

Université de Limoges

Faculté de Pharmacie

Année 1993

n° 330

**ACTIVITE BACTERICIDE DES
ANTIBIOTIQUES VIS A VIS DE SOUCHES DE
PASTEURELLA MULTOCIDA ISOLEES
CHEZ L'HOMME**

THESE

pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie
obtenu après soutenance du

MEMOIRE

du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale

présenté et soutenu publiquement
le 21 juin 1993 à Limoges

par

Cécile CALVES GASTINE
née le 05 septembre 1964 à Brest

JURY

Monsieur le Professeur NICOLAS
Monsieur le Professeur AVRIL
Monsieur le Professeur DENIS
Mademoiselle le Professeur TIXIER
Mademoiselle MOUNIER, Maître de Conférences

Président
Juge
Juge
Juge
Juge



U N I V E R S I T E D E L I M O G E S

F A C U L T E D E P H A R M A C I E

- DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur **RABY**
- ASSESSEURS : Monsieur le Professeur **GHESTEM** (1er Assesseur)
 Monsieur **DREYFUSS**, Maître de Conférences (2ème Assesseur)

PERSONNEL ENSEIGNANT

* PROFESSEUR DES UNIVERSITES

BENEYTOUT Jean-Louis	Biochimie
BERNARD Michel	Physique-Biophysique
BOSGIRAUD Claudine	Microbiologie
BROSSARD Claude	Pharmacotechnie
BUXERAUD Jacques	Chimie Organique, Chimie Thérapeutique
CHULIA Albert	Pharmacognosie
CHULIA Dominique	Pharmacotechnie
DELAGE Christiane	Chimie Générale et Minérale
GALEN François Xavier	Physiologie
GHESTEM Axel	Botanique et Cryptogamie
GUICHARD Claude	Toxicologie
HABRIOUX Gérard	Biochimie
LEFORT DES YLOUSES Daniel	Pharmacie galénique
NICOLAS Jean Albert	Bactériologie et Virologie, Parasitologie
LOUDART Nicole	Pharmacodynamie
PENICAUT Bernard	Chimie Analytique et Bromatologie
RABY Claude	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
TIXIER Marie	Biochimie

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

A Michel et à notre petit Pierre

*Je vous dédie ce travail, en témoignage de notre
amour plus fort chaque jour.*

A Papa

Qui nous aime de là haut

A Maman

Pour toutes ces années parfois difficiles mais toujours pleines de bonheur, pour tout ce que m'as apporté dans ma vie, je sais ce que ce travail représente pour toi et je souhaite que tu y trouves le témoignage de mon amour et de ma reconnaissance

*A mon Papy, à mon oncle Pierre et à toute ma famille,
je vous dois d'être ce que je suis.*

A Coco

*A Marie Anne,
mon binôme pour notre profonde amitié.*

A tous mes Amis

*A Monsieur le Professeur Jean Albert NICOLAS
Professeur des Universités de Bactériologie-Virologie,
Parasitologie,*

*Nous vous remercions du grand honneur que vous
nous faites en acceptant de présider ce jury
Vous nous avez enseigné avec compétence et
dévouement l'Immunologie
Que cette thèse témoigne de notre profond respect.*

*A Monsieur le Professeur Jean Loup AVRIL
Professeur des Universités de Bactériologie-Virologie,
Biologiste des hôpitaux,
Chef de service,*

*Vous avez inspiré cette thèse et dirigé notre travail
Qu'il soit le témoignage de notre reconnaissance.*

*A Monsieur le Professeur François DENIS
Professeur des Universités de Bactériologie-Virologie,
Biologiste des hôpitaux,
Chef de service,*

*Vous nous avez enseigné avec compétence la
Bactériologie et la Virologie*

Vous nous avez soutenu tout au long de notre internat

*Vous nous avez fait l'honneur de participer à notre
jury de thèse*

*Que ce travail témoigne de notre gratitude et de notre
profond respect.*

*A Mademoiselle le Professeur Marie TIXIER
Professeur des Universités de Biochimie*

*Vous nous avez toujours réservé un accueil
bienveillant et une grande disponibilité.
Nous vous remercions de l'honneur que vous nous
faites de juger ce travail.*

*A Madame le Docteur Marcelle MOUNIER
Maître de conférences des Universités,
Praticien hospitalier en Bactériologie Virologie,*

*Merci pour tout ce que tu m'as enseigné avec
compétence et gentillesse pendant cet internat, merci
pour ta bienveillance dans les moments difficiles
Tu as accepté de juger ce travail
Qu'il soit l'expression de ma respectueuse gratitude*

A Monsieur le Docteur Pierre Yves DONNIO

*Merci pour ton aide et tes précieux conseils
Sois assuré de ma profonde reconnaissance*

A Monsieur le Docteur Patrice ANDRE

*Merci pour ta patience lors de la réalisation
expérimentale de ce travail
Sincères remerciements*

A Marie France TRAVERT

*Tu as fais preuve d'une grande disponibilité
La qualité de tes conseils et de ton aide m'a été
précieuse pour la réalisation de ce travail.
Sois assurée de ma reconnaissance et de mon amitié*

A Nicolas VU

*Tous mes remerciements pour ta coopération
informatique et ta gentillesse*

A Geneviève OLLIVIER

*Merci pour ton aide lors de la réalisation de certains
milieux de culture.*

*A tous les membres des laboratoires qui m'ont accueilli
pendant mon internat.*

PLAN

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : REVUE DE LA LITTERATURE

I. HISTORIQUE

II. RAPPEL SUR *PASTEURELLA MULTOCIDA*

1. Classification

2. Habitat et épidémiologie

3. Pouvoir pathogène de *Pasteurella multocida*

3.1. Infections animales à *Pasteurella multocida*

3.2. Infections humaines à *Pasteurella multocida*

3.2.1. La pasteurellose d'inoculation

3.2.2. Pasteurelloses systémiques

4. Physiopathologie de l'infection à *Pasteurella multocida*

5. Etude bactériologique

5.1. Morphologie

5.2. Caractères culturels

5.3. Caractères biochimiques

5.4. Caractères antigéniques

6. Sensibilité de *Pasteurella multocida* aux antibiotiques

III.DETERMINATION DE L'ACTIVITE DES ANTIBIOTIQUES *IN VITRO*

DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL

I. MATERIEL ET METHODES

1. Souches étudiées

2. Antibiotiques

3. Milieux

4. Méthodes

4.1. Contrôles et témoins

4.2. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

4.2.1. Technique de bactériostase

4.2.2. Technique de bactéricidie

-détermination de la CMB

-étude des cinétiques de bactéricidie

II. RESULTATS

1. Détermination de la CMI

2. Détermination de la CMB et du rapport CMB/CMI

3. Cinétiques de bactéricidie: exploitation des courbes

III. DISCUSSION

1. Détermination de la CMI

2. Détermination de la CMB et du rapport CMB/CMI

3. Cinétiques de bactéricidie

**4. Discussion sur les molécules actuelles d'une antibio-
thérapie bactéricide**

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

Environ neuf millions de chiens et huit millions de chats en France, on observe actuellement un regain d'intérêt pour les animaux de compagnie. Ce phénomène est en partie responsable de l'augmentation des agressions animales et de ce fait des affections transmises à l'homme par leur contact(17). Parmi ces anthroozoonoses, orthozoonoses, les Pasteurelloses d'inoculation "vraies", à *Pasteurella multocida*, chez l'homme occupent une place de plus en plus conséquente. Le portage de *Pasteurella* au niveau du rhinopharynx chez les éleveurs de porcs, les infections de la sphère respiratoire et ORL sur terrains fragilisés (26), les formes systématisées lors d'immunodépression, sont également en augmentation.

La nécessité d'une antibiothérapie dite "bactéricide" dans les formes systémiques s'impose. Les *Pasteurella* sont sensibles *in vitro* à de nombreux antibiotiques tels les Béta-lactamines (Ampicilline, Pénicilline G et Céphalosporines), Cyclines, Phénicolés et Quinolones, l'activité des Aminosides, Macrolides et Sulfamides est médiocre. L'apparition récente de souches humaines résistantes aux Béta-Lactamines (production d'une béta-lactamase) est signalée et peut faire reconsidérer le protocole actuel de l'antibiothérapie (53,45,61,48)

Dans ce mémoire, différentes concentrations de plusieurs antibiotiques vont être opposées à des souches de *Pasteurella multocida*. L'activité bactéricide de ces molécules sera évaluée pour chacune des souches par une mesure de CMI et de CMB et une étude de cinétique de bactéricidie.

PREMIERE PARTIE :
REVUE DE LA LITTERATURE

I. HISTORIQUE

Pasteurella multocida, isolé pour la première fois en 1878 par Lemmer, Perroncito, et Kitt sous forme d'un bacille bipolaire dans le sang d'une poule morte de choléra, a été d'abord reconnu comme un pathogène important chez l'animal, provoquant de sérieuses épizooties. En 1879, Toussaint réussit à cultiver l'agent du choléra des poules, permettant ainsi les travaux de Pasteur (58) qui en 1880 obtint une culture atténuée de la bactérie. Ce fut le premier vaccin selon la méthode pasteurienne. En 1887 Trevisan proposa le nom de *Pasteurella* pour désigner ces bactéries, honorant ainsi le travail de Pasteur.

Multocida traduit l'intensité du pouvoir pathogène pour les animaux les plus divers, et ce terme regroupe les différentes variétés de pasteurelles initialement décrites par Lignières en 1901 : *aviseptica*, *boviseptica*, *oviseptica*, *capriseptica*, *equiseptica*, *suisepctica*, en fait dues à la même bactérie.

Par la suite, fut reconnu le rôle pathogène de *P. multocida* en pathologie humaine, le premier cas décrit, rapporté par Brugnaletti en 1913, concernait une septicémie puerpérale. Debre et Ortscheit en 1919 et 1921 puis Teissier et Gastinel en 1922 relatent trois cas de pleurésie purulente à *Pasteurella multocida*. Ils étudient un protocole d'immunisation des animaux pour obtenir des agglutinines et permettre un diagnostic sérologique. Ils montrent, enfin qu'une inoculation cutanée superficielle (badigeonage d'une culture de Pasteurelle virulente sur la peau de cobaye épilée mais non rasée), procure une immunité cellulaire, sans provoquer d'élévation des agglutinines.

On décrit par la suite d'autres type de pasteurellose humaine: atteinte des séreuses, entérite, conjonctivite, myosite, pasteurellose après morsure de panthère (Rivoalen en 1936), pasteurellose localisée d'inoculation en 1930 par Karel et Holm. Le caractère opportuniste du germe et sa fréquente transmission par traumatisme animal direct ont ensuite été démontrés. A partir de 1952 Reilly et Tournier, décrivent l'utilisation d'un antigène par voie intradermique aussi bien dans un but diagnostique que thérapeutique. Depuis, de multiples publications ont rapporté des cas de pasteurelloses touchant n'importe quel organe.

II. RAPPEL SUR *PASTEURELLA MULTOCIDA*

1. Classification.

La famille des *Pasteurellaceae*, tribu des *Pasteurellae*, regroupe les genres *Pasteurella*, *Haemophilus*, *Actinobacillus*. Le genre *Pasteurella* comprend actuellement: (30) *Pasteurella multocida* espèce type, divisée en trois sous-espèces: *multocida*, *septica* et *gallicida*; *Pasteurella canis* (anciennement *P. multocida* biotype 6), biotypes 1 et 2; *P. species B*; *P. stomatis*; *P. dagmatis* (anciennement *P. pneumotropica* biotype Henriksen); *P. pneumotopica* biotypes Jawetz et Heyl; *P. haemolytica* biotype A; *P. trehalosi sp. nov.* (anciennement *P. haemolytica* biotype T); *P. granulomatis* (*P. haemolytica-like*); *P. aerogenes*; *P. lymphangitidis sp. nov.* (anciennement BL group); *P. mairi sp. nov.* (anciennement *P. sp. strain "Mair"*); *P. SP.*; *P. caballi sp. nov.*, d'origine équine; *P. testudinis*; *P. piscicida*; *P. bettyae sp. nov.* (groupe HB5); *P. gallinarum*, *P. anatis* et *P. langaa* (taxons 1 et 4 de Bisgaard,

respectivement), *P. avium* (anciennement *Haemophilus avium*), *P. species A* et *P. volantium*, d'origine aviaire; les trois dernières espèces sont en général exigeantes en hémine ou facteur V.

2. Habitat et épidémiologie.

Les *Pasteurella* sont des parasites obligatoires des muqueuses des cavités naturelles des vertébrés. Elles sont trouvées avec une grande fréquence dans la salive d'un grand nombre d'espèces animales: chiens, chats, chevaux, porcs, sangliers.

Incapables de survivre longtemps dans le milieu extérieur, les *Pasteurella* sont généralement transmises à l'homme par l'animal.(3)

En pathologie humaine, il existe toujours une notion de contact animal:

- dans les formes d'inoculation: morsures de chiens et chats (85%), griffades de chats (5%)
- dans les formes systémiques: sujet immunodéprimé vivant en milieu rural (sujets âgés)

3. Pouvoir pathogène de *Pasteurella multocida*

3.1. Infections animales à *Pasteurella multocida*.

Pasteurella multocida est responsable chez les animaux d'élevage d'une pathologie importante qui a des répercussions économiques considérables.

Chez les bovins et les buffles, les septicémies hémorragiques sont souvent suraigües et favorisées par des stress comme les transports. Les infections respiratoires sont fréquentes.

Le classique choléra des poules est une septicémie hémorragique entraînant une importante mortalité dans les élevages.

La rhinite atrophique, les bronchopneumonies des porcs, les pneumonies des lapins sont la cause d'un arrêt de la croissance de ces animaux.

3.2. Infections humaines à *Pasteurella multocida*.

3.2.1. La pasteurellose d'inoculation.

La plus fréquente, elle est généralement consécutive à une morsure ou une griffade d'un chien ou d'un chat (14,47,11). Après inoculation de la bactérie par voie directe, se développent les formes locorégionales suppuratives: il apparaît après quelques heures, une plaie très inflammatoire et extrêmement douloureuse. Au bout de 48 h surviennent des signes d'inflammation intense: rougeur, oedème, lymphangite, adénopathies et fièvre modérée. Généralement, chez les sujets aux défenses immunitaires normales, ces signes locaux régressent rapidement et la maladie évolue favorablement avec une antibiothérapie. Néanmoins certaines complications peuvent survenir: arthrite aigüe suppurative, ostéites ou ostéomyélites, principalement en cas de morsure profonde, délabrements cutanés nécessitant des parages chirurgicaux .

Non traitées et succédant aux formes aigües, ces infections peuvent évoluer vers des formes locorégionales subaigües, non suppuratives (téno-synovite, arthrite inflammatoire), chroniques, avec impotence et atrophie pouvant persister plusieurs mois (algodystrophies).

3.2.2. Pasteurelloses systémiques.

Non reliées à une inoculation directe (8,16,26), elles sont le plus souvent à l'origine d'infections respiratoires, où la contamination par voie aérienne est probable (sinusites, rhinopharyngites, otites, bronchites, pleuro-pneumopathies) et septicémiques (bactériémies, septicémies), également d'infections uro-génitales (cystites, vaginites, bartholinites, endométrites), abdominales (appendicites, péritonites, abcès divers) et neuroméningées (méningites, abcès cérébraux). Quelques cas d'endocardites et de péricardites sont rapportés mais leur fréquence est limitée. Ces formes s'observent lors d'un amoindrissement des défenses immunitaires (affection chronique, cancers de la sphère ORL, hémopathies, éthylisme). Chez des souches responsables d'infections pulmonaires a été mise en évidence une toxine dermonécrotique de 143-160 kDa codée par le gène *tox A*.

4. Physiopathologie de l'infection à *Pasteurella multocida*.

Actuellement peu de choses sont connues sur la physiopathologie de l'infection, néanmoins il a été mis en évidence certains facteurs de virulence:

- la capsule intervient dans la résistance aux défenses de l'hôte.
- le LPS qui agit comme une endotoxine.
- la production de toxine dermonécrotique chez les souches responsables de rhinite atrophique (25).
- la production de protéases qui clivent les immunoglobulines A et G.(55).

5. Etude bactériologique.

5.1. Morphologie.

Les Pasteurelles sont des coccobacilles à Gram négatif avec habituellement une coloration bipolaire (12,4). Parmi les corps bactériens de petite taille ($L= 1$ à 2 micron ; $l= 0,3$ à $0,4$ micron) des formes longues sont souvent observées. Les chaînettes sont très rares.

A l'état frais, les bactéries sont immobiles . L'encre de Chine permet de voir une capsule dont l'épaisseur varie avec le sérotype.

5.2. Caractères cultureux.

La température de croissance est comprise entre 22 et 44 °C avec un optimum à 37 °C. Ce sont des bactéries aéro-anaérobies avec en gélose profonde une petite inhibition à la surface et un renforcement de la croissance en microaérophilie.

Sur milieux riches (gélose au sérum , gélose au sang) après 24 heures d'incubation à 37°C , les colonies sont petites (1 à 2 mm de diamètre) rondes, grisâtres, en goutte de rosée. Parfois la capsule leur donne un aspect muqueux. En bouillon, un trouble homogène est obtenu en 24 heures.

Il n'y a pas de croissance sur les milieux suivants: Mac Conkey, milieu de Drigalski, milieu au citrate de Simmons et eau de levure.

5.3. Caractères biochimiques.

L'oxydase est toujours positive si sa recherche est faite à l'aide de tétraméthyl-p-phénylènediamine .

La catalase, la nitrate-réductase, l'ODC et l'indole sont constamment positives. Les caractères suivants sont négatifs: gélatinase, LDC, ADH, uréase et H₂S. Toutes les souches sont sensibles au composé vibriostatique O/129 .

La fermentation du glucose se fait toujours sans production de gaz. Les glucides suivants sont régulièrement attaqués: mannitol, galactose, fructose, mannose, saccharose. Par contre sont régulièrement négatifs: sorbose, rhamnose , inositol , adonitol.

L'étude de la fermentation du sorbitol et du dulcitol permet chez *P.multocida* de reconnaître les trois sous-espèces indiquées ci-dessous:

Sous-espèces	Fermentation	
	Sorbitol	Dulcitol
<i>multocida</i>	+	-
<i>septica</i>	-	-
<i>gallicida</i>	+	+

5.4. Caractères antigéniques.

Les polysides constituant la capsule permettent , en fonction de leur composition, de distinguer classiquement 4 types capsulaires (15): A, B, D , et E. Un cinquième type capsulaire F (60), a été

décrit pour des souches isolées chez la dinde. Les lipopolysaccharides de paroi, possédant les caractères des endotoxines des bacilles à Gram négatif, permettent de classer les souches en 12 sérotypes. Une sérotypie capsulaire et somatique existe donc, mais elle n'est pas utilisée en pratique courante en raison de la complexité de cette détermination.

6. Sensibilité de *Pasteurella multocida* aux antibiotiques.

Il existe dans la littérature un nombre limité d'études sur la sensibilité aux antibiotiques de *Pasteurella multocida* isolées chez l'homme et aucun réel travail de synthèse concernant le traitement des pasteurelloses. Ceci semble être dû au fait que, à l'heure actuelle, il n'existe que peu de collections de souches.

Béta-lactamines

En ce qui concerne la sensibilité aux Béta-lactamines, les auteurs, Stevens et coll (65), Oberhoffer et coll (51), rapportent une bonne activité des molécules de cette famille (CMI modale 0,78).

Beytout et coll (9), ont étudié 26 souches de Pasteurelles dont 24 *Pasteurella multocida*, 12% des souches sont moins sensibles à la Pénicilline G qu'à l'Ampicilline ou aux Céphalosporines de deuxième et troisième génération.

Goldstein et coll (34) montrent que certaines formes orales d'antibiotiques dont des Céphalosporines de 1^{ère} génération, ne doivent pas être utilisées comme traitement empirique dans les morsures, car elles ne permettent pas d'atteindre un taux sanguin suffisant.

Différents travaux confirment la bonne activité des Céphalosporines à large spectre comme l'étude de Noel et coll (50) et de Holst et coll (38) de même que celle de Avril et coll (6) qui inclue une souche productrice de bêta-lactamase.

Tétracyclines

Les auteurs (65, 70), rapportent une bonne sensibilité des Pasteurelles à cette famille, (CMI modale 0,09), mais des études de CMI, CMB montrent que ces antibiotiques sont bactériostatiques (CMB 2 à 3 fois la CMI)

Macrolides

Raffi (58) note une résistance fréquente à ces molécules. Goldstein et coll (35), dans leur étude sur le choix d'une antibiothérapie empirique dans les morsures, obtiennent des résultats identiques.

Aminosides

Dibb et Digranes sont les seuls à trouver des sensibilités inhabituelles aux Aminosides. Les *Pasteurella multocida* ont une résistance naturelle à ces antibiotiques entraînant des CMI relativement élevées (CMI=25) (65). Cela rend les Aminosides inutilisables en monothérapie pour traiter une infection à *Pasteurella multocida*

Cette résistance naturelle a été mise à profit pour réaliser un milieu sélectif (5).

Quinolones

Escande et coll (29), Goldstein et coll (32) montrent une bonne activité des nouvelles Quinolones avec des CMI autour de 0,03mg/l.

Au total, les souches de *Pasteurella multocida* isolées chez l'homme demeurent très sensibles aux Béta-lactamines, bien que commencent à apparaître des souches productrices de bêta-lactamase (53, 45, 61), aux Cyclines, aux Quinolones. Les Macrolides ont une activité médiocre ou nulle ainsi que les Aminosides.

Il est loin d'en être de même pour les souches d'origine bovine (56, 37, 41) et porcine, (54, 69), qui dans une proportion notable sont résistantes à la Pénicilline et aux Tétracyclines. Certaines études, notamment sur des souches d'origine aviaire et porcine, montrent une très bonne activité des nouvelles Quinolones à usage vétérinaire, Danofloxacin (36, 57).

III. DETERMINATION DE L'ACTIVITE DES ANTIBIOTIQUES *IN VITRO*

Le choix d'un antibiotique adapté au traitement d'une infection dépend, pour une large part, de l'étude *in vitro* de la sensibilité de la bactérie responsable à divers agents antibactériens, des propriétés pharmacologiques des molécules (diffusion dans le foyer infectieux, toxicité) et de l'état immunitaire du patient (64) La nécessité d'une antibiothérapie dite "bactéricide", a été confirmée dès 1950 dans les endocardites bactériennes, puis dans les méningites bactériennes aiguës, dans les ostéomyélites et dans les infections des

immunodéprimés. Les antibiotiques dits "bactéricides" tuent rapidement les bactéries, les antibiotiques dits "bactériostatiques" inhibent la multiplication cellulaire sans destruction bactérienne (28)

L'étude de l'activité bactéricide peut être divisée en deux groupes de méthodes séparables en fonction de l'expression des résultats:

1) Méthodes dénombrant les bactéries survivantes après 18 à 24 heures (soit après une nuit d'incubation). Elles déterminent la concentration minimale bactéricide ce qui correspond à la plus faible concentration d'antibiotique détruisant une certaine quantité de la population bactérienne initiale. Cette CMB sera exprimée en mg/l d'antibiotique.

2) Méthodes cinétiques analysant la dynamique de l'activité bactéricide. Leurs résultats seront exprimés par l'amplitude de la décroissance bactérienne en fonction d'une unité de temps et ce pour une certaine concentration d'antibiotique.

Les résultats de ces méthodes dépendent de nombreux facteurs techniques et théoriques sans oublier les variations inhérentes aux méthodes de dénombrement des bactéries survivantes. L'étude de ces facteurs est difficile car l'activité bactéricide réelle des antibiotiques n'est que relative: il n'existe pas d'activité bactéricide étalon.

Actuellement la méthode préconisée pour la mesure de l'activité bactéricide est l'étude cinétique: "killing curves"(27). De nombreux travaux, utilisant des modèles expérimentaux animaux, ont montré qu'elle était corrélée, notamment chez les bacilles à Gram négatif, avec la vitesse d'éradication in vivo.

Ainsi, il nous est apparu intéressant de comparer, par les deux méthodes d'étude de l'activité bactéricide, les antibiotiques apparaissant les plus actifs sur *Pasteurella multocida*.

DEUXIEME PARTIE:
TRAVAIL EXPERIMENTAL

I. MATERIEL ET METHODES.

1. Souches étudiées.

Notre travail a été réalisé sur trois souches de *Pasteurella multocida* sp *multocida* isolées chez l'homme, dont les caractéristiques sont réunies dans le tableau 1.

Tableau 1: Souches de *Pasteurella multocida*

souches	types capsulaires	production de toxine dermonécrotique	renseignements cliniques
PMR ^a 164	D	non	suppuration de pouce suite à une morsure de chat
PMR ^a 46	A	oui	expectoration chez un agriculteur
CIP ^b 5724	D	non	plaie de jambe

a/ PMR: collection du laboratoire de bactériologie, Faculté de médecine de Rennes

b/ CIP : collection de l'Institut Pasteur

Nos trois souches ne sont pas productrices de bêta-lactamase (méthode de détermination chromogénique: disque de céfinase)

Deux souches témoins ont été testées parallèlement:

E.coli ATCC 25922

S.aureus ATCC 25923

2. Antibiotiques.

Le choix des antibiotiques testés a été guidé par le profil de sensibilité des souches de *Pasteurella multocida* bêta-lactamase négative. Quatre familles ont été retenue. Les Fluoroquinolones avec la Ciprofloxacin (29) et la Sparfloxacin (59, 46, 49), un Macrolide: la Clarithromycine (24), les Bêta-lactamines avec l'Amoxicilline et le Cefpodoxime (6,7), une Tétracycline: la Doxycycline (20, 11)

Fluoroquinolones

Sparfloxacin: laboratoire Rhône-Poulenc Rorer

RP 64206

Titre= 99,7%

Lot MIJ 496

Ciprofloxacin: laboratoire Bayer Pharma

Titre= 93,6%

Lot 191994 H

Macrolides

Clarithromycine: laboratoire Abbott France

Titre= 100%

Lot 68111TC

Bêta-lactamines

Amoxicilline: laboratoire Beecham Sévigné

Titre= 81%

Lot 20 204

Cefpodoxime: laboratoire Roussel Uclaf

Titre= 94,1%

Lot: 2A0298B

RU 51746

Tétracyclines

Doxycycline: laboratoire Pfizer

Code 200086

Titre=86%

Lot: 10958 R

3.Milieux

Les souches conservées par congélation à -80°C ont été, avant utilisation, cultivées en bouillon de Mueller-Hinton (DIFCO lot: 0757 014) à 37°C pendant 18 heures. Le milieu solide utilisé était une gélose tryptose sérum:

10g tryptose 795757 Difco

0,5g glucose 88131 Prolabo

2,5g NaCl K 16309100 Merck

1,25g Extrait de levure 725192 Difco

7,5g Agar K 17991914 Merck

QSP: 500ml H₂O

Ce milieu était additionné de sérum de veau foetal 10% (521116 Eurobio) et pour certaines expériences de charbon végétal activé 1,5g par litre (EMB lot: 85186) et de MGSO₄ (10 g/l). Cette concentration de charbon a été préférée à celles de 5 ou 10g par litre (43) car elle permet de limiter l'effet carry over observé pour

certaines antibiotiques à CMI très basses, tout en n'inhibant pas la culture de nos souches. Cet effet n'est observé habituellement que pour des concentrations égalant 10 à 20 fois la CMI, sauf pour les *Pasteurella* où il est observé dès 1 à 2 fois la CMI. Il est dû au transport d'antibiotique à la surface de la gélose lors de la réalisation de la CMB ou de la vitesse de bactéricidie.

4. Méthodes

4.1. Contrôles et témoins.

Avant toute étude de sensibilité aux antibiotiques, il a été pratiqué sur les trois souches de Pasteurelles une courbe de croissance sur 24 heures, qui nous a permis d'étudier le comportement de nos trois souches en milieu liquide et d'avoir une évolution du nombre de bactéries par ml toutes les heures pendant 8 heures plus un prélèvement à 24 heures.

Méthode:

Une colonie de chaque souche est mise en culture dans 10 ml de Mueller-Hinton. Les trois tubes sont incubés toute une nuit au bain-marie à 37°C, sous agitation continue (70 oscillations par minute).

Puis 100 microlitres de cette solution sont mélangés à 9,9 ml de bouillon Mueller-Hinton, cette solution est mise à 37°C sous agitation continue. Toutes les heures pendant 8 heures, un prélèvement de 100 microlitres est effectué, dilué de 10 en 10, les dilutions et le prélèvement sont ensemencés en spots de 50 microlitres sur une gélose tryptose sérum. Un dernier prélèvement est effectué à 24 heures. Le lendemain nous procédons à un comptage des colonies qui nous permet de calculer le nombre de bactéries par ml (13).

4.2. Etude de la sensibilité aux antibiotiques.

Notre étude s'est déroulée en deux temps, une première expérience au cours de laquelle nous avons déterminé les CMI et CMB des six antibiotiques vis à vis de nos cinq souches, ce qui nous a permis de vérifier le comportement de nos souches et de fixer les concentrations auxquelles nous travaillerions pour la deuxième étape: les vitesses de bactéricidie.

4.2.1. Technique de bactériostase.

Les CMI ont été déterminées par la méthode des dilutions en milieu liquide. La technique utilisée est celle décrite par Courvalin, Drugeon *et al* (22).

Pour chaque poudre d'antibiotique nous avons préparé une gamme de dilutions, en série de tubes à hémolyse stériles, pour obtenir en concentration finale une gamme allant de 8 mg/l à 0,0039mg/l. Le solvant utilisé correspondait, pour chacun, aux recommandations du fabricant.

Une culture en phase exponentielle de nos souches a été préparée: repiquage de 100 microlitres d'un bouillon de 18 heures dans 10 ml de milieu de Mueller-Hinton, mise au bain-marie agité à 37°C pendant 3 à 5 heures jusqu'à détection d'une légère opalescence ($5 \cdot 10^7$ bactéries par ml). Cet inoculum a été dilué au dixième dans du milieu de Mueller-Hinton préalablement chauffé à 37°C pour obtenir $5 \cdot 10^6$ bactéries par ml, puis distribué dans des tubes à hémolyse à raison de 1,8 ml par tube. A la fin de cette manipulation,

la pureté de l'inoculum est vérifiée par isolement sur une boîte de milieu au tryptose sérum.

CMI

A ce stade 0,2 ml de chaque concentration d'antibiotique sont ajoutés dans les tubes correspondants en allant de la concentration la plus faible à la concentration la plus forte ainsi que 0,2 ml d'eau distillée dans le témoin de croissance. Les bactéries du tube témoin sont dénombrées en effectuant 4 dilutions sériées de 10 en 10. Chaque dilution estensemencée à la surface d'une gélose adaptée en spots de 50 microlitres.

La boîte témoin et les tubes sont incubés 18 heures à 37°C.

Au bout de ce temps les CMI sont lues, elles correspondent aux concentrations d'antibiotique pour laquelle il n'y a pas de croissance visible à l'oeil nu, la boîte témoin est réservée à 4°C.

4.2.2. Technique de bactéricidie.

-détermination de la CMB

Les tubes correspondants à des concentrations supérieures à la CMI sontensemencés, en spots de 50 microlitres, à la surface de géloses tryptose sérum incubées 24 heures à 37°C

La CMB est lue en comparant les numérations des cultures à celle du dénombrement initial. La CMB est la plus faible concentration pour laquelle il y a 0,1 ou 0,01% de bactéries survivantes.

Les CMI et CMB sont exprimées en mg/l.

-étude des cinétiques de bactéricidie.

Ces méthodes ont pour objectif d'étudier l'activité bactéricide des antibiotiques en fonction des deux paramètres essentiels qui sont la concentration d'antibiotique et le temps d'incubation (21).

Deux concentrations différentes pour chaque antibiotique sont testées.

L'une correspondant au double de la CMI déterminée préalablement l'autre à la moitié de la concentration critique basse relevée dans le communiqué 1992 du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (1).

Une colonie de chaque souche de *Pasteurella multocida* est mise en culture dans 10 ml de Mueller-Hinton. Les tubes sont incubés toute une nuit au bain-marie à 37°C, sous agitation continue.

Puis 100 microlitres de cette solution sont mélangés à 9,9 ml de bouillon Mueller-Hinton contenant une certaine quantité d'antibiotique pour obtenir en concentration finale les valeurs choisies précédemment. Un prélèvement de 100 microlitres est effectué au temps 0, 1, 2, 4, 6, 8, 24 heures, dilué de 10 en 10, ces dilutions sont ensemencées en spots de 50 microlitres à la surface d'une gélose adaptée.

Après 24 heures d'incubation, une numération des colonies est effectuée qui nous permet de calculer le nombre de bactéries par ml à chaque temps. Après transformation des ufc*/ml en Log(ufc/ml) nous obtenons une courbe de bactéricidie Log(ufc/ml) en fonction du temps (* ufc: unité formant des colonies).

Pour plus de précision dans les méthodes de détermination de CMB et dans les cinétiques de bactéricidie, il apparaît prudent de

n'utiliser que des numérations de colonies comprises entre 30 et 200 pour des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre (31).

II. RESULTATS

1. Détermination de la CMI

Comme nous l'indiquent les tableaux 2 et 4, toutes nos souches peuvent être classées dans la catégorie sensible aux antibiotiques testés. En effet les CMI sont nettement inférieures à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique (1). L'utilisation de témoins: *E.coli* et *S.aureus* nous permet de vérifier la cohérence de nos résultats en comparant les CMI obtenues avec celles recueillies dans la littérature.

2. Détermination de la CMB et du rapport CMB/CMI

Si l'on compare les valeurs des CMB obtenues (tableaux 3 et 5), nous constatons que celles-ci sont très proches ou identiques aux CMI, sauf pour deux antibiotiques qui sont la Doxycycline et la Clarithromycine. Les résultats des rapports CMB/CMI (tableaux 6 et 7) sont inférieurs ou égaux à 2 pour toutes les molécules sauf pour la Doxycycline et la Clarithromycine où ils sont, pour les souches de *Pasteurella*, respectivement égaux à 16,66 et à 4. Ces deux antibiotiques sont bactériostatiques sur nos souches de *Pasteurella*, les autres molécules, Amoxicilline, Cefpodoxime, Sparfloxacin, Ciprofloxacine sont bactéricides.

3. Cinétiques de bactéricidie: exploitation des courbes

Les résultats sont exposés sous forme de courbe: Log(ufc/ml) en fonction du temps. Chaque courbe réunit les trois souches de *Pasteurella* exposées au même antibiotique à la même concentration choisie comme indiqué dans le chapitre Matériel et Méthodes: deux fois la valeur de la CMI et la moitié de la concentration critique basse. Une exception a été faite pour la Doxycycline, une troisième concentration a été testée, pour mieux cerner le comportement des souches vis à vis de cet antibiotique.

Clarithromycine 0,5 et 1 mg/l: figures 2 et 3.

Cefpodoxime 0,06 et 0,5 mg/l: figures 4 et 5.

Amoxicilline 1 et 2 mg/l: figures 6 et 7.

Sparfloxacin 0,03 et 0,5 mg/l: figures 8 et 9.

Ciprofloxacin 0,06 et 0,5 mg/l: figures 10 et 11.

Doxycycline 0,12, 0,5 et 2 mg/l: figures 12, 13 et 14.

Si nous observons ces courbes, nous remarquons que le comportement de nos souches varie énormément en fonction de l'antibiotique, de sa concentration et du temps de contact avec la molécule. Deux grands profils se dessinent: des antibiotiques pour lesquels quelle que soit la concentration il n'y a jamais de recroissance bactérienne, d'autres pour lesquels nous observons une repousse (Doxycycline 0,12mg/l, Clarithromycine 0,5mg/l et 1mg/l). Nous remarquons également que pour certains antibiotiques, quel que soit la concentration, la bactéricidie est atteinte au même moment, alors que pour d'autres la bactéricidie est plus rapide pour des concentrations plus fortes.

Pour mieux interpréter ces phénomènes, nous avons utilisé deux indices (31): l'un dit descriptif, le TLog, l'autre appelé indice d'activité : le TMB ou Temps Minimal Bactéricide qui n'est applicable qu'aux antibiotiques qui réduisent la population à 0,01% de l'inoculum initial. Les valeurs de ces indices sont réunies dans le tableau 8.

Comme nous pouvons le voir, le TLog varie entre 45mn et 120mn pour tous les antibiotiques qu'ils soient bactériostatiques ou bactéricides. Nos souches, comme indiqué précédemment, sont donc bien sensibles à nos molécules. Ce TLog ne permet de décrire qu'une décroissance de la vitalité bactérienne.

Le TMB, calculable que pour les antibiotiques bactéricides, nous permet de les classer en temps dépendants ou en doses dépendants.

Antibiotiques temps dépendants:

Amoxicilline

Sparfloxacine

Ciprofloxacine

Antibiotiques doses dépendants:

Cefpodoxime

Doxycycline

En regardant les cinétiques de bactéricidie (figures 2, 3, 12, 13 et 14) nous observons aussi nettement que les deux molécules bactériostatiques sont doses dépendantes, car le profil des courbes varie notablement avec les concentrations. Nous constatons également que la Doxycycline pour des concentrations de 0,5 et 2mg/l devient bactéricide.

Maintenant, si nous comparons entre eux les antibiotiques temps dépendants nous remarquons que les Quinolones (Sparfloxacin et Ciprofloxacin) ont une valeur moyenne de TMB de 230mn alors que le TMB de l'Amoxicilline varie beaucoup d'une souche à l'autre et est en moyenne plus élevé.

Si nous comparons les Quinolones avec le Cefpodoxime 0,5mg/l nous trouvons des TMB équivalents.

Au total nous observons donc des molécules très rapidement actives sur les souches de *Pasteurella* pour des concentrations basses(0,03 et 0,06 mg/l), ceux sont les Quinolones de 3^{ème} génération, une molécule aussi rapidement active pour une concentration un peu plus forte(0,5 mg/l): le Cefpodoxime, une molécule active pour des concentrations de 1 à 2 mg/l: l'Amoxicilline, et deux molécules ayant une activité bactériostatique la Doxycycline et la Clarithromycine.

Tableau 2: Valeurs des CMI pour les souches étudiées

Antibiotiques	CMI (mg/l)			
	<i>E.coli</i>	CIP 5724	PMR164	PMR46
Doxycycline	0,12	0,06	0,06	0,06
Sparfloxacin	0,015	0,015	0,015	0,015
Cefpodoxime	0,5	0,03	0,03	0,03
Ciprofloxacine	0,0075	0,03	0,03	0,03

Tableau 3: Valeurs des CMB pour les souches étudiées

Antibiotiques	CMB (mg/l)			
	<i>E.coli</i>	CIP 5724	PMR164	PMR46
Doxycycline	1	1	1	1
Sparfloxacin	0,015	0,015	0,015	0,015
Cefpodoxime	1	0,06	0,03	0,06
Ciprofloxacine	0,0075	0,03	0,03	0,06

Tableau 4: Valeurs des CMI pour les souches étudiées

Antibiotiques	CMI (mg/l)			
	<i>S.aureus</i>	CIP 5724	PMR164	PMR46
Clarithromycine	0,25	0,25	0,25	0,25
Amoxicilline	0,5	0,5	0,5	0,5

Tableau 5: Valeurs des CMB pour les souches étudiées

Antibiotiques	CMB (mg/l)			
	<i>S.aureus</i>	CIP 5724	PMR164	PMR46
Clarithromycine	0,25	1	1	1
Amoxicilline	0,5	0,5	0,5	0,5

Tableau 6: Valeurs des rapports CMB/CMI pour les souches étudiées

Antibiotiques	CMB/CMI			
	<i>E.coli</i>	CIP 5724	PMR 164	PMR 46
Doxycycline	8,33	16,66	16,66	16,66
Sparfloxacin	1	1	1	1
Cefpodoxime	2	2	1	2
Ciprofloxacine	1	1	1	2

Tableau 7 : Valeurs des rapports CMB/CMI pour les souches étudiées

Antibiotiques	CMB/CMI			
	<i>S.aureus</i>	CIP 5724	PMR 164	PMR 46
Clarithromycine	1	4	4	4
Amoxicilline	1	2	1	1

Figure 1 : courbes de croissance des souches de *Pasteurella* en l'absence d'antibiotique

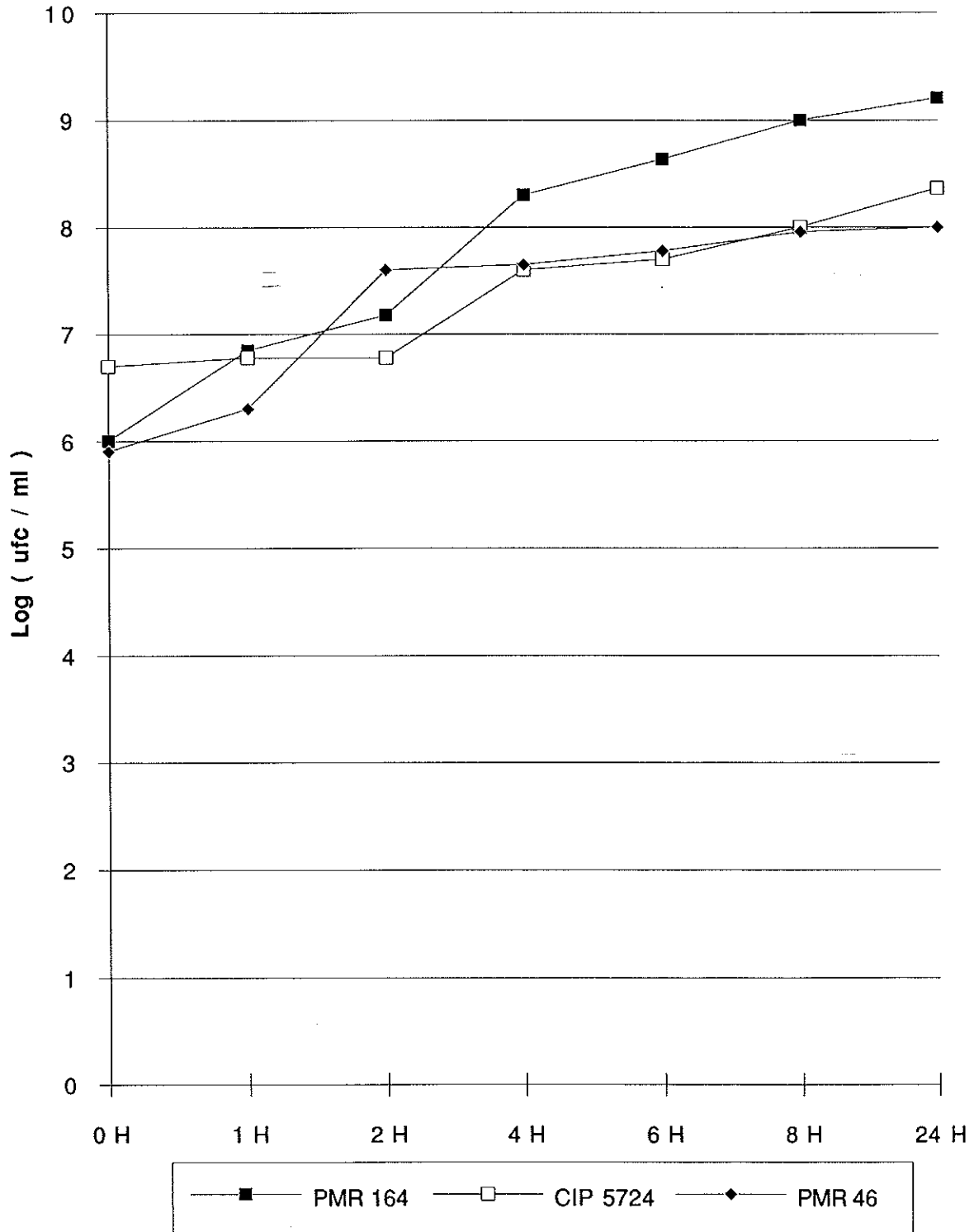


Figure 2 : cinétique de bactéricidie de la Clarithromycine à la concentration de 0,5 mg/l

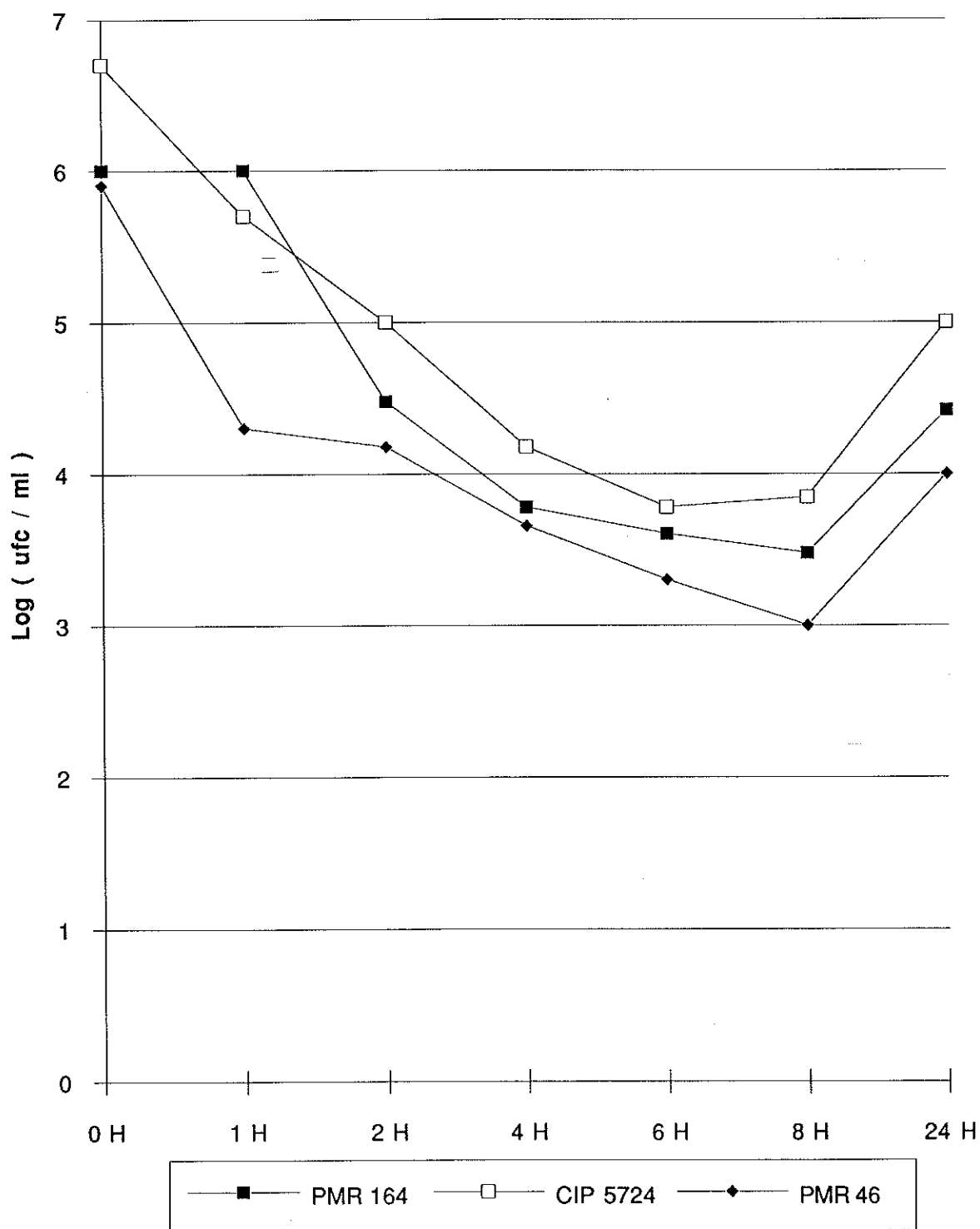


Figure 3 : cinétique de bactéricidie de la Clarithromycine à la concentration de 1 mg/l

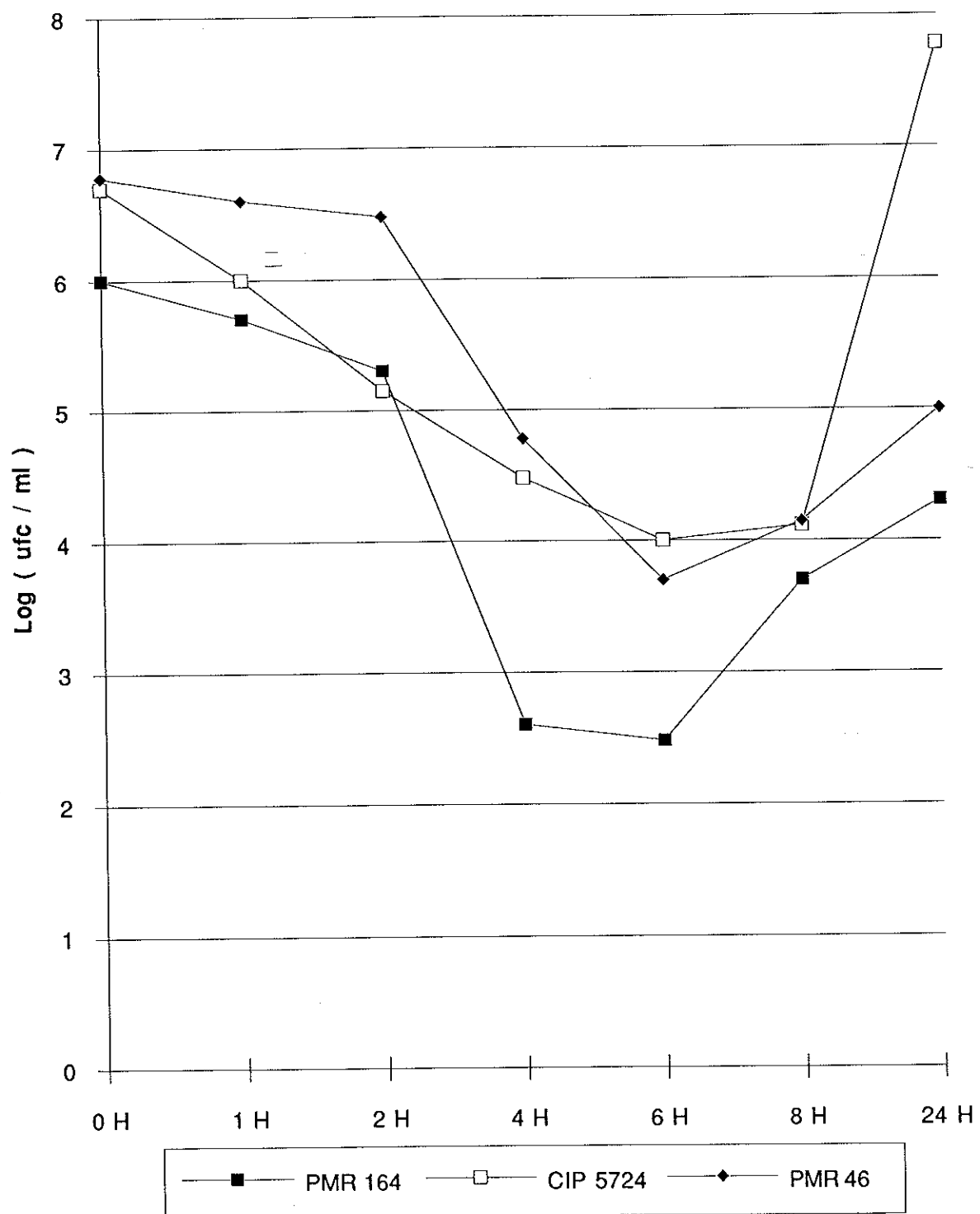


Figure 4 : cinétique de bactéricidie de la cefpodoxime
à la concentration de 0,06 mg/l

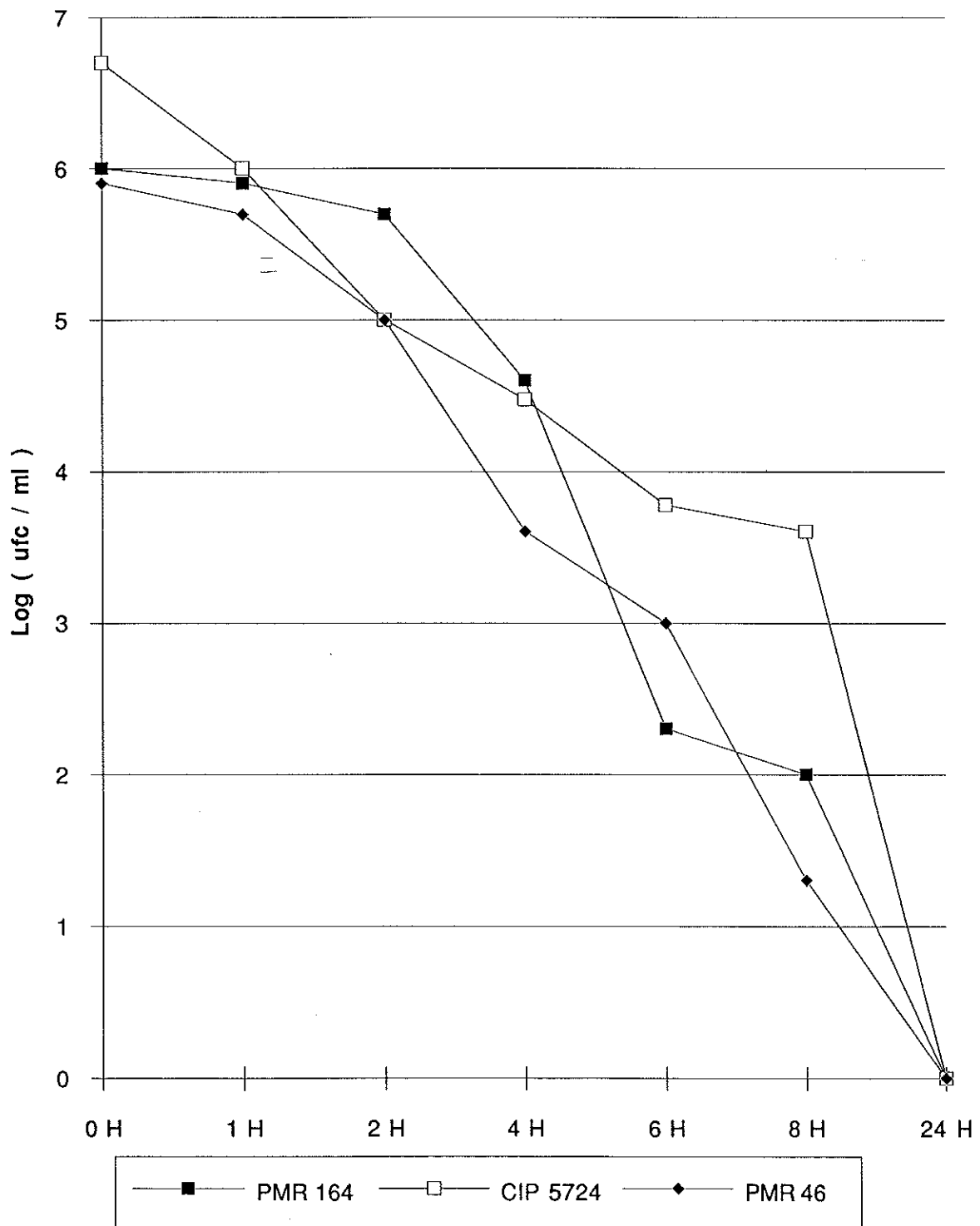


Figure 5 : cinétique de bactéricidie de la Cefpodoxime
à la concentration de 0,5 mg/l

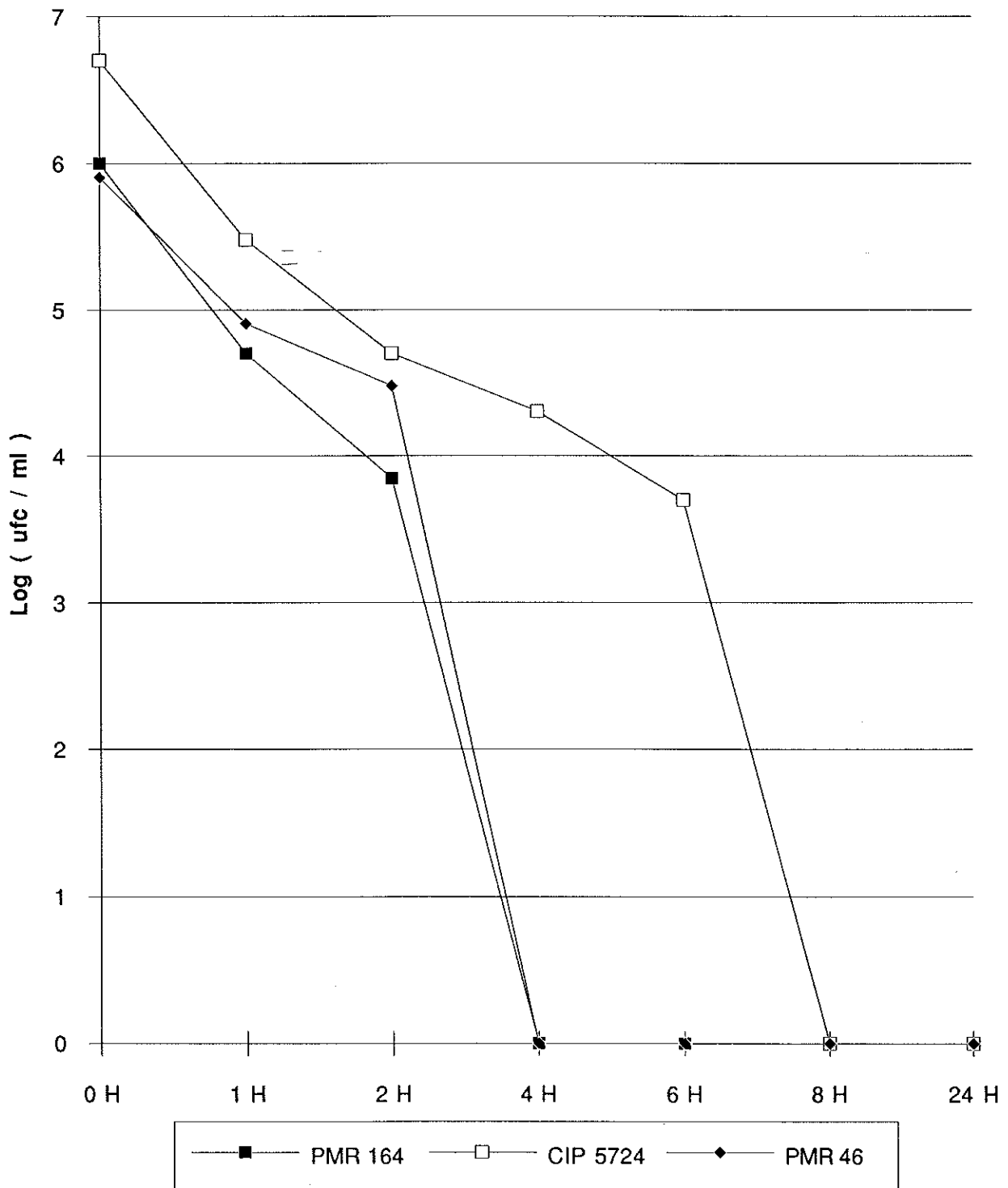


Figure 6 : cinétique de bactéricidie de l'amoxicilline
à la concentration de 1 mg/l

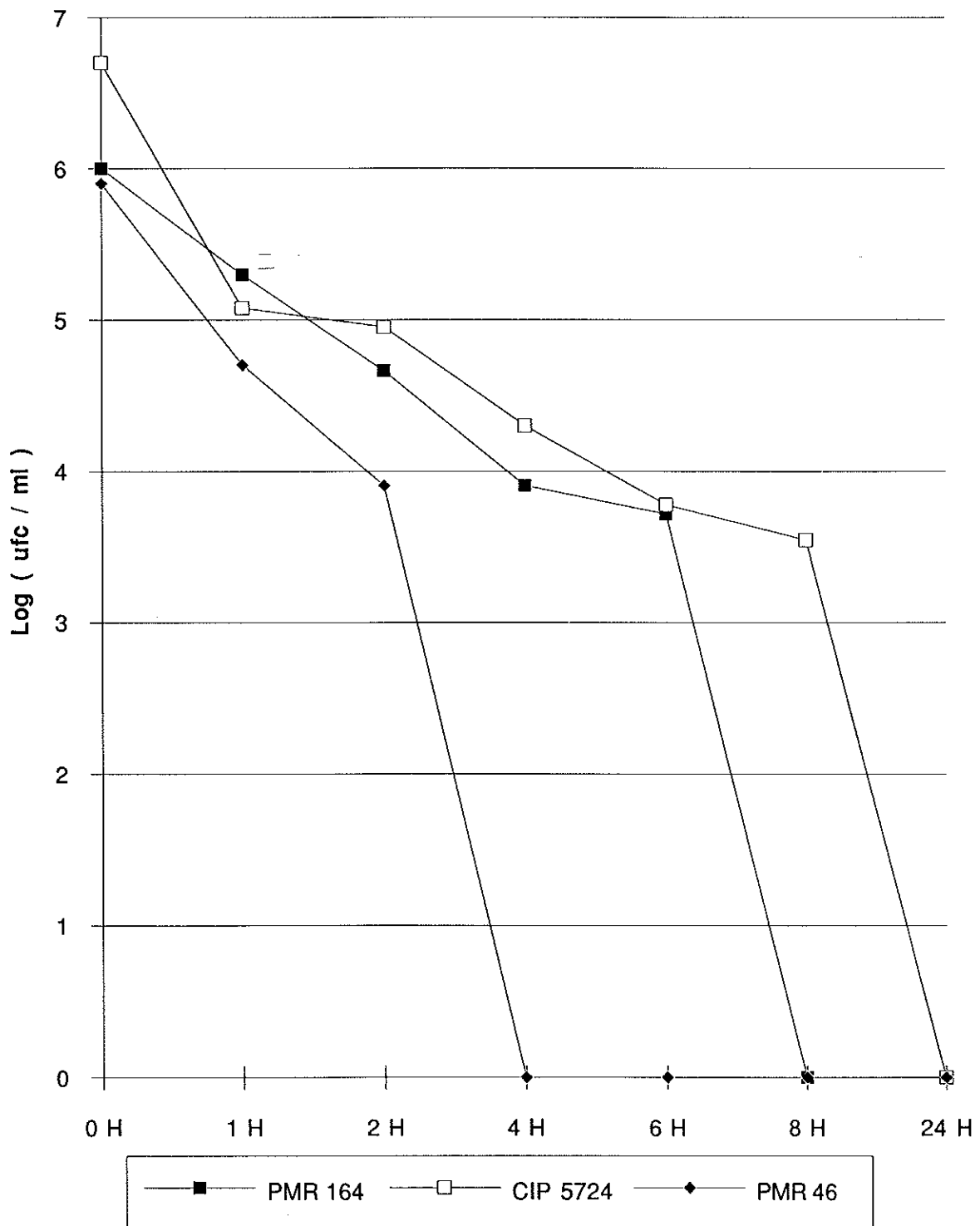


Figure 7 : cinétique de bactéricidie de l'amoxicilline
à la concentration de 2 mg/l

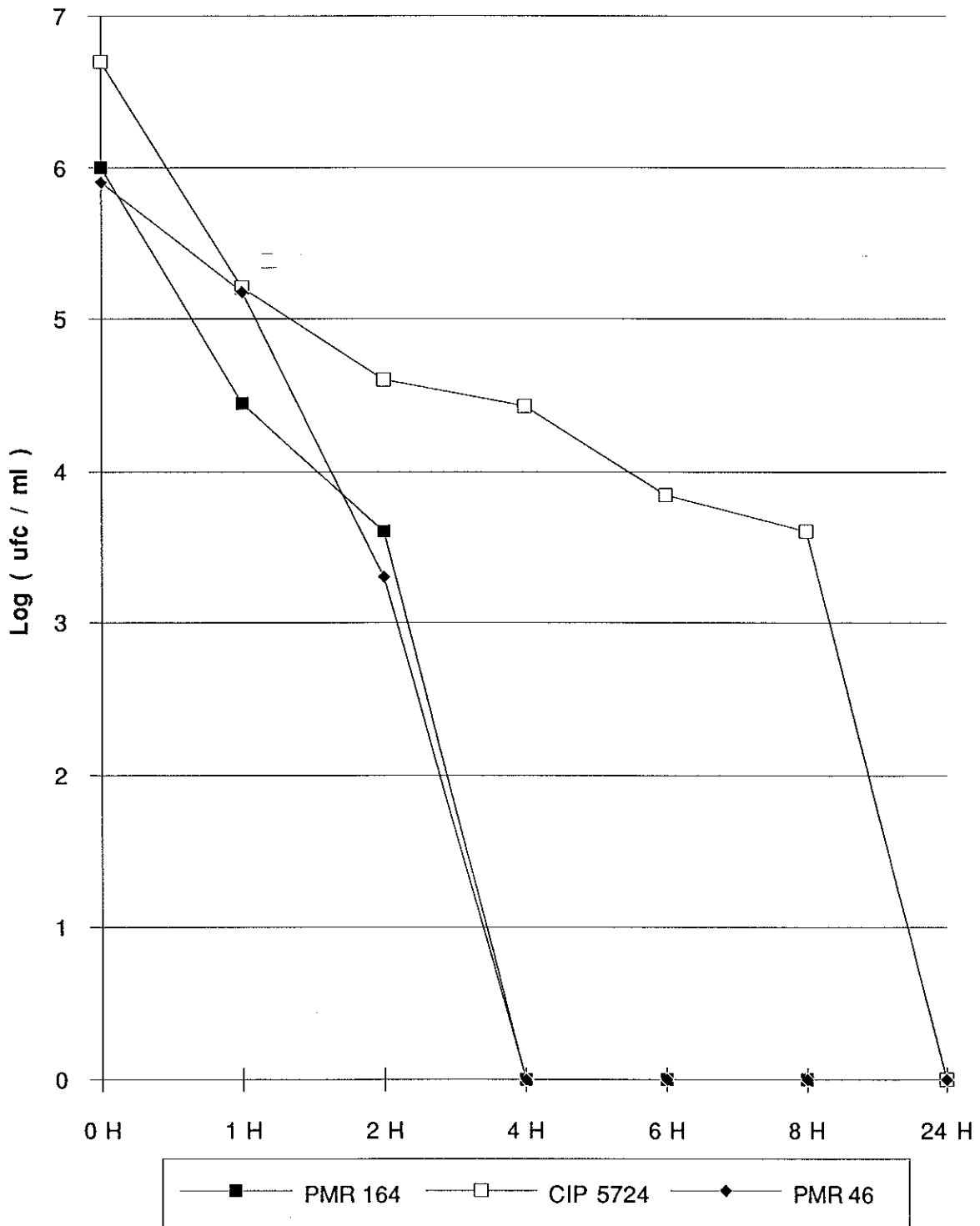


Figure 8 : cinétique de bactéricidie de la Sparfloxacin
à la concentration de 0,03 mg/l

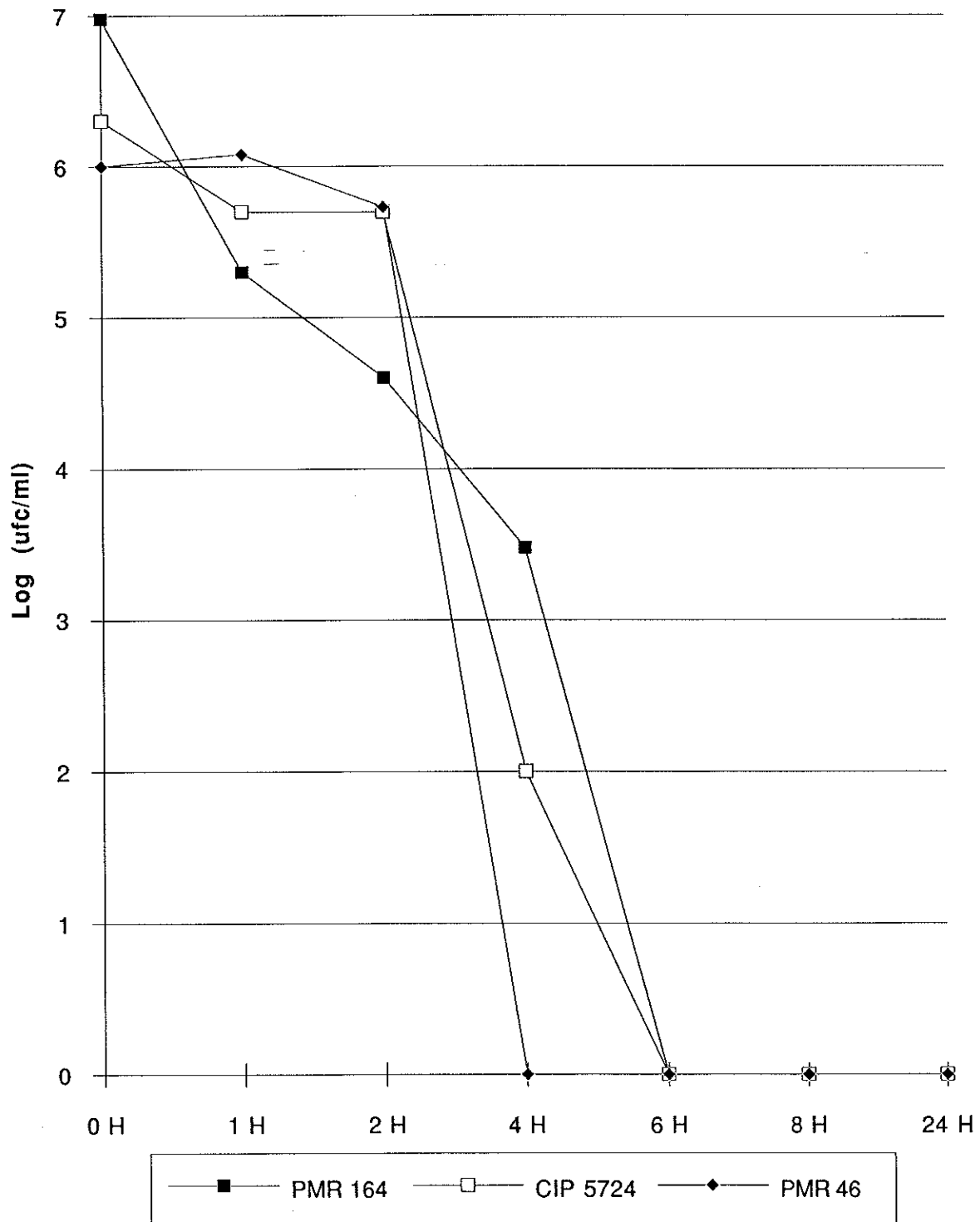


Figure 9 : cinétique de bactéricide de la Sparfloxacin
à la concentration de 0,5 mg/l

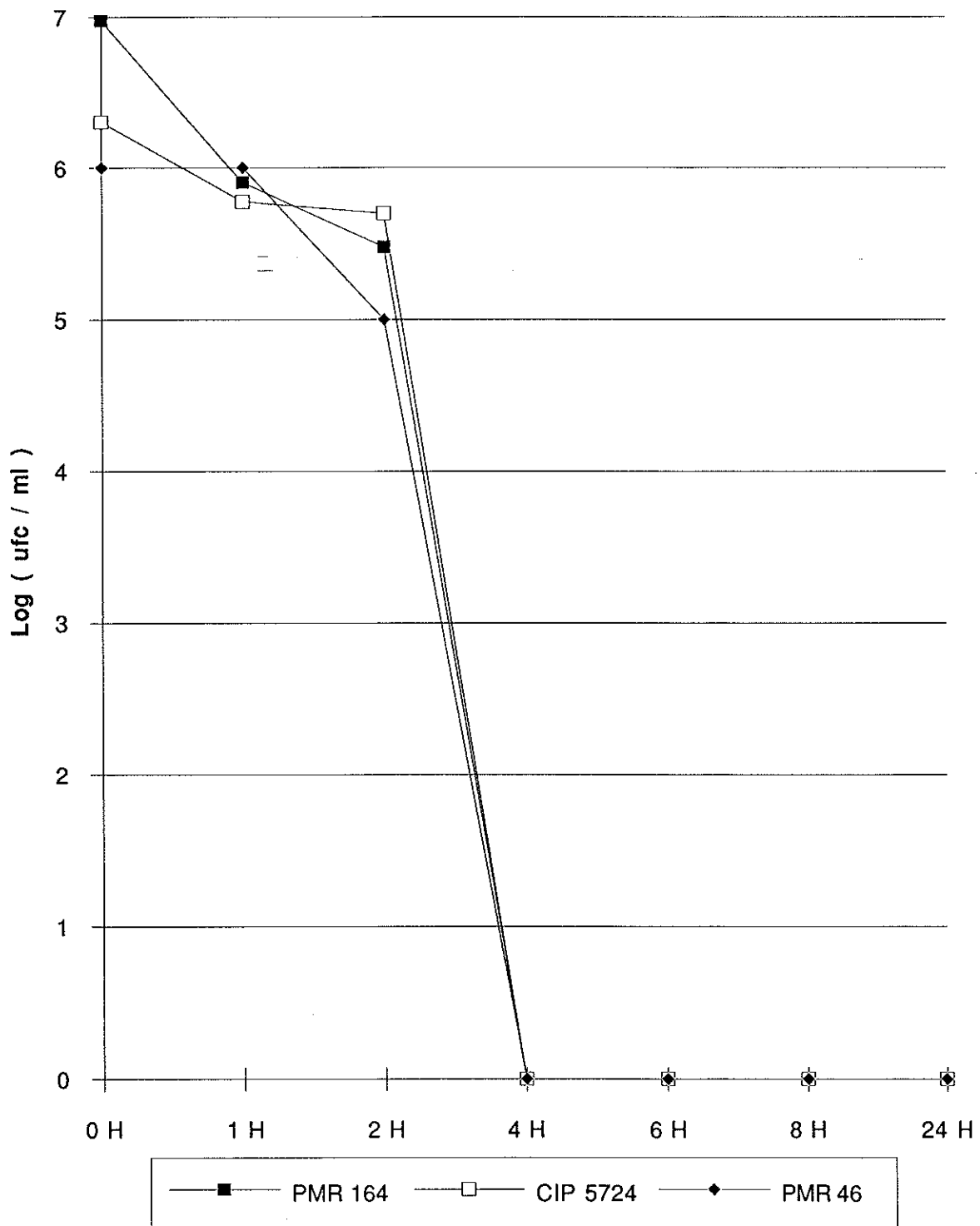


Figure 10 : cinétique de bactéricidie de la Ciprofloxacine à la concentration de 0,06 mg/l

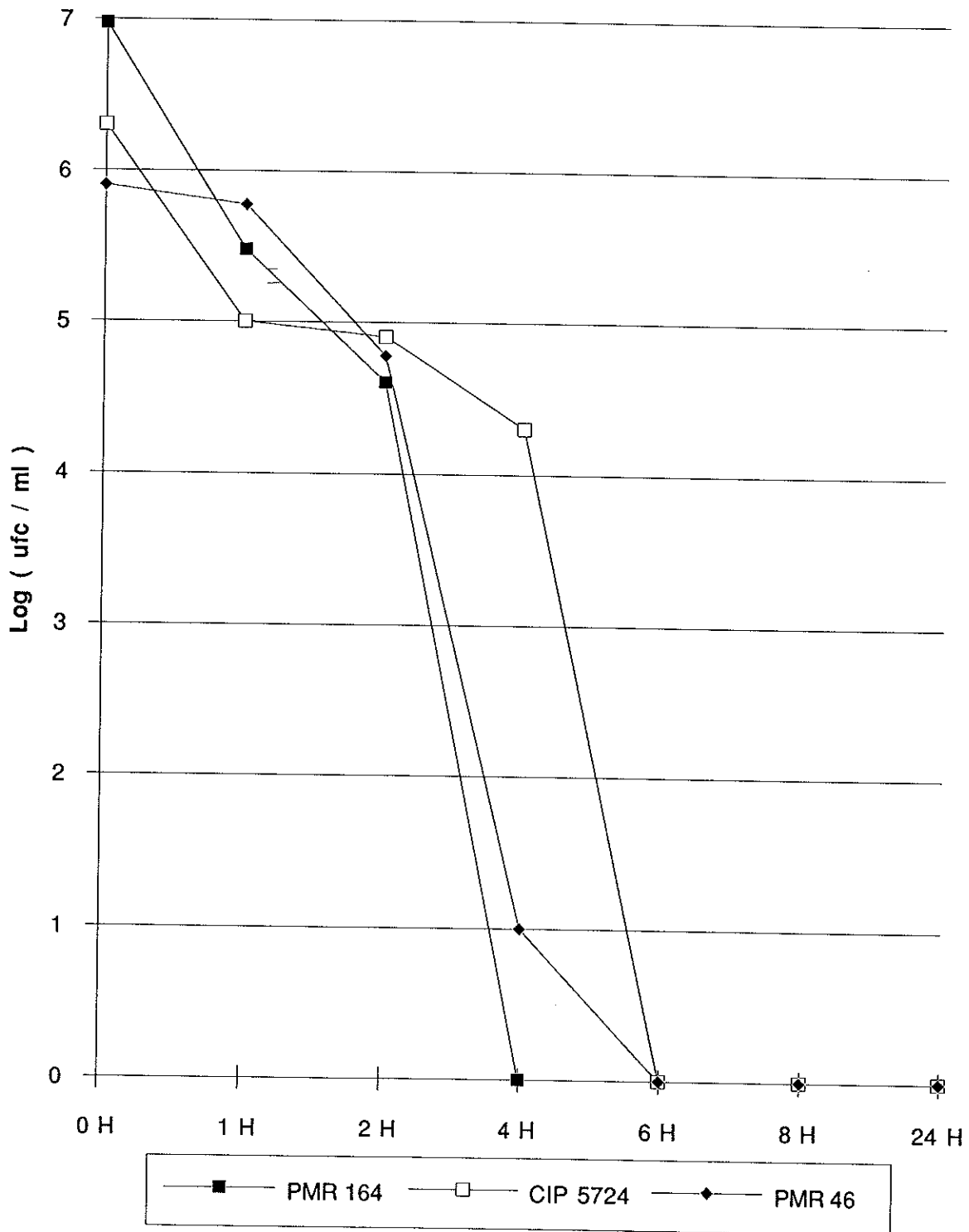


Figure 11 : cinétique de bactéricide de la ciprofloxacine
à la concentration de 0,5 mg/l

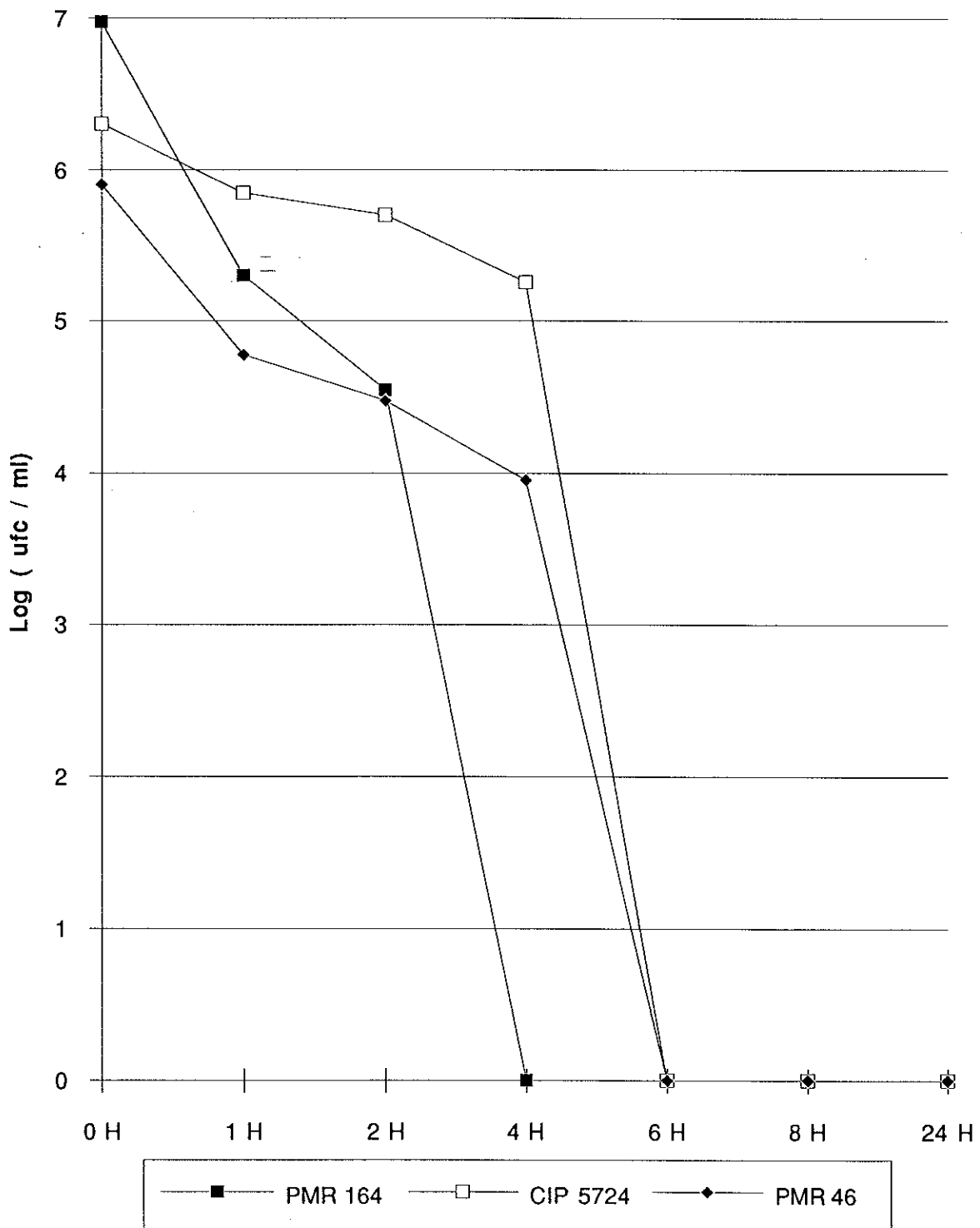


Figure 12: cinétique de bactéricidie de la doxycycline
à la concentration de 0,12 mg/l

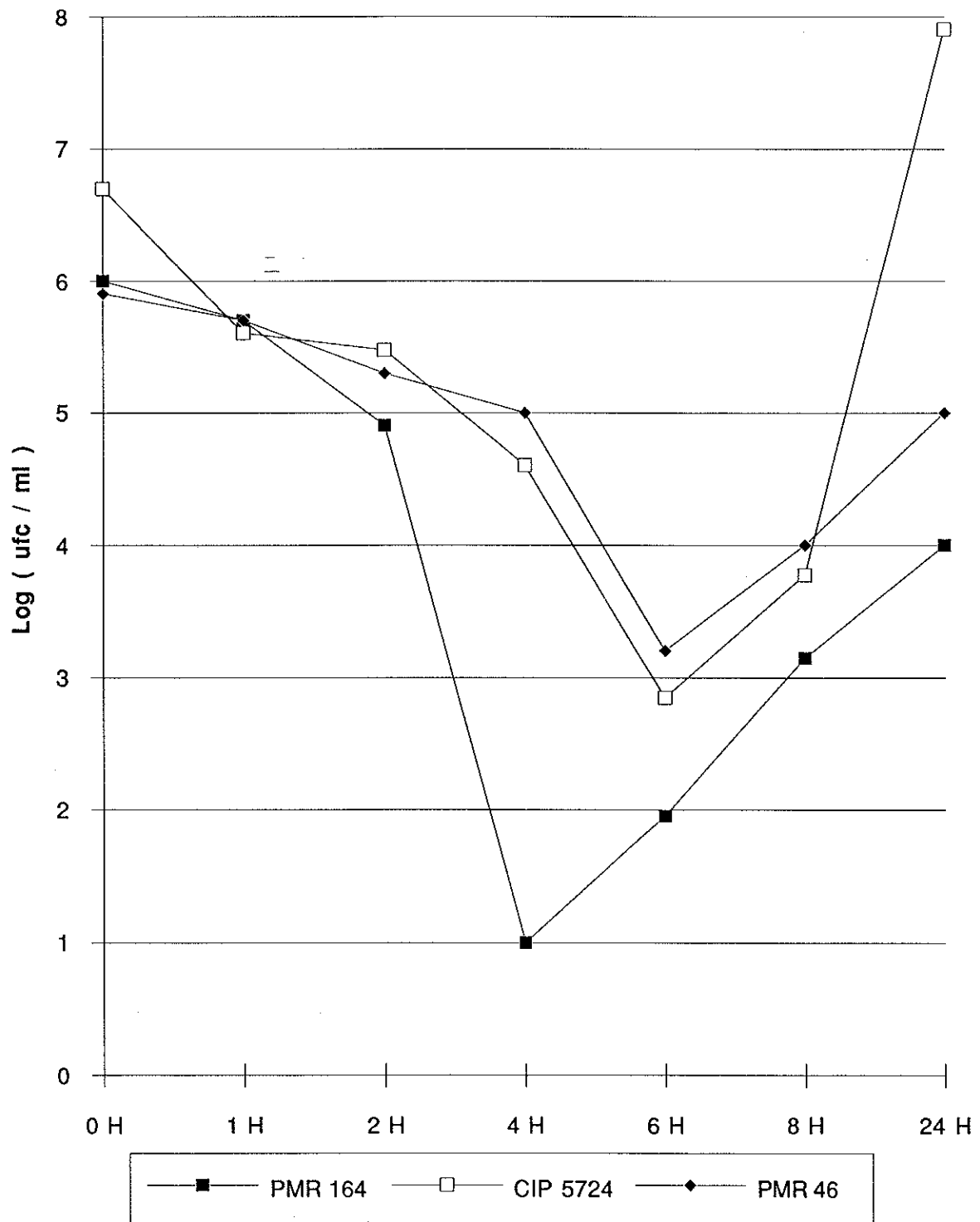


Figure 13 : cinétique de bactéricidie de la Doxycycline
à la concentration de 0,5 mg/l

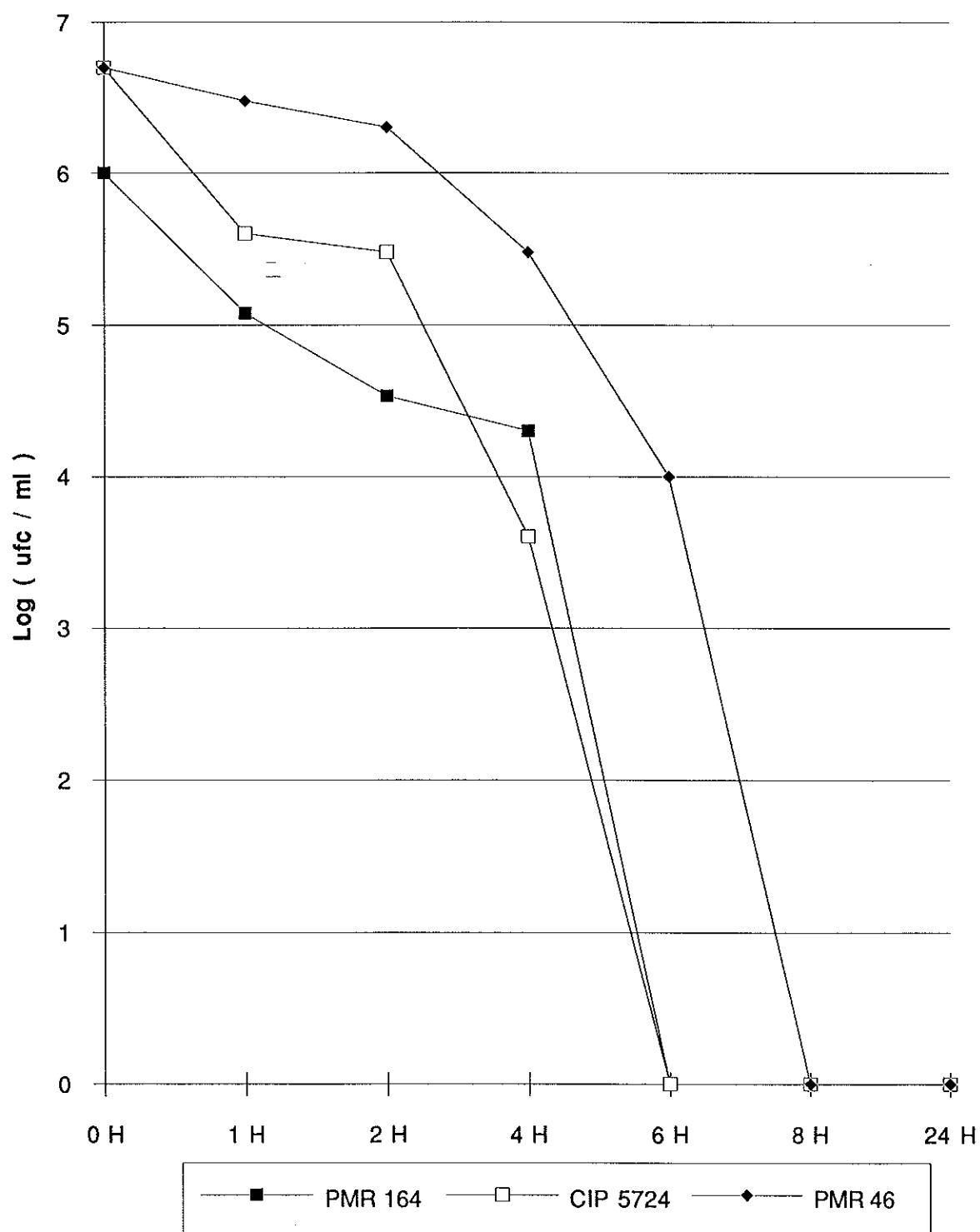


Figure 14 : cinétique de bactéricidie de la doxycycline
à la concentration de 2 mg/l

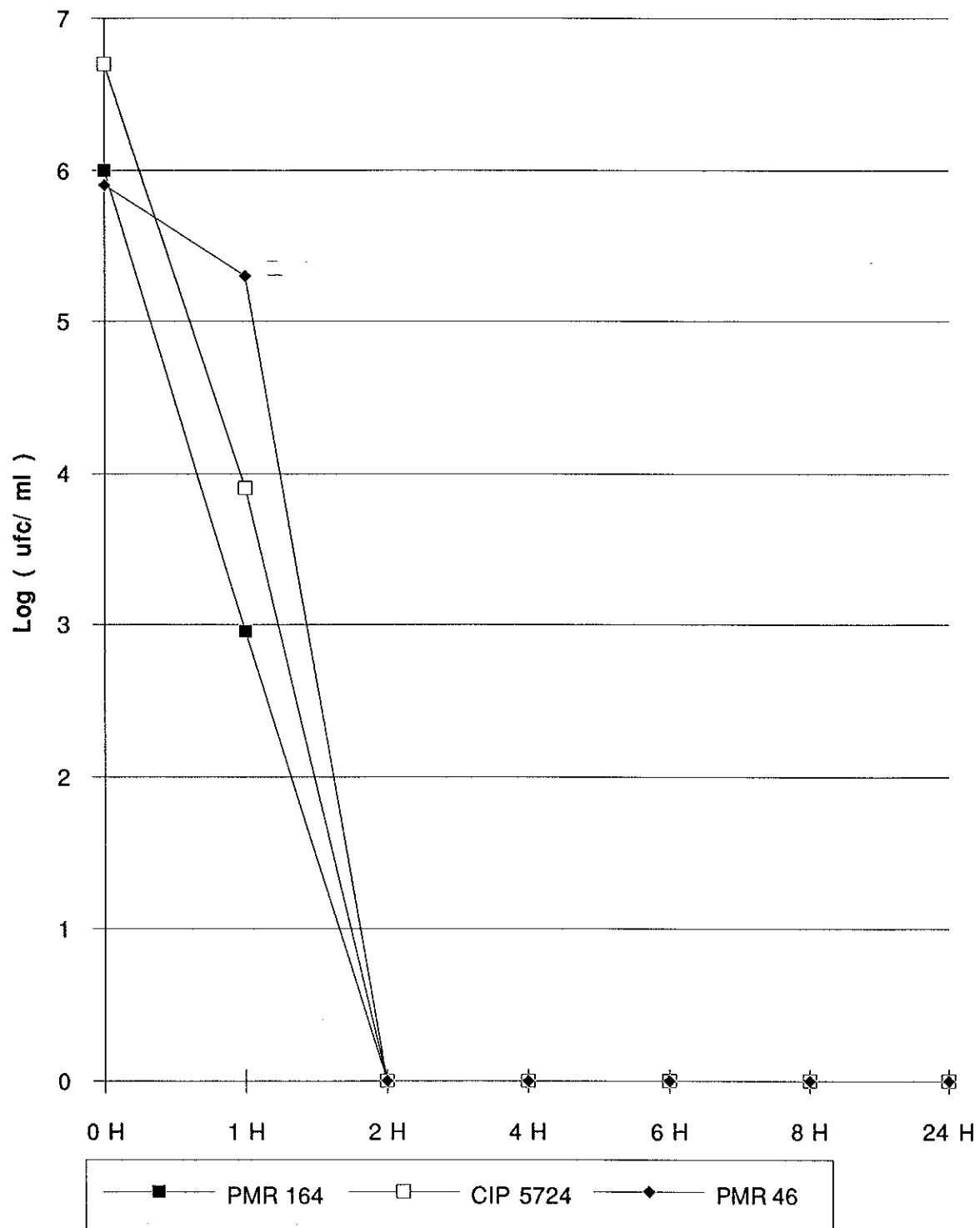


Tableau 8: indice descriptif TLog et indice d'activité TMB

	TLog			TMB		
	CIP 5724	PMR 46	PMR 164	CIP 5724	PMR 46	PMR 164
Clarithromycine						
0,5	60 ^a	100	60	— ^b	—	—
1	75	90	75	—	—	—
Doxycycline						
0,12	55	240	65	—	—	—
0,5	50	210	70	275	425	310
2	23	65	20	80	100	80
Cefpodoxime						
0,06	60	45	50	780	435	480
0,5	47	50	45	400	185	180
Amoxicilline						
1	120	50	90	780	180	420
2	40	90	37	780	170	350
Sparfloxacin						
0,03	80	60	35	240	200	260
0,5	70	60	50	195	200	210
Ciprofloxacine						
0,06	45	60	40	300	250	165
0,5	70	50	40	315	300	165

a : résultats exprimés en minutes

b : absence d'activité bactéricide

III. DISCUSSION.

Dans un premier temps nous discuterons nos résultats et nous essayerons de les comparer avec les données de la littérature puis dans un deuxième temps, nous entamerons une discussion plus générale sur les nouvelles possibilités de traitement des Pasteurelloses nécessitant une antibiothérapie bactéricide.

1. Détermination de la CMI

Les valeurs de CMI que nous avons trouvé correspondent bien à celles décrites par Stevens (65), Weber (70), Raffi (58). A la vue de ces seules CMI, nous concluons donc à la bonne activité de l'Amoxicilline et du Cefpodoxime, de la Clarithromycine et de la Doxycycline et surtout de la Ciprofloxacine et de la Sparfloxacine. Ces résultats sont retrouvés dans une étude de Goldstein et coll (33).

2. Détermination de la CMB et du rapport CMB/CMI

Là encore nos résultats correspondent à ceux décrits par Stevens, Raffi et Weber avec la mise en évidence d'une activité bactéricide pour les Béta-lactamines et les Quinolones et d'une activité bactériostatique pour les Tétracyclines et les Macrolides.

3. Cinétiques de bactéricidie

Les résultats obtenus complètent l'étude du comportement d'une population bactérienne en présence d'un antibiotique faite après un temps donné que sont les déterminations de CMI et de CMB. Ils nous montrent une très bonne activité bactéricide de la Sparfloxacinine et de la Ciprofloxacinine dont les valeurs des TMB apparaissent beaucoup plus intéressantes par rapport aux Béta-lactamines qui constituent le traitement bactéricide de choix actuel des Pasteurelloses ostéo-articulaires et systémiques.

Ces résultats permettent d'étayer quelques observations, déjà faites par des cliniciens, de guérison rapide par les nouvelles Quinolones (66, 2).

Nos études de cinétique de bactéricidie mettent aussi en évidence une activité bactéricide pour des concentrations relativement élevées de Doxycycline en comparaison aux fluoroquinolones et aux Béta-lactamines, et l'absence de bactéricidie, qu'elle que soit nos concentrations utilisées, de la Clarithromycine.

4. Discussion sur les molécules actuelles d'une antibiothérapie bactéricide.

Les Tétracyclines, utilisées à l'heure actuelle dans le traitement des Pasteurelloses d'inoculation semblent être d'une efficacité aléatoire, tantôt elles présentent une très bonne activité (11), mais parfois elles sont sources d'échecs thérapeutiques (10). Nos résultats *in vitro* sont corrélés à ces observations cliniques.

Les Macrolides ne font pas partie des molécules retenues pour le traitement d'une Pasteurellose. Nos courbes de cinétique le confirment.

Le traitement de choix actuel, pour une bonne activité bactéricide, est sans aucun doute les Béta-lactamines et particulièrement les Céphalosporines de deuxième et de troisième génération.

Mais l'apparition de souches productrices de Béta-lactamase (48), et la possibilité d'allergie aux Béta-lactamines, peut nous obliger à nous tourner vers d'autres molécules.

L'utilisation de nouvelles Quinolones systémiques peut constituer un apport thérapeutique intéressant en raison de leur très bonne activité sur les souches de *Pasteurella multocida.*, dès les plus faibles concentrations. Néanmoins elles ont l'inconvénient de ne pas être utilisables chez l'enfant.

CONCLUSION

L'infection de l'homme par une souche de *Pasteurella multocida* nécessite un traitement antibiotique efficace que ce soit une pasteurellose d'inoculation ou une pasteurellose systémique.

Les Tétracyclines ont été les molécules utilisées pendant plusieurs décennies, leur activité seulement bactériostatique en limite l'intérêt.

Nos résultats montrent que les Béta-lactamines, notamment l'Amoxicilline et les Céphalosporines de deuxième et de troisième génération, ainsi que les Quinolones ont une activité bactéricide intense et rapide. De plus il s'agit de molécules utilisables per os. Ces caractéristiques font de ces antibiotiques un traitement bien adapté vis à vis d'une pasteurellose. En effet les bêta-lactamases chez les souches de *Pasteurella multocida* isolées chez l'homme sont encore d'une grande rareté. Les Quinolones peuvent également avoir une place de choix pour traiter les pasteurelloses humaines.

BIBLIOGRAPHIE

- 1-ACAR J., BERGOGNE-BEREZIN E., CHABBERT Y. *et al.*
Communiqué 1992 du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.
Path. biol. 1992; 7: 741-748.
- 2-AKLI J., PIEDON A., GERMAIN M. *et al.*
Traitement des Pasteurelloses d'inoculation par la Péfloxacine: deux observations.
Med. Mal. Infect. 1989; 19: 422-423.
- 3-AVRIL J.L.
Pasteurella., *Actinobacillus*. In Bactériologie médicale. 2^{ème} édition.
LE MINOR L., VERON M.
Ed. FLAMMARION MEDECINE-SCIENCES 1989: 507-520.
- 4-AVRIL J. L., DONNIO P.Y.
Caractérisation des *Pasteurella* isolées chez l'homme.
Path. Biol. 1987; 35: 169-172.
- 5-AVRIL J.L., DONNIO P.Y., POUEDRAS P.
Selective medium for *Pasteurella multocida* and its use to detect oropharyngeal carriage in pigs breeders.
J. Clin. Microbiol. 1990; 28: 1438-1440.
- 6-AVRIL J.L., MESNARD R., DONNIO P.Y.
In vitro activities of Penicillin, Amoxicillin and certain Cephalosporins, including Cefpodoxime, against human isolates of *Pasteurella multocida*.
J. Antimicrob. Chemother. 1991; 28: 473-474.

7-BECQ-GIRAUDON B.

Propositions thérapeutiques dans la Pasteurellose.

Med. Mal. Infect. 1986; 16: 57-64.

8-BEYTOUT J., RAFFI F., GACHIGNAT F.

Formes systémiques des Pasteurelloses chez l'homme.

Med. Mal. Infect. 1986; 16: 28-35.

9-BEYTOUT J., RIVOIRE D., GARAT P. *et al.*

Le traitement des blessures d'origine animale doit tenir compte du risque de Pasteurellose.

Med. Mal. Infect. 1983; 13: 412-419.

10-BOIVIN M., LETERME L.

Etude de cinq cas de Pasteurelloses bronchopulmonaires et enquête dans les élevages contaminés.

Med. Mal. Infect. 1974; 4: 37-40.

11-BRISOU B., ABRALL J., LETERNIER J.P.

Septicémies et bactériémies à *Pasteurella multocida*. Revue générale à propos d'un nouveau cas personnel consécutif à une morsure de chat.

Med. Mal. Infect. 1982; 11: 210-216.

12-BURDIN J.C., LION C.

Diagnostic biologique des infections à *Pasteurella*.

Med. Mal. Infect. 1986; 16: 40-44.

13-CAILLON J., DRUGEON H.

Dénombrement des bactéries survivantes. In Bactéricidie.

COURVALIN P., DRUGEON H., FLANDROIS J.P. *et al.*

Ed. MALOINE, Paris, 1990: 127-137.

14-CANTON P., MAY T., BRAHY L.

Diagnostic clinique des Pasteurelloses d'inoculation chez l'homme.

Med. Mal. Infect. 1986; 16: 23-27.

15-CARTER G.R.

Further observations on typing *Pasteurella multocida* by the indirect hemagglutination test.

Can. J. Comp. Med. Vet. 1962; 26: 238-240.

16-CHARDON H., ZARROUK F., LAGIER E. *et al.*

Description d'une nouvelle observation de septicémie à *Pasteurella multocida*.

Med. Mal. Infect. 1983; 13: 520-522.

17-CHOUDAT D., LE GOFF C., PAUL G. *et al.*

Animaux familiers et prévalence des anticorps anti *Pasteurella multocida* dans une population urbaine.

Med. Mal. Infect. 1986; 1: 13-17.

18-CHRISTOL D.

Sur les Pasteurelloses humaines par inoculation.

Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 1979; 1: 135-140.

19-COLLINS F.M.

Mechanisms of acquired resistance to *Pasteurella multocida* infection: a review.

Cornell Veterinarian. 1977; 67: 103-138.

20-CORCOS A., BREIL B., LEBAS J.

Pour un traitement précoce par les cyclines des Pasteurelloses d'inoculation.

Vie Med. 1981; 62: 1705-1706.

21-COURVALIN P., DRUGEON H., FLANDROIS J.P. *et al.*

Cinétique de l'activité bactéricide des antibiotiques in Bactéricidie.

Ed. MALOINE, Paris, 1990: 343-344.

22-COURVALIN P., DRUGEON H., FLANDROIS J.P. *et al.*

Détermination de la CMI et de la CMB en milieu liquide. in Bactéricidie.

Ed. MALOINE, Paris, 1990: 335-336.

23-COURVALIN P., GOLSTEIN F., PHILIPPON A. *et al.*

L'antibiogramme.

Paris, Bruxelles. MPC-Videom, 1985.

24-DAVID H., PETERS AND STEPHEN P. CLISSOLD.

Clarithromycine. A review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic potential.

Drugs. 1992; 44: 117-164.

25-DONNIO P.Y., AVRIL J.L., ANDRE P.M. *et al.*

Dermonecrotic toxin production by strains of *Pasteurella multocida* isolated from man.

J. Med. Microbiol. 1991; 34: 333-337.

26-DRABICK J.J., GASSER R.A., SAUNDRES N.B. *et al.*

Pasteurella multocida pneumonia in a man with AIDS and nontraumatic feline exposure.

Chest. 1993; 1: 7-11.

27-DRUGEON H.B.

Intérêt de l'appréciation de la vitesse de bactéricidie dans la décision thérapeutique.

Med. Mal. Infect. 1992; 22: 435-436.

28-DRUGEON H., LEGALLOU F., CAILLON J.

Méthodes d'étude de l'activité bactéricide in Bactéricidie.

COURVALIN P., DRUGEON H., FLANDROIS J.P. *et al.*

Ed MALOINE 1990: 113-126.

29-ESCANDE F.

Etude de l'activité *in vitro* de 18 antibiotiques sur les bactéries du genre *Pasteurella* et bactéries apparentées.

Med. Mal. Infect. 1986; 16: 45-51.

30-ESCANDE F.

Pasteurella, bactéries apparentées et *Actinobacillus*..

Communication personnelle.

31-FLANDROIS J. P., CARRET G., CARRE C.*et al.*

Expression des résultats des méthodes d'étude de bactéricidie in Bactéricidie.

COURVALIN P., DRUGEON H., FLANDROIS J.P. *et al.*

Ed MALOINE. Paris. 1990: 139-155.

32-GOLDSTEIN E.J.C., CITRON D.M.

Comparative activities of Cefuroxime, Amoxicillin-Clavulanic acid, Ciprofloxacin, enoxacin and ofloxacin against aerobic and anaerobic bacteria isolates from bite wounds.

Antimicrob. agents and chemother. 1988; 32: 1143-1148.

33-GOLDSTEIN E.J.C., CITRON D.M.

Comparative susceptibilities of 173 aerobic and anaerobic bite wound isolates to Sparfloxacin, Temafloxacin, Clarithromycin, and older agents.

Antimicrob. Agents and Chemother. 1993; 37: 1150-1153.

34-GOLDSTEIN E.J.C., CITRON D.M., RICHWALD G.A.*et al.*

Lack of *in vitro* efficacy of oral forms of certain Cephalosporins, Erythromycin, and Oxacillin against *Pasteurella multocida*.

Antimicrob. agents and chemother. 1988; 32: 213-215.

35-GOLDSTEIN E.J.C., CITRON D.M., VAGVOLGYI A.E.*et al.*

Susceptibilities of bite wound bacteria to seven oral agents, including RU985 a new Erythromycin: considerations in choosing empiric therapy.

Antimicrob. agents and chemother. 1986; 29: 556-559.

36-HANNAN P.C., O'HANLON P.J., ROGERS N.H.

In vitro evaluation of various quinolone antibacterial agents against veterinary mycoplasmas and porcine respiratory bacterial pathogens. Res. Vet. Sci. 1989; 46: 202-211.

37-HIRSH D.C., HANSEN L.M., DORFMAN L.C. *et al.*

Resistance to antimicrobial agents and prevalence of R plasmids in *Pasteurella multocida* from turkeys. Antimicrob. agents and chemother. 1989; 33: 670-673.

38-HOLST E., ROLLOF J., MIORNER H.

In vitro activities of Cefcanel and some other Cephalosporins against *Pasteurella multocida*. Antimicrob. agents and chemother. 1989; 12: 2142-2143.

39-ISENBERG H.D.

Antimicrobial susceptibility testing: a critical evaluation. J. Antimicrob. Chemother. 1988; 22: 73-86.

40-JACQUES M., LEBRUN A., FOIRY B. *et al.*

Effects of antibiotics on the growth and morphology of *Pasteurella multocida*. J. Gen. Microbiol. 1991; 137: 2663-2668.

41-JOLY B., MARTEL J.L., MICHEL R. *et al.*

Sensibilité aux antibiotiques et production de bétalactamase chez les souches de *Pasteurella* d'origine bovine isolées en France. Med. Mal. Infect. 1986; 16: 52-56.

42-KOJIMA T., INOUE M., MITSUHASHI S.

In vitro activity of AT4140 against clinical bacterial isolates.
Antimicrob. Agents and Chemother. 1989; 33: 1980-1988.

43-LEGALLOU F.

Inhibiteurs d'antibiotiques in Bactéricidie.

COURVALIN P., DRUGEON H., FLANDROIS J.P. *et al.*
Ed MALOINE. Paris. 1990: 337-342.

44-LION C., MORY F., CONROY M.C. *et al.*

Sensibilité aux antibiotiques de *Pasteurella multocida* et de germes
voisins (groupes bactériens M5 et EF4).

Path. Biol. 1986; 10: 1061-1066.

45-LIVRELLI V., PEDUZZI J., JOLY B.

Sequence and molecular characterization of the ROB1 betalactamase
gene from *Pasteurella haemolytica*.

Antimicrob. Agents and Chemother. 1991; 35: 242-251.

46-LEWIN C.S., MORRISSEY I., SMITH J.T.

The bactericidal activity of Sparfloxacin.

Journal of Antimicrobial Chemother. 1992; 30: 625-632.

47-MAY T., MARCHOU B., CANTON P. *et al.*

Pasteurelloses par inoculation cutanée. Résultats d'une étude
multicentrique.

Med. Mal. Infect. 1986; 16: 36-39.

48-MESNARD R., DONNIO P.Y., DENIS F. *et al.*

Une deuxième souche de *Pasteurella multocida* d'origine humaine productrice d'une bêta-lactamase.

Med. Mal. Infect. 1989; 19= 422-423.

49-NAKAMURA S., MINAMI A., NAKATA K. *et al.*

In vitro and *in vivo* antibacterials activities of AT4140, a new broad-spectrum Quinolone.

Antimicrob. Agents and Chemother. 1989; 33= 1167-1173.

50-NOEL G.J., TEELE D.W.

In vitro activities of selected new and long-acting Cephalosporines against *Pasteurella multocida*.

Antimicrob. Agents and Chemother. 1986; 29: 344-345.

51-OBERHOFFER T.H.

Characteristics and biotypes of *Pasteurella multocida* isolates from humans.

J. Clin. Microbiol. 1981; 13: 566-571.

52-PETERSON L.R. AND SHANHOLTZER C.J.

Tests for bactericidal effects of antimicrobial agents: technical performance and clinical relevance.

Clin. Microbiology reviews. 1992; 5: 420-432.

53-PHILIPPON A., JOLY B., REYNAUD D. *et al.*

Characterization of a betalactamase from *Pasteurella multocida*.

Ann. Inst. Pasteur 1986; 137A: 153-158

54-PIJPAS A., VAN-KLINGEREN B., SCHOEVERS E.J. *et al.*

In vitro activity of five tetracyclines and some other antimicrobial agents against four porcine respiratory tract pathogens.

J. Vet. Pharmacol. Ther. 1989; 12: 267-276.

55-POUEDRAS P., ANDRE P.M., DONNIO P.Y. *et al.*

Cleavage of immunoglobulin A₁, A₂ and G by proteases from clinical isolates of *Pasteurella multocida*.

J. Med. Microbiol. 1992; 37: 128-132.

56-POST K.W., COLE N.A., RALEIGH R.H.

In vitro antimicrobial susceptibility of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* recovered from cattle with bovine respiratory disease complex.

J. Vet. Diagn. Invest. 1991; 3: 124-126.

57-RAEMDONCK D.L., TANNER A.C., TOLLING S.T. *et al*

In vitro susceptibility of avian *E.coli* and *Pasteurella multocida* to Danofloxacin and five other antimicrobials.

Avian Dis. 1992; 36: 964-967.

58-RAFFI F.

Les infections humaines à *Pasteurella multocida*. Revue générale. 24 cas observés au CHR de Nantes.

Mémoire pour le concours de la Médaille d'or. 1985.

59-RICHARD C.

Recommandations aux auteurs.

Ass. Anc. El. Inst. Pasteur; 33.

60-RIMLER R.B. AND RHOADES K.R.

Serogroup F, a new capsule serogroup of *Pasteurella multocida*.

J. Clin. Microbiol. 1987; 25: 615-618.

61-ROSENAU A., LABIGNE A., ESCANDE F. *et al.*

Plasmid-mediated ROB1 betalactamase in *Pasteurella multocida* from a human specimen.

Antimicrob. Agents and Chemother. 1991; 35: 2419-2422.

62-ROSENAU A., LAPRTE-IRON F., BOULOT-TOLLE M. *et al.*

Infection pulmonaire humaine par une souche de *Pasteurella multocida* productrice de bêta-lactamase.

Med. Mal. Infect. 1988; 10: 440-444.

63-SHIKUMA C.C., OVERTURF G.D.

Antibiotic susceptibility of *Pasteurella multocida*.

Eur J. Clin. Microbiol. Correspondence. 1984; 5: 518-519.

64-SIROT J.

Evaluation de l'activité antibactérienne des antibiotiques *in vitro* in: Bactériologie médicale 2^{ème} édition

LE MINOR L., VERON M.

Ed. FLAMMARION MEDECINE-SCIENCES 1989: 297-315.

65-STEVENS D.L., HIGBEE J.W., OBERHOFER T.R. *et al.*

Antibiotic susceptibilities of human isolates of *Pasteurella multocida*.

Antimicrob. Agents and Chemother. 1979; 16: 322-324.

66-TAILLAN B., FUZIBET J.G., VINTI H. *et al.*

Traitement des Pasteurelloses d'inoculation par les Quinolones de troisième génération.

Med. Mal. Infect. 1989; 19= 421-422.

67-THABAUT A., MEYRAN M.

La détermination de la concentration minimale inhibitrice bactéricide: influence de différents facteurs techniques.

Path. Biol. 1984; 32: 351-354.

68-UTSUI Y., INOUE M. AND MITSUHASHI S.

In vitro and *in vivo* antibacterial activities of CS 807 a new oral Cephalosporine.

Antimicrob. Agents and Chemother. 1987; 31: 1085-1092.

69-VARGA J., MAGYAR K., FODOR L. *et al.*

Prevention and treatment of atrophic rhinitis in pigs with Getroxel, Clorquinaldol and oxytetracycline.

Acta. Vet. Hung. 1991; 39: 127-135.

70-WEBER D.J., WOLFSON J.S., SWARTZ M.N. *et al.*

Pasteurella multocida infections. Report of 34 cases and review of the literature.

Medicine. 1984; 63: 133-154.

TABLE DES MATIERES

	pages
INTRODUCTION	4
PREMIERE PARTIE : REVUE DE LA LITTERATURE	6
I. HISTORIQUE	7
II. RAPPEL SUR <i>PASTEURELLA MULTOCIDA</i>	8
1. Classification	8
2. Habitat et épidémiologie	9
3. Pouvoir pathogène de <i>Pasteurella multocida</i>	9
3.1. Infections animales à <i>Pasteurella multocida</i>	9
3.2. Infections humaines à <i>Pasteurella multocida</i>	10
3.2.1. La pasteurellose d'inoculation	
3.2.2. Pasteurelloses systémiques	
4. Physiopathologie de l'infection à <i>Pasteurella multocida</i>	11
5. Etude bactériologique	12
5.1. Morphologie	12
5.2. Caractères cultureux	12
5.3. Caractères biochimiques	13
5.4. Caractères antigéniques	13
6. Sensibilité de <i>Pasteurella multocida</i> aux antibiotiques	14

III.DETERMINATION DE L'ACTIVITE DES ANTIBIOTIQUES <i>IN VITRO</i>	16
DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL	19
I. MATERIEL ET METHODES	20
1. Souches étudiées	20
2. Antibiotiques	21
3. Milieux	22
4. Méthodes	23
4.1. Contrôles et témoins	23
4.2. Etude de la sensibilité aux antibiotiques	24
4.2.1. Technique de bactériostase	
4.2.2. Technique de bactéricidie	
-détermination de la CMB	
-étude des cinétiques de bactéricidie	
II. RESULTATS	27
1. Détermination de la CMI	27
2. Détermination de la CMB et du rapport CMB/CMI	27

3. Cinétiques de bactéricidie: exploitation des courbes	28
III. DISCUSSION	49
1. Détermination de la CMI	49
2. Détermination de la CMB et du rapport CMB/CMI	49
3. Cinétiques de bactéricidie	50
4. Discussion sur les molécules actuelles d'une antibio- thérapie bactéricide	50
CONCLUSION	52
BIBLIOGRAPHIE	54

RESUME

Ce travail a étudié l'activité bactéricide de six antibiotiques ayant une activité, appartenant à quatre familles, Béta-lactamines, Tétracyclines, Macrolides, Quinolones, vis à vis de souches de *Pasteurella multocida*. Nous avons effectué des mesures de CMI, de CMB et des cinétiques de bactéricidie. Nous avons confirmé l'activité seulement bactériostatique de la Doxycycline et de la Clarithromycine. Nous avons montré une activité bactéricide rapide et intense de l'Amoxicilline, de la Cefpodoxime, de la Ciprofloxacine et de la Sparfloxacine. Nous proposons donc les Béta-lactamines et les Quinolones systémiques pour un traitement efficace et adapté dans les pasteurelloses humaines.

Mots-clés

Antibiotique

Bactéricidie

Béta-lactamines

Macrolides

Pasteurella multocida

Quinolones

Tétracyclines