



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
Université Frères Mentouri-Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie



Cours de :

Agents antimicrobiens et résistances aux antibiotiques



Réalisés par : Dr. A.DAFFRI

Licence (L3) Microbiologie

Années universitaires

2022-2023 / 2023-2024 / 2024-2025

Préambule

Par ce cours d'Agents antimicrobiens et résistances aux antibiotiques, destiné aux étudiants de troisième année Licence Microbiologie de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, un ensemble d'informations de base est fourni sur trois grandes parties. Selon le canevas de la matière établi par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique. Commenant par des définitions des concepts de bases de cette matière, suivies par les différents types des agents antimicrobiens : physiques, chimiques et chimiothérapeutiques. Une partie importante de ce cours est consacrée au phénomène de résistances bactériennes aux antibiotiques, qui met en péril la capacité à combattre des maladies humaines et animales et peut avoir de graves répercussions sur la santé publique. Le cours est illustré par de nombreuses figures et schémas, dont l'objectif est de fixer les connaissances exposées. Ce support scientifique et pédagogique est terminé par des consignes et des pratiques sécuritaires aux laboratoires et des questions de révisions, aidant l'étudiant à assimiler et apprendre le maximum d'informations requises.

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

I. Définitions	1
II. Action antimicrobienne	2
1. Spectre d'activité d'un agent antimicrobien.....	3
2. Temps de réduction décimal (D).....	3
3. Efficacité.....	3
III. Agents antimicrobiens physiques	3
1. Chaleur (Température).....	3
1.1 Chaleur Humide.....	3
a) Autoclavage.....	3
b) Tyndallisation.....	5
c) Pasteurisation.....	5
1.2 Chaleur sèche.....	6
a) Bec Bunsen (flambage).....	7
a) Four PASTEUR.....	8
a) Incinérateur.....	8
a) Stabilisation microbiologique par le froid.....	9
2. Radiations.....	9
2.1 Rayons Ultra-violets (UV).....	9
2.2 Radiations ionisantes X et γ	10
3. Pression.....	11
4. Filtration.....	11

5. Centrifugation.....	12
IV. Agents antimicrobiens chimiques	12
1. Oxydants.....	13
1.1 Eau oxygénée (H ₂ O ₂).....	13
1.2 Chlore et dérivés.....	13
1.3 Iode.....	13
2. Savons et détergents synthétiques.....	13
3. Autres.....	14
4. Spectre d'action des agents antimicrobiens chimiques.....	15
V. Agents chimiothérapeutiques	15
1. Antibiotiques	15
1.1 Définition.....	17
1.2 Classification.....	17
1.3 Familles d'antibiotiques (substances antibiotiques).....	17
1.3.1 Antibiotiques bactéricides.....	18
1.3.2 Antibiotiques bactériostatiques.....	18
1.4 Mécanisme d'action.....	18
2. Antifongiques	30
2.1 Mécanisme d'action.....	30
2.2 Classification.....	30
3. Antiviraux	33
3.1 Mécanisme d'action.....	33
3.1.1 Agent Immunomodulateurs.....	33
3.1.2 Agent qui inhibe la réplication du virus dans la cellule hôte.....	33

VI. Résistance aux antibiotiques	37
1. Historique.....	37
2. Types de l'antibiorésistance.....	38
3. Mécanismes de résistances.....	40
4. Propagation de la résistance et conséquences.....	42
5. Lutte contre l'antibiorésistance.....	43
3.1 Vaccination.....	43
3.2 Phagothérapie.....	43
6. Prévenir l'antibiorésistance.....	44
VII. Antibiogramme	47
1. Définition.....	47
2. But de la standardisation.....	49
3. Principe de l'antibiogramme.....	49
4. Paramètres importants.....	52
5. Technique d'ensemencement.....	57
6. Contrôle de la technique d'antibiogramme.....	57
7. Lecture des résultats de l'antibiogramme.....	57
8. Etablissement des valeurs critiques délimitant les catégories cliniques.....	59
9. Procédure et critères de catégorisation des souches.....	60
10. Concentration Minimale Inhibitrice(CMI) et concentration de prévention des mutants résistants (CPM).....	61
1. Définitions.....	61
2. Techniques de détermination de la CMI	62
11. Association d'antibiotiques.....	66
12. Limites de l'antibiogramme.....	68

VIII. Sécurité aux laboratoires	71
1. Biosécurité.....	75
2. Pratiques sécuritaires au laboratoire de Microbiologie.....	86
2.1 Pratiques de sécurité standard en microbiologie.....	76
2.2 Pratiques spéciales.....	83
2.3 Habits et équipement de protection.....	84
3. Gestion des matières dangereuses.....	88
4. Gestion des déchets biologiques cytotoxiques et pharmaceutiques	91
5. Matières radioactives et risques.....	93
6. Risques physiques.....	94
<i>Questions de révisions</i>	101
<i>Références bibliographiques.....</i>	102

Liste des abréviations

BAAR : Bactéries Acido-Alcoolo-Résistantes

BPC: Biphényles PolyChlorés

c : concentration critique basse

C : concentration critique haute

C° : Degré de Celsius

Ca : Calcium

CH₄ : Méthane

CLSI : Clinical Laboratory Standards Institute

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

Co: Cobalt

CO₂: Dioxyde de Carbone

CPM : Concentration de Prévention des Mutants résistants

D : Barème de stérilisation

DO: Densité optique

d: diamètre du disque d'antibiotique

EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

ESB : Enceintes de Sécurité Biologique

Fe: Fer

G : Temps de génération

Gy : Gray

HClO : Acide hypochloreux

H₂S : Sulfure d'hydrogène

H₂O₂ : Eau oxygénée

K : Potassium

kGy : kilo Gray

M : Molaire

MF : Mc Farland

Mg : Magnésium

Mn : Manganèse

Mo : Molybdène

n : Nombre de génération

N₂ : Azote moléculaire

Na : Sodium

NaCl : Chlorure de sodium

NaOCl : Hypochlorite de sodium

NH₃ : Ammoniac

NH₄⁺ : Sels d'ammonium

NO₂⁻ : Nitrites

NO₃⁻ : Nitrates

NPP : Nombre le Plus Probable

O₂ : Oxygène

OMS : Organisation Mondiale de Santé

pH : Potentiel d'hydrogène

pK/pD : Pharmacocinétique/Pharmacodynamie

PLP : Protéines Liant la Pénicilline

RAM : Résistances aux agents Antimicrobiens

RASRBA : Réseau Algérien de la Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques

SCC mec : *Staphylococcus* Cassette Chromosome mec

SH : Groupement thiol

SHP : Sous Haute Pression

UV : Rayonnements ultraviolette

UFC : Unités Formant une Colonie

UHT : Ultra-Haute Température

VIH : Virus d'Immunodéficience Humaine

vRNP : Complexe Ribo-Nucléo-Protéique

z : Inactivation thermique

Ø : Diamètre d'inhibition mesuré

Liste des figures

<u>Figure 1:</u> Schéma représentatif de l'autoclave.....	5
<u>Figure 2:</u> Photo d'un autoclave utilisé en industries agroalimentaire.....	5
<u>Figure 3:</u> Schéma du processus de Pasteurisation.....	7
<u>Figure 4:</u> Photo du bec Bunsen.....	8
<u>Figure 5:</u> Image du four Pasteur.....	9
<u>Figure 6:</u> Représentation schématique de l'incinérateur.....	9
<u>Figure 7:</u> Lampes germicides UV multidirectionnelles.....	11
<u>Figure 8:</u> Technique de filtration sur membrane	13
<u>Figure 9:</u> Représentation schématique de l'appareil de centrifugation (Centrifugeuse).....	14
<u>Figure 10:</u> Structure de la paroi bactérienne.....	23
<u>Figure 11:</u> Structure chimique des β -lactamines.....	25
<u>Figure 12:</u> Structure chimique de la Vancomycine.....	26
<u>Figure 13:</u> Structure chimique de la Teicoplanine.....	26
<u>Figure 14:</u> Structure chimique de la Fosfomycine.....	27
<u>Figure 15:</u> Structure chimique de la Cyclosérine.....	28
<u>Figure 16:</u> Structure chimique de la Bacitracine.....	28
<u>Figure 17:</u> Structure chimique de la Polymyxine B sulfate.....	29
<u>Figure 18:</u> Structure chimique de la Nystatine.....	29
<u>Figure 19:</u> Structure chimique du Chloramphénicol.....	30
<u>Figure 20:</u> Structure chimique de la Streptomycine.....	31
<u>Figure 21:</u> Structure chimique des Tétracyclines.....	31
<u>Figure 22:</u> Structure chimique des Macrolides.....	32
<u>Figure 23:</u> Structure chimique de l'acide Fusidique.....	32
<u>Figure 24:</u> Représentation schématique du mécanisme d'action des antibiotiques.....	34
<u>Figure 25:</u> Structure chimique de la Caspofungine.....	35

Figure 26: Structure chimique de l'Amphotéricine B.....	36
Figure 27: Structure chimique de la Flucytosine.....	37
Figure 28: Structure chimique des dérivés azolés.....	38
Figure 29: Structure chimique de l'Amantadine et de la Rimantadine.....	40
Figure 30: Structure chimique de l'Aciclovir.....	41
Figure 31: Structure chimique du Raltégravir, de l'Elvitégravir et du Dolutégravir.....	42
Figure 32: Structure chimique de l'Oseltamivir.....	43
Figure 33: Schéma représentatif de l'apparition de la résistance aux antibiotiques.....	45
Figure 34: Schéma représentatif des étapes de l'apparition de bactéries résistantes.....	48
Figure 35: Consommation et diffusion des antibiotiques.....	50
Figure 36 : Schéma descriptif de la phagothérapie.....	53
Figure 37: Diamètre d'inhibition autour d'une pastille contenant une quantité définie d'antibiotique.....	58
Figure 38: Antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé de <i>Staphylococcus aureus</i>	60
Figure 39: Antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	61
Figure 40: Schéma en coupe d'une gélose Mueller-Hinton utilisée pour un antibiogramme standard.....	63
Figure 41: Droite de concordance entre le logarithme de la concentration en antibiotique et le diamètre de diffusion de l'antibiotique	64
Figure 42: Les disques d'antibiotiques.....	66
Figure 43: Les standard Mc Farland servent de standards de turbidité pour préparer les suspensions de microorganismes.....	67
Figure 44: Sélection de mutants résistants en fonction de la concentration en antibiotique...	73
Figure 45 : Détermination de la CMI en milieu liquide.....	74
Figure 46: Détermination de la CMI par dilution en milieu gélosé.....	75
Figure 47: CMI des glycopeptides de <i>Staphylococcus aureus</i> : E-test®.....	77

<u>Figure48:</u> Détermination de la CMI par l'E-test®....	77
<u>Figure 49:</u> Association d'antibiotique: cinétique de bactéricidie en fonction du temps....	79
<u>Figure 50:</u> Test de synergie positif (aspect en bouchant de champagne).....	79
<u>Figure51:</u> Expression phénotypique caractérisée par une multirésistance à divers antibiotiques associée à une image de synergie-antagonisme autour du disque de Ticarcilline-acide clavulanique (TCC).....	80
<u>Figure 52:</u> Schéma descriptif d'une hotte chimique.....	91
<u>Figure 53:</u> Schéma descriptif d'une enceinte de sécurité biologique (ESB).....	93

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classes et premières années d'utilisation des principaux antibiotiques.

Tableau 2:Exemples d'abréviation de quelques antibiotiques.

Tableau 3: Exemple de tableau des résultats d'un antibiogramme standard.

Tableau 4: interprétation de la sensibilité et de la résistance d'une souche à un antibiotique.

Tableau 5: Critères de catégorisations selon les valeurs critiques.

Les **agents antimicrobiens** sont des substances qui tuent (**microbicide**) ou ralentissent (**microbiostatique**) la croissance des microorganismes tels : les bactéries (**activité antibactérienne**), les mycètes (**activité antifongique**), les virus (**activité antivirale**) et les parasites (**activité antiparasitaires**).

En médecine, un **agent antimicrobien** désigne une **substance chimique**, un **médicament**, utilisé pour le traitement d'une maladie causée par un microorganisme, (typiquement une bactérie), qui détruit l'agent pathogène sans endommager les tissus de l'organisme. L'agent antimicrobien est le plus souvent un antibiotique.

L'utilisation par l'homme des **agents antimicrobiens** permet de contrôler la présence et la croissance de microbes dans les milieux où ils sont indésirables. Elle permet aussi d'apporter des données précieuses sur leur mode d'action, sur les résistances développées à leur rencontre, ainsi que sur le métabolisme microbien.

I. Définitions

- **Stérilisation**

Procédé par lequel toutes les cellules vivantes ainsi que leurs formes (spores), sont détruits (éliminés). Un objet stérile est totalement exempt de microorganismes, de spores, de virus, de viroïdes, ou d'autres agents infectieux viables. Un agent chimique permettant la stérilisation est appelé **agent stérilisant**.

- **Désinfection**

C'est la **destruction**, l'**inhibition** ou l'**élimination** des microorganismes potentiellement pathogènes. Elle réduit également, d'une manière substantielle, la population microbienne totale. La **désinfection ne stérilise pas**, car des formes de vie peuvent substituées (endospores bactériennes). C'est une opération permettant l'**élimination momentanée** de microorganismes et l'**inactivation des virus**, contrairement à la stérilisation. Les **agents désinfectants** sont des **agents généralement chimiques** appliqués sur des objets inertes pour sécuriser leur emploi, notamment en milieu hospitalier: instrument chirurgicaux, surfaces et salle de travail.... Les **désinfectants** se présentent sous plusieurs formes: vapeurs (Formol (alcool)...), liquide (eau de Javel, phénols...), solides (chaux vive).

- **Asepsie**

C'est l'ensemble des mesures empêchant tout apport exogène de microorganismes (contamination). La stérilisation, la désinfection sont des moyens de réalisation de l'**asepsie**.

- **Septique**

Qualifié pour un milieu contenant des microorganismes. Cependant, un produit est dit **septique** (non stérile) s'il contient des microorganismes.

- **Antisepsie**

C'est le procédé d'**inhibition** ou **destruction** de microorganismes pathogènes au niveau de tissus vivants. En principe, on doit réserver le terme "désinfection" aux milieux inertes et "antisepsie" aux tissus vivants. Les **agents antiseptiques** sont moins toxiques que les désinfectants, car ils ne doivent pas détruire le tissu hôte. Leur utilisation reste externe, exemple: l'eau oxygénée.

- **Agents chimiothérapeutiques**

Ce sont des agents chimiques antimicrobiens, utilisés dans le traitement des maladies infectieuses: **antibiotiques**, **antiviraux** par exemple.

II. Action antimicrobienne

Le rôle des agents antimicrobiens est d'éliminer les microorganismes. De les détruire ou d'inhiber leur croissance. Les **substances destructrices** (traitement de destruction) sont désignées par le suffixe-**cide** (du latin *coedere*, qui signifie tuer). Un **germicide** détruit les germes mais pas nécessairement les endospores. Son action est létale. L'action antagoniste des germicides en fonction de la catégorie de microorganismes ciblés est désignée par les termes suivants:

- **Bactéricide:** agent qui tue les bactéries.
- **Sporicide** ou **sporulicide:** agent qui tue les spores bactériennes (endospores),
- **Fongicide:** agent qui tue les champignons (y compris leurs spores mais ces spores ne présentent pas les mêmes propriétés de résistance que celles des endospores bactériennes).
- **Algicide:** agent qui tue les algues.
- **Viricide** ou **virulicide** : agent qui inactive les virus.

D'autres **substances inhibent la croissance** et empêche le développement des microorganismes (traitement de stabilisation). Leurs noms se terminent par le suffixe -**statique** (du grec *statikos*, qui signifie arrêter) par exemple: **biostatique** (**bactériostatiques**, **fongistatiques**).

- **Bactériostatique:** agent qui inhibe la croissance bactérienne.
- **Fongistatique** : agent qui inhibe le développement mycélien.

Certains agents présentent ces deux modes d'action en fonction des doses.

1. Spectre d'activité d'un agent antimicrobien

Il s'agit de la liste des espèces vis-à-vis desquelles un agent exerce son pouvoir microbicide ou microbiostatique. Si les désinfectants et les antiseptiques ont un spectre très large, les antibiotiques ont un spectre beaucoup plus étroit. Par exemple la pénicilline G n'agit que sur les bactéries à Gram positif.

2. Temps de réduction décimal (D)

C'est le temps nécessaire pour réduire d'une puissance de 10 le nombre de microorganismes. La contamination initiale est divisée par 10 chaque fois que l'opération de destruction en cours est prolongée d'un temps D.

3. Efficacité

Un agent antimicrobien est plus ou moins efficace selon l'**intensité** pour les agents physiques, la **concentration**, la stabilité chimique, la solubilité pour les **agents chimiques**. Ainsi que, le **temps de contact** et la **température** et autres.

III. Agents antimicrobiens physiques

1. Chaleur (Température)

La plupart des germes bactériens sous leur forme végétative sont détruits dans de l'eau bouillante. Cette technique reste encore la plus fiable pour obtenir de l'eau potable. Les procédés les plus classiques de stérilisation par la chaleur sont l'**autoclavage à 120°C (destruction des spores)**, la **tyndallisation (destruction des spores sans altération des produits fragiles)** et les **pasteurisations : basse, haute et Ultra Haute Température (UHT)**. Ce sont des procédés de **stérilisation à la chaleur humide**.

1.1 Chaleur Humide

a) Autoclavage (destruction des spores)

Il est réalisé en **autoclave**, qui est un outil de **stérilisation par la chaleur humide sous pression**. L'autoclave est constitué d'une enceinte métallique hermétiquement close dans laquelle l'eau est chauffée sous pression (1 bar) pour faire agir de la vapeur d'eau saturée. La stérilisation est obtenue par dénaturation des protéines, après chauffage à 121°C pendant 15 à 20 minutes. La température utilisée est **inférieure** à celle utilisée en **chaleur sèche**. La saturation de l'atmosphère en eau permet la stérilisation de milieux liquides sans évaporation.

Il est déconseillé de stériliser par autoclavages les liquides albumineux, le lait, les solutions concentrées de glucides, la gélatine et toute autre solution facilement hydrolysable.

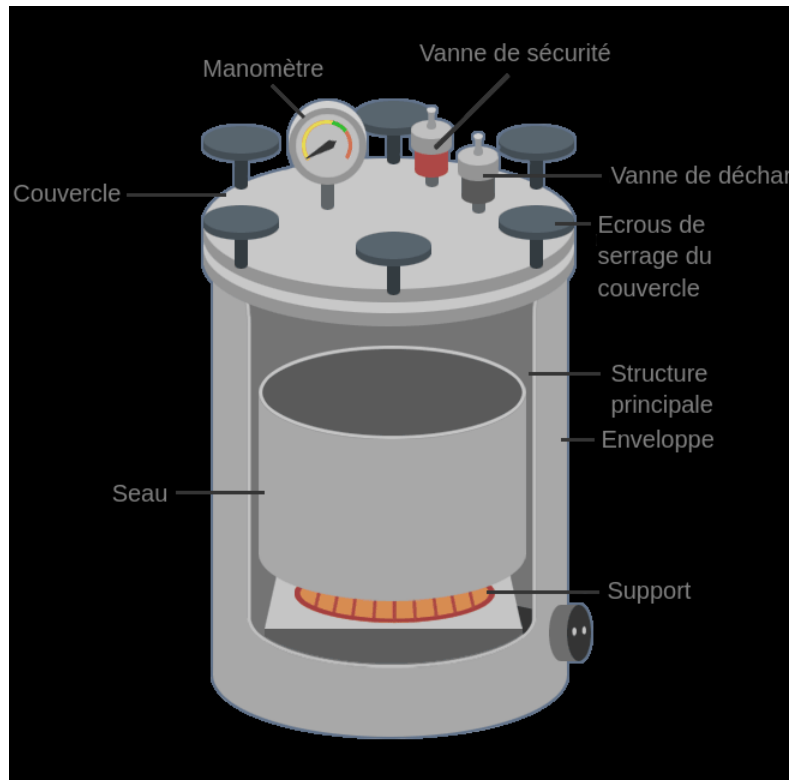


Figure 1: Schéma représentatif de l'autoclave.



Figure 2: Photo d'un autoclave utilisé en industries agroalimentaire.

b) Tyndallisation

C'est une opération décrite par TYNDALL, qui consiste à chauffer un milieu à 60-70°C pendant 30-60 minutes trois fois consécutives en laissant un intervalle de 24 heures entre chaque chauffage. Ainsi, certains milieux ne supportant pas l'autoclavage peuvent être stérilisés par tyndallisation. La dormance des spores thermorésistantes est levée au cours du premier chauffage, les cellules végétatives issues de la germination de ces spores sont détruites lors des traitements suivants. Cette méthode est utilisée pour les milieux fragiles contenant le sérum ou toute substance thermosensible de forte viscosité qui ne peut être stérilisée par autoclavage ou par filtration.

c) Pasteurisation

Il s'agit d'une méthode de conservation découverte par Louis Pasteur dans les années 1860. Un chauffage modéré permet la destruction des germes pathogènes fréquemment présents dans le lait ou ses dérivés, les jus de fruits... La pasteurisation a l'avantage de laisser intactes les vitamines présentes dans le produit traité, qui conserve également ses caractères organoleptiques (couleur, odeur, saveur). On distingue plusieurs types de pasteurisation :

Pasteurisation à basse température: 60-70°C plusieurs minutes.

Pasteurisation à haute température: 90°C durant 30 secondes puis refroidissement à 10 °C.

Pasteurisation à ultra-haute température (UHT): 140°C pendant quelques secondes puis refroidissement brutal.

La pasteurisation est utilisée pour les milieux de cultures comme pour les aliments. En effet, il est important de choisir les conditions qui assurent une bonne destruction microbienne. Une destruction minime des vitamines, et une production minime de réactions défavorables comme les réactions de Maillard.

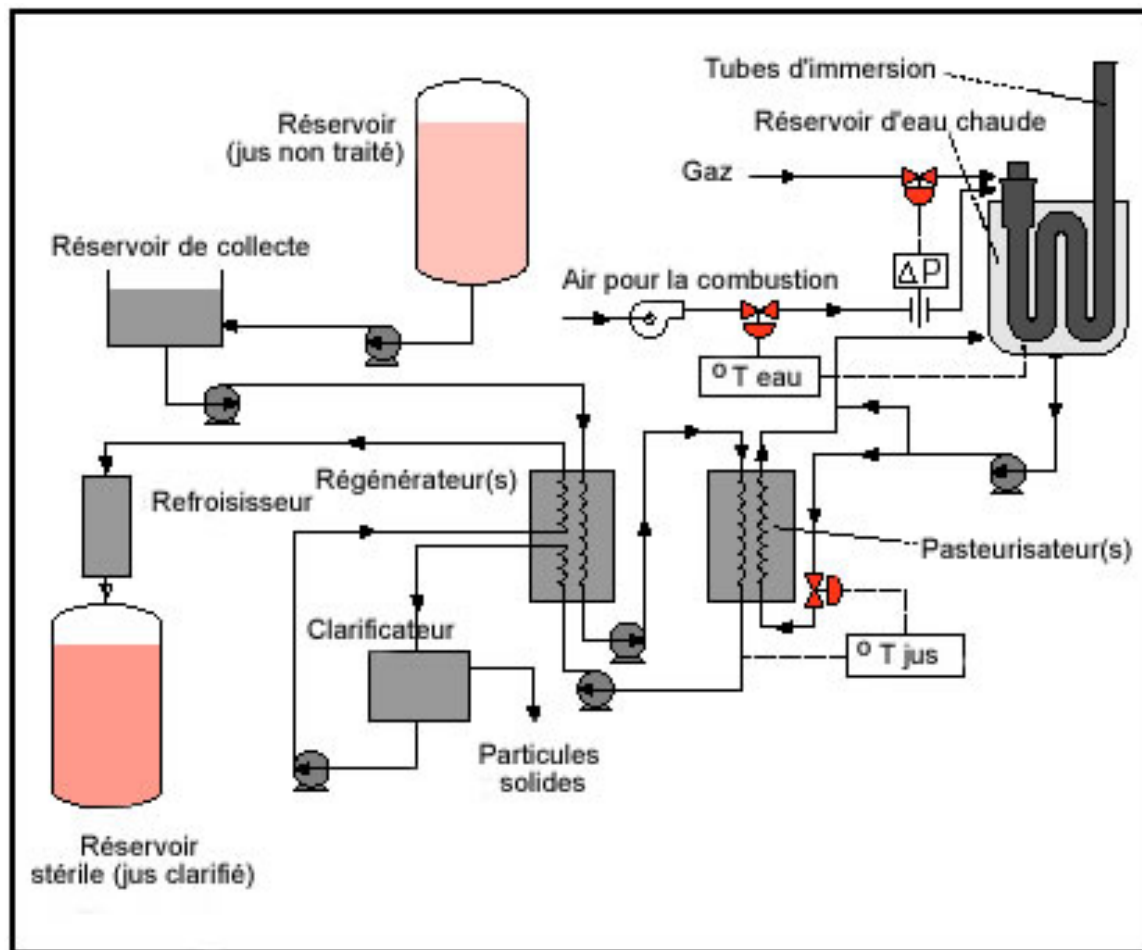


Figure 3: Schéma du processus de Pasteurisation.

1.2 Chaleur sèche

Certains matériels ne peuvent pas être stérilisés par la chaleur humide. Ils sont alors stérilisés par la chaleur sèche.

a) Bec Bunsen (flambage)

Cette méthode est utilisée pour la stérilisation extemporanée du matériel de manipulation (fils de platine, extérieurs et extrémités des pipettes Pasteur ou graduées, col des tubes à essais, des flacons et des fioles, ouverture de récipients, spatules, etc.). Ce procédé consiste à maintenir l'objet à stériliser dans la flamme chauffante du **bec Bunsen** (chaleur sèche). Il se produit à sa surface une destruction totale des matières organiques.



Figure 4: Photo du bec Bunsen.

b) Four PASTEUR

Le four PASTEUR est utilisé pour la **stérilisation à sec** (par l'air chaude) de la verrerie vide, objets en porcelaine, les seringues métalliques, les aiguilles, les pièces de métal. Le matériel à stériliser, propre et parfaitement sec, bouché au coton et éventuellement emballé dans du papier solide (papier Kraft ou papier journal). La mort des microorganismes est obtenue par dénaturation des protéines, après un chauffage à 180 °C pendant 30 minutes (160°C/2 heures). Le matériel ainsi stérilisé sera laissé dans l'étuve jusqu'à son refroidissement complet, ensuite stocké à l'abri des poussières.



Figure 5: Image du four Pasteur.

c) Incinérateur

L'incinération est utilisée pour les objets non récupérables, combustibles à usage unique.



Figure 6: Représentation schématique de l'incinérateur.

d) Stabilisation microbiologique par le froid

La conservation des denrées alimentaires est assurée par l'abaissement de la température, soit en la laissant positive (**réfrigération**) soit en la passant dans la zone négative (**congélation ou surgélation**). La **réfrigération** et la **congélation** doivent être appliquées à des aliments sains, de façon précoce et continue (la chaîne du froid ne doit pas être rompue).

▪ Barème de stérilisation (D)

Le **barème de stérilisation D** est le temps nécessaire pour réduire d'une puissance de 10 le nombre de microorganismes. L'**inactivation thermique (z)** est l'accroissement de température nécessaire pour réduire D à 1/10. Afin d'obtenir une destruction satisfaisante des microorganismes, les conditions assurant l'élimination des spores les plus résistantes doivent être réalisées (valeurs de D et z optimales).

Par exemple, lors de l'action de la vapeur d'eau, *Bacillus stearothermophilus* est caractérisé par une valeur de D à 120°C de 1,5 mn et une valeur de z de 9,5°C. Un traitement stérilisant d'une minute et demie par la vapeur d'eau à 110,5°C sera donc 10 fois moins efficace qu'à 120°C. **Le couple température-durée est très important dans les barèmes de stérilisation.**

Les spores de *Clostridium botulinum* présentent un temps de réduction décimale D à 121 °C de 0,204 mn. Un traitement thermique suffisamment long pour réduire le nombre de spores de 10^{12} à 10^0 (une spore) est égal à 12D, soit 2,5 mn. La valeur de z étant de 10°C pour ces spores, un changement de température de 10°C modifie la valeur D d'un facteur 10. Si le traitement devait être effectué à 111°C au lieu de 121°C, D serait égal à 2,04 mn et la valeur 12D égale à 24,5 minutes.

2. Radiations

2.1 Rayons Ultra-violets (UV)

Les rayonnements UV sont produits par un tube en quartz à vapeur de mercure. Les rayonnements ultraviolette (UV) proches de 260 nm sont très létales mais ne pénètrent que très peu le verre ou l'eau. Les lampes germicides ou stérilampes sont utilisées pour la stérilisation des surfaces et de l'air ambiante dans des locaux ou des hottes servants de manipulation dans une atmosphère stérile (salles de chirurgie, hotte à flux laminaire, la décontamination de surfaces de travail...). Ces rayonnements provoquent des mutations au niveau du génome, inhibant ainsi les processus biochimiques.

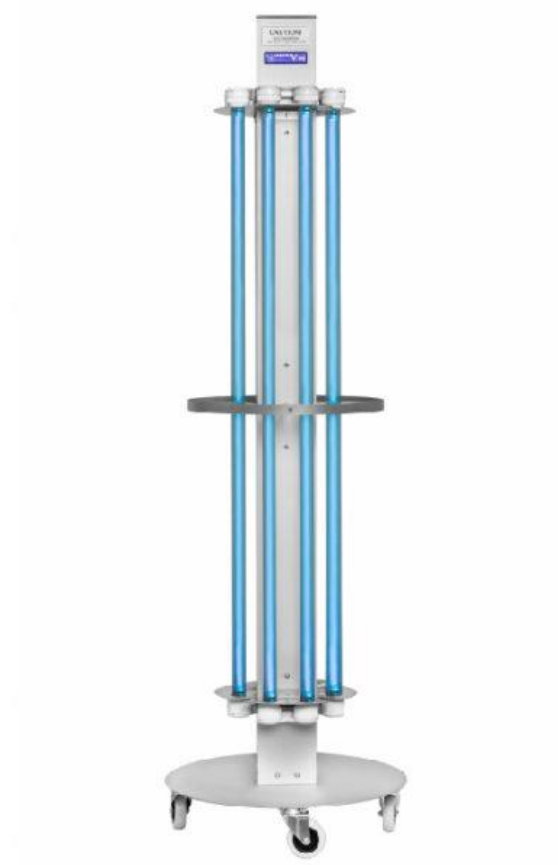


Figure 7: Lampes germicides UV multidirectionnelles.

2.2 Radiations ionisantes X et γ

Les rayonnements ionisants RX et $R\gamma$ pénètrent profondément la matière, leur pouvoir de pénétration est plus important. Ils sont utilisés pour la stérilisation industrielle des boîtes de Pétri, des pipettes et des flacons en matières plastiques. Les radiations γ d'une source de cobalt 60 stérilisent à froid des antibiotiques, des hormones ou des objets plastiques à usage unique. Trois types de radiations ionisantes sont appliqués:

Raddappertisation: Destruction de tous les microorganismes vivants (20 à 50 kGy (kilo Gray)).

Radication: Destruction de tous les microorganismes pathogènes non sporulants (10 kGy).

Radurisation: Réduction de la charge microbienne sans altération du produit.

3. Pression

Les **ultrapressions** sont capables de détruire les microorganismes. Le traitement d'aliments à 4000 bars permet de réduire sensiblement leur teneur en microorganismes. L'usage industriel est limité par l'importante dépense énergétique nécessaire. Des techniques de **pascalisation** associent l'action de la température à celle des **hautes pressions**. L'augmentation de la pression osmotique (et la diminution de la disponibilité de l'eau) est un procédé ancestral pour la conservation des aliments (exemple: salaisons).

4. Filtration

La **filtration** est une excellente méthode pour réduire la population microbienne de substances thermosensibles ou pour stériliser des solutions. Il existe des **filtres épais** et des **membranes filtrantes**.

Les filtres épais sont constitués de matière fibreuse ou granulaire. Ils sont caractérisés par une épaisse couche contenant des canaux tortueux, exemple: Chamberlain (porcelaine). Alors que les membranes filtrantes sont composées d'acétate de cellulose, de polycarbonates et autres. Elles sont poreuses avec des diamètres caractéristiques ($0,22\ \mu\text{m}$ pour les bactéries de petites tailles par exemple).

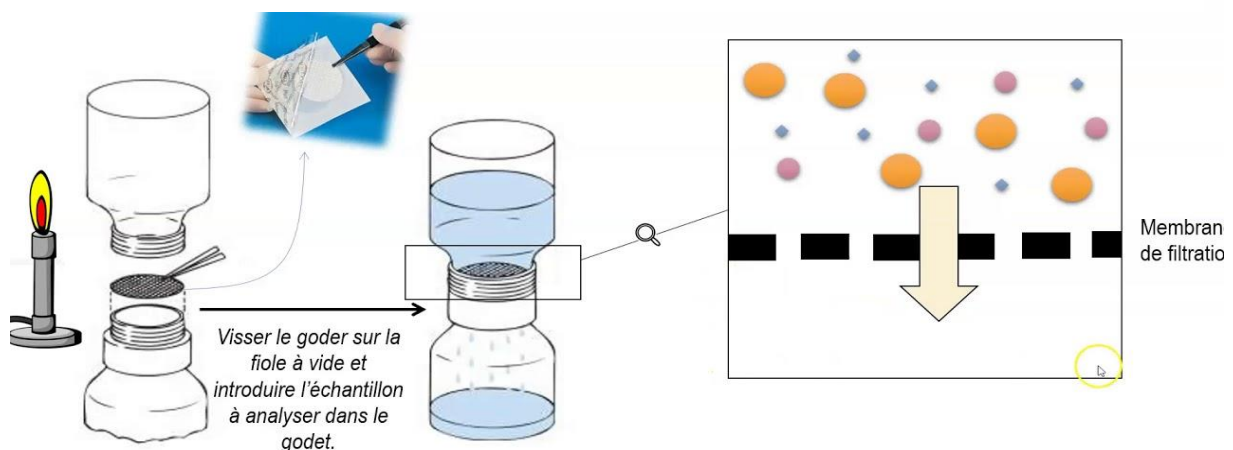


Figure 8: Technique de filtration sur membrane.

5. Centrifugation

Dans un milieu liquide, les particules et les bactéries peuvent être éliminées, grâce à des appareils permettant une accélération de l'ordre de 5000g. Le procédé de **bactofugation** consiste à centrifuger le lait pour en éliminer la plus grande partie des microorganismes, il est utilisé en complément de la **pasteurisation**.

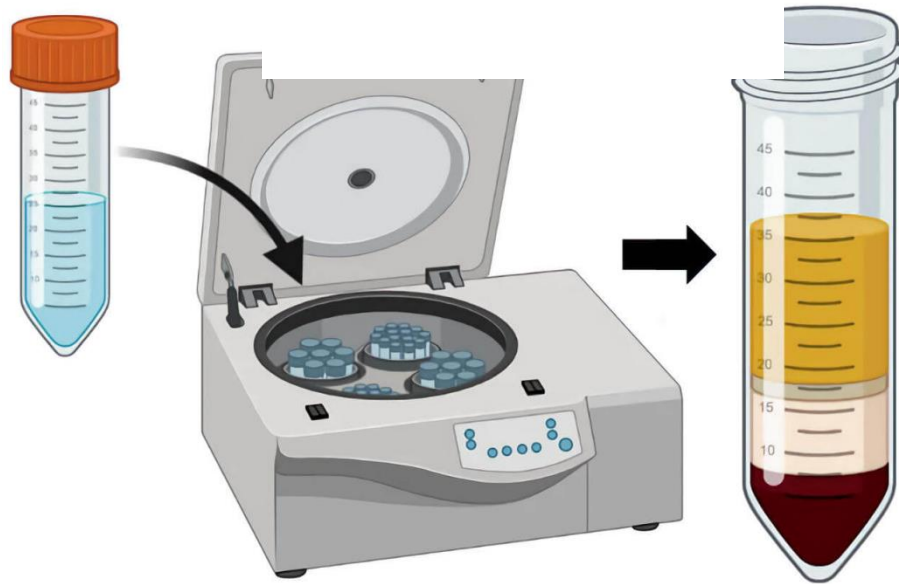


Figure 9: Représentation schématique de l'appareil de centrifugation (Centrifugeuse).

IV. Agents antimicrobiens chimiques

Les agents chimiques décrits jusqu'aujourd'hui, ont une application sur des objets inertes, ce sont alors les **agents désinfectants**. S'ils ont une application sur les tissus vivants (peau, plaie), c'est les **agents antiseptiques**. Ce sont en général des substances chimiques dont l'action toxique sur les microorganismes ou les cellules des tissus s'exprime par la coagulation structurale et la dénaturation d'enzyme essentielles. Les **désinfectants** et les **antiseptiques** sont souvent un même composé, utilisé selon le cas à des concentrations différentes. Les solutions les plus diluées étant antiseptiques et les plus concentrées désinfectantes.

1. Oxydants

Les agents oxydants oxydent les groupements thiols (SH) libres des enzymes et les altèrent irréversiblement:

1.1 Eau oxygénée (H_2O_2)

C'est un désinfectant des plaies, mais sa décomposition rapide limite son efficacité.

1.2 Chlore et dérivés

Le chlore, sous forme de gaz ou de diverses combinaisons chimiques (**hypochlorites** et **chloramines**), est le désinfectant de choix pour l'eau de distribution et les piscines, également employé dans les industries alimentaires. Son application produit de l'acide hypochloreux ($HClO$) entraînant une oxydation des constituants cellulaires. L'**eau de Javel** (hypochlorite de sodium: $NaOCl$) assure rapidement la destruction des bactéries et des champignons sur le sol ou les ustensiles. Seules les formes sporulées nécessitent des doses très élevées pour être éliminées. Il s'agit d'un désinfectant bon marché, efficace et facile d'utilisation.

1.3 Iode

L'iode, peu soluble dans l'eau, est utilisé en solution dans l'alcool (**teintures d'iode**) ou sous forme d'iodure de sodium ou de potassium. Il permet la désinfection de la peau (antisepsie préopératoire) et des plaies superficielles mais peut entraîner des brûlures. Les **iodophores** comme la **Bétadine** sont des complexes organiques libérant progressivement l'iode, solubles dans l'eau, non irritants et non tâchant.

2. Savons et détergents synthétiques

Les **savons** sont des sels sodiques ou potassiques d'acide gras de poids moléculaire élevé. Leur action est mécanique réduit les forces de tension superficielle et augmentent le pouvoir mouillant de l'eau, permettant ainsi l'emprisonnement des germes dans la mousse, puis leur élimination par rinçage.

Des composés à pouvoir mouillant, plus récemment synthétisés, sont également bactéricides : ce sont les **détergents** (ou **surfactants**), classés en trois catégories:

- Détergents anionique qui ont un groupement anionique actif.
- Détergents cationiques qui ont un groupement cationique actif.
- Détergents non ioniques qui n'ont pas d'activité antimicrobienne.

Les plus efficaces sont les sels d'ammonium quaternaires. Ils agissent par adsorption au niveau des surfaces cellulaires, détruisant la membrane plasmique et inactivant les

enzymes respiratoires. Les détergents ne sont pas biodégradables, leur déversement dans les rivières perturbe fortement l'équilibre écologique de celles-ci.

3. Autres

3.1 Alcools

Ce sont des désinfectants et des antiseptiques largement utilisés comme bactéricides et fongicides. L'éthanol et l'isopropanol sont utilisés en solution (70%). Ils agissent par dénaturation des protéines.

3.2 Métaux lourds et leurs sels

Les ions de métaux lourds comme le mercure, l'argent, l'arsenic, le zinc et le cuivre inactivent les enzymes des bactéries et des cellules de l'hôte, ce qui explique leur toxicité.

3.3 Phénols

Les composés phénoliques inhibent les systèmes enzymatiques ou découplent les réactions énergétiques. Largement utilisés autrefois en raison de leur efficacité contre les bacilles tuberculeux, ils sont remplacés par des antiseptiques moins irritants.

3.4 Aldéhydes

Le formaldéhyde et le glutaraldéhyde détruisent les virus, les bactéries et les champignons par dénaturation des protéines et des acides nucléiques. Ce sont d'excellents désinfectants des surfaces, des instruments et appareils.

3.5 Gaz

La stérilisation par les gazs est un procédé de plus en plus courant pour les objets thermosensibles (seringues, boîtes de Pétri...) et les locaux (chambres des malades).Formaldéhyde (vapeur à pouvoir bactéricide pour les locaux, chambres d'hôpitaux...), oxyde d'éthylène pour les tissus, plastiques..., ozone pour la potabilisation de l'eau.

3.6 Colorants

Les colorants sont utilisés comme antiseptiques à usage local : vert malachite, vert brillant, violet de méthyle, violet de gentiane, acridine... Ils ont fréquemment une action sélective vis-à-vis des bactéries à Gram positif ou à Gram négatif.

3.7 Conservateurs alimentaires

Un additif antimicrobien doit être bactéricide et doit agir également sur les champignons. Cependant, il doit conserver les caractères organoleptiques de l'aliment. Diverses méthodes sont utilisées depuis l'antiquité: salage, fumage, emploi de l'acide

lactique, de l'acide acétique....Autres conservateurs: acide sulfureux, bisulfite de sodium, acide benzoïque, acide salicylique, huiles essentielles....

4. Spectre d'action des agents antimicrobiens chimiques

Les agents antimicrobiens chimiques doivent être actifs contre une large gamme d'agents infectieux (bactéries, BAAR (bacilles acido-alcoolo-résistants), champignons et virus), ceci en dilution élevée et en présence de matières organiques. Ainsi, ils doivent avoir un bon pouvoir pénétrant (soluble dans l'eau et les lipides). De plus, les agents chimiques doivent être non toxiques pour les êtres vivants et non corrosifs pour les objets inertes. Ils doivent être stables durant leur conservation.

V. Agents chimiothérapeutiques

Les **agents chimiothérapeutiques** sont des agents chimiques d'**origine microbienne ou de synthèse**, utilisés par l'homme pour lutter contre les microorganismes pathogènes: bactérie, champignons, protozoaires et virus, chez l'homme ou l'animal, afin d'inhiber leur croissance ou de les détruire. Leur usage interne est possible, grâce à leur **toxicité sélective**. En effet, ils ciblent le microorganisme sans endommager l'hôte. La chimiothérapie est l'usage des substances chimiques pour le traitement des maladies. Les agents chimiothérapeutiques sont utilisés dans le traitement des maladies infectieuses. Leur **spectre d'activité** peut être **étroit** ou **large**.

1. Antibiotiques

L'action **bactériostatique** de certains microorganismes envers d'autres avait été observée en 1877 par Louis Pasteur (1822 - 1895) et M. Joubert (à propos du bacille charbonneux), mais ce n'est qu'en 1929 qu'Alexander Fleming (1881 - 1955) constate que la culture en boîte de Pétri de staphylocoques est inhibée par la présence de moisissures du genre *Penicillium*. Fleming proposa que le champignon sécrétait une substance chimique bactériostatique, utilisable en thérapeutique humaine. Un peu plus tard, la culture en masse permit de disposer de grandes quantités de cette substance: **la pénicilline**.

Plusieurs années de recherche étaient nécessaires pour optimiser les conditions de production de la pénicilline et permettre son utilisation à grande échelle pendant la Seconde Guerre mondiale. En 1937, les premiers sulfamides, plus toxiques que la pénicilline, sont également découverts. Ces deux découvertes médicales majeures marquent le début de la découverte de nombreuses familles d'antibiotiques soit naturels (produits par des microorganismes), soit synthétiques (produits chimiquement, sans l'intervention de

microorganismes), soit semi-synthétiques (antibiotiques naturels modifiés chimiquement afin d'en changer les propriétés).

Tableau 1 : Classes et premières années d'utilisation des principaux antibiotiques.

Antibiotiques	Classe	Première année d'utilisation en santé humaine
<i>p</i>-aminophénylsulfamide	Sulfamides	1937
Pénicilline	β -lactamines	1943
Streptomycine	Aminosides	1947
Tétracycline	Cyclines	1952
Méticilline	β -lactamines	1960
Acide nalidixique	Quinolones	1964
Gentamicine	Aminosides	1967
Vancomycine	Glycopeptides	1972
Céfotaxime	β -lactamines	1981
Linézolide	Oxazolidinones	2000
Daptomycine	Glycolipopeptides	2003
Ceftolozane-tazobactam	β -lactamines	2017

En dehors des microorganismes du genre *Penicillium*, les bactéries du genre *Streptomyces* produisent de nombreux antibiotiques. Les bactéries du genre *Streptomyces* ont pour habitat naturel le sol où ils jouent un rôle important dans la décomposition et la minéralisation des matières organiques, grâce à la synthèse de nombreuses enzymes (amylases, chitinases, cellulases, protéases).

Les *Streptomyces* produisent environ deux tiers de tous les antibiotiques connus. L'abondance et la diversité structurale des antibiotiques synthétisés par ces bactéries ne se retrouvent chez aucun autre genre bactérien. Presque toutes les classes d'antibiotiques sont synthétisées: les **β -lactamines** (ampicilline), les **synergistines** (pristinamycine),

les antibiotiques **aminoglycosidiques** (streptomycine, kanamycine), les **macrolides** (érythromycine, spiramycine), les **cyclines** (tétracycline) et autres. Cependant, les principaux microorganismes producteurs d'antibiotiques sont des bactéries des genres: *Streptomyces* (Streptomycine, Néomycine, Erythromycine, Kanamycine...), *Bacillus* (Bacitracine, Polymyxines) et des moisissures (*Penicillium* (Pénicillines, Griséofulvine...)). Depuis les années soixante (60), de nombreux antibiotiques sont obtenus par synthèse ou semi-synthèse.

1.1 Définition

Les antibiotiques sont des substances chimiques produites par des microorganismes ou par synthèse capables d'inhiber le développement et de détruire les bactéries et d'autres microorganismes.

L'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose d'une manière spécifique, à l'égard des virus, des microorganismes ou même de certains êtres pluricellulaires.

1.2 Classification

La classification des antibiotiques peut se faire selon leur:

- **Origine** qui peut être élaborée par un microorganisme (naturel) ou produit par synthèse (synthétique ou semi synthétique).
- **Structure chimique** qui est très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex : cycle β lactame) sur laquelle il y a hémi-synthèse.
- **Mode d'action** où ils agissent sur la paroi, sur la membrane cytoplasmique, sur la synthèse des protéines ou sur la synthèse des acides nucléiques.
- **Spectre d'activité** qui est la liste des espèces sur lesquelles les antibiotiques sont actifs (spectre étroit ou large).

1.3 Familles d'antibiotiques (substances antibiotiques)

Les antibiotiques perturbent des mécanismes essentiels de la vie cellulaire (réplication, transcription, traduction, synthèse de la paroi...) ce qui **inhibe** la croissance bactérienne : **effet bactériostatique** ou tue les bactéries : **effet bactéricide**. Comme les cibles moléculaires des antibiotiques sont présentes uniquement chez les bactéries, ces substances n'interfèrent pas avec la vie des cellules eucaryotes et n'ont pas d'effet sur les virus.

Il existe de nombreux antibiotiques, qui peuvent être classés en familles selon leurs modes d'action ou leur structure moléculaire :

1.3.1 Antibiotiques bactéricides

- **Béta-lactamines** (comme la **pénicilline**, **céphalosporine**, **céphamycine**) inhibent la synthèse de la paroi bactérienne.
- **Aminosides** (comme la **streptomycine**, **gentamycine**, **tobramycine**, **kanamycine**, **néomycine**) interfèrent avec le ribosome et empêchent la traduction des ARN messagers en protéines.
- **Sulfamides** (sulfadiazine) qui bloquent les voies métaboliques de la synthèse des acides nucléiques.
- **Imidazoles**.
- **Macrolides** (comme l'**érythromycine**) bloquent la sous-unité 50S du ribosome procaryote en inhibant sa translocation ou la péptidyl-transférase.
- **Fosfomycines** inhibent la synthèse de la paroi bactérienne.
- **Quinolones** (comme l'**acide nalidixique**, la **norfloxacin**) empêchent la réplication de l'ADN bactérien en bloquant l'ADN gyrase et la topoisomérase II.
- **Glycopeptides** inhibent la formation de la paroi bactérienne en bloquant la synthèse des peptidoglycane.
- **Polypeptides** (comme la **gramicidine**, la **bacitracine**, **polymyxine**, **vancomycine**) dont le mode d'action est très variables.

1.3.2 Antibiotiques bactériostatiques

- **Phénicols** (comme le **chloramphénicol**) bloquent la péptidyl-transférase du ribosome bactérien.
- **Tétracyclines** inhibent la fixation des ARN de transfert sur le complexe ribosome-ARN messager, et perturbent la traduction (**tétracycline**, **chlortétracycline**, **oxytétracycline**).

1.4 Mécanisme d'action

Par définition, le mécanisme de l'action antibiotique implique une ou plusieurs cibles moléculaires spécifiques. Les principaux sites d'action des antibiotiques sont la paroi bactérienne, le ribosome, l'ADN bactérien, la membrane cytoplasmique.

a) Paroi bactérienne

La cible des antibiotiques au niveau de la paroi bactérienne est un constituant indispensable à la bactérie : le **peptidoglycane**. Celui-ci est en perpétuel remaniement, résultat d'un équilibre dynamique fragile entre activité de synthèse par les PLP (protéines liant la pénicilline) et d'hydrolyse par les autolysines.

Les **β -lactamines** (pénicillines, céphalosporines) forment une famille d'antibiotiques caractérisée par la présence d'un noyau **β -lactame**. Ces molécules sont capables de se lier aux PLP par liaison covalente et d'inhiber leur activité. L'équilibre entre lyse et synthèse du peptidoglycane est alors rompu, les bactéries deviennent incapables de résister à la pression osmotique exercée sur leur membrane plasmique et meurent par lyse osmotique.

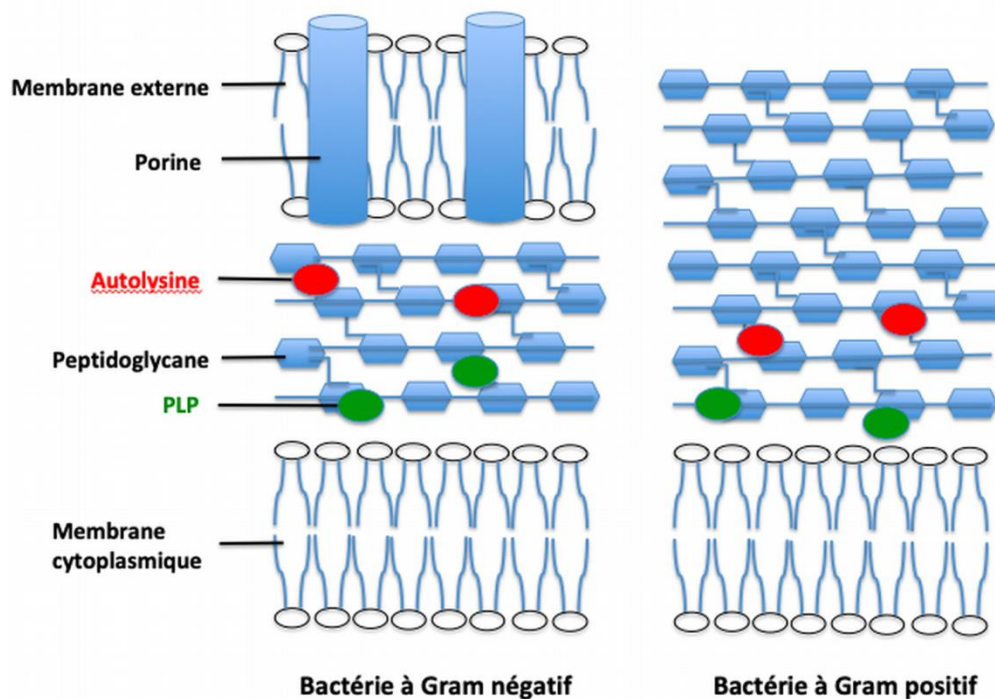
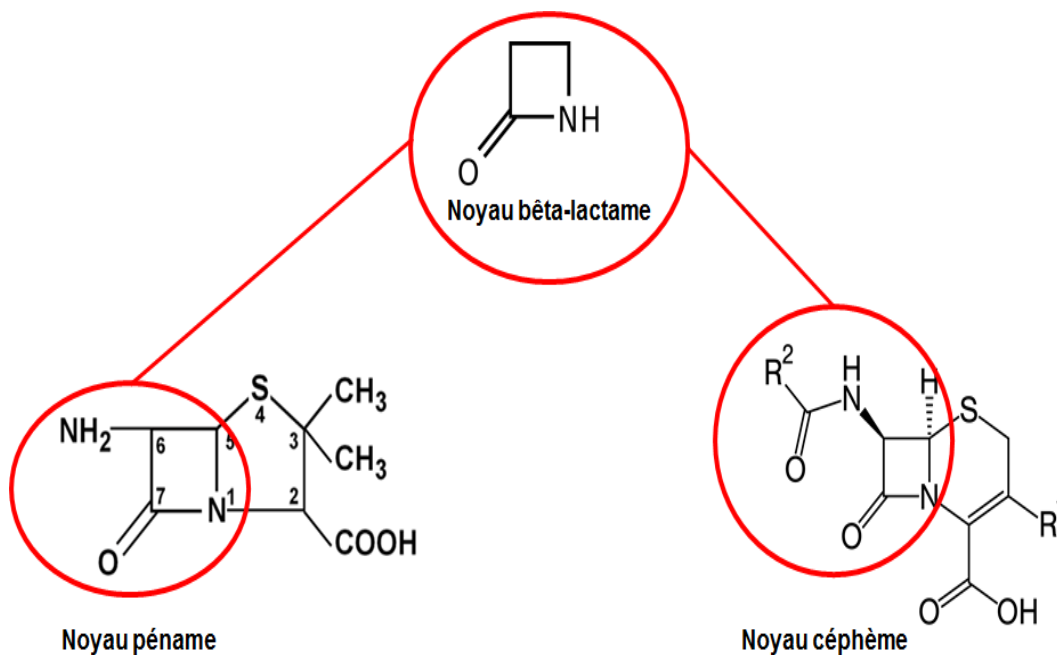


Figure 10: Structure de la paroi bactérienne.

Les **glycopeptides**, le **fosfomycine**, la **cyclosérine**, la **bacitracine** perturbent aussi la biosynthèse du peptidoglycane, induisant la perte et la mort cellulaire par lyse de la cellule bactérienne. L'**isoniazide**, l'**éthambutol** et le **pyrazinamide**, sont trois antituberculeux, agissent également sur des cibles de la paroi de *Mycobacterium tuberculosis* impliquant le métabolisme des acides mycoliques.

➤ **β-Lactamines**

Les β-lactamines sont caractérisées par un cycle **β-lactame** associé à un noyau thiazolidine formant l'acide 6-amino-pénicillinique (**pénicillines**) ou à un noyau dihydrothiazine formant l'acide 7-amino-céphalosporanique (**céphalosporines**). Ces antibiotiques, actifs lorsque les bactéries sont en phase de croissance exponentielle, **inhibent la synthèse de peptidoglycane**, et plus particulièrement la réaction de **transpeptidation**. Les β-lactamines se fixent sur des protéines liant la pénicilline (**PLP** ou **PBP**) : ce sont principalement des enzymes (carboxypeptidases) qui interviennent dans l'assemblage du peptidoglycane. Les β-lactamines activent également les **autolysines** bactériennes. Il s'agit d'une famille qui comprend cinq groupes majeurs : les **Pénames**, les **pénèmes**, les **oxapénames**, les **céphèmes** et les **monobactames**.



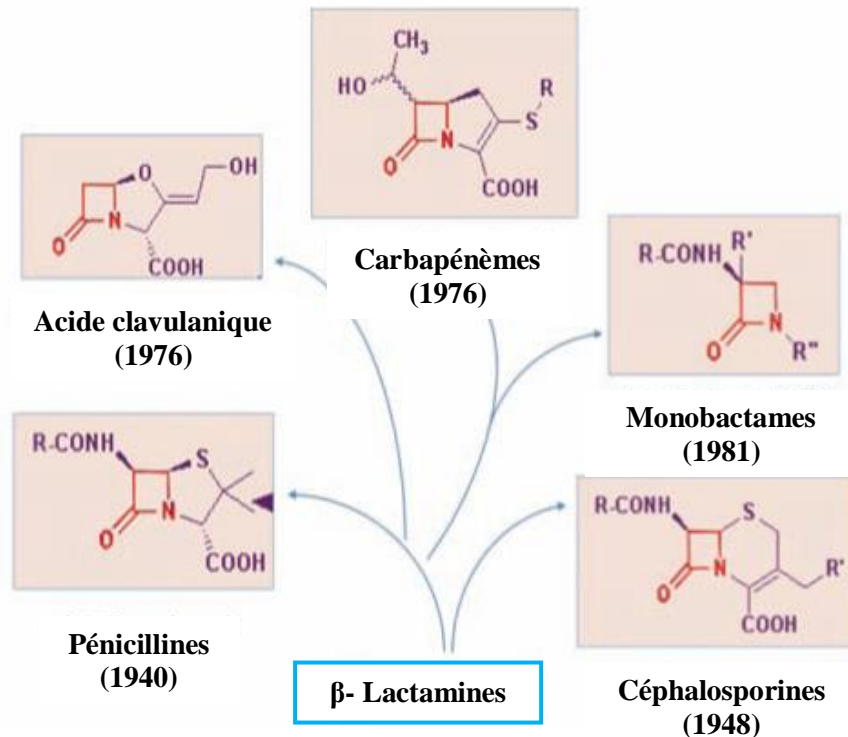


Figure 11: Structure chimique des β -lactamines .

➤ Glycopéptides

Les **glycopeptides** constituent une famille d'antibiotiques dont les deux représentants sont la **vancomycine** et la **teicoplanine**. Ils agissent en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne en bloquant la synthèse du peptidoglycane par liaison avec l'aminoacyl-D-alanyl-D-alanine. Non absorbés par voie orale, ils sont exclusivement utilisés par voie parentérale pour les infections systémiques. Leur spectre d'action étroit est dirigé contre les bactéries à Gram positif. Ils sont réservés aux traitements des infections graves documentées ou présumées à des bactéries à Gram positif résistantes aux β -lactamines ou chez des patients allergiques aux β -lactamines.

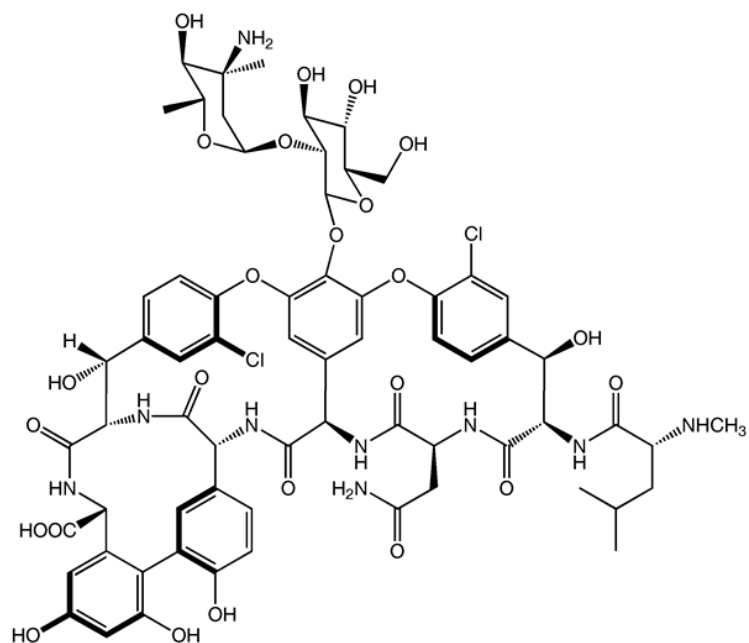


Figure 12: Structure chimique de la Vancomycine.

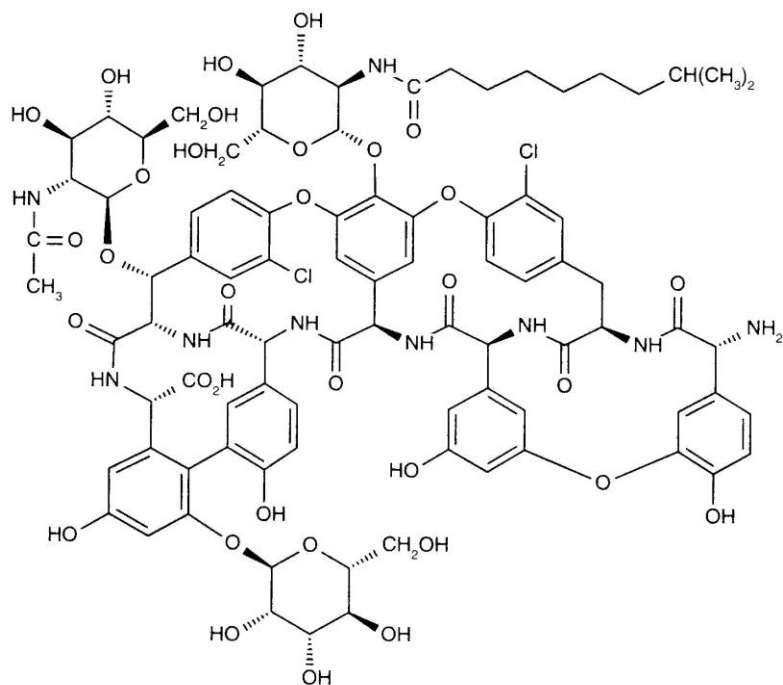


Figure 13: Structure chimique de la Teicoplanine.

➤ **Fosfomycine**

La **fosfomycine** agit en inhibant la synthèse du peptidoglycane de la paroi des bactéries, plus précisément sur la pyruvate-N-acétylglucosamine-transférase qui va servir à la formation des précurseurs du peptidoglycane.

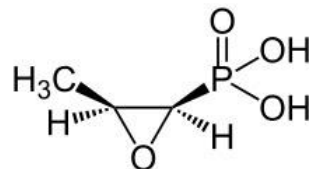


Figure 14: Structure chimique de la Fosfomycine.

➤ **Cyclosérine**

La **cyclosérine** est un analogue de l'acide aminé D-alanine. Il interfère avec une étape précoce de la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne dans le cytoplasme par inhibition compétitive de deux enzymes, la L-alanine racémase, qui forme la D-alanine à partir de la L-alanine, et la D-alanylalanine synthétase, qui incorpore la D-alanine dans le pentapeptide nécessaire à la formation de peptidoglycane et à la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne.

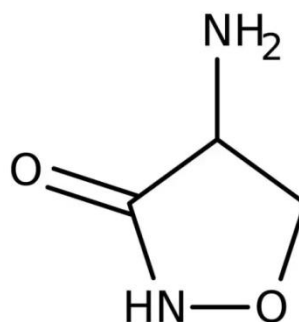


Figure 15: Structure chimique de la Cyclosérine.

➤ **Bacitracine**

Elle inhibe la synthèse du péptidoglycane en se fixant sur le lipide transporteur des nucléotides précurseurs, au travers de la membrane cytoplasmique dont elle empêche la phosphorylation.

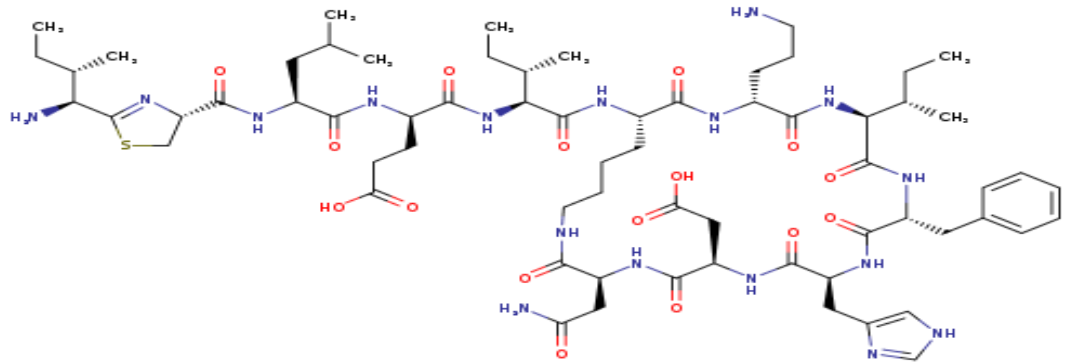
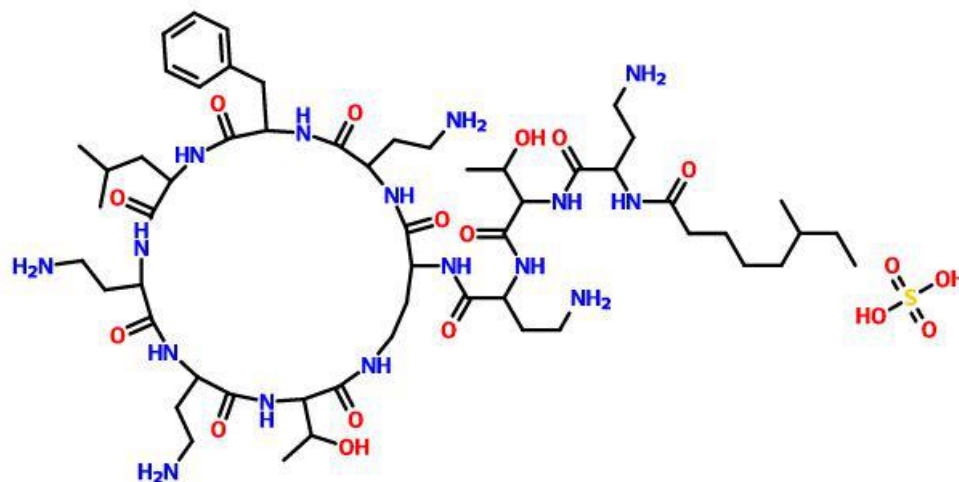


Figure 16: Structure chimique de la Bacitracine.

b) Membrane interne

En dénaturant les phospholipides de la membrane interne, les agents **polycationiques** (**polymyxines**, **bacitracine**) ou **polyéniques** (**nystatine**) provoquent la fuite fatale de composés intracellulaires par rupture de la perméabilité cellulaire.



Polymyxine B sulfate

Figure 17: Structure chimique de la Polymyxine B sulfate.

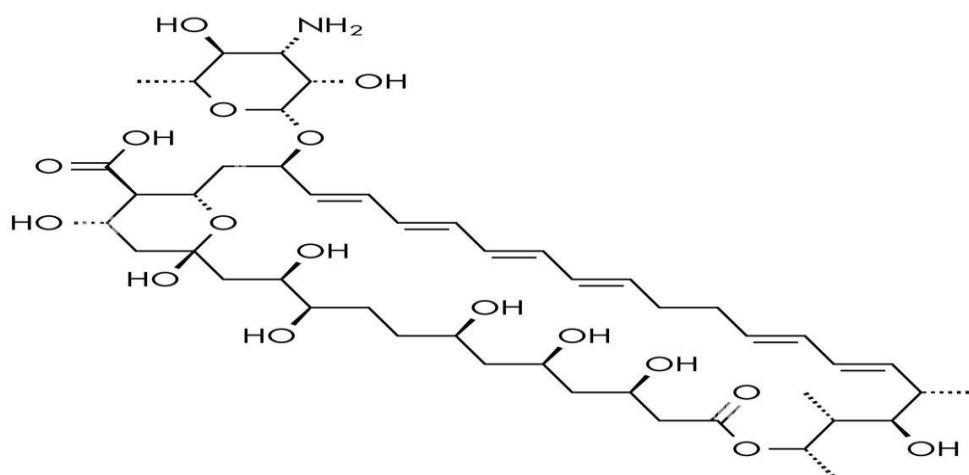


Figure 18: Structure chimique de la Nystatine.

c) Synthèse protéique

Le ribosome bactérien est la cible supramoléculaire de nombreux antibiotiques, provoquant l'arrêt plus ou moins brutal de la synthèse protéique. L'inhibition de la synthèse protéique est également l'un des principaux mécanismes d'action des antibiotiques. Les

aminosides (amikacine, gentamicine) se fixent à l'ARN ribosomal 16S (de la sous-unité 30S du ribosome) et altèrent la synthèse protéique. En raison d'erreurs de lecture, des protéines anormales sont intégrées à la membrane cytoplasmique entraînant une perte de l'intégrité membranaire. Ainsi, d'autres mécanismes d'inhibition de la synthèse protéique existent :

- ✓ L'inhibition des liaisons peptidiques par les **phénicols** (**Chloramphénicol**, **Thiamphénicol**).

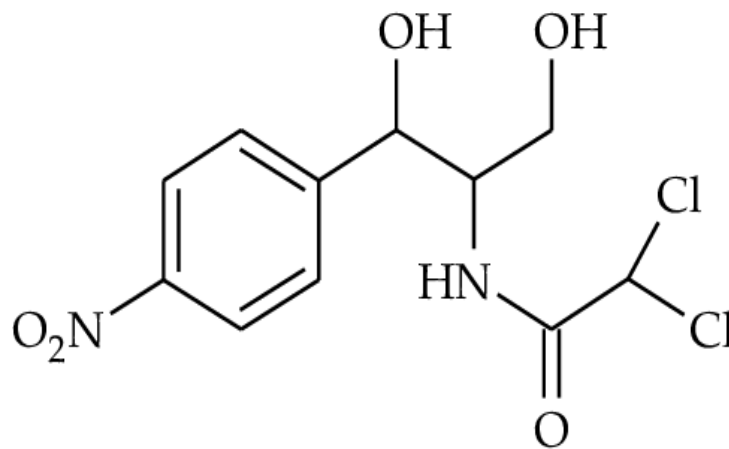


Figure 19: Structure chimique du Chloramphénicol.

- ✓ l'inhibition de l'élongation protéique par les **aminosides** (Streptomycine, Gentamicine...) et les **tétracyclines** (Oxytétracycline, Chlortétracycline...)

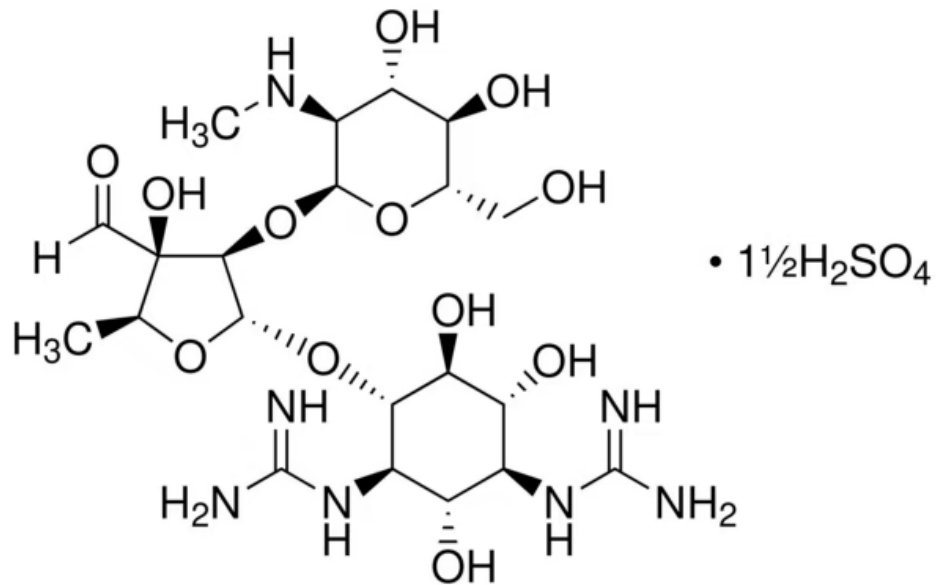


Figure 20: Structure chimique de la Streptomycine.

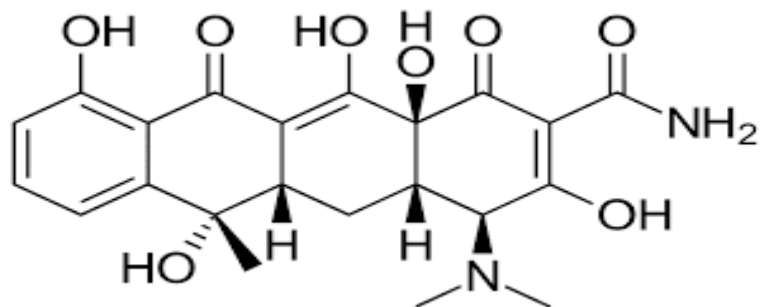


Figure 21: Structure chimique des Tétracyclines.

- ✓ l'inhibition de la translocation par les **macrolides** (Erythromycine, Oléandomycine, Roxithromycine...), et apparentés (**lincosamides**, **streptogramines** ou **synergistines**, **kétolides**), le linézolide et les everninomycines.

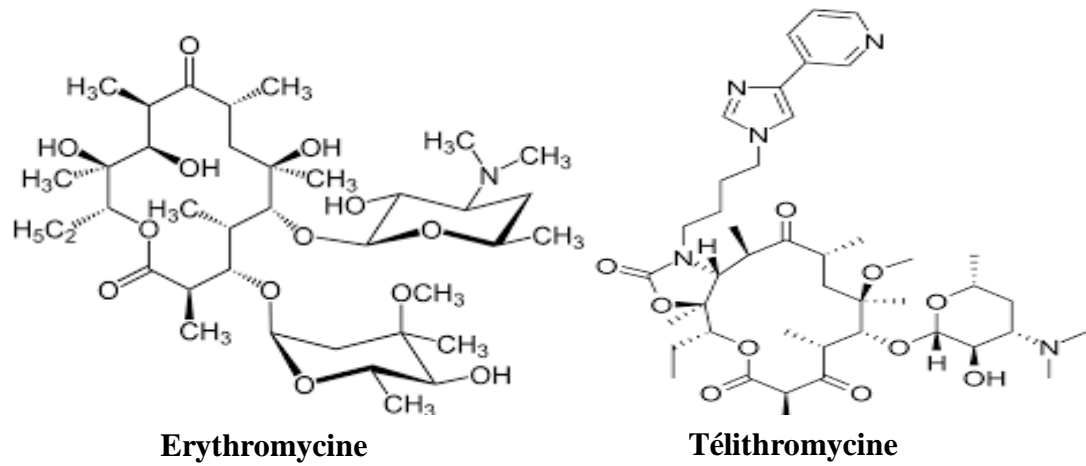


Figure 22: Structure chimique des Macrolides.

✓ L'inhibition des étapes post-translocation par l'acide fusidique.

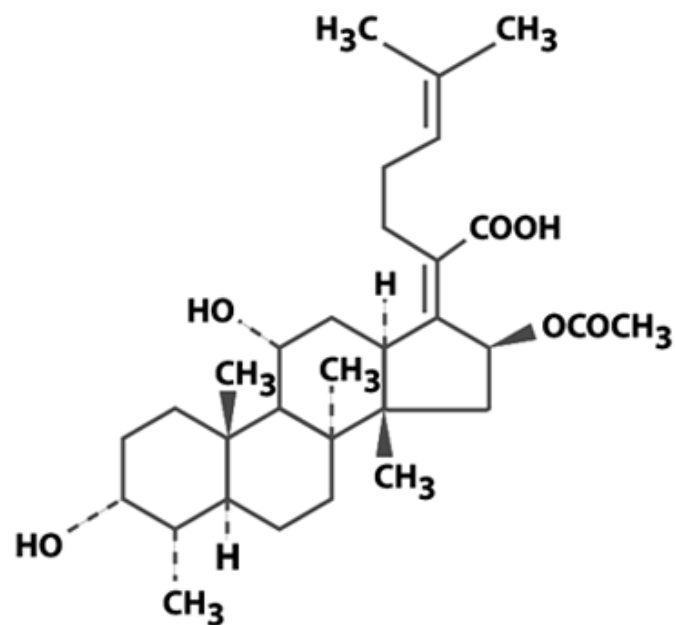


Figure 23: Structure chimique de l'acide Fusidique.

c) Synthèse des acides nucléiques

Les antibiotiques peuvent également inhiber la réplication de l'ADN. Lors de celle-ci, l'ADN gyrase crée des coupures dans le double brin d'ADN. Ces coupures normalement transitoires, sont suivies d'un recollage des deux brins par la gyrase. L'activité des **fluroquinolones (ofloxacin)** est expliquée par la formation d'un complexe ternaire irréversible quinolone-ADN-gyrase. Le fonctionnement de l'enzyme est altéré et la coupure de l'ADN n'est pas réparée aboutissant à la mort cellulaire. De nombreuses erreurs dans la synthèse de l'ADN bactérien s'obtiennent par :

- ✓ L'inhibition de l'ARN-polymérase avec les **rifamycines**,
- ✓ L'inhibition de la synthèse des purines par les **sulfamides** et le **cotrimoxazole**.
- ✓ Les **nitro-imidazolés** et les **nitrofuranes** agissent également sur le génome bactérien selon des mécanismes moins bien connus.

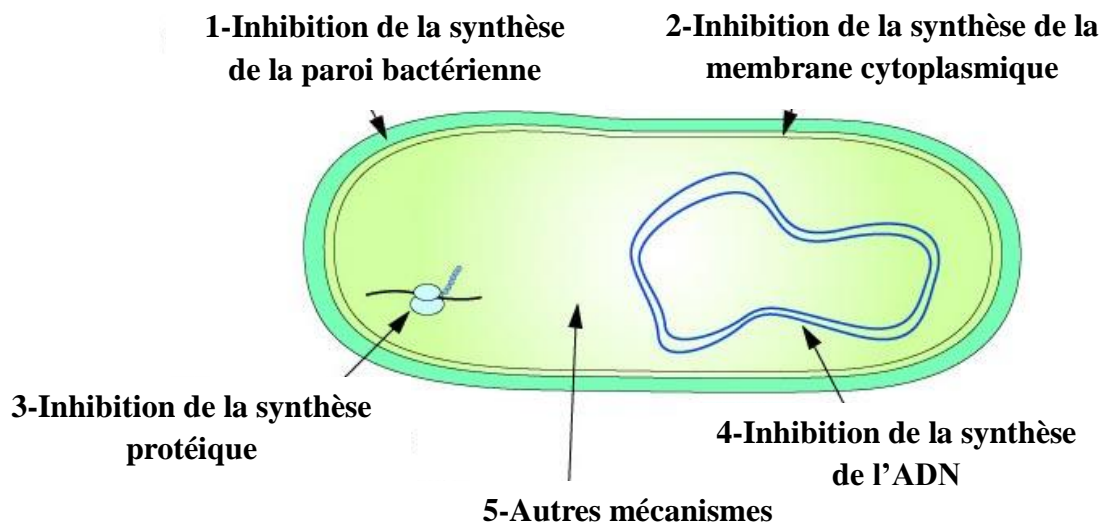


Figure 24: Représentation schématique du mécanisme d'action des antibiotiques.

2. Antifongiques

Les **antifongiques** (ou antifungiques) tirent leur nom du latin *fungus* qui signifie champignons. Les antifongiques sont aux champignons ce que les antibiotiques sont aux bactéries. Ce sont donc des agents chimiothérapeutiques utilisés pour lutter contre les infections locales ou profondes à champignons microscopiques appelées **mycoses**. Ces infections sont surtout fréquentes sur la peau, les cheveux, les ongles, les muqueuses et les organes génitaux.

2.1 Mécanisme d'action

A la différence des antibiotiques qui agissent en différents points des bactéries, les antifongiques agissent principalement au niveau de la membrane cellulaire des champignons. En la perforant, les antifongiques **rompent l'intégrité de la cellule et entraînent leur mort (action fongicide)**. Soit en **bloquant la division cellulaire**, arrêtant ainsi la reproduction des champignons (**action fongistatique**).

2.2 Classification

Les antifongiques sont classés en quatre familles:

2.2.1 Echinocandines

La **caspofungine** est le premier représentant d'une nouvelle classe d'antifongiques des **échinocandines**. Son utilisation est actuellement limitée au traitement des aspergilloses sévères en cas d'échec ou d'intolérance aux autres antifongiques.

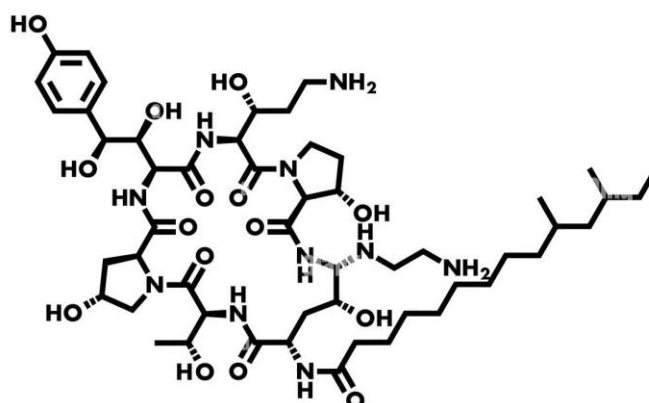


Figure 25: Structure chimique de la Caspofungine.

2.2.2 Amphotéricine B ou Fungizone

Cet antifongique est issu de la culture de *Streptomyces nodosus*. Cette molécule de la famille des **polyènes** est active sur la plupart des **champignons pathogènes**. Elle est utilisée en injectable ou par voie orale pour traiter des **mycoses systémiques profondes** comme aspergillose et candidoses. Globalement, ce médicament est utilisé surtout pour les mycoses profondes.

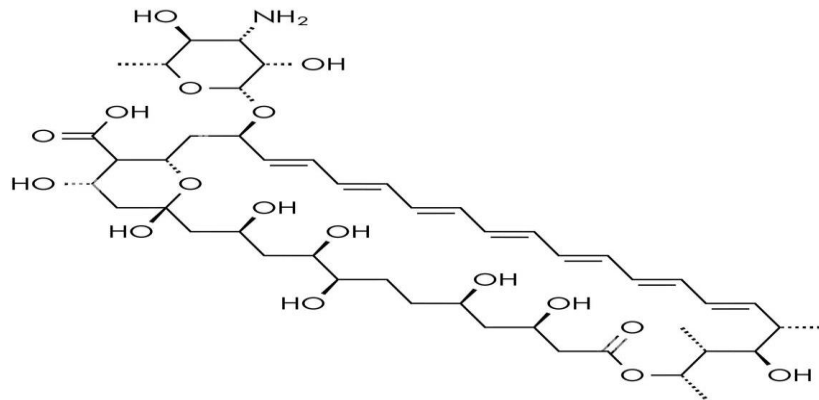


Figure 26: Structure chimique de l'Amphotéricine B.

2.2.3 Flucytosine

La **flucytosine** est un **antimétabolite** d'utilisation exceptionnelle du fait de l'émergence très rapide de résistances et de ses nombreux effets indésirables (troubles hématologiques, neuropsychiques, hépatiques). Par voie orale ou injectable, cet antifongique est utilisé pour traiter les mycoses profondes dues à des levures (candidoses, cryptococcoses, aspergilloses). Il est le plus souvent utilisée en association avec un autre antifongique (amphotéricine B ou azolés), car les cas de résistance sont nombreux.



Figure 27: Structure chimique de la Flucytosine.

2.2.4 Dérivés azolés

Les **antifongiques azolés** représentent une classe assez hétérogène, tant sur le plan de l'efficacité antifongique et des effets indésirables que sur la plan pharmacocinétique. Ce sont le **kétoconazole**, le **fluconazole**, l'**itraconazole** et le **voriconazole**. Selon les molécules, les dérivés azolés sont utilisés aussi bien dans les mycoses superficielles que profondes. Ainsi, le fluconazole est utilisé dans le traitement des cryptococcoses neuro-méningées et les candidoses systémiques, l'itraconazole dans le traitement l'aspergillose invasive et le voriconazole dans le traitement de première intention des aspergilloses invasives et les infections à mycoses rares.

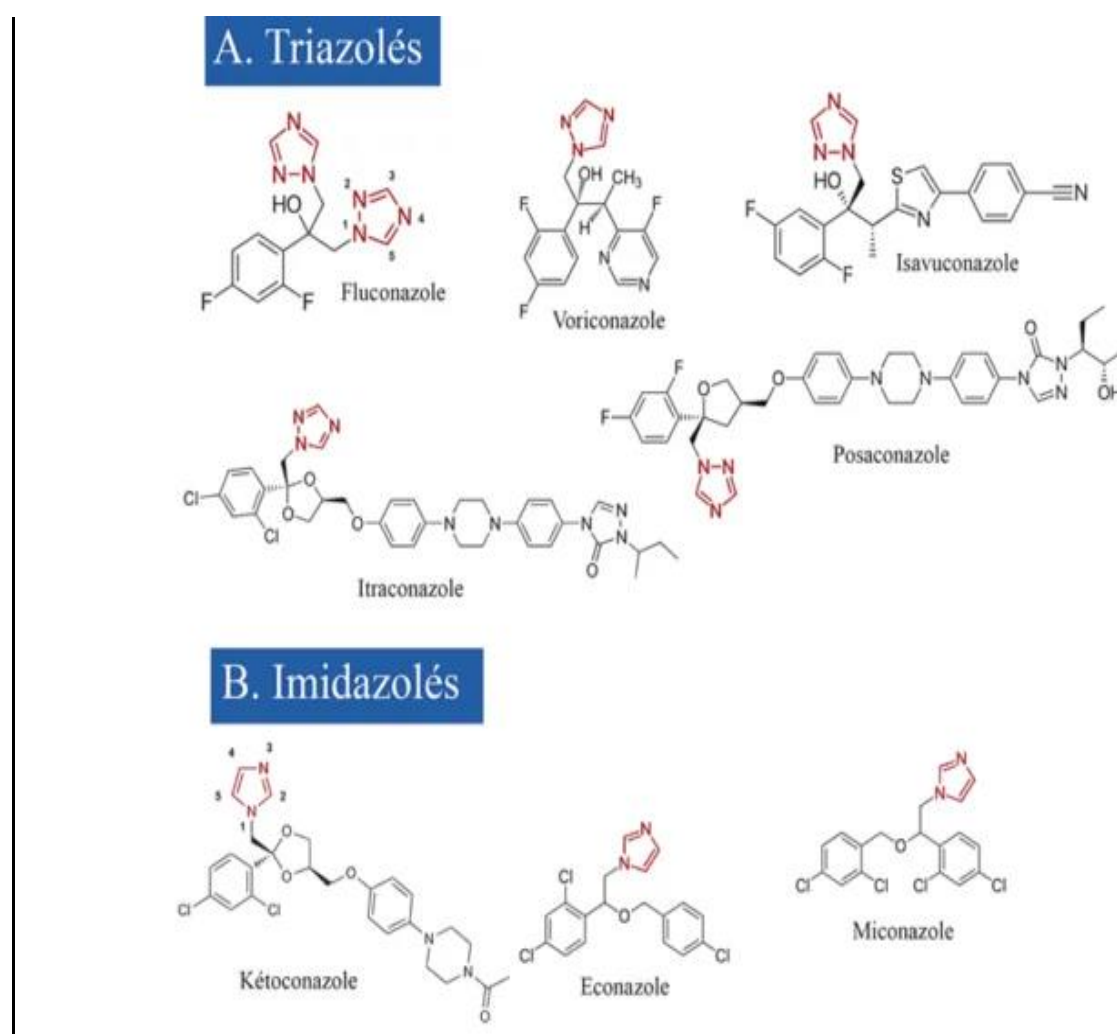


Figure 28: Structure chimique des dérivés azolés.

3. Antiviraux

Les **agents antiviraux** sont des substances chimiques de synthèse, capable de lutter contre les virus de diverses manières. L'usage d'antiviraux est relativement récent. Durant longtemps, il a semblé peu probable de pouvoir toucher les virus avec des médicaments dans la mesure où ils sont des parasites intracellulaires. Les agents antiviraux se répartissent en **agent virucides** et en **agents virostatiques**. Cependant, il existe diverses substances antivirales qui agissent de différentes manières, elles sont classées selon leurs cibles au cours du cycle de multiplication des virus. Actuellement les antiviraux utilisés en médecine sont tous des **agents virostatiques**.

3.1 Mécanisme d'action

Les molécules antivirales peuvent agir au niveau des étapes précoces, au niveau des étapes de réplication du génome (la majorité des molécules) et aussi au niveau des étapes tardives de maturation ou de libération. Cependant, l'action des antiviraux repose sur deux grands principes pharmacologiques :

- Soit l'**immunomodulation** qui module la réponse immunitaire de l'hôte.
- Soit l'**inhibition de la réplication virale** en bloquant une ou plusieurs étapes du cycle de réplication viral.

3.1.1 Agent Immunomodulateurs

Ce sont des agents antiviraux qui modulent la réponse immunitaire de l'hôte. C'est le cas des **interférons**, qui sont des petites protéines secrétées par l'hôte (suite à une infection virale) et qui sont capables d'inhiber la réplication des virus. Ce mécanisme d'action est uniquement utilisé dans la prise en charge des **hépatites virales chroniques**. Les **interférons** sont très utilisés dans le traitement des cancers viraux.

3.1.2 Agent qui inhibe la réplication du virus dans la cellule hôte

Ce sont pratiquement les médicaments antiviraux susceptibles d'être utilisés en médecine humaine. Ils agissent selon différentes manières:

a) **Inhibition de l'adhésion du virus à la cellule hôte**

C'est le cas des **antigrippaux** tels que l'**amantadine** et la **rimantadine**. L'**Amantadine**, une amine cyclique, bloque la liaison entre le virus A de la grippe et la cellule cible.

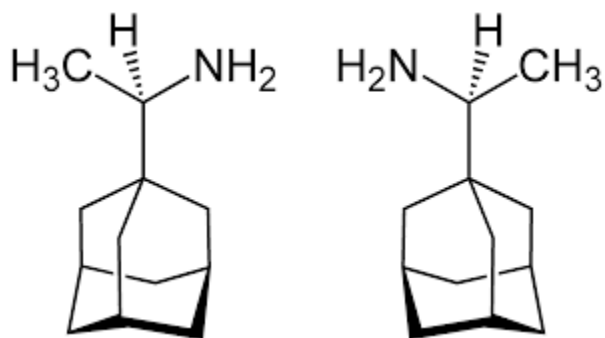


Figure 29: Structure chimique de l'Amantadine et de la Rimantadine.

b) Les antiviraux inhibant la décapsidation des virus

Dans cette catégorie on trouve l'**Aciclovir** (traitement de l'herpès viral) et l'**AZT** (azidothymidine) qui fait partie des premiers virucides anti-VIH (SIDA).

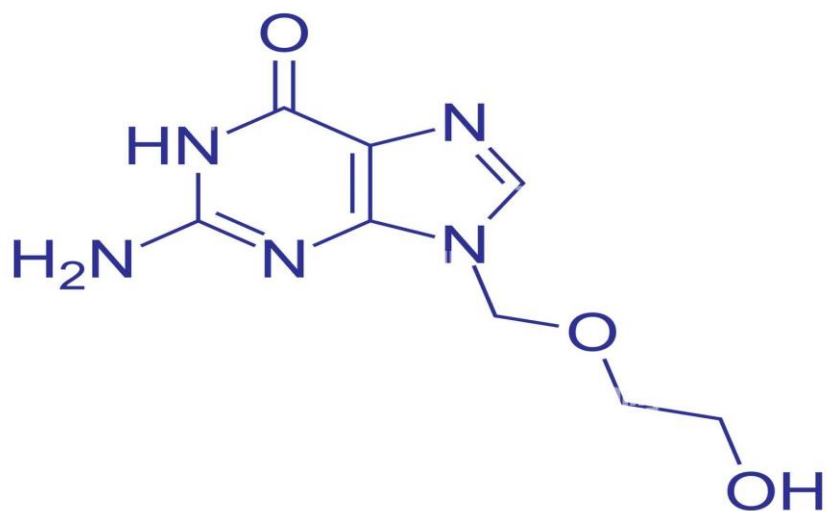


Figure 30: Structure chimique de l'Aciclovir.

c) Inhibition de la réplication virale

Cette inhibition peut être compétitive (blocage du site actif de l'enzyme virale cible grâce à des analogues nucléosidiques ou nucléotidiques) ou non compétitive (blocage de l'enzyme virale sur un site différent de celui de fixation des nucléotides naturels).

Par exemple, en bloquant l'ADN polymérase ARN dépendante du VIH (la transcriptase inverse) par les inhibiteurs nucléosidiques ou non nucléosidiques, il y a alors formation d'un ADN proviral qui ne peut pas s'intégrer au génome cellulaire.

d) Inhibition de l'intégration du génome viral au génome cellulaire

Ce sont les **inhibiteurs de l'intégrase du VIH (Raltégravir, Elvitégravir, Dolutégravir)**. L'intégrase est l'enzyme qui assure l'intégration de l'ADN d'origine virale à l'ADN humain, étape nécessaire à la reproduction du virus.

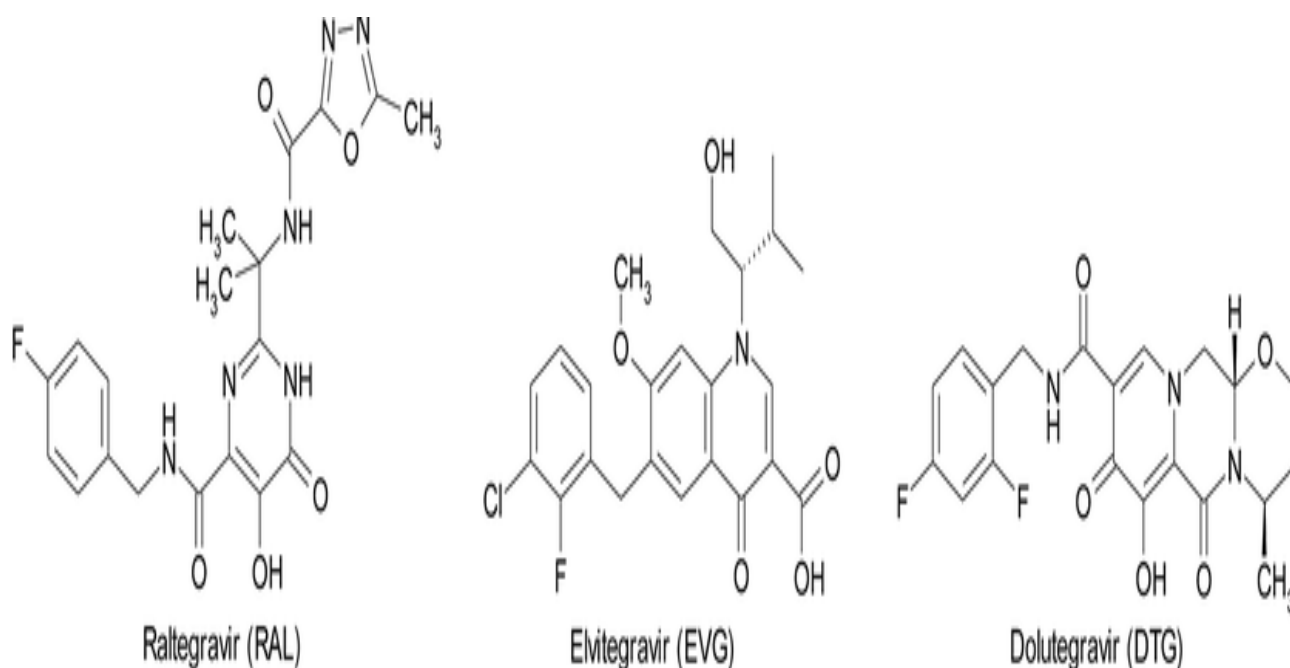


Figure 31: Structure chimique du Raltégravir, de l'Elvitégravir
et du Dolutégravir.

e) Inhibition de la maturation des particules virales

Les molécules agissent en fin de cycle de réplication virale selon un mécanisme d'action commun. Elles se lient de manière compétitive au site actif de la protéase du VIH-1 et empêchent ainsi le clivage des précurseurs polypeptidiques gags et pol viraux en

protéines de structure définitive. Les particules virales nouvellement formées sont alors immatures et non infectieuses.

f) Inhibition de la libération des particules virales

Ce sont les **antiviraux inhibant la Neuraminidase** (enzyme à la surface des virus d'influenza) et bloquent le processus de libération des virus par bourgeonnement de la membrane cellulaire, **Oseltamivir (Tamiflu)** par exemple.

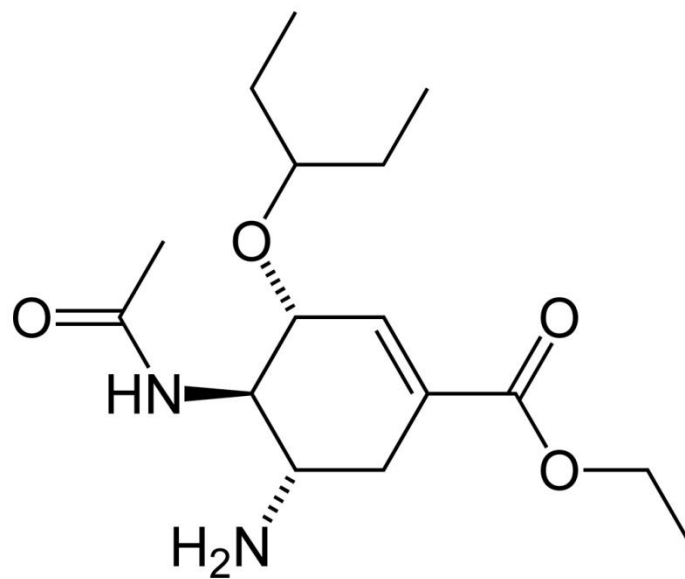


Figure 32: Structure chimique de l'Oseltamivir.

VI. Résistance aux antibiotiques

1. Historique

Les **antibiotiques** ont représenté une avancée médicale majeure au cours du XX^{ème} siècle. Non seulement ils éliminent de manière efficace les bactéries pathogènes, avec le plus souvent peu d'effets indésirables, mais ils permettent de lutter contre un grand nombre d'infections telles que les pneumonies, les bronchites, les otites, les méningites, les infections urinaires, les septicémies, les maladies sexuellement transmissibles, etc. Cependant, leur efficacité est aujourd'hui menacée avec l'émergence dans le monde entier de **pathogènes résistants** à ces traitements, qui mettent en péril la santé des populations. Chaque année, la **résistance aux médicaments** pour traiter la tuberculose, à elle seule, est responsable de 250 000 morts.

Dès 1945, Alexander Fleming s'alarma du **risque de résistance** : « Je crains que si la pénicilline est en vente libre, les patients ne s'essaient à l'automédication, et ne prennent pas les doses suffisantes. En cas de doses trop faibles, les microbes ne sont pas tués. Et ils risquent d'apprendre à résister à la pénicilline. Voici quelques règles simples pour l'usage de la pénicilline:

Premièrement : ne l'utilisez que sur des microbes appropriés.

Deuxièmement : utilisez-la de manière à ce qu'elle soit en contact avec le microbe.

Troisièmement : prenez-la en dose suffisante.

Quatrièmement : prenez-la assez longtemps pour tuer le microbe ».

Quant au problème de l'**antibiorésistance**, il fut soulevé par Fleming lui-même dès 1945. Il pressentait les risques liés à une mauvaise utilisation de la molécule qu'il avait découverte :

« Cela aboutirait à ce que, au lieu d'éliminer l'infection, on apprenne aux microbes à résister à la pénicilline et à ce que ces microbes soient transmis d'un individu à l'autre, jusqu'à ce qu'ils en atteignent un, chez qui ils provoqueraient une pneumonie ou une septicémie que la pénicilline ne pourrait guérir ».

L'avertissement lancé par Alexander Fleming ne fut pas pris en compte, et les antibiotiques ont été largement utilisés dès l'année 1940, contribuant avec plusieurs vaccins à faire chuter drastiquement l'impact des maladies infectieuses bactériennes, tout du moins dans les pays industrialisés. Cependant, l'âge d'or des antibiotiques s'acheva, au début des années 1990, avec l'apparition d'un nombre inquiétant et croissant de **bactéries devenues résistantes aux antibiotiques** et du retard de la découverte de nouvelles molécules pour lutter

contre les **bactéries résistantes**. Des médecins se sont retrouvés dans des situations d'impasse thérapeutique face à certains patients, aucun antibiotique n'ayant plus le moindre effet sur leur infection.

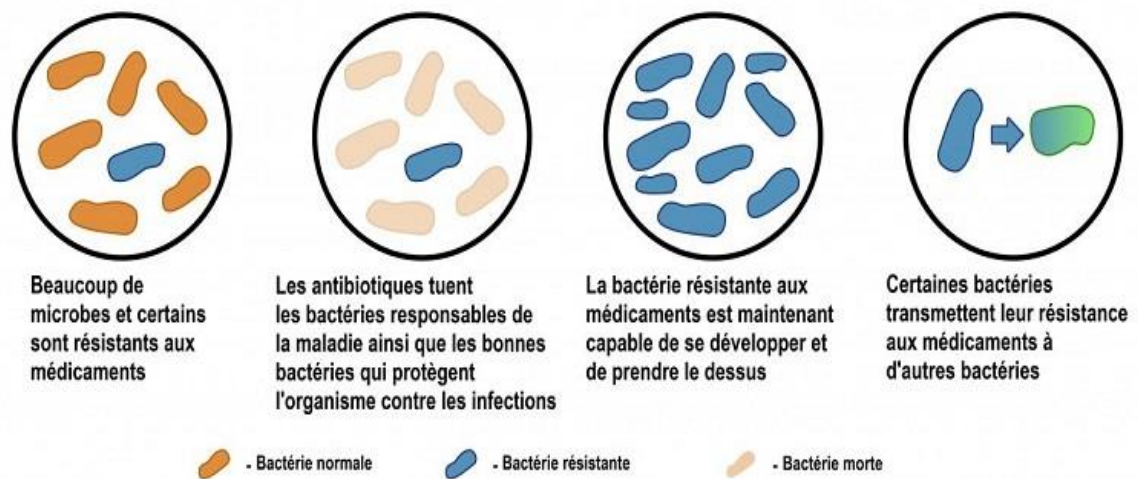


Figure 33: Schéma représentatif de l'apparition de la résistance aux antibiotiques.

2. Types de l'antibiorésistance

La **résistance aux antibiotiques** est un phénomène naturel qui s'accélère du fait de l'usage excessif ou abusif de ces substances. Des organismes à l'origine sensibles aux antibiotiques deviennent peu à peu résistants à la suite de mutations ou de l'acquisition de matériel génétique externe. Plus d'une centaine de types de résistance ont été observés depuis plusieurs décennies, ce qui indique que le développement et l'émergence de la résistance risquent de se poursuivre. La résistance aux antibiotiques a pour plus grave effet de diminuer l'efficacité de ces derniers dans le traitement des infections.

La **résistance** d'une bactérie peut être **naturelle**, elle concerne alors toutes les souches d'un genre ou d'une espèce et détermine le **phénotype sauvage de résistance**. Elle est alors portée par le chromosome et se **transmet verticalement** lors de la division cellulaire. La résistance d'une bactérie peut également être **acquise**. Elle est alors retrouvée dans une proportion plus ou moins importante des souches d'une espèce et elle est variable dans le

temps. Dans ce cas, la **transmission est verticale ou horizontale** (entre bactéries *via* des éléments génétiques mobiles).

La fréquence élevée des **bactéries résistantes** s'explique par la grande plasticité du génome bactérien. Il peut y survenir des **mutations chromosomiques** (phénomène rare de l'ordre d'une bactérie sur un milliard) ou plus fréquemment **l'acquisition d'éléments génétiques mobiles** porteurs de gènes de résistance (plasmides, transposons et intégrons) retrouvés à haute fréquence (jusqu'à une bactérie sur 100). Les voies d'acquisition des éléments génétiques mobiles sont de plusieurs types : **transformation bactérienne**, **transduction** par bactériophages, **conjugaison bactérienne** pour le transfert de plasmides.

La conjugaison, contrairement à la transduction, n'est pas spécifique d'espèce et est donc très impliquée dans la diffusion de gènes de résistance entre différentes espèces bactériennes notamment au sein des microbiotes. A l'heure actuelle, la plupart des antibiotiques font l'objet du développement d'une résistance.

L'acquisition de **plusieurs gènes** par une bactérie entraîne une résistance à plusieurs classes d'antibiotiques habituellement appelée **multirésistance**.

Certaines bactéries (*Pseudomonas aeruginosa*) ont développé une **multirésistance** à toutes sortes d'antibiotiques. Cette **multi-résistance** pose de sérieux problèmes, en particulier, dans le domaine de la prévention des maladies. En effet, deux raisons peuvent expliquer le phénomène de **multi-résistance acquise**: l'utilisation abusive d'antibiotiques en médecine, même lorsque une infection bactérienne n'est pas avérée. D'autre part, l'utilisation d'antibiotiques plus ou moins systémique dans l'alimentation animale. C'est le cas de la présence de *Salmonella sp*, *Shigellasp.* et *E.coli* ETEC, multi-résistantes, de plus en plus fréquentes dans le tube digestif des bovins et des volailles. Ainsi, la **multi-résistance** aux antibiotiques développée par *Staphylococcus aureus* (et maintenant par le genre *Clostridium*) dans les services hospitaliers conduit à une fréquence accrue d'apparition d'infections récidivantes.

Autres bactéries **multirésistantes** sont fréquentes, c'est le cas des entérobactéries, bactéries du tube digestif responsables d'un très grand nombre d'infections (*Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*), les staphylocoques dorés résistants à la méthicilline, les bacilles tuberculeux multirésistants, ou encore le bacille pyocyanique et les *Acinetobacter baumannii*: des bactéries infectant les poumons de personnes atteintes de mucoviscidose et qui sont responsables d'infections nosocomiales (acquises en milieu de soin de santé, en particulier les hôpitaux et les cliniques).

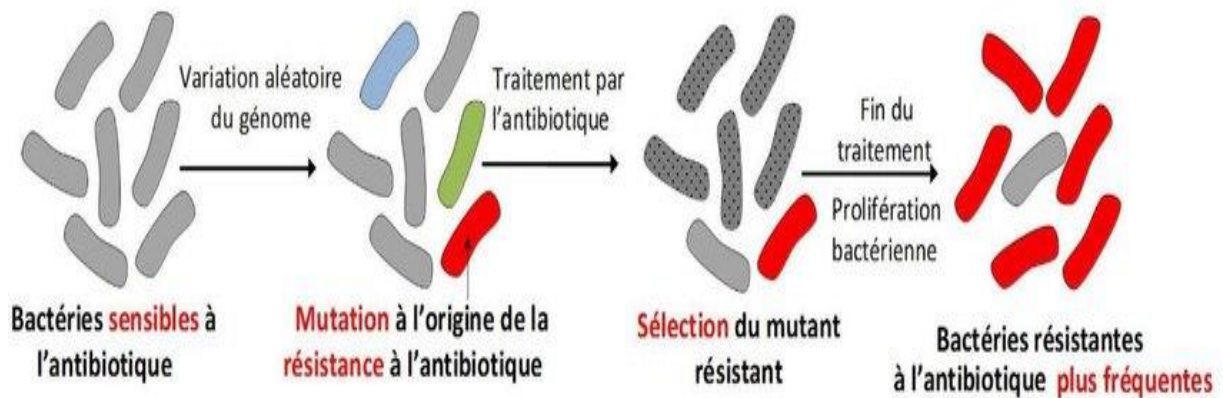


Figure 34: Schéma représentatif des étapes de l'apparition de bactéries résistantes.

Les bactéries résistantes et les **gènes de résistances** peuvent se transmettre entre l'être humain, les animaux et l'environnement, par contact direct, mais aussi par l'eau ou les aliments. Ainsi, l'utilisation d'antibiotiques en médecine vétérinaire et le rejet d'antibiotiques dans l'environnement contribuent aussi à l'apparition de nouvelles souches bactériennes multirésistantes.

La résistance aux antibiotiques n'est pas spécifique aux bactéries responsables de maladie. Elle touche également les bactéries non pathogènes qui constituent le **microbiome** humain. Ces bactéries résistantes représentent alors un réservoir de gènes de résistance qui pourront être transmis à des bactéries pathogènes.

3. Mécanismes de résistances

Il existe quatre principaux mécanismes de résistances : imperméabilité bactérienne, modification de la cible, inactivation de l'antibiotique, efflux actif.

3.1 Imperméabilité bactérienne

L'imperméabilité bactérienne est impliquée dans la **résistance naturelle** des bacilles à Gram négatif aux **glycopeptides** (vancomycine), molécules de grande taille ne pouvant pas entrer dans les porines de la membrane externe de ces bactéries. L'imperméabilité est également impliquée dans la **résistance acquise** des bactéries, par exemple celle de *Pseudomonas aeruginosa* à l'**imipénème** par perte de la porine D2 de la membrane externe, voie d'entrée de l'antibiotique.

3.2 Modification de la cible

Une modification de la cible de l'antibiotique entraîne une perte d'activité de celui-ci. Un exemple incontournable est la **résistance acquise** de *Staphylococcus aureus*, pathogène humain très répandu, à la **méticilline**. La bactérie possède une nouvelle PLP (protéines liant la pénicilline), la PLP 2A ayant très peu d'affinité pour les β -lactamines. La PLP 2a est codée par le gène *MecA*, inclus dans un élément génétique mobile intégré dans le chromosome et appelé en anglais *Staphylococcal cassette chromosome mec* ou SCC mec.

3.3 Inactivation de l'antibiotique

Un troisième mécanisme d'action très répandu est l'inactivation enzymatique de l'antibiotique. Par exemple, la bactérie peut acquérir des **gènes de résistance** codant des enzymes nommées β -lactamases et capables d'hydrolyser le noyau β -lactame des β -lactamines, les transformant en produits inactifs. Chez les bacilles à Gram négatif, il existe une grande diversité des β -lactamases impliquées dans des **résistances naturelles** (TEM, SHV) et **acquises** (CTX-M, TEM, SHV, KPC, OXA, NDM) aux antibiotiques. Quelques années après l'utilisation d'une nouvelle β -lactamine en thérapeutique (amoxicilline, céphalosporines, carbapénèmes), on voit toujours apparaître la résistance à ces antibiotiques par production de β -lactamases.

3.4 Efflux actif

Des systèmes de pompes à efflux permettent également d'éliminer l'antibiotique en dehors de la bactérie. Ce mécanisme de résistance est particulièrement impliqué dans les **résistances naturelles et acquises** de *P. aeruginosa* aux antibiotiques.

Les antibiotiques exercent inéluctablement une pression de sélection environnementale sur les populations bactériennes. Cette **sélection de bactéries résistantes** et préexistantes peut avoir lieu en situation pathologique, au sein d'un foyer infecté. Elle peut également se faire en situation physiologique, par exemple au sein du microbiote intestinal, lieu privilégié présentant une densité élevée de bactéries (10^{14} unités formant des colonies/gramme de selles) et une diversité importante d'espèces, propice aux échanges horizontaux de gènes de résistance. Ainsi, la prise d'antibiotique, même de durée courte, a toujours des conséquences sur le microbiote.

4. Propagation de la résistance et conséquences

La consommation, la dissémination des antibiotiques et des bactéries résistantes, se fait dans trois secteurs principaux : les **élevages**, l'**environnement** et en **santé humaine**. Ces constats montrent l'importance de l'approche globale promulguée par l'Organisation Mondiale de Santé (OMS) dans son plan d'action contre la résistance aux antibiotiques, celle-ci mobilisant des acteurs variés.

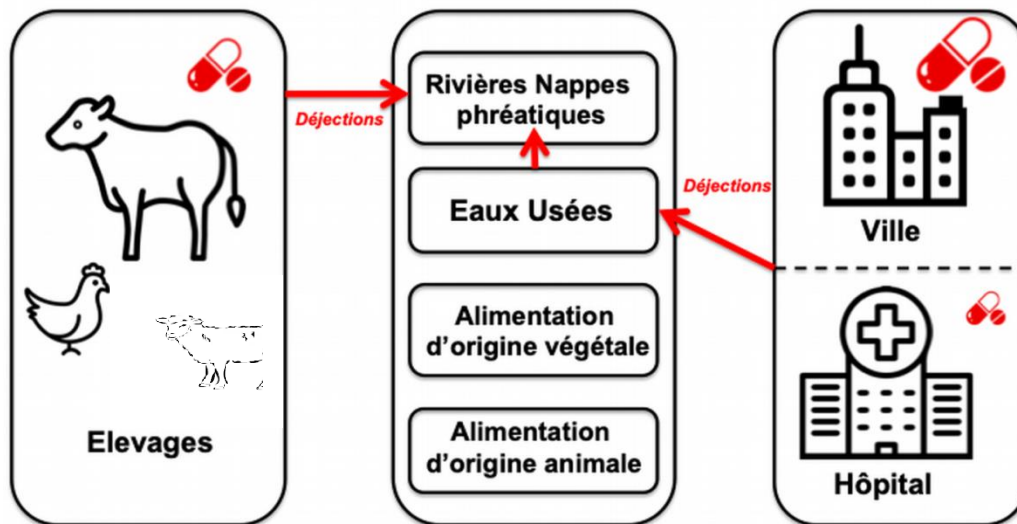


Figure 35 : Consommation et diffusion des antibiotiques.

Les bactéries se propagent *via* l'alimentation et les déjections. L'environnement a un rôle de réservoir et de propagation. Le secteur hospitalier est un secteur propice aux transmissions croisées (d'individu à individu). La principale cause de l'accélération de l'antibiorésistance est la surconsommation des antibiotiques, principalement en médecine de ville où la consommation a augmenté entre 2007 et 2017. Sur la même période, l'usage d'antibiotique est resté stable dans les hôpitaux et a diminué en santé animale grâce aux plans ECOANTIBIO, avec pour conséquence une baisse de la prévalence des résistances chez les animaux d'élevage. À ce jour, même si des succès ont été observés (par exemple, diminution de la prévalence des pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline et de *S. aureus* résistant à la méticilline), l'inquiétude se concentre sur l'augmentation de la résistance des bacilles à Gram négatif responsables de nombreuses infections en santé humaine telles que des infections urinaires ou digestives.

La résistance aux antibiotiques a d'ores et déjà un impact considérable en santé publique. En France, l'un des pays d'Europe les plus consommateurs d'antibiotiques en ville, on estime que la multirésistance est responsable de 158 000 infections par an causant 12 500 décès. En effet, la résistance aux antibiotiques entraîne des difficultés de traitement pour des infections autrefois sans gravité et peut mener parfois à des situations d'impasse thérapeutique (absence d'antibiotiques actifs). La situation future pourrait s'aggraver en cas d'accélération de l'émergence de résistances ayant pour conséquence l'utilisation de molécules à spectre large, générant elles-mêmes plus de résistances (cercle vicieux) et en l'absence d'un développement suffisant de nouveaux antibiotiques. La problématique est mondiale, certains pays ayant une prévalence très élevée de bactéries résistantes.

5. Lutte contre l'antibiorésistance

En 2015, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a adopté un plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens, et en particulier aux antibiotiques.

3.1 Vaccination

La **vaccination** est au cœur de la **lutte contre l'antibiorésistance**. Plusieurs vaccins homologués, ciblant à la fois les bactéries (*Haemophilus influenzae type b*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella enterica* serovar *Typhi*) et virus (virus de la grippe, rotavirus) pathogènes humains, ont déjà prouvé leurs bienfaits en réduisant la consommation injustifiée d'antibiotiques et les **souches bactériennes résistantes aux antibiotiques**, en favorisant **l'immunité collective**. Un certain nombre de nouveaux vaccins expérimentaux, visant à réduire la propagation des agents pathogènes bactériens multirésistants, sont également à divers stades de développement clinique.

Cependant, les **vaccins** en tant qu'outil de lutte contre la résistance aux antimicrobiens restent sous-estimés et malheureusement peu utilisés. La mobilisation mondiale des ressources de santé publique et de l'industrie est essentielle pour maximiser l'utilisation des **vaccins homologues**, et le développement de nouveaux **vaccins prophylactiques** pourrait avoir un impact profond sur la réduction de la résistance aux antimicrobiens.

3.2 Phagothérapie

Développer des alternatives thérapeutiques est devenu une urgence sanitaire mondiale du premier plan. Le recours aux **bactériophages** par la **phagothérapie** revient comme une des voies les plus avérées, prometteuses et durables pour l'avenir. De plus en plus de chercheurs se penchent, avec des méthodes d'investigation modernes, sur cette thérapie

lancée au début du XX^{ème} siècle, avant la découverte des premiers antibiotiques. Elle consiste à attaquer et détruire les bactéries avec leurs ennemis naturels : des virus de bactéries, appelés **bactériophages**, qui sont chacun spécifique d'une bactérie donnée, n'infectant donc que la bactérie hôte sans détruire la flore microbienne.

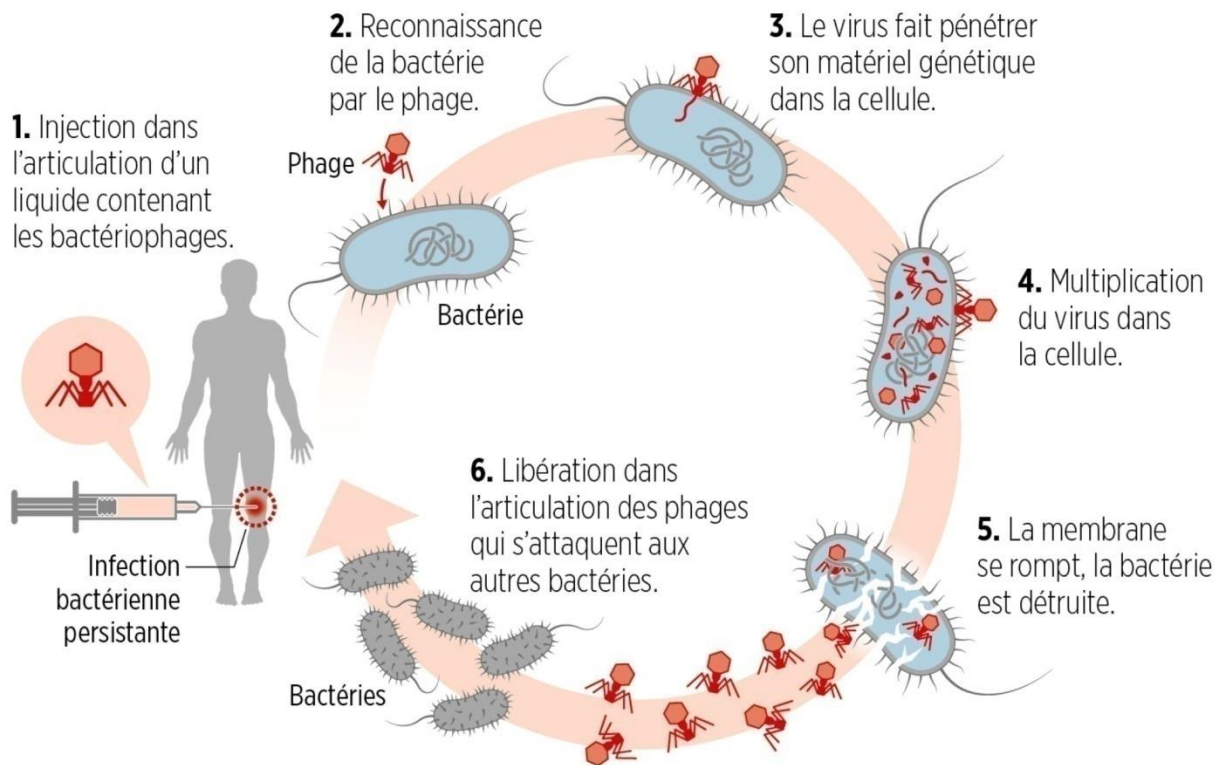


Figure 36 : Schéma descriptif de la phagothérapie.

6. Prévenir l'antibiorésistance

D'une manière générale les activités humaines et le développement **accélèrent la résistance** aux agents antimicrobiens. Il s'agit notamment de **l'usage excessif ou abusif d'antibiotiques**, de la **propagation de la résistance**, de la **transmission des infections** et de la **contamination de l'environnement**. Cependant, la **prévention de l'antibiorésistance** doit être menée conjointement en santé animale et humaine car les bactéries résistantes diffusent entre ces deux secteurs.

En santé humaine, **lutter contre l'antibiorésistance** consiste en premier lieu à éviter de prescrire des antibiotiques aux patients qui n'en ont pas besoin. Cela peut s'avérer complexe lors d'examen cliniques difficiles, chez des patients ayant des maladies

inflammatoires pouvant mimer une infection ou lorsque les résultats de certains examens de laboratoire ne sont pas disponibles. De plus, le suivi des recommandations de prescription médicale est capital.

La réalisation de prélèvements microbiologiques permet également d'adapter l'**antibiothérapie** en fonction de l'**antibiogramme** en évitant les antibiotiques les plus générateurs de résistance (antibiotiques à spectre large ayant une activité anti-anaérobies et/ou un impact sur les microbiotes) et en évitant les molécules de dernier recours.

Un effort particulier doit être réalisé sur le raccourcissement des durées d'antibiothérapie, la majorité des infections bactériennes pouvant être traitées en moins de huit jours.

En milieu hospitalier, les mesures d'hygiène visent à diminuer les **infections nosocomiales** ou les **transmissions croisées de bactéries résistantes** et sont définies et adaptées des recommandations nationales par les équipes d'hygiène des hôpitaux.

Lutter contre l'antibiorésistance nécessite la coopération de plusieurs praticiens hospitaliers et de leurs équipes : médecin, microbiologiste, infectiologue, pharmacien hospitalier, praticien en hygiène. De plus, dans chaque établissement hospitalier, est nommé un référent antibiotique (praticien ayant une compétence en antibiothérapie). Il est ainsi possible d'évaluer l'efficacité des actions de prévention menées dans l'établissement hospitalier.

En médecine de ville, plusieurs outils d'aide au bon usage des antibiotiques sont disponibles tels que **Antibioclic**, un logiciel d'aide à la décision thérapeutique en antibiothérapie. La disponibilité d'une **cellule de conseil en antibiothérapie** pour tout médecin prescripteur pourra également améliorer les pratiques.

La **mauvaise utilisation des antibiotiques** en ville a des répercussions à l'hôpital. Si un traitement antibiotique mal adapté a été instauré en ville pour un patient donné, une molécule plus génératrice de résistance sera utilisée, si celui-ci se présente ensuite aux urgences de l'hôpital.

L'usage d'antibiotiques dans le secteur humain est contre indiquée dans plus de 50 % des cas, cependant, jusqu'à 60 % d'**antibiotiques** étant vendus sans ordonnances. La prévention de l'antibiorésistance est devenue une exigence dont elle peut être réalisée au niveau individuel :

- Ne prendre l'antibiotique que s'il est prescrit par son médecin.
- Ne pas partager un antibiotique avec quelqu'un d'autre.
- Ne pas exiger d'antibiotique si le médecin n'en voit pas le besoin.

- Suivre les règles d'hygiène pour prévenir les infections.

Un plan d'action mondial lancé par l'OMS en mai 2015, vise à :

- Préserver la capacité à prévenir et à traiter les maladies infectieuses à l'aide de médicaments sûrs et efficaces.
- Améliorer la sensibilisation et la compréhension du phénomène de résistance aux agents antimicrobiens d'une manière générale et spécifiquement aux antibiotiques.
- Renforcer la surveillance et la recherche dans ce domaine et réduire l'incidence des infections,
- Consentir des investissements durables pour combattre la résistance aux agents antimicrobiens.

L'OMS a publié la version actualisée de la liste des **agents pathogènes résistants**, prioritaires pour ces deux dernières années, qui comprend quinze familles de bactéries résistantes aux antibiotiques classées selon trois catégories de priorité : **critique, élevée et moyenne**. Cette liste fournit des orientations sur la mise au point des nouveaux traitements nécessaires pour stopper la propagation de la résistance aux agents antimicrobiens (RAM).

***Bactéries à priorité critique**

- *Acinetobacter baumannii*, résistance aux carbapénèmes
- *Enterobacterales*, résistance aux céphalosporines de troisième génération
- *Enterobacterales*, résistance aux carbapénèmes
- *Mycobacterium tuberculosis*, résistance à la rifampicine (inclus après une analyse indépendante effectuée avec des critères parallèles adaptés et l'application ultérieure d'une matrice d'analyse décisionnelle multicritère adaptée)

***Bactéries à priorité élevée**

- *Salmonella Typhi*, résistance aux fluoroquinolones
- *Shigella spp.*, résistance aux fluoroquinolones
- *Enterococcus faecium*, résistance à la vancomycine
- *Pseudomonas aeruginosa*, résistance aux carbapénèmes
- *Salmonella* non typhoïdique, résistance aux fluoroquinolones
- *Neisseria gonorrhoeae*, résistance aux céphalosporines et/ou aux fluoroquinolones de troisième génération

- *Staphylococcus aureus*, résistance à la méticilline

***Bactéries à priorité moyenne**

- Streptocoques du groupe A, résistance aux macrolides
- *Streptococcus pneumoniae*, résistance aux macrolides
- *Haemophilus influenzae*, résistance à l'ampicilline
- Streptocoques du groupe B, résistance à la pénicilline

Les changements intervenus depuis l'année 2017 témoignent la nature dynamique de la résistance aux antibiotiques, qui nécessite des interventions adaptées. La liste des agents pathogènes prioritaires étant un outil mondial précieux, l'adapter aux contextes nationaux et régionaux permet de prendre en compte les variations régionales dans la répartition des agents pathogènes et la charge de la RAM.

VII. Antibiogramme

La documentation des infections permet de mettre en évidence les bactéries impliquées et d'étudier leur sensibilité aux antibiotiques. Le traitement d'un prélèvement de microbiologie comprend les étapes suivantes :

- Examen direct avec coloration de GRAM et ensemencement du prélèvement sur des milieux de culture le premier jour (jour 0),
- Identification des colonies bactériennes et ensemencement des **antibiogrammes** le lendemain (jour 1),
- Lecture des **antibiogrammes** au deuxième jour (jour 2).

1. Définition

L'**antibiogramme** est une technique phénotypique permettant de catégoriser **sensible (S)**, **intermédiaire (I)** ou **résistant (R)** un couple bactérie-antibiotique.

L'antibiogramme standard est un test *in vitro* de sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques par la technique de diffusion sur milieux gélosé. Il a pour but de guider le clinicien dans le **choix d'un antibiotique pour traiter une infection** bactérienne, d'exploiter les données pour la **surveillance des résistances** bactériennes aux antibiotiques (échange de données par le logiciel WHONET) et une indication supplémentaire pour l'**identification du germe** par la mise en évidence de résistances naturelles.

L'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé correspond à la croissance d'une bactérie sur un milieu solide comprenant une concentration croissante d'antibiotique (apposition d'un disque d'antibiotique sur le milieu de culture suivie de la diffusion de l'antibiotique dans la gélose). On obtient un diamètre d'inhibition après incubation .

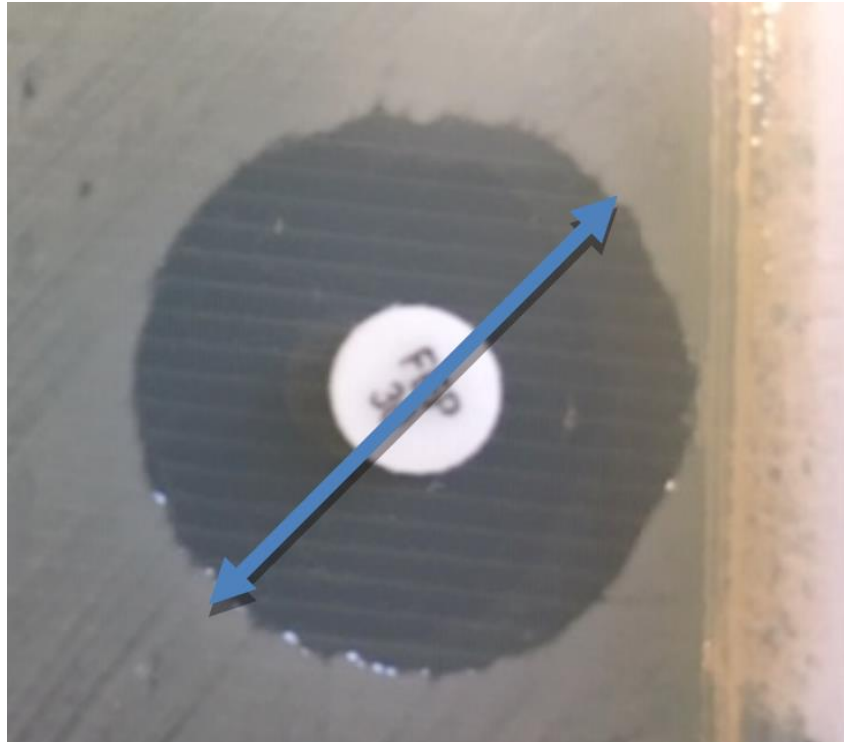


Figure 37: Diamètre d'inhibition autour d'une pastille contenant une quantité définie d'antibiotique.

Le Réseau Algérien de la Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques (AARN) applique les techniques de standardisation de l'antibiogramme préconisées par le CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) recommandées par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) et agréées par de nombreux pays. La standardisation de la technique permet d'échanger des données grâce à un logiciel de saisie et d'exploitation fourni par l'OMS : le WHONET. Le CLSI et l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) sont en concertation pour tenter d'unifier les techniques, les milieux, les charges des disques et les valeurs critiques. Dans les années à venir, il y aura uniformisation des règles applicables par tous les pays.

2. But de la standardisation

- Dépister rapidement et correctement les souches bactériennes résistantes aux antibiotiques.
- Surveiller l'évolution de la résistance aux antibiotiques,
- Echanger des données sur la résistance des bactéries aux antibiotiques entre laboratoires, d'un même pays, d'un même continent puis avec les autres continents.
- Réduire le coût de l'antibiogramme,
- Orienter la prescription d'antibiotique,
- Contrôler la qualité de l'antibiogramme pour éviter les erreurs de lecture et d'interprétation.

3. Principe de l'antibiogramme

Les disques de papier imprégnés avec une concentration déterminée d'agent antimicrobien sont déposés à la surface d'un milieu de culture standardisé, préalablement ensemencé avec un inoculum calibré d'une culture pure de la bactérie à tester. Après incubation, les boîtes de Pétri sont examinées et les diamètres des zones d'inhibition entourant les disques sont mesurés et comparés aux valeurs critiques des différents agents antimicrobiens testés, afin de déterminer la catégorisation clinique (**Résistant, Intermédiaire, Sensible**). Le diamètre de la zone d'inhibition est proportionnel à la sensibilité de la bactérie testée.

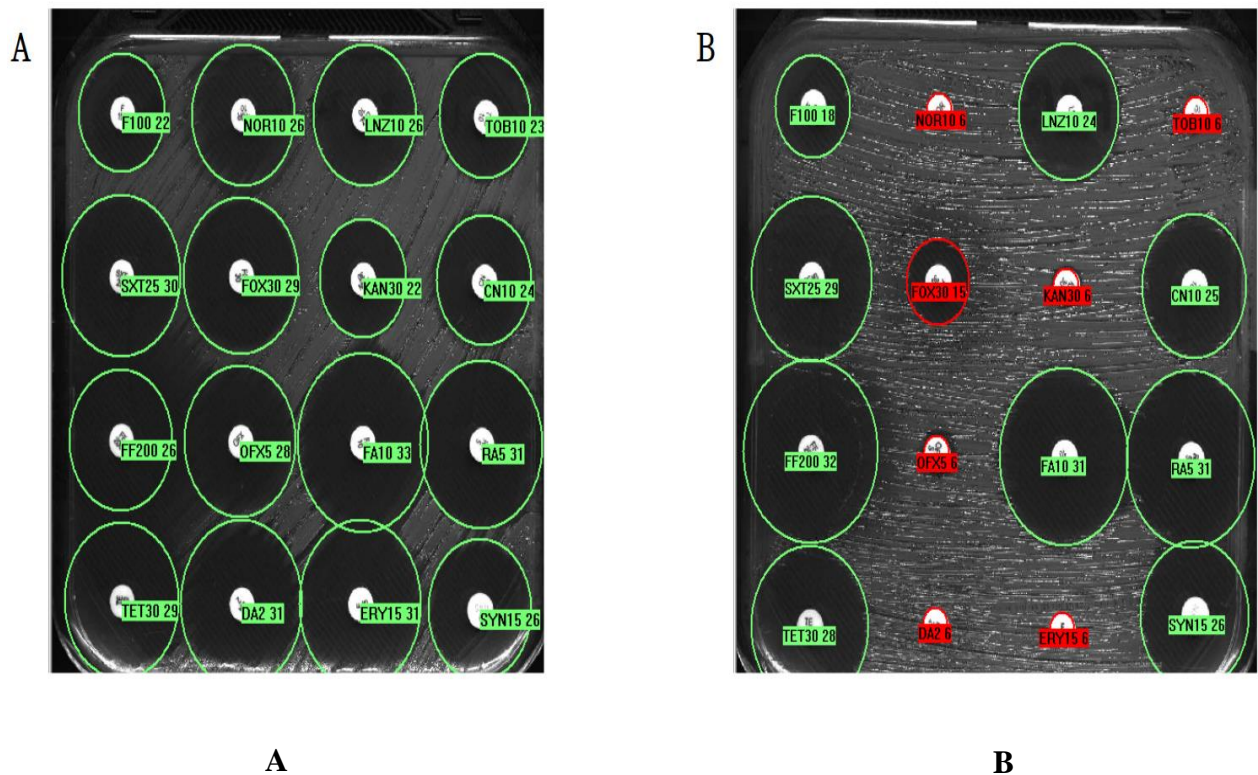


Figure 38: AntibioGrammes par diffusion en milieu gélosé de *Staphylococcus aureus*.

A. *S. aureus* sensible à l'ensemble des antibiotiques testés. Phénotype sauvage.

B. *S. aureus* résistant à la méticilline (disque FOX) et à d'autres classes d'antibiotiques telles que les fluoroquinolones (NOR et OFX), macrolides (ERY), lincosamides (DA) et les aminosides (KAN et TOB). Les noms des antibiotiques, les cercles délimitant les contours des disques d'inhibition, et les couleurs (vert : sensible, jaune : intermédiaire, rouge : résistant) sont ajoutés automatiquement sur l'image par une machine spécialisée (Sirscan 2000 Automatic (I2A)). Abréviations : F : furanes, NOR : norfloxacin, LNZ : linézolide, TOB : tobramycine, SXT : sulfaméthoxazole/triméthoprim, FOX : céfoxitine, KAN : kanamycine, CN : gentamicine, FF : fosfomycine, OFX : ofloxacin, FA : acide fusidique, RA : rifampicine, TET : tétracycline, DA : clindamycine, ERY : érythromycine, SYN : synergistine

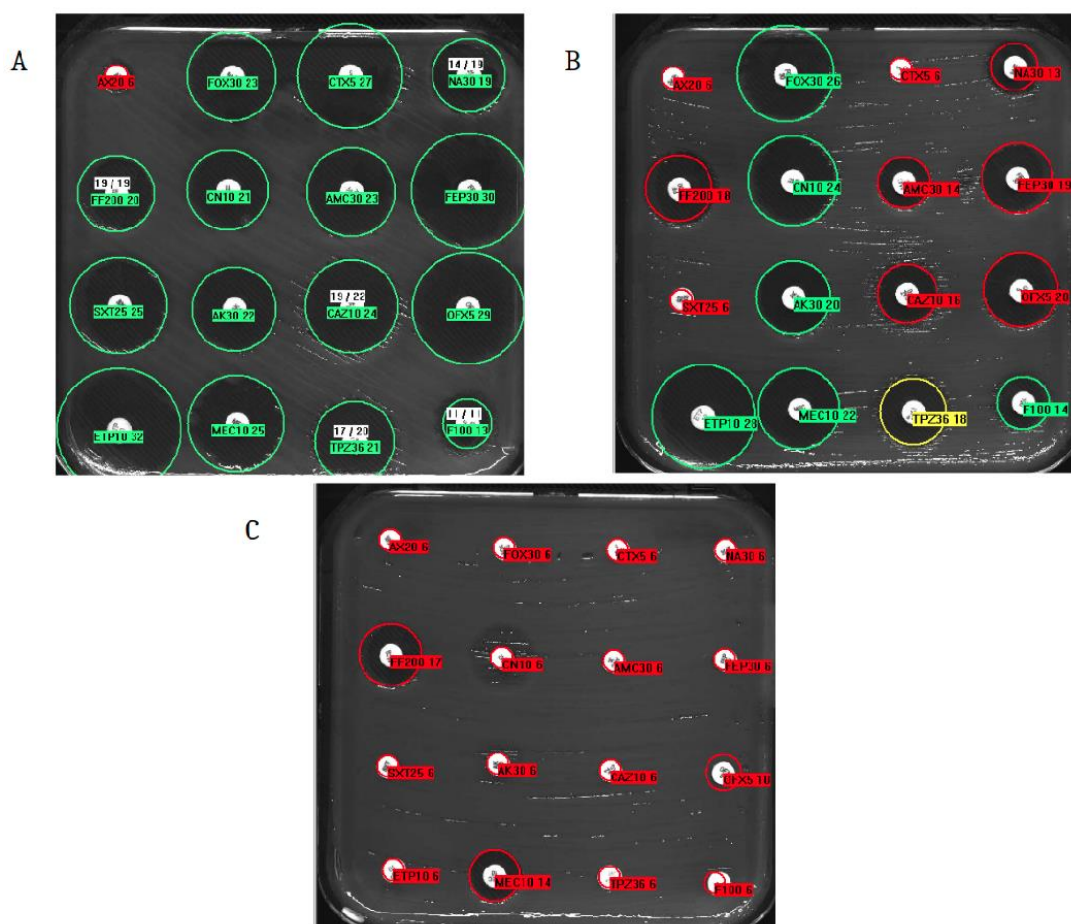


Figure 39: AntibioGrammes par diffusion en milieu gélosé de *Klebsiella pneumoniae*.

A. Phénotype sauvage, production d'une pénicillinase naturelle de bas niveau, permettant la résistance à l'amoxicilline (une pénicilline).

B. Résistance acquise aux β -lactamines (AM, AMX, CTX, FEP, CAZ) par production d'une β -lactamase à spectre étendu (BLSE). Résistance acquise associée aux fluoroquinolones (NA et OFX), à la fosfomycine (FF) et au triméthoprim/sulfaméthoxazole (SXT).

C. Résistance acquise à l'ensemble des β -lactamines testées (AM, AMC, CTX, FOX, FEP, CAZ, TPZ, MEC, ETP) par production d'une β -lactamase nommée carbapénèmase. Résistance acquise associée aux fluoroquinolones (NA et OFX), aux aminosides (CN et AK), aux furanes (F), à la fosfomycine (FF), au triméthoprim/sulfaméthoxazole (SXT) (Antibiotique vert : S, jaune : I, rouge : R). Abréviations : AX : amoxicilline, FOX : céfoxitine, CTX : céfotaxime, NA : acide nalidixique, FF : fosfomycine, CN : gentamine, AMC : amoxicilline/acide clavulanique, FEP : céfépime, SXT : triméthoprim/sulfaméthoxazole, AK :

amikacine, CAZ : ceftazidime, OFX : ofloxacin, ETP : ertapénème, MEC : méicillinam, TPZ : pipéracilline/tazobactam, F : furanes.

4. Paramètres importants

La fiabilité des résultats d'un antibiogramme est influencée par de nombreux paramètres qui doivent être rigoureusement contrôlés.

4.1 Milieu de culture

Le milieu de culture doit permettre la croissance de nombreuses bactéries et il ne doit pas contenir d'inhibiteurs des antibiotiques. La teneur en calcium et en magnésium doit être contrôlée, car un excès de cations bivalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}) inhibent l'action des polymyxines. Un pH trop acide augmente l'activité des β -lactamines, un milieu alcalin favorise les aminosides et les macrolides, il doit être compris entre 7,2 et 7,4, valeur qui permet une bonne croissance bactérienne et qui réalise un compromis pour l'activité des antibiotiques.

Le milieu retenu pour la majorité des espèces bactériennes est celui de **Mueller-Hinton** (plus 5% de sang pour les germes exigeants). Il doit être coulé en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm et les géloses doivent être séchées avant l'emploi.

La standardisation de l'épaisseur de la gélose détermine l'établissement du gradient et de la valeur de la concentration en antibiotique, à une distance donnée du disque. En effet, l'antibiotique contenu dans le disque se solubilise dans l'eau de la gélose. Sa diffusion peut être schématiquement présentée en deux étapes :

- Une diffusion verticale (en profondeur) dans le milieu contenu dans le cylindre délimité par le disque pré-imprégné,
- Une diffusion horizontale (latéralement) qui répartit l'antibiotique selon un gradient de concentrations dont le maximum est situé au niveau du disque. Chaque disque est pré-imprégné d'une masse connue d'antibiotique appelée charge du disque.

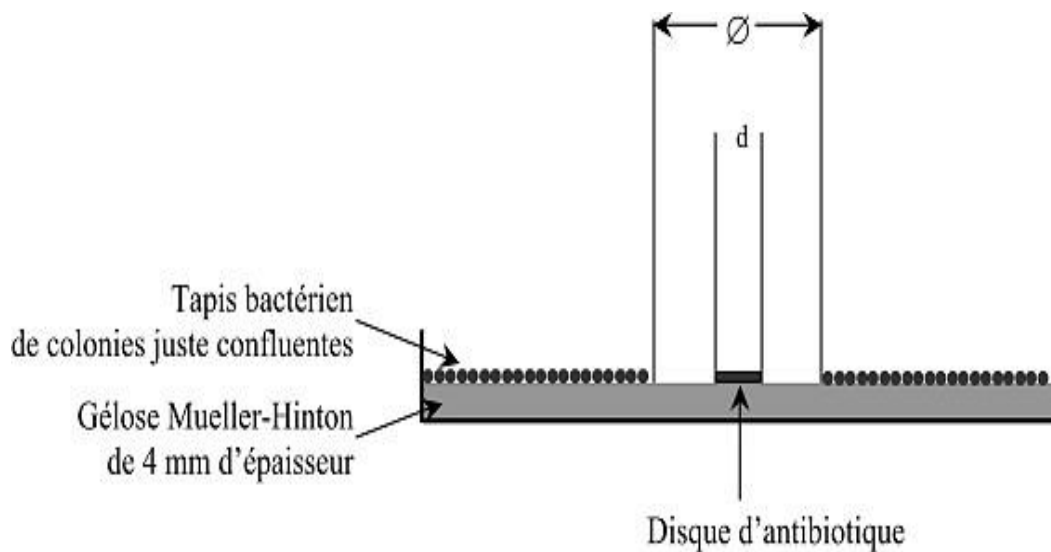


Figure 40: Schéma en coupe d'une gélose Mueller-Hinton utilisée pour un antibiogramme standard.

d: diamètre du disque d'antibiotique (6,35 mm)

Ø: diamètre d'inhibition mesuré

Il existe pour chaque antibiotique une relation linéaire entre le logarithme de la concentration en antibiotique et le diamètre du cercle concentrique au disque d'antibiotique appelée droite de concordance. Les concentrations critiques en antibiotique peuvent être déplacées sur cette droite de concordance afin d'en déduire les diamètres de diffusion correspondants.

Plus on s'éloigne du disque d'antibiotique plus la concentration en antibiotique diminue.

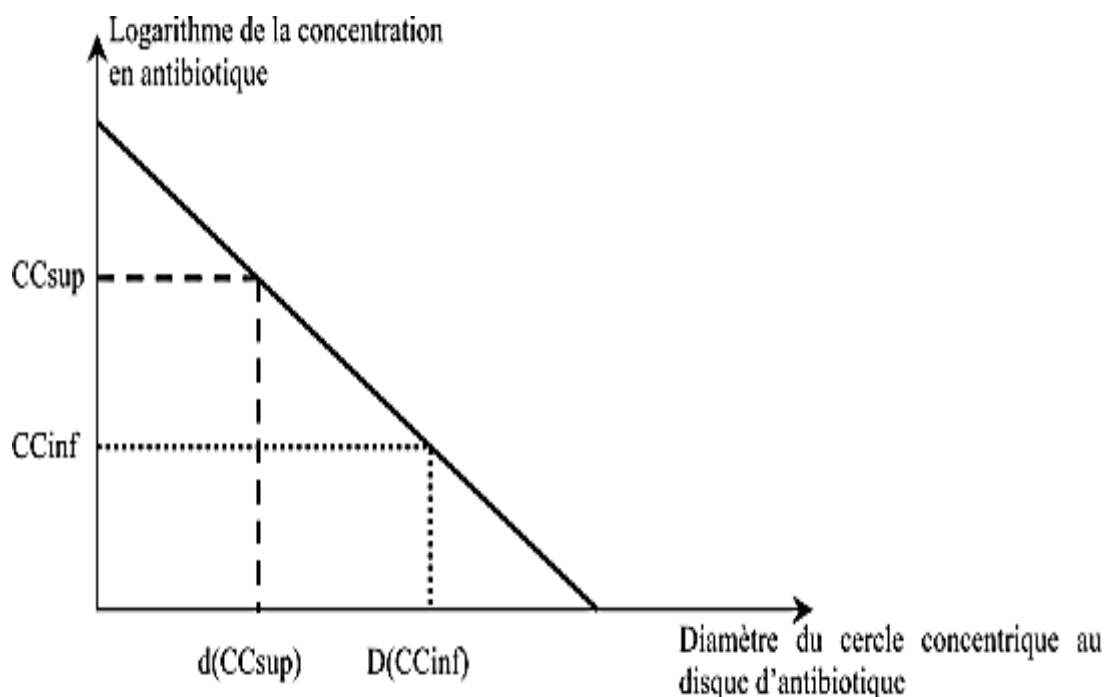


Figure 41: Droite de concordance entre le logarithme de la concentration en antibiotique et le diamètre de diffusion de l'antibiotique.

4.2 Disques d'antibiotiques

Les disques sont fabriqués à partir du papier absorbant, de qualité supérieure imprégnés d'agents antimicrobiens à des concentrations précises. Ils sont clairement identifiés par un sigle, comportant 1 à 3 lettres, imprimé de chaque côté du disque.

Tableau 2: Exemples d'abréviation de quelques antibiotiques.

Sigle	Antibiotique	Famille
AM	Ampicilline	Aminopénicilline
AMC	Amoxicilline +acide clavulanique	Aminopénicilline
AMX	Amoxicilline	Aminopénicilline
AN	Amikacine	Aminosides
ATM	Aztréonam	Monobactame
AZM	Azithromycine	Macrolides
B	Bacitracine	Polypeptides
C	Chloramphénicol	Phénicolés

Les disques sont présentés en cartouche de 50 disques conditionnés en containers étanches contenant un dessicant. La date de péremption et le numéro de lot figurent sur chaque conditionnement (cartouche et container). Les cartouches de disques doivent être conservées dans leur container entre +2 et +8°C à sec.



Figure 42: Les disques d'antibiotiques.

Le laboratoire a pour responsabilité de stocker les disques dans des conditions optimales et de ne pas utiliser des disques périmés. Avant utilisation, les disques doivent être amenés à température ambiante. Toute cartouche ouverte doit être utilisée dans les cinq jours.

4.3 Taille de l'inoculum

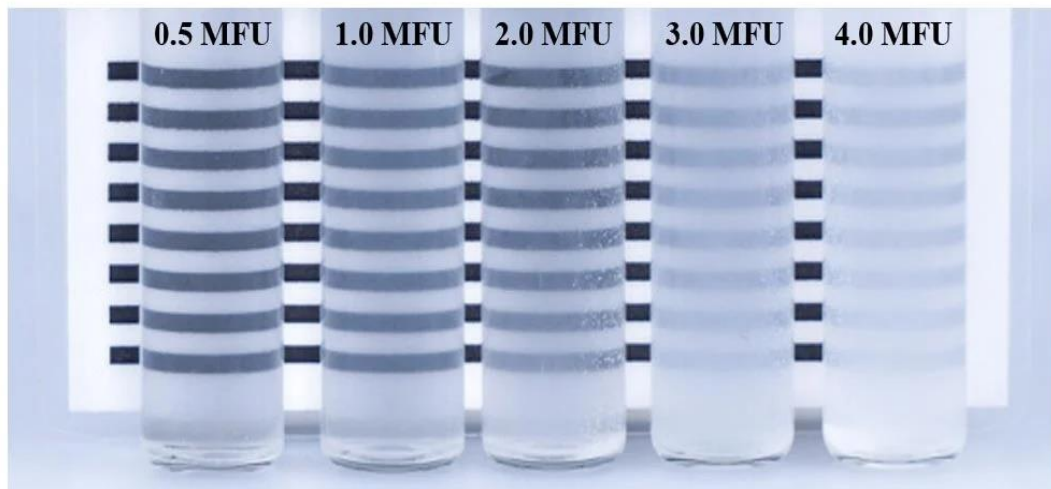
La densité de l'inoculum bactérien est un élément primordial. La suspension cellulaire doit être préparée dans de l'eau physiologique stérile à partir d'une culture jeune et pure sur milieu d'isolement approprié. Dans le cas de *Neisseria gonorrhoeae*, la suspension est préparée dans du tampon phosphate stérile à pH 7,2.

La suspension bactérienne doit être ajustée à l'aide d'un photomètre ou par comparaison avec un étalon d'opacité (**échelle de Mc Farland, MF**). L'utilisation d'un densitomètre

est fortement souhaitable.

En générale, l'antibiogramme par diffusion est réalisé avec une suspension calibrée à 0,5 MF ou à une DO de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm contenant environ 10^8 bactéries par ml. Ce nombre est porté à 10^9 pour *Helicobacter pylori* équivalente au standard Mc Farland 3.

McFarland Standards



McFarland Standard No.	0.5	1	2	3	4
1.0% barium chloride (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
1.0% sulfuric acid (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6
Approx. cell density (1×10^8 CFU/mL)	1.5	3.0	6.0	9.0	12.0
% transmittance*	74.3	55.6	35.6	26.4	21.5
Absorbance*	0.08 to 0.1	0.257	0.451	0.582	0.669

Figure 43: Les standard Mc Farland servent de standards de turbidité pour préparer les suspensions de microorganismes.

5. Technique d'ensemencement

L'ensemencement doit se faire dans les quinze minutes qui suivent la préparation de l'inoculum. Il est réalisé par **écouvillonnage** ou par **inondation**, de telle façon à avoir après incubation des colonies distinctes mais jointives.

6. Contrôle de la technique d'antibiogramme

Le contrôle de qualité permet de garantir la précision et la fiabilité de la technique des tests de sensibilités, de la performance des réactifs utilisés dans ces tests et de la performance du personnel qui effectue les tests et la lecture des résultats.

Selon les recommandations du Réseau Algérien de la Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques (AARN), le contrôle de qualité doit se faire à chaque nouveau lot de Mueller-Hinton et/ou d'antibiotiques où le laboratoire devrait vérifier la validité de sa technique en testant, au moins une fois par mois, la sensibilité des souches de références et vérifier que les diamètres des zones d'inhibition obtenues, vis-à-vis des divers antibiotiques, sont conformes aux valeurs publiées par le comité de l'antibiogramme.

Les souches de référence devant être obligatoirement testées sont : *E. coli* ATCC 25922; *S. aureus* ATCC 25923; *P. aeruginosa* ATCC 27853; *S. pneumoniae* ATCC 49619 et *H. influenzae* ATCC 49247.

Si les résultats ne sont pas satisfaisants, il faudra contrôler chacun des paramètres suivants :

- Lecture et interprétation des diamètres des zones d'inhibition,
- Milieu de culture,
- Inoculum,
- Disques d'antibiotiques,
- Souches de références.

7. Lecture des résultats de l'antibiogramme

Après incubation à la température et sous atmosphère recommandées, les diamètres des zones d'inhibition seront mesurés avec précision à l'aide d'un pied à coulisse. Les mesures seront prises en procédant par transparence à travers le fond de la boîte de Pétri fermée.

Les diamètres des zones d'inhibition mesurés seront comparés aux diamètres critiques donnés par les instances en vigueur (AARN et CLSI) afin de classer la bactérie dans l'une des catégories : **Résistante**, **Intermédiaire** ou **Sensible**.

Ces critères de catégorisation clinique selon les diamètres critiques sont remis à jour périodiquement par le CLSI.

Le compte-rendu des résultats d'un antibiogramme standard sera réalisé en reportant les diamètres d'inhibition mesurés (\emptyset) pour chaque antibiotique et les diamètres critiques dans un tableau (Tableau 3). Une colonne permettra d'interpréter la résistance ou la sensibilité de la souche pour chaque antibiotique.

Tableau 3: Exemple de tableau des résultats d'un antibiogramme standard.

Antibiotique	Sigle	d(CCsup) (mm)	D(CCinf) (mm)	\emptysetmesuré mm	Interpretation
Acidefusidique	FA	22	15	24	S
Amoxicilline	AMX	14	21	17	I
Gentamicine	GM	16	18	12	R

Trois catégories cliniques sont retenues pour l'interprétation des tests de sensibilité *in vitro* : **Sensible (S), Résistant (R) et Intermédiaire (I).**

- Les souches catégorisées **S** sont celles pour lesquelles la probabilité de **succès** thérapeutique est forte dans le cas d'un traitement par voie systémique avec la posologie recommandée.
- Les souches catégorisées **R** sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'**échec** thérapeutique quels que soient le type de traitement et la dose d'antibiotique utilisée.
 - Les souches catégorisées **I** sont celles pour lesquelles le succès thérapeutique est **imprévisible**. Ces souches forment un ensemble hétérogène pour lequel les résultats obtenus *in vitro* ne sont pas prédictifs d'un succès thérapeutique. En effet, ces souches peuvent présenter un mécanisme de résistance dont l'expression *in vitro* est faible, avec pour conséquence leur classement dans la catégorie S. Cependant, *in vivo*, une partie de ces souches apparaît résistante au traitement. Ainsi, elles peuvent présenter un mécanisme de résistance dont l'expression n'est pas suffisante pour justifier un classement dans la catégorie R, mais suffisamment faible pour espérer un effet thérapeutique dans certaines conditions (fortes concentrations locales ou posologies accrues). La catégorie intermédiaire est aussi une zone tampon qui tient compte des incertitudes techniques et biologiques.

8. Etablissement des valeurs critiques délimitant les catégories cliniques

Deux concentrations critiques sont définies pour chaque antibiotique :

La **concentration critique basse c** et la **concentration critique haute C**, auxquelles correspondent des diamètres critiques **D**, et **d**, respectivement. Les concentrations critiques sont établies sur la base des concentrations sériques obtenues après administration d'une posologie usuelle (c) et de la posologie maximale tolérée (C). Chaque antibiotique a ses concentrations critiques propres.

Pour une bactérie et un antibiotique donnés, le diamètre d'inhibition mesuré est comparé aux diamètres critiques :

- En dessous d'un diamètre critique **inférieur d**, la souche est classée **R**.
- En dessus du diamètre critique **supérieur D**, la souche est classée **S**.

Tableau 4: Interprétation de la sensibilité et de la résistance d'une souche à un antibiotique.

$\emptyset \text{ mesuré} \geq D(\text{CCinf})$	Sensible (S)
$\emptyset \text{ mesuré} < d(\text{CCsup})$	Résistante (R)
$d(\text{CCsup}) \leq \emptyset \text{ mesuré} < D(\text{CCinf})$	Intermédiaire (I)

9. Procédure et critères de catégorisation des souches

Aux regards des concentrations et des diamètres critiques sont considérées comme:

- **Sensibles (S)**, les souches pour lesquelles la **CMI (Concentration Minimale Inhibitrice)** de l'antibiotique testé est inférieure ou égale à la concentration critique basse (c), ce qui équivaut à un diamètre supérieur ou égal au diamètre critique D ;
- **Résistantes (R)**, les souches vis-à-vis desquelles la **CMI** de l'antibiotique testé est supérieure à la concentration critique haute C, correspondant à un diamètre inférieur au diamètre critique d ;
- **Sensibilité intermédiaire (I)**, les souches vis-à-vis desquelles la **CMI** de l'antibiotique testé et du diamètre correspondant sont compris entre les deux concentrations critiques et les deux diamètres critiques :

Tableau 5: Critères de catégorisations selon les valeurs critiques.

Catégories	CMI(mg/L)	Diamètre mesuré \emptyset (mm)
Sensible	$\text{CMI} \leq c$	$\emptyset \geq D$
Résistante	$\text{CMI} > C$	$\emptyset < d$
Intermédiaire	$c < \text{CMI} \leq C$	$d \leq \emptyset < D$

10. Concentration Minimale Inhibitrice(CMI) et concentration de prévention des mutants résistants (CPM)

1. Définitions

L'importance de la résistance d'une souche bactérienne à un antibiotique est évaluée par détermination de la **CMI (Concentration Minimale Inhibitrice)** et par comparaison de celle-ci avec celle d'une souche dite sensible.

La **CMI** est définie comme la concentration minimale d'un antibiotique qui inhibe la croissance *in vitro* de 99% de la population bactérienne testée. La **CMI** mesure donc l'effet bactériostatique d'un antibiotique sur une bactérie. Elle correspond à la plus petite concentration d'antibiotique inhibant la pousse bactérienne visible après 18 h de culture à 35 °C.

La **concentration de prévention des mutants résistants** ou **CPM** est une grandeur non mesurable, supérieure à la **CMI**, en dessous de laquelle la sélection de mutants résistants au sein d'une population bactérienne est possible.

Au-dessus de la **CPM**, même les bactéries résistantes à l'antibiotique sont tuées par celui-ci. En effet, l'antibiorésistance n'est jamais absolue. Au-delà d'une certaine concentration seuil en antibiotique, les mécanismes permettant la résistance à l'antibiotique sont saturés et même les bactéries dites « **résistantes** » meurent.

L'activité antibactérienne *in vitro* d'un antibiotique (**détermination d'une CMI**) considérée isolément n'est pas prédictive de son efficacité *in vivo*. En effet, un antibiotique actif *in vitro* peut être en incapacité à pénétrer de manière satisfaisante dans tel ou tel site infectieux. Seule la prise en considération des aspects bactériologiques (**CMI**) mais également pharmacocinétiques (concentration sérique de l'antibiotique en fonction du temps, diffusion de l'antibiotique dans les tissus, etc.) regroupés dans l'appellation **pK/pD** des antibiotiques (pharmacocinétique/pharmacodynamie des antibiotiques) permet de prédire l'efficacité clinique d'un antibiotique.

La **concentration de prévention des mutants résistants (CPM)** est un paramètre pharmacodynamique qui, confronté à la concentration sérique ou du site infecté en antibiotique, permet de prédire la sélection possible d'une sous-population résistante lors d'une infection. Les posologies, le rythme d'administration et la durée de traitement préconisés en thérapeutique reposent sur des études pK/pD et cliniques et visent notamment à éviter la fenêtre de sélection de mutants résistants. Lors d'un traitement antibiotique, leur respect est donc capital.

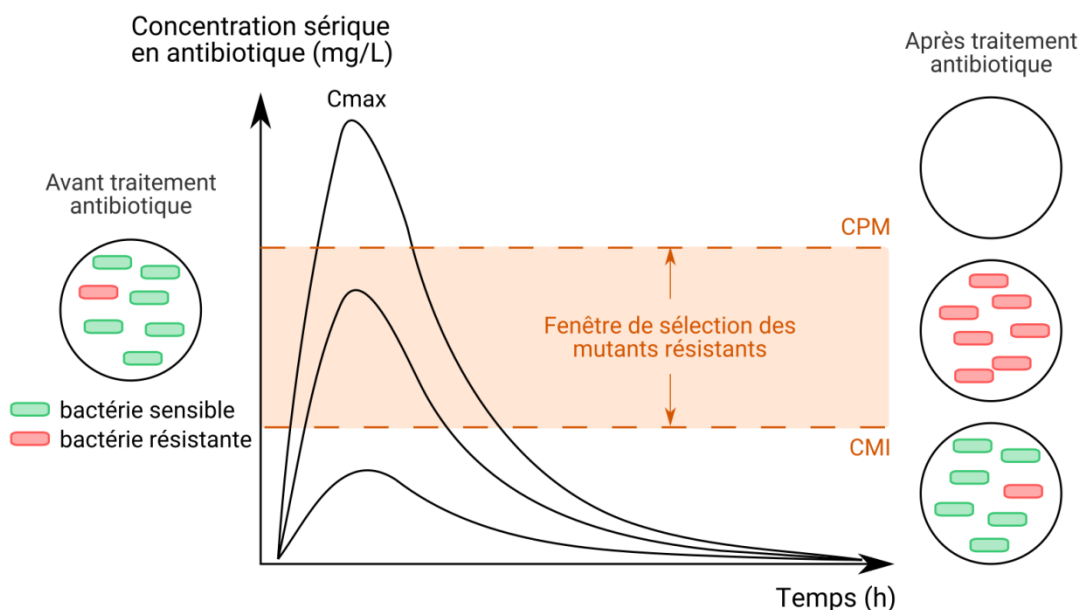


Figure 44: Sélection de mutants résistants en fonction de la concentration en antibiotique.

En pratique, la **CMI** est la plus faible concentration d'une gamme de dilutions d'antibiotique de demi en demi qui entraîne l'inhibition de toute croissance bactérienne visible. Elle explore donc l'effet bactériostatique seulement, ce qui n'est pas limitatif sachant qu'en bactériologie clinique, le but le plus souvent recherché est l'inhibition de la prolifération bactérienne, dans la mesure où l'organisme est capable de se défendre contre les bactéries.

Il faut noter que la **CMI** ne prédit pas toujours l'effet observé *in vivo*. De même, la **CMI** déterminée peut varier en fonction du milieu utilisé pour la réalisation du test .

Elle s'exprime en général en **µg/ml** et peut être réalisée par différentes méthodes et sur différents milieux de croissance.

2. Techniques de détermination de la CMI

2.1 Méthodes de dilution

Les méthodes de dilution sont effectuées en milieu liquide ou en milieu solide. Elles consistent à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'antibiotiques selon une progression géométrique de raison deux (2).

- En milieu liquide, l'inoculum bactérien est distribué dans une série de tubes (méthode de macrodilution) ou de cupules (méthode de microdilution) contenant l'antibiotique. Après incubation, la **CMI** est indiquée par le tube ou la cupule qui contient la plus faible concentration d'antibiotique où aucune croissance n'est visible.

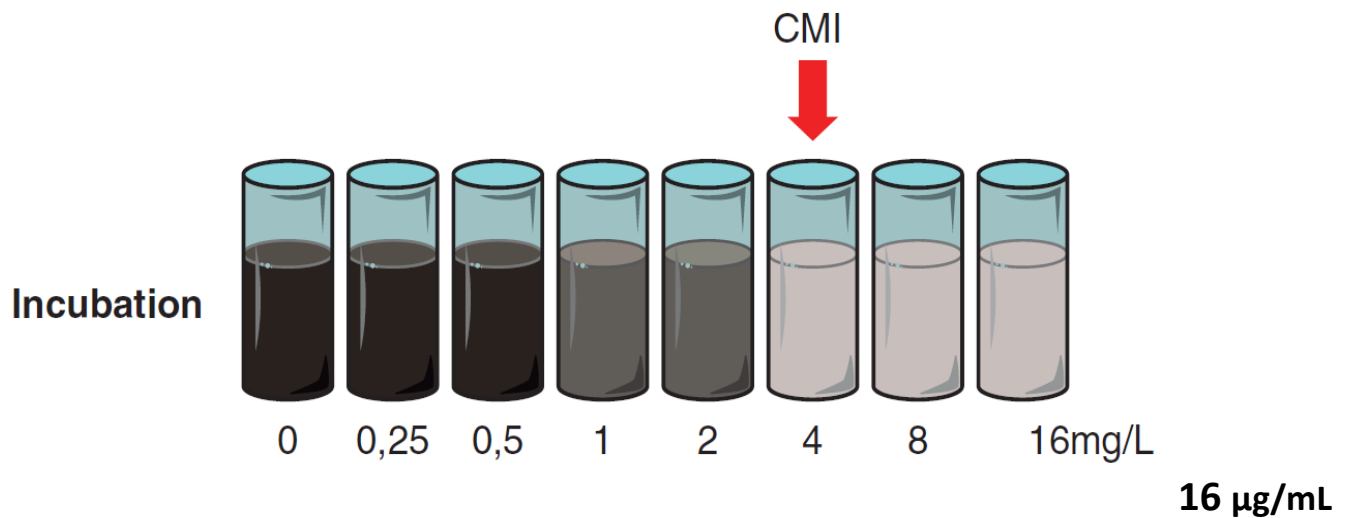


Figure 45: Détermination de la CMI en milieu liquide.

La CMI de la souche testée est de 4µg/mL (premier tube dans lequel aucune croissance n'est visible à l'œil nu).

- En milieu solide, l'antibiotique est incorporé dans un milieu gélosé coulé en boîtes de Pétri. La surface de la gélose estensemencée avec un inoculum des souches à étudier. Après incubation, la **CMI** de chaque souche est déterminée par l'inhibition de la croissance sur le milieu contenant la plus faible concentration d'antibiotique.

La méthode de dilution en milieu gélosé, réalisée avec une gamme de concentrations en progression géométrique de raison 2 est la méthode de référence. Elle permet également de mesurer la concentration inhibitrice 99% (concentration qui inhibe la croissance de 99% des cellules d'une souche bactérienne) ou la concentration inhibitrice 50% (concentration qui inhibe la croissance de 50% des cellules d'une souche bactérienne).

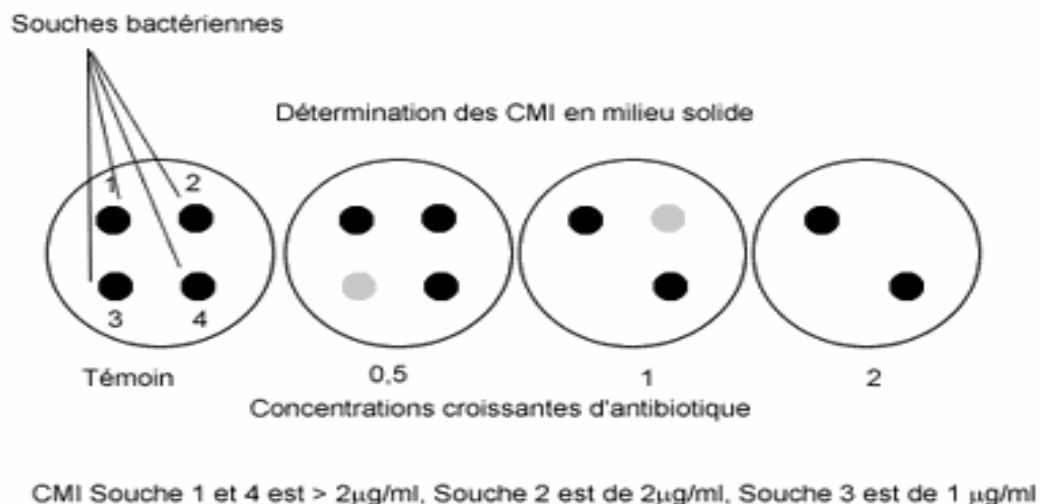


Figure 46: Détermination de la CMI par dilution en milieu gélosé.

Une boîte de Pétri permet de tester jusqu'à 30 souches différentes. Dans l'exemple présenté ci-dessus, le nombre de souches est limité à quatre. La CMI de la souche 3 vis-à-vis de l'antibiotique incorporé à la gélose est de 1 µg/mL. La CMI de la souche 2 est de 2 µg/mL. Les déterminations des CMI des souches 1 et 4 nécessiteraient de tester des concentrations plus fortes en antibiotique. Dans la pratique courante, les méthodes de dilution sont de mises en œuvre délicates et/ou coûteuses et elles sont réservées à des laboratoires spécialisés.

2.2 E-test

La détermination précise de la **CMI** par les méthodes classiques est difficilement utilisable en pratique quotidienne. La commercialisation d'une technique rapide et simple, l'**E-test** permet à un laboratoire une estimation indirecte de la **CMI**.

L'**E-test**, technique en milieu gélosé, permet de déterminer la **CMI** grâce à l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel continu de l'antibiotique à tester. Ce gradient couvre une zone qui, en fonction des molécules, va de 0,016 à 256 mg/L ou de 0,002 à 32 mg/L.

Le principe de l'**E-test®** est basé sur l'association des caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide. Les bandelettes (supports inertes, hydrophobes, de 5 mm de largeur et de 50 mm de longueur) sont appliquées sur la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec un inoculum de la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance se traduit par une ellipse d'inhibition dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la **CMI**. Une échelle de lecture, imprimé sur la bandelette, permet une interprétation rapide.

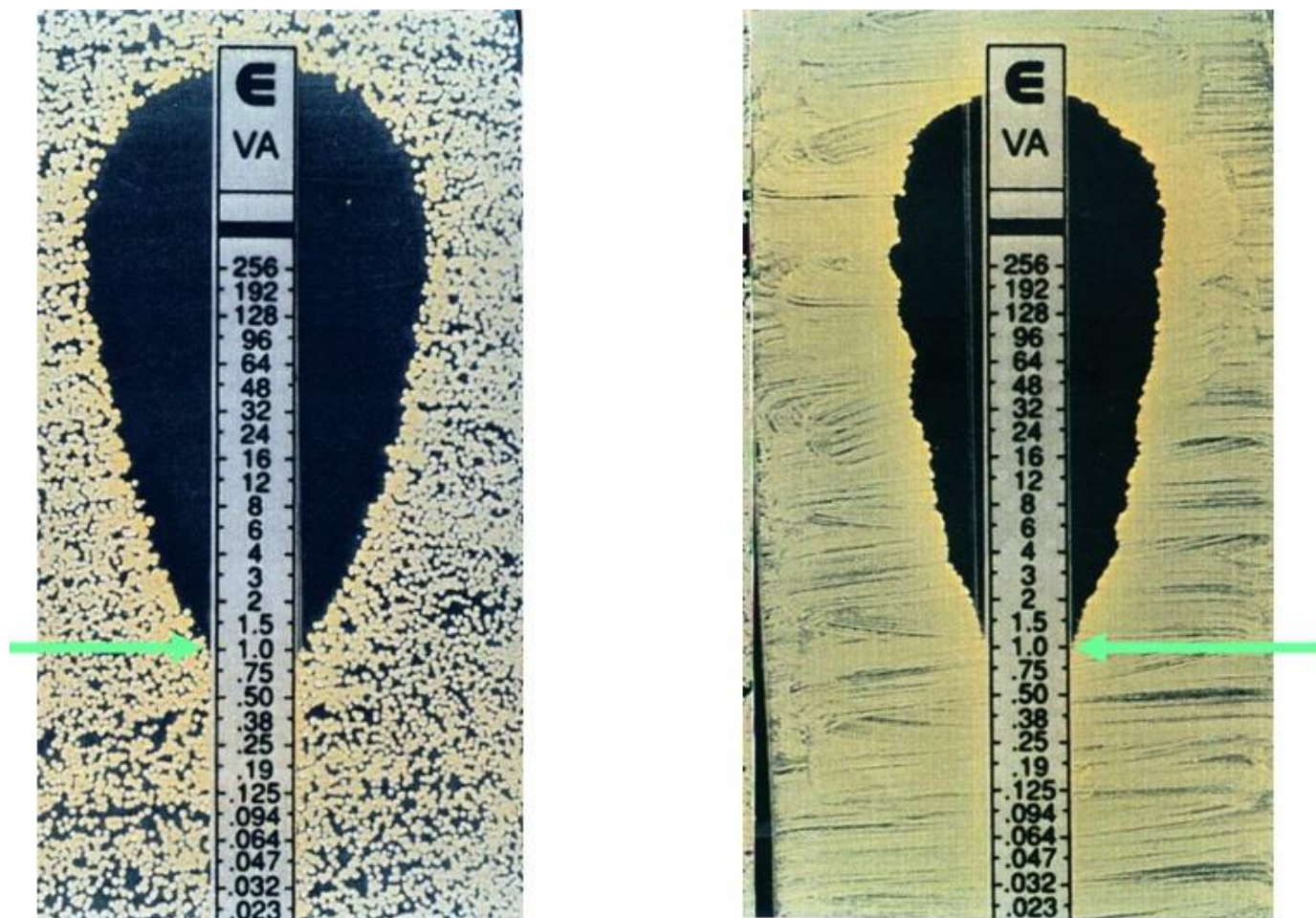


Figure 47: CMI des glycopeptides de *Staphylococcus aureus* : E-test®.

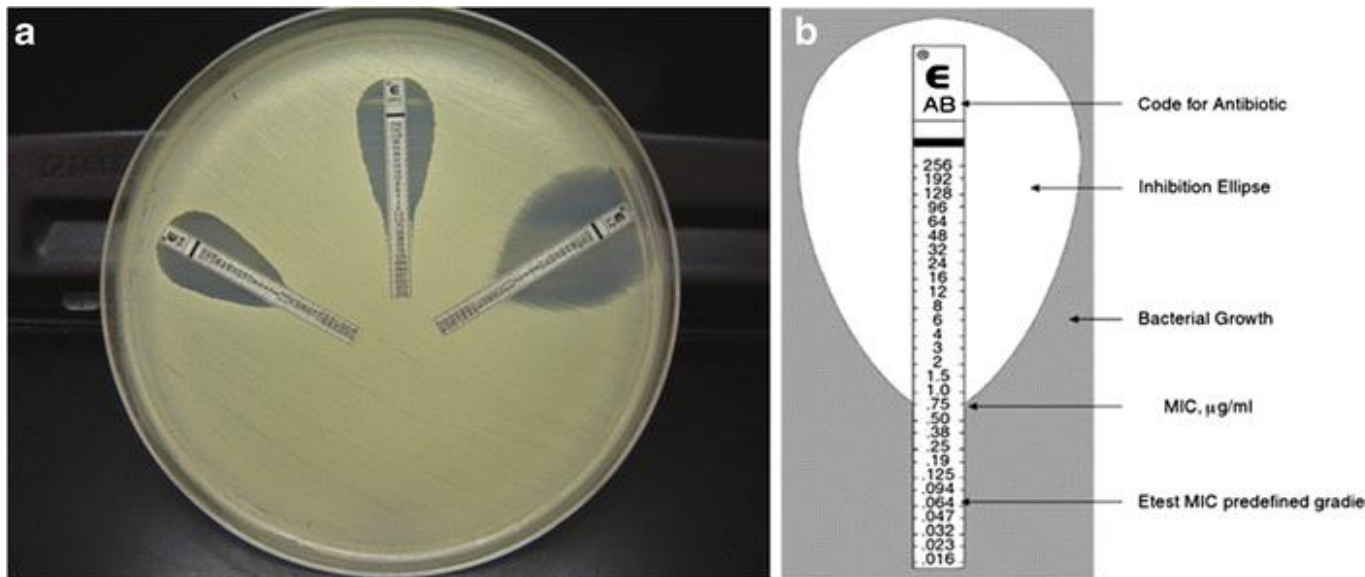


Figure 48: Détermination de la CMI par l'E-test®.

Lorsque la zone d'inhibition est nette et parfaitement symétrique, la lecture ne pose aucun problème. Dans tous les autres cas, une interprétation est nécessaire :

- Une zone de décrochage (dip) dans la zone de lecture impose de lire la **CMI** en extrapolant la courbe de l'ellipse.
- La présence de colonies **squatter** doit être analysée (résistance hétérogène, émergence de mutants résistants, mélange bactérien).
- La présence d'une croissance en ligne le long de la bandelette n'est pas prise en compte et résulte certainement d'un séchage insuffisant de la surface du milieu ;
- Une asymétrie des points d'intersection de l'ellipse avec la bandelette conduit à lire la **CMI** au niveau le plus élevé.

11. Association d'antibiotiques

L'interaction de deux antibiotiques peut produire quatre principaux effets:

- **Effet synergique:** l'effet de l'association est supérieur à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément.

$$\text{L'effet (A + B) > effet A + effet B}$$

- **Effet additif:** l'effet de l'association est légèrement supérieur à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément.

$$\text{L'effet (A + B) = effet A + effet B}$$

- **Effet indifférent:** l'activité d'un antibiotique n'a aucune influence sur l'activité de l'autre. L'effet (A + B) = effet A ou effet B
- **Effet antagoniste:** l'effet de l'association est inférieur à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément. L'effet (A + B) < effet A ou effet B

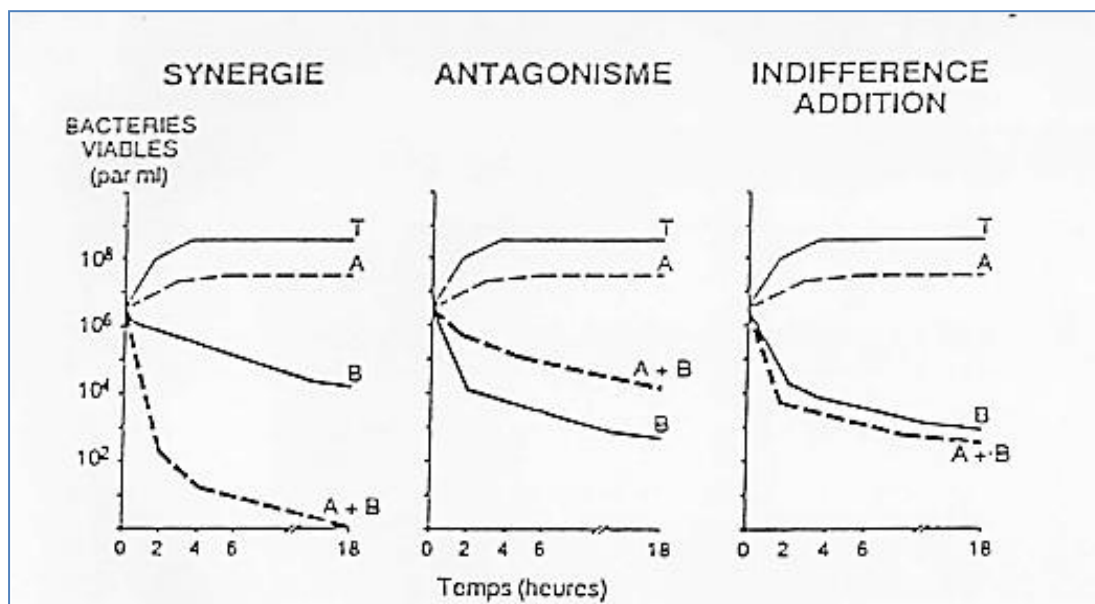


Figure 49: Association d'antibiotique: cinétique de bactéricidie en fonction du temps.

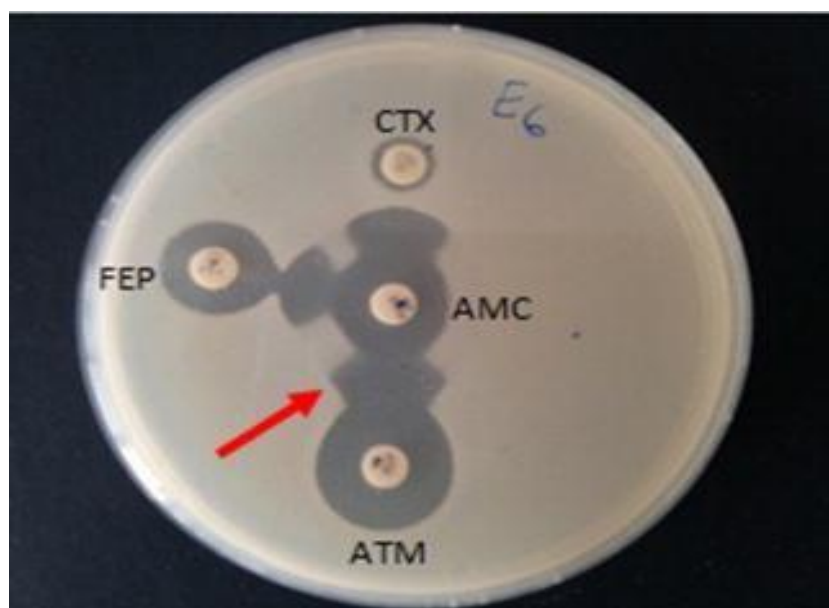


Figure 50: Test de synergie positif (aspect en bouchant de champagne).

FEP : Céfépime; AMC : Amoxicilline + Acide clavulanique ; ATM : Aztréonam.

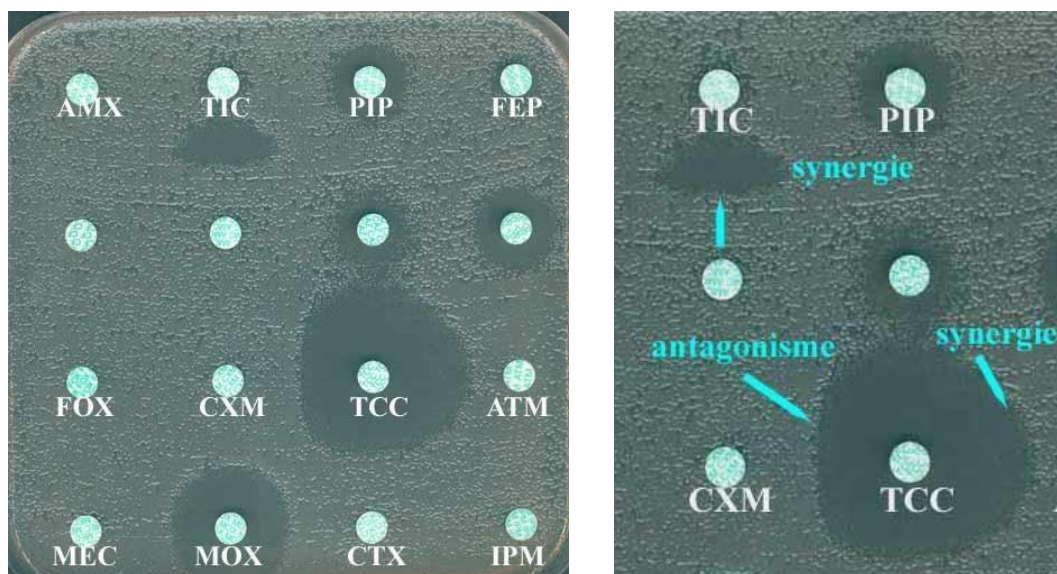


Figure 51: Expression phénotypique caractérisée par une multirésistance à divers antibiotiques associée à une image de synergie-antagonisme autour du disque de Ticarcilline-acide clavulanique (TCC).

L'utilisation d'une association d'antibiotiques est justifiée dans trois cas:

- Obtention d'un effet bactéricide maximal;
- Élargir le spectre d'activité dans les cas d'infections à germes multiples ou non documentée ;
- Prévenir et limité l'émergence la sélection de mutants résistants lors des traitements de longue durée (par exemple, lors d'infections à mycobactéries ou à brucelles).

La plus grande efficacité thérapeutique de certaines associations est démontrée expérimentalement et/ou confirmée par l'expérience clinique.

12. Limites de l'antibiogramme

Aujourd'hui, le principal défaut de l'antibiogramme est son délai de réalisation, il nécessite une culture pure de la bactérie, soit un premier délai de 18 à 24 heures, puis une incubation de même durée, soit un délai total au mieux de 48 heures. Alors que l'identification bactérienne est maintenant raccourcie de 24 heures à quelques minutes, par l'utilisation de la spectrométrie de masse. L'antibiogramme classique reste l'étape limitante d'une prise en charge rapide et ciblée des infections bactériennes. Dans certaines situations, le résultat de l'antibiogramme de première

intention ne permet pas de s'assurer de la sensibilité de la souche bactérienne à l'antibiotique ou d'identifier la présence d'une résistance acquise. Il faut alors réaliser des tests complémentaires pour mettre en évidence des mécanismes particuliers de résistance ou déterminer précisément la CMI. Par ailleurs, la réalisation d'un antibiogramme par le laboratoire ne constitue pas une incitation à traiter et à prescrire des antibiotiques, hormis lorsqu'il porte sur une bactérie pathogène isolée d'un site stérile (sang circulant, liquide cérébro-spinal...). Le bon usage des antibiotiques inclut la juste prescription des tests de diagnostic (le *diagnostic stewardship* en anglais, qui complète l'*antimicrobial stewardship*) : ils peuvent mettre en évidence des colonisations et des contaminations, qui n'ont aucun intérêt dans la prise en charge du patient mais augmentent inutilement la prescription d'antibiotiques, avec toutes les conséquences nocives à la fois individuelles et collectives, notamment sur la sélection et la diffusion de bactéries multirésistantes.

➤ **Tests basés sur les acides nucléiques**

Ces tests utilisent des méthodes basées sur les acides nucléiques, semblables à celles utilisées pour identifier les microorganismes mais modifiées pour détecter des gènes ou des mutations de résistance connus. Un exemple en est *mecA*, un gène de résistance à l'oxacilline de *Staphylococcus aureus*, si ce gène est présent, le microorganisme est considéré comme résistant à la plupart des β -lactamines quels que soient les résultats de l'antibiogramme. Cependant, bien qu'un grand nombre de ces gènes soient connus, leur présence ne confère pas nécessairement au microorganisme une résistance *in vivo*. En outre, comme de nouvelles mutations ou d'autres gènes de résistance peuvent être présents, leur absence ne garantit pas non plus la sensibilité au médicament. Pour toutes ces raisons, les méthodes des tests de sensibilité phénotypiques de routine demeurent l'approche standard d'évaluation de la sensibilité des bactéries et des champignons aux médicaments antimicrobiens. Cependant, les méthodes basées sur les acides nucléiques sont préférées pour leur diagnostic rapide de la tuberculose multirésistante dans les groupes à risque, ainsi que leur détection rapide de la résistance probable des microorganismes, directement obtenue à partir d'hémocultures positives.

Les techniques de diagnostic récentes, de plus en plus performantes et rapides, visent à pouvoir rapidement adapter l'antibiothérapie avant l'obtention de l'antibiogramme. Les techniques d'identification des bactéries se sont améliorées ces dernières années grâce à l'utilisation de la spectrométrie de masse, technologie basée sur l'analyse du profil protéique ribosomal des bactéries, se substituant aux techniques biochimiques dans de nombreux laboratoires. Ainsi, à partir d'une culture de bactéries sur un milieu solide, il est possible d'obtenir une identification en 15 minutes seulement. Les techniques de biologie moléculaire permettent de mettre en évidence les gènes de

résistances des bactéries directement sur prélèvement. Sur les colonies bactériennes, des tests colorimétriques (détection de β -lactamases) ou immuno-chromatographiques (détection de la PLP2A) sont réalisés en 20 minutes et permettent d'obtenir des résultats précocement. De plus, des améliorations de la technique de l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé permettent une lecture plus précoce de l'antibiogramme et sont actuellement en cours d'évaluation.



À l'avenir, la mise en place des techniques de séquençage du génome entier permettra d'avoir facilement la cartographie des gènes de résistance des bactéries d'un patient et pourra peut-être permettre un choix d'antibiotique plus pertinent et adapté aux potentielles émergences de souches résistantes chez le patient. Ce type de technique pourra également permettre de documenter facilement les transmissions croisées de bactéries résistantes.

En conclusion, les antibiogrammes permettent de déterminer la sensibilité d'un microorganisme en mettant en présence une concentration standard du germe et des concentrations spécifiques d'antibiotiques. Les antibiogrammes peuvent être effectués dans le cas des bactéries, des champignons et des virus. Dans le cas de certains microorganismes, les résultats obtenus pour un médicament laissent présumer de la sensibilité aux produits de même catégorie. Ainsi, tous les médicaments potentiellement utilisables ne sont pas testés.

Les antibiogrammes sont réalisés *in vitro* et peuvent ne pas tenir compte de nombreux facteurs qui influencent les résultats du traitement *in vivo* : pharmacodynamique et pharmacocinétique, concentrations variables du médicament selon les tissus, état immunitaire de l'hôte, immunité locale spécifique de l'hôte). Ainsi, les résultats des antibiogrammes ne permettent pas toujours de prévoir l'efficacité réelle du traitement. Les antibiogrammes peuvent être qualitatifs (méthode des disques), semi-quantitatifs (CMI) ou utiliser des techniques de biologie moléculaire. On peut également déterminer l'efficacité d'une association d'antimicrobiens (tests de synergie). L'antibiogramme représente actuellement une cible privilégiée de nouvelles évolutions techniques, notamment pour améliorer son délai de rendu.

VIII. Sécurité aux laboratoires

Le personnel de laboratoire qui travaille en contact avec des agents infectieux, peut contracter des infections par le biais d'accidents ou d'incidents ignorés. Le degré de **risque** dépend de la virulence de l'agent biologique concerné et de la résistance de l'hôte. Les infections contractées dans le laboratoire interviennent lorsque, par inadvertance, des germes sont avalés, inhalés ou introduits dans les tissus. L'ingestion accidentelle est le plus grand risque avec des pathogènes intestinaux comme *Shigella* et *E. coli*.

 <p>Risques physiques</p>	<p>Dangers?</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pièces mobiles • Formes dangereuses(verrebrisé,aiguille,etc.) • Plancher glissant ou local encombré • Électricité • Températures extrêmes(chaud ou froid) • Équipement sous haute pression ou vide • Point chaud : flammeneue, étincelle ou chaleur capable d'initierun incendie ou une explosion • Rayonnement non ionisant • Bruits et vibrations 	<p>Blessures et atteintes ...</p> <ul style="list-style-type: none"> • D'une simple écorchure à des blessures graves et multiples • Coupures, piqûres et possibilité de contamination • Chute • Électrisations,électrocution • Brûlures,engelures • Détérioration de l'acuitéauditive,de l'équilibre • Fatigue,stress,diminution de lavigilance • Etc.
 <p>Risques chimiques</p>	<p>Proviennent de...</p> <ul style="list-style-type: none"> • Absorption de produitstoxiques, corrosifs, irritants, réactifs,etc. • Exposition à des substances asphyxiantes, inflammables et combustibles • Exposition à des gaz, fumées, aérosols • Exposition à des poussières ou fibres 	<p>Blessures et atteintes ...</p> <ul style="list-style-type: none"> • Dommage organs cibles • Brûlure chimique • Intoxication, irritation • Maux de tête • Problème respiratoire • Asphyxie • Etc.



<i>Proviennent de...</i>	<i>Blessures et atteintes...</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Virus, bactérie, parasite, etc. • Morsures, égratignures ou piqûres d'animaux • Allergies 	<ul style="list-style-type: none"> • Rhume, grippe, hépatite • Rage, tétanos • Etc.



<i>Proviennent de...</i>	<i>Blessures et atteintes...</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Rayons X, gamma • Particules alpha, bêta • Neutron 	<ul style="list-style-type: none"> • Troubles neurologiques et physiques • Altération de l'ADN (ex. cancer, leucémie)

Le travail en laboratoire peut également entraîner des risques ergonomiques, psychosociaux et organisationnels

1. Biosécurité

Les travaux de recherche qui impliquant la manipulation de matériel biologique peuvent présenter un **risque d'infection** ou de contamination pour l'individu, mais également pour la communauté et l'environnement. L'utilisation de **matières infectieuses** nécessite la mise en place de plusieurs **mesures de contrôle**, tels des règlements, des méthodes de travail sécuritaires et des équipements spécialisés. Ces mesures visent à assurer une **protection contre les agents pathogènes**, les **toxines** et les **animaux infectés**. Le matériel biologique pouvant être une **source de matière infectieuse** : **Animaux, plantes, champignons, lignées cellulaires, microorganismes, prions, toxines, ADN recombinant, organismes génétiquement modifiés, vecteurs viraux, ADN, molécules biologiques de synthèse.**

Les **matières infectieuses** sont catégorisées selon quatre groupes de risque qui dépendent de leurs propriétés toxicologiques sur l'individu et la communauté, et ce, dans un contexte de manipulation en laboratoire.

Parmi les facteurs de risque, on retrouve la **pathogénicité**, la **dose infectieuse**, le **mode de transmission**, la **gamme d'hôtes**, ainsi que la **disponibilité de mesures préventives efficaces** et de **traitements efficaces**. Elles peuvent pénétrer l'organisme par quatre voies:

- L'inhalation sous forme d'aérosol (voie d'infection la plus importante).
- L'absorption cutanée ou oculaire.
- L'ingestion.
- L'injection (accidentelle) provenant de piqûres d'aiguilles ou d'objets tranchants souillés.

Contrairement aux risques chimiques, où l'effet d'un produit dépend généralement de la dose, une faible quantité de matériel biologique peut se multiplier dans l'hôte et avoir des effets néfastes pour celui-ci ou l'environnement.

1.1 Groupes de risques (GR) et les niveaux de confinement (NC)

L'utilisation de matériel biologique de nature infectieuse est hautement règlementée et l'UQTR doit détenir une attestation de conformité des laboratoires et des pratiques qui y ont cours. Cette utilisation doit être effectuée selon un niveau de confinement (NC) bien déterminé, qui décrit le niveau de sécurité minimal dans lequel les manipulations sont sans danger. Le NC concerne autant le milieu de travail (espace physique) que les méthodes opérationnelles. Les champs de recherche à l'UQTR impliquent uniquement du matériel biologique des groupes de risque (GR) 1 et 2. En général, les laboratoires qui travaillent avec des agents pathogènes de GR 1 nécessitent un NC 1, tandis que les laboratoires qui manipulent des agents pathogènes de GR 2 exigent un NC 2. Toutefois, certaines exceptions existent. Voici les principales caractéristiques de chacun des quatre groupes de risques :

<u>GR1</u> : Agents pathogènes ayant un risque faible pour l'individu et la communauté. <ul style="list-style-type: none">• Incapables de causer une maladie chez l'homme ou l'animal, ou peu susceptibles de le faire	<u>NC1</u>
<u>GR2</u> : Agents pathogènes ayant un risque modéré pour l'individu et faible pour la communauté. <ul style="list-style-type: none">• Peuvent causer des maladies graves chez l'homme et l'animal, mais peu susceptibles de le faire• Il existe des mesures préventives et des traitements efficaces• Faible risque de propagation dans la communauté	<u>NC2</u>
<u>GR3</u> : Agents pathogènes ayant un risque élevé pour l'individu et faible pour la communauté. <ul style="list-style-type: none">• Peuvent causer des maladies graves chez l'homme et l'animal• Il existe des mesures préventives et des traitements efficaces• Faible risque de propagation dans la communauté	<u>NC3</u>
<u>GR4</u> : Agents pathogènes ayant un risque élevé pour l'individu et la communauté. <ul style="list-style-type: none">• Peuvent causer des maladies graves et mortelles chez l'homme et l'animal• Il n'existe pas des mesures préventives et des traitements efficaces• Grand risque de propagation dans la communauté	<u>NC4</u>

Il est de la responsabilité du chercheur de vérifier le GR des agents qu'il manipule et d'appliquer le niveau de confinement requis.

- **Niveau de confinement 1 (NC 1)**

Le NC 1 requiert principalement que le laboratoire soit conçu avec des espaces de travail fonctionnels et des surfaces de travail nettoyables. Les bonnes pratiques de base en laboratoire doivent être maintenues en tout temps. On y manipule des agents pathogènes du GR 1. Le NC 1 vise essentiellement à éviter la contamination du matériel étudié et à éviter son contact avec l'environnement.

- **Niveau de confinement 2 (NC 2)**

Le niveau de confinement 2 requiert des mesures de sécurité et de conception des installations supplémentaires au niveau 1 :

- L'accès à ces laboratoires est contrôlé et limité au personnel autorisé qui a reçu la formation sur la biosécurité.
- L'affichage à l'extérieur du laboratoire fait mention des risques qu'on y retrouve à chaque point d'entrée.
- Les chercheurs doivent porter les équipements de protections individuels appropriés en tout temps dans la zone de confinement. Les sarraus utilisés en zone de confinement doivent être dédiés uniquement à cet usage.
- Les manipulations susceptibles de générer des aérosols ou ayant des concentrations ou quantités élevées de matière infectieuses doivent être effectuées dans une ESB
- Les procédures opérationnelles normalisées doivent être utilisées et respectées à l'entrée, à l'intérieur et à la sortie de la zone de confinement. Les utilisateurs doivent se laver les mains et retirer les équipements de protections individuels avant de sortir.

Le NC 2 vise à protéger le matériel étudié, mais également ses utilisateurs et l'environnement de son contact.

1.2 Décontamination

La décontamination du matériel, de l'équipement et des aires de travail du laboratoire permettent de contrôler la libération accidentelle d'un agent pathogène dans la communauté ou l'environnement, mais également ses utilisateurs. Il est essentiel d'utiliser des moyens de décontamination efficace avant d'éliminer ou de réutiliser le matériel. Cela peut se faire par stérilisation (autoclave) ou désinfection. Les Fiches signalétiques d'agents pathogènes et évaluation des risques peuvent donner des indications à cet effet.

2. Pratiques sécuritaires au laboratoire de Microbiologie

Les pratiques de bio-sécurité doivent être appliquées pour tout travail avec des microorganismes présentant des risques pour le personnel et l'environnement. Ces pratiques indiquent que:

- Le personnel de laboratoire dispose d'une formation spécifique sur la manipulation des agents pathogènes et travaille sous la direction de chercheurs compétents.
- L'accès au laboratoire est limité lors de la réalisation des manipulations.
- Des précautions extrêmes sont prises en ce qui concerne les objets pointus contaminés.
- Certaines manipulations produisant des aérosols infectieux ou des risques d'éclaboussures sont effectuées en utilisant des vêtements et un équipement de protection.



2.1 Pratiques de sécurité standard en microbiologie

Les directives de sécurité données ci-dessous s'appliquent à tous les laboratoires de microbiologie quelque soit le niveau de bio-sécurité :

- Limiter l'accès au laboratoire.
- Mettre des pancartes ou signaux sur toutes les portes de laboratoire et sur tout l'équipement (incubateurs, hottes, réfrigérateurs, congélateurs) utilisé pour le travail de laboratoire.
- Ne pas faire entrer les enfants de moins de 12 ans et les animaux dans les laboratoires. Ces derniers doivent être fermés lorsqu'ils sont inutilisés.
- Tous les réfrigérateurs et congélateurs placés dans les couloirs doivent être fermés à clé
- Lavage des mains.
- Équiper chaque laboratoire d'un évier pour se laver les mains.
- Se laver souvent les mains est l'une des procédures les plus efficaces pour éviter de contracter des infections dans le laboratoire.
- Les mains doivent être lavées avec un savon bactéricide avant de sortir du laboratoire ou après avoir touché du matériel infectieux.

➤ **Repas**

- Il est interdit de manger, de boire ou de fumer dans les zones de travail.
- La nourriture doit être gardée à l'extérieur de la zone de travail dans des espaces prévus uniquement à cet effet.
- Ne pas laisser d'objets personnels tels que les sacs à main ou les lunettes sur les paillasses.

➤ **Prélèvement par la bouche avec la pipette**

- Tout pipetage par la bouche est strictement interdit.
- Utiliser une poire ou une propipette.

➤ **Objets pointus**

- Faire extrêmement attention avec des objets pointus contaminés, notamment les aiguilles et les seringues, les lames, les pipettes, les tubes capillaires et les bistouris.
- Jeter les objets pointus dans des récipients conçus à cet effet.
- Afin d'éviter les piqûres aux doigts, il ne faut pas chercher à plier ou à casser les aiguilles ou à les encapuchonner car c'est ainsi que l'on risque de se piquer les doigts.

- Les objets pointus non jetés doivent être mis dans un récipient clairement identifié afin de les décontaminer avant le nettoyage.
- Ne pas toucher de verre cassé directement avec la main mais l'enlever par des moyens mécaniques comme des brosses, pelle et balayette ou pinces.

➤ **Aérosols**

- Exécuter attentivement toutes les procédures pour éviter la création d'éclaboussures ou d'aérosols
- Éviter les techniques qui ont tendance à produire des aérosols.
- Faire refroidir les anses et fils d'ensemencement en les tenant en l'air pendant 5 à 10 secondes avant de toucher les colonies ou le matériel clinique.
- Faire sécher à l'air chaud au-dessus du bec Bunsen les anses contenant du matériel infectieux avant de les passer à la flamme.
- Faire les opérations de centrifugation ou de vortex dans des récipients fermés.
- Utiliser de la gaze pour retirer les bouchons des échantillons de sang et placer de la gaze autour du bouchon des flacons d'hémoculture pour minimiser la production d'aérosol au moment de retirer l'aiguille.
- Ne jamais couper les aiguilles ou les ôter des seringues avant autoclavage.
- Centrifuger les liquides biologiques uniquement dans des plots comportant des bouchons de sécurité.
- Pendant les procédures où il existe un grand risque de créer des aérosols infectieux ou lorsque l'on craint des éclaboussures ou pulvérisations de matériel infectieux ou dangereux, effectuer le travail en laboratoire dans un endroit sûr en se protégeant le visage (lunettes, masques ou autres moyens le protégeant). Il s'agit de toutes les opérations de centrifugation, mélange, agitation, traitement aux ultrasons, ouverture de récipients contenant du matériel infectieux dont la pression interne peut être différente des pressions ambiantes, inoculation à l'animal par le nez et collecte de tissus infectés sur des animaux ou des œufs.
- Il faut se protéger le visage en cas d'utilisation de concentrations élevées ou de grandes quantités d'agents infectieux.
- Décontaminer le dessus des paillasse et des autres surfaces.
- Décontaminer régulièrement les surfaces des paillasse avec un désinfectant (désinfectant au phénol, hypochlorite de sodium à 1% (Javel) ou alcool à 70°C) après chaque manipulation

d'agents infectieux ou d'échantillons cliniques, après une éclaboussure ou autre contamination avec un matériel infectieux.

- Les désinfectants doivent être présents sur les lieux de travail.
- Évacuation du matériel contaminé.
- Les boîtes de Pétri, les tubes, les échantillons cliniques ou tout autre matériel contaminé, doivent être mis dans des récipients-poubelles placés près de chaque paillasse.
- Utiliser des boîtes spéciales pour les aiguilles et le verre contaminés pour minimiser le plus possible le risque de blessure.
- Éviter de trop remplir ces récipients.
- Porter précautionneusement les poubelles jusqu'à la laverie avant de les autoclaver.

➤ **Ventilation**

▪ **Ventilation générale**

Les laboratoires doivent être en pression négative, c'est-à-dire que les contaminants sont limités à l'environnement de travail immédiat et ne se disperseront pas hors du local. Tout laboratoire manipulant des produits dangereux toxiques et générant des vapeurs dangereuses doit avoir accès à une hotte de laboratoire ou à un système de captage des vapeurs et contaminant qui doivent être évacués directement à l'extérieur ou sur un support filtrant. Il ne doit pas y avoir recirculation des produits dangereux dans le système de ventilation.

▪ **Hottes chimiques**

Une hotte chimique est une enceinte dans laquelle une pression négative attire l'air de la pièce par un système mécanique. Cet air est ensuite dirigé vers une cheminée extérieure. Le manipulateur et l'environnement sont ainsi protégés. Tout travail impliquant des matières dangereuses, tels des solvants, des produits volatils, des acides et bases concentrées doit être effectué sous une hotte. Tout travail susceptible de produire des émanations de vapeurs, de fumées et poussières nocives doit être effectué sous une hotte ou un système de captage des contaminants.

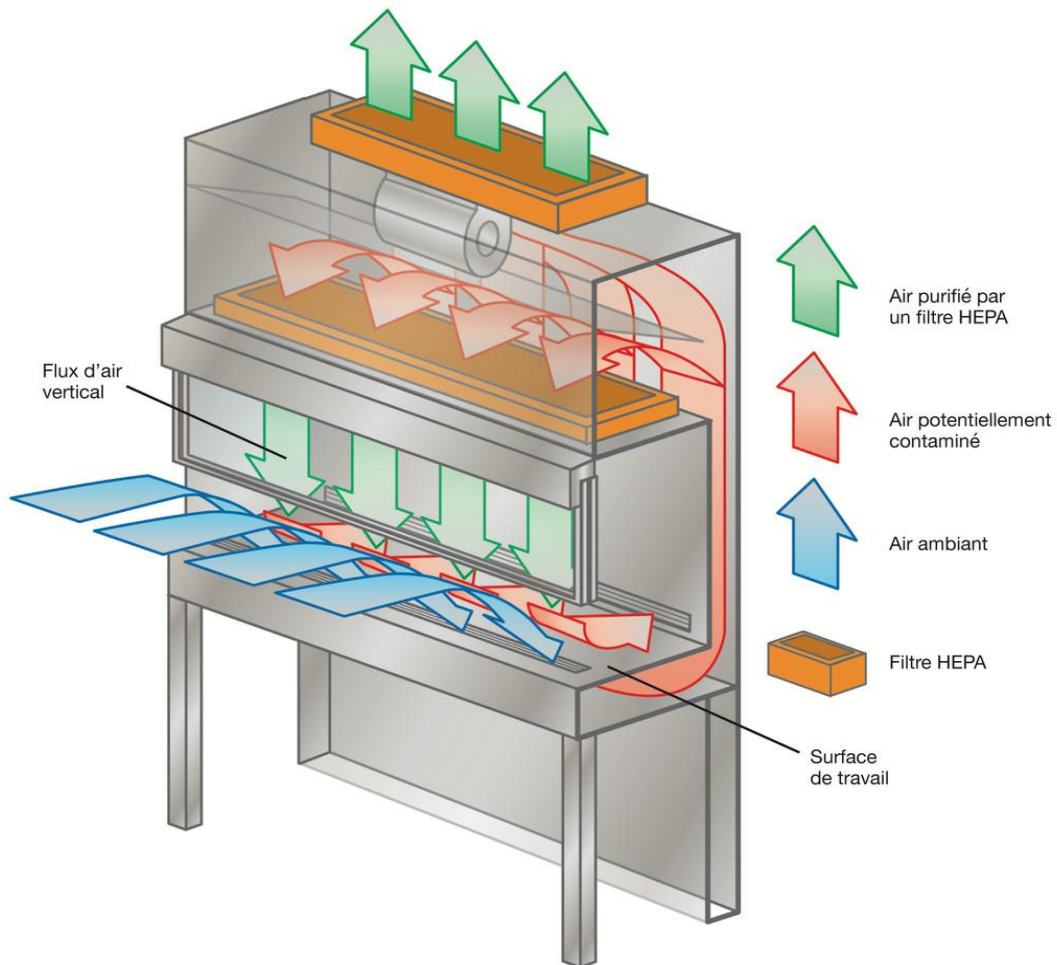


Figure 52: Schéma descriptif d'une hotte chimique.

✓ **Bon fonctionnement de la hotte et son bon usage**

- Avant l'emploi, toujours vérifier son tirant. Lorsqu'il y a un moniteur de contrôle, celui-ci doit indiquer une vitesse d'aspiration autour de 100 fpm (feet/min).
- Limiter les équipements et les produits dangereux à l'intérieur de la hotte.
- Manipuler les produits et le matériel le plus au fond de la hotte. Seuls vos avant-bras devraient être à l'intérieur.
- Manipuler avec le châssis à moitié fermé, afin d'avoir une évacuation efficace et une meilleure protection contre les éclaboussures ou projections.
- Fermer le châssis de la hotte lorsqu'elle n'est pas utilisée.
- Éviter les mouvements brusques à l'intérieur et à proximité de la hotte.
- Ne pas utiliser de matières infectieuses ou de matières radioactives dans les hottes chimiques.
- Ne pas utiliser d'acide perchlorique. Cet acide fait des dépôts explosifs sur les parois des conduits.

- Neutraliser les vapeurs des substances corrosives si de grandes quantités sont générées.
- Manipuler les liquides inflammables et combustibles uniquement dans les hottes chimiques certifiées.
- Surélever les équipements volumineux, afin de faciliter l'évacuation des vapeurs.
- Identifier toute expérience sans surveillance et laisser ses coordonnées sur le châssis de la hotte, spécifiquement lorsque les réactions se prolongent au-delà des heures normales de travail.
- Au cas du mauvais fonctionnement ou bris de la hotte, rapporter immédiatement tout problème de fonctionnement ou bris au service de l'équipement, au responsable de laboratoire et mettre une affiche visible d'interdiction d'emploi.

▪ **Enceintes de sécurité biologique (ESB)**

Une enceinte de sécurité biologique est un système destiné à protéger l'utilisateur et son environnement contre l'exposition aux toxines et aux matières infectieuses qui peuvent être aéroportées. Selon le type d'ESB (catégorie I et II, types A1, A2, B1 et B2), les échantillons utilisés à l'intérieur de l'enceinte sont protégés contre la contamination de l'air de la pièce par un flux laminaire (de l'air propre est soufflé vers les échantillons). L'air retiré est filtré par un filtre à haute efficacité (HEPA) qui assure sa décontamination.

Tout travail impliquant des procédures pouvant entraîner la formation d'aérosols ou nécessitant l'utilisation de fortes concentrations ou de grands volumes des matières infectieuses doit être effectué dans une ESB.

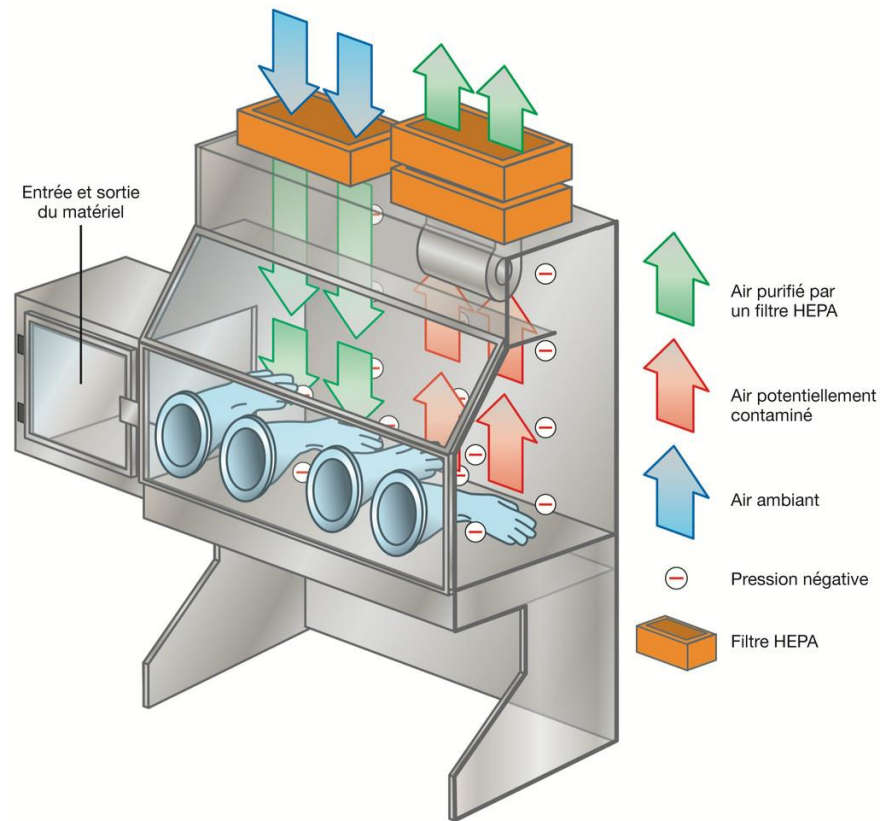


Figure 53: Schéma descriptif d'une enceinte de sécurité biologique (ESB).

✓ **Bon fonctionnement de l'ESB et son bon usage**

- Avant l'emploi, toujours vérifier son tirant. Les valeurs de pression doivent correspondre aux valeurs de certification.
- N'utiliser que le matériel dédié et le plus possible jetable.
- Ne pas utiliser de produits chimiques (sauf pour les catégories II de type B1 ou B2 qui permettent de petites quantités seulement).
- Ne pas utiliser de flamme nue en continu pour ne pas endommager le filtre HEPA.
- L'usage du bec Bunsen est interdit; le remplacer par un microbrûleur électrique ou un brûleur de sécurité électronique).
- Ne pas utiliser d'appareil créant des courants d'air, telles des pompes à vide ou centrifugeuses.
- Les manipulations sous l'ESB doivent s'effectuer vers le fond de l'aire de travail (particulièrement lorsque des radionucléides y sont manipulés (cat.II, types B1 et B2).
- Les coudes et les bras ne devraient pas toucher la grille ni le plan de travail.
- Éviter les va-et-vient devant l'ESB lorsqu'elle est utilisée, éviter l'ouverture ou la

fermeture rapide des portes et éviter de faire des mouvements de balayage dans l'enceinte afin de maintenir l'intégrité du flux d'air laminaire situé à l'avant de l'ESB.

- Les bras devraient être glissés vers l'intérieur ou l'extérieur de l'enceinte, perpendiculairement à l'ouverture frontale.
- Pendant le travail sous l'ESB, séparer les articles non contaminés (« propres ») des articles contaminés (« sales »).
- Il est important de toujours travailler des zones « propres » vers les zones « sales ».
- Une seule personne à la fois doit travailler dans une ESB.
- Si vous devez aller chercher du matériel en dehors de l'enceinte, retirer vos gants. En remettre une nouvelle paire pour revenir dans l'ESB et attendre quelques minutes avant de reprendre les manipulations pour permettre au flux d'air de se stabiliser.

➤ **Autoclave**

- Un autoclave doit être à disposition pour les laboratoires de niveau de biosécurité 2/3, il ne sera utilisé que par un personnel formé en la matière.
- Des tests de stérilité seront effectués régulièrement avec des bandes de spores ou autres indicateurs biologiques conçus à cet effet.
- Chaque autoclavage doit être suivi avec une bande sensible à la température, un thermographe ou d'autres moyens (par exemple des indicateurs biologiques).
- Conduite générale au laboratoire.
- Garder toutes les zones du laboratoire bien propres et bien rangées.
- Il est inacceptable de faire une recherche biologique dans des locaux sales, plein de poussières, en désordre et encombrés.
- Les sols doivent être bien propres, sans entassement inutile et lavés avec un produit désinfectant et plus particulièrement après tout renversement de matériel infectieux.

➤ **Réfrigérateurs et congélateurs**

- Les réfrigérateurs et congélateurs doivent être inspectés régulièrement pour être sûr qu'ils ne contiennent pas de fioles ou de tubes cassés contenant des agents infectieux.
- Le matériel cassé doit être enlevé par une personne qui porte des gants et une blouse de protection
- Nettoyer régulièrement les réfrigérateurs et les congélateurs avec un désinfectant et les décongeler pour éviter toute contamination possible ainsi qu'une remontée de la température.

➤ **Prévention des incendies**

- Garder tous les becs Bunsen à l'abri des lampes et des produits inflammables, les réserves de produits inflammables doivent être placées dans un lieu sûr.
- On peut conserver des petites quantités de ces produits inflammables dans des récipients sûrs (par exemple, l'acétate d'éthyle, l'alcool éthylique et le méthanol).
- Éteindre les becs Bunsen quand on ne les utilise pas.
- Connaître l'emplacement des extincteurs et des douches.
- Les instructions à suivre en cas d'incendie et les voies d'évacuation doivent être affichées.

2.2 Pratiques spéciales

➤ **Transport du matériel bio-dangereux**

Le transport du matériel bio-dangereux d'un établissement à un autre augmente le risque de casse ou de fuites. Observer les directives suivantes si le transport est nécessaire :

- le récipient primaire des agents infectieux (quelle que soit sa taille) doit être placé dans un second récipient incassable et pouvant être fermé hermétiquement (avec un bouchon que l'on peut visser ou avec un sac en plastique).

➤ **Désinfectants**

- Les organismes ont des sensibilités différentes aux divers désinfectants.
- Comme désinfectant de surface, l'alcool à 70° est généralement actif contre les entérobactéries, mais d'autres organismes sont plus résistants. Cependant, l'alcool à 70° n'est pas le désinfectant de choix pour décontaminer lors d'une fuite ou lorsque l'on a renversé un liquide contaminé.
- Les désinfectants phénoliques, bien que chers, sont généralement actifs contre beaucoup d'organismes.
- Toujours lire la notice d'utilisation ou les recommandations du fabricant pour les dilutions et le temps d'action, spécialement pour des organismes recommandant des normes de biosécurité de type 3 (comme les mycobactéries par exemple).
- L'hypochlorite de sodium à 1% (eau de Javel) constitue un bon désinfectant.
- A cette dilution, on peut l'utiliser sur les surfaces des paillasse, les hottes et tout autre matériel.
- Une dilution au 1:10 (10%) est corrosive et ronge le métal.

- Ne pas utiliser régulièrement la dilution de 10% mais l'employer pour nettoyer tout déversement de matériel infectieux en cas de forte contamination.
- Préparer quotidiennement les dilutions d'hypochlorite de sodium.
- Décontamination en cas de déversement

La procédure suivante est recommandée lors des déversements :

- Isoler les lieux afin que personne n'entre.
- Porter des gants et des habits de protection (blouse ou autre revêtement, masque si le déversement peut contenir un agent respiratoire ou si l'agent est inconnu).
- Éponger ou recouvrir le déversement avec des serviettes absorbantes.
- Saturer les serviettes avec un désinfectant adapté, dilué en quantité adéquate.
- Laisser les serviettes ainsi imbibées sur la surface pendant 15 minutes au minimum.
- Frotter la zone en utilisant des serviettes imbibées puis laisser sécher la zone.
- Placer ensuite les serviettes dans un récipient destiné au matériel contaminé.
- Elles doivent être traitées de la même manière que tout autre déchet infectieux.

➤ **Accidents**

- Toute blessure ou accident inhabituel doit être rapporté immédiatement au superviseur du laboratoire.
- Lorsqu'une piqûre ou une coupure a eu lieu avec des aiguilles ou autre matériel potentiellement contaminé, laver la blessure avec un savon désinfectant et de l'eau.
- Dans le cas d'un accident de centrifugation, quand des portoirs de sécurité n'ont pas été utilisés, prévenir les autres personnes du laboratoire afin d'éviter la zone puis en informer le superviseur.

2.3 Habits et équipement de protection

Les équipements de protection individuelle ont pour rôle de réduire à un niveau acceptable l'exposition d'un travailleur à un ou plusieurs types de risque. ils doivent être bien entretenus et inspectés avant chaque utilisation.

2.3.1 Pour la protection des yeux et du visage

➤ **Lunettes de protection**

Les lunettes de protection sont obligatoires lorsqu'il y a exposition à des risques d'aérosols, d'éclaboussures de matières dangereuses et à des risques de projections de particules ou de

poussières. Des lunettes de protection avec verre correcteur ou pour porter par-dessus des verres correcteurs sont disponibles sur le marché. être munies de protecteurs latéraux, s'ajuster à la forme du visage en minimisant l'espace entre la peau et les lunettes.

➤ **Visière de protection faciale**

La visière doit être portée pour la manipulation de liquides cryogéniques, lorsqu'il y a un risque d'explosion ou un grand risque d'éclaboussures. Elle doit être portée lors de travaux par point chaud, lorsque le masque de soudage n'est pas requis, mais qu'il y a possibilité de projections d'étincelles. Les lunettes de protection doivent être portées sous la visière. Les lunettes à coques (*goggle*) sont nécessaires lorsque le risque d'éclaboussure ou de projection de particules est élevé ou lors de la manipulation de faible quantité de produits chimiques irritants en cas d'absence d'accès à une hotte.

➤ **Écran de protection**

L'écran de protection doit être utilisé en cas de risque d'explosion ou lorsque des mesures de protection supplémentaires sont requises. L'écran de protection doit être placé entre le montage et l'utilisateur.

➤ **Lunettes de protection opaques**

Les lunettes de protection opaques sont obligatoires pour l'utilisation de lasers de classe 3B, 3R et de classe 4. La protection doit être choisie selon la longueur d'onde, la puissance et le type de laser (suivre les indications du fabricant). Les lunettes protègent contre les réflexions diffuses d'une longueur d'onde donnée, mais pas contre les réflexions spéculaires (créées par des surfaces réfléchissantes tel un miroir qui contient jusqu'à 95% de l'énergie du laser) ou le rayon direct du laser. Il faut :

- Inspecter les lunettes avant chaque utilisation pour voir si elles comportent des bris (rayures ou filtre endommagé).
- Ne jamais regarder directement un rayon laser ou sa réflexion spéculaire.
- Dans le cas de laser émettant dans le spectre UV, porter des lunettes de protection avec filtre UV, visière, sarrau en coton et gants jetables. Toute partie du corps exposée doit être protégée.

➤ **Masque de soudage**

Le masque de soudage doit être porté lors de travaux de soudage à l'arc électrique ou autre; coupage ou gougeage au plasma et coupage à l'arc au carbone avec jet d'air. Des lunettes de protection standard doivent être portées en dessous du masque de soudage. Les travaux de soudage, coupage ou de brasage peuvent être effectués avec des lunettes de protection munies de lentilles filtrantes moins foncées que le masque de soudage.

2.3.2 Pour la protection du corps

Les vêtements de ville doivent toujours être remis séparément des sarraus de laboratoire, des vêtements de travail et du tablier.

➤ **Sarrau de laboratoire**

Le sarrau sert de barrière de protection contre les contaminants chimiques et biologiques. À l'inverse, il peut servir à protéger tout matériel d'une contamination par l'utilisateur (*ex. matériel biologique*). Il peut également servir à protéger l'utilisateur contre les projections de particules, poussière, huiles ou peintures. Le tissu doit être choisi en fonction de la résistance, du risque d'exposition (*ex. feu*) et de l'imperméabilité recherchée. Il doit être muni de boutons-pression pour un enlèvement rapide.

➤ **Vêtement de travail**

Le vêtement de travail sert à protéger l'utilisateur contre les projections de particules, poussière, huiles ou peintures. Le tissu doit être choisi en fonction de la résistance et de l'imperméabilité recherchées. Il doit être muni de boutons-pression pour un enlèvement rapide. Pour les travaux de soudage ou impliquant un travail par point chaud, il doit être en coton ou en tissus ininflammable pour être utilisé sans tablier ignifuge. De plus, il ne doit pas comporter de bas de pantalon tourné et les poches de chemise doivent être à rabat.

➤ **Blouses de laboratoire**

- Porter des blouses ou des uniformes de protection pendant que l'on travaille dans le laboratoire.
- Enlever ces vêtements de protection au moment de quitter le travail (ou la zone du laboratoire) et les laisser au laboratoire.
- Tous les vêtements de protection sont soit détruits au laboratoire soit nettoyés par l'institution.
- Ils ne doivent jamais être emportés à la maison par le personnel.

➤ **Gants**

Les gants servent de barrière de protection contre les contaminants chimiques, biologiques et les blessures mécaniques.⁸ Ils doivent être choisis en fonction de leurs utilisations.

- Quel que soit le type de matériel infectieux, porter des gants lors de l'exécution de procédures jugées dangereuses (par exemple, l'agglutination sur lame) quand il y a un risque d'éclaboussure ou de contamination de la peau ou encore quand le technicien de laboratoire a des coupures ou autres lésions sur la main.
- Les gants doivent toujours être portés lors du travail avec des échantillons cliniques, des liquides biologiques et des tissus humains ou animaux.
- Il faut partir du principe qu'ils peuvent être contaminés par le virus de l'hépatite B, du VIH, d'autres pathogènes transmis par le sang ou par *Mycobacterium tuberculosis*.
- Enlever les gants quand ils sont contaminés ou quand le travail avec le matériel infectieux est terminé.
- Ne pas porter les gants à l'extérieur du laboratoire.
- Ne pas utiliser le téléphone et ne pas ouvrir les portes avec des gants qui ont été utilisés pendant les manipulations de laboratoire.
- Jeter tous les gants utilisés avec le reste du matériel à usage unique destiné à être autoclavé.
- Les mains doivent être lavées juste après avoir enlevé les gants.

✓ **Gants jetables**

Les gants jetables sont faits de latex, vinyle ou nitrile. Le choix doit être en fonction du risque de contamination, de la résistance aux différents produits utilisés (taux de perméabilité, temps de protection et dégradation), du temps d'utilisation et la souplesse recherchée. Ils ne protègent ni des températures extrêmes ni des perforations et peuvent être doublés en situation plus délicate ou plus risquée. Retirer les gants immédiatement en cas d'éclaboussures, même s'il s'agit de 1 ou 2 goutte.

✓ **Gants réutilisables**

Produits chimiques et fluides : selon le produit, le caoutchouc néoprène offre une bonne polyvalence. Ils sont utilisés pour se protéger des températures extrêmes : gants thermaux, etc., pour se protéger des abrasions et des angles vifs : cuir, cotte de mailles, etc. Les gants de cuir, cotte de mailles et Kevlar® ne protègent pas contre les produits chimiques.

➤ **Chaussures**

Dans un laboratoire, les chaussures doivent être fermées au talon et aux orteils, avoir des semelles antidérapantes, des talons bas et faites d'un matériau facile à nettoyer et à désinfecter. Ces caractéristiques permettent d'éviter les chutes, les blessures, protègent contre les déversements ou les contaminations.

➤ **Chaussures de sécurité**

Le port de chaussure de sécurité est requis dans certains secteurs présentant des risques de blessures aux pieds telles la chute de matériel, les formes dangereuses, les matières corrosives ou irritantes et l'électricité. Elles doivent être choisies en fonction des risques retrouvés dans le milieu de travail et être conformes à la norme CSA Z195.

➤ **Protections**

- Toujours considérer les échantillons cliniques, les liquides biologiques et des tissus humains ou animaux comme potentiellement positifs pour le virus de l'hépatite B, le VIH, d'autres pathogènes transmis par le sang ou pour *Mycobacterium tuberculosis*.
- Ces échantillons devraient être manipulés dans des hottes de sécurité en se dotant de protections appropriées comme les lunettes, les gants, un masque ou tout autre moyen de protéger le visage des éclaboussures ou des aérosols.

3. Gestion des matières dangereuses

3.1 Transport

Le transport des matières dangereuses entre les locaux ou les pavillons doit se faire de manière sécuritaire, afin d'éviter toute fuite, tout déversement ou accident :

- Sécuriser les échantillons et produits dangereux dans un autre contenant, récipient ou dispositif de sécurité afin de prévenir un déversement accidentel.
- Le transport de toute matière dangereuse dans les escaliers est strictement proscrire.
- Utiliser un chariot pour les grands volumes. Les contenants en verre doivent être sécurisés pour éviter qu'ils s'entre choquent.

3.2 Étiquetage

Toute matière dangereuse doit être correctement étiquetée.

3.3 Entre posage et inventaire

Les matières dangereuses doivent être entreposées de manière sécuritaire et faire l'objet d'un inventaire qui doit être maintenu à jour. Commander des petits volumes, si

nécessaire fréquemment, permet de diminuer l'espace d'entreposage, le danger du lieu et assure une qualité de certains produits qui se dégradent selon les conditions de stockage. Il est également important de vérifier régulièrement l'état des armoires. Les vapeurs corrosives peuvent entraîner des dommages et au pire la chute de tablettes.

- Identifier chaque armoire (ou zone) selon la classe de produit
- Lorsqu'une armoire contient plusieurs zones, isoler les produits par classe de danger.
- Utiliser des bacs de rétention et/ou des tablettes distinctes.
- Les tablettes d'étagères (murales ou non) doivent avoir des angles ou baguettes d'arrêts afin de prévenir les chutes de produits suivant une secousse sismique.
- Les tablettes peuvent être recouvertes de papier absorbant.
- Utiliser le système de ségrégation des produits chimiques pour déterminer les zones d'entreposage et leurs contenus.
- Limiter la hauteur de l'entreposage à celle des yeux et ranger les contenants volumineux et lourds au niveau de la taille ou dans le bas des armoires.
- Entreposer les liquides inflammables et combustibles dans des armoires de sécurité.
- Réfrigérer, si spécifié, les produits inflammables (liquides) dans des réfrigérateurs anti-déflagration. Il est interdit de stocker des liquides inflammables dans un réfrigérateur qui n'est pas conçu à cette fin.
- Dater les matières dangereuses à leur réception.

3.4 Élimination

L'élimination des matières dangereuses doit se faire selon les règles et en respect des lois et des règlements :

- Aucune matière ne doit être rejetée à l'égout ou dans la poubelle au-delà de la valeur seuil/limite de sa classe de danger pour la santé et l'environnement.
- Aucune dilution n'est permise pour amener le résidu inférieur à sa valeur seuil/limite.
- Il y a deux **valeurs seuil/limites de concentration**, soit 0.1% ou 1% selon la classe de danger pour la santé humaine ou l'environnement.
- La règle générale veut que les substances cancérigènes, mutagènes, sensibilisants respiratoires et cutanées, toxiques pour la reproduction aient un seuil/limite de 0.1% et que toutes les autres classes de danger (pour la santé humaine et

l'environnement) soient à 1%.

- **L'étiquette d'identification** attachée au récipient doit être remplie dès le premier résidu versé.
- Les **résidus liquides** doivent être placés dans des bidons ou récipients de plastique prévus à cet effet selon leurs natures (huiles- solvants usés halogénés- solvants usés non halogénés- solutions aqueuses acides - solutions aqueuses basiques – autres solutions aqueuses).
- Les **résidus solides** doivent être placés dans des bacs de plastique prévus à cet effet et clairement identifiés.
- Les **liquides corrosifs** (sans autres classes de dangers) sont interdits de rejets à l'égout si ceux-ci produisent un pH inférieur à 6 ou supérieur à 10.5 (aucune dilution à la source n'est permise).
- Les **résidus de verre brisé** ou pipettes sont jetés à peu près propres dans des contenants de carton prévus et identifiés à cet effet.
- Les **bouteilles vides souillées** de résidus, sont, soit rincées et la ou les rinçures successives sont récupérées dans un bidon identifié «rinçures»; ensuite, la bouteille vide et propre peut être disposée dans la boîte prévue pour le verre.
- Les **aiguilles et autres objets piquants et tranchants** doivent être placés dans un contenant de plastique prévu à cet effet (généralement jaune et pourvu du pictogramme infectieux).
- Les **poubelles de sécurité** (rouge ou jaune, en métal et s'ouvrant à l'aide du pied) sont prévues pour les ateliers de procédés pour les guenilles et absorbants imbibés d'huiles, de substances inflammables ou combustibles ainsi que pour des produits comme les hydrures de métal (hydro réactifs et pyrophoriques).
- Les **bouteilles aérosols vides** sont récupérées comme des résidus dangereux.
- Les gros formats de **piles**, les **rechargeables**, les **batteries**, celles acide-plomb sont recyclées (les petits formats vont dans les boîtes de récupération).
- Les **lampes** DHI, fluocompactes, fluorescentes, UV, vapeur de sodium sous haute pression (SHP), doivent être récupérées; *les ampoules qui ne contiennent PAS de mercure, telles que les incandescentes, les halogènes et les diodes électroluminescentes (DEL), ne sont PAS récupérées. Les DEL vont à la récupération des résidus électroniques.*
- Les **huiles, leurs contenants d'origines vides**, filtres à l'huile et graisses sont

récupérés.

- Les **équipements et appareils de laboratoire** à disposer pour lesquels il y a des produits dangereux ou métaux de valeurs (mercure, plomb, métaux lourds, huile, condensateur aux BPC (biphényles polychlorés), source radioactive, laser, etc.,) doivent être signalés de ces constituants au responsable de l'inventaire du service de l'équipement.

4. Gestion des déchets biologiques cytotoxiques et pharmaceutiques

L'élimination des déchets biologiques, cytotoxiques et pharmaceutiques est soumise à des règles et la collecte de manière hebdomadaire ou à la demande durant les périodes où le niveau d'activité est réduit. Ces déchets sont généralement pris en charge par une entreprise spécialisée. Aucun recyclage n'est possible et ils sont soit incinérés ou désinfectés par autoclave et enfouis.

- Les **déchets anatomiques d'animaux** sont éliminés congelés dans des contenants spécifiques (boîtes ou barils de fibres avec deux sacs de plastique), bien identifiés et portant la mention *Incinerate*.
- Les **liquides de préservation pour animaux**, vertébrés et invertébrés, doivent être séparés des spécimens en les récupérant dans un contenant identifié et portant la description du préservatif du fournisseur, ces fluides seront traités comme des résidus chimiques.
- Les **déchets anatomiques humains** seront incinérés.
- Les **déchets non anatomiques** (objet piquant, tranchant, souillé; tissus biologiques, cultures cellulaires ou matériel ayant été en contact avec ses derniers; vaccin de souche vivante; sang ou matériel imbibé) sont éliminés dans des contenants spéciaux, selon le cas (bac de plastique, boîte de carton); ils seront décontaminés à l'autoclave et enfouis ou incinérés.
- Les déchets liquides pouvant être décontaminés chimiquement ou thermiquement et qui n'ont plus de catégories de danger, peuvent être disposés dans l'environnement.
- Les **déchets provenant du secteur enseignement de la microbiologie** (gélose, milieu de culture) doivent être stérilisés à l'autoclave et sont disposés au site d'enfouissement local.
- Les **plantes transgéniques** sont récupérées par la GMD et doivent être stérilisées avant d'être éliminées.

- Les déchets **pharmaceutiques** comprennent les résidus de médicaments (non toxiques, toxiques et **cytotoxiques**), des produits servant à la préparation ou à l'administration des médicaments, ainsi que de certains produits dangereux. Les contenants qui renferment ou ont été mis en contact avec un produit pharmaceutique entre dans cette catégorie. Ces produits doivent être identifiés par une étiquette visible, comme celle-ci sur le contenant.
- Les **drogues contrôlées** périmées ou rebutées (ex. narcotiques) sont aussi des produits pharmaceutiques qui doivent être tenues dans un registre avec leurs volumes résiduels et maintenues sous clés jusqu'à leurs prises en charge. Ils seront incinérés à haute température. L'ensemble de ces produits, à l'exception des déchets cytotoxiques, doit être identifié par la mention « Déchets Pharmaceutiques » qui est apposée sur le contenant lors de la prise en charge par le personnel de décharges. Si les volumes devenaient importants, sur le lieu de production, un contenant spécialement identifié de ce symbole sera fourni.
- Les **déchets cytotoxiques** sont les médicaments périmés ou à rebuter ainsi que leurs contenants qui ont le rôle d'inhiber ou d'empêcher le bon fonctionnement des cellules. Ils sont utilisés surtout pour traiter le cancer, souvent dans le cadre d'une chimiothérapie. Ces médicaments traitent parfois des maladies spécifiques. Ces médicaments sont utilisés sur des animaux ou des milieux de culture. Ils seront incinérés à haute température et doivent porter cette étiquette sur le contenant de réception.

➤ **Procédure en cas de déversement**

Les procédures de base pour faire face à un déversement de matériel biologique infectieux doivent être affichées dans le laboratoire :

- Si requis, aviser les personnes autour qu'il y a un déversement et s'il y a lieu, les inviter à s'éloigner ou à vous donner du support.
- Porter des gants et les vêtements protecteurs nécessaires.
- Apporter la trousse d'intervention en cas de déversement sur les lieux: papier absorbant, désinfectant.
- Recouvrir soigneusement la substance déversée avec le papier absorbant pour la contenir.
- Verser délicatement par zones concentriques un désinfectant approprié sur les serviettes et la zone environnante en commençant de la périphérie vers le centre.

- Laisser agir le décontaminant pendant une période suffisante (environ 30 minutes).
- Utiliser un désinfectant non corrosif à l'intérieur d'une centrifugeuse.
- Utiliser des pinces ou une pelle pour ramasser les débris de verre ou d'autres objets pointus ou tranchants et les placer dans un récipient étanche et résistant à la perforation en vue de leur élimination.
- Les pinces et les pelles doivent être décontaminées à l'autoclave ou être immergées dans un désinfectant efficace.
- Jeter les matériaux et produits contaminés dans une poubelle étanche et résistante à la perforation.
- Nettoyer et désinfecter toutes les surfaces exposées au déversement [44], [45].
- Dans le cas d'un déversement mineur à l'intérieur d'une ESB, il est important de la laisser fonctionner pendant la procédure de décontamination et au moins 10 minutes avant de reprendre le travail.
- Le Déversement à l'intérieur d'une centrifugeuse dans la formation de biosécurité. Il faut attendre 30 min avant d'ouvrir la centrifugeuse et procéder au nettoyage.

5. Matières radioactives et risques

Une matière est dite radioactive lorsqu'elle émet des rayonnements ionisants, c'est-à-dire une énergie suffisante pour ioniser un atome ou une molécule. Ce rayonnement se présente sous forme de rayons gamma (γ), de rayons X, de particules alpha (α), de particules bêta (β) ou de neutrons. On appelle radionucléides les isotopes radioactifs. La formation sur la radioprotection est obligatoire pour toute personne qui a à manipuler, même à l'occasion, du matériel radioactif. Il existe deux formations à cet effet: Radioprotection, sources scellées et jauges nucléaires, ainsi que Radioprotection et sources nucléaires ouvertes.

5.1 Radioprotection

Les risques reliés à l'utilisation de matières radioactives dans un contexte de laboratoire dépendent de plusieurs facteurs, dont le type de rayonnement, l'énergie du rayonnement et la dose (ponctuelle et cumulée). Les utilisateurs de matières radioactives doivent appliquer les pratiques sécuritaires générales et spécifiques décrites et tenir compte de sa réglementation (acquisition, transport, élimination).

5.2 Mesures préventives générales



















- Porter les équipements de protection individuels nécessaires .
- Appliquer le principe ALARA (*As Low As Reasonably Achievable*) : diminuer le temps d'exposition, se distancer de la source de radiation et utiliser un écran de protection (blindage).
- Éviter la formation d'aérosol : manipuler sous hotte ou ESB approuvés.
- Limiter la contamination de source ouverte sur les surfaces afin d'éviter l'exposition.
- Porter un dosimètre en tout temps lorsque la condition du permis l'exige.
- Garder le matériel radioactif sous clé.
- Ne jamais consommer de nourriture ou s'abreuver sur les lieux.

6. Risques physiques

6.1 Machines et équipements

Toujours lire le manuel d'instruction avant d'utiliser une nouvelle machine ou un nouvel équipement et suivre les directives du fabricant. S'assurer d'avoir la formation requise pour opérer une machine ou un équipement. Maintenir un programme d'entretien. Porter les équipements de protection individuels recommandés.

Voici quelques pictogrammes de sécurité à retenir :

	Surface chaude: risqué de brûlures		Objet tranchant :risque decoupure ou la cération		Pièce en mouvement: risque d'écrasement
	Basse température : risqué de brûlures par le froid		Pièce en mouvement: risque d'écrasement mains		Angle rentrant: risque d'entraînement et d'écrasement
	Démarrage automatique: risques multiples		Électricité: risque d'électrisation, d'électrocution		Bouteille pressurisée: risqué'explosion en présence de flamme
	Rayonnement laser: risqué pour les yeux		Champ électromagnétique		Rayonnement optique (UV, visible, IR)
	Champ magnétique puissant		Bruit élevé soudain Risque acuité auditive		Attacher les cheveux. Risque avec pièces mobiles et flamme.
	Interdit: manches longues, foulard, cravate, etc.		Risque de projection		Risque de la creations et de brûlures

6.2 Gaz sous pression

Il y a un risque d'explosion lorsqu'une bouteille de gaz comprimé est chauffée ou endommagée. Un cylindre de gaz peut devenir un projectile hautement dangereux en cas de rupture accidentelle de la valve. Une libération rapide de gaz peut perforer la peau, créer une embolie, rendre l'atmosphère déficiente en oxygène, intoxiquer et peut nécessiter une mesure d'évacuation.

➤ Mesures préventives

- Porter les équipements de protections individuels recommandés.
- Manipuler les bouteilles avec précaution et les transporter avec un diable muni d'une courroie de fixation. Toujours manipuler avec le capuchon vissé de la bonbonne.
- Attacher solidement les bonbonnes au deux tiers de la hauteur.
- Utiliser le régulateur (détendeur) approprié pour chaque gaz, en se référant au catalogue du fournisseur.
- Ne jamais lubrifier, mettre du ruban Téflon, modifier et forcer un régulateur ou la valve de la bouteille.
- Vérifier la présence de fuite de gaz à l'aide d'eau savonneuse après un raccordement : la présence de bulles indique une fuite.
- Toujours fermer la valve principale de la bouteille après l'utilisation et vider la pression résiduelle du circuit (incluant le manomètre).
- Identifier les bouteilles en fonctions ou vides et détachant le talon de l'identificateur d'état.

6.3 Procédure de test de fuite sur un régulateur de gaz

- Mettre le régulateur correspondant à la bouteille de gaz (pleine) avec au moins 1500 psi.
- Tourner la vis de réglage du régulateur dans le sens antihoraire.
- Ouvrir lentement la valve de la bouteille jusqu'à ce qu'elle soit complètement ouverte.
- Ajuster le manomètre de basse pression à environ 50 psi, puis fermer la pression en aval (ex. : sur l'équipement ou sur la valve de sortie du régulateur), noter la pression puis vérifier la pression après 30 minutes et comparer la donnée.
- Si le réglage du manomètre de basse pression (le cadran de sortie) a augmenté (ou diminué dans le cas où c'est la valve sur le régulateur qui est fermée), le régulateur n'est pas conforme et doit être envoyé au fournisseur pour une évaluation ou réparation.

6.4 Cryogénie – Azote liquide

Pour manipuler des liquides cryogéniques, il faut suivre la formation liquide cryogénique – Azote liquide, sur le remplissage, le transvasage, le transport et l'entreposage de l'azote liquide.

➤ Mesures préventives

✓ Risque de brûlures par le froid

- Éviter tout contact avec le liquide.
- Porter les équipements de protections individuels recommandés: lunette de sécurité, sarrau, gants thermaux et si nécessaire, couvre-chaussures. Pour le remplissage de réservoir : ajouter visière, et tablier thermal.
- Premiers soins: doucher à l'eau tiède les parties exposées.

✓ Risque d'asphyxie

- Utiliser dans un endroit bien aéré et éviter de respirer les vapeurs.
- Une grande utilisation peut demander la présence d'un détecteur d'O₂.
- Manipuler les gros réservoirs à deux personnes.
- Premiers soins: diriger la personne vers un endroit bien aéré.

✓ Risque d'explosion due à une surpression

- De liquide à gaz, les liquides cryogéniques ont un fort taux d'expansion.
- Utiliser un réservoir cryogénique en bon état.
- Ne jamais utiliser de récipients fermés.
- Limiter la formation de glace

✓ Risque d'explosion due à une condensation d'oxygène

Lors de l'utilisation de trappe branchée sur un système sous vide et refroidi à l'azote liquide, l'introduction d'air environnant par un défaut d'étanchéité peut amener la condensation de l'oxygène (liquide caractérisé par une couleur bleutée). L'oxygène liquide représente un risque d'explosion.

6.5 Danger électrique

La tension de 120 V que l'on retrouve dans tous les laboratoires est suffisante pour créer des blessures allant du simple choc électrique (électrisation) à l'électrocution (mort). L'homme, étant

conducteur d'électricité, peut être exposé à ce danger lorsqu'un appareil électrique présente une exposition de ses parties sous tension (perte de son isolation) ou une fuite de courant.

➤ **Mesures préventives**

- Vérifier l'état des fils électriques et des fiches des appareils.
- Éviter les raccordements multiples sur une seule prise.
- Ne pas utiliser en cas de dommage et faire réparer immédiatement.
- Disposer les rallonges électriques de manière à ne pas encombrer les espaces de travail et prévenir les risques de trébuchement.
- L'équipement électrique doit être mis à la terre (présence de la 3e broche de la fiche).
- Prenez garde à l'électricité statique, elle peut générer des étincelles.

6.6 Rayonnement non ionisant (laser, UV et micro-ondes)

Le rayonnement est l'émission d'une énergie à partir de sa source. Dans le cas d'un rayonnement non ionisant, l'énergie n'est pas suffisante pour ioniser les atomes ou les molécules.

6.6.1 Laser

Les lasers sont caractérisés par un rayon étroit et ciblé, ce qui permet d'envoyer une grande quantité d'énergie sur une petite surface. Le principal risque associé aux lasers est une blessure oculaire. Il existe sept catégories de lasers : classe 1, 1M, 2, 2M, 3R, 3B et 4.

➤ **Mesures préventives**

- Informer le service de l'équipement préalablement du souhait d'acquérir un appareil laser des classes 3R, 3B ou 4, car des installations particulières et des aménagements physiques coûteux peuvent être requis.
- Avoir reçu une formation adéquate pour l'utilisation du laser, selon sa catégorie et la longueur d'onde émise. Les lasers de classes 3B et 4 sont particulièrement dangereux.
- Porter des lunettes de protection adéquate, un sarrau en coton (pour lasers de classe 3R, 3B et 4) et retirer les objets personnels réfléchissants, tels que montre, bijou, stylo, boucle de ceinture, fermeture éclair, etc. L'utilisation d'un laser émettant dans les UV nécessite le port de la visière, du sarrau et de gants jetables.

- Les lunettes de protection pour les lasers sont spécifiques et requièrent une attention et une utilisation particulières; bien lire les consignes du fabricant sur la vérification de leurs conformités, leur entretien et leur durée de vie.
- Ne jamais regarder directement ou indirectement (par réflexion sur des objets tels des miroirs, acier inoxydable) le faisceau d'un laser.
- Passer un examen d'optométrie tous les cinq ans.
- Restreindre l'accès au laboratoire, spécifiquement lorsque le laser est en fonction. Les lasers de classes 3B et 4 nécessitent une zone de travail contrôlée et une signalisation spécifique. Un panneau lumineux servant à indiquer que le laser est en fonction, ainsi qu'un bouton d'arrêt d'urgence doit se trouver à l'entrée du laboratoire.

6.6.2 Ultraviolet (UV)

Les risques associés à l'utilisation de lampes UV ou toute autre source de rayons UV sont la blessure oculaire et le dommage cutané. À titre comparatif, la lumière du soleil contient environ 5 % de rayons UV.

➤ Mesures préventives

- S'assurer d'avoir la formation adéquate pour l'utilisation d'une source de rayons UV.
- Porter les lunettes de protection avec filtre UV, visière, sarrau en coton et gants jetables. Aucune partie du corps ne doit être exposée.
- Éviter de regarder directement ou indirectement (par réflexion sur des objets tels des miroirs ou de l'acier inoxydable) la source de rayonnement UV.
- Éteindre la source de rayon UV lorsqu'elle n'est pas utile à votre travail.
- Utiliser dans un endroit bien aéré, car il y a formation d'ozone par ionisation de l'oxygène à proximité des lampes UV. C'est le principe d'action des lampes UV (254 nm) dites germicides retrouvées dans les ESB.

6.6.3 Micro-ondes

Les micro-ondes servent à chauffer la matière par agitation des molécules d'eau ou toute molécule polaire. Le risque principal est associé à l'exposition à la chaleur. Les réactions chimiques conduites sous conditions micro-ondes doivent être effectuées uniquement dans des réacteurs spécifiques à cette fin.

Les fours à micro-ondes pour la recherche ne doivent jamais servir à d'autres fins et ne doivent jamais être utilisés pour réchauffer de la nourriture pour nos besoins alimentaires.

6.7 Températures extrêmes

6.7.1 Chaleur

Il y a un risque de brûlures lors de la manipulation d'objet chaud ou d'une flamme.

- Portez des gants résistants à la chaleur et tout autre équipement de protection individuels jugé nécessaire.
- Il y a un risque d'hyperthermie lors de travail en ambiance chaude. Prendre des pauses régulièrement et boire beaucoup d'eau.

6.7.2 Froid

Il y a un risque de brûlure par le froid lors de manipulation d'objet à basse température et de liquide cryogénique.

- Portez des gants thermaux, tout vêtement et équipement de protection individuels nécessaire. Il y a un risque d'hypothermie lors d'exposition prolongée au froid.

6.8 Bruit

Un niveau de bruit supérieur à 85 dBa requiert une protection auditive. Dans un tel environnement, on doit crier pour se parler à une distance d'un mètre. La dose de bruit sécuritaire pour 8 heures de travail serait inférieure à 75 dBa. Bien que dans la plupart des laboratoires ce niveau soit inférieur à cette limite, il ne faut pas oublier qu'un environnement de travail bruyant peut affecter la concentration, la communication et la qualité du milieu de travail. Il ne faut donc pas banaliser l'impact qu'a le bruit sur la santé et la sécurité. Lorsqu'il en est possible, toujours prendre les mesures nécessaires pour éliminer ou réduire la source de bruit (entretien des équipements, substitution d'équipement, éloigner la source de bruit des aires de travail, etc.).

6.9 Pression ou vide

Toute manipulation impliquant un équipement ou de la verrerie sous pression (ou vide) présente un risque de projection et d'éclaboussure. De plus, les changements brusques de pression peuvent entraîner des variations rapides de température.

➤ **Mesures préventives**

- Porter les équipements de protection individuels nécessaires.
- S'assurer que l'équipement ou la verrerie peut être utilisé sous haute pression ou vide et qu'ils sont en bon état.
- En l'absence de pellicule plastique sur le verre ou grillage autour d'un Dewar, mettre du ruban de tissu ou du ruban adhésif (de type ruban électrique) tout autour du récipient.
- Utiliser des appareils ou montages équipés de dispositif pour limiter ou libérer la pression
- Utiliser un écran protecteur.
- Éviter les chocs et laisser la pression s'équilibrer doucement (ex. chasser doucement le vide d'un dessiccateur).

Questions de révisions

1. Donner la définition des termes suivants: asepsie, bactéricide, désinfection, agent antiseptique, bactériostatique, stérilisation, fongicide, agent chimiothérapeutique, viricide et antibiotique?
2. Expliquer la Tyndallisation et la Pasteurisation?
3. Citer les différents types d'agents antimicrobiens physiques?
4. Les agents antimicrobiens chimiques se distinguent en deux groupes, lesquels? Quelles sont leurs applications?
5. Citer les différents mécanismes d'action d'antibiotiques?
6. Les pénicillines et les céphalosporines font partie de quelle famille d'antibiotiques?
7. Quel est le mode d'action des β -lactamines?
8. Quel est le mécanisme d'action des antifongiques?
9. L'action des antiviraux repose sur deux grands principes pharmacologiques, lesquels?
10. Quel est le mode d'action des antigrippaux?
11. Expliquer le phénomène de résistance aux agents antimicrobiens?
12. Quelles sont les causes de l'antibiorésistance ?
13. Quelles sont les causes et les types de l'antibiorésistance ?
14. Citer les moyens de prévention et de l'antibiorésistance ?
15. La propagation de la résistance aux antibiotique est dans trois secteurs principaux, lesquels ?
16. Quelles sont les méthodes proposées pour la lutte contre l'antibiorésistance ?
17. Donner les définitions suivantes : antibiogramme, CMI ?
18. Quelle est la différence entre la CMI et la CMP ?
19. Décrire la méthode standard utilisée pour réaliser un antibiogramme ?
20. Le travail au laboratoire peut entraîner plusieurs risques de plusieurs types, lesquels ?
21. Citer le matériel biologique qui est à l'origine des risques d'infections et de contaminations au laboratoire de Microbiologie?
22. Quels sont les habits et l'équipement de protections au laboratoire?
23. Donner la procédure en cas de déversement de matériel biologique infectieux ?

Références bibliographiques

- Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. 2016. Liste des antibiotiques critiques Actualisation (<https://ansm.sante.fr>).
- Bernard A, Deiana J, Meyer A. 2014. Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. 2^{ème} édition. Edition DOIN. Paris.
- Bernard A, Deiana J, Meyer A. 2014. Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. 2^{ème} édition. Edition DOIN. Paris.
- Bonnet R, Bru J.P, Caron F, Cattoir V, Chardon H. 2015. EUCAST. European society of clinical microbiology and infectious diseases. Comité de l'antibiogramme. Société Française de Microbiologie.
- Cantón R, Horcajada JP, Oliver A, Garbajosa PR, Vila J. 2013. Inappropriate use of antibiotics in hospitals : the complex relationship between antibiotic use and antimicrobial resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 31 Suppl 4 :3–11.
- Collégiale des enseignants de bactériologie-virologie-hygiène. 2014. Structure et physiologie de la bactérie: Anatomie-Structure. Edition UMVF Université Médicale Virtuelle Francophone.
- Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie Recommandations 2019 – V1.0 janvier 2019. In : CASFM / EUCAST : Société Française de Microbiologie Ed ; 2019: p.5-27, 30, 138-143.
- Cours de Microbiologie Clinique : l'antibiogramme. 2017. <https://fac.umc.edu.dz/snv/faculte/microbio/2017/Cours%20microbiologie%20clinique%20chapitre%201%27antibiogramme.pdf>.
- Denis Comte, Stéphanie Petitpierre, Pierre-Alexandre Bart, François Spertini. 2012. Allergie aux β -lactamines. *Revue Médicale Suisse*, DOI: 10.53738/REVMED.2012.8.337.0836

- Denis F, *et al.*, Bactériologie médicale techniques usuelles, 3e édition, Elsevier, figure 38.1, page 531.
- Duckett S. 1999. Ernest Duchesne and the concept of fungal antibiotic therapy. *Lancet* 354 :2068–2071.
- Emile Cardot Martin, Oana Dumitrescu, Philippe Lesprit.2019. La résistance aux antibiotiques. Planet - Vie : <https://planet-vie.ens.fr/>.
- Guide de lecture du ETEST® pour les bactéries aérobies. © Copyright AB BIODISK.
- Guiraud J.P. 2012. Microbiologie alimentaire. ChapitreV: destruction et élimination des microorganismes: agents antimicrobiens. Edition Dunod, Paris.
- Grosjean J, Calve D, Archambaud M, Pasquier C. 2011. Bactériologie et Virologie pratiques. 2^{ème} édition. Edition De Boeck Université. Belgique.
- Grosjean J, Calve D, Archambaud M, Pasquier C. 2011. Bactériologie et Virologie pratiques. 2^{ème} édition. Edition De Boeck Université. Belgique.
- Haute Autorité de Santé Recommandations de bonne pratique (https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1101438/fr/tableau-des-recommandations-ou-travaux-relatifs-2495004_27.php).
- Héloïse Rambert. 2022. Les phages, ces virus qui nous soignent (https://www.lepoint.fr/villes/les-phages-ces-virus-qui-nous-soignent-24-10-2022-2495004_27.php).
- J. Caillon. 2017. Lecture interprétatives de l'antibiogramme. DESC, EA 3826, Thérapeutiques Cliniques et Expérimentales des infections, CHU Nante, France.
- Jouvin-Marche E, Carrara G, Pulcini C, Andremont A, Danan C, Couderc-Obert C, Lienhardt C, Kieny MP, Yazdanpanah Y. 2020. French research strategy to tackle antimicrobial resistance. *The Lancet*. 18;395(10232):1239-1241.
- Kayser F.H, Bottger E.C, Deplazes P, Haller O, Roers A. 2014. Manuel de poche de microbiologie médicale. 2^{ème} édition. Edition Médecine Sciences, Lavoisier, France.

- L'antibiorésistance ou comment les bactéries deviennent résistantes. 2023. Le journal de recherche, Institut Pasteur.
- La résistance aux antibiotiques - Projets financés sur la période 2011-2021. Les cahiers de l'ANR(Agence Nationale de recherche), N° 14, Novembre 2022, France.
- Laboratory biosafety manual, 1993. Chapitre 12 : Pratiques de sécurité standard dans le laboratoire de microbiologie. 2^{ème} édition. Genève : OMS ; 1993 : ISBN 92 4 154450.
- Larpent J-P. and Sanglier J.J. (1989). Biotechnologie des antibiotiques. Masson, Paris. 481
- Luciano Paolozzi, Jean Claude Liebart, Matthieu Arlat. 2023. Introduction à la Microbiologie : Microbiologie fondamentale et appliquée. 2^{ème} édition. Dunod, Paris.
- Madigan M.T, Martinko J.M. 2007. Brock, Biologie des microorganismes. 11^{ème} éditions. Edition Pearson Education France.
- Maria T. Vazquez-Pertejo. 2022. AntibioGramme.MD, FACP, Wellington Regional Medical Center (<https://www.msdmanuals.com/fr/professional/maladies-infectieuses/diagnostic-biologique-des-maladies-infectieuses/antibiogramme>).
- MC. El bouamri , L. Aarslane , Y. Kamouni , H. Yahyaoui , N. Bennouar, M. Berraha, S. Zouhair.2014. Profil actuel de résistance aux antibiotiques des souches d'*Escherichia coli* uropathogènes et conséquences thérapeutiquesCurrent antibiotic resistance profile of uropathogenic *Escherichia coli* strains and therapeutic consequences. Progrès en Urologie : 1058-1062.
- Organisation Mondiale de Santé (OMS). 2024. Mise à jour de la liste des bactéries résistantes aux médicaments.
- Paolozzi L, Liberat J.C. 2015. Microbiologie, Biologie des procaryotes et de leurs virus. Edition Dunod, Paris.

- Pascale Lesseur. 2014. Antibiotiques : modes d'action, mécanismes de la résistance. ARCHIVE DEVSANTE. ORG.
- Perry J.J, Staley J.T, Lory S. 2004. Microbiologie. Cours et questions de révisions. Edition Dunod, Paris.
- Prieur D, Geslin C, Payan C. 2015. Mini Manuel de microbiologie. 2^{ème} édition. Edition Dunod, Paris.
- Romano -Bertrand S, Pozzetto B, Decousser JW. 2023. L'antibiogramme : objectifs, méthodes et interprétation. Hygiènes, 31(3); 253-258.
- Romano-Bertrand S, Pozzetto B, Decousser JW. L'antibiogramme : objectifs, méthodes et interprétation. Hygiènes 2023;31(3);253-258.
- Sagar Aryal. 2021. McFarland Standards- Principle, Preparation, Uses, Limitations, Basic Microbiology.
- Santé Publique France. 2018. Consommation d'antibiotiques et résistance aux antibiotiques en France : une infection évitée, c'est un antibiotique préservé (<https://www.santepubliquefrance.fr>).
- Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) <http://www.infectiologie.com/fr/recommandations.html>.
- Société Française de Microbiologie. 2019. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie Recommandations V.2.0 Mai.
- Tortora G.J, Funke B.R, Case C. L. 2012. Introduction à la microbiologie. 2^{ème} Edition du Renouveau Pédagogique Inc. Montréal.
- Touat M, Opatowski M, Brun-Buisson C, Cosker K, Guillemot D, Salomon J, Tuppin P, de Lagasnerie G, Watier L. 2019. A Payer Perspective of the Hospital Inpatient Additional Care Costs of Antimicrobial Resistance in France : A Matched Case-Control Study. Appl Health Econ Health Policy 17 :381–389.

- Virgine Marquet et Pierre Viora. 2019. Variation génétique bactérienne et résistance aux antibiotiques, Chapitre 3, p :27-39, SVT au Lycée (<https://svtlyceedevenue.com/2013/05/11/bienvenue/>).
- Willey J.M, Sherwood L.M, Woolverton C.J. 2018. Microbiologie de Prescott. 5^{ème} édition. Edition Groupe De Boeck Supérieur s.a. Belgique.
- Yoneyama H, Nakae T. 1993. Mechanism of efficient elimination of protein D2 in outer membrane of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 37 :2385–2390.