

LES AGENTS ANTI-MICROBIENS

S . KADRI

1 .DEFINITIONS :

Le mot **stérilisation** est une opération qui consiste à éliminer tous les microorganismes présents dans une préparation.

La stérilisation est obtenue par action de la chaleur, des radiations et de certains produits chimiques.

La désinfection

C' est l'action de certains produits chimiques qui permet d'éliminer ou de tuer les microorganismes et/ou d'inactiver les virus indésirables portés par les milieux inertes tels que les eaux, les sols, l'air et autres objets..... Le résultat de cette opération est limité aux micro-organismes présents au moment de l'opération.

- ❖ Les désinfectants sont utilisés sur des supports inertes tels que les sols, tables, paillasses. Exemple : le cas de L'eau de Javel qui est un bon désinfectant.
- ❖ Les antiseptiques, contrairement aux désinfectants, sont employés sur des tissus vivants. Ce sont des agents antibactériens chimiques à toxicité brutale, peu sélectifs ,à usage exclusivement externe. Exemple la solution iodée BETADINE

Comme agents antimicrobiens, on distingue :

- **Germicides** : éliminent tous les germes excepté les endospores.
- **Bactéricides** : agissent sur toutes les bactéries.
- **Fongicides** : agissent sur les champignons.
- **Algicides** : agissent sur les algues.
- **Virucides** : éliminent les virus.

2. CRITERES D'EFFICACITE D'UN AGENT ANTIMICROBIEN:

Le choix est fonction de :

- **L'efficacité** sur l'ensemble des micro-organismes.
- **La rémanence** qui est la persistance de l'activité bactériostatique après l'application. On privilégie un antiseptique rémanent pour le lavage des mains et la préparation du champ opératoire.
- **La tolérance** : un antiseptique ne doit pas entraîner de toxicité, ou d'allergies trop importante.
- **La vitesse d'action** : pour réaliser une injection, on préférera un antiseptique à

action rapide (alcoolique généralement).

3. CLASSIFICATION DES AGENTS ANTIMICROBIENS

3.1. Agents physiques

- **La température** : son action peut avoir deux conséquences
 - La stabilisation ou conservation (réfrigération, congélation et pasteurisation)
 - La destruction (stérilisation)

❖ la chaleur :

Les procédés pratiques de traitements thermiques utilisent la chaleur humide ou sèche.

La stérilisation par la chaleur humide (autoclavage) est utilisée pour stériliser les milieux de culture, les produits biologiques. L'autoclave est un appareil à pression de vapeur d'eau.

L'action conjuguée de la vapeur d'eau et de la température provoque la dénaturation puis la mort des micro-organismes (bactéries, virus,...) présents sur ou dans le matériel.. La stérilisation commence lorsque la température et la pression choisies sont atteintes et s'achève lorsque celles-ci diminuent.

La stérilisation par la chaleur sèche (four Pasteur) est destinée pour la stérilisation du matériel ou objets dont l'hydratation n'est pas souhaitée ciseaux, scalpel porte anse de platine.....(verrerie ; matériel chirurgical). Autre procédé, c'est la pasteurisation qui reste un chauffage contrôlé à des T° inférieures à 100°C, et consiste à détruire toute la flore pathogène, la quasi-totalité de la flore banale, tout en préservant les éléments biochimiques (vitamines). C'est un bref chauffage entre 60°C et 85°C de quelques dizaines de secondes à 30mn. Il est appliqué à certains produits naturels dont on veut préserver les caractères organoleptiques tels que lait, jus de fruits.

❖ Le froid :

- **La réfrigération** : les basses températures de 0 à 8°C n'éliminent pas les microorganismes mais ralentissent leur métabolisme et leur multiplication.

- *La congélation* : bactéries et virus sont conservés au laboratoire (pour la recherche, production de vaccins et autres médicaments) à des températures de moins 20°C à moins 80°C
- , ou dans la carboglace à moins 70°C ou bien dans l'azote liquide à moins 195°C.

➤ **La filtration :**

On utilise des filtres poreux de $\varnothing \leq 0,5 \mu\text{m}$ (généralement les membranes filtrantes dont la taille des pores = 0,2 μm). Ce sont des filtres d'acétate ou nitrates de cellulose dans le cas des eaux minérales, industrie alimentaire (sucres thermolabiles). C'est le procédé de choix pour la rétention absolue des microorganismes.

- **Les radiations** : le rayonnement solaire ou les radiations UV sont les agents naturels de stérilisation de surface car ils agissent jusqu'à une profondeur de 10 cm. Cependant les rayons X et gamma sont plus efficaces car ils sont doués d'un pouvoir de pénétration plus intense (au-delà de 30 cm de profondeur).
- **Pression osmotique et teneur en eau** : la lyophilisation, la dessiccation, l'addition de sels et de sucre.

3.2. Agents chimiques :

- **Les alcools** : sont les désinfectants et les antiseptiques les plus utilisés. Ils ont une action bactéricide et fongicide mais ne détruisent pas les spores. L'éthanol et l'isopropanol sont les plus utilisés à des concentrations de 70 à 80%.

L'alcool désorganise les structures cellulaires riches en lipides, sont plus + efficaces chez les Gram-. Pas d'action sur les spores et les virus.

- Les agents tensio-actifs :(surfactants) Exemples:

- chlorure de benzalkonium (dans le Cetavlon, ou le Biocidan), chlorure de cétaikonium
- Phénol bonne activité antibactérienne mais effet caustique et nécrosant
- Le crésol (gresyl): désinfectant des sols et des installations sanitaires

➤ *Les halogènes :*

- **Le chlore** étant le plus utilisé dans la désinfection de l'eau (barrages, piscines)
- **L'iode** excellent antiseptique de surface utilisé sous forme de teinture d'iode notamment au niveau des plaies.
- **Les métaux lourds** tels que le mercure d'argent, le zinc, le cuivre, utilisés comme agents germicides.

Spectre d'action des antiseptiques :

+++forte létalité ; ++ moyenne ; + faible ; 0 nulle

	Bactéries G+	Bactéries G-	Champignons	Spores	Virus
Biguanides Chlorhexidine	+++	++	+	0	+/0
Dérivés iodés Gamme bétadinée	+++	+++	++	++	++
Dérivés chlorés Dakin stabilisé	+++	+++	++	++	++
Alcool 70°	++	++	++	0	+/0

Remarque : ces produits ne sont pas des antiseptiques

Les colorants tels l'éosine, le violet de gentiane

L'éther

L'eau oxygénée

Les gels et autres produits hydro-alcooliques pour désinfections des mains

- *Les gaz stérilisants* : utilisés dans la stérilisation des seringues, boîtes de Pétri et autres objets thermosensibles.

La stérilisation par l'oxyde d'éthylène gaz très utile pour stériliser le matériel médicochirurgical thermosensible. . L'oxyde d'éthylène est un gaz toxique, inodore, dont on ne perçoit pas la présence dans l'air.

Il est toxique:

- par inhalation (irritation respiratoire et dépression du système nerveux central)
- par contact (réactions irritatives de la peau et des muqueuses)
- par voie parentérale (phénomènes hémolytiques, et phénomènes allergiques)
- par réaction avec différents corps chimiques: produits toxiques.

La stérilisation par le formaldéhyde gazeux : c'est un agent de stérilisation en surface, ne pénétrant pas en profondeur à l'inverse de l'oxyde d'éthylène.

	temps	selon l'emballage et le moyen utilisé
le matériel	pendant un mois	pour le matériel sous double emballage en papier crêpé
est considéré	2 à 3 mois	pour le matériel stérilisé à la vapeur saturée sous pression en conteneurs
comme	2 mois	pour le matériel stérilisé au poutinel dans des sachets plastique
stérile	1 an	pour le matériel stérilisé à la vapeur saturée sous pression ou aux radiations ionisantes ou à l'oxyde d'éthylène, dans des sachets thermosoudables.

3.3. Agents chimio thérapeutiques :

Substances capables d'inhiber spécifiquement la croissance de micro-organismes ou de les détruire.

Substances chimiques, produites par des micro-organismes ou obtenus par semi synthèse ou synthèse chimique.

C'est le cas des antibiotiques (le terme d'antibiotique = Contre la vie=anti bactérien), substances qui détruisent les agents infectieux sans nuire aux cellules hôtes, donc sont douées d'une toxicité sélective.

Leur mode d'action se fait de différentes manières :

- Comme analogues des vitamines ; agissent en inhibant l'activité enzymatique.
- Comme analogues des aminoacides ; ils sont incorporés dans les molécules de protéines.

Les ATB agissent à faibles doses (mg ou μ /l) sur des cibles spécifiques au monde bactérien, telles que la paroi, la mb cytoplasmique, la réplication de l'ADN, la transcription de l'ADN et enfin la traduction.

3.4. Les différentes familles d'antibiotiques :

3.4.1. Les bêta-lactamines : La famille des β -lactamines se caractérise par la présence d'un cycle β -lactame. Ce noyau β -lactame est associé à différents cycles, ce qui permet de définir différents groupes au sein des β -lactamines.

On distingue ainsi le groupe des pénicillines et le groupe des céphalosporines.

Les Pénicillines G (intra veineuse ou musculaire) et pénicillines par voie orale (pénicilline V) ont une activité sur les bactéries Gram+, et Cocci Gram-.

Les Pénicillines M molécules qui résistent aux β lactamases : oxacilline, a une activité sur les Staphylocoques résistants à la Pénicilline G.

Les Pénicillines A : ce sont des aminopenicillines à spectre large telles que ampicilline, amoxicilline , qui ont une activité élargie sur les bacilles gram- (sauf *P. aeruginosa*).

3.4.2. Les glycopeptides : molécules bactéricides, c'est le cas de la vancomycine et la teicoplanine. Leur structure comprend une partie glucidique et des amino- acides ; ce sont les plus grosses molécules parmi les antibiotiques. Ils ont un spectre d'activité étroit, ont une activité bactéricide sur les bactéries Gram+.

3.4.3. Les aminosides : Leur structure est à base de sucres aminés. Les principales molécules sont : Streptomycine, Gentamicine, Amikacine

Ils ont une activité bactéricide sur les Cocci gram+ (Staphylocoques).

3.5. Conditions d'action des antibiotiques.

- L'existence de la cible spécifique (organites cellulaires).

-la cible doit être atteinte :

l'ATB doit traverser la paroi sans être dégradé de façon à atteindre sa cible avec la concentration de départ.

-la cible doit interagir avec l'ATB.

3.6. Mode d'action des ATB sur les bactéries. (Voir Fig.1).

Les ATB qui inhibent la synthèse de la paroi sont bactéricides et agissent sur les bactéries en phase active de multiplication ; c'est le cas de la pénicilline sur *staph.auréus*.

Les ATB polypeptidiques tels les polymyxines, les gramicidines, agissent sur la mb cytoplasmique en formant un pore traversant une partie de la mb plasmique provoquant la rupture de l'intégrité de la structure de la mb.

Les ATB du type macrolide agissent sur la synthèse des protéines au niveau des ribosomes en empêchant l'interprétation du code génétique ou en le faussant.

Quelques Antibiotiques importants en thérapeutique.			
Antibiotique.	Organisme producteur	activité	Organe cible
pénicilline	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Bactérie Gram ⁺	Synthèse de la paroi
céphalosporine	<i>Céphalosporium acremonium</i>	Large spectre	Synthèse paroi
griséofulvine	<i>Penicillium griséofulvum</i>	dermatophytes	microtubules
bacitracine	<i>Bacillus subtilis</i>	Bactérie Gram ⁺	Synthèse paroi
Polymixine B	<i>Bacillus polymyxa</i>	Bactérie Gram-	Membrane cellulaire
Amphotéricine B	<i>Streptomyces nodosus</i>	champignons	Membrane cellulaire
Erythromycine	<i>Streptomyces erythreus</i>	Bactérie Gram ⁺	Synthèse des protéines
néomycine	<i>Streptomyces fradiae</i>	Large spectre	Synthèse des protéines
streptomycine	<i>Streptomyces griseus</i>	Bactérie Gram-	Synthèse des protéines
tétracycline	<i>Streptomyces rimosus</i>	Large spectre	Synthèse des protéines
vancomycine	<i>Streptomyces orientalis</i>	Bactérie Gram ⁺	Synthèse des protéines
gentamycine	<i>Micromonospora purpurea</i>	Large spectre	Synthèse des protéines

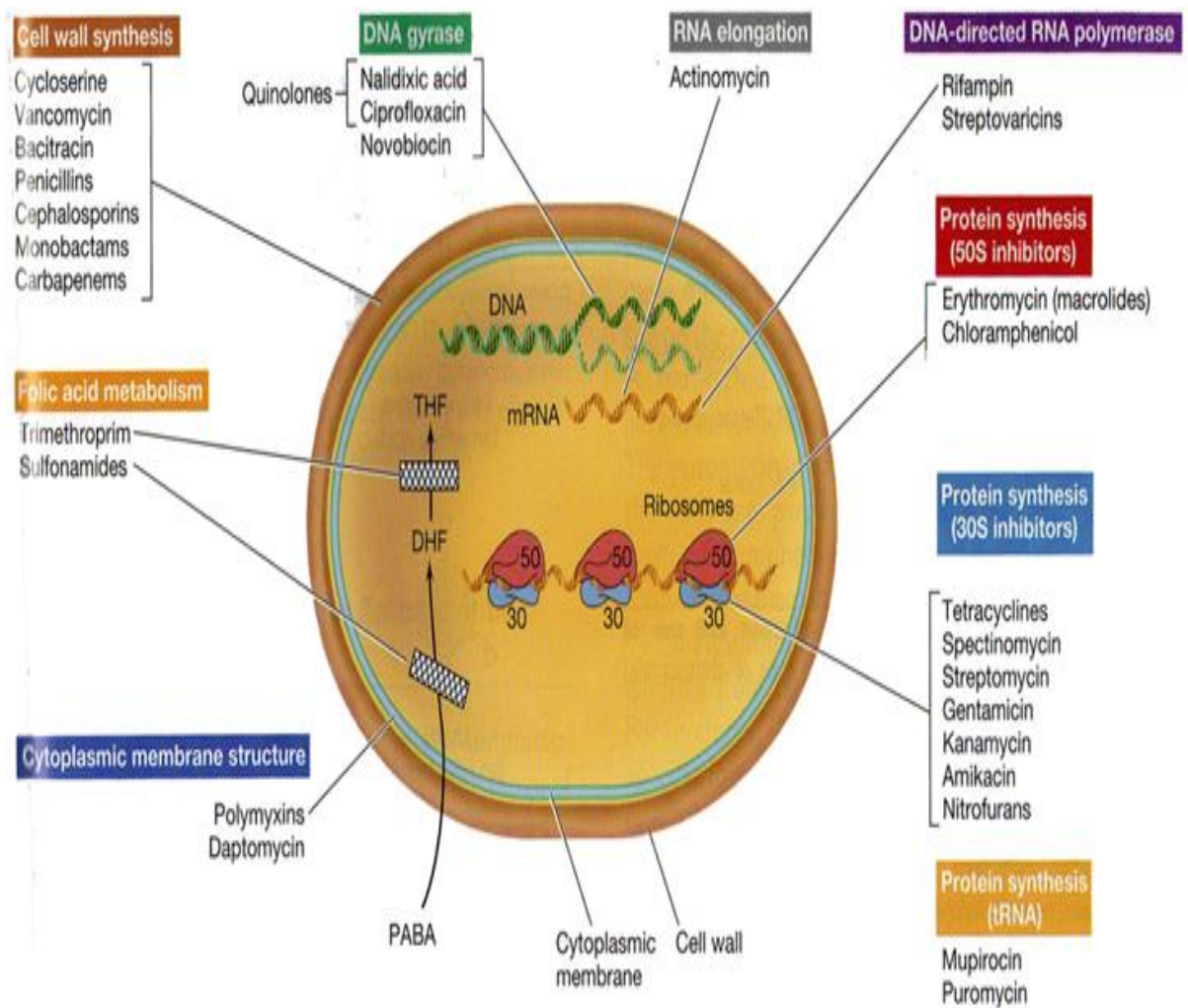


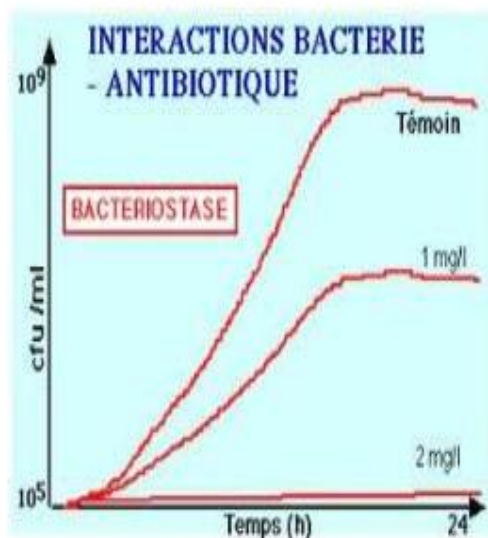
Figure 1. Spécificités cible –antibiotique.

4. Mesures de l'activité des ATB.

Elle permet de sélectionner les ATB les plus actifs.

Elle permet aussi de définir le taux thérapeutique dans la perspective de traitement des maladies infectieuses, qui détermine la [] nécessaire et suffisante pour détruire l'agent infectieux (Fig2.).

Effets des antibiotiques sur les bactéries

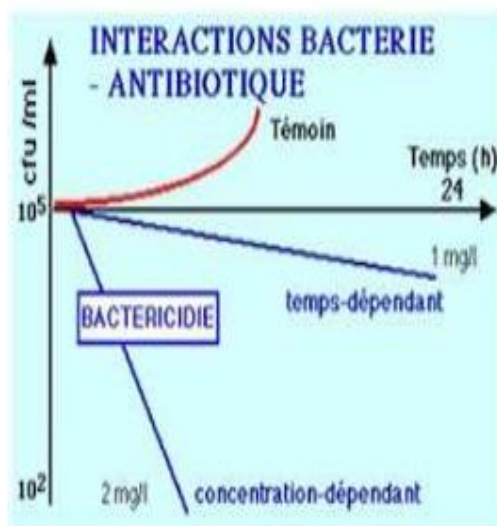


Bactériostase

Arrêt du développement des micro-organismes par inhibition partielle ou totale de leur croissance

- CMI

1^o concentration en AB inhibant toute croissance visible à l'œil nu



Bactéricidie

Arrêt du développement de ces micro-organismes par mort cellulaire avec ou sans lyse

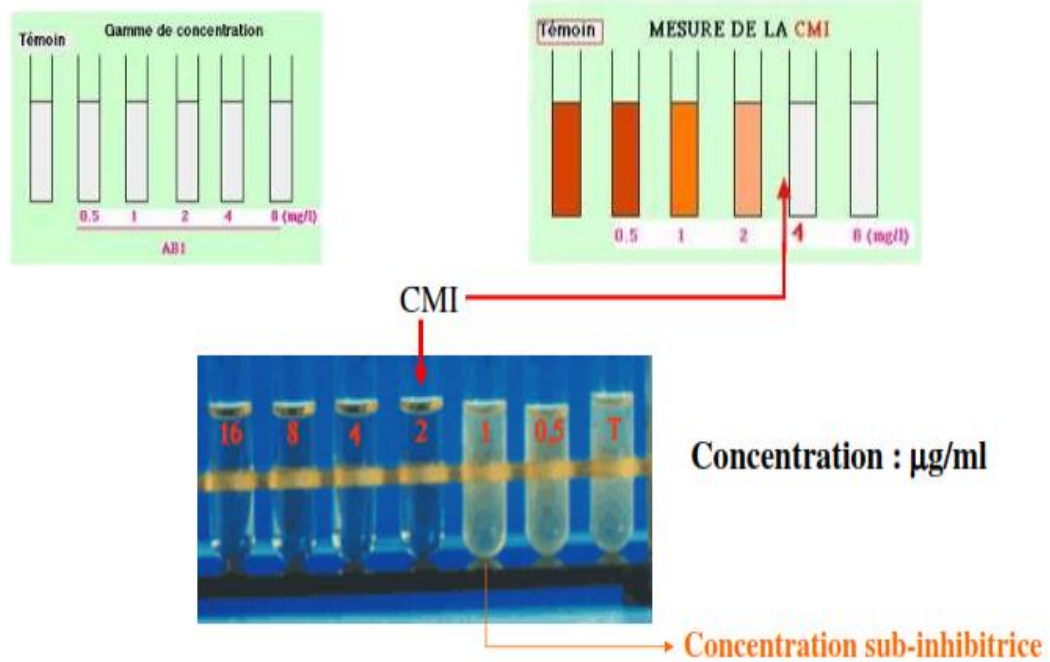
- CMB

1^o concentration en AB létale pour la bactérie

Figure2. Détermination des concentrations d'antibiotiques inhibitrices et bactéricides.

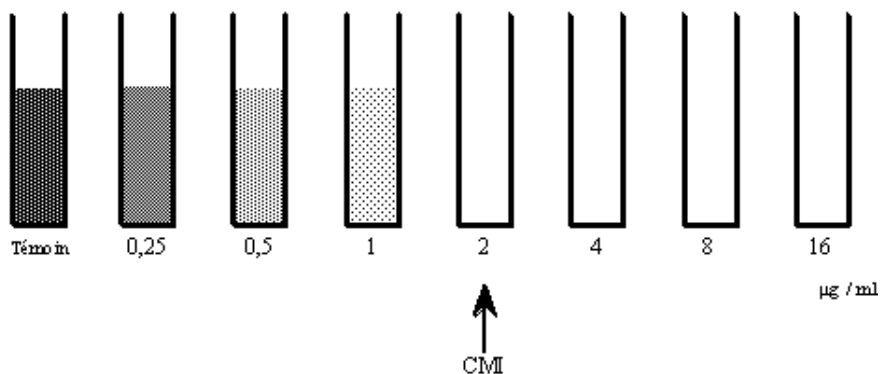
On réalise l'expérience suivante : dans une série de tubes à essais contenant un milieu de culture liquide, on inocule un même nombre de microorganismes () et des doses croissantes de l'ATB ().

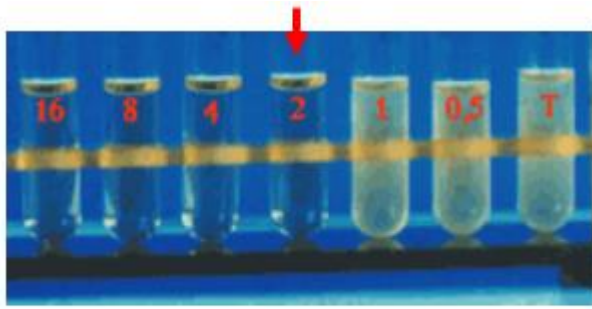
Méthode de dilution en milieu liquide



Classiquement : inoculum est confronté à des [AB] croissantes de progression géométrique de raison 2

Dans le tube témoin, la croissance se déroule normalement.

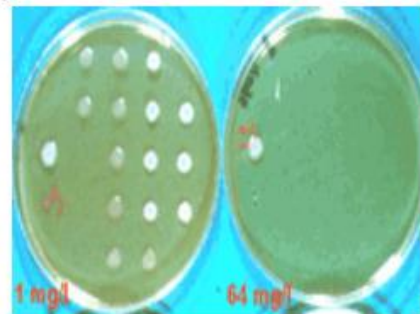
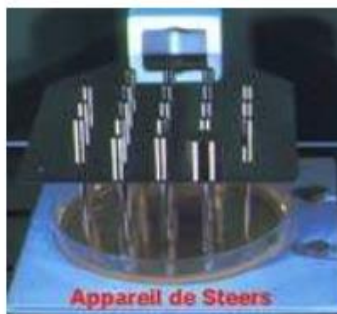
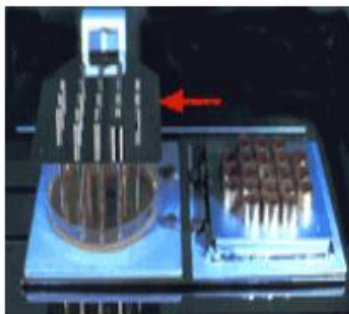




Milieu liquide :
concentration ici 2mg/l

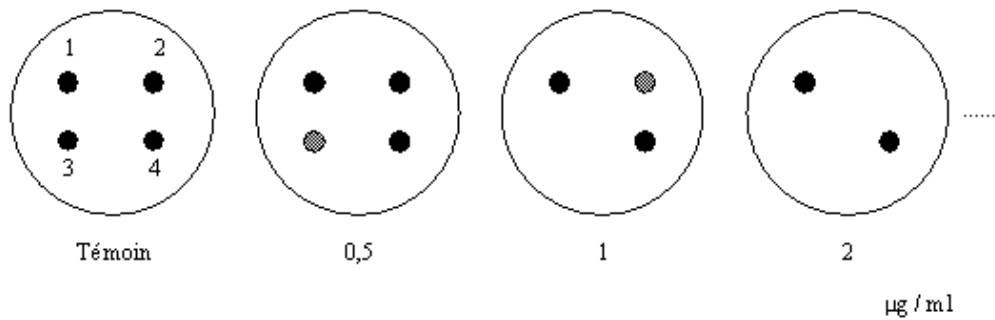
Accès à la CMI

Méthode de dilution en milieu solide



Les méthodes de dilution ont pour but la détermination quantitative de la dose inhibant toute croissance visible.

La CMI est de l'ordre de $\mu\text{g/ml}$; elle est déterminable pour tout germe cultivable et pour toute substance.



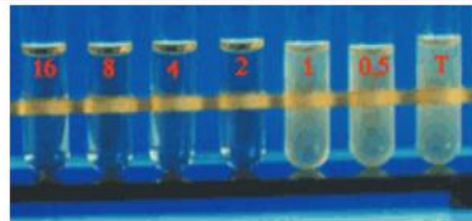
La CMI de la souche 3 vis-à-vis de l'antibiotique incorporé à la gélose est de 1µg/mL.

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.

Mesure de la bactéricidie

Méthode de dilution en milieu liquide – Méthode quantitative – µg/ml

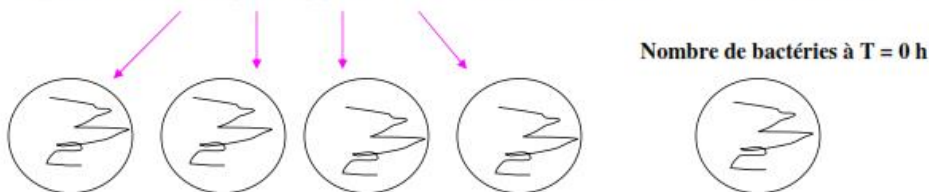
Dénombrement par la technique de la viabilité cellulaire du nombre de survivants dans chaque tube ne présentant aucune culture visible à l'oeil nu



CMB

Y-a-t-il des survivants ?

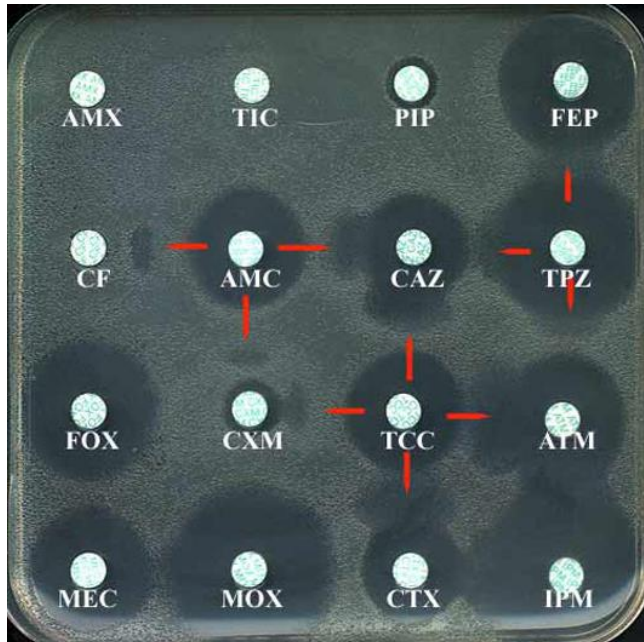
Quel est leur % par rapport aux bactériesensemencées à t = 0 heure ?



Géloses sans AB

5. Méthode par diffusion en milieu solide par la méthode des disques.

Mesure d'un diamètre d'inhibition en mm ; CMI



On réalise les étapes suivantes :

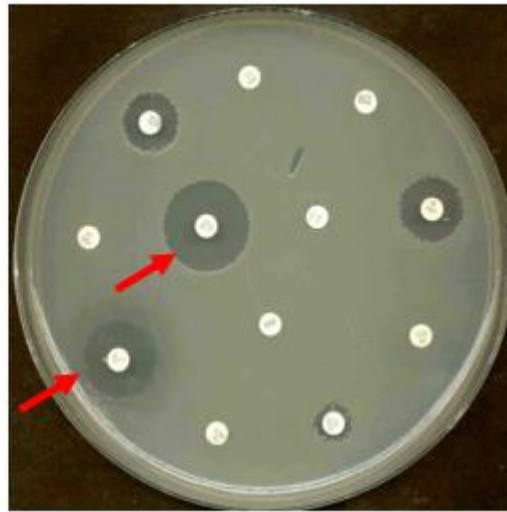
- Isolement du pathogène sur milieu sélectif
- Réalisation d'une suspension bactérienne à partir des colonies suspectes.
- Ensemencement sur milieu Muller Hinton.
- Dépôt de disques d'ATB sur les cellules.
- Incubation et observation des cercles d'inhibition avec différents diamètres et ou absence de cercles.

La mesure des diamètres détermine l'efficacité de l'ATB .

Un diamètre supérieur ou égal à 22 voire 28 mm , signifie une efficacité de l'ATB.

Antibiogramme

Milieu solide :
diamètre d'inhibition

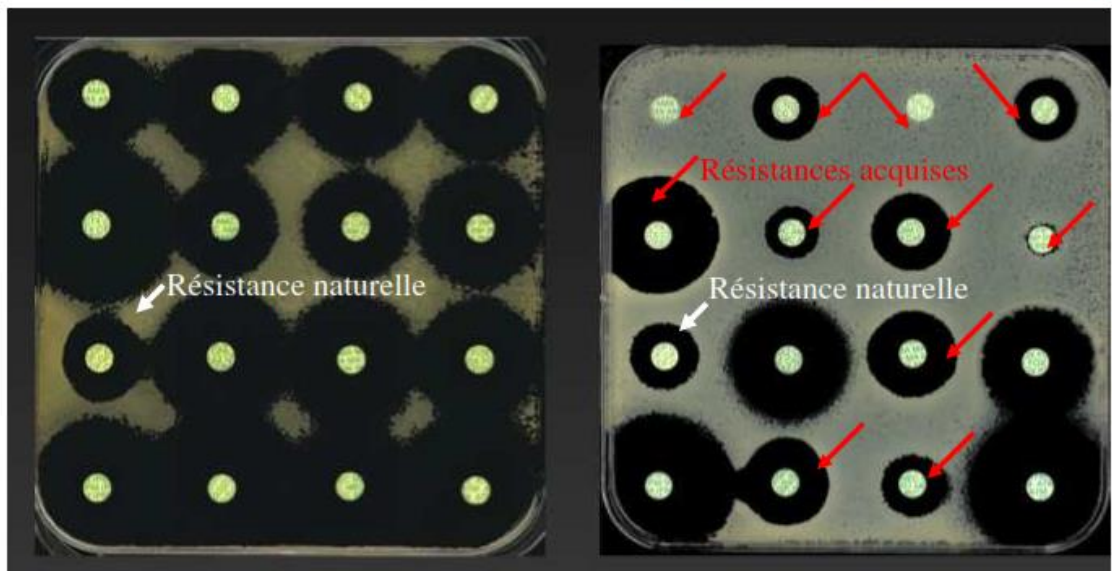


6. Résistance des bactéries aux antibiotiques .

La résistance des bactéries aux antibiotiques est soit naturelle, soit acquise.

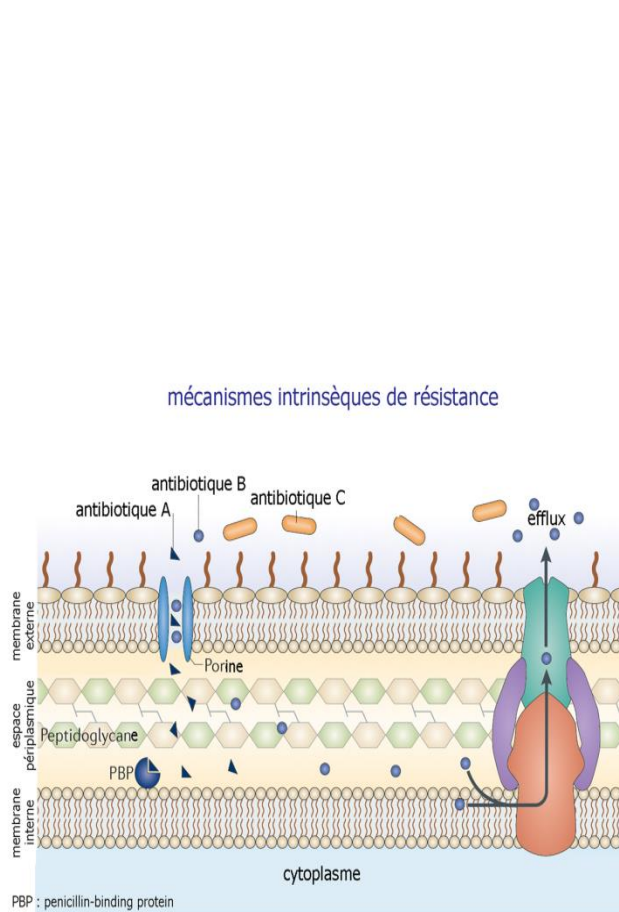
- Norme = Référence
- Souche sensible

- Changement de la Norme
- Acquisition d'une résistance

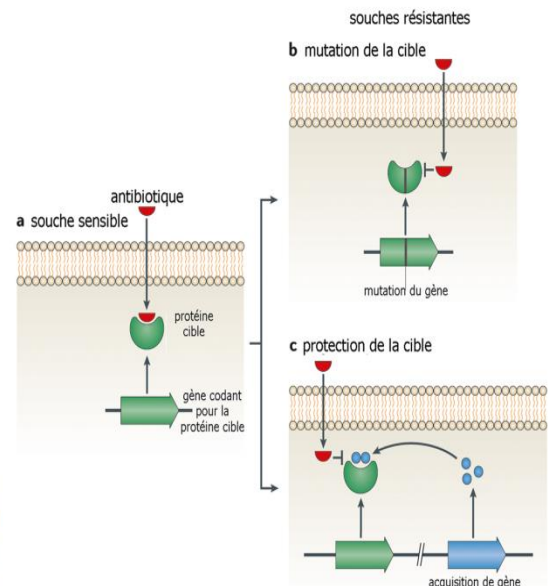


Il existe à ce jour 4 Stratégies de la résistance aux antibiotiques :

- Inactivation de l'antibiotique par des enzymes. le cas des β lactamases.
- empêcher l'ATB d'atteindre sa cible en s'opposant à son accès ou bien en l'expulsant.
- modifier la structure de la cible
- substituer à la cible une autre molécule analogue



modifications de la cible de l'antibiotique



interaction directe avec l'antibiotique

