2,4}	2	1-4	10-10	21-22	19-24 ¹
Ampicilline-sulbactam (ratio constant 2:1) ^{2,5}	4	2-8	10-10	21-22	19-24 ¹
Azithromycine	-	-	15	17	14-20 ⁶

Tableau 4 – Extrait de l'EUCAST/SFM pour *E. coli* (page 23) (en jaune : changements intervenus depuis la dernière édition)

2.5. Lecture et interprétation

Aux diamètres mesurés autour du disque, permettant l'estimation de la CMI, on peut associer les diamètres critiques, eux-mêmes correspondant à deux concentrations critiques : concentration critique supérieure (CCs) et concentration critique inférieure (Cci).

La comparaison de la CMI aux deux concentrations critiques permet de déterminer le caractère sensible à posologie normale, intermédiaire ou sensible à forte posologie ou résistant de la souche. La comparaison des diamètres permettra la même opération, le **diamètre d'inhibition** correspondant à la CMI :

diamètre d'inhibition > diamètre de la Cci	sensible ou aujourd'hui sensible à posologie normale	CMI < CCi
diamètre d'inhibition < diamètre de la CCs	résistante	CMI > CCs
diamètre de la Cci < diamètre d'inhibition < diamètre de la CCs	Intermédiaire, dit aujourd'hui sensible à forte posologie	CCi < CMI < CCs
Note : On peut considérer que si CMI = Cci, la catégorie doit être, par précaution, sensible à forte posologie		

La **figure 6** représente une vue en coupe de la boîte et illustre les trois situations possibles.

Il existe plusieurs façons de procéder à l'interprétation. On peut utiliser des abaques, représentant les boîtes vues par-dessus, sur lesquelles il est possible de poser les boîtes réalisées. La lecture se fait par transparence.

En superposant la zone d'inhibition à l'image de la figure 6, on obtient les trois figures possibles (**figure 7**).

On remarquera qu'une souche peut être déclarée résistante même si une zone d'inhibition existe autour du disque.

Des abaques linéaires peuvent être utilisées : le type d'abaque autrefois fourni par l'institut Pasteur devenu Bio-Rad est représenté en **figure 8**.

Comme toute mesure, celle du diamètre supporte une incertitude. On la considère à ± 0,5 mm. D'autre part, la reproductibilité est estimée à ± 2 mm. Pour conclure, utiliser les tableaux des pages et suivantes ou un système informatique incluant les données. Un système expert permet une analyse fine des résultats.

La lecture peut être réalisée à l'aide d'un pied à coulisse, éventuellement connectée au système informatique.