

## 15 : Les antibiotiques

Les bactéries sont partout et nous sommes en contact permanent avec ces micro-organismes (voir expérience 8). Lorsque l'on évoque les bactéries, on pense tout de suite aux maladies, aux infections, à la mortalité causées par ces microbes. Cependant seule une minorité des bactéries peut causer des infections et nous rendre malade. L'avènement des antibiotiques au début du XXe siècle a permis de faire reculer d'une manière extraordinaire la mortalité liée aux infections. Malheureusement les médecins doivent maintenant faire face avec de nombreuses souches bactériennes devenues résistantes à de nombreux antibiotiques.

En 1928 **Alexandre Flemming**, un médecin écossais, remarqua qu'un champignon, la moisissure *Penicillium notatum* (actuellement dénommé *Penicillium chrysogenum*), était capable de produire une substance qui inhibait la croissance de certaines bactéries. Ce fut le début de l'ère des antibiotiques ! La **pénicilline** était découverte.

En analyse médicale il est courant de tester si la bactérie responsable d'une infection est résistante ou non à différents antibiotiques afin de donner un antibiotique approprié pour garantir le traitement efficace. Cette analyse peut être effectuée par un antibiogramme dont le protocole est décrit ci-dessous

### L'EXPERIENCE :

Cette expérience est prévue avec 2 souches d'*Escherichia coli*. Une résistante à l'ampicilline (AmpR) et une autre sensible (AmpS). La moitié de la classe effectuera la manipulation avec l'une des souches et l'autre moitié de la classe utilisera la deuxième souche. La bactérie AmpR possède un plasmide contenant une enzyme capable d'inactiver l'ampicilline (voir expérience 4).

Des disques imprégnés d'antibiotiques sont déposés sur un gazon de bactéries à tester. L'antibiotique va diffuser dans le milieu de culture. La concentration sera élevée au bord du disque et de plus en plus faible à mesure que l'on s'en éloigne. Si la bactérie est sensible, une zone d'inhibition (absence de croissance de la bactérie) sera visible autour du disque. Plus la bactérie est sensible, plus la zone d'inhibition sera grande. En mesurant le diamètre de la zone d'inhibition et en la comparant à des tables de référence il est ainsi possible de savoir si la bactérie est sensible ou résistante à cet antibiotique.

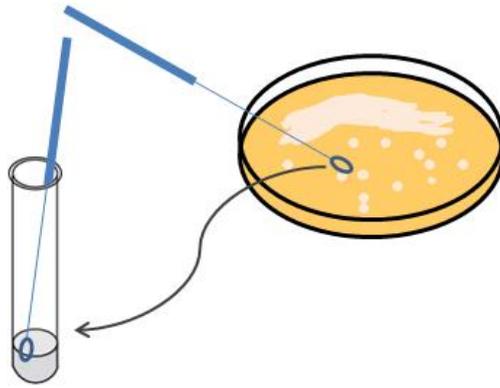
Les antibiotiques utilisés ici sont :

- **Le chloramphénicol** (disque C30) inhibe la synthèse des protéines en agissant sur le ribosome bactérien (de type 70S) et est sans effet sur les ribosomes 80S des cellules eucaryotes.
- **L'ampicilline** (disque Am) est une pénicilline modifiée qui agit sur la synthèse de la paroi et peut traverser facilement la membrane externe des bactéries Gram- négatives.
- **La pénicilline G** (disque P) agit sur la synthèse de la paroi mais ne peut pas traverser la membrane externe des bactéries Gram-négatives (voir expérience 5). Celles-ci, comme *E. coli*, sont donc résistantes naturellement à la pénicilline G.

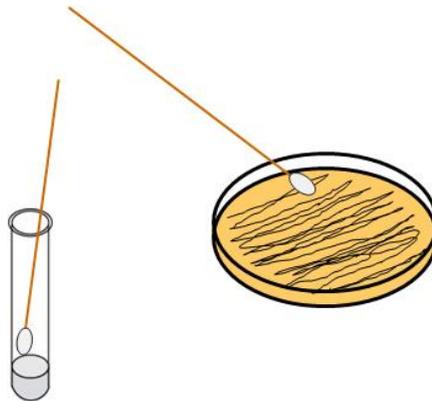
## PROTOCOLE

Attention : travaillez stérilement à côté d'une flamme!

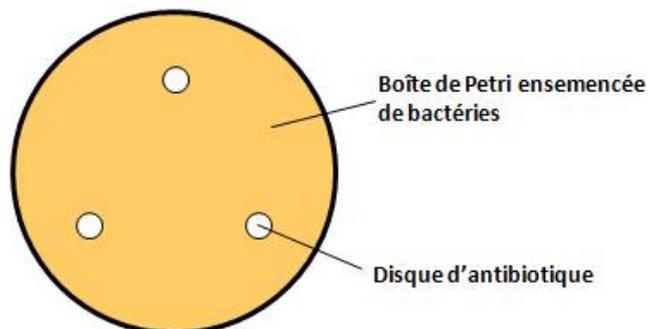
1. A l'aide d'un inoculateur, prélevez un peu de bactérie que vous ressuspendez dans votre tube Eppendorf contenant 1 ml d'eau physiologique stérile (NaCl 0.9%).



2. Imbiber un écouvillon stérile dans la suspension. Essorer légèrement contre la paroi du tube et frotter l'écouvillon sur une nouvelle boîte de pétri. Il est important d'effectuer des stries serrées afin de déposer des bactéries sur toute la boîte en grande quantité. Répéter l'opération en tournant la boîte d'un tiers pour strier dans une autre direction. Répéter une troisième fois l'opération en tournant encore la boîte d'un tiers.

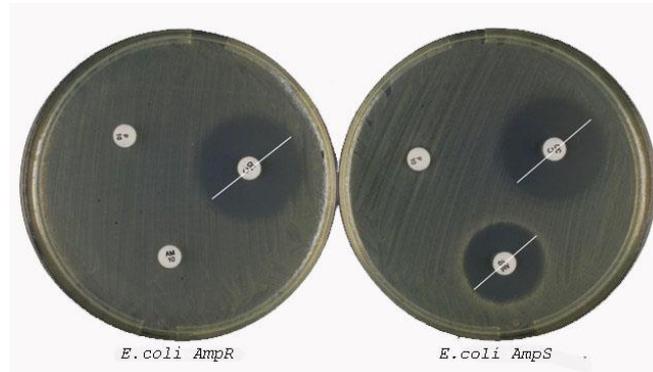


3. A l'aide d'une pince stérile (flambée à l'alcool), déposez les différents disques d'antibiotique en prenant exemple sur le schéma ci-après et appuyez légèrement dessus.



4. Incubez les pétris 24h à 37 °C (ou 48h à température ambiante) puis observez les résultats et mesurez les zones d'inhibitions.

## RESULTATS



Les diamètres des zones d'inhibition sont indiqués par les traits blancs

### Table de références pour l'interprétation des résultats :

Diamètre en mm. Les valeurs intermédiaires signifient que la bactérie possède une certaine résistance mais un traitement avec dose maximale d'antibiotique est encore possible.

Antibiotique	Résistant (R)	Intermédiaire (I)	Sensible (S)
Ampicilline	$\leq 13$	14-16	$\geq 29$
Pénicilline G	$\leq 28$	-	$\geq 29$
Chloramphénicol	$\leq 12$	13-17	$\geq 18$

### Matériel fourni :

- 20 boîtes LBA
- 20 pastilles de chaque antibiotique (Amp, C, P)
- Ecouillons stériles
- H2O physiologique stérile
- Tubes Eppendorf stériles
- Souches de bactéries (*E.coli* AmpS et *E.coli* Amp R)
- Sac rouge