

ACP	Phosphate de calcium amorphe
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
°C	Degrés Celsius
Ca	Calcium
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
cm ³	Centimètre cube
DCP	Phosphate de Calcium Déficiante
DPL	Direction de la Pharmacie et des Laboratoires
HA	Hydroxyapatite
HALD	Hôpital Aristide Le Dantec
mg	Milligramme
mg/l	Milligramme par litre
MH	Mueller Hinton
ml	millilitre
ml/min	Millilitre par minute
MLS	Macrolides Lincosamides Streptogramines
mm	millimètre
m ² /g	Mètre carré par gramme
nm	Nanomètre

OCP	Phosphate octocalcique
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
P	Phosphate
PA	Principe Actif
pH	Potentiel Hydrique
TCP	Phosphate Tricalcique
Tr/min	Tours par minute
µg	Microgramme
µg/ml	Microgramme par millilitre
µm	Micromètre
V	Volume



LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1:</u> Diagramme de diffraction des rayons X de la poudre d'hydroxyapatite.....	10
<u>Figure 2:</u> Spectre d'absorption R de la poudre d'hydroxyapatite recuite.....	11
<u>Figure 3:</u> Méthode de dilution en milieu liquide	19
<u>Figure 4:</u> Détermination de la sensibilité par micro méthode en milieu liquide avec indicateur de pH.	19
<u>Figure 5:</u> Ensemenceur multiple (appareil steers)	20
<u>Figure 6:</u> Détermination de la sensibilité par la méthode de dilution en milieu solide.....	21
<u>Figure 7:</u> Détermination de la sensibilité par la méthode des disques standardisations.	22
<u>Figure 8:</u> Droites de concordances du diamètre d'inhibition en fonction de la CMI de l'antibiotique testée.....	23
<u>Figure 9:</u> Détermination de la CMI par la méthode E-test.	24
<u>Figure 10:</u> Différentes étapes de la méthode de préparation de l'hydroxyapatite.....	31
<u>Figure 11:</u> Diamètres d'inhibition en fonction de la charge de l'expérience 1	36
<u>Figure 12:</u> Diamètres d'inhibition en fonction de la charge de l'expérience 2	37
<u>Figure 13:</u> Diamètres d'inhibition en fonction de la charge de l'expérience 3	38
<u>Figure 14:</u> Diamètres d'inhibition en fonction de la charge de l'expérience 4	39
<u>Figure 15:</u> Diamètres d'inhibition en fonction de la charge de l'expérience 5	40
<u>Figure 16:</u> Diamètres d'inhibition en fonction de la charge de l'expérience 6	41

<u>Figure17</u> :Diagramme de la moyenne des diamètres d'inhibition en fonction de la charge à l'expérience 1	43
<u>Figure18</u> :Diagramme de la moyenne des diamètres d'inhibition en fonction de la charge à l'expérience2	43
<u>Figure19</u> :Diagramme de la moyenne des diamètres d'inhibition en fonction de la charge à l'expérience3	44
<u>Figure20</u> :Diagramme de la moyenne des diamètres d'inhibition en fonction de la charge à l'expérience4	44
<u>Figure21</u> :Diagramme de la moyenne des diamètres d'inhibition en fonction de la charge à l'expérience5	45
<u>Figure22</u> :Diagramme de la moyenne des diamètres d'inhibition en fonction de la charge à l'expérience6	45



LISTE DES TABLEAUX

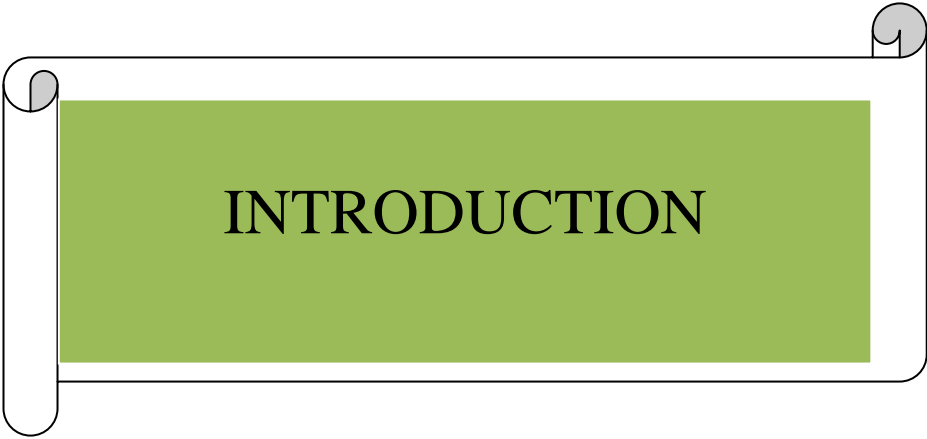
TABLEAU N° I: La masse en grammes d'antibiotique et d'hydroxyapatite par matrices. 34

TABLEAU N°II: Résultats de la sensibilité de la souche *Escherichia ColiATCC 25922* à l'ofloxacine en fonction de la charge. 42

Sommaire

INTRODUCTION.....	1
PREMIERE PARTIE:	3
GENERALITES	3
CHAPITRE I: LES CERAMIQUES	4
I.1 DEFINITION:.....	4
I.2 CLASSIFICATION	4
I.3. LA CERAMIQUE D’HYDROXYAPATITE.....	5
I.3.1 Définition:.....	5
I.3.2 Méthodes de synthèse de l’hydroxyapatite	6
I.3.3- Techniques de caractérisation de l’hydroxyapatite.....	9
I.3.4- Utilisations de l’hydroxyapatite	11
CHAPITRE II: ETUDE DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES	13
II.1 LES ANTIBIOTIQUES	13
II.1.1 Définition.....	13
II.1.2 Classification des antibiotiques [44, 45].....	13
II.1.3 Mécanismes d’action des antibiotiques [44, 45]	16
II.2 METHODES D’ETUDE IN VITRO DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES	17
II.2.1 Définition de la CMI	17
II.2.2 Méthode de dilution.....	18
II.2.3 Méthode de diffusion.....	21
II.3. FACTEURS INFLUENCANTS L’ETUDE DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES [43;46-48]	24
II.3.1 Facteurs extrinsèques.....	24
II.3.2.Facteurs intrinsèques	26
DEUXIEME PARTIE:	27
TRAVAIL EXPERIMENTAL.....	27
OBJECTIF:.....	28
CHAPITRE I: MATERIEL ET METHODES	28
I.1 CADRE D’ETUDE.....	28
I.2 MATERIEL	28
I.2.1 Appareillage et verrerie	28
I.2.2 Matières premières.....	30
I.3- METHODES DE PREPARATION.....	32

I.3.1- Préparation des matrices.....	32
I.3.2- Réalisation de l'antibiogramme standard	34
CHAPITRE II: RESULTATS ET COMMENTAIRES	36
II.1- RESULTATS	36
II.1.1: OBSERVATION MACROSCOPIQUE.....	36
II.1.2 Résultats des diamètres d'inhibition.....	41
II.2 COMMENTAIRES	46
CONCLUSION	47
REFERENCES.....	47



Les substances pharmacologiques administrées par voie orale ou parentérale présentent souvent une demi-vie trop courte et des risques de toxicité générale pour atteindre l'effet recherché au niveau du site d'action.

Pour pallier ces inconvénients, se sont développés des systèmes de délivrance de principes actifs, appelés Drug Delivery Systems (DDS). Le principe de ces DDS repose sur le fait qu'ils sont en mesure de délivrer les substances pharmacologiquement actives in situ, de façon prolongée, régulière, en quantité suffisante et non toxique [1].

L'hydroxyapatite, matériau de phosphate de calcium ressemblant à la phase minérale de l'os, est le matériau ostéoconducteur le plus étudié et appliqué [2].

Plus tôt des études in vitro ont démontré la propriété de l'hydroxyapatite comme support de divers agents actifs tels que les antibiotiques [3, 4].

Du fait de ses propriétés, nous nous sommes donné pour objectif de confectionner des matrices à base d'hydroxyapatite mélangées d'antibiotiques capables d'entraîner une inhibition d'une culture bactérienne en milieu gélosé.

Le travail est divisé en deux parties:

- La partie bibliographique est composée de deux chapitres:
 - Chapitre I décrit les généralités sur les céramiques,
 - Chapitre II évoque la sensibilité bactérienne aux antibiotiques.
- La partie expérimentale est divisée en deux chapitres:
 - Chapitre I où nous présenterons le matériel et la méthode de confection des matrices,
 - Chapitre II consacré aux résultats et commentaires.



**PREMIERE PARTIE:
GENERALITES**

CHAPITRE I: LES CERAMIQUES

I.1 DEFINITION

Le terme céramique provient de « *keramos* », mot grec signifiant argile. Il a d'abord désigné des poteries recouvertes d'émail avant d'être étendu à toute la porcelaine et à d'autres produits essentiellement constitués de silicates et qui représentent les céramiques classiques [5].

En effet, ce sont des matériaux inorganiques, composés d'oxydes, de carbures, de nitrures et de borures. Ces céramiques présentent des liaisons chimiques fortes de nature ionique ou covalente. Les céramiques sont mises en forme à partir d'une poudre de granulométrie adaptée qui est agglomérée. Puis une deuxième étape consiste à densifier et consolider cet agglomérat par un traitement thermique appelé frittage [5-7].

En odontologie, les céramiques sont essentiellement employées dans des applications prothétiques mais peuvent également être utilisées en implantologie, en orthodontie, en matériau de restauration esthétique [8].

I.2 CLASSIFICATION

On distingue deux classes de céramiques [9-11]:

- **Les céramiques traditionnelles** parmi lesquelles se trouvent les produits de terre cuite, les porcelaines, les faïences et les verres.
- **Les céramiques nouvelles** en général obtenues à partir de produits frittés (agglomérés par chauffage). Dans cette classe on retrouve les céramiques utilisées comme biomatériaux avec deux grandes catégories:

- les céramiques dites bio-inertes avec:
 - Les céramiques à base de métaux (alumine, zircon);
 - Les céramiques à base de nitrures et de carbures comme les carbures de silicium (HPSiC: Hot Pressed Silicon Carbide), les nitrures de silicium, les carbures et nitrures de titane (TiC, TiN);
- les céramiques dites bioactives comprenant:
 - Les céramiques à base de sels de calcium (hydroxyapatite, fluoroapatite, phosphate tricalcique...),
 - Les verres et vitrocéramiques encore appelés Bioverres.

I.3.LA CERAMIQUE D'HYDROXYAPATITE

I.3.1 Définition:

L'hydroxyapatite est une espèce minérale de la famille des phosphates, de formule $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, usuellement écrite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ pour souligner le fait que la maille de la structure cristalline comprend deux molécules. L'hydroxyapatite est le membre hydroxylé du groupe apatite. L'ion OH^- peut être remplacé par le fluor, le chlore ou le carbonate [12,13].

L'hydroxyapatite cristallise dans le dispositif hexagonal. Elle a une densité de 3,08 et une dureté de 5 sur l'échelle de Mohs. La poudre d'hydroxyapatite pure est blanche. Celles qu'on trouve dans la nature peuvent cependant être de couleur marron, jaune ou verte. On peut rapprocher ceci à la coloration observée dans la fluorose dentaire [12].

La céramique d'hydroxyapatite, sel à base de calcium, est le plus proche de la phase minérale des tissus calcifiés et sa biocompatibilité lui offre une place de choix en chirurgie osseuse. Il n'y a aucune tendance à l'encapsulation de ce

matériau par le tissu mou. Sa bio activité et sa biodégradation dépendent directement de ses propriétés physicochimiques [14,15].

La céramique hydroxyapatite n'est ni ostéo-inductrice, ni ostéogénique. L'ostéoinduction est la conversion phénotypique de cellules du tissu mou en précurseurs de tissus osseux par une stimulation appropriée telle que la matrice d'os déminéralisé ou la «bonemorphogenicprotein»[9].

L'ostéogénèse est la formation de tissu minéralisé par les ostéoblastes. L'os greffé autogène est ostéogénique. Il provoque la migration des ostéoblastes formateurs d'os et des pré-ostéoblastes vers un site où de l'os néoformé, est synthétisé.

L'hydroxyapatite cependant est ostéophile ou ostéo-conductrice comme les greffes d'os autogène dévitalisé ou l'os de banque. L'hydroxyapatite synthétique agit comme un treillis pour la pénétration des vaisseaux et le dépôt consécutif d'os néoformé.

Avec des greffes dévitalisées ou de l'os de banque, le processus de remplacement par de l'os vivant peut être extrêmement lent, car l'os mort doit d'abord être résorbé par l'activité ostéoclastique, puis remplacé par «creeping substitution ». L'hydroxyapatite, quant à elle, n'est pas résorbée, mais agit simplement comme un agent ostéoconducteur qui est intégré dans le tissu osseux néoformé [9,10;16].

I.3.2 Méthodes de synthèse de l'hydroxyapatite

Il existe plusieurs méthodes de synthèse de l'hydroxyapatite.

En raison des nombreuses applications de l'hydroxyapatite, que ce soit dans le domaine médical comme substitut osseux ou dans le domaine environnemental comme adsorbant de métaux toxiques, plusieurs méthodes de

synthèse ont été mises en œuvre. Les synthèses de l'hydroxyapatite s'opèrent soit par voie sèche ou les précurseurs sont mélangés à l'état solide, soit en milieu humide en utilisant des réactifs en solution.

La synthèse chimique par voie humide est la méthode la plus utilisée. Cependant, cette méthode a quelques inconvénients, principalement la difficulté de maintenir le pH au-dessus de 9 pour éviter la formation d'hydroxyapatite déficiente en calcium qui se transforme facilement en phosphate tricalcique (TCP) lors du frittage[17].

La méthode de synthèse de l'hydroxyapatite par voie humide fait appel à la précipitation à partir de solution aqueuse ou à l'hydrolyse d'un phosphate de calcium. Généralement, elle permet d'obtenir de fine particule (poudre) d'hydroxyapatite de grande surface spécifique. Cependant, les hydroxyapatites obtenues par ce processus de synthèse ne sont pas toujours stœchiométriques et ont une basse cristallinité dont le degré dépend d'ailleurs de plusieurs paramètres tels que le pH, la température et le temps de vieillissement des solutions ainsi que la nature et la concentration des réactifs mis en jeu [18].

Parmi les techniques les plus couramment utilisées, on peut citer: la synthèse hydrothermale [18, 19], la méthode sol-gel [17;20-21], la pyrolyse [22], et la précipitation [23, 24].

En synthétisant de l'hydroxyapatite par précipitation à 35°C à partir de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ et $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ à pH = 10-11, **Changsheng Liu et collaborateurs** ont montré qu'au début de la réaction le rapport Ca/P est inférieur à 1,5, valeur atteinte en dix (10) minutes, et qu'un temps considérablement long était nécessaire pour obtenir le rapport stœchiométrique de 1,67 [25].

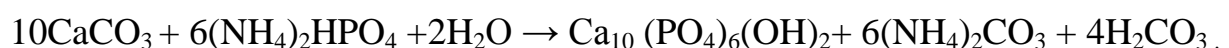
Dans la même étude les auteurs ont proposé la chronologie suivante pour la préparation de la poudre d'hydroxyapatite:

- formation de phosphate octocalcique (OCP) très instable: $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$;
- transformation très rapide de l'OCP en phosphate de calcium amorphe (ACP): $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$;
- transformation progressive de l'ACP en hydroxyapatite déficiente en calcium (DCP): $\text{Ca}_{10-z}(\text{HPO}_4)_z(\text{PO}_4)_{6-z}(\text{OH})_{2-z}n\text{H}_2\text{O}$ avec $0 \leq z \leq 1$;
- finalement, la DCP se transforme en hydroxyapatite (HA) stable: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

La technique sol-gel, permettant d'obtenir un mélange homogène de phosphore et de calcium et un contrôle strict des paramètres, est une méthode élective pour la préparation de poudres hautement pures.

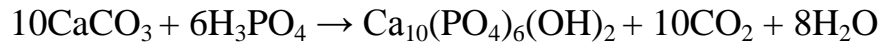
Cependant, l'application de la technique sol-gel est limitée par la possibilité d'hydrolyse des phosphates, le vieillissement de la solution et le coût élevé des matières premières[25].

Le principe de la synthèse de la poudre hydroxyapatite par la méthode hydrothermale consiste à chauffer au-dessus de 100°C un mélange de réactifs en solution sous une pression suffisamment haute (supérieur à 1atmosphère) permettant une élévation de la température tout en empêchant l'eau de s'évaporer. Cette méthode conduit à l'obtention de poudres d'hydroxyapatite fines, homogènes et bien cristallisées. Au début la méthode hydrothermale a été utilisée pour préparer de l'hydroxyapatite directement à partir du corail qui est un matériau naturel contenant de l'aragonite (CaCO_3 cristallisé dans le système orthorhombique) suivant la réaction [26]:



Dans une étude récente, Masahiro Yoshimura et collaborateurs ont réalisé la transformation hydrothermale de la calcite en hydroxyapatite en présence de la solution saturée d'acide ortho phosphorique dans un autoclave à 120° et 180°C

(le pH étant maintenu à 7 avec de l'ammoniaque) et proposé ainsi le mécanisme de dissolution /précipitation suivant [27]:



La synthèse à l'état solide met en jeu des poudres de réactifs tels que $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}_{(s)}$ avec $\text{Ca}(\text{OH})_{2(s)}$ dont le mélange est ensuite chauffé à très haute température, de 300°C à 1200°C [28]. Comparativement à la préparation par voie humide, la synthèse par voie sèche a le grand avantage d'atteindre une composition stœchiométrique mais son coût reste élevé eu égard aux températures élevées.

On distingue aussi la synthèse mécano-chimique dont le principe consiste en la perturbation par pression des espèces liées en surface pour accroître les réactions thermodynamiques et cinétiques entre les solides [29, 30].

Les réactifs sont mélangés à l'état solide (ou parfois même à l'état humide) dans un broyeur à boulets à grande vitesse de l'ordre de 170 tr/min. L'activation mécano-chimique peut générer des zones locales de hautes températures (450-700°C) et de hautes pressions à cause des effets de frottements et, le cas échéant, un chauffage adiabatique des bulles d'air, alors que la température globale reste voisine de la température ambiante [31].

I.3.3- Techniques de caractérisation de l'hydroxyapatite

a- Caractérisation par diffraction des rayons X

La poudre d'hydroxyapatite peut être caractérisée par diffraction des rayons X à l'aide d'un diffractomètre D500 (Siemens, Karlsruhe, Germany) équipé d'un monochromateur avant en cristal de quartz ($\text{Co K}_{\alpha 1} = 0,178897 \text{ nm}$). Les raies de diffraction de l'hydroxyapatite (fichier JCPDS #9-432) sont présentes dans le diagramme de diffraction des rayons X. [32]

L'hydroxyapatite obtenue après recuite à 800°C est bien cristallisée et ne présente pas d'impuretés (**Figure 1 d**).

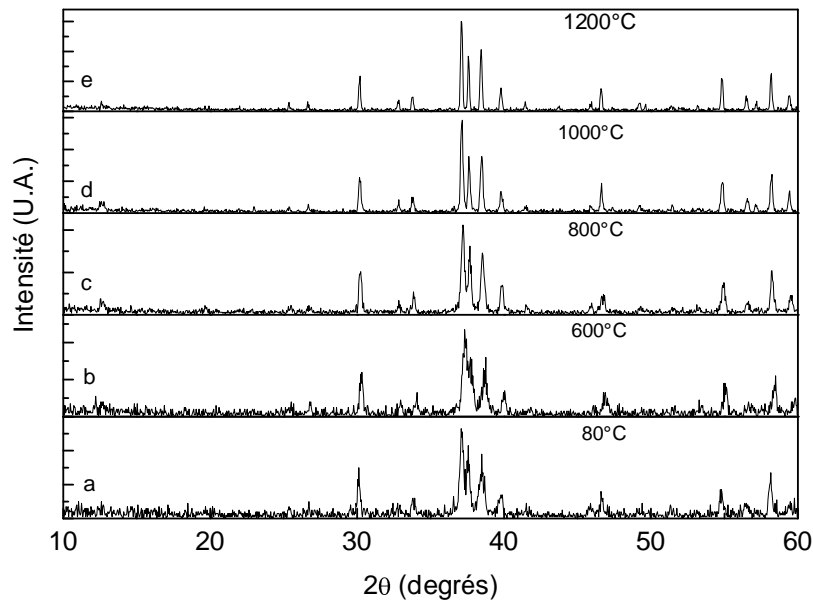


Figure1: Diagramme de diffraction des rayons X(d) de la poudre d'hydroxyapatite précipitée entre 80°C et 95°C puis séchée à 80°C, ayant subi ensuite un traitement thermique à l'air d'une durée de 3 heures à 800°C[1].

b- Caractérisation par spectroscopie IR

Les spectres d'absorption IR de la poudre d'hydroxyapatite ont été obtenus avec le spectrophotomètre ATI Mattson Genesis Series FTIR™ (GMI, Strasbourg, France). Ils sont identiques à celui de l'hydroxyapatite synthétique de référence (**Figure 2**).

Nous retrouvons les bandes à 3571 et 630 cm^{-1} caractéristiques des groupements OH, ainsi que celles caractéristiques des groupements PO_4 à 571, 601, 962, 1040-1080 cm^{-1} [34]

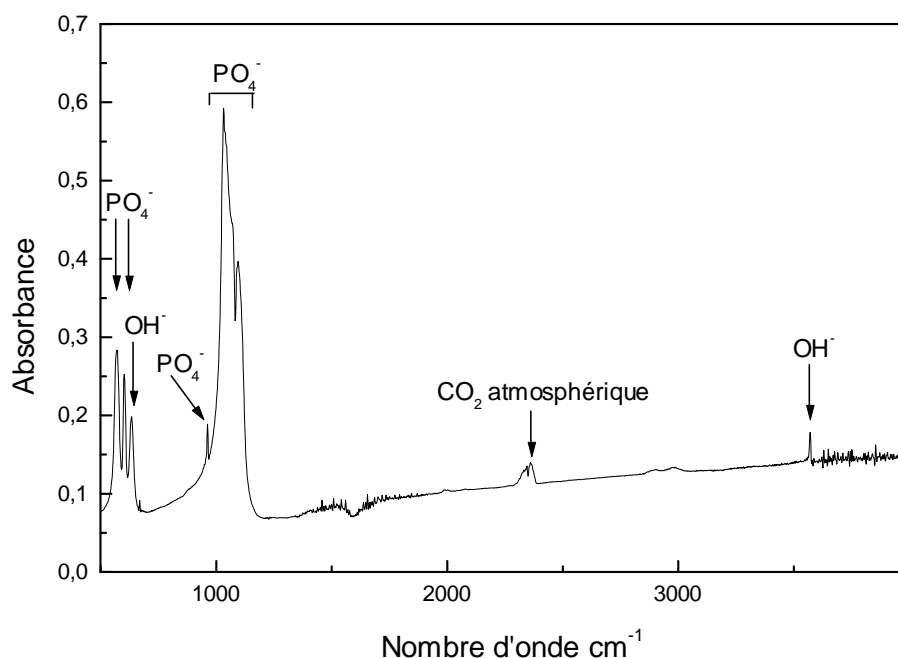


Figure 2: Spectre d'absorption IR de la poudre d'hydroxyapatite recuite à 800°C pendant 3 heures[1]

I.3.4- Utilisations de l'hydroxyapatite

En raison de ses propriétés de bioactivité et de biocompatibilité l'hydroxyapatite est largement utilisée dans le domaine médical et chirurgical.

L'hydroxyapatite peut être utilisée comme substance de remplissage pour remplacer un os amputé ou comme enduit pour favoriser la croissance à l'intérieur des implants prothétiques. Certains implants dentaires modernes sont enduits d'hydroxyapatite.

Pour les greffes de petites tailles, on a recourt également à l'hydroxyapatite, mais la relative fragilité de ce matériau en limite l'utilisation à des zones peu sollicitées mécaniquement notamment pour la réparation maxillo-faciale ou les prothèses oculaires [36,37].

L'hydroxyapatite rentre dans la fabrication de certains médicaments tels que l'ossopan faisant partie de la classe thérapeutique des suppléments calciques[1].

L'hydroxyapatite synthétique est également utilisée couramment comme phase stationnaire dans les colonnes chromatographiques pour la séparation de diverses molécules telles que la vit D₃ et ses composés dérivés [40] et les protéines dont l'adsorption sur l'hydroxyapatite met en jeu des interactions entre, d'un côté, les résidus carboxyliques et les résidus basiques à la surface des protéines avec, de l'autre côté, respectivement les ions Ca²⁺ et les ions PO₄³⁻ de l'hydroxyapatite [41,42].

CHAPITRE II: ETUDE DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

II.1 LES ANTIBIOTIQUES

II.1.1 Définition

Les antibiotiques sont des substances chimiques, produites par des micro-organismes ou obtenues par semi-synthèse ou synthèse chimique capables d'inhiber spécifiquement la croissance des micro-organismes ou de les détruire.

Pour être efficace l'antibiotique doit satisfaire aux trois conditions suivantes:

- pénétration à l'intérieur de la bactérie;
- intervention au niveau d'une cible à l'intérieur de cette bactérie;
- l'antibiotique ne doit pas être inactivé par des enzymes pouvant être synthétisées par cette bactérie.

II.1.2 Classification des antibiotiques[44,45]

- **Les bêtalactamines**

Leur structure chimique comprend un cycle bêtalactame indispensable à l'activité antibactérienne.

On distingue trois familles principales:

- les pénicillines (oxacilline, amoxicilline, ticarcilline,...);
- les céphalosporines (cefadroxile, cefuroxime, cefoxitine,...);
- les monobactams (aztreonam,...);

- **Les aminosides**

Ce sont des antibiotiques bactéricides à large spectre possédant une structure aminoglycosidiques.

Les aminosides sont dérivés en trois grands groupes:

- aminosides de première génération: streptomycine, kanamycine, néomycine...,
- aminosides de deuxième génération: amikacine, gentamicine, tobramycine...,
- aminosides de troisième génération: netilmicine;

- **Macrolides, Lincosamides, Streptogramines(MLS)**

Les MLS ont un spectre limité comprenant les bactéries à Gram positif, les cocci à Gram négatif, les mycoplasmes et les bacilles à Gram négatifs anaérobies et sont divisés en trois grands groupes:

- macrolides (érythromycine, oléandomycine, josamycine);
- lincosamides (lincomycine, clindamycine);
- streptogramines ou synergistine (pristinamycine, virginamycine).

- **Les cyclines**

Les principaux produits sont: les tétracyclines, doxycycline, minocycline. Les tétracyclines ont une activité antibiotique large, seulement bactériostatique;

- **Les phénicolés**

Ce sont des bactériostatiques à large spectre, dérivés de l'acide dichloro-acétique avec le chloramphénicol comme chef de file;

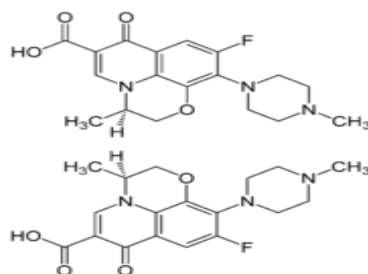
• Les quinolones

On peut les diviser en deux groupes:

- Les quinolones de première génération ne sont pratiquement actifs que sur les bacilles à Gram négatif, principalement les entérobactéries et ne sont indiqués que dans le traitement des infections urinaires (acide nalidixique, acide piromidique, flumequine),

- Les quinolones de deuxième génération ont une grande activité par leur spectre large et leur pharmacocinétique: les fluoroquinolones (ofloxacine, ciprofloxacine, pefloxacine, norfloxacine);

Structure chimique de l'ofloxacine



▪ Propriétés chimiques

L'ofloxacine se caractérise sur le plan chimique par :

- Formule brute : $C_{18}H_{20}FN_3O_4$
- Masse molaire moléculaire égale à $361,3675 \pm 0,0176$ g/mol

▪ propriétés physiques

L'ofloxacine est caractérisé sur la plan physique par :

- une température de fusion TF égale à $254^{\circ}C$
- une solubilité dans l'eau égale $28,3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ à $25^{\circ}C$

L'ofloxacine est un agent antimicrobien synthétique des quinolones fluorées à large spectre.

C'est un liquide transparent de couleur jaune clair.

Elle pénètre dans les tissus, est également bien distribuée dans les liquides corporels, y compris dans le liquide céphalo-rachidien. Les concentrations sont relativement élevées dans la bile. Le volume de distribution est de 1,5 à 2,5 l/kg. La liaison avec les protéines plasmatiques est de 25%.

- **les polypeptides**

Ce sont des antibiotiques bactériostatiques (polymixines).

II.1.3 Mécanismes d'action des antibiotiques[44,45]

- **Action sur la paroi bactérienne**

Les antibiotiques agissant par ce mécanisme extracellulaire ne sont actifs que sur les germes en croissance. Les cellules qui sont au repos ne sont pas perturbées par l'action de ces molécules.

Les antibiotiques bloquent la synthèse de la paroi, la cellule s'allonge sans faire de paroi (cloison) et explose sous l'effet de la pression osmotique interne.

- **Action sur la membrane cellulaire**

Ces antibiotiques bloquent la synthèse du peptidoglycane qui est un constituant de la paroi des bactéries. Ils inhibent les transpeptidases et carboxypeptidases qui sont essentielles à la synthèse de la paroi.

- **Action sur l'ADN**

Les sulfamides par exemple sont des analogues structurels de molécules biologiques. La cellule va les reconnaître, les insérer dans son métabolisme, bloquant ainsi les voies métaboliques. Ceci provoque une inhibition de la synthèse des bases nucléiques indispensables à la synthèse de l'ADN.

- **Action sur le ribosome bactérien**

Approximativement, la moitié des antibiotiques utilisés en thérapeutique ont pour cible le ribosome bactérien, organite cellulaire responsable de la synthèse des protéines.

La plupart interagissent avec l'ARNm ribosomique en se fixant soit sur la sous unité 30 S soit sur la 50 S (Svedberg).

II.2 METHODES D'ETUDE IN VITRO DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

II.2.1 Définition de la CMI

L'action d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être caractérisée par sa concentration minimale inhibitrice.

La CMI est la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures la multiplication des bactéries. Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories «sensible», «résistante» ou «intermédiaire» à l'action d'un agent antibactérien [46,47]

La détermination de l'effet bactériostatique et l'effet bactéricide d'un antibiotique repose sur des faits expérimentaux.

Lorsqu'on met en contact des bactéries avec un antibiotique et que l'on suit la survie bactérienne en fonction du temps, on observe les phénomènes qui diffèrent selon la concentration d'antibiotique [47].

Pour les basses concentrations (0,5 à 2µg/ml), on observe un ralentissement de la croissance bactérienne, mais à tout moment le nombre de bactéries est supérieur ou égal au nombre initial des bactéries: l'antibiotique exerce alors un effet bactériostatique. Cet effet résulte soit:

- d'un ralentissement du temps de division bactérienne;
- d'un équilibre entre la croissance normale et la destruction des bactéries.

Pour des concentrations plus élevées (4,8 à 16µg/ml), on constate une réduction du nombre de microorganismes au cours du temps; l'antibiotique exerce un effet bactéricide.

Parfois, l'action antimicrobienne est partielle et après une détermination précoce du nombre de bactéries, on observe une reprise de la croissance bactérienne.

Ce phénomène dit de «rebond» peut être du à:

- une instabilité de l'antibiotique in vitro,
- une hétérogénéité de la population bactérienne qui peut comporter un nombre de bactéries génotypiquement plus résistantes que l'ensemble de la population,
- une induction d'enzymes conférant une résistance des bactéries à l'antibiotique, par exemple les bêtalactamines[44].

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne est réalisée en recourant à plusieurs méthodes: méthode par dilution, par diffusion ou par élution [43;46,47].

II.2.2 Méthode de dilution

• En milieu liquide

On distribue dans un premier temps, dans une série de tubes à hémolyse stériles, sous un même volume des concentrations décroissantes d'antibiotique. Puis on ajoute dans chacun des tubes, sous un même volume, une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ 10^6 bactéries /ml. La CMI de l'antibiotique sur la souche est définie comme la plus faible concentration inhibant après 18 à 24 heures de contact à 37°C toute croissance bactérienne visible à l'œil (figure 3).

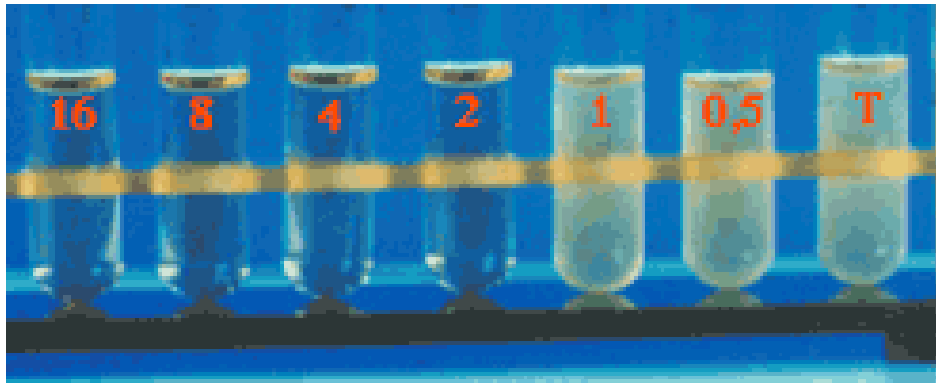


Figure 3: Méthode de dilution en milieu liquide[43,47]

Une variante de cette méthode consiste à utiliser des micros cupules en plaque au lieu de tubes. Il s'agit d'une micro méthode en milieu liquide [48] (figure4).

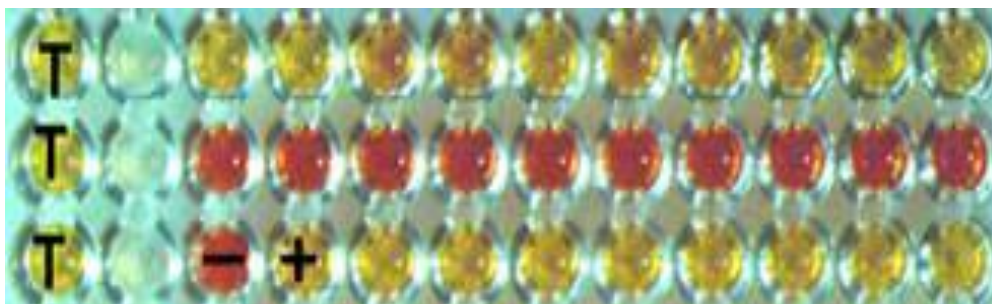


Figure 4: Détermination de la sensibilité par micro méthode en milieu liquide avec indicateur de pH [48].

- **En milieu solide**

Le principe de la technique en milieu solide est le même que celui de la méthode par dilution en milieu liquide.

Des concentrations croissantes de l'antibiotique sont réalisées et chaque concentration est incorporée à un milieu gélosé.

Des boîtes de pétri peuvent êtreensemencées avec plusieurs souches bactériennes à l'aide d'un ensemencneur (figure5).

La CMI correspond à la plus faible concentration d'antibiotique inhibant la formation de colonies visibles.

C'est la méthode de référence. Elle permet en outre de tester un grand nombre de souches vis - à -vis d'un même antibiotique [46-48] (figure 6).

En pratique, on utilise la gélose Mueller Hinton avec une épaisseur de 4mm. Pour les micros organismes exigeants, on utilise des milieux plus riches (gélose au sang). L'ensemencement se fait par inondation ou par écouvillonnage.

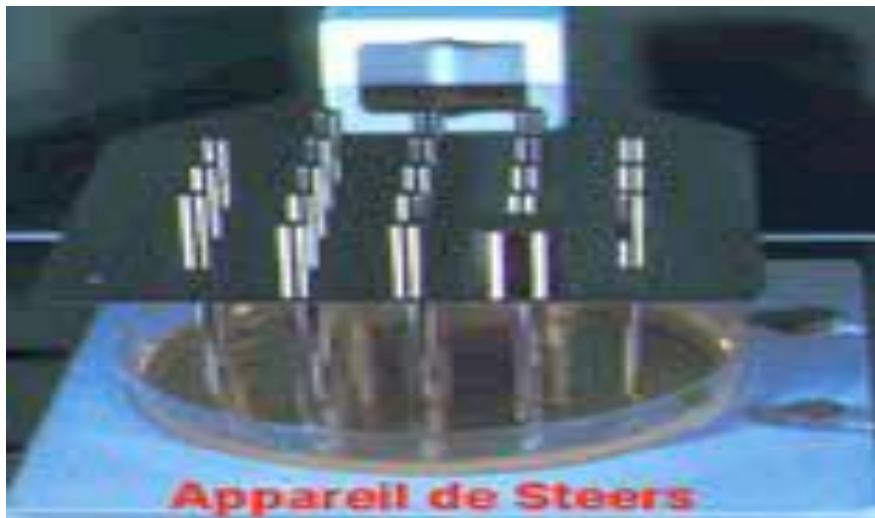


Figure 5: Ensemencement multiple (appareil de Steers)[43,48].

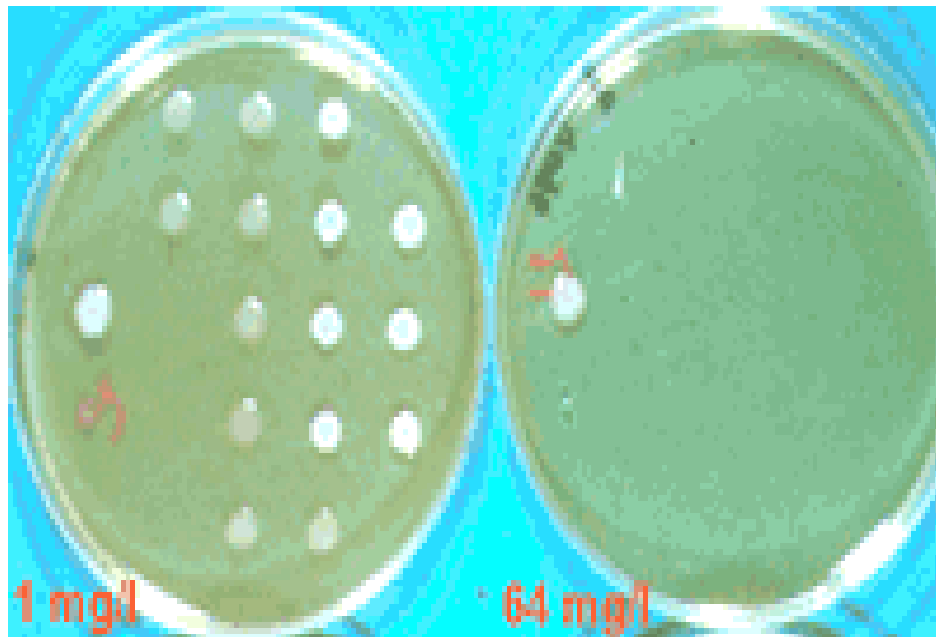


Figure 6: Détermination de la sensibilité par la méthode de dilution en milieu solide [43,48].

II.2.3 Méthode de diffusion

- **Antibiogramme standard [49-51].**

Les disques d'antibiotique sont déposés à la surface de la gélose préalablementensemencée avec une suspension de bactéries en phase exponentielle de croissance.

L'antibiotique imprégnant le disque va diffuser dans la gélose, la concentration diminue au fur et à mesure que l'on s'éloigne du disque (gradient de concentration). Après incubation du milieu de culture (18 heures à 37°C), on constate que chaque disque est entouré d'une zone d'inhibition de croissance bactérienne: la multiplication bactérienne à une concentration supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique, on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur approchée de la CMI. En effet pour un antibiotique donné, une relation existe entre le diamètre d'inhibition et

la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives portant sur un grand nombre d'espèces différentes (figure7).

En fonction de la CMI, on classera la souche en trois catégories:

- Résistante lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte in vivo sans atteindre les doses toxiques,
- Sensible, lorsque la CMI est inférieure à la concentration obtenue après l'administration d'une dose thérapeutique,
- Intermédiaire si la CMI se situe entre ces deux extrêmes.

L'effet inhibiteur est obtenu soit par une forte concentration de l'antibiotique au niveau du siège de l'infection, soit par une administration par voie générale avec des doses élevées.

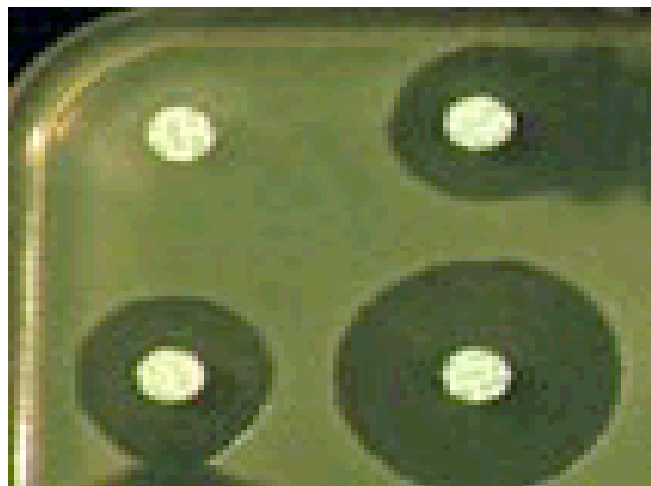


Figure7: Détermination de la sensibilité par la méthode des disques standardisation [52].

La fiabilité des résultats d'antibiogramme est influencée par de nombreux paramètres qui doivent être rigoureusement contrôlés. La standardisation est régie par des documents émanant de l'organisation mondiale de la santé (OMS) et des divers comités nationaux. Selon les pays, il peut exister des variations techniques et il est important de respecter une technique identique à celle utilisée pour l'établissement des droites de concordances (figure8).

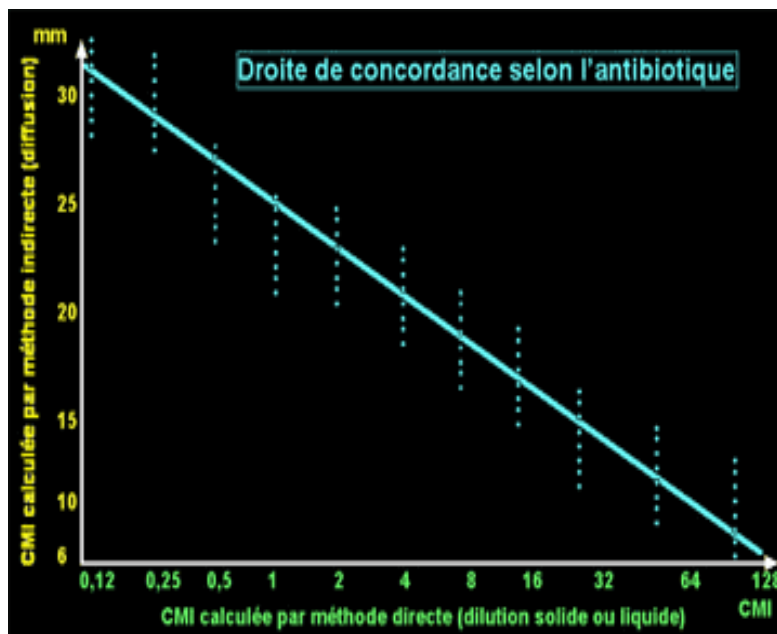


Figure 8: droite de concordances du diamètre d'inhibition en fonction de la CMI de l'antibiotique testée[43,47].

- **E-Test**

Le E-Test est une technique de détermination de la CMI basée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentielle prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone continue de 0,016 à 256mg /l ou 0,002 à 32mg/l en fonction des molécules.

L'E-test associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes de 5 mm de large et 50 mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablementensemencée avec la souche à étudier.

Après l'incubation, l'inhibition de la croissance se traduit par la présence d'une ellipse dont le point d'intersection avec une bandelette définit la CMI.

Cette nouvelle méthode de mesure de la CMI présente les avantages des méthodes de diffusion: simplicité, rapidité, large choix des molécules à tester(figure9).

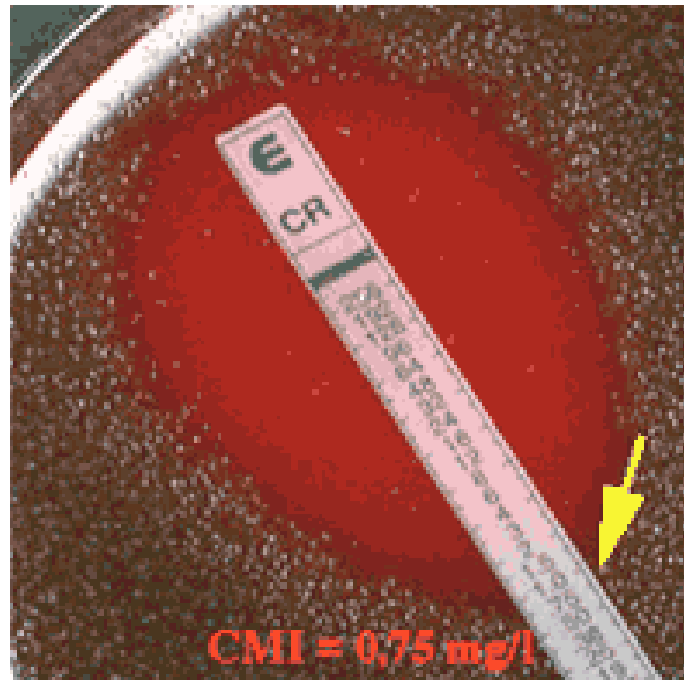


Figure 9: Détermination de la CMI par la méthode E-Test[43,47].

II.3.FACTEURS INFLUENCANTS L'ETUDE DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES [43;46-48]

II.3.1Facteurs extrinsèques

L'étude de l'action des antibiotiques n'obéit pas à une loi physique simple aisément formulable par une équation mathématique. Les phénomènes biologiques complexes qui entrent en jeu dépendent de nombreux paramètres pas toujours dépendants. Il est donc important de standardiser les techniques pour une bonne appréciation de l'activité antibiotique. L'observation rigoureuse des règles régissant l'encadrement des différents facteurs s'avèrent primordiale pour avoir des résultats fiables.

- **Environnement de culture**

- **Température d'incubation**

L'élévation de la température entre 37°C et 42°C entraîne une augmentation progressive de l'activité antibiotique.

- **L'atmosphère d'incubation aéro-anaérobie**

Certains antibiotiques sont peu influencés (exemple du chloramphénicol).

- **Le pH**

Influence l'activité de presque tous les antibiotiques et en pratique, dans les tests de routine d'étude de la sensibilité des souches, le pH est en général proche du pH physiologique.

- **Composition du milieu**

- **Glucides**

Les glucides peuvent influencer l'action d'un antibiotique en augmentant la croissance bactérienne et /ou en modifiant le pH.

- **Ions**

Ils activent ou amplifient l'action de l'antibiotique et/ ou la croissance bactérienne (exemple: Ca²⁺; Mg²⁺).

- **Antibiotique**

La mauvaise conservation des disques d'antibiotiques entraînerait une baisse de l'activité par diminution du principe actif et pour palier à cela les disques d'antibiotiques doivent être conservés au frais.

II.3.2.Facteurs intrinsèques

Plusieurs facteurs peuvent influencer l'inoculum

- **Nombre de bactériesensemencées**

L'importance de ce facteur varie selon l'antibiotique et selon l'hétérogénéité éventuelle de la population bactérienne: si la population est homogène, les variations de la CMI sont assez faibles pour la plupart des antibiotiques.

Un inoculum faible (10³ bactéries /ml) augmente la sensibilité; par contre lorsque l'inoculum est important (> à 10⁶ bactéries /ml) on note une diminution importante de la sensibilité.

- **Phase de la croissance de l'inoculum**

La phase de croissance dans l'inoculum d'une culture bactérienne intervient dans l'activité de l'antibiotique. L'action de l'antibiotique est en effet liée à un certain état du métabolisme bactérien. Exemple pour l'étude de la sensibilité à la pénicilline, on utilise un inoculum en phase croissante.

- **Lecture**

Le temps au bout duquel s'effectue la lecture de même que les procédés d'appréciation (optique ou photométrique) jouent un rôle important dans les tests de sensibilité.



**DEUXIEME PARTIE:
TRAVAIL EXPERIMENTAL**

OBJECTIF:

Confectionner de matrices à base d'hydroxyapatite mélangées d'antibiotiques capables d'entraîner une inhibition d'une culture bactérienne en milieu gélosé.

CHAPITRE I: MATERIEL ET METHODES

I.1 CADRE D'ETUDE

Cette étude a été réalisée au laboratoire de Physique Pharmaceutique de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar en collaboration avec :le Laboratoire National de Contrôle des Médicaments etle Laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec (HALD).

I.2 MATERIEL

I.2.1Appareillage et verrerie

Le matériel utilisé pour la synthèse de la poudre d'hydroxyapatite, la confection des matrices et la réalisation de l'antibiogramme est le suivant:

- Mortier et pilon en verre;
- Epprouvettes en verre pyrex 10ml, 100ml (Prolabo, Paris, France);
- Pipettes 1ml, 5ml, 10ml (Suprema, Prolabo, Paris, France);
- Pipette de précision Eppendorf 500µl;
- Balance Mettler H16;
- Étuve D135-I, Kowel;
- Fioles jaugées en verre pyrex 50ml, 100ml, 250ml, 500ml, 1000ml;
- Fiole de kitassato;
- Pompe à vide
- Thermomètre à mercure de -40° à 250 °C (Prolabo, Paris, France);
- Agitateur magnétique chauffant (Fisher Scientific USA);

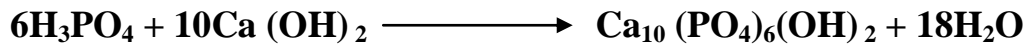
- Erlenmeyer en verre pyrex (Prolabo, Paris, France);
- Burette Aspin, 50/0,1cm³;
- Four Volca 33-55 (Prolabo, Paris, France);
- Fiole à vide en verre pyrex (Prolabo, Paris, France);
- Tubes à essai 16 x 150 (Deltalabo, Barcelone, Espagne);
- Papiers en aluminium;
- Entonnoirs de Buchner en porcelaine (Prolabo, Paris, France);
- Papiers filtres Whatman;
- Bécher en plastique de 250ml;
- Mortier et pilon en porcelaine;
- Bécher en verre de 150ml;
- Agitateur magnétique chauffant (Fisher Scientific USA);
- Presse hydraulique carver 4350.L numserie :4350-620;
- Moule à pastille;
- Balance Sartorius LA23OS;
- Spatule;
- Boîtes de pétri en matière plastique (Muller Hinton);
- Ecouvillons stériles;
- Eau physiologique stérile;
- Pipettes pasteur;
- Bec bunsen;
- Etuve;
- Pince;
- tube à hémolyse.

I.2.2 Matières premières

- **Hydroxyapatite [33]**

La poudre d'hydroxyapatite est synthétisée au laboratoire de Physique Pharmaceutique de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar.

La préparation de l'hydroxyapatite a été réalisée par précipitation directe en ajoutant, sous agitation une solution d'acide phosphorique (H_3PO_4) 0,3M à raison de 25ml par minute à une suspension fraîchement préparée d'hydroxyde de calcium ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) 0,5M suivant la réaction (**figure 10**):



Le rapport Ca/P est de 1,66. La réaction s'effectue sous agitation continue à une température comprise entre 80° et 95°C, l'agitation et le chauffage sont maintenus pendant 20 minutes, ensuite on coupe le chauffage et on maintient l'agitation pendant 25 minutes. Après un repos de 24 heures, le produit est récupéré par filtration, puis mis à sécher dans une étuve en faisant monter la température de 40° à 80°C en 24 heures; la température est maintenue à 80°C pendant 5 heures.

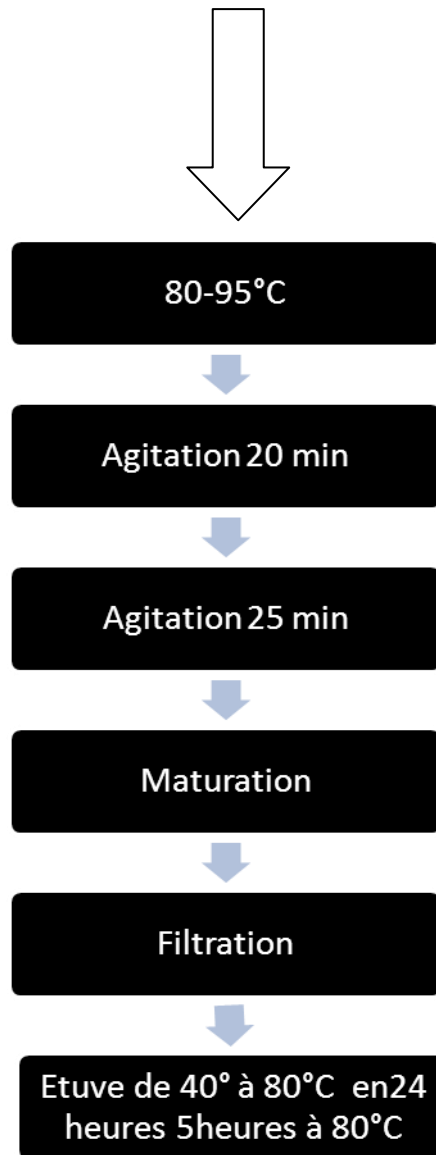
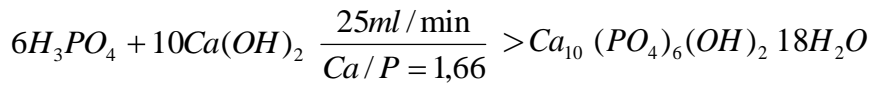


Figure 10 : Différentes étapes de la préparation de l'hydroxyapatite [33].

La poudre hydroxyapatite ainsi obtenue est passée sur un tamis équipé d'une grille de calibre 125 μm , ensuite recuite à 800°C pendant 3 heures au laboratoire de Sanofi Aventis. Cette poudre correspond à l'Hydroxyapatite recuite, elle a une surface spécifique de 75 m^2/g et est formée de grains de 100 à 200 nm de diamètre.

- **Les liants**

Les liants que nous avons utilisés pour la confection des matrices sont de deux natures:

- Les Eudragit® RS PO sous forme de poudre, utilisés en phase interne;
- Les Eudragit® RS100 utilisés en phase externe par l'intermédiaire du liquide de mouillage.

- **Antibiotique**

Ofloxacin USP de référence numéro OFX1010055 (date de fabrication octobre 2010, date d'expiration septembre 2014) nous a été fourni par la direction de la Pharmacie et des Laboratoires de Dakar (D.P.L).

- **La souche bactérienne**

La souche utilisée pour la réalisation de l'antibiogramme standard nous a été fournie par le Laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec (HALD). C'est une souche de référence *d'Escherichia coli ATCC 25922*.

I.3- METHODES DE PREPARATION

I.3.1- Préparation des matrices

Pour la confection des matrices nous avons utilisé le mélange suivant avec des proportions permettant d'obtenir des matrices de consistance convenable :

Hydroxyapatite recuite + Antibiotique + Liants.

- Hydroxyapatite X% ;
- Antibiotique Y% ;
- Eudragit® RS PO 20% ;
- Eudragit® RS 100 5% ;

Y varie de 0,5 à 3% ; **X** varie de 72 à 74,5%.

Le liquide de mouillage est préparé à partir des proportions suivantes:

Eudragit® RS 100 (11,6%) + Ethanol (85,5%) +butylphtalate (2,9%).

Le protocole pour élaborer les matrices à base d'antibiotique est décrit comme ci-dessous:

- Préparation du mélange hydroxyapatite+liant
 - Peser une quantité hydroxyapatite + Eudragit® RS PO pour un mélange total de 10 grammes;
 - Mélanger ces deux produits à l'aide d'un mortier en verre, jusqu'à obtention d'un mélange homogène;
 - Rajouter un volume (V) du liquide de mouillage contenant les Eudragit®RS 100 (liant en phase externe);
 - Triturer pendant 10 minutes jusqu'à obtention d'une masse homogène n'adhérant pas aux doigts et aux parois du mortier .
- Confection des matrices
 - Peser des quantités du mélange précédent + des quantités d'antibiotique pour un mélange total de 150mg puis homogénéisé (voir tableau I),
 - Ensuite placer le mélange dans la moule à pastille,
 - Appliquer une pression de $60,89 \cdot 10^3 \text{Pa}$ à l'aide d'une presse hydraulique.
 - A partir de ce protocole, 50 matrices de 150 mg de différentes charges, d'épaisseur 0,92 mm et de diamètre 13mm ont été confectionnées.

Ces matrices (disques d'antibiotiques) ont été utilisées pour la réalisation de l'antibiogramme standard.

Tableau I: La masse en gramme d'antibiotique et d'hydroxyapatite par matrice.

MATRICE DE 150,00 mg		Concentration pondérale en %
ANTIBIOTIQUE (mg)	HYROXYAPATITE (mg)	Matrices
0,75	149,25	0,5
1,50	148,50	1
2,25	147,75	1,5
3,00	147,00	2
3,75	146,25	2,5
4,50	145,50	3

A partir de ce protocole, des matrices de 150 mg de différentes charges ont été confectionnées.

I.3.2- Réalisation de l'antibiogramme standard

Elle comprend plusieurs étapes:

- **Préparation de l'inoculum**

L'inoculum à 0,5 Mac Farland a été préparé à partir d'une culture jeune (environ 18 heures) et pure de la souche de référence *d'Escherichia coli ATCC 25922*.

- **Ensemencement**

L'ensemencement a été réalisé par écouvillonnage sur milieu Muller Hinton (MH) à partir de l'inoculum de 0,5 Mac Farland.

- **Dépôt des matrices**

Annotation de la position des matrices d'antibiotiques sur le fond de la boîte suivi d'un dépôt des matrices d'antibiotiques puis d'une incubation pendant 18 heures.

Un disque standard de papier buvard (poids 11400 μg) imprégné d'antibiotique (5 μg d'ofloxacin) de concentration pondérale en % égal à 0,044% servant de contrôle a été déposé dans l'expérience 1.

- **Lecture**

La lecture a été effectuée 18heures de temps après.

Nous avons réalisé 6 expériences.

CHAPITRE II: RESULTATS ET COMMENTAIRES

II.1- RESULTATS

II.1.1: OBSERVATION MACROSCOPIQUE

La figure 11 montre les diamètres d'inhibition obtenus avec les différentes charges d'antibiotiques à l'expérience 1.

EXPERIENCE 1

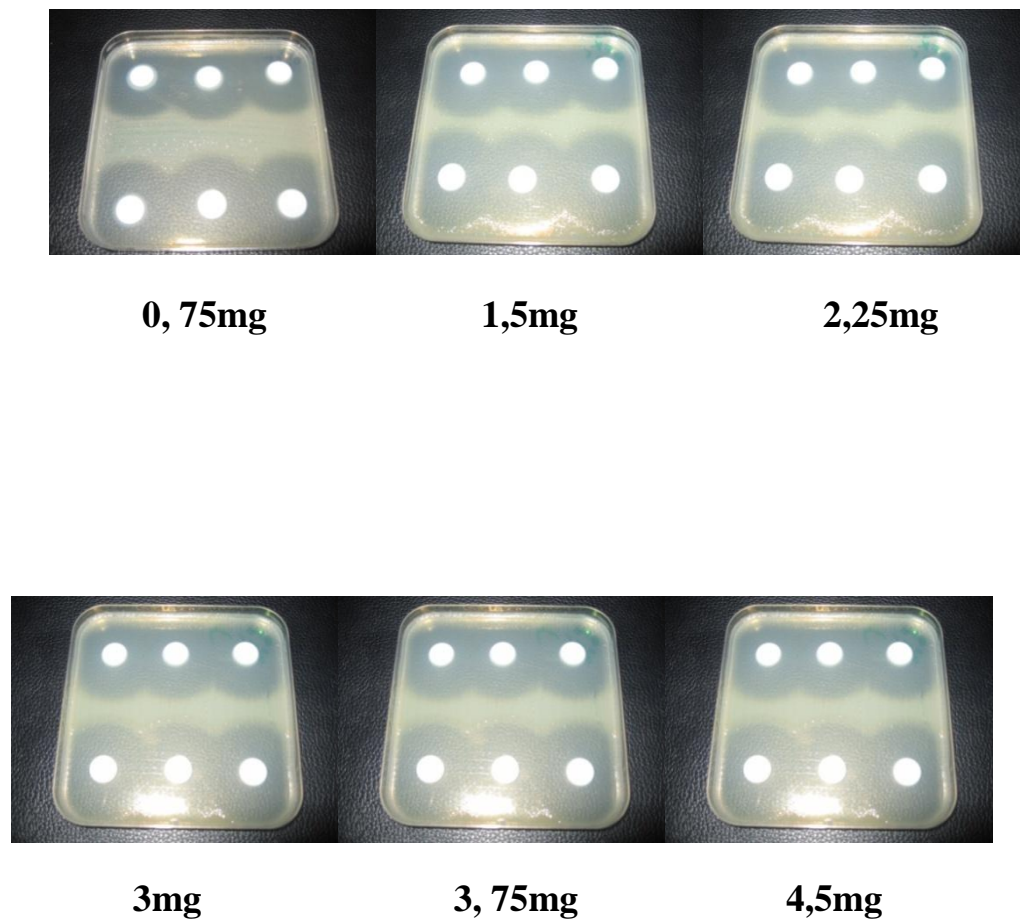


Figure11: Diamètres d'inhibition en fonction de la charge.

La figure 12 montre les diamètres d'inhibition obtenus avec les différentes charges d'antibiotiques à l'expérience 2.

EXPERIENCE 2

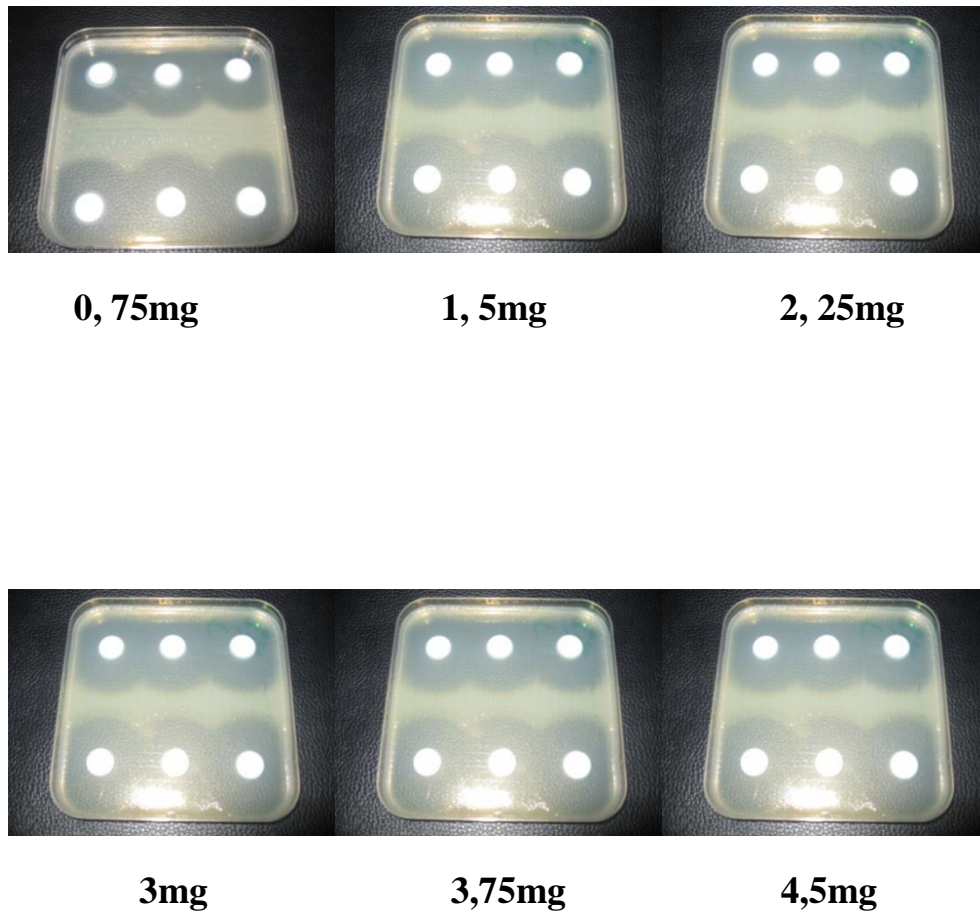


Figure12: Diamètres d'inhibition en fonction de la charge.

La figure 13 montre les diamètres d'inhibition obtenus avec les différentes charges d'antibiotiques à l'expérience 3.

EXPERIENCE 3



0,75mg

1,5mg

2,25mg



3 mg

3,75mg

4,5mg

Figure13: Diamètres d'inhibition en fonction de la charge.

La figure 14 montre les diamètres d'inhibition obtenus avec les différentes charges d'antibiotiques à l'expérience 4.

EXPERIENCE 4

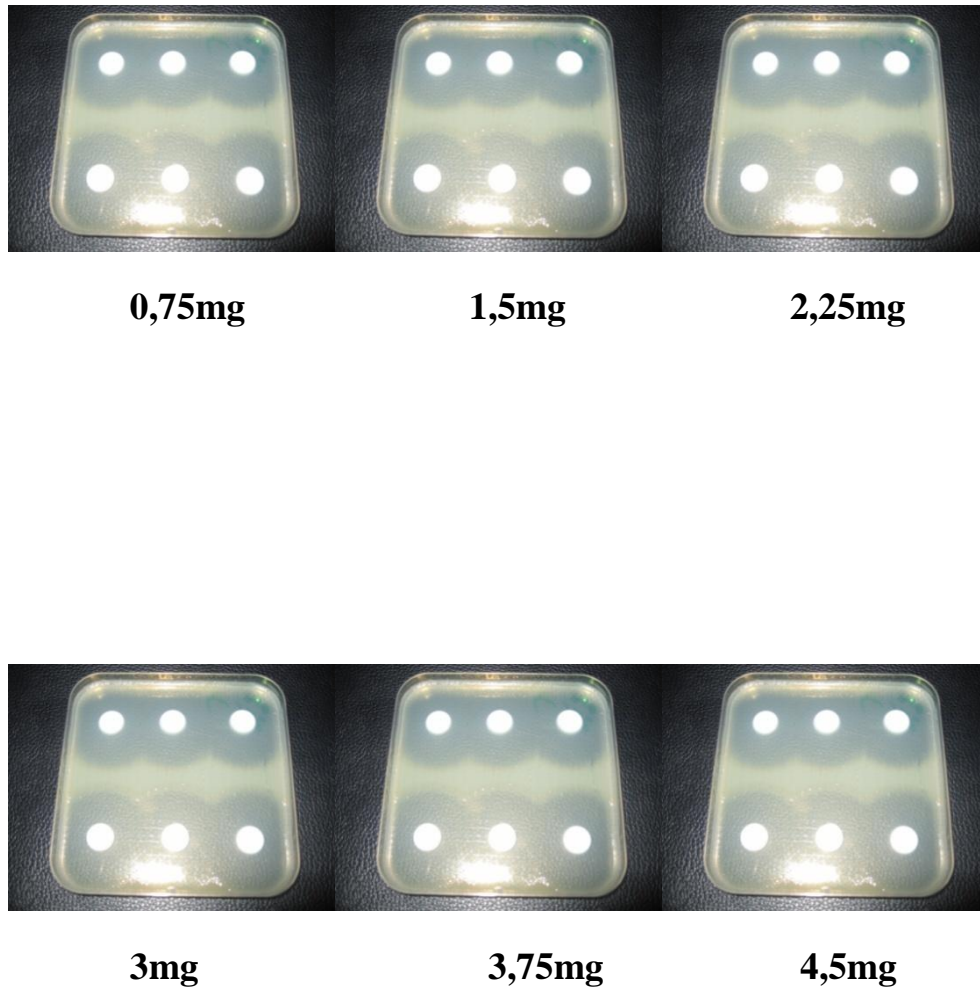


Figure14: Diamètres d'inhibition en fonction de la charge.

La figure 15 montre les diamètres d'inhibition obtenus avec les différentes charges d'antibiotiques à l'expérience 5

EXPERIENCE 5



0,75mg

1,5mg

2,25mg



3mg

3,75mg

4,5mg

Figure15: Diamètres d'inhibition en fonction de la charge.

La figure 16 montre les diamètres d'inhibition obtenus avec les différentes charges d'antibiotiques à l'expérience 6.

EXPERIENCE 6

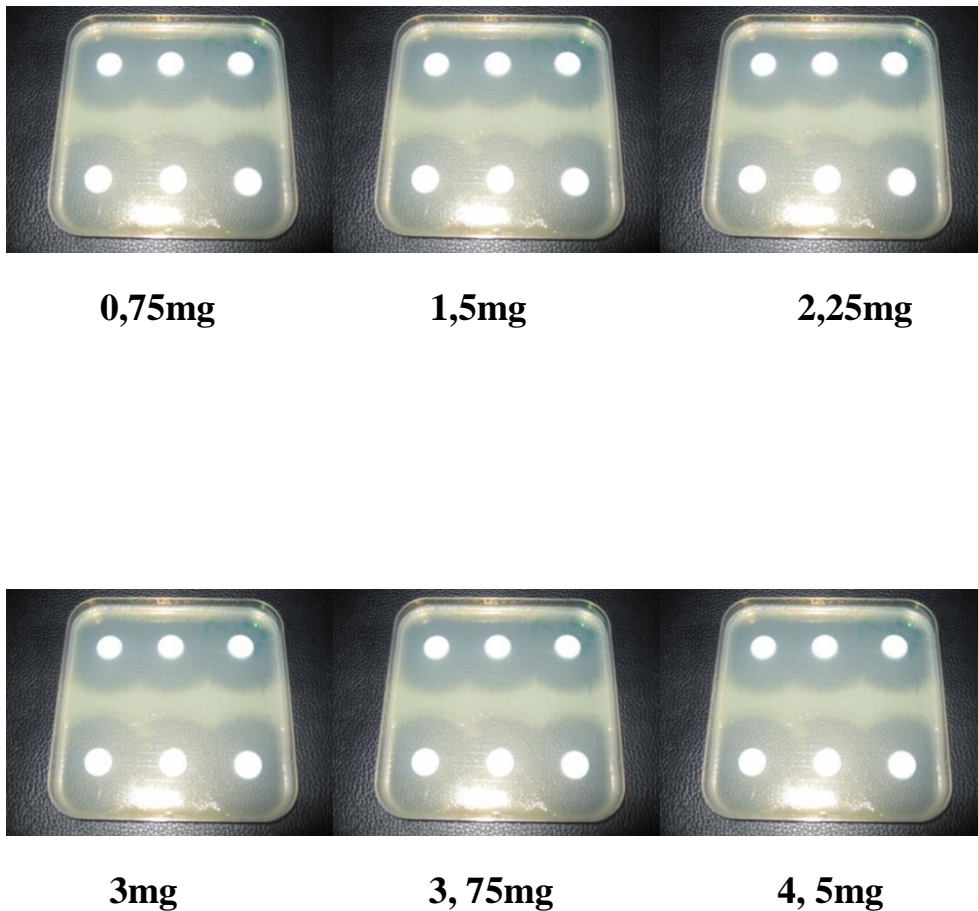


Figure16: Diamètres d'inhibition en fonction de la charge.

Après incubation du milieu de culture (18 heures à 37°C). On constate que chaque matrice est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne.

II.1.2 Résultats des diamètres d'inhibition

Avec le disque de contrôle nous avons obtenu un diamètre d'inhibition de 30mm.

Les diamètres reportés dans le tableau II ci-dessous correspondent à la moyenne des diamètres d'inhibition obtenus pour chaque charge initiale en antibiotique de l'expérience 1 à 6.

Tableau II: Résultats de la sensibilité de la souche *d'Escherichia coli* ATCC 25922 à l'ofloxacin en fonction des charges.

Charge en mg	Exp1 Diamètre en mm	Exp 2 Diamètre en mm	Exp 3 Diamètre en mm	Exp 4 Diamètre en mm	Exp 5 Diamètre en mm	Exp 6 Diamètre en mm
0.75	43±1,581	43±1,581	43±1,581	43±1,581	42±1,414	42±1,414
1.5	44±0,707	45±0,707	45±0,707	46±1,414	42±1,414	42±1,414
2.25	46±1,414	46±1,414	46±1,414	46±1,414	46±1,414	46±1,414
3	46±1,414	46±1,414	46±1,414	46±1,414	47±0,707	47±0,707
3.75	46±1,414	46±1,414	46±1,414	46±1,414	46±1,414	46±1,414
4.5	46±1,414	46±1,414	46±1,414	46±1,414	46±1,414	46±1,414

Les figures 17à 22 sont les représentations graphiques des expériences de 1à6

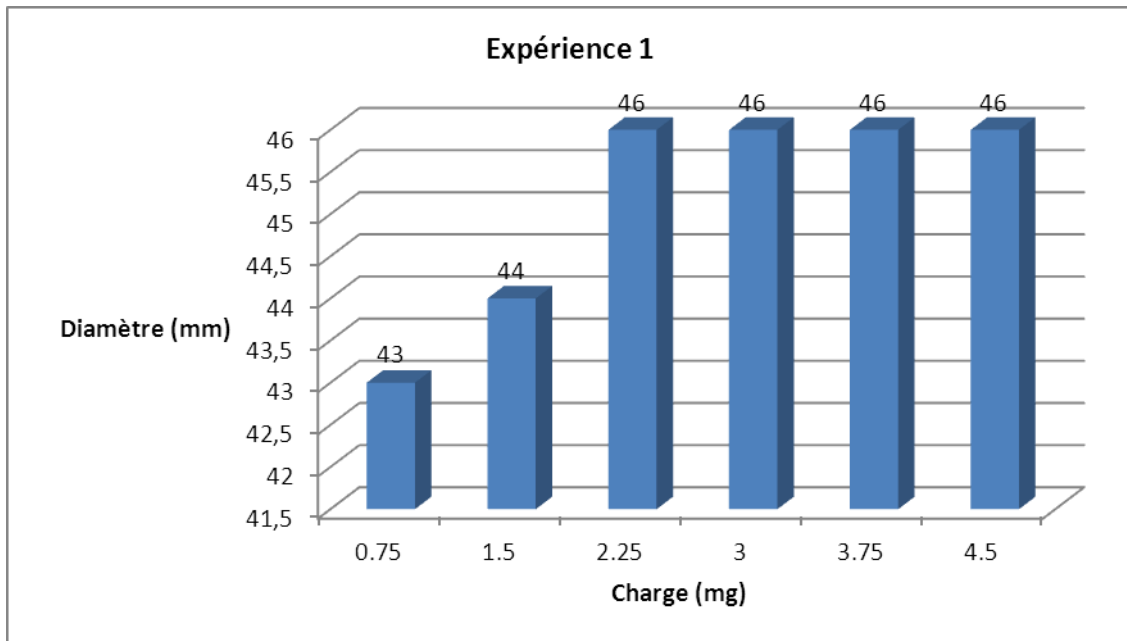


Figure 17: La moyenne des diamètres d'inhibition en fonction de la charge

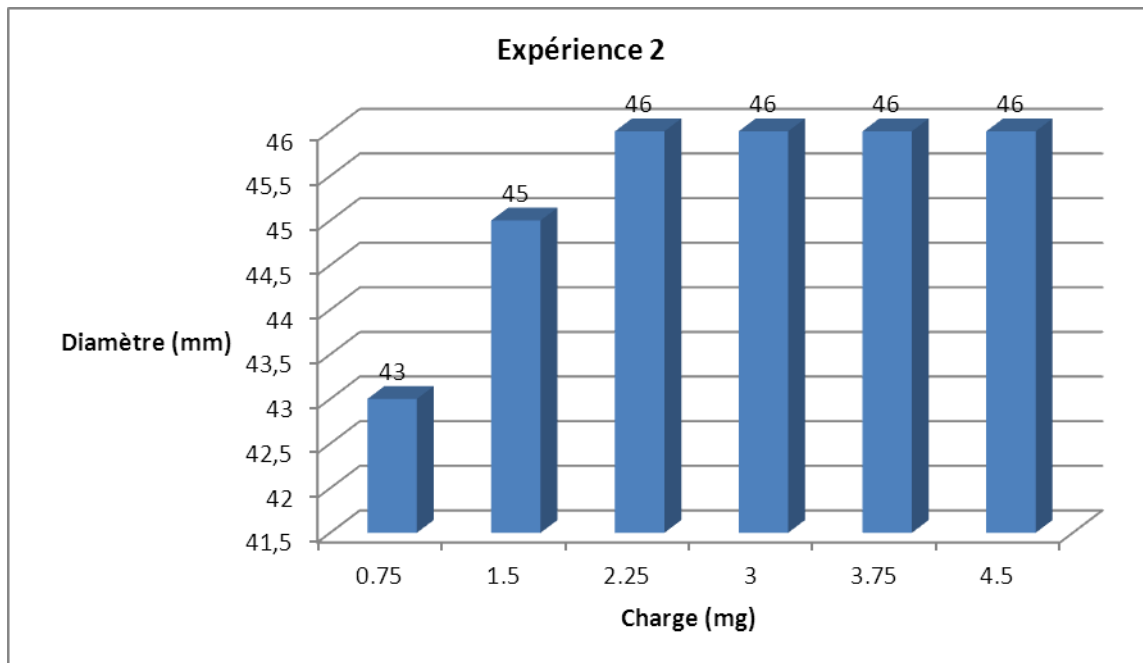


Figure 18: La moyenne des diamètres d'inhibition en fonction de la charge.

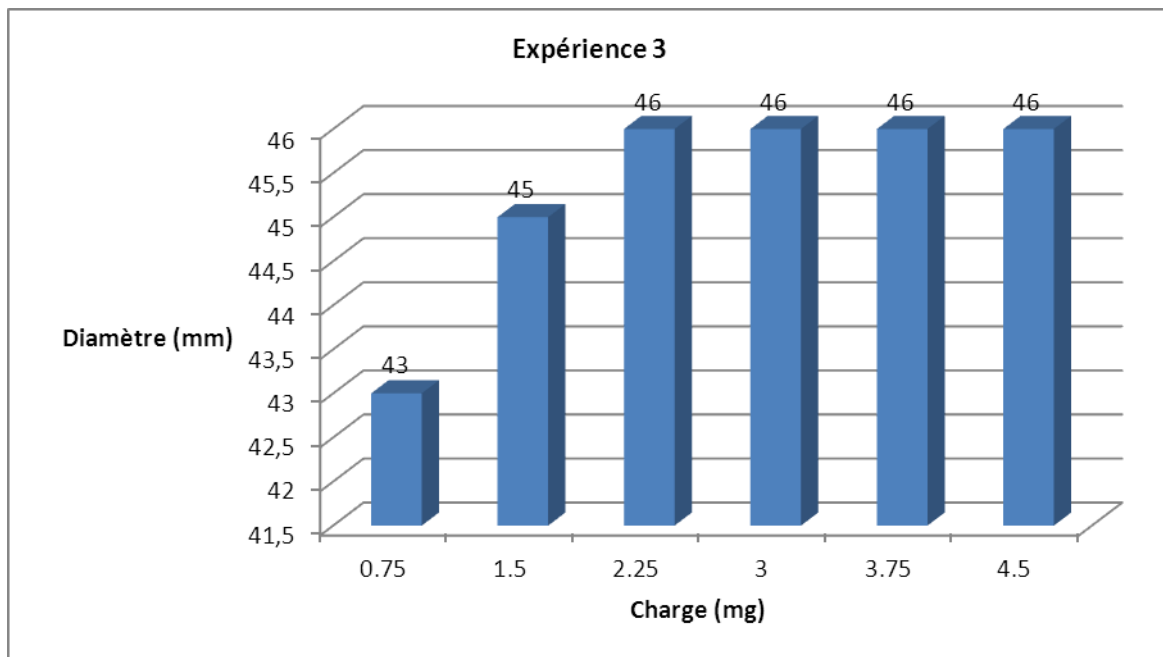


Figure 19: La moyenne des diamètres d'inhibition en fonction de la charge.

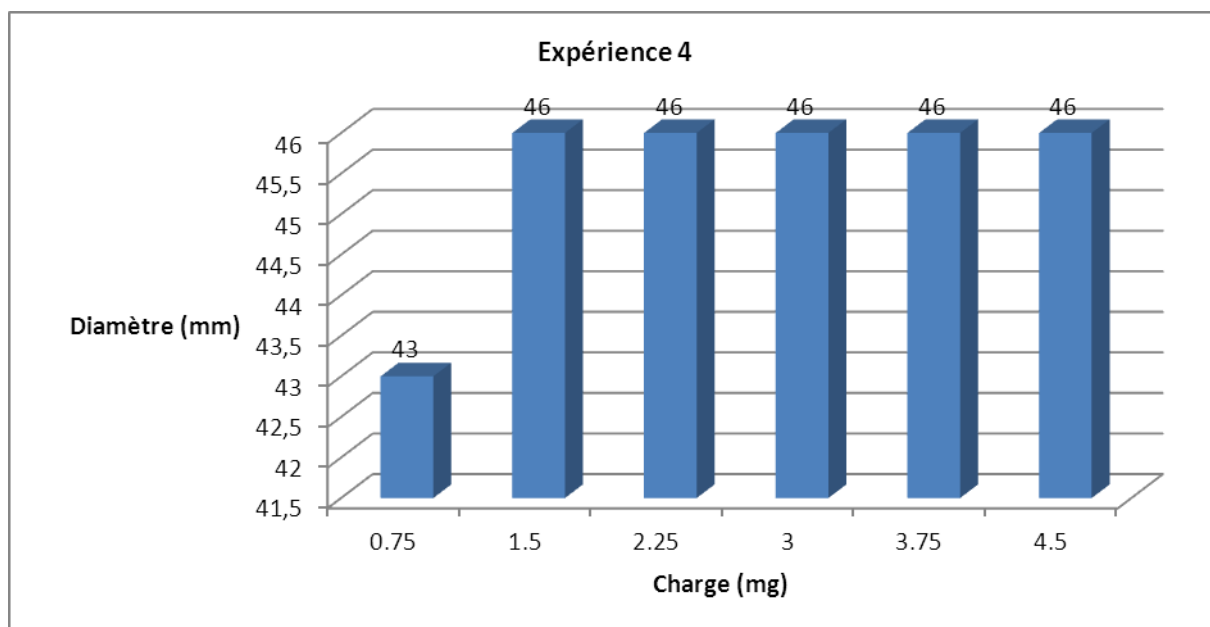


Figure 20: La moyenne des diamètres d'inhibition en fonction de la charge.

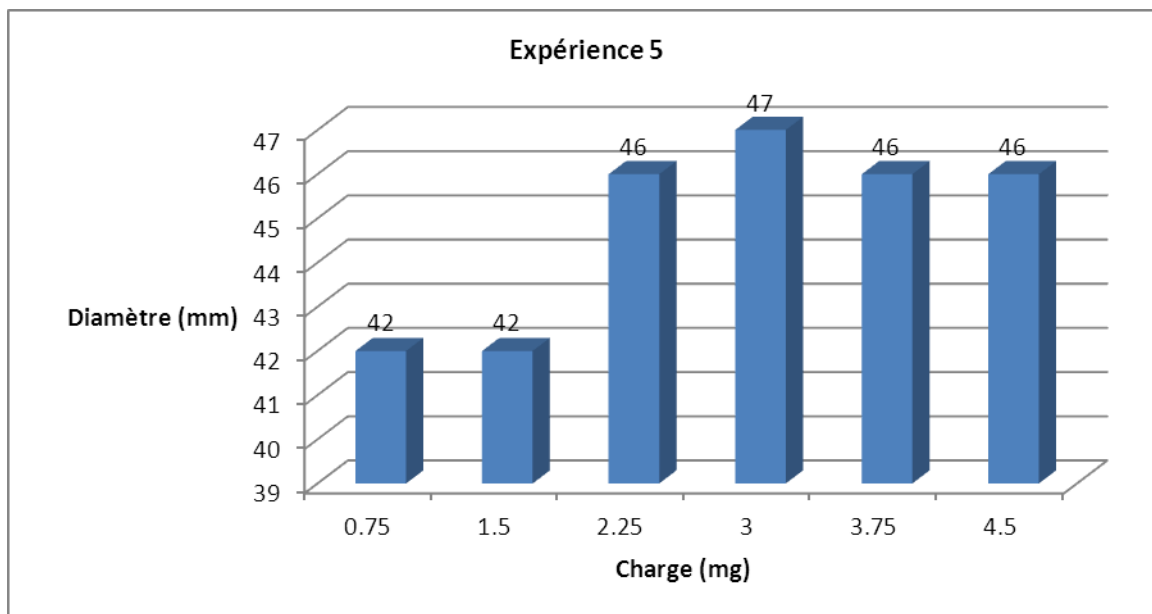


Figure 21: La moyenne des diamètres d'inhibition en fonction de la charge.

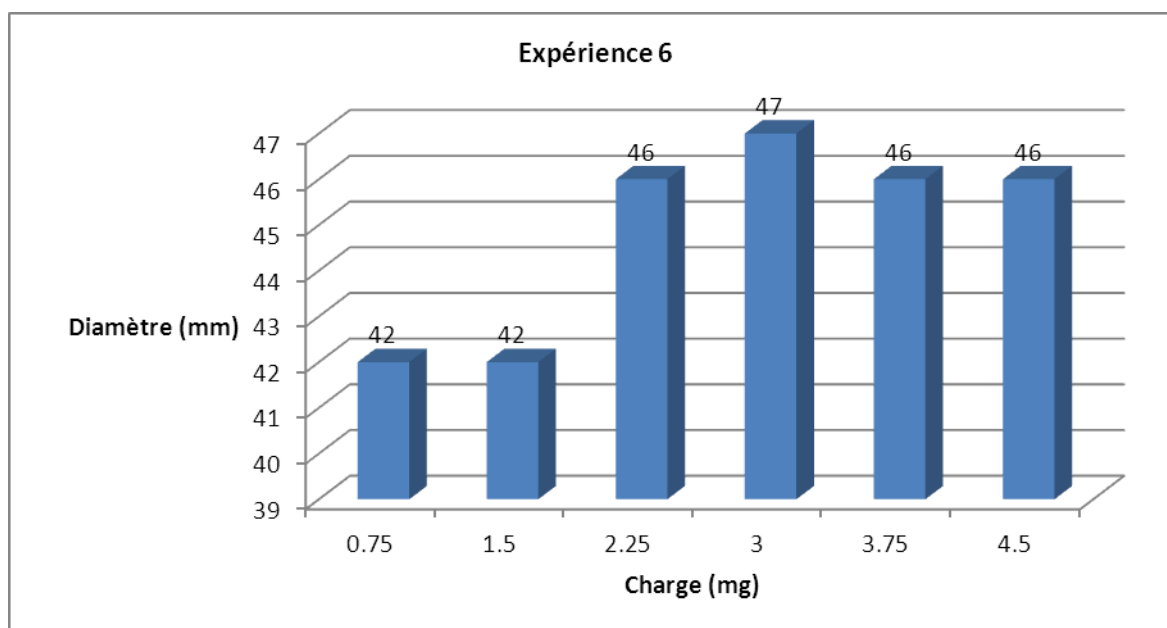


Figure 22: La moyenne des diamètres d'inhibition en fonction de la charge.

II.2 COMMENTAIRES

Il a bien été établi que la taille de l'inoculum bactérien est susceptible de modifier largement les résultats des tests de détermination de la sensibilité in vitro pour de nombreux antibiotiques et chez de nombreuses espèces bactériennes [53]. L'effet inoculum est défini comme une augmentation significative de la résistance à un antibiotique, parallèle à l'augmentation de l'inoculum bactérien. Pour remédier à cela un inoculum de 0,5 Mac Farland a été utilisé pour nos travaux.

Nous avons observé avec le disque à papier buvard un diamètre d'inhibition de 30mm; suffisant pour confirmer la sensibilité de la souche d'*Escherichia coli ATCC 25922*.

Ainsi l'analyse de nos résultats montre une libération de tous les lots avec des diamètres d'inhibition très satisfaisants allant de **42 à 47 mm**.

Le plus grand diamètre d'inhibition (**47 mm**) est observé avec le lot de **3 mg** aux expériences **5 et 6**.

Pour les lots **2,25; 3,75 et 4,50 mg**, nous observons des diamètres d'inhibition identiques égales à **46 mm**.

En fonction de la charge, nous observons que pour les matrices chargées à **0,75mg**, les diamètres d'inhibitions obtenus (**42-43mm**) sont sensiblement égaux à ceux observés avec les matrices de charges élevées (**46-47 mm**). En effet les matrices faiblement chargées libèrent fortement le principe actif et les matrices fortement chargées mettent à la disposition de la gélose une importante quantité d'antibiotique au niveau de la surface de contact ce qui explique le même comportement pendant l'étude.

Les matrices chargées à faibles quantités entraînent une forte inhibition du fait qu'elles libèrent plus vite dans les 18 heures par rapport aux autres matrices.

Des résultats similaires ont été observés avec DIOUF[9] et SY[10] qui ont montré que des matrices à base d'hydroxyapatite chargées à faibles quantités de principe actif en étude in vitro dans un solvant liquide, se vidaient beaucoup plus rapidement que ceux chargés en quantités importantes et dépend de la concentration initiale résiduelle en principe actif.

Sur les figures (17, 18, 19, 20, 21 et 22), nous constatons qu'à partir des matrices chargées à **2,25 mg**, les diamètres d'inhibition n'augmentent plus en fonction de la charge initiale en antibiotique et ne dépassent pas **47 mm**.

En effet, ces matrices présentent les mêmes profils de libération qui sont linéaires en fonction du temps. Nos résultats collaborent avec ceux de DIOUF [9] qui a montré que le profil de libération de l'acide Niflumique en milieu liquide à partir de systèmes à base hydroxyapatite est linéaire et suit une cinétique du premier ordre. Nous pouvons évoquer un phénomène de limite de libération de l'antibiotique dans le milieu après les 24 heures d'incubation.

En comparant nos résultats à ceux obtenus par Fall[54] et BASSOUM[55] qui ont travaillé sur la même thématique utilisant des antibiotiques de la famille des bêtalactamines, nous observons pour nos matrices des diamètres d'inhibition plus importants.

En effet, les diamètres d'inhibition observés conférant à la souche testée « la notion de souche sensible », peuvent être dus à la nature de l'antibiotique qui est une quinolone de deuxième génération. Les fluoroquinolones ont pour cible principale l'ADN gyrase et les topoisomérases IV, qui jouent un rôle important dans le mécanisme d'enroulement et de déroulement de l'ADN bicaténaire au moment de la réplication bactérienne entraînant ainsi un effet bactéricide rapide or les bêtalactamines ont un effet bactériostatique.



Les substances pharmacologiques administrées par voie orale ou parentérale présentent souvent une demi-vie trop courte et des risques de toxicité générale pour atteindre l'effet recherché au niveau du site d'action.

Pour pallier ces inconvénients, se sont développés des systèmes de délivrance de principes actifs, appelés Drug Delivery Systems (DDS). Le principe de ces DDS repose sur le fait qu'ils sont en mesure de délivrer les substances pharmacologiquement actives in situ, de façon prolongée, régulière, en quantité suffisante et non toxique.

Des études in vitro ont démontré la propriété de l'hydroxyapatite comme support de divers agents actifs tels que les antibiotiques.

Ainsi, nous nous sommes donné pour objectif de confectionner des matrices à base d'hydroxyapatite mélangées d'antibiotiques capables d'entraîner une inhibition d'une culture bactérienne en milieu gélosé.

La poudre d'hydroxyapatite est obtenue par une réaction de précipitation entre l'hydroxyde de calcium et l'acide orthophosphorique avec un rapport Ca/P =1,66 entre 80 et 95 °C. Après filtration et séchage à l'étuve à 80°C pendant 24 heures, et recuite à 800°C pendant 3heures, cette poudre correspond à l'hydroxyapatite recuite formée de grains de 100 à 200nm de diamètre avec une surface spécifique de 75 m²/g.

Cette poudre dépourvue d'impuretés est identique à l'hydroxyapatite synthétique de référence.

Nous avons aussi utilisé comme liants les Eudragit® RSPO sous forme de poudre en phase interne et les Eudragit® RS100 utilisés en phase externe par l'intermédiaire d'un liquide de mouillage. Ce mélange est constitué d'Eudragit® RS100 + Butylphtalate + Ethanol.

Pour la confection des matrices nous avons utilisé le mélange hydroxyapatite+antibiotique+liant avec des proportions permettant d'obtenir des matrices de consistance convenable

A partir de ce protocole, des matrices de poids 150 mg de différentes charges en antibiotiques (**0,75; 1,50; 2,25; 3,00; 3,75 et 4,50 mg**) ont été confectionnées pour la réalisation de l'antibiogramme standard.

L'inoculum de 0,5 Mac Farland a été préparé à partir d'une culture jeune (environs 18 heures) de la souche de référence d'*Escherichia coli ATCC 25922* puis ensemercer par écouvillonnage sur milieu Mueller Hinton (MH), suivi d'un dépôt des matrices d'antibiotiques puis incubé pendant 18 heures à l'étuve.

La lecture après incubation nous a permis d'obtenir nos résultats et l'analyse de ces résultats a montré une libération de tous les lots avec des diamètres d'inhibition très satisfaisants allant de **42 à 47 mm**.

Le plus grand diamètre d'inhibition (**47 mm**) est observé avec le lot de **3 mg** aux expériences **5 et 6**.

Pour les lots **2,25; 3,75 et 4,50 mg**, nous observons des diamètres d'inhibition identiques égales à **46 mm**.

En fonction de la charge, nous observons que pour les matrices chargées à **0,75mg**, les diamètres d'inhibitions obtenus (**42-43 mm**) sont sensiblement égaux à ceux observés avec les matrices de charges élevées (**46-47mm**).

Cette absence de différence des diamètres d'inhibition peut s'expliquer par le fait que les matrices chargées à faibles quantités entraînent une forte inhibition du fait qu'elles libèrent plus vite le principe actif dans les 18 heures par rapport aux autres matrices.

Des résultats similaires ont été observés avec DIOUF[9] et SY[10] qui ont montré que des matrices à base d'hydroxyapatite chargées à faibles quantités de principe actif en étude in vitro dans un solvant liquide, se vidaient beaucoup plus rapidement que ceux chargés en quantités importantes et dépend de la concentration initiale résiduelle en principe actif.

Nous constatons qu'à partir des matrices chargées à **2,25 mg**, les diamètres d'inhibition n'augmentent plus en fonction de la charge en antibiotique et ne dépassent pas **47 mm**. Nous pouvons évoquer un phénomène de limite de libération de l'antibiotique dans le milieu.

Les diamètres d'inhibition observés conférant à la souche testée « la notion de souche sensible », peuvent être dus à la nature de l'antibiotique qui est une quinolone de deuxième génération. En effet, les fluoroquinolones ont pour cible principale l'ADN gyrase et les topoisomérases IV, qui jouent un rôle important dans le mécanisme d'enroulement et de déroulement de l'ADN bicaténaire au moment de la réplication bactérienne entraînant ainsi un effet bactéricide rapide.



REFERENCES

1-SOUMBOUNDOU M.

Systèmes hydroxyapatite/polymères pour la libération contrôlée de l'amoxicilline.

These pharm. Dakar, 2009, N°86.

2- FORSGREN J., MIHRANYAN A., and al.

In vivo Evaluation of functionalized Biomimetic Hydroxyapatite for local Delivery of active Agents.

Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, 2011, 2, p 150-155.

3-.LEGEROS R. Z., LEGEROS J.P., and KOKUBO T.

Bioceramics and their clinical Applications.

Woodhead Publishing Limited, Sawston, 2008.

4- BROHEDE U., FORSGREN J., and al.

Multifunctional Implant Coating Providing Possibilities for Fast Antibiotics Loading with Subsequent slow Release.

Journal of Materials Science- Materials in Medicine, 2009, 20, 9, p1859.

5- [http://microbiologie.univ-tours.fr/ue libre antibiotiques](http://microbiologie.univ-tours.fr/ue_libre_antibiotiques).

Consulté le 29-01-2013.

6-DEJON J.

Société francophone de biomatériaux dentaire.

Les céramiques 2009-2010.27 p 5.

7- <http://fr.wikipedia.org/wiki/C%C3%A9ramique-technique>.

Consulté le 15 .06 .2012 à 10 heures.

8- POUJADE J.M., ZERBIB C., SERRE D.

Céramique Dentaire

EMC-Dentisterie, 2004, 1, p 101-117.

9 DIOUF L.A.D.

Systèmes hydroxyapatite/polymères pour la libération contrôlée du paracétamol et de l'acide niflumique.

These Pharm. Dakar, 2004, n° 71.

10- SY P.M

Systèmes hydroxyapatite /polymères pour la libération contrôlée de l'ibuprofène.

Thèse Pharm. Dakar 2009 n°72.

11- MUSTER D.

Médicament de la douleur

Encyclochir (Paris, France) stomatologie, I, 22012G¹⁰ 4-1985, 8 p.

12-WOPENKA B., AND PASTERIS J. D.

A. mineralogical perspective on the apatite in bone.

Materials science and Engineering, 2005, 25 , 2, 31 p.

13- GAUTIER H., BILLON A., MERLE C., DACULSI G.

Les substituts osseux à bioactivité contrôlée: un vecteur pour la libération de principes actifs : Place des antibiotiques.

Antibiotiques ,Masson, Paris 2004; 6, p 120-127.

14 WANG F., GUO E., SONG E., and al.

Structure and properties of bone-like-nanohydroxyapatite/gelatin/ polyvinyl alcohol composites.

Advances in Bioscience and Biotechnology, 2010, 1, p 185-189.

15- PATRICIA C., PLINIO C. S., HELENA C. C.

Bone Remodeling, Biomaterials and Technological Applications: Revisiting Basic Concepts.

Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, 2011, 2, p 318-328.

16- MUSTER D.

Biomatériaux, et bio-matériels en chirurgie osseuse et dentaire.

Edition techniques Encyclo.Med .chir. (paris France), stomatologie et odontologie 22-014-F-15, 1993: 26 p

17-BEZZI G., CELOTTI G ., LANDI E.

A novel sol- gel technique for hydroxyapatite préparation.

Materiels chemistry and physics, 2003 ,78, p 816-824.

18- CHIN T.S., LAI L.S., CHU S.Y., CHUNGK.H., CHANG C.S.,LUI M.T.

Hydroxyapatite synthesized by a simplified hydrothermal method.

Ceramics International, 1997, 23, p 19-25.

19-RICHARD E.R., SUCHANEK L .W., BYRAPPA K., CHUN-WEICHEN

Solution synthesis of hydroxyapatite designer particulates.

Solid state Ionics, 2002, 151, p 393-402.

20- HOON KIN B., JU-JEAONG and al.

Hydroxyapatite Layers prepared by sol-gel assisted electrostatic spray deposition.

Ceramics International, 2007, 33, p 119-122.

21- KURIAKOSE T.N., KALKURA S.N., PALANICHMY M., and al.

Synthesis of Stoichiometric nanoCrystalline hydroxyapatite by ethanol –based sol-gel Technique at low temperature.

Journal of crystal growth, 2004, 263, p 517-523.

22-VARMA H.K., SURESH S., BABU.

Synthesis of calcium phosphate bioceramics by citrate gel pyrolysis method,
ceramics International, 2005, 31, p 109-114.

23-RAYNAUD S.,CHAMPION E.,BERNACHE-ASSOLAND.,THOMAS P.

Calcium phosphate apatite with variable ca/p atomic ratio I.Synthesis, chacterisation and thermal stability of pouders.

Biomaterials, 2002, 23, p 1065-1072.

24- KANNAN S., VENTURA J.M.G.,LEMOS A.F., and al.

Effect of Sodium addition on the preparation of hydroxyapatites, and biphasic ceramics.

International, 2008, 34, p 7-13.

25- Lin C., HUANG Y., SHEN W., CUI J.

Kinetics of hydroxyapatite precipitation at pH 10 to 11.

Biomaterials, 2001, 22, p 301-306.

26- Bella M., Roy.

Nature, 1974, 247, p 220-222.

27- YOSHIMARA M., SUJARIDWOROKUN P., and al.

Hydrothermal Conversion of calcite crystals to hydroxyapatite.

Materials Science and engineering , 2004, 24, p 521-525.

28- OMARI M., ONOKI T., HASHIDA T., OKUBO A., MMAKAMI Y.

Low temperature synthesis of hydroxyapatite from $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ based on effect of the spark plasma system (SPS).

Ceramics international, 2006, 32, p 617-621.

29-KINW.,SEITO F.

MechanochemicalSynthems of hydroxyapatite from constituent powder Mixtures By dry Grinding.

Journal of chemical Engineering of Japan, 2000, 3, p 768-772.

30-RODRIGUEZ E., FUENTES A.F., and al.

Structural, Microstructural and vibrational characterization of apatite type lanthanum Silicates prepared by mechanical milling.

Journal of Solid state chemistry, 2006, 179, p 495-504.

31- NASSER Y., MOSTAFA.

Characterization, Thermal stability and Sintering of hydroxyapatite powders prepared by different routes.

Materials Chemistry and physics, 2005, 94, p 333- 34.

32- JCPDS

International center for diffraction.

Version 2.16,1995, N°9-432.

33- DIARRA M., POURRO Y.G., MUSTER D.

Development and evaluation of an active substance controlled-release device for use in the oral cavity.

Rev StomatolChirMaxillofac, 1998; 99, 1, p 94-8.

34-NARASAJU T.S.B., PHEBE D.E.

Some Physico-chemical aspect of hydroxyapatite

J.MAT. SC, 1996, 31, p 1-21.

35- DIARRA M., POURROY G., BOYMOND C., MUSTER D.

Fluoride controlled release tablets for intrabuccal use,

Biomaterials, 2003, 24, p 1293-1300.

36- SHIKINAMI Y., OKUNO M.

Bioresorbable devices made of forged composites of hydroxyapatite (HA) particles and poly -L- lactide (PLLA):PartI.Basic characteristics

Biomaterials, 1999, 20, p 859-877.

37-DEVILLE S., SAIZ E.,TOMSIA A.P.

Freeze Casting of hydroxyapatite Scaffolds for bone tissue engineering,
Biomaterials, 2006, 27, p 5480-5489.

38- WARREN S.M.,FONGK.D., NACAMULI R.P., SONG H.M.

Biomatériaux de réparation de la peau et de l'os en chirurgie plastique.
EMC.chirurgie, 2004, 1, p 583-591.

39-ZIMA A., PASZKIEWIEZ Z., SIEK D.

Study on the new bone cement based on calcium sulfate and Mg, CO₃ hydroxyapatite.
Ceramics international, 2012, 38, p 4935-4942.

40- BENMOUSSA A., DELAURENT C., LACOUT J.L.,LORSEAUD.

Determination of cholecalciferol and related substances by calcium phosphate hydroxyapatite and calcium phosphate fluoro apatite high-performance chromatography.
Journal of chromatography A, 1996, 731, p 153-160.

41- SCHRÖDER E., JÖNSSON T., andPOOLE L.

Hydroxyapatite chromatography: altering the phosphate –dependent elution profile of protein as a function of pH.
Analytical biochemistry, 2003, 313, p 176-178.

42- SCHLATTERER B., BAEKER R., SCHLATTERER K.

Improved purification of beta-lactoglobulin from acid whey by means of ceramic hydroxyapatite chromatography with sodium fluoride as a displacer.
Journal of chromatography B, 2004, 807, p 223-228.

43- DENIS F., PLOY M.C., et al.

Bactériologie Médical: techniques usuelles

Elsevier Masson, 2007, ISBN: 978-2-294-01172-6, 573 p.

44--DUVAL J.

Classification et mécanisme d'action des agents antibactériens.

EDS bactériologie médicale, Paris, Médecine-sciences, Flammarion, 1989, p 273-296.

45- COURVALIN P., GOLDSTEIN F., PHELIPPON A., SIROT S.

Fiches techniques d'étude pratique des antibiotiques n°41ère Edition, Paris, mpc vit, 1985, p 177-188.

46-www.microbe-edu.org/étudiant/antibio4 consulté le 08-06-2012 à 09h

47- SAGNE M.F.G.

Modélisation de l'étude in vitro de la sensibilité des staphylocoques aux antibiotiques.

Thèse pharm., Dakar, 2013, n°07.

48- Comité de l'antibiogramme de la société française microbiologie

Recommandations 2010.

49-ACAR T., SWIFT R., MCKIE J.

Sensibilité des bactéries aux antibiotiques: évaluation d'une méthode automatisée.

Path. Bio, 1978, 26, 2, p 137-144.

50- BAC (British Society of antimicrobial chemotherapy)

Disc diffusion method for Antimicrobial susceptibility Testing.

Disponible sur le site [http://www bsac.org.uk/](http://www.bsac.org.uk/). Consulté le 12/11/2012.

51-BERCHE P., GAELLARD J.L., SIMONET M.

Mesure de l'activité antibactérienne des antibiotiques.

Bactériologie: Bactéries des infections humaines Paris, Médecine-science, Flammarion 1988, 114, p 593-600.

52-Comité d'expertise de la standardisation biologique 1977.

1977 28^{ème} rapport série des rapports techniques n°610, OMS, Genève.

53-GARRABE E., FABRE R., HERNANDEZ E.

Antibiogramme par diffusion en gélose:

Essai de standardisation de l'inoculum par la méthode «presto ABG»

Revue française des laboratoires, 1998, n°307,8p.

54- FALL A.

Systèmes hydroxyapatite/polymères/cefadroxyle pour l'étude de la sensibilité de la souche *Escherichia coli* ATCC 25922 en milieu gélosé.

Thèse Pharm. Dakar 2013, n°45.

55-BASSOUM A.

Systèmes hydroxyapatite/polymères/cefuroxime pour l'étude de la sensibilité de la souche *Escherichia coli* ATCC 25922 en milieu gélosé.

Thèse Pharm. Dakar 2013, n°38.

Serment de Galien

Je jure en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

PERMIS D'IMPRIMER

Vu :

Le président du jury

Vu :

Le Doyen.....

Vu et Permis d'imprimer

Pour le recteur, le Président de l'assemblée d'Université Cheikh Anta Diop de Dakar et par
délégation

Le Doyen