



جامعة العربي بن مهدي أم البواقي

Université larbi ben mhidi oum el bouaghi

Dep. SNV قسم علوم الطبيعة والحياة

Matière: Pharmacologie toxicologie

مادة علم الصيدلة والسموم

Travaux pratique N° 1

Evaluation de l'effet scavenger par la méthode de DPPH

1- Réalisation du test :

On prépare une solution de DPPH à 10^{-2} M c'est-à-dire en diluant 20mg DPPH dans Environ 5 ml d'éthanol, la cuve de mesure devra contenir

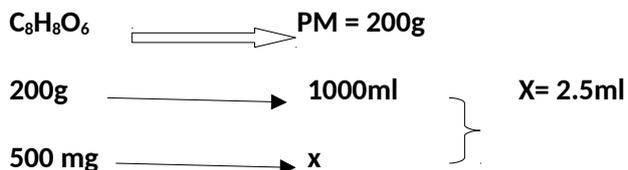
15 μ l de solution éthanolique de DPPH à 10^{-2} M.

1,5ml d'eau distillée ; ici on fait l'auto zéro du spectrophotomètre puis on ajoute

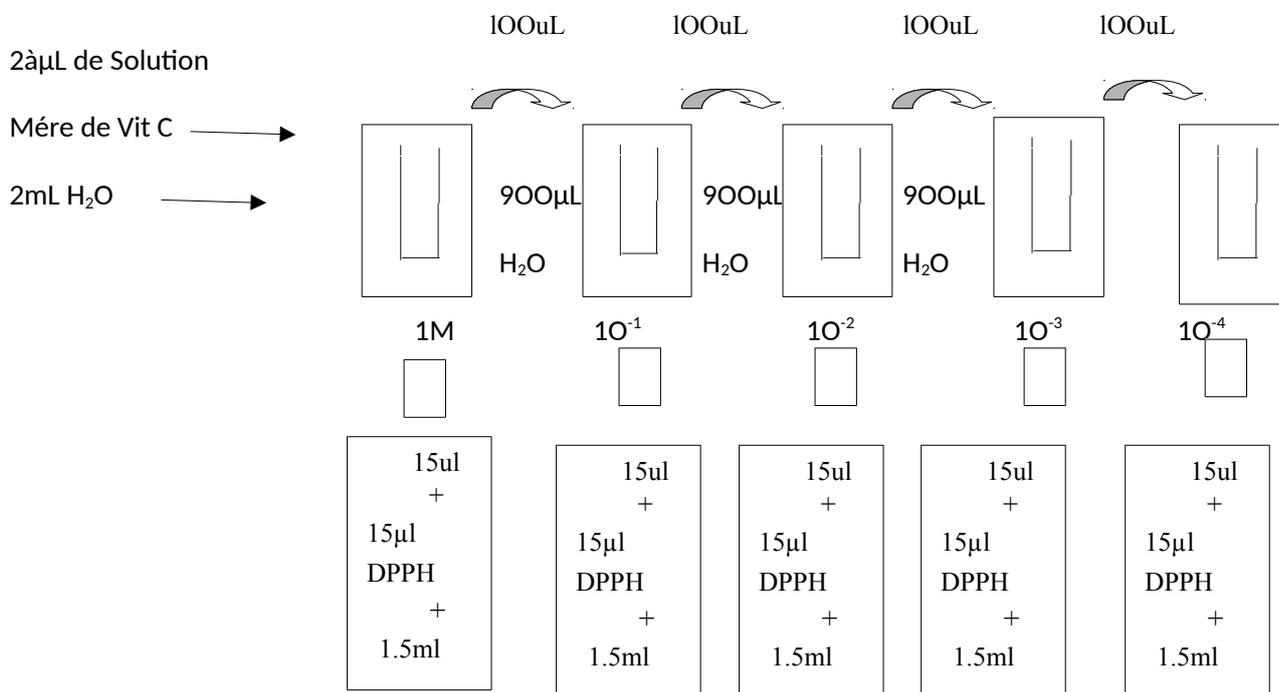
15 μ l de la molécule à tester.

On mesure la DO chaque 30 secondes pendant 5 minutes

La vitamine C



On procède à plusieurs dilutions de la solution mère de vitamine C selon le schéma suivant :



On mesure la DO par la spectrophotomètre a 515 nm de chaque tube.

Pour l'extrait on dispose une solution de 1g par mL

15 μ L + 15 μ L DPPH +1.5 mL H₂O

L'effet piégeur est déterminé en pourcentage de réduction en prenant le 100 % du contrôle selon la relation suivante :

$$\% \text{ de réduction} = \frac{A_C - A_E}{A_E} \times 100$$

A_C : Absorbance du contrôle après 5 mn

A_E : Absorbance de l'essai après 5mn.

Z.A



جامعة العربي بن مهدي أم البواقي

Université Larbi ben mhidi oum el bouaghi

Dep. SNV قسم علوم الطبيعة والحياة

Matière: Pharmacologie toxicologie

مادة علم الصيدلة والسموم

Travaux pratique N° 2

Réalisation d'un antibiogramme

I. Introduction :

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à

Un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique. Il sert également :

- À la surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne ;
- À l'identification bactérienne par la mise en évidence de résistances naturelles.

L'antibiogramme est la méthode analytique qui permet de définir *in vitro* la concentration minimal inhibitrice CMI d'une souche bactérienne vis-à-vis des divers antibiotiques.

Par définition (O.M.S.), la CMI est la plus faible concentration d'antibiotique capable de provoquer une inhibition complète de la croissance d'une bactérie donnée, appréciable à l'œil nu, après une période d'incubation donnée.

1. La méthode de diffusion ou des disques en milieu solide :

La technique consiste à étaler uniformément sur un milieu gélosé spécialement étudié généralement milieu Mueller-Hinton coule en boîte de pétri, un inoculum modéré de bactéries de telle sorte qu'après culture, on obtient des colonies isolées.

On inonde les boîtes avec 3 à 5 cm de suspension prélevée à la pipette Pasteur et on essaie de répartir la préparation en inclinant les boîtes dans toutes directions.

L'excès de suspension est ensuite respiré soigneusement. aussitôt après l'ensemencement, des disques de papiers buvard, rigoureusement standardisés, imprègnés d'une quantité calculée d'antibiotiques sont disposés à équidistance sur le milieu à l'aide d'une pince stérilisée, en les appuyant légèrement pour faciliter l'adhésion.

Les boîtes sont placées dans l'étuve à la température adéquate.

Durant cette incubation, l'antibiotique diffuse en déterminant un gradient de concentration inversement proportionnel à la distance de la source

L'inhibition se traduira par une zone circulaire stérile dont le diamètre sera fonction de la sensibilité ou de résistance du germe microbien

Trois catégories cliniques ont été retenues pour l'interprétation des tests de sensibilité *in vitro* :

Sensible(S), résistance(R) et intermédiaire (I)

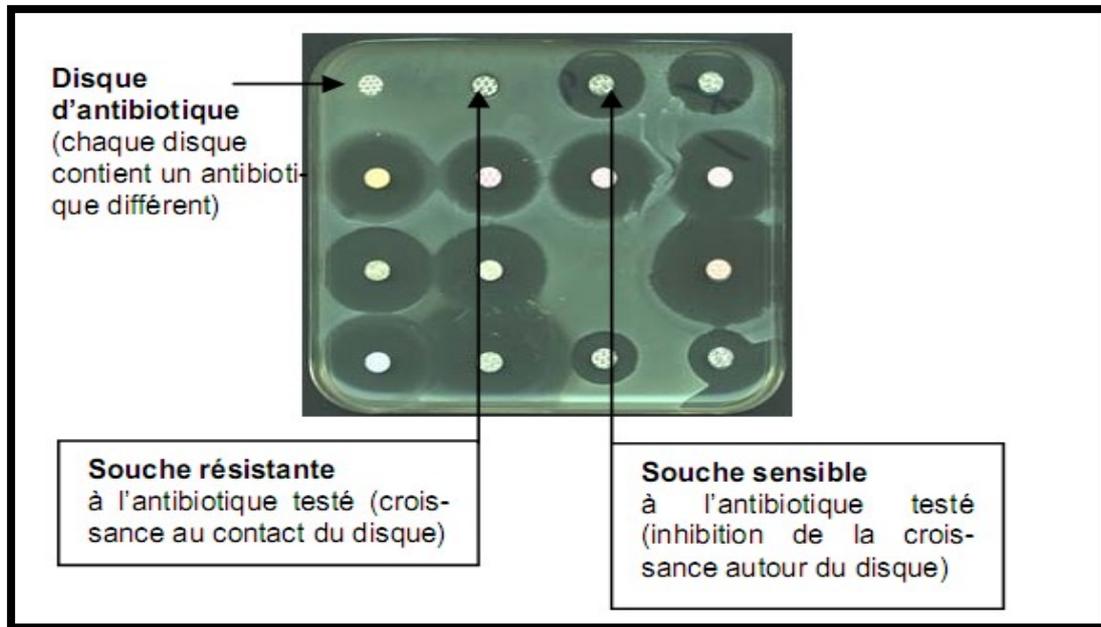


Figure 15 : Antibiogramme selon la méthode des disques ou de diffusion en milieu gélosé

Antibiotiques bactériostatiques :

CMB éloignée des CMI : $CMB > 32 \times CMI$

Les macrolides, tétracyclines, rifamycines, sulfamid

Antibiotiques bactéricides :

CMB proches des CMI : $CMB < 32 \times CMI$

Aminosides - β -lactamines-quinolones-glycopeptides

Limites de l'antibiogramme

• Limites techniques

La réalisation d'un antibiogramme est soumise au respect de conditions techniques qui sont parfois incomplètement et insuffisamment respectées.

Un antibiogramme doit obligatoirement être effectué sur une culture pure et identifiée. Cette dernière condition permet d'ajuster la densité de l'inoculum, de choisir judicieusement les

antibiotiques à tester et de pratiquer une lecture interprétative. Un antibiogramme réalisé de manière non standardisée et sur un mélange de germes non identifiés est dépourvu de sens.

Tout laboratoire devrait vérifier la validité de sa technique en testant, au moins une fois par mois, la sensibilité des souches de référence 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 techniques de l'antibiogramme ont été standardisées uniquement pour les bactéries cultivant rapidement sur milieux usuels. Lorsque la souche isolée ne rentre pas dans ce cadre, l'interprétation est parfois délicate :

Coté pratique :

- Préparation des disques :

- les disques sont fabriqués à partir de papier Waltman n°3 ou n1 (ou autre type de papier buvard), avec un diamètre de 5-6 mm, suivant le diamètre de l'emporte-pièce.
- ensuite ils sont mis dans une bite de Pétri (ou plus si nécessaire), et stérilisés à l'autoclave.
- chaque disque a été injecté à l'aide d'une micro pipette avec 10µl de l'antibiotique choisi.

-1 L'inoculum:

-À partir d'une culture pure jeune des bactéries à tester sur milieu d'isolement (ayant au maximum 24h), racler à l'aide d'une anse de platine ou d'une pipette pasteur scellée, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.

- décharger l'anse ou la pipette pasteur dans 2.5 ml d'eau physiologique stérile.
- bien homogénéiser la suspension bactérienne.
- l'ensemencement doit se faire en moins de 15 min après la préparation de l'inoculum.

-L'ensemencement:

- Le milieu de culture utilisé est Muller - Hinton, qui est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens.

-Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne (il évite la contamination du manipulateur et de la paillasse).

- l'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.

- frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.

- répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de Pétri de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.

-Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

- dans le cas de l'ensemencement de plusieurs boîtes de Pétri il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

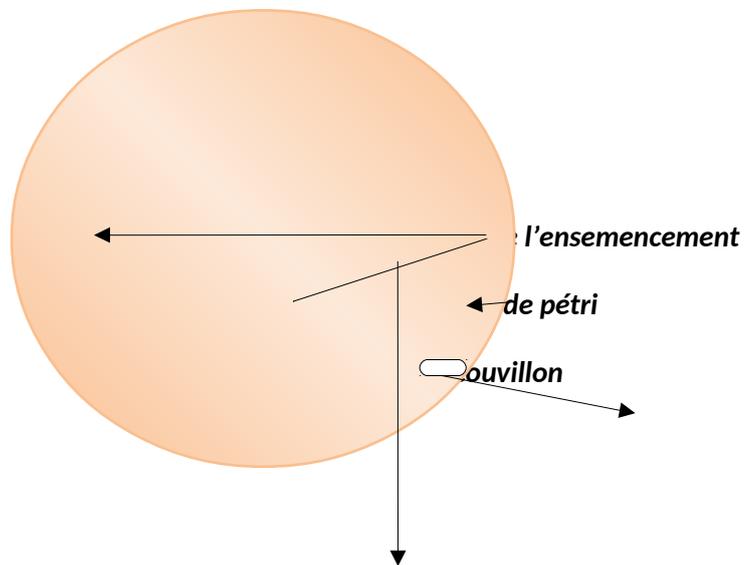


Figure : *Ensemencement par écouvillon.*

- une fois les géloses Muller - Hinton sont ensemencées, les disques imbibés de chaque antibiotique sont disposés sur la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérilisée près de bec bunsen.

Incubation et Lecture:

Pendant 18 à 24 heures à 37°C, pour toutes les boîtes, et à température ambiante (température de la chambre) pour les boîtes qui contiennent des disques imbibés de 10µl de l'antibiotique .

Les résultats sont observés le lendemain des expériences, en mesurant les diamètres des halos clairs tout autour des disques, ou zones d'inhibition.

