

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Ghardaia



Faculté des Sciences de la Nature et de Vie et Sciences de la Terre

Département de Biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

En : *Science biologiques*

Spécialité : Biochimie appliquée

Par : ACHOUR Bahmed

Thème

**Effet de la concentration de l'agar agar et de la période d'incubation
sur le diamètre d'inhibition et le résultat de l'antibiogramme de
Pseudomonas aeruginosa "ATCC 27853" et *Staphylococcus aureus*
"ATCC 25923"**

Soutenu publiquement, le 23/06/2019, devant le jury composé de :

M. S. BELGHIT	Maitre de Conférences B	Univ. de Ghardaïa	Président
M. N. BOURAS	Professeur	Univ. de Ghardaïa	Directeur de mémoire
M. Y. DAOUDI	Ingénieur	Laboratoire Essalam	Co-Directeur de mémoire
M. M. KRAIMAT	Maitre-Assistant A	Univ. de Ghardaïa	Examineur

Année universitaire : 2018-2019

A mon jury

Président vous avez bien voulu présider mon jury, soyez en vivement
remercié.

Examineur vous avez accepté d'examiner ce modeste travail, vous êtes à
mes yeux une personnalité déterminante par l'appréciation finale de mon travail,
acceptez mes plus vifs remerciements

Que monsieur le président et les membres de cet honorable jury qui me fait
l'honneur d'évaluer ce modeste travail trouvent ici, l'expression de mon infinie
gratitude et l'assurance de ma haute considération.

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage et la force d'affronter toutes les difficultés.

Mes remerciements les plus distingués à mon encadreur professeur **BOURAS Nouredine** pour l'orientation, la confiance, la patience, la générosité qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port. Qu'il trouve dans ce travail un hommage vivant à sa haute personnalité.

Mes remerciements à mon Co-encadreur **DAOUDI Yacine** qui n'a ménagé aucun effort pour m'orienter et m'éclairer jusqu'à ma soutenance et qui a consenti de lourds sacrifices à mener avec moi ce travail. Merci infiniment.

Je remercie aussi Mr. **KRAIMAT Mohammed**, maitre-assistant à l'université de Ghardaïa, de m'avoir aidée à affiner les analyses statistiques et pour sa disponibilité. Qu'il soit assuré de ma profonde gratitude et ma vive reconnaissance.

Mon profond respect au docteur **DELMA Fatima Zohra**, directrice de laboratoire d'analyses médicales Essalam, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de mettre à ma disposition le matériel nécessaire pour mener à bien ce travail. Ainsi, mes remerciements à l'ensemble du personnel pour leur gentillesse.

Je voudrais également exprimer toute ma gratitude et mes remerciements à Monsieur **HADJADJ Sofiane**, directeur de laboratoire d'analyses médicales EL AMEL OUARGLA, pour son aide et sa disponibilité

Aussi je tiens à remercier Dr **BOUDISSA Karim** et Dr **HAMMOUDI Karim**
de la clinique EL-DEY, **ABISMAIL Aoumeur**, **BENNACER Slimane** et
DAOUDI Smail pour les services rendus.

Enfin mes remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la
réalisation de ce mémoire.

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Ma mère, tu as œuvré pour ma réussite, de par ton amour, ton soutien

Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse

te combler à mon tour.

La mémoire de mon père,

qui a été toujours dans mon esprit et dans mon cœur, je te dédie aujourd'hui ma réussite. Que Dieu, le miséricordieux, t'a accueille dans son éternel paradis.

Ma très chère épouse

Mes enfants Imane, Slimane, Youcef et Yasmine

Et à tous mes proches, et plus spécialement, mes sœurs et mes frères.

Résumé

L'antibiogramme est une technique de routine d'analyse médicale dont le but est d'aider le médecin traitant à prescrire au patient l'antibiotique le plus approprié. Le principe de cette technique consiste à placer la culture de bactéries en cause de l'infection en présence des antibiotiques, normalement efficaces, et à observer les conséquences sur le développement et la survie de celle-ci en mesurant le diamètre des zones translucides autour des disques d'antibiotiques (zones d'inhibition). Afin de garantir des résultats fiables et reproductibles, cette technique est standardisée. Cependant, dans des situations particulières le technicien de laboratoire doit modifier un ou plusieurs paramètres de la technique pour palier à cette situation.

Dans notre étude nous avons évalué l'impact de changements de la concentration d'agar-agar et le temps d'incubation sur le diamètre de la zone d'inhibition et voir si cela pouvait affecter ou non l'interprétation de l'antibiogramme en se référant aux valeurs critiques décrites par un des organismes régulateurs. Nous avons réalisé des antibiogrammes sur *Pseudomonas aeruginosa* "ATCC 27853" et *Staphylococcus aureus* "ATCC 25923" en utilisant des milieux de culture Mueller-Hinton 14, 15,16, 17, 18, 19 et 20 g/L d'agar-agar et en mesurant les zones d'inhibition chaque 24 h pendant 4 jours. Après analyses statistiques nous avons observé que, malgré l'absence d'influence sur le résultat de l'interprétation des antibiogrammes, la variation des diamètres d'inhibition, dans tous les cas, était significative sauf entre les milieux agar-agar 17 et 16 g/L en agar-agar pour *S. aureus* auxquels sont ajoutés les milieux 15 et 14 g/L pour *P. aeruginosa*.

Mots clés : zone d'inhibition, antibiogramme, antibiotique, agar-agar, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

ملخص

اختبار حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية إجراء روتيني في التحاليل الطبية، يهدف إلى مساعدة الطبيب المعالج على وصف المضاد الحيوي الأنسب للمريض. مبدأ هذه التقنية هو وضع مضادات حيوية على مستنبت للبكتيريا المسؤولة عن العدوى ومراقبة أثر ذلك على نموها وبقائها على قيد الحياة من خلال قياس قطر المناطق الشفافة حول أفراس المضادات الحيوية (مناطق التثبيط). و من أجل ضمان نتائج موثوقة وقابلة للتكرار، تم توحيد هذه التقنية. ومع ذلك قد يجد المخبري، في حالات معينة، نفسه أمام مشكل يوجب عليه تعديل ظرف من ظروف إجراء هذه التقنية أو أكثر.

في دراستنا، قمنا بتقييم تأثير التغيرات في تركيز الأجار ووقت التحضين على قطر منطقة التثبيط وما إذا كان يمكن أن يؤثر على تفسير اختبار حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية. إذ أجرينا اختبارات حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية على سلالة من *Staphylococcus aureus* وأخرى لـ *Pseudomonas aeruginosa* باستخدام الوسط المغذي "ميلر-هينتون" و لكن بتركيز مختلفة من "الأجار" وهي كالآتي : 14، 15، 16، 17، 18، 19 و 20 غ/ل، و قمنا بقياس قطر مناطق التثبيط. كل 24 ساعة لمدة 4 أيام. بعد التحليل الإحصائي ، لاحظنا أنه على الرغم من عدم وجود تأثير على نتيجة تفسير اختبار حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية ، فإن تباين أقطار التثبيط ، في جميع الحالات ، كان محسوسا باستثناء بين الوسطين ذات التركيزين 17 و 16 غ/ل من "الأجار" مع *Staphylococcus aureus* و يضاف اليهما الوسطين ذات التركيزين 14 و 15 مع *Pseudomonas aeruginosa*.

الكلمات المفتاحية: منطقة التثبيط، مضاد حيوي، اختبار حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية

Staphylococcus aureus ، *Pseudomonas aeruginosa*.

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification des antibiotiques selon leur structure chimique (Berdy <i>et al.</i> , 1987).	3
Tableau 2. Antibiotiques bactériostatiques et bactéricides (Van Bambeke, 2009).	5
Tableau 3. Antibiotiques et leur mécanismes de résistance (Ahmed, 2012).	15
Tableau 4. Concentrations critiques pour l'interprétation des CMI et des diamètres critiques des zones d'inhibition (EUCAST, 2018).	18
Tableau 5. Description des souches utilisées (Grosjean <i>et al.</i> , 2011; Beddou, 2015).	23
Tableau 6. Familles des antibiotiques utilisés (CA-SFM / EUCAST, 2018) et (standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale 5 ^{ème} édition, 2014).	27
Tableau 7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 cultivée sur la gélose Muller Hinton (Standardisation de l'Antibiogramme en Médecine Humaine. 4 ^{ème} Edition 2005).	30
Tableau 8. Interprétations des antibiogrammes selon le diamètre des zones d'inhibition pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> d'après EUCAST 2018.	32
Tableau 9. <i>p</i> -value générées par variation du temps d'incubation suivant la procédure de Shapiro-Wilk avec seuil de signification $\alpha = 0,05$.	33
Tableau 10. <i>p</i> -value générées par variation de la concentration d'agar-agar suivant la procédure de Shapiro-Wilk avec seuil de signification $\alpha = 0,05$.	34
Tableau 11. Récapitulatif des coefficients de corrélation de Spearman entre le diamètre d'inhibition (D_{ATB}) et les deux variables temps d'incubation et concentration d'agar-agar, le coefficient de détermination R^2 et les paramètres de l'équation du model chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> "ATCC 27853".	35
Tableau 12. Récapitulatif des statistiques K de Kruskal-Wallis et les <i>p</i> -value correspondantes renvoyées par le logiciel XLSTAT (avec $\alpha = 0,05$) chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	36
Tableau 13. Récapitulatif des différences significatives par paires ATB-concentration agar-agar pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	37
Tableau 14. Récapitulatif des statistiques Q de Friedman et les <i>p</i> -value correspondantes renvoyées par le logiciel XLSTAT (avec $\alpha = 0,05$) chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	37
Tableau 15. Récapitulatif des différences significatives par paires ATB-temps d'incubation chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	38
Tableau 16. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 cultivée sur Muller Hinton (Standardisation de l'Antibiogramme en Médecine Humaine. 4 ^{ème} Edition 2005).	39
Tableau 17. Interprétations des antibiogrammes selon le diamètre des zones d'inhibition pour <i>Staphylococcus aureus</i> selon EUCAST 2018.	40
Tableau 18. <i>p</i> -value générées par variation du temps d'incubation suivant la procédure de Shapiro-Wilk avec seuil de signification $\alpha = 0,05$.	42
Tableau 19. <i>p</i> -value générées par variation de la concentration d'agar-agar suivant la procédure de Shapiro-Wilk avec seuil de signification $\alpha = 0,05$.	42

Liste des tableaux

Tableau 20. Récapitulatif des coefficients de corrélation de Spearman entre le diamètre d'inhibition (D_{ATB}) et les deux variables temps d'incubation et concentration d'agar-agar, le coefficient de détermination R^2 et les paramètres de l'équation du model chez <i>Staphylococcus aureus</i> "ATCC 25923".	444
Tableau 21. Récapitulatif des statistiques K de Kruskal-Wallis et les p -value correspondantes renvoyées par le logiciel XLSTAT (avec $\alpha = 0,05$) chez <i>Staphylococcus aureus</i> "ATCC 25923".....	45
Tableau 22. Récapitulatif des différences significatives par paires ATB-concentration agar-agar pour <i>Staphylococcus aureus</i> "ATCC 25923".	46
Tableau 23. Récapitulatif des statistiques Q de Friedman et les p -value correspondantes renvoyées par le logiciel XLSTAT (avec $\alpha = 0,05$) <i>Staphylococcus aureus</i> "ATCC 25923" ...	47
Tableau 24. Récapitulatif des différences significatives par paires ATB-temps d'incubation chez <i>Staphylococcus aureus</i>	47

Liste des figures

Figure 1. Différents modes d'action des antibiotiques sur les cellules microbiennes d'après Peters <i>et al.</i> (2010).....	6
Figure 2. Comparaison des parois des bactéries Gram - et Gram+ (Wikipédia, 2019).....	7
Figure 3. Mécanisme de formation de radicaux libres à partir des nitroimidazolés (Van Bambeke, 2009).....	9
Figure 4. Illustration des principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques (Van Bambeke, 2009).....	14
Figure 5. Exemple de mesure de la CMI et de la CMB.....	16
Figure 6. Courbes de croissance bactérienne en présence d'antibiotique (Archambaud, 2009).	17
Figure 7. Etapes de la démarche expérimentale.	24
Figure 8. Ensemencement de <i>P. aeruginosa</i> et application des disques d'antibiotiques (Photo Originale).....	28
Figure 9. Principe de la lecture d'un antibiogramme (Photo Originale).	29
Figure 10. Variation de diamètre des zones d'inhibition en fonction de la concentration du milieu de culture en agar-agar chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
Figure 11. Variation de diamètre des zones d'inhibition en fonction du temps d'incubation chez la souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
Figure 12. Variation de diamètre des zones d'inhibition en fonction de la concentration du milieu de culture en agar-agar chez <i>Staphylococcus aureus</i> "ATCC 25923".	40
Figure 13. Variation de diamètre des zones d'inhibition en fonction du temps d'incubation chez <i>Staphylococcus aureus</i> "ATCC 25923".	40

LISTE DES ABREVIATIONS

AK	Amikacine
ATB	Antibiotique
ATCC	American Type Culture collection
ATM	Aztréonam
C	Chloramphénécol
CASFM	Comité de l'Antibiogramme de Société Française de Microbiologie
CAZ	Céftazidime
CD	Clindamycine
CLSI	The Clinical and Laboratory Standards Institute
COT	Cotrimoxazole= Sulfaméthoxazole + triméthoprime
CX	Céfoxitine
E	Erythromycine
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GEN	Gentamycine
GEN	Gentamycine
Ind.	Individu
IPM	Imipénème
OF	Ofloxacine
p	Pénicilline G
PI	Acide pipémidique
R	Rifampicine
TCC	Ticarcilline + acide clavulanique
TE	Tétracycline
TEC	Teicoplanine
TIC	Céftazidime
TOB	Tobramycine
VA	Vancomycine

Table des matières

Introduction.....	1
Chapitre 1 : Revue bibliographique.....	2
1. Antimicrobiens et antibiotiques	2
1.1. Définition.....	2
1.1. Classification des antibiotiques.....	2
1.1.1. Selon leur spectre d'action.....	2
1.1.2. Selon leur origine	3
1.1.3. Selon leur nature chimique.....	3
1.1.4. Selon leur type d'activité.....	4
1.2. Conditions d'efficacité d'un antibiotique	5
1.3. Modes d'action des antibiotiques	5
1.3.1. Antibiotiques actifs sur l'enveloppe bactérienne	6
1.3.2. Antibiotiques actifs sur la membrane bactérienne	7
1.3.3. Antibiotiques actifs sur la synthèse protéique	7
1.3.4. Antibiotiques actifs sur le métabolisme des acides nucléiques et de leurs précurseurs	7
1.3.5. Antibiotiques anti-anaérobies	8
2. Résistance des bactéries aux antibiotiques	9
2.1. Résistance naturelle ou intrinsèque	9
2.2. Résistance acquise	10
2.2.1. Résistance mutationnelle (par mutation)	10
2.2.2. Transfert horizontal de gènes.....	11
2.3. Mécanismes biochimiques de résistance aux antibiotiques	11
2.3.1. Modifications de la molécule antibactérienne	12
2.3.2. Diminution de la pénétration et de l'efflux d'antibiotiques	12
2.3.3. Pompes d'efflux.....	12
2.3.4. Diminution de la perméabilité.....	12
2.4. Modifications dans les sites cibles	12
2.4.1. Protection de la cible	13
2.4.2. Modification du site cible.....	13

2.5. Résistance due aux adaptations globales des cellules.....	13
3. Antibiogramme	15
3.1. Définition.....	15
3.2. Antibiogramme par dilution	16
3.3. Antibiogramme par diffusion	17
3.4. Buts d’antibiogramme	17
4. Microorganismes résistants aux antibiotiques	19
4.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
4.1.1. Morphologie et habitat.....	19
4.1.2. Substances élaborées	19
4.1.3. Pouvoir pathogène	19
4.1.4. Sensibilité aux antibiotiques	20
4.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	20
4.2.1. Morphologie et habitat.....	20
4.2.2. Substances élaborées	21
4.2.3. Pouvoir pathogène	21
4.2.4. Sensibilité aux antibiotiques	21
Chapitre 2 : Matériel et méthodes.....	22
1. But du travail	22
2. Cadre d’étude.....	22
3. Matériel de laboratoire	22
3.1. Appareillage.....	22
3.2. Petit matériel	22
3.3. Produits chimiques.....	22
3.4. Matériel biologique	23
3.5. Milieu de culture	23
4. Méthodes utilisées.....	23
4.1. Préparation des milieux de cultures.....	24
4.2. Repiquage des souches bactériennes	25
4.3. Contrôle de qualité des souches bactériennes	25
4.4. Antibiogramme par diffusion sur milieu Mueller Hinton gélosé.....	25

4.4.1.	Préparation de l'inoculum	25
4.4.2.	Ensemencement	26
4.4.3.	Choix des antibiotiques et incubation.....	26
4.4.4.	Lecture des résultats.....	28
4.5.	Analyses statistiques	29
Chapitre 3 : Résultats et discussion		30
1.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
1.1.	Résultats de test contrôle de qualité.....	30
1.2.	Résultats de l'antibiogramme	30
1.3.	Tests statistiques.....	33
1.3.1.	Test de normalité	33
1.3.2.	Régression linéaire multiple	34
1.3.3.	Effet de la concentration en agar-agar sur le diamètre de la zone d'inhibition	36
1.3.4.	Effet de temps d'incubation sur le diamètre de zone d'inhibition	37
2.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	38
2.1.	Résultats de test contrôle de qualité.....	38
2.2.	Résultats de l'antibiogramme	39
2.3.	Tests statistiques.....	42
2.3.1.	Test de normalité	42
2.3.2.	Régression linéaire multiple	43
2.3.3.	Effet de la concentration en agar-agar sur le diamètre de la zone d'inhibition	45
2.3.4.	Effet de temps d'incubation sur le diamètre de zone d'inhibition	46
Discussion.....		48
Conclusion et perspectives		51
Références bibliographiques		52

Introduction

La lutte contre les agents infectieux et les maladies transmissibles est l'une des préoccupations du monde scientifique. Les recherches ont abouti à la découverte des molécules appelées antibiotiques, mais il s'avère que ces derniers ne sont pas efficaces sur tous les agents infectieux. En plus, leur utilisation abusive ou excessive a conduit à l'émergence de phénomènes de résistance de plus en plus récurrents (BEVILACQUA, 2011).

Le développement de méthodes permettant une détection rapide et économique de la sensibilité aux antibiotiques contribuerait à contrôler la dissémination de souches résistantes, et améliorerait la chimiothérapie antimicrobienne. Parmi ces méthodes l'antibiogramme qui est une technique avec laquelle on peut déterminer cette sensibilité mais aussi elle peut être utilisée comme approche dans la caractérisation et l'identification bactérienne (Bent Mohamed et Sidi Baba, 2008).

Pour que les résultats d'antibiogramme soient fiables et reproductibles il fallait le standardiser, pour cela l'OMS et divers comités internationaux tel que EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) et nationaux tel que CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*) et l'institut Pasteur pour l'Algérie qui ont publié des documents qui régissent cette standardisation et qui sont mis à jours périodiquement.

Il existe en Algérie un réseau de laboratoires chargé de la surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques, il est dénommé : *Algerian Antimicrobial Resistance Network* (AARN).

Pour différentes raisons les recommandations ne répondent pas à des situations particulières dans les laboratoires de recherche ou d'analyses médicales, par exemple en cas d'une pénurie d'un ingrédient, d'une urgence ou encore pour des raisons économiques. Pour cette raison, des études, parmi lesquelles la nôtre fait partie, ont été reprises pour étudier l'influence de divers facteurs sur le résultat de l'antibiogramme.

Le but de ce travail est de vérifier l'effet de deux variables a savoir la concentration de l'agar-agar et le temps d'incubation sur le diamètre de la zone d'inhibition. Ceci, pour pouvoir prédire le diamètre d'inhibition et d'examiner l'impact de ces variables sur l'interprétation des résultats d'un antibiogramme. Ainsi, de vérifier la possibilité de minimiser le coût du milieu de culture sans pour autant rogner sur la qualité de l'antibiogramme.

Chapitre 1 : Revue bibliographique

1. Antimicrobiens et antibiotiques

1.1. Définition

Certains auteurs considèrent qu'un antibiotique est toute substance d'origine biologique biosynthétisée par un champignon ou une bactérie, ayant une activité bactéricide ou bactériostatique (Lüllmann *et al.*, 2000; Dedet, 2007; Muylaert et Mainil, 2012), tandis que d'autres élargissent leur définition pour inclure les molécules synthétiques et semi synthétiques obtenues par modification de molécules naturelles (Berthet et Amar-Costesec, 2006; Van Bambeke, 2009), alors que d'autres élargissent encore leur définition pour inclure les substances ayant une activité biocide ou biostatique sur les moisissures, les champignons, les cellules cancéreuses et même les virus, ce que certains les qualifient des antimicrobiens.

Les antibiotiques sont utilisés à des fins thérapeutiques lors des infections bactériennes chez l'homme et les animaux et dans certains cas comme anticancéreux (Duguet et Rioux, 1994). Pour être efficaces, ils doivent :

- atteindre leurs sites d'action en franchissant les barrières de l'enveloppe bactérienne.
- être efficaces à des doses tolérables par l'hôte, pour cela, ils devront affecter une voie métabolique absente ou peu active chez l'homme ou l'animal mais essentielle pour le germe pathogène.
- avoir une bonne absorption et bonne diffusion dans l'organisme (Mohammedi *et al.*, 2012).

1.1. Classification des antibiotiques

Vue le nombre élevé des antibiotiques, une classification rationnelle serait très utile pour faciliter le choix thérapeutique.

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères à savoir l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action (Mohammedi *et al.*, 2012).

1.1.1. Selon leur spectre d'action

Chaque antibiotique a un certain spectre d'action, c'est-à-dire une gamme d'espèces bactériennes manifestant une sensibilité naturelle à la substance. Certains antibiotiques ont un spectre d'action étroit (par exemple, la vancomycine). Cependant, la plupart ont des spectres étendus comme les tétracyclines, qui affectent tous les eubactéries (Kayser *et al.*, 2005).

1.1.2. Selon leur origine

Les antibiotiques peuvent être :

- Naturels, dont La plupart sont produits par :

- Les procaryotes principalement des actinomycètes comme par exemples : aminoglycosides, macrolides, tétracyclines, polyènes, chloramphénicol.
- Les bactéries, exemples: polymyxine B, tyrothricine, colistine, aztréoname, bacitracine, etc.
- Les champignons, exemples : pénicilline, griséofulvine, céphalosporine, etc.
- Les végétaux (Duquéniois, 1955; Alloui *et al.*, 2014).
- Les lichens (Duquéniois, 1955).

- Synthétiques, fabriqués par des méthodes chimiques indépendantes d'une activité microbienne (Oulmi, 2017).

- Semi synthétiques : ce sont les antibiotiques naturels ayant subi une modification par l'addition de groupes chimiques supplémentaires dans le but d'améliorer l'activité et/ou modifier des paramètres pharmacocinétiques essentielles (Oulmi, 2017).

1.1.3. Selon leur nature chimique

La classification selon la nature chimique nous permet de grouper les antibiotiques en familles (Tableau 1). Le classement n'est pas tout à fait cohérent, car le point commun des divers antibiotiques d'une classe peut parfois être chimique et de spectres d'action semblables, mais pas identiques (les β -lactamines, les sulfamides, les polypeptidiques, les aminosides, les macrolides, les fluoroquinolones), et parfois une bactérie sur laquelle ils sont efficaces (les antituberculeux, les anti-staphylococciques). Il peut s'y rajouter une notion de moment d'apparition par exemple : céphalosporine de 1^e, de 2^e génération (Lechat, 2006).

Tableau 1. Classification des antibiotiques selon leur structure chimique (Berdy *et al.*, 1987).

Familles d'antibiotiques	Sous-familles	Exemples
1-Glucide et apparentés	Glucides purs	Nojirimycine
	Aminoglycosides	Streptomycine, gentamicine, kanamicine.
	Glycosides	G-Glycosides : Vancomycine. N-Glycosides : striptothricine.
	Glycolipides	Moénomycine
2-Lactones macrocycliques	Macrolides	Erythromycine, spiramycine
	Polyènes	Amphotéricine, nystatine, candicidine
	Macrotétrolides	Teranactine, nonactine
	Macrolactames	Rifamycine

3-Quinones et apparentes	Polycycliques accolés linéairement	Tétracyclines
	Dérivés naphtoquinoniques	Anthracyclines
	Dérivés benzoquinoniques	Mitomycine
4-Acides aminés et peptides	Dérivés d'acides aminés	Cyclosérine, pénicilline, nocardicine
	Homopeptides	Bacitracine, cyclosporine
	Hétéropeptides	Aculéacine
	peptolides	Valinomycine
5- hétérocycles à azote	Hétérocycles non accolés	caerulomycine, mildiomycine
	Hétérocycles accolés	Phénazines herbicides
6- Hétérocycles à oxygène	Polyéthers	Monensine, nigérocine.
	Dérivés cycloalcane	Cycloheximide
7-Composés alicycliques	Terpènes	Acide marasmiq
	Oligoterpènes	Acide fusidique
8- -Autres dérivés aromatique	Dérivés benzéniques	Chloramphénicol
	Aromatiques accolés	Griséofulvine
	Composés non benzéniques	Fusariocine
		Novobiocine
	Dérivés des alcanes	Elaïomycine
	Dérivés d'acides carboxyliques	Cérolémine
9-Aliphatiques	Composés contenant du phosphore ou du soufre	Fosfomycine

1.1.4. Selon leur type d'activité

Les antibiotiques peuvent être distingués sur la base du type d'activité qu'ils exercent. Un antibiotique bactériostatique arrête la croissance des bactéries, et un antibiotique bactéricide tue les bactéries (Van Bambeke, 2009). La distinction entre les deux types d'activité (bactéricide et bactériostatique) peut se faire en comparant *in vitro* la CMI (concentration minimale inhibitrice) et la CMB (concentration minimale bactéricide). Un antibiotique peut être considéré comme bactéricide lorsque sa CMB est sensiblement égale à sa CMI (CMB inférieure à 32 fois la CMI) Un antibiotique dont la CMB est très supérieure à la CMI (CMB supérieure à 32 fois la CMI), de telle sorte que sa concentration au site d'infection *in vivo* ne permet pas d'atteindre la valeur de la CMB, sera considéré comme bactériostatique (Archambaud, 2009).

Implication clinique : un antibiotique bactériostatique ne peut à lui seul éradiquer une infection; en empêchant la prolifération bactérienne, il facilite simplement la destruction des germes par les défenses de l'hôte. En cas d'infection grave, et chez tous les patients dont les défenses immunitaires sont déficientes, on préférera un antibiotique bactéricide (Tableau 2).

Tableau 2. Antibiotiques bactériostatiques et bactéricides (Van Bambeke, 2009).

Bactériostatique	Bactéricide
Macrolides, sulfamidés, tétracyclines, lincosamides, oxazolidinones, nitrofuranes, phénicolés, ethambutol, cyclosérine, etc.	β -lactames, fluoroquinolones, aminoglycosides, nitroimidazoles, glycopeptides (bactéricidie lente), polymyxines, synergistines, ansamycines, acide fusidique, isoniazide, pyrazinami, etc.

1.2. Conditions d'efficacité d'un antibiotique

Pour qu'un antibiotique soit actif sur le germe responsable de l'infection, il faut :

- qu'il atteigne le site infecté par le germe à des concentrations suffisamment élevées de sa forme active, et qu'il parvienne jusqu'au site d'action au niveau du germe.
- qu'il ait un mode d'action qui lui permet d'agir sur ce germe.
- et qu'il y reste le temps suffisant pour lui permettre soit de le détruire (bactéricidie) soit d'en arrêter la multiplication (bactériostatisme) (Lechat, 2006).

1.3. Modes d'action des antibiotiques

Contrairement aux antiseptiques, les antibiotiques agissent en générale d'une manière très spécifique sur des structures de cellules bactériennes, ceci explique pourquoi les antibiotiques sont actifs à très faible concentration (Zeghilet, 2009).

En fonction de leur cible pharmacologique, on distingue cinq groupes d'antibiotiques. Leurs modes d'action sont illustrés dans la figure 1.

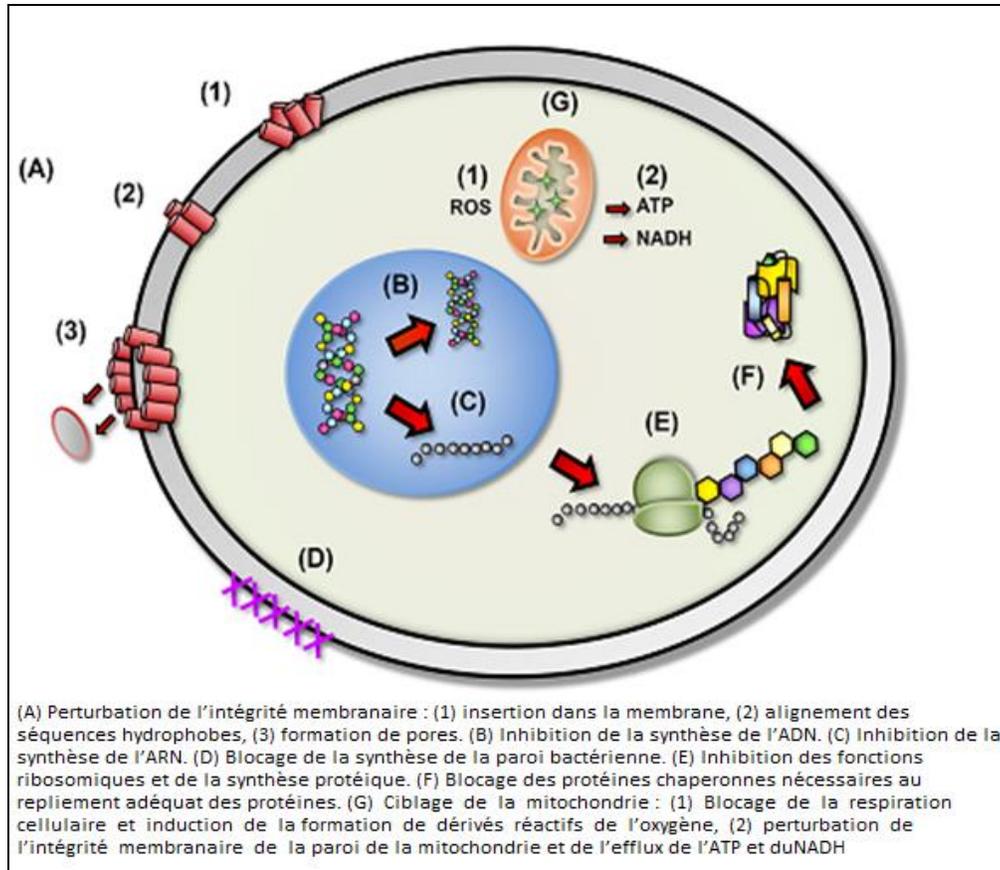


Figure 1. Différents modes d'action des antibiotiques sur les cellules microbiennes d'après Peters *et al.* (2010).

1.3.1. Antibiotiques actifs sur l'enveloppe bactérienne

L'enveloppe bactérienne est une cible majeure de nombreux antibiotiques appartenant aux différentes classes mentionnées ci-dessus. Certains antibiotiques ciblent directement l'enveloppe en perturbant son intégrité, tandis que d'autres ciblent spécifiquement les mécanismes d'assemblage de la paroi (Coumes Florens, 2011).

Le mécanisme de biosynthèse du peptidoglycane est le site d'action de plusieurs antibiotiques, comme les β -lactamases (qui inhibent la transpeptidase intervenant dans la synthèse de la paroi dont fait partie la pénicilline, ou les glycopeptides (qui se lient à un intermédiaire de synthèse (Van Bambeke, 2009), auquel appartient la vancomycine. De plus, la structure du peptidoglycane est commune aux bactéries à Gram négatif et à Gram positif (Figure 2), ce qui fait de la synthèse de cette molécule une cible privilégiée (Van Bambeke, 2009; Coumes Florens, 2011).

1.3.2. Antibiotiques actifs sur la membrane bactérienne

En dénaturant les phospholipides de la membrane cytoplasmique, certains antibiotiques provoquent la fuite de composés hydrosolubles intracellulaires par rupture de la perméabilité cellulaire et modifient ainsi la tension de surface en produisant des troubles d'échanges électrolytiques avec le milieu extérieur (Zeghilet, 2009) ce qui provoque l'explosion des cellules bactériennes. De ce fait ces antibiotiques ne sont actifs que sur les bactéries à Gram négatif (Figure 2). Parmi ces antibiotiques les agents polycationiques (polymyxines, colistine) ou polyéniques (nystatine, amphotéricine B).

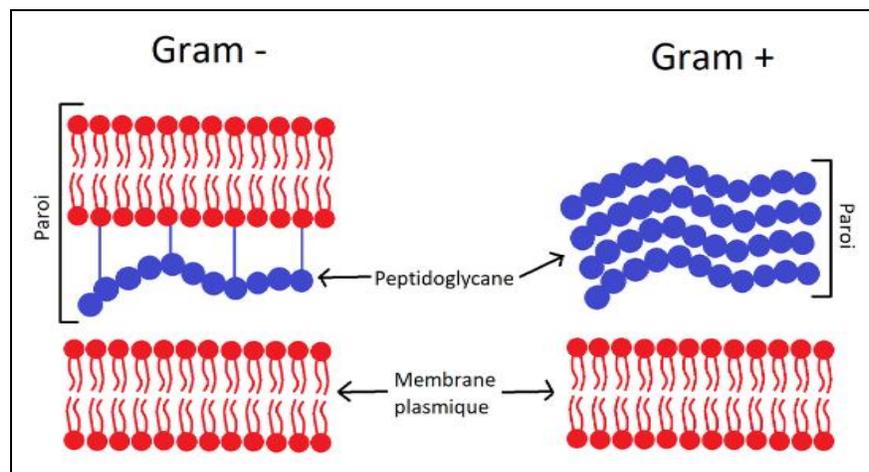


Figure 2. Comparaison des parois des bactéries Gram - et Gram+ (Wikipédia, 2019)

1.3.3. Antibiotiques actifs sur la synthèse protéique

Ils existent plusieurs inhibiteurs :

- de la sous-unité ribosomale lourde des procaryotes, 50S, qui empêchent la fixation d'un nouvel acide aminé sur la chaîne en croissance (phénicolés par exemple) ou le transfert de la chaîne en croissance du site A vers le site P (macrolides, lincosamides, streptogramines).
- de la sous-unité ribosomale légère des procaryotes, 30S, qui empêchent ou perturbent la liaison des aminoacyl-ARNt aux ribosomes (tétracyclines, aminoglycosides) (Van Bambeke, 2009).

1.3.4. Antibiotiques actifs sur le métabolisme des acides nucléiques et de leurs précurseurs

Plusieurs antibiotiques agissent d'une part en tant qu'antagonistes de métabolites bactériens en inhibant de manière compétitive l'utilisation des métabolites par des enzymes clés et d'autre

part, en inhibant l'ADN-gyrase et l'ARN polymérase. Parmi ces antibiotiques on peut citer à titre d'exemples :

- les sulfamides qui sont des analogues structuraux d'un métabolite intermédiaire de la voie de synthèse d'acide folique nécessaire pour la synthèse des bases purines et pyrimidines utilisées dans la construction d'ADN et des ARN (Prescott *et al.*, 2018).
- Les ansamycines, inhibiteurs de l'ARN polymérase.
- Les fluoroquinolones (énoxacine par exemple) agissent en se liant au complexe ADN-ADN gyrase bactérienne ce qui a pour effet d'inhiber la gyrase. Cette enzyme rajoute des surenroulements négatifs à l'ADN, préalable indispensable à l'ouverture de la double hélice. Cela inhibe la réplication et la transcription de l'ADN (Duguet et Rioux, 1994; Papillon *et al.*, 2014).

1.3.5. Antibiotiques anti-anaérobies

Les bactéries anaérobies (*Helicobacter pylori*, *Campilobacter* et *Gardnerella*) et d'autres parasites anaérobies utilisent des voies d'oxydo-réduction indépendantes du dioxygène, pour produire de l'énergie, en réduisant certains ions (tel que les nitrates, sulfates, carbonates). Ceci permet l'activation métabolique spécifique de certaines molécules, comme les nitroimidazolés. Ces molécules sont réduites de manière intracellulaire dans toutes les cellules, mais en l'absence d'un apport suffisant en oxygène, ils subissent une réduction supplémentaire en des produits plus réactifs se liant aux composants cellulaires. Les nitroimidazolés ne sont pas toxiques pour les microorganismes susmentionnés en eux-mêmes mais grâce à leur lipophilie pénètrent, par simple diffusion dans la bicouche lipidique, la membrane cellulaire et empruntent la voie métabolique de la respiration anaérobique pour aboutir à des métabolites intermédiaires, des radicaux libres, cytotoxiques qui entraînent la mort cellulaire (Figure 3) (Leitsch *et al.*, 2011).

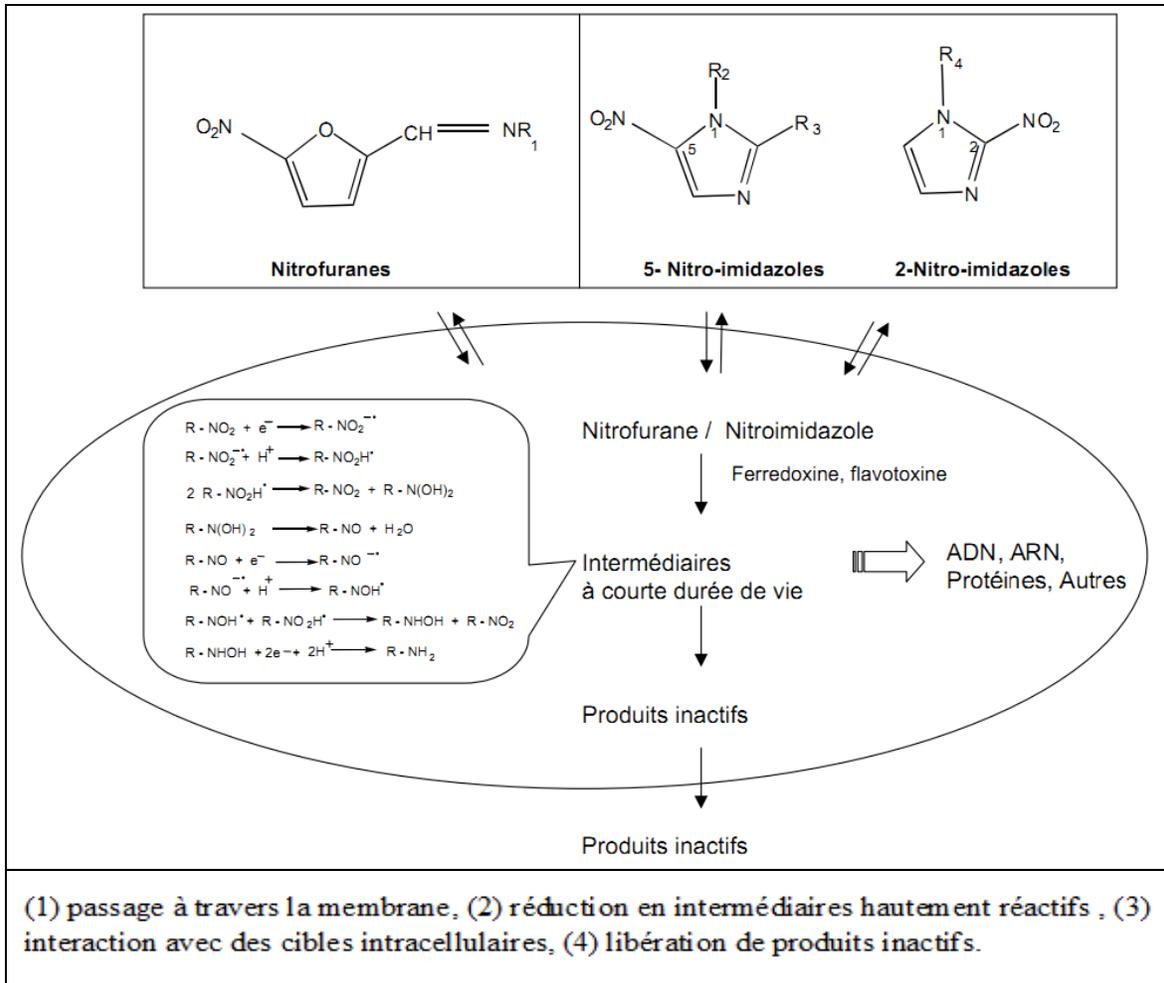


Figure 3. Mécanisme de formation de radicaux libres à partir des nitroimidazolés (Van Bambeke, 2009).

2. Résistance des bactéries aux antibiotiques

Pour éviter l'action nocive d'antibiotiques, les bactéries ont développé de nombreux mécanismes biochimiques de résistance, associés à une grande souplesse génétique à les acquérir et à les diffuser (Archambaud, 2009). Les gènes de résistance se trouvent soit dans le chromosome, soit dans des éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons). La résistance peut être naturelle ou acquise (Lambert *et al.*, 2000).

2.1. Résistance naturelle ou intrinsèque

La résistance intrinsèque est définie comme une caractéristique fonctionnelle ou structurelle qui confère une certaine tolérance, ou une insensibilité totale, à tous les membres d'un groupe

de bactéries vis-à-vis d'un antibiotique. L'absence ou la réduction de la sensibilité à l'antibiotique peut être due à :

- une faible affinité de l'antibiotique pour la cible bactérienne (par exemple, la faible affinité de l'acide nalidixique pour la gyrase des entérocoques).
- l'inaccessibilité de la cible pour l'antibiotique (impermeabilité de la membrane externe des bactéries Gram négatives aux glycopeptides comme la vancomycine).
- un refoulement (expulsion) de l'antibiotique par des pompes à efflux chromosomiques (résistance aux tétracyclines, au chloramphénicol et aux quinolones chez *Pseudomonas aeruginosa*).
- une inactivation enzymatique innée de l'antibiotique (la production d'une β -lactamase chromosomique AmpC chez certains membres de la famille *Enterobacteriaceae*) (Muylaert et Mainil, 2012).

2.2. Résistance acquise

C'est le développement d'une résistance par un microorganisme (qui était sensible auparavant) par mutation ou transfert de gène ou en raison de l'utilisation abusive d'un antibiotique. Cela peut arriver avec n'importe quelle bactérie et constitue un problème clinique majeur. Cependant, le développement de la résistance dépend du microorganisme et de l'antibiotique. Certaines bactéries sont connues pour leur acquisition rapide de résistance (comme par exemple : les Staphylocoques, les coliformes et les bacilles tuberculeux. D'autres comme les Streptocoques, Les pyogènes et les spirochètes n'ont pas développé de résistance significative à la pénicilline malgré son utilisation répandue depuis longtemps (plus de 50 ans). Les gonocoques ont rapidement développé une résistance aux sulfamides, mais une résistance faible et lente à la pénicilline (Tripathi, 2008).

Les bactéries utilisent deux stratégies génétiques majeures pour s'adapter à «l'attaque» des antibiotiques :

2.2.1. Résistance mutationnelle (par mutation)

En général, les mutations entraînant une résistance aux antibiotiques modifient l'action de l'antibiotique via l'un des mécanismes suivant :

- Modifications de la cible de l'antibiotique (diminution de l'affinité pour l'antibiotique).
- Diminution de l'absorption du médicament.
- Activation des mécanismes d'efflux pour l'extrusion de la molécule nocive.

- Des changements globaux de voies métaboliques importantes via la modulation des réseaux de régulation (Munita et Arias, 2016).

2.2.2. Transfert horizontal de gènes

Classiquement, les bactéries acquièrent du matériel génétique externe selon trois stratégies principales : i) transformation (incorporation d'ADN nu), ii) transduction (un transfert de l'ADN bactérien par l'intermédiaire d'un bactériophage) et iii) conjugaison bactérienne qui est la plus répandue les deux autres sont rares. En règle générale, la conjugaison utilise des éléments génétiques mobiles (EGM) comme moyens d'échange d'informations génétiques. Les EGM les plus importants sont les plasmides et les transposons, qui jouent tous deux un rôle crucial dans le développement et la dissémination de la résistance aux antibiotiques (Munita et Arias, 2016).

Il est à noter que la résistance plasmidique est liée à la synthèse de protéines additionnelles et non à une modification des constituants normaux de la bactérie.

2.3. Mécanismes biochimiques de résistance aux antibiotiques

La résistance à une classe d'antibiotique peut généralement être obtenue par de multiples voies biochimiques. Par exemple, la résistance à la fluoroquinolone (FQ) peut être due à trois voies biochimiques différentes, qui peuvent toutes coexister dans la même bactérie à un moment donné :

- 1) des mutations dans les gènes codant pour le site cible des FQ (ADN gyrase et topoisomérase IV).
- 2) la surexpression des pompes d'efflux qui extrudent l'antibiotique à partir de la cellule.
- 3) la protection du site cible du FQ par une protéine appelée Qnr.

En revanche, les espèces bactériennes semblent avoir développé une préférence pour certains mécanismes de résistance par rapport à d'autres. Par exemple, le mécanisme prédominant de résistance aux β -lactames chez les bactéries à Gram négatif est la production de β -lactamases, alors que la résistance à ces composés chez les microorganismes à Gram positif est principalement obtenue par la modification de leur site cible (Munita et Arias, 2016).

Afin de fournir une classification complète des mécanismes de résistance aux antibiotiques, nous allons les catégoriser en fonction de la voie biochimique impliquée dans la résistance (Figure 4), comme suit :

2.3.1. Modifications de la molécule antibactérienne

L'une des stratégies bactériennes les plus efficaces pour faire face à la présence d'antibiotiques consiste à produire des enzymes qui inactivent le médicament en ajoutant des groupements chimiques spécifiques au composé ou qui détruisent la molécule elle-même, empêchant ainsi l'antibiotique d'interagir avec sa cible (Muylaert et Mainil, 2012).

2.3.2. Diminution de la pénétration et de l'efflux d'antibiotiques

Un des facteurs clés intervenant dans l'activité antibactérienne d'un antibiotique est sa concentration intracellulaire. Chez les bactéries à Gram négatif, par exemple, la perméabilité de l'enveloppe (constituée d'une membrane externe, d'un périplasme et d'une membrane plasmique) joue un rôle majeur dans la sensibilité à un antibiotique. Elle peut moduler la diffusion de l'antibiotique lors de son entrée via des porines, et réguler son expulsion par des pompes d'efflux. Plusieurs mécanismes génétiques et biochimiques, contrôlent l'expression fonctionnelle de ces divers canaux membranaires donc sont impliqués dans la manifestation et le niveau de résistance aux antibiotiques (Muylaert et Mainil, 2012).

2.3.3. Pompes d'efflux

Ce mécanisme de résistance affecte un large éventail de classes d'antibactériens, notamment les inhibiteurs de la synthèse des protéines, les fluoroquinolones, les β -lactames, les carbapénèmes et les polymyxines. Les gènes codant pour les pompes à efflux peuvent être situés dans les EGM ou dans le chromosome (Courvalin *et al.*, 2012).

2.3.4. Diminution de la perméabilité

La membrane externe constitue la première ligne de défense contre la pénétration de multiples antibiotiques hydrophiles tels que les β -lactames, les tétracyclines et certaines fluoroquinolones sont particulièrement affectées par les modifications de la perméabilité de la membrane externe, car elles utilisent souvent des porines (Courvalin *et al.*, 2012).

2.4. Modifications dans les sites cibles

Une stratégie courante pour que les bactéries développent une résistance aux antibactériens, consiste à éviter l'action de l'antibiotique en interférant avec leur site cible. Pour y parvenir, les bactéries ont mis au point différentes stratégies, notamment la protection de la cible (éviter que l'antibiotique n'atteigne son site de liaison) et les modifications du site cible entraînant une diminution de l'affinité pour la molécule d'antibiotique (Munita et Arias, 2016).

2.4.1. Protection de la cible

Une des stratégies consiste dans la saturation de l'antibiotique par multiplication de sa cible, autrement dit par surexpression de la cible. Un autre mécanisme peut être mis en place par la production de protéines cytoplasmiques qui lient l'antibiotique, c'est le cas pour la résistance aux tétracyclines, qui peut résulter d'une protection ribosomale. De manière similaire, la résistance aux fluoroquinolones est médiée par la production de protéines dont la structure tertiaire qui imite celle de l'ADN, remplaçant les fluoroquinolones par leur liaison à l'acide nucléique (van Bambeke, 2009). Souvent, sont les éléments génétiques mobiles qui sont impliqués dans ces stratégies (Courvalin *et al.*, 2012).

2.4.2. Modification du site cible

La modification du site cible est l'un des mécanismes les plus courants de résistance aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes touchant presque toutes les familles de composés antibactériens. Ces modifications peuvent consister en :

- 1) des mutations ponctuelles dans les gènes codant pour le site cible,
- 2) altérations enzymatiques du site de liaison (par exemple, addition de groupes méthyle).
- 3) remplacement ou contournement de la cible d'origine.

Comme mentionné, quel que soit le type de changement, l'effet final est toujours le même, à savoir une diminution de l'affinité de l'antibiotique pour le site cible (Munita et Arias, 2016).

2.5. Résistance due aux adaptations globales des cellules

Au fil des années, les bactéries ont mis au point des mécanismes sophistiqués leur permettant de faire face aux facteurs de stress environnementaux afin de survivre dans les environnements les plus hostiles, y compris le corps humain. Les bactéries doivent concurrencer pour les nutriments et éviter l'attaque de molécules produites par d'autres organismes rivaux afin de «prendre le dessus». À l'intérieur d'un hôte particulier, les organismes bactériens sont constamment attaqués par le système immunitaire de l'hôte et, afin de s'établir dans des niches biologiques particulières, il est essentiel qu'ils s'adaptent et gèrent ces situations stressantes. Ainsi, les agents pathogènes bactériens ont mis au point des mécanismes très complexes pour éviter la perturbation des processus cellulaires pivots tels que la synthèse de la paroi cellulaire et la stabilité membranaire. Le développement de la résistance à la daptomycine (DAP) et à la vancomycine (de faible niveau chez *S. aureus*) sont les exemples les plus pertinents du point de vue clinique des phénotypes de résistance résultant

d'une réponse adaptative globale des cellules à l'attaque antibactérienne (Munita et Arias, 2016).

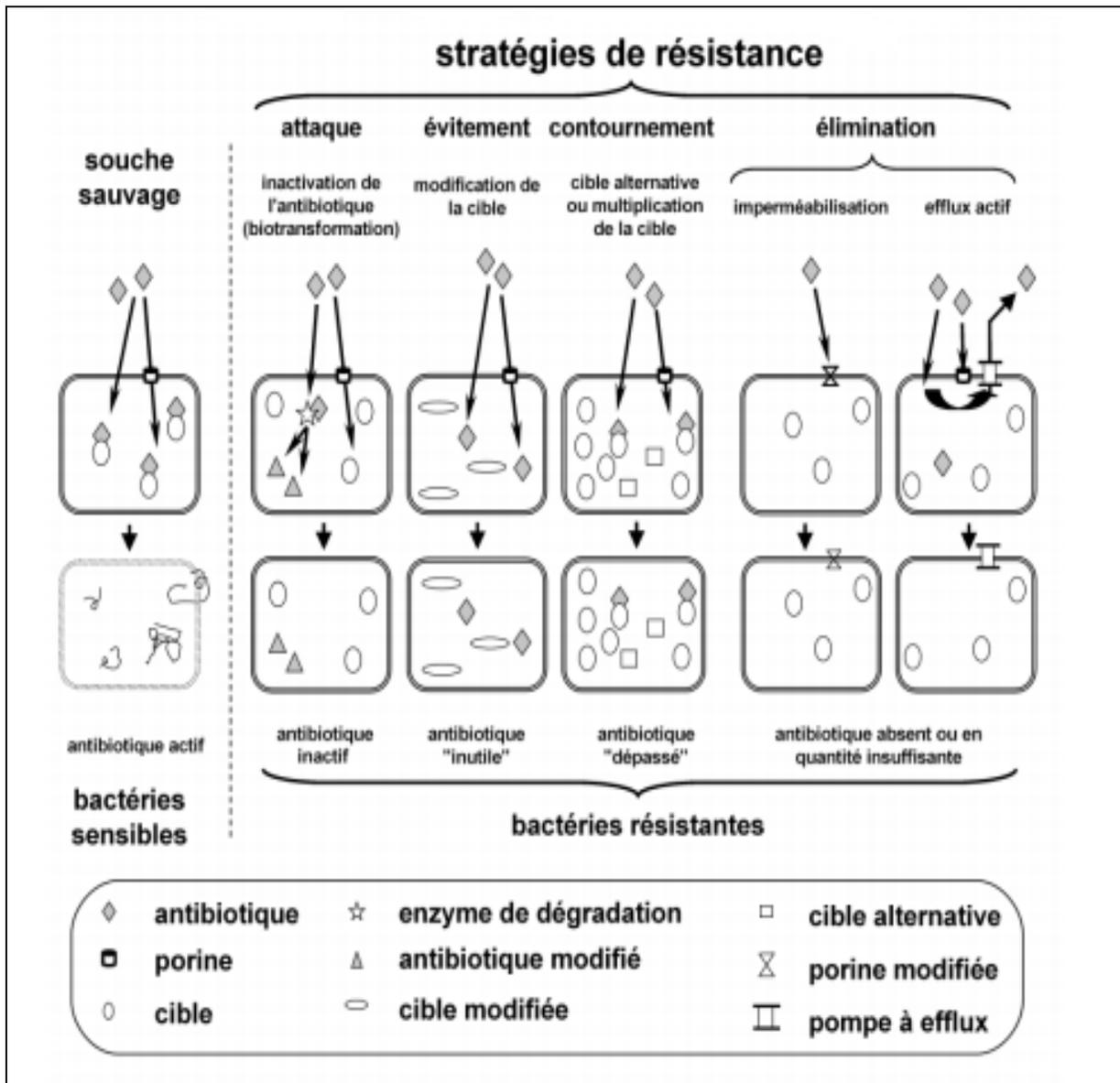


Figure 4. Illustration des principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques (Van Bambeke, 2009).

Le tableau 3 illustre les mécanismes de résistance de différentes familles d'antibiotiques.

Tableau 3. Antibiotiques et leur mécanismes de résistance (Ahmed, 2012).

Famille d'antibiotique	Exemples	Mode d'action	Principaux mécanismes de résistance
β-lactamines	Pénicilline Céphalosporine, Cétoximes, Carbapénèmes	Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire	Clivage par les β-lactamases, les BLSE, les céfotaximases, les carbapénémases, les PBPs altérés (Penicillin-binding proteins).
Les aminosides	Streptomycine, Gentamycine, Tobramycine, Amikacine	Inhibition de la synthèse des protéines	Modification enzymatique, efflux, mutations ribosomales, méthylation de l'ARNr 16S.
Les quinolones	Ciprofloxacine, Ofloxacine, Norfloxacine	Inhibition de l'ADN	Efflux, modification et mutation de la cible.
Glycopeptides	Vancomycine	Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire	Parois cellulaires altérées, efflux
Tétracyclines	Tétracycline	Inhibition de la traduction	Efflux
Rifamycines	Rifampicine	Inhibition de la transcription	Sous-unité β modifiée de l'ARN polymérase
Streptogramines	Virginamycines, Quinupristin, Dalfopristin	Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire	Clivage enzymatique, modification, efflux.
Oxazolidinones	Linézolide.	Inhibition de la formation du complexe ribosomal 70S.	Mutations dans les gènes de l'ARNr 23S suivies par la conversion génique.

3. Antibiogramme

3.1. Définition

En cas d'infection banale débutante ou d'une urgence, la lutte contre le (ou les germes) responsable de l'infection bactérienne est basée sur une antibiothérapie probabiliste. Si le problème persiste les bactéries responsables doivent être identifiées. Une fois qu'on les a identifiées, nous devons trouver des antibiotiques qui pourraient être efficaces contre elles et choisir parmi eux la molécule la plus appropriée. Cela se fait par antibiogramme, appelés communément tests de sensibilité aux antibactériens.

L'antibiogramme est le teste permettant de mesurer la capacité d'un antibiotique à inhiber la croissance bactérienne *in vitro*. Cette capacité peut être estimée à l'aide de deux méthodes principales : par dilution ou par diffusion (Vandepitte *et al.*, 1994).

3.2. Antibiogramme par dilution

Les méthodes par dilution sont effectuées en milieu liquide ou solide. Des dilutions croissantes de l'antibiotique, sont mises en contact avec un inoculum standardisé de la bactérie identifiée et ensuite soit incorporées dans du bouillon ou de la gélose, ou imprégnées dans une bandelette sous forme de gradient de concentrations (E-TEST®). En milieu liquide comme en milieu solide, l'estimation quantitative de l'activité antibiotique passe par la détermination, de la concentration la plus faible empêchant toute croissance bactérienne (CMI) et la plus petite concentration d'antibiotique qui ne laisse que 0.01% ou moins de survivants des inoculum prélevés des tubes ayant des concentrations en antibiotique supérieures ou égales à la CMI après 18h d'incubation à une température de 37°C (CMB), comme mentionné dans la Figure 5 et la Figure 6 (Archambaud, 2009).

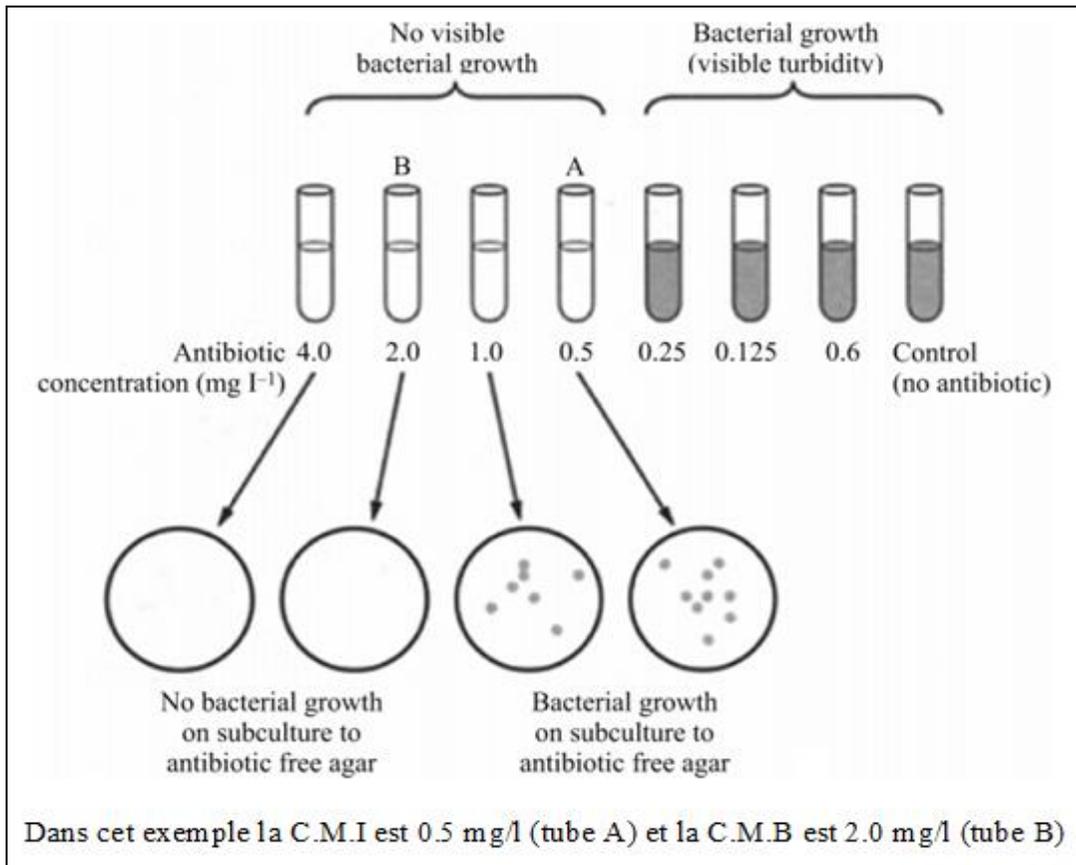


Figure 5. Exemple de mesure de la CMI et de la CMB.

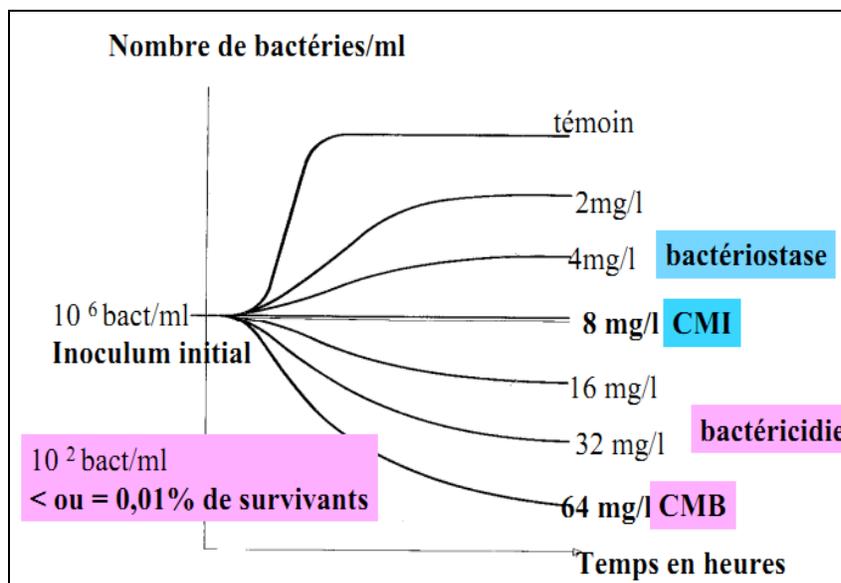


Figure 6. Courbes de croissance bactérienne en présence d'antibiotique (Archambaud, 2009).

3.3. Antibiogramme par diffusion

Appelé aussi la technique des disques de Kirby-Bauer (Vandepitte *et al.*, 1994). Elle consiste à disposer des disques de papier buvard (Whatman) imprégnés de concentration déterminée d'antibiotiques à la surface d'un milieu gélosé, lequel aura été préalablement ensemencé de manière uniforme avec une culture pure du germe à tester. Dès l'application des disques, l'antibiotique diffuse à partir du disque de manière uniforme dans la gélose. Après incubation, le diamètre de la zone d'inhibition de la croissance est utilisé pour déterminer si la souche est sensible à l'antibiotique testé (Tableau 4). Cette technique reste la méthode de routine la plus utilisée dans les laboratoires médicaux. Elle est simple, fiable et peu coûteuse (Collins *et al.*, 2004).

3.4. Buts d'antibiogramme

Un antibiogramme peut être effectué soit :

- pour un intérêt thérapeutique (individuel) pour mesurer la sensibilité d'une souche bactérienne à un ou plusieurs antibiotiques et dépister les résistances acquises afin d'orienter les décisions thérapeutiques.
- pour un intérêt épidémiologique (collectif) pour le suivi épidémiologique des résistances bactériennes afin de surveiller l'évolution des spectres cliniques des antibiotiques et l'adaptation de l'antibiothérapie probabiliste (Cavallo, 2012).

-pour caractériser ou identifier une souche bactérienne (Bent Mohamed et Sidi Baba, 2008).

Tableau 4. Concentrations critiques pour l'interprétation des CMI et des diamètres critiques des zones d'inhibition (EUCAST, 2018).

Abrégé	ATB	S : sensible ; R : résistant				
<i>P. aeruginosa</i>		Charge (µg/mL)	Diamètre critique (mm)		Concentration critique (mg/L)	
			S ≥	R <	S ≤	R >
AK	Amikacine	30	18	15	8	16
GEN	Gentamycine	10	15	15	4	4
TOB	Tobramycine	10	16	16	4	4
IPM	Imipénème	10	20	17	4	8
CAZ	Ceftazidime	10	16	16	8	8
ATM	Aztréonam	30	25	23	2	8
TCC	Ticarcilline+ Acide Clavulanique	75/10	18	18	16	16
TIC	Ticarcilline	75	18	18	16	16
PI	Acide pipémidique	20	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>		Charge (µg/mL)	Diamètre critique (mm)		Concentration critique (mg/L)	
			S ≥	R <	S ≤	R >
CX	Céfoxitine FOX	30	22	22	-	4
GEN	Gentamycine	10	18	18	1	1
C	Chloramphénicol	30	18	18	8	8
R	Rifampicine	5	26	23	0,06	0,5
OF	Ofloxacine	5	20	20	1	1
TEC	Teicoplanine	30	Note A	Note A	2	2
VA	Vancomycine	30	Note A	Note A	2	2
E	Erythromycine	15	21	18	1	2
CD	Clindamycine	2	22	19	0,25	0,5
p	Pénicilline G	1 unité	26	26	0,12	0,12
TE	Tétracycline	30	22	19	1	2
COT	Triméthoprim /sulfaméthoxazole	1,25/3,75	17	14	2	4

Note A : La méthode de diffusion n'est pas utilisable car elle ne permet pas la différenciation entre les souches sensibles de celles de sensibilité diminuée aux glycopeptides.

Note B : COT = Co-trimoxazole = Triméthoprim + Sulfaméthoxazol.

4. Microorganismes résistants aux antibiotiques

Depuis leur découverte et leur utilisation, les antibiotiques ont permis de faire considérablement reculer la mortalité associée aux maladies infectieuses. Cependant, l'utilisation massive et répétée de ces molécules et leur rejet dans l'environnement a conduit à une acquisition accélérée de résistances aux antibiotiques. En fait, toutes les bactéries peuvent développer une multirésistance, qu'elles soient impliquées dans les infections chez l'homme ou l'animal ou qu'elles se trouvent dans un environnement pollué par des antibiotiques.

4.1. *Pseudomonas aeruginosa*

4.1.1. Morphologie et habitat

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram négatif, en forme de bâtonnets mesurant 0,5 à 8 µm par 1,5 à 3 µm, utilisant un flagelle pour la mobilisation. Parfois entouré d'une substance muqueuse péribacillaire. Ce bacille est non fermentant, aérobic strict et peut prospérer et survivre dans une variété de températures comprises entre 10°C et 42°C. Il habite normalement le sol et les surfaces en milieu aqueux, voir même dans de l'eau distillée, ainsi que dans le tube digestif de l'homme et des animaux. Son adaptabilité et sa haute résistance intrinsèque aux antibiotiques lui permettent de survivre dans un large éventail d'autres environnements naturels et artificiels, y compris le matériel hospitalier (sondes, trocarts, cathéters), hôtelier (robinetterie), etc. (Kayser *et al.*, 2005; Jenny et Kingsbury, 2018); <http://anne.decoaster.free.fr/bgn/pseudo.htm>).

4.1.2. Substances élaborées

Pseudomonas aeruginosa appelée aussi bacille pyocyanique produit deux pigments qui diffusent dans le milieu de culture la pyocyanine, bleu vert, soluble dans le chloroforme, et la pyoverdine, jaune vert, fluorescent et soluble dans l'eau (Lazoul et Rabhi, 2014).

Pseudomonas aeruginosa élabore des toxines et des enzymes qui participent au pouvoir pathogène. Ce sont: des enzymes extra cellulaires : une exotoxine A de nature protéique, et une enterotoxine produite par de rares souches (Kayser *et al.*, 2005).

4.1.3. Pouvoir pathogène

Pseudomonas aeruginosa figure parmi les agents pathogènes opportunistes les plus courants en milieu hospitalier. Ce microorganisme peut utiliser ses pili de fixation pour adhérer aux cellules hôtes.

Les facteurs de virulence pertinents sont: l'exotoxine A, l'exoenzyme S, la cytotoxine, diverses protéases métalliques et deux types de phospholipase C. Bien entendu, le lipopolysaccharide de la membrane externe joue également un rôle important dans la pathogénèse. Les infections à *Pseudomonas* ne surviennent que chez les patients immunodéprimés (Kayser *et al.*, 2005; Soni *et al.*, 2018).

P. aeruginosa a une capacité aiguë à détruire les macrophages humains en utilisant la production d'exotoxine A pour régesser l'absorption de 3H-thymidine par les cellules, donnant ainsi à *P. aeruginosa* sa haute toxicité (Jenny et Kingsbury, 2018).

4.1.4. Sensibilité aux antibiotiques

P. aeruginosa résiste naturellement à plusieurs classes d'antibiotiques : aminopénicillines, céphalosporines 1G et 2G, céfotaxime, ertapénème, kanamycine, tétracyclines, chloramphénicol et triméthoprine.

Les résistances acquises sont dues à une imperméabilité accrue de la membrane externe (modification des porines), à une surexpression de la pompe MexAB-OprM, qui augmente l'efflux d'antibiotiques, la production de β -lactamines et d'enzymes inactivant les aminosides et mutations de gyrases et de topo-isomérases qui provoquent une résistance aux fluoroquinolones. Ces mécanismes combinés conduisent à une multirésistance aux médicaments (Abbas *et al.*, 2018).

4.2. *Staphylococcus aureus*

4.2.1. Morphologie et habitat

Le *Staphylococcus aureus*, appelé aussi staphylocoque doré, est une bactérie à Gram positif, aéro-anaérobie facultative de forme arrondie immobile, qui se présente sous la forme de diplocoques ou de grappes de raisin (amas) dépourvue de capsule. Dans des conditions optimales, la division cellulaire se produit approximativement tous les 20 min avec un diamètre de cellule allant de 0,5 à 1,5 μm .

Staphylococcus aureus est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux (rhino-pharynx, intestin). On le trouve sur la muqueuse nasale d'un tiers environ des sujets normaux. Elle est présente sur la peau chez 20 à 30% des individus. Les germes peuvent être localisés à plusieurs endroits du corps : comme le nez, le pharynx, le pharynx, le périnée, et en plus faible quantité dans le tube digestif.

4.2.2. Substances élaborées

La pathogénicité de *Staphylococcus aureus* est associée à l'expression de plusieurs facteurs. On distingue Les facteurs d'adhésion (telle que la protéine A et la protéine de liaison au collagène), des substances à effets nécrotiques et les facteurs de résistance à la phagocytose grâce (à la présence d'une capsule) à la formation de microcolonies tissulaires entourées de fibrine et à la protéine A en empêchant le processus de phagocytose de se mettre en place (Alioua, 2005; Kayser *et al.*, 2005).

4.2.3. Pouvoir pathogène

Le *Staphylococcus aureus* est un germe pyogène par excellence, il est l'accusé principal des infections suppuratives cutanées, sous cutanées, muqueuses et ORL Il convient de signaler que *S. aureus* peut aussi être responsable dans certaines infections localisées notamment des infections de l'appareil respiratoire, l'endocardite, les infections urinaires, les phlébites les méningites et l'ostéomyélite mais aussi la septicémie.

4.2.4. Sensibilité aux antibiotiques

Staphylococcus aureus a une grande aptitude (plasticité génétique) à développer différents mécanismes de résistance aux antibiotiques, Il est naturellement résistant aux monobactames (aztréoname), aux quinolones de 1^{ère} génération (acide nalidixique) et aux peptides cycliques (polymyxines B) (Alioua, 2005). Aujourd'hui, moins de 10% des souches sont moins en moins sensibles aux pénicillines, dont la méticilline fait partie, d'où le nom SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (Murray *et al.*, 2009), et d'autres résistances ne cessent d'apparaître, pour en nommer que la résistance à la vancomycine, le SARV : *Staphylococcus aureus* résistant à la vancomycine. Il est à noter que ce germe a développé une résistance croisée entre les pénicillines M (méticilline, oxacilline) et les autres β -lactamines par production d'une protéine liant les pénicillines (PLP) de faible affinité, la PLP2a (Daurel et Leclercq, 2008). Le gène codant la PLP2a, *mecA*, est porté par un élément chromosomique qui contient également d'autres gènes de résistance aux métaux lourds et à d'autres antibiotiques, ceci expliquant le profil de multirésistance des SARM (Dumitrescu *et al.*, 2010).

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

1. But du travail

Le but de ce travail est de vérifier l'effet de deux variables à savoir la concentration de l'agar-agar et le temps d'incubation sur le diamètre de la zone d'inhibition. Ceci, pour pouvoir prédire le diamètre d'inhibition et d'examiner également l'impact de ces variables sur l'interprétation des résultats d'un antibiogramme. Ainsi, de vérifier la possibilité de réduire le coût du milieu de culture sans affecter la qualité de l'antibiogramme.

2. Cadre d'étude

Les milieux de culture utilisés dans cette étude ont été préparés au laboratoire de microbiologie de l'Université de Ghardaïa et le reste des travaux ont été effectués au laboratoire Essalam, Bounoura, Ghardaïa.

3. Matériel de laboratoire

Le matériel utilisé au cours de ce travail de recherche est représenté ci-dessous.

3.1. Appareillage

Etuve (Mettler), autoclave, balance, bain-marie

3.2. Petit matériel

Bec Bunsen, anse de platine, pipettes Pasteur, écouvillons, boîtes de Pétri, tube à vis, pied à coulisse digital, flacons de 180 mL en verre avec bouchon à vis.

3.3. Produits chimiques

-Eau distillée.

-Extrait de viande (BIOCHEM Chemopharma®)

-Poudre agar-agar (BIOCHEM Chemopharma®)

-Amidon de pomme de terre (VWR BDH PROLABO®)

-Peptone bactériologique (liofilchem®)

-Antibiotiques : vingt antibiotiques furent utilisés (charge en µg/mL) :

Amikacine (30)	Ticarcilline (75)	Chloramphénicol(30)	Cotrimoxazol=
Gentamycine (10)	Céfoxitine (30)	Rifampicine (5)	Sulfaméthoxazole+
Tobramycine (10)	Clindamycine (2)	Ofloxacin (5)	Triméthoprime (1.25/3.75)
Imipénème (10)	Tétracycline (30)	Teicoplanine (30)	Ticarcilline+Acide Clavulanique
Ceftazidime (10)	PénicillineG(1u)	Vancomycine (30)	(75/10)
Aztréonam (30)			

Erythromycine (15) Acide pipémidique (20)

3.4. Matériel biologique

Dans ce genre d'étude il est recommandé de travailler avec des souches de référence telles que les ATCC.

Pour le déroulement de notre travail, nous avons utilisé trois souches bactériennes qui font parties de deux groupes taxonomiques : Gram positive et Gram négative. Ces deux souches ont été choisies car elles sont fréquemment isolées des échantillons cliniques (Tableau 5), elles ont une croissance rapide à 37°C et elles représentent grande part des infections nosocomiales signalées dans le monde.

Les souches bactériennes ayant servis au déroulement de cette étude étaient conservées dans de la gélose de conservation et fournies par le laboratoire d'analyses médicales du EHS des maladies cardio-vasculaires et médecine du sport Maouche Mohand Amokrane (Ex. CNMS Hôpitaux, Alger).

Tableau 5. Description des souches utilisées (Grosjean *et al.*, 2011; Beddou, 2015).

Souche	Habitat préférentiel	Infections hospitalières
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Sol, eau, plantes • Voies respiratoires • Matières fécales • Appareils sanitaires 	<ul style="list-style-type: none"> • Infections pulmonaires et urinaires • Brûlures • Plaies septicémies
<i>Staphylococcus aureus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Peau, cheveux • Nasopharynx • Périnée • Poussières, air • Aliments contaminé 	<ul style="list-style-type: none"> • Infections cutanées, plaies, abcès • Ostéites, ostéomyélites • Infections pulmonaires • Intoxications alimentaires

3.5. Milieu de culture

Nous avons utilisé le milieu gélose Mueller Hinton, qui est un milieu relativement riche. De plus, cette gélose standardisée est la gélose permettant de tester l'action des antibiotiques sur les bactéries, c'est-à-dire pour la réalisation de l'antibiogramme standard (principale utilisation).

4. Méthodes utilisées

Notre démarche expérimentale est résumée dans la figure 7 :

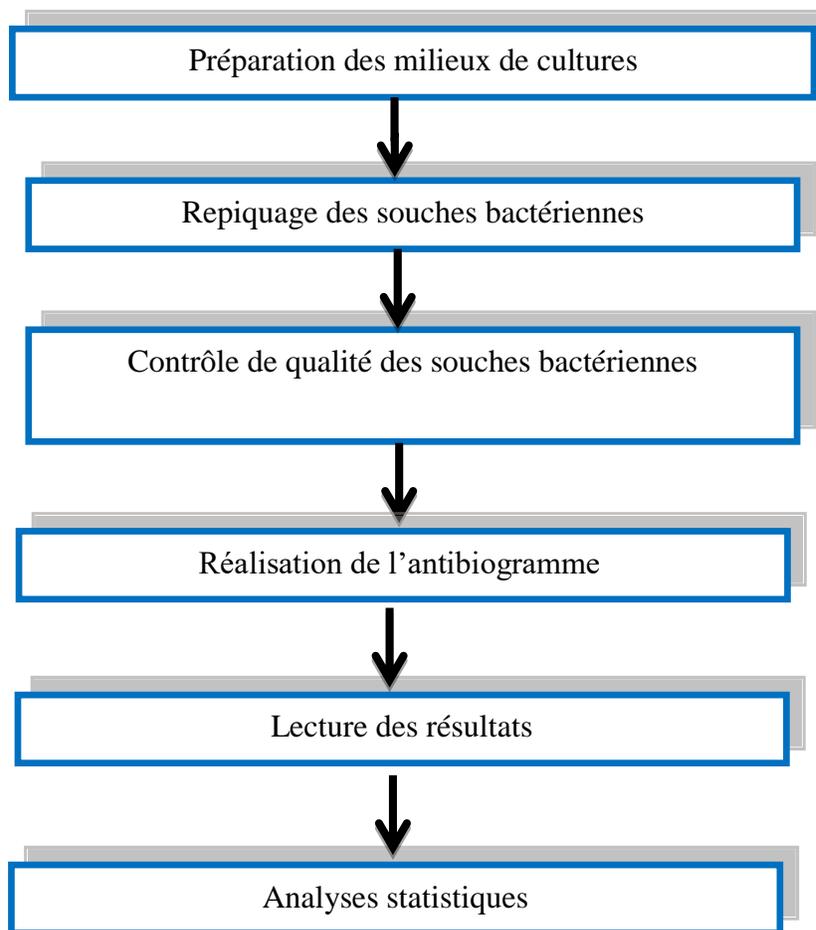


Figure 7. Etapes de la démarche expérimentale.

4.1. Préparation des milieux de cultures

Nous avons préparé, au laboratoire de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université de Ghardaïa, différents milieux de culture ayant la même composition chimique que la gélose Muller Hinton (MH) mais avec des concentrations différentes d'agar-agar.

Composition pour un litre du milieu de culture Muller Hinton gélosé :

Peptone	17,5 g
Amidon	1,5 g
Extrait de viande	2 g
Agar-agar	17 g

Préparation

Nous avons préparé, en quantités suffisantes, sept milieux de culture de différentes concentrations en agar-agar : 14, 15, 16, 17, 18, 19 et 20 g/L.

On a procédé comme suit pour préparer ces milieux de culture :

- Mettre en suspension les ingrédients dans 1 litre d'eau distillée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en flacons de 180 mL (trois flacons pour chaque concentration).
- Stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

4.2. Repiquage des souches bactériennes

Les deux souches bactériennes utilisées ont été repiquées par la méthode des stries sur milieu gélosé Mueller Hinton, puis incubées à 37°C, durant 24 h, afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum.

4.3. Contrôle de qualité des souches bactériennes

Après avoir repiqué les souches bactériennes nous avons vérifié la pureté des souches par observation macroscopique des colonies qui doit montrer la présence d'un seul type de colonies présentant les mêmes caractéristiques à savoir la couleur, la forme, l'aspect, et la taille. Nous avons également effectué des antibiogrammes pour comparer les profils des souches reçues à ceux des souches ATCC.

4.4. Antibiogramme par diffusion sur milieu Mueller Hinton gélosé

La méthode de diffusion des antibiotiques en milieu gélosé est basée sur l'observation de la croissance bactérienne en présence d'un gradient de concentration d'antibiotique obtenu par diffusion à partir des disques dans le milieu gélosé. La fiabilité des résultats d'un antibiogramme est influencée par de nombreux paramètres qui doivent être rigoureusement contrôlés. La technique standard utilisée est celle préconisée par les documents émanant de la Société Française de Microbiologie (SFM) selon les normes du communiqué 2010.

4.4.1. Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture pure (de 18 à 24 h) sur milieu Mueller Hinton solide, quelques colonies ont été raclées à l'aide d'une anse de platine, visiblement bien isolées et parfaitement identiques. On décharge l'anse dans 20 mL d'eau distillée stérile à 0,9% NaCl. Puis, bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être à 0,5 McFarland, qui est

l'équivalent d'une densité optique de 0,08 à 0,1 (absorbance mesurée à 625 nm), l'inoculum est ajusté a cette valeur en ajoutant des colonies (si nécessaire). Cette concentration correspond globalement à $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (EUCAST, 2018). Cette suspension doit être utilisée dans les cinq minutes qui suivent sa préparation.

4.4.2. Ensemencement

La gélose Mueller-Hinton stérile (prête à l'usage) est coulée dans des boîtes de Pétri stériles (de 90 mm de diamètre) et laissée se gélifier. L'épaisseur de la gélose est de 4 mm répartie uniformément dans les boîtes. Ces dernières doivent être séchées durant 30 min à la température ambiante avant leur emploi. Plonger un écouvillon dans la suspension bactérienne et éliminer le liquide excédentaire en le tournant et en le pressant sur les parois du tube. On l'étale à une prise sur la surface entière du milieu de culture, en tournant la boîte Pétri à environ 60°C après chaque application (ensemencement) pour obtenir une distribution égale et homogène de l'inoculum. Finalement, on écouvillonne partout autour des bords de la surface du milieu de culture (la gélose), l'écouvillon est rechargé chaque fois qu'une nouvelle boîte de Pétri est ensemencée, l'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des souches bactériennes ensemencées (CLSI, 2012; CASFM, 2017).

4.4.3. Choix des antibiotiques et incubation

Un antibiogramme permet de tester, sur milieu de culture solide, l'action des antibiotiques sur les souches bactériennes dans le but de déterminer la sensibilité (ou la résistance) de chaque antibiotique. Le choix des antibiotiques a été fait en fonction de leur mode d'action, et selon leur utilisation par les spécialistes de la pharmacologie médicale et également selon leur disponibilité.

- On a posé les disques en appuyant légèrement pour qu'ils adhèrent bien à la gélose.
- Les disposer à 15 mm minimum de la périphérie de la boîte de manière à ce que les zones d'inhibition ne se chevauchent pas.

Vinght et un (21) antibiotiques, appartenant a des familles différentes, ont été utilisés pour réaliser nos expériences (Tableau 6).

Tableau 6. Familles des antibiotiques utilisés (CA-SFM / EUCAST, 2018) et (standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale 5ème édition, 2014).

	Abrégé	ATB	Famille	Charge (µg/mL)	Mode d'action
<i>P. aeruginosa</i>	AK	Amikacine	Aminosides	30	Peptidoglycane
	GEN	Gentamycine	Aminosides	10	ribosome
	TOB	Tobramycine	Aminosides	10	synthèse de protéine
	IPM	Imipénème	Carbapénèmes	10	Peptidoglycane
	CAZ	Ceftazidime	Céphalosporines	10	Peptidoglycane
	ATM	Aztréonam	Monobactames	30	Peptidoglycane
	TCC	Ticarcilline+ Ac. Clavulanique	Pénicillines	75/10	Peptidoglycane
	TIC	Ticarcilline	Pénicillines	75	Peptidoglycane
	PI	Ac. pipémidique	Quinolones		synthèse des acides nucléiques
<i>S. aureus</i>	CX	Céfoxitine FOX	Céphalosporines	30	peptidoglycane
	GEN	Gentamycine	Aminosides	10	ribosome
	C	Chloramphénicol	Phénicolés	30	ribosome
	R	Rifampicine	Antituberculeux	5	mécanismes complexes
	OF	Ofloxacine	Fluoroquinolones	5	synthèse des acides nucléiques
	TEC	Teicoplanine	Glycopeptides	30	peptidoglycane
	VA	Vancomycine	Glycopeptides	5	peptidoglycane
	E	Erythromycine	Macrolides; lincosamides;	15	synthèse de protéine
	CD	Clindamycine	Macrolides; lincosamides;	2	synthèse de protéine
	p	Pénicilline G	Pénicillines	1 unité	peptidoglycane
	TE	Tétracycline	Tétracyclines	30	ribosome
	COT	Cotrimoxazole = (Sulfaméthoxazole + Triméthoprime)	Sulfamides	1,25-23,75	synthèse de l'acide folique

Les disques d'antibiotiques sont appliqués avec une légère pression à l'aide d'une pince bactériologique stérile afin d'assurer le contact complet avec la surface de la gélose. Une fois appliqué, le disque ne peut pas être déplacé car la diffusion des antibiotiques est très rapide (CASFM, 2017), les antibiotiques diffusent de manière uniforme si bien que leurs concentrations sont inversement proportionnelles à la distance du disque (Mohammedi *et al.*, 2012). Les cinq disques utilisés sont distribués de sorte que les zones d'inhibition autour des disques ne se chevauchent pas et qu'ainsi la zone d'inhibition puisse être déterminée. Le

diamètre des disques est de 6 mm (figure8). Les boîtes sont incubées à l'étuve à 37°C en position inversée durant 24 h (Parsaeimehr *et al.*, 2010).



Figure 8. Ensemencement de *P. aeruginosa* et application des disques d'antibiotiques (Photo Originale).

4.4.4. Lecture des résultats

Le but de notre étude est d'analyser, pour deux souches bactériennes, l'influence du temps d'incubation et de la concentration d'agar-agar sur le diamètre de la zone d'inhibition de la croissance bactérienne dans un antibiogramme. Pour ce faire, chaque paire antibiotique-concentration d'agar-agar est répété trois fois et le diamètre de la zone d'inhibition de la croissance bactérienne, traduite par un halo translucide autour du disque (Figure 9), est mesuré avec précision à l'aide d'un pied à coulisse digital (en le maintenant perpendiculairement à l'axe optique) chaque vingt-quatre heures pendant quatre jours. Les résultats sont interprétés selon les critères du Comité d'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2018). Les deux souches testées ont été classées dans trois catégories: sensible (S), résistante (R) ou intermédiaire (I) à un antibiotique selon le diamètre de la zone d'inhibition; plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'antibiotique, et plus il est petit, plus la bactérie est résistante.



Figure 9. Principe de la lecture d'un antibiogramme (Photo Originale).

1: disque d'antibiotique; 2: croissance bactérienne; 3. zone d'inhibition.

4.5. Analyses statistiques

Les données obtenus ont été saisies en utilisant le logiciel Excel version 2010 et traitées par le logiciel XLSTAT 2016. Afin d'examiner l'effet de la concentration d'agar-agar et l'effet de la période d'incubation, différents tests statistiques ont été effectués.

Pour une meilleure exploitation des résultats, les tests paramétriques (anova par exemple) sont préférables pour leur puissance, mais dans le cas où l'une des conditions d'application de ces tests n'est pas remplie (telque la normalité) nous devons recourir à des tests non paramétriques connus pour leur robustesse.

Dans le cas où l'hypothèse de normalité n'est pas acceptable et pour k échantillons indépendants on utilise le test de Kruskal-Wallis. Tandis que pour k échantillons appariés on utilise le test de Friedman.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

1. *Pseudomonas aeruginosa*

1.1. Résultats de test contrôle de qualité

L'observation macroscopique (à l'œil nu) de la boîte de Pétri ensemencée par *Pseudomonas aeruginosa* "ATCC 27853" montre la présence de colonies de même forme, de même couleur, de même taille et de même aspect, ce qui indique qu'elles appartiennent à la même souche bactérienne.

Après avoir effectué l'antibiogramme, les mesures des diamètres d'inhibition sont soigneusement prises et comparées aux valeurs critiques décrites pour la souche de référence *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Les résultats obtenus et présentés dans le tableau 7 indiquent que la souche testée ne correspond pas à la souche de référence *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Tableau 7. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 cultivée sur la gélose Muller Hinton (Standardisation de l'Antibiogramme en Médecine Humaine. 4^{ème} Edition 2005).

Antibiotique	charge	Limites acceptables de diamètres d'inhibition de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>P. aeruginosa</i> "ATCC 27853"
imipénème	10	22—28	19
Aztréonam	30	23—29	26
Acide pipémidique	100	25—33	20
Gentamycine	10	17—23	25
Ticarcilline	75	21—27	22
Céftazidime	30	22—29	< 6
Ticarcilline + acide clavulanique	75 /10	20—28	14
Amikacine	30	23—29	24
Tobramycine	10	20—26	20

1.2. Résultats de l'antibiogramme

Pour chaque paire antibiotique-concentration agar-agar (individu) nous avons utilisé deux répliques analytiques et les mesures des diamètres des zones d'inhibition prises (sur un fond noir) chaque 24 heures durant quatre jours et la troisième mesure (individu 3) est la moyenne des deux répliques sont présentées dans l'annexe 1 et les figures 10 et 11.

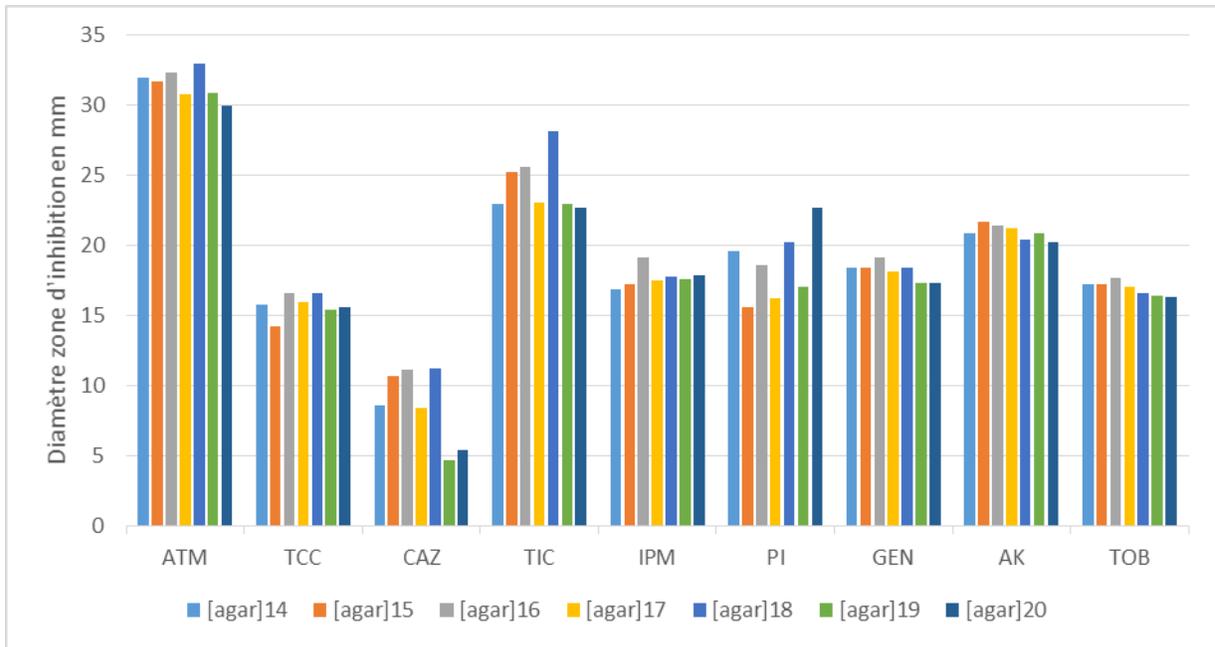


Figure 10. Variation de diamètre des zones d'inhibition en fonction de la concentration du milieu de culture en agar-agar chez *Pseudomonas aeruginosa*.

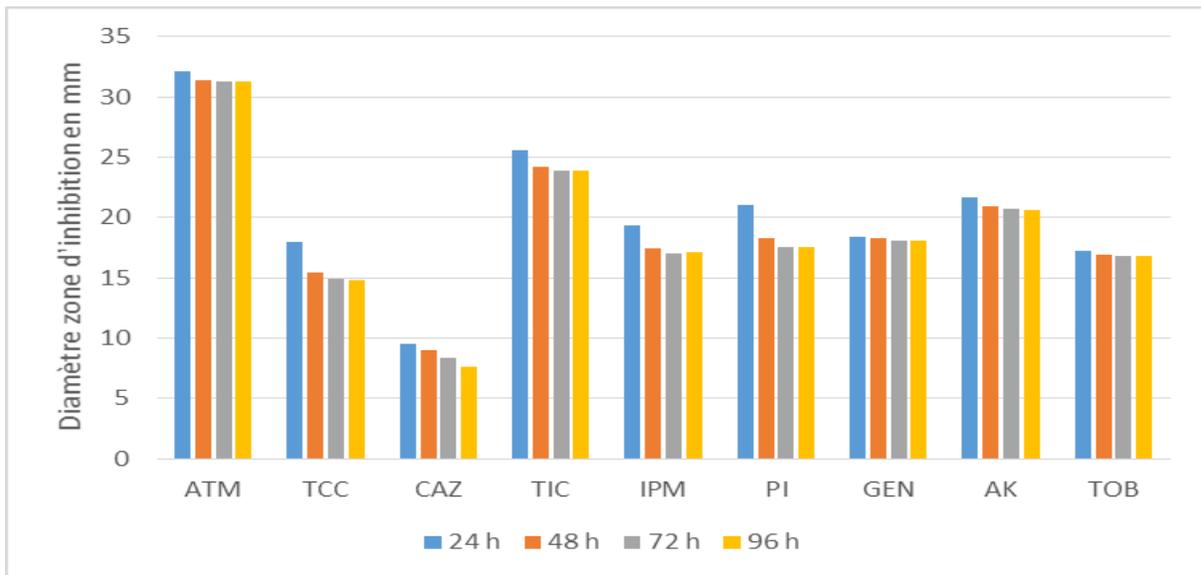


Figure 11. Variation de diamètre des zones d'inhibition en fonction du temps d'incubation chez la souche *Pseudomonas aeruginosa*.

Selon l'annexe 2 la variation de la concentration d'agar-agar a engendré une variation de diamètre d'inhibition allant de 1,02 mm pour l'amikacine jusqu'à 8,79 mm pour l'acide pipémidique. La plus petite variation de diamètre d'inhibition causée par le temps d'incubation est enregistrée pour la gentamycine (0,06 mm) et la plus élevée est enregistrée

pour ticarcilline + acide clavulanique (4,37 mm). Il convient de noter qu'une lecture simple de l'annexe 2 a révélé que la souche *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotique est très sensible à la variation de la concentration d'agar-agar et le temps d'incubation, ce qui doit être confirmé ou abjuré par des tests statistiques adéquats et convenables.

Tableau 8. Interprétations des antibiogrammes selon le diamètre des zones d'inhibition pour *Pseudomonas aeruginosa* d'après EUCAST 2018.

ATB	[agar]	24 h	48 h	72 h	96 h	ATB	[agar]	24 h	48 h	72 h	96 h
ATM	14	S	S	S	S	PI	14	S	S	S	S
ATM	15	S	S	S	S	PI	15	S	S	S	S
ATM	16	S	S	S	S	PI	16	S	S	S	S
ATM	17	S	S	S	S	PI	17	S	S	S	S
ATM	18	S	S	S	S	PI	18	S	S	S	S
ATM	19	S	S	S	S	PI	19	S	S	S	S
ATM	20	S	S	S	S	PI	20	S	S	S	S
TCC	14	S	R	R	R	GEN	14	S	S	S	S
TCC	15	R	R	R	R	GEN	15	S	S	S	S
TCC	16	S	R	R	R	GEN	16	S	S	S	S
TCC	17	R	R	R	R	GEN	17	S	S	S	S
TCC	18	S	R	R	R	GEN	18	S	S	S	S
TCC	19	R	R	R	R	GEN	19	S	S	S	S
TCC	20	R	R	R	R	GEN	20	S	S	S	S
CAZ	14	R	R	R	R	AK	14	S	S	S	S
CAZ	15	R	R	R	R	AK	15	S	S	S	S
CAZ	16	R	R	R	R	AK	16	S	S	S	S
CAZ	17	R	R	R	R	AK	17	S	S	S	S
CAZ	18	R	R	R	R	AK	18	S	S	S	S
CAZ	19	R	R	R	R	AK	19	S	S	S	S
CAZ	20	R	R	R	R	AK	20	S	S	S	S
TIC	14	S	S	S	S	TOB	14	S	S	S	S
TIC	15	S	S	S	S	TOB	15	S	S	S	S
TIC	16	S	S	S	S	TOB	16	S	S	S	S
TIC	17	S	S	S	S	TOB	17	S	S	S	S
TIC	18	S	S	S	S	TOB	18	S	S	S	S
TIC	19	S	S	S	S	TOB	19	S	S	S	S
TIC	20	S	S	S	S	TOB	20	S	S	S	S
IPM	14	I	R	R	R						
IPM	15	I	I	R	R						
IPM	16	S	I	I	I						
IPM	17	I	I	R	I						
IPM	18	I	I	I	I						

IPM	19	I	I	I	I
IPM	20	I	I	I	I

Le tableau 8 montre que la souche *Pseudomonas aeruginosa* est très sensible à tous les antibiotiques testés à l'exception de ticarcilline + acide clavulanique et céftazidime et le profil de sensibilité a changé à partir du deuxième jour pour la concentration d'agar-agar 14 g/L et le lendemain pour les concentrations 15 g/L et 16 g/L, pour les autres antibiotiques, le profil de sensibilité n'a pas changé, ceci est dû au fait que les diamètres d'inhibition sont largement supérieurs aux valeurs critiques de sensibilité.

1.3. Tests statistiques

Plusieurs tests statistiques permettant de comparer des échantillons parmi eux les tests paramétriques, tel que l'ANOVA, souvent préférés pour leur puissance. Cependant ces tests sont valables uniquement sous certaines hypothèses portant sur les résidus: normalité, homoscedasticité et l'absence d'autocorrélation.

1.3.1. Test de normalité

Les tests de normalité impliquent l'hypothèse nulle que la variable ayant généré les échantillons suit une distribution normale.

Tableau 9. *p*-value générées par variation du temps d'incubation suivant la procédure de Shapiro-Wilk avec seuil de signification $\alpha = 0,05$.

Echantillon	Shapiro-Wilk	Echantillon	Shapiro-Wilk	Echantillon	Shapiro-Wilk
ATM_J1	0,013	TIC_J1	0,806	GEN_J1	0,251
ATM_J2	0,222	TIC_J2	0,071	GEN_J2	0,293
ATM_J3	0,083	TIC_J3	0,095	GEN_J3	0,158
ATM_J4	0,090	TIC_J4	0,148	GEN_J4	0,158
TCC_J1	0,216	IPM_J1	0,040	AK_J1	0,886
TCC_J2	0,002	IPM_J2	0,983	AK_J2	0,875
TCC_J3	0,077	IPM_J3	0,977	AK_J3	0,625
TCC_J4	0,056	IPM_J4	0,995	AK_J4	0,386
CAZ_J1	0,000	PI_J1	0,139	TOB_J1	0,354
CAZ_J2	0,000	PI_J2	0,909	TOB_J2	0,431
CAZ_J3	0,000	PI_J3	0,773	TOB_J3	0,246
CAZ_J4	0,016	PI_J4	0,665	TOB_J4	0,162

Tableau 10. *p*-value générées par variation de la concentration d’agar-agar suivant la procédure de Shapiro-Wilk avec seuil de signification $\alpha = 0,05$.

Echantillon	Shapiro-Wilk	Echantillon	Shapiro-Wilk	Echantillon	Shapiro-Wilk
ATM_agar14	0,000	TIC_agar14	0,004	GEN_agar14	0,098
ATM_agar15	0,331	TIC_agar15	0,002	GEN_agar15	0,095
ATM_agar16	0,394	TIC_agar16	0,600	GEN_agar16	0,079
ATM_agar17	0,002	TIC_agar17	0,005	GEN_agar17	0,004
ATM_agar18	0,633	TIC_agar18	0,151	GEN_agar18	0,585
ATM_agar19	0,769	TIC_agar19	0,016	GEN_agar19	0,324
ATM_agar20	0,118	TIC_agar20	0,331	GEN_agar20	0,009
TCC_agar 14	0,003	IPM_agar14	0,359	AK_agar14	0,184
TCC_agar 15	0,565	IPM_agar15	0,363	AK_agar15	0,001
TCC_agar 16	0,084	IPM_agar16	0,038	AK_agar16	0,556
TCC_agar 17	0,714	IPM_agar17	0,387	AK_agar17	0,088
TCC_agar 18	0,046	IPM_agar18	0,075	AK_agar18	0,383
TCC_agar 19	0,022	IPM_agar19	0,285	AK_agar19	0,001
TCC_agar 20	0,038	IPM_agar20	0,019	AK_agar20	0,001
CAZ_agar 14	0,747	PI_agar14	0,001	TOB_agar14	0,827
CAZ_agar 15	0,067	PI_agar15	0,001	TOB_agar15	0,611
CAZ_agar 16	< 0,0001	PI_agar16	0,431	TOB_agar16	0,030
CAZ_agar 17	< 0,0001	PI_agar17	0,366	TOB_agar17	0,004
CAZ_agar 18	0,112	PI_agar18	0,496	TOB_agar18	0,004
CAZ_agar 19	0,076	PI_agar19	0,626	TOB_agar19	0,126
CAZ_agar 20	0,033	PI_agar20	0,009	TOB_agar20	0,310

Une *p*-value faible ($p\text{-value} < \alpha$) indique un risque faible de se tromper en concluant que les données sont ‘non-normales’. En d’autres termes, si $p\text{-value} < \alpha$, les données s’écartent significativement de la normalité. Les tableaux 9 et 10 nous indiquent qu’au moins un des échantillons de tous les antibiotique issu d’une distribution asymétrique. Donc, l’application de tests paramétriques (ANOVA par exemple) pour examiner l’impact de la concentration d’agar-agar et de temps d’incubation sur le diamètre d’inhibition n’est pas possible. Nous devons donc recourir à des tests non paramétriques.

1.3.2. Régression linéaire multiple

Comme la distribution des individus au sein de la plupart des échantillons ne suit pas la loi normale, nous avons calculé les coefficients de corrélation de Spearman entre le diamètre

d'inhibition (D_{ATB}) et les deux variables temps d'incubation et concentration d'agar-agar. Ensuite, nous avons effectué une régression linéaire multiple. Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau 11.

Tableau 11. Récapitulatif des coefficients de corrélation de Spearman entre le diamètre d'inhibition (D_{ATB}) et les deux variables temps d'incubation et concentration d'agar-agar, le coefficient de détermination R^2 et les paramètres de l'équation du modèle chez *Pseudomonas aeruginosa* "ATCC 27853".

D_{ATB}	temps incub.	Conc. agar	R^2	Const.	t	[Agar]	Equation du modèle
D_{ATM}	-0,256	-0,255	0,163	36,553	-0,012	-0,254	$D_{ATM} = 36,55 - 0,011 * t - 0,2536 * [\text{agar}]$
D_{TCC}	-0,548	0,095	0,323	17,222	-0,043	0,066	$D_{TCC} = 17,22 - 4,28E-02 * t$
D_{CAZ}	-0,283	-0,308	0,234	23,239	-0,026	-0,771	$D_{CAZ} = 23,23 - 2,56E-02 * t - 0,77 * [\text{agar}]$
D_{TIC}	-0,293	-0,097	0,084	27,472	-0,023	-0,102	$D_{TIC} = 27,47 - 2,25E-02 * t$
D_{IPM}	-0,586	0,164	0,340	18,095	-0,030	0,085	$D_{IPM} = 18,09 - 3,01E-02 * t$
D_{PI}	-0,323	0,298	0,178	13,109	-0,046	0,487	$D_{PI} = 13,109 - 4,63E-02 * t + 0,487 * [\text{agar}]$
D_{GEN}	-0,110	-0,544	0,301	22,133	-0,004	-0,217	$D_{GEN} = 22,13 - 0,216 * [\text{agar}]$
D_{AK}	-0,392	-0,367	0,321	24,533	-0,014	-0,161	$D_{AK} = 24,53 - 1,37E-02 * t - 0,16 * [\text{agar}]$
D_{TOB}	-0,229	-0,735	0,505	20,690	-0,005	-0,201	$D_{TOB} = 20,69 - 5,37E-03 * t - 0,201 * [\text{agar}]$

Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification $\alpha = 0,05$. (Annexe 3.)

Le tableau 11 révèle que seul le coefficient de corrélation entre le diamètre d'inhibition de la gentamycine, et la variable temps d'incubation ne diffère pas significativement de zéro, ce qui reflète l'absence de corrélation entre ces deux variables, ceci est confirmé par le faible coefficient de la variable (t) dans les modèles mathématiques correspondant. Tandis que pour aztréoname, ticarcilline + acide clavulanique, céftazidime, céftazidime, imipénème, acide pipémidique et amikacine on remarque la présence d'une corrélation négative, c'est à dire que le diamètre d'inhibition diminue avec le temps.

Concernant la variable concentration agar-agar les coefficients de corrélation reflètent une influence très importante de la concentration d'agar-agar sur le diamètre d'inhibition pour tobramycine, modérée pour gentamycine, faible Pour aztréoname, céftazidime, acide pipémidique, et amikacine et nulle pour ticarcilline + acide clavulanique, céftazidime et imipénème c'est-à-dire pour ces derniers le diamètre d'inhibition varie indépendamment de la concentration d'agar-agar.

Il convient de noter que seul le diamètre d'inhibition de l'acide pipémidique augmente proportionnellement avec la concentration d'agar-agar, les autres D_{ATB} diminuent au cours du temps.

Le coefficient de détermination (R^2) de tobramycine indique que plus 50 % de la variation du diamètre est expliquée par les modèle mathématique utilisé. Les R^2 des autres antibiotiques sont faibles c'est-à-dire les modèles mathématiques utilisés expliquent mal la variation du diamètre d'inhibition en fonction du temps d'incubation et la concentration d'agar-agar.

1.3.3. Effet de la concentration en agar-agar sur le diamètre de la zone d'inhibition

On est présence de 7 échantillons (de différentes concentrations d'agar-agar) indépendants issues d'une population de distribution asymétrique. Afin de déterminer si ces échantillons proviennent d'une même population (hypothèse nulle H_0) ou si au moins un des échantillons provient d'une population différente des autres on utilise le test de Kruskal-Wallis.

Tableau 12. Récapitulatif des statistiques K de Kruskal-Wallis et les p -value correspondantes renvoyées par le logiciel XLSTAT (avec $\alpha = 0,05$) chez *Pseudomonas aeruginosa*.

Antibiotique	K (Valeur observée)	K (Valeur critique)	DDL	p -value (bilatérale)	Interprétation
ATM	35,590	12,592	6	< 0,0001	S
TCC	13,369	12,592	6	0,038	S
CAZ	46,415	12,592	6	< 0,0001	S
TIC	55,891	12,592	6	< 0,0001	S
IPM	16,921	12,592	6	0,010	S
PI	33,350	12,592	6	< 0,0001	S
GEN	47,433	12,592	6	< 0,0001	S
AK	28,932	12,592	6	< 0,0001	S
TOB	57,391	12,592	6	< 0,0001	S

Etant donné que les p -value calculées pour l'ensemble des antibiotiques sont inférieures au niveau de signification $\alpha=0,05$, on doit rejeter les hypothèses nulles, et retenir les hypothèses alternatives.

Pour mettre en évidence les éventuels échantillons issus d'une même population on effectue des tests de comparaisons multiples. Les résultats obtenus sont présentés dans l'annexe 4.

Interprétations des p -value des comparaisons multiples entre le couple antibiotique-agar-agar 17 g/L et les couples antibiotique-agar-agar 14, 15, 16, 18, 19 et 20 g/L, tirées à partir de l'annexe 4, sont récapitulées dans le tableau 13.

Tableau 13. Récapitulatif des différences significatives par paires ATB-concentration agar-agar pour *Pseudomonas aeruginosa*.

		ATB_ agar14	ATB_ agar15	ATB_ agar16	ATB_ agar18	ATB_ agar19	ATB_ agar20
ATB_ agar17	ATM	Non	Non	Oui	Oui	Non	Non
	TCC	Non	Non	Non	Non	Non	Non
	CAZ	Non	Non	Oui	Oui	Non	Non
	TIC	Non	Non	Non	Oui	Non	Non
	IPM	Non	Non	Non	Non	Non	Non
	PI	Non	Non	Non	Non	Non	Oui
	GEN	Non	Non	Non	Non	Non	Non
	AK	Non	Non	Non	Non	Non	Oui
TOB	Non	Non	Non	Non	Oui	Oui	

Pour *Pseudomonas aeruginosa* la moyenne des diamètres des zones d'inhibition a changé pour ATM et CAZ a une concentration d'agar-agar égale à 16 g/L et on remarque que pour le reste des antibiotiques testés qu'il n'y a pas de différence significative entre les moyennes des diamètres de zones d'inhibition d'un même antibiotique pour les milieux de culture de 14, 15, 16 et 17 g/L d'agar-agar, autrement dit nous pouvons diminuer la concentration en agar-agar, pour préparer le milieu gélosé MH, jusqu'à 14 g/L sans avoir un effet sur le résultat de l'antibiogramme.

1.3.4. Effet de temps d'incubation sur le diamètre de zone d'inhibition

Pour étudier l'effet de temps d'incubation sur le résultat de l'antibiogramme nous avons choisi l'équivalent non paramétrique de l'ANOVA pour comparer k échantillons appariés, le test de Friedman.

On est en présence de 4 échantillons de temps d'incubation différents issues de populations de distribution asymétrique. Afin de déterminer si ces échantillons proviennent d'une même population (hypothèse nulle H_0) ou si au moins un échantillon provient d'une population différente des autres (hypothèse alternative H_a) on utilise le test de Friedman.

Tableau 14. Récapitulatif des statistiques Q de Friedman et les *p*-value correspondantes renvoyées par le logiciel XLSTAT (avec $\alpha = 0,05$) chez *Pseudomonas aeruginosa*.

Antibiotique	Q (Valeur observée)	Q (Valeur critique)	DDL	<i>p</i> -value (bilatérale)	Interprétation de <i>p</i> -value
ATM	36,691	7,815	3	< 0,0001	S
TCC	57,230	7,815	3	< 0,0001	S
CAZ	41,000	7,815	3	< 0,0001	S
TIC	33,422	7,815	3	< 0,0001	S

IPM	47,289	7,815	3	< 0,0001	S
PI	51,408	7,815	3	< 0,0001	S
GEN	20,098	7,815	3	0,000	S
AK	47,834	7,815	3	< 0,0001	S
TOB	19,577	7,815	3	0,000	S

Etant donné que les *p*-value calculées sont inférieure au niveau de signification $\alpha=0,05$, on doit rejeter les hypothèses nulles (H_0), et retenir les hypothèses alternatives (H_a).

Pour mettre en évidence les éventuels échantillons issus d'une même population on effectue des tests de comparaisons multiples. Les résultats obtenus sont présentés dans l'annexe 5.

Interprétations des *p*-value des comparaisons multiples entre le couple antibiotique-temps d'incubation 24 h et les couples antibiotique-temps d'incubation 48-96 h, tirées à partir de l'annexe 5, sont récapitulées dans le tableau 15.

Tableau 15. Récapitulatif des différences significatives par paires ATB-temps d'incubation chez *Pseudomonas aeruginosa*.

	ATB_48 h	ATB_72 h	ATB_96 h
ATM_24 h	Oui	Oui	Oui
TCC_24 h	Non	Oui	Oui
CAZ_24 h	Non	Oui	Oui
TIC_24 h	Oui	Oui	Oui
IPM_24 h	Oui	Oui	Oui
PI_24 h	Oui	Oui	Oui
GEN_24 h	Non	Oui	Oui
AK_24 h	Oui	Oui	Oui
TOB_24 h	Oui	Oui	Oui

A partir du tableau 15, il est évident qu'une incubation dépassant les vingt-quatre heures suivants l'ensemencement des boîtes influence sensiblement les résultats de l'antibiogramme chez *Pseudomonas aeruginosa*.

2. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

2.1. Résultats de test contrôle de qualité

La même démarche de contrôle de qualité suivie pour *Pseudomonas aeruginosa* "ATCC 27853" a été suivie pour *Staphylococcus aureus* "ATCC 25923".

Les résultats obtenus et présentés dans le tableau 16 indiquent que la souche testée ne correspond pas à la souche ATCC 25923.

Tableau 16. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 cultivée sur Muller Hinton (Standardisation de l'Antibiogramme en Médecine Humaine. 4^{ème} Edition 2005).

antibiotique	symbole	Charge (µg/mL)	Limites acceptables de diamètres d'inhibition pour <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Staphylococcus aureus</i> "ATCC 25923"
Rifampicine	R	5	26—34	31
Teicoplanine	TEC	30	15—21	15
Tétracycline	TE	30	24—30	30
Erythromycine	E	15	22—30	24
Oxacilline	OX	5	18—24	17
Pénicilline G	P	6	26—37	30
Céfoxitine	CX	30	23—29	26
Kanamycine	K	30	19—26	20
Ofloxacine	OF	5	24—28	30
Chloramphénicol	C	30	19—26	24
Vancomycine	VA	30	17—21	20
Cotrimoxazole	COT	25	24—32	27
Amikacine	AK	30	20—26	19

2.2. Résultats de l'antibiogramme

Pour chaque paire antibiotique-concentration agar-agar (individu) nous avons utilisé trois répliques analytiques et les mesures des diamètres des zones d'inhibition prises chaque 24 heures durant quatre jours sont présentées dans l'annexe 6 et les figures 12 et 13.

Selon l'annexe 7 la variation de la concentration d'agar-agar a entraîné une variation de diamètre d'inhibition allant de 0,9 mm, pour teicoplanine, jusqu'à 9,13 mm, pour pénicilline G. La variation de diamètre d'inhibition causée par le temps d'incubation enregistrée est de 0 mm, pour l'ensemble des antibiotiques, jusqu'à 12,52 mm pour pénicilline. Il convient de noter que mise à part céfoxitine et pénicilline G, la variation du diamètre d'inhibition en fonction du temps d'incubation est très faible (le diamètre n'a pas changé beaucoup au fil de temps). Par contre, il y a eu un impact plus important sur les diamètres d'inhibition par le changement de la concentration d'agar-agar.

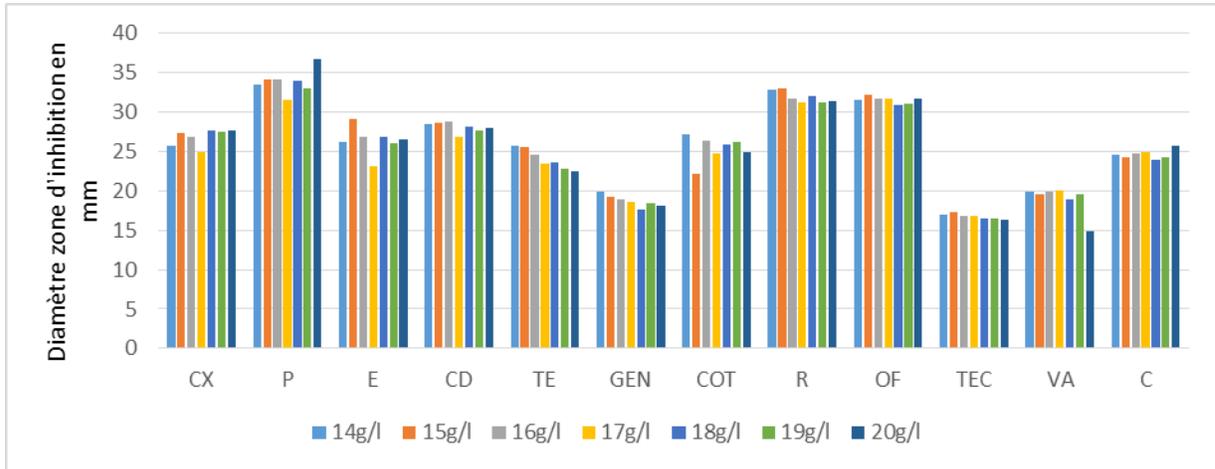


Figure 12. Variation de diamètre des zones d'inhibition en fonction de la concentration du milieu de culture en agar-agar chez *Staphylococcus aureus* "ATCC 25923".

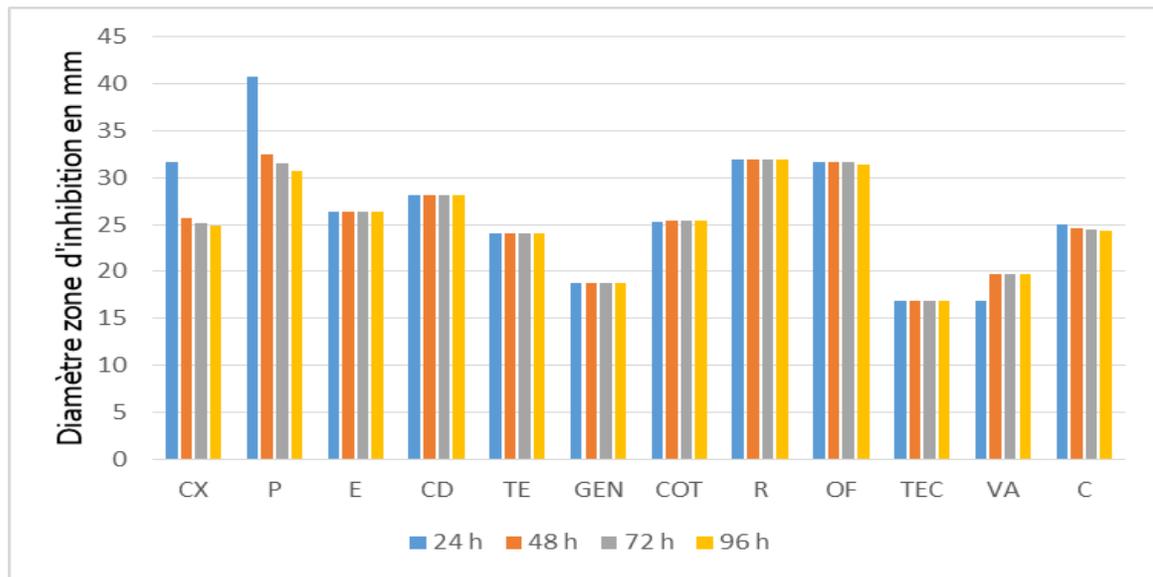


Figure 13. Variation de diamètre des zones d'inhibition en fonction du temps d'incubation chez *Staphylococcus aureus* "ATCC 25923".

Tableau 17. Interprétations des antibiogrammes selon le diamètre des zones d'inhibition pour *Staphylococcus aureus* selon EUCAST 2018.

ATB	[agar]	24 h	48 h	72 h	96 h	ATB	[agar]	24 h	48 h	72 h	96 h
CX	14	S	S	S	S	COT	14	S	S	S	S
CX	15	S	S	S	S	COT	15	S	S	S	S
CX	16	S	S	S	S	COT	16	S	S	S	S
CX	17	S	S	S	S	COT	17	S	S	S	S
CX	18	S	S	S	S	COT	18	S	S	S	S
CX	19	S	S	S	S	COT	19	S	S	S	S

CX	20	S	S	S	S	COT	20	S	S	S	S
P	14	S	S	S	S	R	14	S	S	S	S
P	15	S	S	S	S	R	15	S	S	S	S
P	16	S	S	S	S	R	16	S	S	S	S
P	17	S	S	S	S	R	17	S	S	S	S
P	18	S	S	S	S	R	18	S	S	S	S
P	19	S	S	S	S	R	19	S	S	S	S
P	20	S	S	S	S	R	20	S	S	S	S
E	14	S	S	S	S	OF	14	S	S	S	S
E	15	S	S	S	S	OF	15	S	S	S	S
E	16	S	S	S	S	OF	16	S	S	S	S
E	17	S	S	S	S	OF	17	S	S	S	S
E	18	S	S	S	S	OF	18	S	S	S	S
E	19	S	S	S	S	OF	19	S	S	S	S
E	20	S	S	S	S	OF	20	S	S	S	S
CD	14	S	S	S	S	TEC	14	S	S	S	S
CD	15	S	S	S	S	TEC	15	S	S	S	S
CD	16	S	S	S	S	TEC	16	S	S	S	S
CD	17	S	S	S	S	TEC	17	S	S	S	S
CD	18	S	S	S	S	TEC	18	S	S	S	S
CD	19	S	S	S	S	TEC	19	S	S	S	S
CD	20	S	S	S	S	TEC	20	S	S	S	S
TE	14	S	S	S	S	VA	14	S	S	S	S
TE	15	S	S	S	S	VA	15	S	S	S	S
TE	16	S	S	S	S	VA	16	S	S	S	S
TE	17	S	S	S	S	VA	17	S	S	S	S
TE	18	S	S	S	S	VA	18	S	S	S	S
TE	19	S	S	S	S	VA	19	S	S	S	S
TE	20	S	S	S	S	VA	20	S	S	S	S
GEN	14	S	S	S	S	C	14	S	S	S	S
GEN	15	S	S	S	S	C	15	S	S	S	S
GEN	16	S	S	S	S	C	16	S	S	S	S
GEN	17	S	S	S	S	C	17	S	S	S	S
GEN	18	R	R	R	R	C	18	S	S	S	S
GEN	19	S	S	S	S	C	19	S	S	S	S
GEN	20	S	S	S	S	C	20	S	S	S	S

Selon le tableau 17 il n'y a aucun changement de profile de résistance ni pour les couples antibiogramme-concentration d'agar-agar ni pour les couples antibiotique-temps d'incubation.

En d'autres termes, la variation de la concentration d'agar-agar n'a pas influencé, au cours des 4 jours, la catégorie de sensibilité de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques testés.

2.3. Tests statistiques

Le même raisonnement pour choisir les tests statistiques et les mêmes démarches suivies pour *Pseudomonas aeruginosa* ont été suivies pour *Staphylococcus aureus*.

2.3.1. Test de normalité

Les tests de normalité impliquent l'hypothèse nulle que la variable ayant généré les échantillons suit une distribution normale.

Tableau 18. *p*-value générées par variation du temps d'incubation suivant la procédure de Shapiro-Wilk avec seuil de signification $\alpha = 0,05$.

Echantillon	Shapiro-Wilk	Echantillon	Shapiro-Wilk	Echantillon	Shapiro-Wilk
CX_J1	0,169	TE_J1	0,285	OF_J1	0,286
CX_J2	0,147	TE_J2	0,285	OF_J2	0,227
CX_J3	0,061	TE_J3	0,257	OF_J3	0,227
CX_J4	0,035	TE_J4	0,257	OF_J4	0,019
P_J1	0,120	GEN_J1	0,895	TEC_J1	0,212
P_J2	0,005	GEN_J2	0,895	TEC_J2	0,212
P_J3	0,045	GEN_J3	0,895	TEC_J3	0,212
P_J4	0,004	GEN_J4	0,895	TEC_J4	0,212
E_J1	0,008	COT_J1	0,014	VA_J1	0,116
E_J2	0,014	COT_J2	0,009	VA_J2	0,116
E_J3	0,014	COT_J3	0,007	VA_J3	0,116
E_J4	0,014	COT_J4	0,007	VA_J4	0,116
CD_J1	0,005	R_J1	0,009	C_J1	0,649
CD_J2	0,005	R_J2	0,009	C_J2	0,154
CD_J3	0,005	R_J3	0,004	C_J3	0,153
CD_J4	0,005	R_J4	0,004	C_J4	0,045

Tableau 19. *p*-value générées par variation de la concentration d'agar-agar suivant la procédure de Shapiro-Wilk avec seuil de signification $\alpha = 0,05$.

Echantillon	Shapiro-Wilk	Echantillon	Shapiro-Wilk	Echantillon	Shapiro-Wilk
CX_14	0,328	TE_14	0,012	OF_14	0,012
CX_15	< 0,0001	TE_15	0,012	OF_15	0,012
CX_16	0,005	TE_16	0,015	OF_16	0,022
CX_17	0,406	TE_17	0,012	OF_17	0,012
CX_18	0,051	TE_18	0,012	OF_18	0,012

CX_19	0,007	TE_19	0,012	OF_19	0,012
CX_20	0,826	TE_20	0,012	OF_20	0,012
P_14	0,000	GEN_14	0,012	TEC_14	0,012
P_15	0,007	GEN_15	0,012	TEC_15	0,012
P_16	0,001	GEN_16	0,012	TEC_16	0,012
P_17	0,455	GEN_17	0,012	TEC_17	0,012
P_18	0,026	GEN_18	0,012	TEC_18	0,012
P_19	0,000	GEN_19	0,012	TEC_19	0,012
P_20	0,387	GEN_20	0,012	TEC_20	0,012
E_14	0,012	COT_14	0,012	VA_14	0,012
E_15	0,012	COT_15	0,030	VA_15	0,012
E_16	0,012	COT_16	0,001	VA_16	0,009
E_17	0,059	COT_17	0,012	VA_17	0,012
E_18	0,012	COT_18	0,012	VA_18	0,012
E_19	0,012	COT_19	0,012	VA_19	0,012
E_20	0,012	COT_20	0,012	VA_20	0,012
CD_14	0,012	R_14	0,012	C_14	0,017
CD_15	0,012	R_15	0,027	C_15	0,014
CD_16	0,012	R_16	0,035	C_16	0,016
CD_17	0,012	R_17	0,012	C_17	0,181
CD_18	0,012	R_18	0,012	C_18	0,042
CD_19	0,012	R_19	0,012	C_19	0,165
CD_20	< 0,0001	R_20	0,012	C_20	0,012

Les tableaux 18 et 19 indiquent que, pour tous les antibiotiques, au moins un des échantillons issu d'une distribution asymétrique. Donc, l'application de tests paramétriques (ANOVA par exemple) pour examiner l'impact de la concentration d'agar-agar et de temps d'incubation sur le diamètre d'inhibition n'est pas possible. Nous devons donc recourir à des tests non paramétriques.

2.3.2. Régression linéaire multiple

Comme la distribution des individus au sein de la plupart des échantillons ne suit pas la loi normale, nous avons calculé les coefficients de corrélation de Spearman entre le diamètre d'inhibition (D_{ATB}) et les deux variables temps d'incubation et concentration d'agar-agar. Ensuite, nous avons effectué une régression linéaire multiple. Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau 20.

Tableau 20. Récapitulatif des coefficients de corrélation de Spearman entre le diamètre d'inhibition (D_{ATB}) et les deux variables temps d'incubation et concentration d'agar-agar, le coefficient de détermination R^2 et les paramètres de l'équation du modèle chez *Staphylococcus aureus* "ATCC 25923".

D_{ATB}	temps incub.	Conc. agar	R^2	Const.	t	[Agar]	Equation du modèle
D_{CX}	-0.677	0.165	0,511	27.720	-0.087	0.257	$CX = 27.71 - 8.74E-02 * t + 0.25 * [Agar]$
D_P	-0.666	0.116	0,511	37.157	-0.130	0.268	$P = 37.15 - 0.13 * t + 0.26 * [Agar]$
D_E	-0.025	-0.193	0,040	29.644	-0.001	-0.189	$E = 29.64 - 9.1E-04 * t - 0.18 * [Agar]$
D_{CD}	0.000	-0.362	0,031	30.584	0.000	-0.147	$CD = 30.58 - 0.14 * [Agar]$
D_{TE}	-0.019	-0.899	0,797	33.890	-0.001	-0.577	$TE = 33.89 - 5.95E-04 * t - 0.57 * [Agar]$
D_{GEN}	0.000	-0.743	0,562	23.913	0.000	-0.306	$GEN = 23.91 - 0.30 * [Agar]$
D_{COT}	0.026	-0.158	0,001	24.970	0.002	0.019	$COT = 24.96 + 1.5E-03 * t + 1.93E-02 * [Agar]$
D_R	0.011	-0.535	0,310	36.680	0.000	-0.280	$R = 36.67 + 4.76E-04 * t - 0.28 * [Agar]$
D_{OF}	-0.051	-0.131	0,065	33.370	-0.002	-0.096	$OF = 33.37 - 2.4E-03 * t - 9.6E-02 * [Agar]$
D_{TEC}	0.000	-0.606	0,395	19.103	0.000	-0.135	$TEC = 19.10 - 0.135 * [Agar]$
D_{VA}	0.000	-0.185	0,057	20.671	0.000	-0.058	$VA = 20.67 - 5.78E-02 * [Agar]$
D_C	-0.270	0.113	0,074	23.574	-0.009	0.095	$C = 23.57 - 9.2E-03 * t + 9.53E-02 * [Agar]$

Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification $\alpha=0,05$ (Annexe 8)

Le tableau 20 révèle que les coefficients de corrélation entre le diamètre d'inhibition de l'érythromycine, clindamycine, tétracycline, gentamycine, cotrimoxazole, rifampicine, ofloxacine, teicoplanine et vancomycine et la variable temps d'incubation ne diffèrent pas de zéro, ce qui reflète l'absence de corrélation entre ces deux variables, ceci est confirmé par les faibles coefficients de la variable (t) dans les modèles mathématiques. Tandis que pour céfoxitine, pénicilline G et chloramphénicol on remarque la présence d'une corrélation négative, c'est à dire que le diamètre d'inhibition diminue avec le temps.

Concernant la variable concentration agar-agar les coefficients de corrélation reflètent une influence importante de la concentration d'agar-agar sur le diamètre d'inhibition pour tétracycline, gentamycine, teicoplanine, rifampicine et clindamycine. Pour le reste des antibiotiques le diamètre d'inhibition varie indépendamment de la concentration d'agar-agar. Il convient de noter qu'en aucun cas les deux variables influencent en même temps le diamètre d'inhibition cela signifie qu'il n'y a pas d'interaction entre ces deux variables, ce qui est confirmée par les équations des modèles, de sorte que le diamètre d'inhibition varie en fonction de l'une des variables mais pas des deux en même temps.

Les coefficients de détermination (R^2) indiquent que pour céfoxitine, pénicilline G, tétracycline, gentamycine plus de 50 % de la variation du diamètre est expliquée par les modèles mathématiques utilisés. Les R^2 d'érythromycine, clindamycine, cotrimoxazole, ofloxacine, vancomycine et de chloramphénécol sont statistiquement nuls. Cela signifie que les modèles mathématiques correspondants utilisés n'expliquent absolument pas la variation du diamètre d'inhibition, c'est-à-dire il n'y a aucune influence de la variation de la concentration d'agar sur le diamètre d'inhibition durant les 96 h suivant la pose des disques de ces antibiotiques sur la gélose.

2.3.3. Effet de la concentration en agar-agar sur le diamètre de la zone d'inhibition

Nous avons 7 échantillons (de différentes concentrations en agar-agar) indépendants issues d'une population de distribution asymétrique. Afin de déterminer si ces échantillons proviennent d'une même population (hypothèse nulle H_0) ou si au moins un des échantillons provient d'une population différente des autres on utilise le test de Kruskal-Wallis.

Tableau 21. Récapitulatif des statistiques K de Kruskal-Wallis et les p -value correspondantes renvoyées par le logiciel XLSTAT (avec $\alpha = 0,05$) chez *Staphylococcus aureus* "ATCC 25923".

Antibiotique	K (Valeur observée)	K (Valeur critique)	DDL	p -value (bilatérale)	Interprétation de p -value
CX	5,749	12,592	6	0,452	NS
P	13,594	12,592	6	0,035	S
E	55,713	12,592	6	< 0,0001	S
CD	17,285	12,592	6	0,008	S
TE	69,662	12,592	6	< 0,0001	S
GEN	64,172	12,592	6	< 0,0001	S
COT	62,829	12,592	6	< 0,0001	S
R	44,389	12,592	6	< 0,0001	S
OF	26,274	12,592	6	0,000	S
TEC	43,199	12,592	6	< 0,0001	S
VA	42,489	12,592	6	< 0,0001	S
C	9,710	12,592	6	0,137	NS

Etant donné que les p -value calculées pour céfoxitine et chloramphénécol sont supérieures à α on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle et on dit que la variation de la concentration agar-agar n'a pas d'effet significatif sur le diamètre d'inhibition de ces antibiotiques. Et étant donné que les p -value calculées pour les autres antibiotiques sont inférieures au niveau de

signification $\alpha=0,05$, on rejette les hypothèses nulles, et on retient les hypothèses alternatives.

Pour mettre en évidence les éventuels échantillons issus d'une même population on effectue des tests de comparaisons multiples. Les résultats obtenus sont présentés dans l'annexe 9.

Interprétations des p -value des comparaisons multiples entre le couple antibiotique-agar-agar 17 g/L et les couples antibiotique-agar-agar 14-20 g/L, tirées à partir de l'annexe 9, sont récapitulées dans le tableau 22.

Tableau 22. Récapitulatif des différences significatives par paires ATB-concentration agar-agar pour *Staphylococcus aureus* "ATCC 25923".

		ATB_ agar14	ATB_ agar15	ATB_ agar16	ATB_ agar17	ATB_ agar18	ATB_ agar19	ATB_ agar20
ATB_ agar17	CX	Non						
	P	Non						
	E	Non	Oui	Oui	Non	Oui	Non	Oui
	CD	Non						
	TE	Oui	Oui	Non	Non	Non	Non	Non
	GEN	Oui	Non	Non	Non	Oui	Non	Non
	COT	Oui	Non	Non	Non	Non	Oui	Non
	R	Oui	Oui	Non	Non	Non	Non	Non
	OF	Non						
	TEC	Non	Oui	Non	Non	Non	Non	Non
	VA	Non	Non	Non	Non	Oui	Non	Non
C	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	

Pour tous les antibiotiques, à l'exception de l'érythromycine, l'échantillon de concentration d'agar-agar 16 g/L ne diffère pas significativement de celui de concentration d'agar-agar 17 g/L, autrement dit nous pouvons réduire la concentration en agar-agar à 16 g/L pour préparer le milieu gélosé MH sans avoir affecté le résultat de l'antibiogramme.

2.3.4. Effet de temps d'incubation sur le diamètre de zone d'inhibition

Pour étudier l'effet de temps d'incubation sur le résultat de l'antibiogramme nous avons choisi l'équivalent non paramétrique de l'ANOVA pour comparer k échantillons appariés, le test de Friedman.

On est en présence de 4 échantillons (de temps d'incubation différents) appariés issues de populations de distribution asymétrique. Afin de déterminer si ces échantillons proviennent

d'une même population (hypothèse nulle H_0) ou si au moins un échantillon provient d'une population différente des autres (hypothèse alternative H_a) on utilise le test de Friedman.

Tableau 23. Récapitulatif des statistiques Q de Friedman et les p -value correspondantes renvoyées par le logiciel XLSTAT (avec $\alpha = 0,05$) *Staphylococcus aureus* "ATCC 25923".

Antibiotique	Q (Valeur observée)	Q (Valeur critique)	DDL	p -value (bilatérale)	Interprétation de p -value
CX	44,595	7,815	3	< 0,0001	S
P	43,555	7,815	3	< 0,0001	S
E	6,000	7,815	3	0,112	NS
CD	0,000	7,815	3	1,000	NS
TE	6,000	7,815	3	0,112	NS
GEN	0,000	7,815	3	1,000	NS
COT	9,429	7,815	3	0,024	S
R	12,000	7,815	3	0,007	S
OF	6,000	7,815	3	0,112	NS
TEC	0,000	7,815	3	1,000	NS
VA	0,000	7,815	3	1,000	NS
C	27,136	7,815	3	< 0,0001	S

Etant donné que, pour CX, P, COT, R, et C, les p -value calculées sont inférieure au niveau de signification $\alpha=0,05$, on doit rejeter les hypothèses nulles H_0 , et retenir les hypothèses alternatives H_a . Pour voir où elles résident les différences on effectue le test des comparaisons multiples. Les résultats obtenus sont présentés dans l'annexe 10.

Pour E, CD, TE, GEN, COT, OF, TEC et VA les p -value sont $> 0,05$ donc on ne peut pas rejeter H_0 . Nous concluons qu'il n'y a pas d'effet significatif du temps d'incubation sur le diamètre des zones d'inhibition, de ces antibiotiques chez *Staphylococcus aureus*.

Interprétations des p -value des comparaisons multiples entre le couple antibiotique-temps d'incubation 24 h et les couples antibiotique-temps d'incubation 48-96 h, tirées à partir de l'annexe 10, sont récapitulées dans le tableau 24.

Tableau 24. Récapitulatif des différences significatives par paires ATB-temps d'incubation chez *Staphylococcus aureus*.

	ATB_48 h	ATB_72 h	ATB_96 h
CX_24 h	Oui	Oui	Oui
P_24 h	Oui	Oui	Oui
E_24 h	Non	Non	Non
CD_24 h	Non	Non	Non
TE_24 h	Non	Non	Non

GEN_24 h	Non	Non	Non
COT_24 h	Non	Non	Non
R_24 h	Non	Non	Non
OF_24 h	Non	Non	Non
TEC_24 h	Non	Non	Non
VA_24 h	Non	Non	Non
C_24 h	Non	Non	Oui

Le tableau 24 révèle que seuls les diamètres de CX, P et C ont été affectés par le temps d'incubation, tandis que pour les autres antibiotiques aucune variation significative n'a été observée dans les diamètres des zones d'inhibition. (Nous n'avons enregistré aucune variation significative des diamètres des zones d'inhibition). En d'autres termes les résultats de l'antibiogramme ne changent pas au moins durant 4 jours.

Discussion

L'antibiogramme sur milieu gélosé Muller-Hinton est une technique permettant de quantifier la capacité des antibiotiques à inhiber la croissance des souches bactériennes. L'interprétation des résultats de ce test repose sur la mesure des diamètres des zones d'inhibition. Pour que les résultats soient fiables et reproductibles, les facteurs pouvant influencer ce diamètre doivent être parfaitement et rigoureusement contrôlés, raison pour laquelle une standardisation de la technique est nécessaire. Cependant, dans certaines situations particulières le changement de la grandeur d'un de ces facteurs pourrait être bénéfique et utile au laborantin pour répondre à une nécessité ou en lui laissant une plus grande marge de manœuvre.

Plusieurs études ont été conduites en ce sens. Toama *et al.*, (1978) ont montré qu'une augmentation de la concentration d'agar-agar à partir de 15 jusqu'à 25g/L pour différentes concentrations de la novobiocine entraîne une diminution du diamètre de la zone d'inhibition. Cependant, cette variation ne semble pas être linéaire.

La présente étude comprend deux volets, le premier consiste en la prédiction du diamètre des zones d'inhibition en variant le temps d'incubation et la concentration de la culture en agar-agar. Ainsi, nous pouvons voir l'effet de ces deux variables sur l'interprétation "catégorielle" de sensibilité des antibiogrammes (sur le profil de sensibilité des antibiotiques). La deuxième partie est une étude comparative entre l'antibiogramme réalisé dans des

conditions standard et des antibiogrammes pratiqués avec des milieux de culture de différentes concentrations en agar-agar et avec prise de mesures plusieurs fois dans le temps. Pour cela, deux types de souches bactériennes ont été choisies, une à Gram négatif, *Pseudomonas aeruginosa*, et l'autre à Gram positif, *Staphylococcus aureus*.

Avant d'entamer nos expériences nous avons procédé à des tests de contrôle de qualité des souches utilisées pour s'assurer de leur pureté et leur appartenance à des souches de référence, puis on a préparé sept milieux de culture "Muller-Hinton" de concentrations en agar-agar allant de 14 jusqu'à 20 g/L puis trois répliques analytiques pour chaque trinôme antibiotique-concentration agar-agar-bactérie ont été générés et des mesures de diamètre de zone d'inhibition, au moyen d'un pied à coulisse, ont été prises chaque 24 heures durant quatre jours. Par la suite, nous avons effectué des analyses statistiques.

Pour une meilleure exploitation des résultats une analyse statistique via des tests paramétriques est fortement recommandée pour leur puissance, mais dans le cas où l'une des conditions d'utilisation de ces tests n'est pas remplies et le nombre d'individus dans un échantillon est inférieur à trente le recours à des tests non paramétriques, moins puissants mais plus robustes, est impératif. Dans notre cas, l'analyse de la normalité des échantillons a montré que la normalité de distribution n'est pas remplie.

Les coefficients de corrélation de Spearman ont été calculés pour mesurer l'intensité de la liaison entre le diamètre d'inhibition et les deux conditions expérimentales à étudier. Puis nous avons pratiqué une régression linéaire multiple pour analyser la relation de diamètre d'inhibition par rapport à la concentration d'agar-agar et le temps d'incubation. Le test de Friedman et Kruskal-Wallis pour examiner respectivement l'impact du changement, à la fois, du temps d'incubation et la concentration d'agar-agar sur le diamètre d'inhibition. En fin, une comparaison multiple a été faite pour mettre en évidence les éventuelles modalités concentration agar-agar et temps d'incubation qui diffèrent des modalités 17 g/L d'agar-agar et 24 h de temps d'incubation.

Le diamètre d'inhibition est le résultat d'interaction (dans tous les sens) entre plusieurs éléments à savoir les facteurs influençant la diffusion, la molécule d'antibiotique, la composition du milieu, la souche bactérienne utilisée et sa réponse aux conditions qui l'entourent. Par conséquent, une interprétation rationnelle de l'antibiogramme implique la prise en compte de tous ces éléments. Plusieurs auteurs ont décrits des modèles mathématiques

régissant la diffusion d'un antibiotique dans un gèle. Selon la formule de Bonev *et al.* (2008) (Formule 1 de l'annexe 11) et la loi de Fick (Annexe 11) la diffusion dépend entre autres facteurs de la masse volumique de l'antibiotique et de sa perte au cours de la diffusion qui est exprimée dans la formule 1 par le coefficient de dissipation (V) et qui s'explique par les interactions de l'antibiotique avec les composants du milieu de culture dont l'agar-agar fait partie.

Dans l'antibiogramme l'agar-agar est un composant inerte (par rapport à la bactérie) jouant le rôle de solidifiant du milieu de culture, mais tout changement dans sa concentration engendrera une modification du diamètre de la zone d'inhibition ce qui explique en partie la diminution du diamètre d'inhibition avec l'augmentation de la concentration d'agar-agar exprimée par un coefficient négatif de la variable [Agar] dans les model de régression linéaire de la plus part des antibiotiques (Tableaux 11 et 20).

En ce qui concernant la diminution du diamètre d'inhibition dans le temps (Tableaux 11 et 20), trois hypothèses peuvent être illustrées. La première est que l'antibiotique continu à diffuser ainsi la concentration au tour du disque diminue et la bactérie occupe de plus en plus de l'espace. La deuxième hypothèse est que la bactérie subit une phase d'adaptation aux concentrations d'antibiotique relativement élevées à la périphérie des zone d'inhibition et la troisième hypothèse est que cette diminution peut résulter d'une dégradation d'antibiotique soit par des facteurs physiques, chimiques ou encore biochimiques par des métabolites secrétés par la bactérie.

Conclusion et perspectives

Il ressort de l'étude comparative entre le diamètre d'inhibition d'un antibiogramme réalisé dans les conditions normales de concentration d'agar-agar et de temps d'incubation que chez *Pseudomonas aeruginosa*, la concentration d'agar-agar peut être abaissée de 3 g/L. Vu le coût très élevé de l'agar-agar dans le marché, qui frôle les 65 €, une telle diminution apporte un gain économique très important avoisinant 17,64 %. Chez *Staphylococcus aureus* la concentration d'agar-agar peut être diminuée de 1 g/L. Bien que l'augmentation de la concentration d'agar-agar n'entraîne pas un changement de profil de sensibilité, comme nous l'avons constaté (tableaux 8 et 17), elle engendre une variation significative de diamètre d'inhibition. La raison pour laquelle le profil de sensibilité n'a pas changé est que les diamètres des zones d'inhibition étaient largement supérieurs aux valeurs critiques de sensibilité.

Compte tenu de l'instabilité des marchés nationaux et internationaux en matière de disponibilité des produits chimiques de laboratoire. Ce genre d'étude peut fournir de très bonnes alternatives aux techniques standards et classiques en cas d'urgence ou de pénurie d'un ingrédient. Mais aussi d'offrir aux laborantins plus de liberté.

Enfin, les résultats obtenus ne sont pas indiscutables et méritent d'être confirmés. Ceci en se plaçant dans les zones de sensibilité intermédiaire par une sélection préalable des paires antibiotiques-souche bactérienne présentant autant que possible des diamètres d'inhibition moyens. Mais aussi, en testant d'autres antibiotiques et bactéries.

Références bibliographiques

1. **Abbas, H.A., El-Ganiny, A.M., Kamel, H.A. (2018).** Phenotypic and genotypic detection of antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urinary tract infections. Afri Health Sci 2018; 18(1): 11-21. <https://dx.doi.org/10.4314/ahs.v18i1.3>.
2. **Ahmed, M. (2012).** Antibiotic Resistance: An Emerging Global Headache. King Abdul Aziz University Hospital, Jeddah, Saudi Arabia. Page:3-14 in Marina Pana, (2012), Antibiotic Resistant Bacteria – A Continuous Challenge in the New Millennium, Published by InTech Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia Copyright © InTech
3. **Alioua, M.A. (2005).** Thèse de doctorat Microbiologie Appliqué intitulée : Les Staphylocoques : sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire de *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline. Unveirsite BADJI MOKHTAR, Annaba ; Page: 20-24 et 57.
4. **Alloui, M.N., Agabou, A. and Alloui, N. (2014).** Phytogeniques Application of herbs and phytogenic feed additives in poultry production-A Review. Global Journal of Animal Scientific Research. 2(3):234-243.
5. **Archambaud, M. (2009).** Méthodes d'évaluation de l'activité des antibiotiques in vitro. Laboratoire Bactériologie-Hygiène CHU Rangueil Toulouse.
6. **Beddou, F. (2015).** Thèse De Doctorat intitulée : Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex vesicarius L.* et *Anvillea radiata Coss. & Dur.* Université De Abou Bekr Belkaid, Telmcen:144p.
7. **Bent Mohamed, A. et Sidi Baba A.M. (2008).** Manuel de travaux pratiques de microbiologie. Université de Nouakchott, Faculté des sciences et techniques, Département de biologie.
8. **Berdy J., Aaszalos A. and Mc Nitt K.L. (1987).** CRC Handbook of antibiotic compounds. Microbial metabolites, Vol. 13. Université du Michigan, 358 p.
9. **Berthet, J. et Amar-Costesec, A. (2006).** Dictionnaire de biologie. Bruxelles : De Boeck, ©2006, 1034 p.
10. **Bevilacqua, S. (2011).** Thèse de doctorat intitulée Évaluation de l'impact d'une équipe opérationnelle en infectiologie sur la consommation et le coût des antibiotiques au CHU de Nancy. UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ.

11. **Bonev, B., Hooper, J., et Parisot, J., (2008).** Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2008) 61, 1295–1301 doi:10.1093/jac/dkn090 Advance Access publication 12 March 2008.
12. **Cavallo, J.D. (2012).** Lecture interprétative de l'antibiogramme. Ecole du Val-de-Grâce 47ème Colloque national des biologistes des Hôpitaux 26 septembre 2012 Toulouse.
13. **Collins, C. H., Lyne, P.M., Grange, J.M., Falkinham III, J. O. (2004).** Microbiological methods, Lyne's Eighth Edition published in 2004 by Arnold, 338 Euston Road, London NW1 3BH © 2004 Arnold pages 168-171
14. **Daurel, C., Leclercq, R. (2008).** Antibiogram of *Staphylococcus aureus*. *Revue francophone des laboratoires* Vol 38, N° 407 décembre 2008 pp. 81-90.
15. **Dedet, J.P. (2007).** La microbiologie, de ses origines aux maladies émergentes. © Dunod, Paris, 2007 ISBN 978-2-10-050806-8, page 201.
16. **Duguet, M., Rioux, J.F. (1994).** De la topologie de l'ADN aux médicaments antibiotiques et anticancéreux, *médecine/sciences* 10: 962-72 MS 1994 10-962.
17. **Dumitrescu, O., Dauwalder, O., Boisset, S., Reverdy, M.É., Tristan, A., Vandenesch, F. (2010).** *Staphylococcus aureus* résistance to antibiotics. *médecine/sciences* 2010; 26: 943-9.
18. **Duquénois, P. (1955).** Antibiotiques des plantes supérieures. *Bulletin de la Société Botanique de France*, 102:7-8, 377-405.
19. **EUCAST (2018).** Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie Recommandations 2018 V.2.0 Septembre
20. **Coumes Florens, S. (2011).** Thèse de doctorat intitulée Les modules de « détection/résistance » aux antibiotiques peptidiques chez les Firmicutes. Université de la Méditerranée, Aix-Marseille II Faculté des Sciences de Luminy 163, Avenue de Luminy 13288 Marseille Cedex 09 ; 9 septembre 2011, page: 32, 61, 65.
21. **Grosjean J., Clavé, D., Archambaud, M., Pasquier, C. (2011).** Bactériologie et Virologie pratique. France : DE BOECK, 2^e édition : 290p.
22. **Jenny, M., Kingsbury J. (2018).** Properties and Prevention: A Review of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biology and Medical Research* Vol.2 No.3:18 page 1-8.

23. **Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J., Zinkernagel, R.M. (2005).** *Médical Microbiology*. © 2005 Thieme, 698 pages.
24. **Lambert, T., Ploy, M.C. et Denis, F. (2000).** Les intégrons: un système original de capture de gènes chez les bactéries. *médecine/sciences* 2000; 16 : 255-9
25. **Lazoul, K. Rabhi, I. (2014).** Etudes des mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques dans la région de Touggourt. Master, Sciences de la nature et de la vie, Microbiologie appliquée, Uni. Kasdi Merbah, 66 page.
26. **Lechat, P. (2007).** Pharmacologie. faculté de médecine Université Pierre et Marie Curie Niveau DCEM1, Service de pharmacologie page 307-320
27. **Leitsch, D., Burgess, A.G., Dunn, L.A., Krauer, K.G., Tan, K., Duchêne, M., Upcroft, P., Eckmann, L., and Upcroft J.A. (2011).** Pyruvate: ferredoxin oxidoreductase and thioredoxin reductase are involved in 5-nitroimidazole activation while flavin metabolism is linked to 5-Nitroimidazole resistance in *Giardia lamblia*. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66: 1756 – 1765 Published online 2011 May 22.
28. **Lüllmann, H., Mohr, K., Ziegler, A. and Bieger, D.. (2000).** *Color Atlas of Pharmacology* 2nd edition, Lüllmann, Color Atlas of Pharmacology © 2000 Thieme, 266-278.
29. **Mohammedi, D., Yala, D., Merad, A.S., Ouar korich, M.N. (2012).** Classification and action of antibiotics. *Maghreb Medicine* 2001 n ° 91.
30. **Munita, J.M. et Arias, C.A. (2016).** Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr.* 2016 April; 4(2): doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. Page: 3, 5, 11, 12.
31. **Murray, P.R.; Rosenthal, Ken S; Pfaller, M.A (2009).** *Medical Microbiology* 6th edition. Elsevier, ©2009.
32. **Muylaert, A., Mainil, J.g. (2012).** Résistances bactériennes aux antibiotiques: les mécanismes et leur « contagiosité ». *Ann. Méd. Vét.*, 2012 pages, 112, 156, 109- 123
33. **Oulmi, L. (2017).** Agents antimicrobiens et résistance aux antibiotiques. Université des frères Mentouri Constantine, années universitaire 2016-2017.
34. **Papillon, J., Ménétret, J.F., Batisse, C., Hélye, R., Schultz, P., Potier, N., Lamour, V. (2014).** L'architecture moléculaire complète de l'ADN gyrase révélée par cryo-microscopie électronique. *Med Sci (Paris)* 2014 ; vol. 30, n° 12: 1081–1084.

35. **Parsaeimehr A., Sargsyan E. et Javidnia K., (2010).** A comparative study of the antibacterial, antifungal and antioxidant activity and total content of phenolic compounds of cell cultures and wild plants of three endemic species of Ephedra. *Molecules*. 2010 Mar; 15(3): 1668–1678.
36. **Prescott, L.M, Willey, J.M, Sherwood, L.M, Woolverton C.J. (2018).** *Microbiologie de Prescott* 5^e édition 2018. De Boeck Supérieur, 976p.
37. **Soni, P., Shivangi, Meena, L.S. (2018).** Vitamine D An Immune Modulator and Growth Inhibitor of Mycobacterium Tuberculosis H37Rv. *Journal of Molecular Biology and Biotechnology* Vol.3: No.1:2.
38. standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale 5^{ème} édition, 2014
39. **Toama, M.A., Issa, A.A., and Ashour, M.S. (1978).** Effect of Agar Percentage, Agar Thickness, and Medium Constituents on Antibiotics Assay by Disc Diffusion Method. *Pharmazie* 33, H. 2/3 (1978). Faculty of Pharmacy, Cairo University, Cairo, A.R.E.
40. **Tripathi, KD. (2008).** *Essentials of Medical Pharmacology* 6th Ed Published by Jitendar P Vij Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd AYPPEE BROTHERS MEDICAL PUBLISHERS (P) LTD 2008, page 670.
41. **Van Bambeke, F. (2009).** *Pharmacologie et Pharmacothérapie Anti-infectieuse* Unité de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire Université catholique de Louvain UCL 73.70 avenue E. Mounier 73 1200 Bruxelles, année 2009/2010. page: 204.
42. **Vandepitte, J., Engbaek, K., Piot, P., Heuck, C.C. (1994).** *Bactériologie clinique: techniques de base pour le laboratoire.* Département de Microbiologie Hôpital universitaire St Raphaël Louvain, Belgique, Organisation mondiale de la Santé Genève 1994 page 110.
43. **Courvalin, P., Leclercq, R., Bingen, É. (2012).** *L'antibiogramme* 3^{ème} édition. Editeur : ESKA, pages 17-35.
44. **Zeghilet, N. (2009).** Mémoire de magister en médecine vétérinaire intitulé Optimisation des paramètres de détection et de quantification des résidus d'antibiotiques dans la viande blanche par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Université Mentouri de Constantine, Faculté des sciences, département des sciences vétérinaire, année universitaire 2008-2009.
45. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/6c/Parois_des_bact%27ries_Gram-_et_Gram%2B.png consulté le 20.06.2019.

Annexe 1.

Diamètres des zones d'inhibition chez *Pseudomonas aeruginosa* "ATCC 27853" en mm

Temps incubation h	Con. Agar g/l	ATM	TCC	CAZ	TIC	IPM	PI	GEN	AK	TOB
24	14	34,10	21,19	11,11	26,57	20,22	23,40	19,53	23,15	18,19
24	14	32,40	18,03	9,90	24,43	17,46	22,30	17,72	21,37	17,40
24	14	33,25	19,61	10,51	25,50	18,84	22,85	18,63	22,26	17,80
24	15	33,71	20,29	12,03	27,70	20,00	15,06	19,23	23,04	18,01
24	15	30,75	12,75	9,89	26,47	17,76	18,88	17,92	21,50	17,39
24	15	32,23	16,52	10,96	27,09	18,88	16,97	18,58	22,27	17,70
24	16	32,93	19,53	12,82	25,53	23,50	26,52	20,29	23,57	18,40
24	16	33,53	20,09	12,80	27,50	19,43	15,18	18,69	20,69	17,11
24	16	33,23	19,81	12,81	26,52	21,47	20,85	19,49	22,13	17,76
24	17	30,68	16,50	9,20	24,42	19,00	23,20	18,42	22,36	17,70
24	17	31,64	17,73	9,19	23,25	18,37	15,16	18,39	21,00	17,47
24	17	31,16	17,12	9,20	23,84	18,69	19,18	18,41	21,68	17,59
24	18	34,00	19,43	12,28	28,93	20,59	25,49	19,80	22,22	16,80
24	18	33,28	17,66	11,62	28,66	18,90	19,95	17,25	19,90	16,80
24	18	33,64	18,55	11,95	28,80	19,75	22,72	18,53	21,06	16,80
24	19	33,25	19,09	10,53	25,18	18,72	22,27	17,20	22,04	16,30
24	19	29,09	15,43	0,00	22,65	18,27	15,74	17,32	21,12	16,40
24	19	31,17	17,26	5,27	23,92	18,50	19,01	17,26	21,58	16,35
24	20	27,39	13,70	0,00	20,72	18,07	24,85	17,12	19,95	16,40
24	20	33,47	20,54	11,37	25,77	20,90	26,67	18,23	21,18	17,05
24	20	30,43	17,12	5,69	23,25	19,49	25,76	17,68	20,57	16,73
48	14	31,47	15,08	9,60	22,50	17,47	18,85	19,53	21,93	17,70
48	14	31,44	14,75	8,45	21,53	15,37	18,53	17,72	19,80	16,90
48	14	31,46	14,92	9,03	22,02	16,42	18,69	18,63	20,87	17,30

48	15	32,72	16,60	12,03	24,74	18,65	15,06	19,23	21,63	17,36
48	15	30,55	11,30	9,89	24,60	16,03	15,90	17,73	21,30	16,81
48	15	31,64	13,95	10,96	24,67	17,34	15,48	18,48	21,47	17,09
48	16	31,44	15,40	10,52	25,15	19,42	24,97	19,90	22,30	18,40
48	16	32,81	16,70	10,60	26,40	17,95	12,80	18,66	20,55	16,90
48	16	32,13	16,05	10,56	25,78	18,69	18,89	19,28	21,43	17,65
48	17	30,68	15,20	9,20	22,60	18,23	19,84	18,42	21,40	16,97
48	17	30,82	16,50	9,19	23,00	16,54	11,60	18,32	21,00	17,00
48	17	30,75	15,85	9,20	22,80	17,39	15,72	18,37	21,20	16,99
48	18	34,00	16,70	12,28	28,47	17,85	22,55	18,93	21,40	16,80
48	18	32,00	16,52	11,62	28,82	16,45	17,20	18,00	19,50	16,20
48	18	33,00	16,61	11,95	28,65	17,15	19,88	18,47	20,45	16,50
48	19	32,09	15,42	10,53	23,47	17,90	20,20	17,20	20,70	16,30
48	19	29,75	15,43	0,00	22,65	17,61	13,50	17,32	20,67	16,52
48	19	30,92	15,43	5,27	23,06	17,76	16,85	17,26	20,69	16,41
48	20	27,39	13,70	0,00	20,72	16,75	22,40	17,12	19,95	15,93
48	20	32,75	16,67	11,37	24,92	18,03	22,06	17,50	21,18	16,50
48	20	30,07	15,19	5,69	22,82	17,39	22,23	17,31	20,57	16,22
72	14	31,47	14,67	9,33	22,50	17,23	19,04	19,53	21,00	17,44
72	14	31,70	14,50	6,00	21,80	15,00	18,10	17,00	19,80	16,60
72	14	31,59	14,59	7,67	22,15	16,12	18,57	18,27	20,40	17,02
72	15	32,80	15,85	12,03	24,10	17,00	15,06	19,23	21,63	17,50
72	15	30,37	11,10	9,89	24,80	15,66	15,41	17,40	21,30	16,75
72	15	31,59	13,48	10,96	24,45	16,33	15,24	18,32	21,47	17,13
72	16	31,37	14,04	10,52	24,03	19,42	23,68	19,22	22,30	18,40
72	16	32,68	16,70	10,60	26,30	17,33	11,20	18,66	19,90	16,90
72	16	32,03	15,37	10,56	25,17	18,38	17,44	18,94	21,10	17,65
72	17	30,67	14,72	9,20	22,70	17,48	18,82	17,70	21,31	16,97
72	17	30,50	16,40	9,19	23,00	16,50	11,60	18,32	20,75	16,90

72	17	30,59	15,56	9,20	22,85	16,99	15,21	18,01	21,03	16,94
72	18	33,17	15,32	10,77	27,95	17,70	21,21	18,93	20,70	16,80
72	18	32,16	15,86	10,22	27,00	16,45	17,20	18,00	19,60	16,20
72	18	32,67	15,59	10,50	27,48	17,08	19,21	18,47	20,15	16,50
72	19	32,09	13,71	8,26	22,11	16,20	19,40	17,42	20,55	16,34
72	19	29,60	15,30	0,00	22,70	17,90	13,50	17,32	20,67	16,52
72	19	30,85	14,51	4,13	22,41	17,05	16,45	17,37	20,61	16,43
72	20	27,39	13,70	0,00	20,72	16,75	21,35	17,12	19,95	15,93
72	20	31,95	16,60	10,25	24,18	18,04	20,85	17,44	20,00	16,50
72	20	29,67	15,15	5,13	22,45	17,40	21,10	17,28	19,98	16,22
96	14	31,47	13,50	8,50	22,50	17,23	18,80	19,53	20,43	17,44
96	14	31,70	14,50	6,00	21,80	15,20	18,10	17,00	19,80	16,60
96	14	31,59	14,00	7,25	22,15	16,22	18,45	18,27	20,12	17,02
96	15	32,80	15,73	12,03	24,66	17,11	15,06	19,23	21,63	17,50
96	15	30,37	10,50	8,00	24,80	15,66	14,80	17,40	21,30	16,75
96	15	31,59	13,12	10,02	24,73	16,39	14,93	18,32	21,47	17,13
96	16	31,37	14,04	10,52	24,03	19,08	23,68	19,22	22,30	18,41
96	16	32,68	16,70	10,60	26,30	17,33	11,20	18,66	19,90	16,90
96	16	32,03	15,37	10,56	25,17	18,21	17,44	18,94	21,10	17,66
96	17	30,67	14,72	6,00	22,70	17,75	18,66	17,70	21,43	16,79
96	17	30,50	16,40	6,00	23,00	16,50	11,40	18,32	20,75	16,90
96	17	30,59	15,56	6,00	22,85	17,13	15,03	18,01	21,09	16,85
96	18	33,17	15,32	10,77	28,14	17,70	21,21	18,93	20,70	16,80
96	18	32,28	15,86	10,10	27,10	16,85	17,50	18,00	19,60	16,20
96	18	32,73	15,59	10,44	27,62	17,28	19,36	18,47	20,15	16,50
96	19	31,67	13,71	8,26	22,11	16,20	19,25	17,42	20,55	16,34
96	19	29,60	15,30	0,00	22,70	17,90	12,86	17,32	20,67	16,52
96	19	30,64	14,51	4,13	22,41	17,05	16,06	17,37	20,61	16,43
96	20	27,39	13,70	0,00	20,40	16,75	21,35	17,12	19,95	15,93

96	20	31,95	16,50	10,25	24,18	18,04	21,95	17,44	20,00	16,50
96	20	29,67	15,10	5,13	22,29	17,40	21,65	17,28	19,98	16,22

Annexe 2.

les moyennes des trois répliques analytiques. *Pseudomonas aeruginosa*" ATCC 27853"

Antibiotique	[agar]	24 h	48 h	72 h	96 h	La variation
ATM	14	33,25	31,455	31,585	31,585	1,795
ATM	15	32,23	31,635	31,585	31,585	0,645
ATM	16	33,23	32,125	32,025	32,025	1,205
ATM	17	31,16	30,75	30,585	30,585	0,575
ATM	18	33,64	33	32,665	32,725	0,975
ATM	19	31,17	30,92	30,845	30,635	0,535
ATM	20	30,43	30,07	29,67	29,67	0,76
	la variation	3,21	2,93	2,995	3,055	
TCC	14	19,61	14,915	14,585	14	5,61
TCC	15	16,52	13,95	13,475	13,115	3,405
TCC	16	19,81	16,05	15,37	15,37	4,44
TCC	17	17,115	15,85	15,56	15,56	1,555
TCC	18	18,545	16,61	15,59	15,59	2,955
TCC	19	17,26	15,425	14,505	14,505	2,755
TCC	20	17,12	15,185	15,15	15,1	2,02
	la variation	3,29	2,66	2,115	2,475	
CAZ	14	10,505	9,025	7,665	7,25	3,255
CAZ	15	10,96	10,96	10,96	10,015	0,945
CAZ	16	12,81	10,56	10,56	10,56	2,25
CAZ	17	9,195	9,195	9,195	6	3,195
CAZ	18	11,95	11,95	10,495	10,435	1,515
CAZ	19	5,265	5,265	4,13	4,13	1,135
CAZ	20	5,685	5,685	5,125	5,125	0,56
	la variation	7,545	6,685	6,83	6,43	
TIC	14	25,5	22,015	22,15	22,15	3,485
TIC	15	27,085	24,67	24,45	24,73	2,635
TIC	16	26,515	25,775	25,165	25,165	1,35
TIC	17	23,835	22,8	22,85	22,85	1,035
TIC	18	28,795	28,645	27,475	27,62	1,32
TIC	19	23,915	23,06	22,405	22,405	1,51
TIC	20	23,245	22,82	22,45	22,29	0,955
	la variation	5,55	6,63	5,325	5,47	
IPM	14	18,84	16,42	16,115	16,215	2,725

IPM	15	18,88	17,34	16,33	16,385	2,55
IPM	16	21,465	18,685	18,375	18,205	3,26
IPM	17	18,685	17,385	16,99	17,125	1,695
IPM	18	19,745	17,15	17,075	17,275	2,67
IPM	19	18,495	17,755	17,05	17,05	1,445
IPM	20	19,485	17,39	17,395	17,395	2,095
	la variation	2,97	2,265	2,26	1,99	
PI	14	22,85	18,69	18,57	18,45	4,4
PI	15	16,97	15,48	15,235	14,93	2,04
PI	16	20,85	18,885	17,44	17,44	3,41
PI	17	19,18	15,72	15,21	15,03	4,15
PI	18	22,72	19,875	19,205	19,355	3,515
PI	19	19,005	16,85	16,45	16,055	2,95
PI	20	25,76	22,23	21,1	21,65	4,66
	la variation	8,79	6,75	5,89	6,72	
GEN	14	18,625	18,625	18,265	18,265	0,36
GEN	15	18,575	18,48	18,315	18,315	0,26
GEN	16	19,49	19,28	18,94	18,94	0,55
GEN	17	18,405	18,37	18,01	18,01	0,395
GEN	18	18,525	18,465	18,465	18,465	0,06
GEN	19	17,26	17,26	17,37	17,37	0,11
GEN	20	17,675	17,31	17,28	17,28	0,395
	la variation	2,23	2,02	1,66	1,66	
AK	14	22,26	20,865	20,4	20,115	2,145
AK	15	22,27	21,465	21,465	21,465	0,805
AK	16	22,13	21,425	21,1	21,1	1,03
AK	17	21,68	21,2	21,03	21,09	0,65
AK	18	21,06	20,45	20,15	20,15	0,91
AK	19	21,58	20,685	20,61	20,61	0,97
AK	20	20,565	20,565	19,975	19,975	0,59
	la variation	1,705	1,015	1,49	1,49	
TOB	14	17,795	17,3	17,02	17,02	0,775
TOB	15	17,7	17,085	17,125	17,125	0,615
TOB	16	17,755	17,65	17,65	17,655	0,105
TOB	17	17,585	16,985	16,935	16,845	0,74
TOB	18	16,8	16,5	16,5	16,5	0,3
TOB	19	16,35	16,41	16,43	16,43	0,08
TOB	20	16,725	16,215	16,215	16,215	0,51
	la variation	1,445	1,435	1,435	1,44	

Annexe 3.

Récapitulatif des coefficients de corrélation de Spearman entre le diamètre d'inhibition (D_{ATB}) et les deux variables temps d'incubation et concentration d'agar-agar, le coefficient de détermination R^2 , les p -value correspondantes et les paramètres de l'équation du modèle chez *Pseudomonas aeruginosa* "ATCC 27853".

D_{ATB}	temps incubation	Conc. agar	R^2	Const.	t	[Agar]	Equation du model
D_{ATM}	-0,256	-0,255	0,163	36,553	-0,012	-0,254	$D_{ATM} = 36,55 - 0,011 * t - 0,2536 * [\text{agar}]$
p -value	0,019	0,019	0,0001	< 0,0001	0,038	0,001	
D_{TCC}	-0,548	0,095	0,323	17,222	-0,043	0,066	$D_{TCC} = 17,22 - 4,28E-02 * t + 6,5E-02 * [\text{agar}]$
p -value	< 0,0001	0,389	0,001	< 0,0001	< 0,0001	0,483	
D_{CAZ}	-0,283	-0,308	0,234	23,239	-0,026	-0,771	$D_{CAZ} = 23,23 - 2,56E-02 * t - 0,77 * [\text{agar}]$
p -value	0,009	0,004	0,0001	< 0,0001	0,046	< 0,0001	
D_{TIC}	-0,293	-0,097	0,084	27,472	-0,023	-0,102	$D_{TIC} = 27,47 - 2,25E-02 * t - 0,101 * [\text{agar}]$
p -value	0,007	0,377	0,029	< 0,0001	0,012	0,388	
D_{IPM}	-0,586	0,164	0,340	18,095	-0,030	0,085	$D_{IPM} = 18,09 - 3,01E-02 * t + 8,5E-02 * [\text{agar}]$
p -value	< 0,0001	0,136	0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,186	
D_{PI}	-0,323	0,298	0,178	13,109	-0,046	0,487	$D_{PI} = 13,109 - 4,63E-02 * t + 0,487 * [\text{agar}]$
p -value	0,003	0,006	0,000	0,000	0,001	0,012	
D_{GEN}	-0,110	-0,544	0,301	22,133	-0,004	-0,217	$D_{GEN} = 22,13 - 4,09E-03 * t - 0,216 * [\text{agar}]$
p -value	0,320	< 0,0001	0,0001	< 0,0001	0,151	< 0,0001	
D_{AK}	-0,392	-0,367	0,321	24,533	-0,014	-0,161	$D_{AK} = 24,53 - 1,37E-02 * t - 0,16 * [\text{agar}]$
p -value	0,000	0,001	0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,000	
D_{TOB}	-0,229	-0,735	0,505	20,690	-0,005	-0,201	$D_{TOB} = 20,69 - 5,37E-03 * t - 0,201 * [\text{agar}]$
p -value	0,037	< 0,0001	0,0001	< 0,0001	0,003	< 0,0001	

Annexe 4.

Les p -value des comparaisons multiples par paires antibiotique_concentration agar-agar pour *Pseudomonas aeruginosa*.

ATB	Con. agar- agar	14	15	16	17	18	19	20
ATM	14	1	0,679	0,424	0,013	0,037	0,071	0,016
	15	0,679	1	0,225	0,039	0,012	0,165	0,047
	16	0,424	0,225	1	0,001	0,199	0,009	0,001
	17	0,013	0,039	0,001	1	< 0,0001	0,498	0,937
	18	0,037	0,012	0,199	< 0,0001	1	0,000	< 0,0001
	19	0,071	0,165	0,009	0,498	0,000	1	0,550
	20	0,016	0,047	0,001	0,937	< 0,0001	0,550	1
TCC	14	1	0,469	0,070	0,174	0,031	0,841	0,728
	15	0,469	1	0,011	0,037	0,004	0,355	0,284
	16	0,070	0,011	1	0,651	0,728	0,107	0,143
	17	0,174	0,037	0,651	1	0,424	0,246	0,311
	18	0,031	0,004	0,728	0,424	1	0,050	0,070
	19	0,841	0,355	0,107	0,246	0,050	1	0,884
	20	0,728	0,284	0,143	0,311	0,070	0,884	1
CAZ	14	1	0,013	0,002	0,688	0,002	0,125	0,398
	15	0,013	1	0,569	0,004	0,547	< 0,0001	0,001
	16	0,002	0,569	1	0,001	0,973	< 0,0001	0,000
	17	0,688	0,004	0,001	1	0,001	0,258	0,657
	18	0,002	0,547	0,973	0,001	1	< 0,0001	< 0,0001
	19	0,125	< 0,0001	< 0,0001	0,258	< 0,0001	1	0,492
	20	0,398	0,001	0,000	0,657	< 0,0001	0,492	1
TIC	14	1	0,001	0,000	0,441	< 0,0001	0,795	0,815
	15	0,001	1	0,657	0,015	0,022	0,003	0,003
	16	0,000	0,657	1	0,004	0,064	0,001	0,001
	17	0,441	0,015	0,004	1	< 0,0001	0,610	0,592
	18	< 0,0001	0,022	0,064	< 0,0001	1	< 0,0001	< 0,0001
	19	0,795	0,003	0,001	0,610	< 0,0001	1	0,980
	20	0,815	0,003	0,001	0,592	< 0,0001	0,980	1
IPM	14	1	0,627	0,000	0,182	0,130	0,136	0,053
	15	0,627	1	0,001	0,396	0,303	0,315	0,148
	16	0,000	0,001	1	0,017	0,027	0,025	0,073
	17	0,182	0,396	0,017	1	0,857	0,877	0,550
	18	0,130	0,303	0,027	0,857	1	0,980	0,676

	19	0,136	0,315	0,025	0,877	0,980	1	0,657	
	20	0,053	0,148	0,073	0,550	0,676	0,657	1	
PI	14	1	0,005	0,584	0,048	0,519	0,145	0,038	
	15	0,005	1	0,022	0,389	0,000	0,167	< 0,0001	
	16	0,584	0,022	1	0,154	0,233	0,364	0,009	
	17	0,048	0,389	0,154	1	0,009	0,604	< 0,0001	
	18	0,519	0,000	0,233	0,009	1	0,036	0,154	
	19	0,145	0,167	0,364	0,604	0,036	1	0,000	
	20	0,038	< 0,0001	0,009	< 0,0001	0,154	0,000	1	
		14	1	0,874	0,028	0,604	0,802	0,001	0,001
GEN	15	0,874	1	0,042	0,498	0,927	0,000	0,001	
	16	0,028	0,042	1	0,007	0,052	< 0,0001	< 0,0001	
	17	0,604	0,498	0,007	1	0,441	0,005	0,007	
	18	0,802	0,927	0,052	0,441	1	0,000	0,001	
	19	0,001	0,000	< 0,0001	0,005	0,000	1	0,900	
	20	0,001	0,001	< 0,0001	0,007	0,001	0,900	1	
		14	1	0,004	0,132	0,109	0,321	0,887	0,126
	AK	15	0,004	1	0,180	0,214	0,000	0,007	< 0,0001
16		0,132	0,180	1	0,923	0,012	0,172	0,002	
17		0,109	0,214	0,923	1	0,009	0,144	0,002	
18		0,321	0,000	0,012	0,009	1	0,257	0,589	
19		0,887	0,007	0,172	0,144	0,257	1	0,094	
20		0,126	< 0,0001	0,002	0,002	0,589	0,094	1	
		14	1	0,980	0,333	0,566	0,001	< 0,0001	< 0,0001
TOB		15	0,980	1	0,321	0,583	0,001	< 0,0001	< 0,0001
	16	0,333	0,321	1	0,123	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	
	17	0,566	0,583	0,123	1	0,006	0,000	0,000	
	18	0,001	0,001	< 0,0001	0,006	1	0,417	0,368	
	19	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,000	0,417	1	0,930	
	20	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,000	0,368	0,930	1	

Niveau de signification corrigé de Bonferroni : 0,0024

Annexe 5.

Comparaisons multiples par paires entre les échantillons de la variable temps d'incubation suivant la procédure de Nemenyi (test bilatéral) chez *Pseudomonas aeruginosa*.

Antibiotique	Temps incubation (h)	24	48	72	96
ATM	24	1	0,026	< 0,0001	< 0,0001
	48	0,026	1	0,199	0,176
	72	< 0,0001	0,199	1	1,000
	96	< 0,0001	0,176	1,000	1
TCC	24	1	0,079	< 0,0001	< 0,0001
	48	0,079	1	0,012	0,001
	72	< 0,0001	0,012	1	0,837
	96	< 0,0001	0,001	0,837	1
CAZ	24	1	0,704	0,012	< 0,0001
	48	0,704	1	0,199	0,002
	72	0,012	0,199	1	0,338
	96	< 0,0001	0,002	0,338	1
TIC	24	1	0,002	< 0,0001	< 0,0001
	48	0,002	1	0,592	0,807
	72	< 0,0001	0,592	1	0,984
	96	< 0,0001	0,807	0,984	1
IPM	24	1	0,001	< 0,0001	< 0,0001
	48	0,001	1	0,079	0,405
	72	< 0,0001	0,079	1	0,837
	96	< 0,0001	0,405	0,837	1
PI	24	1	0,026	< 0,0001	< 0,0001
	48	0,026	1	0,058	0,004
	72	< 0,0001	0,058	1	0,807
	96	< 0,0001	0,004	0,807	1
GEN	24	1	0,405	0,012	0,012
	48	0,405	1	0,441	0,441
	72	0,012	0,441	1	1,000
	96	0,012	0,441	1,000	1
AK	24	1	0,010	< 0,0001	< 0,0001
	48	0,010	1	0,120	0,156
	72	< 0,0001	0,120	1	0,999
	96	< 0,0001	0,156	0,999	1

TOB	24	1	0,015	0,007	0,010
	48	0,015	1	0,995	0,999
	72	0,007	0,995	1	0,999
	96	0,010	0,999	0,999	1

Annexe 6.

Diamètres des zones d'inhibition chez *Staphylococcus aureus* "ATCC 25923" en mm

Temps Incub. (h)	Conc. Agar (g/l)	CX	P	E	CD	TE	GEN	COT	R	OF	TEC	VA	C
24	14	28,30	43,00	25,50	28,67	25,76	20,36	27,06	33,40	31,69	17,12	19,82	25,13
24	14	32,48	42,24	26,95	28,31	25,78	19,60	27,46	32,37	31,43	17,00	20,06	24,15
24	14	30,39	42,62	26,23	28,49	25,77	19,98	27,26	32,89	31,56	17,06	19,94	24,64
24	15	32,26	39,40	27,65	27,65	26,63	19,82	19,80	35,00	31,55	17,18	19,60	25,64
24	15	31,61	41,48	30,46	29,60	24,60	18,70	24,00	31,00	33,00	17,45	19,70	23,80
24	15	31,94	40,44	29,06	28,63	25,62	19,26	21,90	33,00	32,28	17,32	19,65	24,72
24	16	32,27	44,26	27,80	30,00	25,00	19,06	25,85	32,00	31,15	16,40	19,95	24,90
24	16	30,59	40,22	25,86	27,72	24,31	18,88	26,62	31,44	33,00	17,27	20,00	25,60
24	16	31,43	42,24	26,83	28,86	24,66	18,97	26,24	31,72	32,08	16,84	19,98	25,25
24	17	33,36	40,66	26,50	31,30	22,95	18,00	23,70	31,33	31,40	16,70	20,26	26,35
24	17	28,19	34,47	20,69	22,48	23,82	19,33	25,90	31,21	32,07	17,10	19,74	25,41
24	17	30,78	37,57	23,60	26,89	23,39	18,67	24,80	31,27	31,74	16,90	20,00	25,88
24	18	35,36	40,70	27,32	30,00	24,50	17,31	26,95	32,09	29,82	16,00	18,40	23,40
24	18	31,27	38,80	26,40	26,17	22,66	17,85	24,90	31,88	32,00	17,12	19,30	25,90
24	18	33,32	39,75	26,86	28,09	23,58	17,58	25,93	31,99	30,91	16,56	18,85	24,65
24	19	32,16	41,00	25,93	28,03	23,13	18,85	27,50	31,36	30,45	16,47	19,09	24,45
24	19	32,30	42,42	26,04	27,36	22,62	17,90	25,06	31,00	31,70	16,58	20,06	25,00
24	19	32,23	41,71	25,99	27,70	22,88	18,38	26,28	31,18	31,08	16,53	19,58	24,73
24	20	32,55	43,14	27,00	28,00	23,10	18,72	25,11	32,26	31,70	17,08	20,50	27,63

24	20	30,50	39,60	26,00	28,00	21,95	17,64	24,63	30,65	31,81	15,75	19,15	23,72
24	20	31,53	41,37	26,50	28,00	22,53	18,18	24,87	31,46	31,76	16,42	19,83	25,68
48	14	21,77	30,50	25,50	28,67	25,76	20,36	27,06	33,40	31,69	17,12	19,82	25,13
48	14	26,75	30,70	26,95	28,31	25,78	19,60	27,46	32,37	31,43	17,00	20,06	24,15
48	14	24,26	30,60	26,23	28,49	25,77	19,98	27,26	32,89	31,56	17,06	19,94	24,64
48	15	25,81	30,89	27,65	27,65	26,63	19,82	19,80	35,00	31,55	17,18	19,60	24,90
48	15	25,88	33,50	30,46	29,60	24,60	18,70	24,75	31,00	33,00	17,45	19,70	23,80
48	15	25,85	32,20	29,06	28,63	25,62	19,26	22,28	33,00	32,28	17,32	19,65	24,35
48	16	26,40	33,06	27,80	30,00	25,00	19,06	25,85	32,00	31,40	16,40	19,95	24,90
48	16	24,30	30,70	25,86	27,72	24,31	18,88	26,62	31,44	33,00	17,27	20,00	25,60
48	16	25,35	31,88	26,83	28,86	24,66	18,97	26,24	31,72	32,20	16,84	19,98	25,25
48	17	26,46	42,84	25,48	31,30	22,95	18,00	23,70	31,33	31,40	16,70	20,26	23,70
48	17	19,80	23,75	20,69	22,48	23,82	19,33	25,90	31,21	32,07	17,10	19,74	25,41
48	17	23,13	33,30	23,09	26,89	23,39	18,67	24,80	31,27	31,74	16,90	20,00	24,56
48	18	27,20	33,80	27,32	30,00	24,50	17,31	26,95	32,09	29,82	16,00	18,40	21,50
48	18	24,40	30,50	26,40	26,17	22,66	17,85	24,90	31,88	32,00	17,12	19,30	25,90
48	18	25,80	32,15	26,86	28,09	23,58	17,58	25,93	31,99	30,91	16,56	18,85	23,70
48	19	27,00	31,18	25,93	28,03	23,13	18,85	27,50	31,36	30,45	16,47	19,09	24,45
48	19	29,00	30,00	26,04	27,36	22,62	17,90	25,06	31,00	31,70	16,58	20,06	24,00
48	19	28,00	30,59	25,99	27,70	22,88	18,38	26,28	31,18	31,08	16,53	19,58	24,23
48	20	26,11	33,60	27,00	28,00	23,10	18,72	25,11	32,26	31,70	17,08	20,50	27,63
48	20	28,60	39,82	26,00	28,00	21,95	17,64	24,63	30,65	31,81	15,75	19,15	23,72
48	20	27,36	36,71	26,50	28,00	22,53	18,18	24,87	31,46	31,76	16,42	19,83	25,68
72	14	21,80	30,50	25,50	28,67	25,76	20,36	27,06	33,40	31,69	17,12	19,82	25,13
72	14	26,75	30,70	26,95	28,31	25,78	19,60	27,46	32,37	31,43	17,00	20,06	24,15
72	14	24,28	30,60	26,23	28,49	25,77	19,98	27,26	32,89	31,56	17,06	19,94	24,64
72	15	25,81	30,89	27,65	27,65	26,63	19,82	19,80	35,34	31,55	17,18	19,60	24,18
72	15	25,88	33,50	30,46	29,60	24,60	18,70	24,75	31,00	33,00	17,45	19,70	23,80
72	15	25,85	32,20	29,06	28,63	25,62	19,26	22,28	33,17	32,28	17,32	19,65	23,99

72	16	25,90	33,06	27,80	30,00	24,50	19,06	26,55	32,00	31,40	16,40	19,95	23,20
72	16	24,30	30,70	25,86	27,72	24,31	18,88	26,62	31,50	33,00	17,27	20,00	25,60
72	16	25,10	31,88	26,83	28,86	24,41	18,97	26,59	31,75	32,20	16,84	19,98	24,40
72	17	26,35	31,80	25,48	31,30	22,95	18,00	23,70	31,33	31,40	16,70	20,26	23,70
72	17	19,55	23,36	20,69	22,48	23,82	19,33	25,90	31,21	32,07	17,10	19,74	25,41
72	17	22,95	27,58	23,09	26,89	23,39	18,67	24,80	31,27	31,74	16,90	20,00	24,56
72	18	27,36	33,70	27,32	30,00	24,50	17,31	26,95	32,09	29,82	16,00	18,40	21,50
72	18	24,40	30,50	26,40	26,17	22,66	17,85	24,90	31,88	32,00	17,12	19,30	25,90
72	18	25,88	32,10	26,86	28,09	23,58	17,58	25,93	31,99	30,91	16,56	18,85	23,70
72	19	25,04	30,00	25,93	28,03	23,13	18,85	27,50	31,36	30,45	16,47	19,09	24,45
72	19	25,00	30,00	26,04	27,36	22,62	17,90	25,06	31,00	31,70	16,58	20,06	24,00
72	19	25,02	30,00	25,99	27,70	22,88	18,38	26,28	31,18	31,08	16,53	19,58	24,23
72	20	26,11	33,60	27,00	28,00	23,10	18,72	25,11	32,26	31,70	17,08	20,50	27,63
72	20	28,60	39,82	26,00	28,00	21,95	17,64	24,63	30,65	31,81	15,75	19,15	23,72
72	20	27,36	36,71	26,50	28,00	22,53	18,18	24,87	31,46	31,76	16,42	19,83	25,68
96	14	21,85	29,80	25,50	28,67	25,76	20,36	27,06	33,40	31,69	17,12	19,82	24,36
96	14	26,50	30,40	26,95	28,31	25,78	19,60	27,46	32,37	31,43	17,00	20,06	24,15
96	14	24,18	30,10	26,23	28,49	25,77	19,98	27,26	32,89	31,56	17,06	19,94	24,26
96	15	25,80	30,60	27,65	27,65	26,63	19,82	19,80	35,34	31,55	17,18	19,60	24,18
96	15	25,75	33,40	30,46	29,60	24,60	18,70	24,75	31,00	33,00	17,45	19,70	23,80
96	15	25,78	32,00	29,06	28,63	25,62	19,26	22,28	33,17	32,28	17,32	19,65	23,99
96	16	26,00	30,60	27,80	30,00	24,50	19,06	26,55	32,00	28,36	16,40	19,95	23,20
96	16	24,66	31,00	25,86	27,72	24,31	18,88	26,62	31,50	33,00	17,27	20,00	25,60
96	16	25,33	30,80	26,83	28,86	24,41	18,97	26,59	31,75	30,68	16,84	19,98	24,40
96	17	26,20	31,42	25,48	31,30	22,95	18,00	23,70	31,33	31,40	16,70	20,26	23,70
96	17	19,55	23,80	20,69	22,48	23,82	19,33	25,90	31,21	32,07	17,10	19,74	25,41
96	17	22,88	27,61	23,09	26,89	23,39	18,67	24,80	31,27	31,74	16,90	20,00	24,56
96	18	28,00	33,50	27,32	30,00	24,50	17,31	26,95	32,09	29,82	16,00	18,40	21,40
96	18	24,00	30,16	26,40	26,17	22,66	17,85	24,90	31,88	32,00	17,12	19,30	25,90

96	18	26,00	31,83	26,86	28,09	23,58	17,58	25,93	31,99	30,91	16,56	18,85	23,65
96	19	25,20	30,00	25,93	28,03	23,13	18,85	27,50	31,36	30,45	16,47	19,09	24,45
96	19	24,70	30,00	26,04	27,36	22,62	17,90	25,06	31,00	31,70	16,58	20,06	24,00
96	19	24,95	30,00	25,99	27,70	22,88	18,38	26,28	31,18	31,08	16,53	19,58	24,23
96	20	25,76	33,70	27,00	28,00	23,10	18,72	25,11	32,26	31,70	17,08	20,50	27,63
96	20	23,55	31,26	26,00	28,00	21,95	17,64	24,63	30,65	31,81	15,75	19,15	23,72
96	20	24,66	32,48	26,50	28,00	22,53	18,18	24,87	31,46	31,76	16,42	19,83	25,68

Annexe 7.

les moyennes des trois répliques analytiques. *Staphylococcus aureus*.

ATB	[agar]	24 h	48 h	72 h	96 h	la variation
CX	14	30,39	24,26	24,275	24,175	6,215
CX	15	31,935	25,845	25,845	25,775	6,16
CX	16	31,43	25,35	25,1	25,33	6,33
CX	17	30,775	23,13	22,95	22,875	7,9
CX	18	33,315	25,8	25,88	26	7,515
CX	19	32,23	28	25,02	24,95	7,28
CX	20	31,525	27,355	27,355	24,655	6,87
	la variation	2,925	4,87	4,405	3,125	
P	14	42,62	30,6	30,6	30,1	12,52
P	15	40,44	32,195	32,195	32	8,44
P	16	42,24	31,88	31,88	30,8	11,44
P	17	37,565	33,295	27,58	27,61	9,985
P	18	39,75	32,15	32,1	31,83	7,92
P	19	41,71	30,59	30	30	11,71
P	20	41,37	36,71	36,71	32,48	8,89
	la variation	5,055	6,12	9,13	4,87	
E	14	26,225	26,225	26,225	26,225	0
E	15	29,055	29,055	29,055	29,055	0
E	16	26,83	26,83	26,83	26,83	0
E	17	23,595	23,085	23,085	23,085	0,51
E	18	26,86	26,86	26,86	26,86	0
E	19	25,985	25,985	25,985	25,985	0
E	20	26,5	26,5	26,5	26,5	0
	la variation	5,46	5,97	5,97	5,97	
CD	14	28,49	28,49	28,49	28,49	0
CD	15	28,625	28,625	28,625	28,625	0
CD	16	28,86	28,86	28,86	28,86	0
CD	17	26,89	26,89	26,89	26,89	0
CD	18	28,085	28,085	28,085	28,085	0
CD	19	27,695	27,695	27,695	27,695	0
CD	20	28	28	28	28	0
	la variation	1,97	1,97	1,97	1,97	
TE	14	25,77	25,77	25,77	25,77	0
TE	15	25,615	25,615	25,615	25,615	0

TE	16	24,655	24,655	24,405	24,405	0,25
TE	17	23,385	23,385	23,385	23,385	0
TE	18	23,58	23,58	23,58	23,58	0
TE	19	22,875	22,875	22,875	22,875	0
TE	20	22,525	22,525	22,525	22,525	0
	la variation	3,245	3,245	3,245	3,245	
GEN	14	19,98	19,98	19,98	19,98	0
GEN	15	19,26	19,26	19,26	19,26	0
GEN	16	18,97	18,97	18,97	18,97	0
GEN	17	18,665	18,665	18,665	18,665	0
GEN	18	17,58	17,58	17,58	17,58	0
GEN	19	18,375	18,375	18,375	18,375	0
GEN	20	18,18	18,18	18,18	18,18	0
	la variation	2,4	2,4	2,4	2,4	
COT	14	27,26	27,26	27,26	27,26	0
COT	15	21,9	22,275	22,275	22,275	0,375
COT	16	26,235	26,235	26,585	26,585	0,35
COT	17	24,8	24,8	24,8	24,8	0
COT	18	25,925	25,925	25,925	25,925	0
COT	19	26,28	26,28	26,28	26,28	0
COT	20	24,87	24,87	24,87	24,87	0
	la variation	5,36	4,985	4,985	4,985	
R	14	32,885	32,885	32,885	32,885	0
R	15	33	33	33,17	33,17	0,17
R	16	31,72	31,72	31,75	31,75	0,03
R	17	31,27	31,27	31,27	31,27	0
R	18	31,985	31,985	31,985	31,985	0
R	19	31,18	31,18	31,18	31,18	0
R	20	31,455	31,455	31,455	31,455	0
	la variation	1,82	1,82	1,99	1,99	
OF	14	31,56	31,56	31,56	31,56	0
OF	15	32,275	32,275	32,275	32,275	0
OF	16	32,075	32,2	32,2	30,68	1,52
OF	17	31,735	31,735	31,735	31,735	0
OF	18	30,91	30,91	30,91	30,91	0
OF	19	31,075	31,075	31,075	31,075	0
OF	20	31,755	31,755	31,755	31,755	0
	la variation	1,365	1,365	1,365	1,595	

TEC	14	17,06	17,06	17,06	17,06	0
TEC	15	17,315	17,315	17,315	17,315	0
TEC	16	16,835	16,835	16,835	16,835	0
TEC	17	16,9	16,9	16,9	16,9	0
TEC	18	16,56	16,56	16,56	16,56	0
TEC	19	16,525	16,525	16,525	16,525	0
TEC	20	16,415	16,415	16,415	16,415	0
	la variation	0,9	0,9	0,9	0,9	
VA	14	19,94	19,94	19,94	19,94	0
VA	15	19,65	19,65	19,65	19,65	0
VA	16	19,975	19,975	19,975	19,975	0
VA	17	20	20	20	20	0
VA	18	18,85	18,85	18,85	18,85	0
VA	19	19,575	19,575	19,575	19,575	0
VA	20	19,825	19,825	19,825	19,825	0
	la variation	1,15	1,15	1,15	1,15	
C	14	24,64	24,64	24,64	24,255	0,385
C	15	24,72	24,35	23,99	23,99	0,73
C	16	25,25	25,25	24,4	24,4	0,85
C	17	25,88	24,555	24,555	24,555	1,325
C	18	24,65	23,7	23,7	23,65	1
C	19	24,725	24,225	24,225	24,225	0,5
C	20	25,675	25,675	25,675	25,675	0
	la variation	1,24	1,975	1,975	2,025	

Annexe 8.

Récapitulatif des coefficients de corrélation de Spearman entre le diamètre d'inhibition (D_{ATB}) et les deux variables temps d'incubation et concentration d'agar-agar, le coefficient de détermination R^2 , les p -value correspondantes et les paramètres de l'équation du modèle chez *Staphylococcus aureus* "ATCC 25923".

D_{ATB}	temps incub.	Conc. agar	R^2	Const.	t	[Agar]	Equation du model
D_{CX}	-0,677	0,165	0,511	27,720	-0,087	0,257	$CX = 27,71 - 8,74E-02 * t + 0,25 * [Agar]$
p -value	< 0,0001	0,133	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,053	
D_P	-0,666	0,116	0,511	37,157	-0,130	0,268	$P = 37,15 - 0,13 * t + 0,26 * [Agar]$
p -value	< 0,0001	0,292	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,167	
D_E	-0,025	-0,193	0,040	29,644	-0,001	-0,189	$E = 29,64 - 9,1E-04 * t - 0,18 * [Agar]$
p -value	0,821	0,078	0,188	< 0,0001	0,905	0,069	
D_{CD}	0,000	-0,362	0,031	30,584	0,000	-0,147	$CD = 30,58 - 0,14 * [Agar]$
p -value	1,000	0,001	0,284	< 0,0001	1,000	0,114	
D_{TE}	-0,019	-0,899	0,797	33,890	-0,001	-0,577	$TE = 33,89 - 5,95E-04 * t - 0,57 * [Agar]$
p -value	0,861	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,806	< 0,0001	
D_{GEN}	0,000	-0,743	0,562	23,913	0,000	-0,306	$GEN = 23,91 - 0,30 * [Agar]$
p -value	1,000	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	1,000	< 0,0001	
D_{COT}	0,026	-0,158	0,001	24,970	0,002	0,019	$COT = 24,96 + 1,5E-03 * t + 1,93E-02 * [Agar]$
p -value	0,811	0,150	0,962	< 0,0001	0,842	0,848	
D_R	0,011	-0,535	0,310	36,680	0,000	-0,280	$R = 36,67 + 4,76E-04 * t - 0,28 * [Agar]$
p -value	0,924	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,891	< 0,0001	

value							
D _{OF}	-0,051	-0,131	0,065	33,370	-0,002	-0,096	OF = 33,37-2,4E-03*t-9,6E-02*[Agar]
<i>p</i> -value	0,641	0,235	0,065	< 0,0001	0,437	0,027	
D _{TEC}	0,000	-0,606	0,395	19,103	0,000	-0,135	TEC = 19,10-0,135*[Agar]
<i>p</i> -value	1,000	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	1,000	< 0,0001	
V _A	0,000	-0,185	0,057	20,671	0,000	-0,058	VA = 20,67-5,78E-02*[Agar]
<i>p</i> -value	1,000	0,092	0,091	< 0,0001	1,000	0,029	
D _C	-0,270	0,113	0,074	23,574	-0,009	0,095	C = 23,57-9,2E-03*t+9,53E-02*[Agar]
<i>p</i> -value	0,013	0,305	0,045	< 0,0001	0,047	0,126	

Annexe 9.

Les *p*-value comparaisons multiples par paires antibiotique_concentration agar-agar pour *Staphylococcus aureus* "ATCC 25923".

ATB	[agar]	14	15	16	17	18	19	20
CX	14	1	0,286	0,575	0,802	0,202	0,267	0,104
	15	0,286	1	0,613	0,187	0,834	0,967	0,575
	16	0,575	0,613	1	0,417	0,474	0,584	0,286
	17	0,802	0,187	0,417	1	0,127	0,174	0,060
	18	0,202	0,834	0,474	0,127	1	0,867	0,725
	19	0,267	0,967	0,584	0,174	0,867	1	0,604
	20	0,104	0,575	0,286	0,060	0,725	0,604	1
P	14	1	0,167	0,271	0,970	0,284	0,607	0,009
	15	0,167	1	0,779	0,156	0,757	0,058	0,225
	16	0,271	0,779	1	0,255	0,977	0,106	0,135
	17	0,970	0,156	0,255	1	0,267	0,633	0,008
	18	0,284	0,757	0,977	0,267	1	0,113	0,128
	19	0,607	0,058	0,106	0,633	0,113	1	0,002
	20	0,009	0,225	0,135	0,008	0,128	0,002	1
E	14	1	< 0,0001	0,269	0,006	0,076	0,331	0,340
	15	< 0,0001	1	0,003	< 0,0001	0,021	< 0,0001	0,002
	16	0,269	0,003	1	0,000	0,503	0,038	0,880
	17	0,006	< 0,0001	0,000	1	< 0,0001	0,079	0,000
	18	0,076	0,021	0,503	< 0,0001	1	0,006	0,412
	19	0,331	< 0,0001	0,038	0,079	0,006	1	0,054
	20	0,340	0,002	0,880	0,000	0,412	0,054	1
CD	14	1	0,502	0,946	0,016	0,202	0,003	0,032
	15	0,502	1	0,460	0,081	0,546	0,022	0,140
	16	0,946	0,460	1	0,013	0,179	0,003	0,027
	17	0,016	0,081	0,013	1	0,254	0,591	0,788
	18	0,202	0,546	0,179	0,254	1	0,093	0,383
	19	0,003	0,022	0,003	0,591	0,093	1	0,421
	20	0,032	0,140	0,027	0,788	0,383	0,421	1
TE	14	1	0,592	0,035	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
	15	0,592	1	0,115	0,000	0,001	< 0,0001	< 0,0001
	16	0,035	0,115	1	0,041	0,070	0,001	< 0,0001
	17	< 0,0001	0,000	0,041	1	0,815	0,180	0,032
	18	< 0,0001	0,001	0,070	0,815	1	0,115	0,017

	19	< 0,0001	< 0,0001	0,001	0,180	0,115	1	0,421
	20	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,032	0,017	0,421	1
GEN	14	1	0,061	0,023	0,000	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
	15	0,061	1	0,688	0,081	< 0,0001	0,007	0,001
	16	0,023	0,688	1	0,180	< 0,0001	0,023	0,005
	17	0,000	0,081	0,180	1	0,001	0,348	0,140
	18	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,001	1	0,016	0,061
	19	< 0,0001	0,007	0,023	0,348	0,016	1	0,592
	20	< 0,0001	0,001	0,005	0,140	0,061	0,592	1
COT	14	1	< 0,0001	0,061	< 0,0001	0,009	0,081	< 0,0001
	15	< 0,0001	1	< 0,0001	0,088	< 0,0001	< 0,0001	0,070
	16	0,061	< 0,0001	1	0,003	0,461	0,893	0,004
	17	< 0,0001	0,088	0,003	1	0,023	0,002	0,920
	18	0,009	< 0,0001	0,461	0,023	1	0,384	0,029
	19	0,081	< 0,0001	0,893	0,002	0,384	1	0,002
	20	< 0,0001	0,070	0,004	0,920	0,029	0,002	1
R	14	1	0,094	0,006	< 0,0001	0,044	< 0,0001	0,000
	15	0,094	1	0,284	0,001	0,738	0,000	0,032
	16	0,006	0,284	1	0,027	0,461	0,007	0,284
	17	< 0,0001	0,001	0,027	1	0,003	0,639	0,255
	18	0,044	0,738	0,461	0,003	1	0,001	0,070
	19	< 0,0001	0,000	0,007	0,639	0,001	1	0,108
	20	0,000	0,032	0,284	0,255	0,070	0,108	1
OF	14	1	0,005	0,094	0,191	0,441	0,268	0,052
	15	0,005	1	0,254	0,131	0,000	< 0,0001	0,383
	16	0,094	0,254	1	0,712	0,014	0,005	0,789
	17	0,191	0,131	0,712	1	0,038	0,016	0,524
	18	0,441	0,000	0,014	0,038	1	0,737	0,007
	19	0,268	< 0,0001	0,005	0,016	0,737	1	0,002
	20	0,052	0,383	0,789	0,524	0,007	0,002	1
TEC	14	1	0,019	0,203	0,383	0,032	0,003	0,003
	15	0,019	1	0,000	0,001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
	16	0,203	0,000	1	0,688	0,383	0,081	0,081
	17	0,383	0,001	0,688	1	0,203	0,032	0,032
	18	0,032	< 0,0001	0,383	0,203	1	0,383	0,383
	19	0,003	< 0,0001	0,081	0,032	0,383	1	1,000
	20	0,003	< 0,0001	0,081	0,032	0,383	1,000	1
VA	14	1	0,013	0,687	0,592	< 0,0001	0,044	0,461

	15	0,013	1	0,004	0,003	0,032	0,639	0,081
	16	0,687	0,004	1	0,893	< 0,0001	0,016	0,254
	17	0,592	0,003	0,893	1	< 0,0001	0,011	0,203
	18	< 0,0001	0,032	< 0,0001	< 0,0001	1	0,009	0,000
	19	0,044	0,639	0,016	0,011	0,009	1	0,203
	20	0,461	0,081	0,254	0,203	0,000	0,203	1
	14	1	0,353	0,477	0,535	0,398	0,645	0,136
	15	0,353	1	0,101	0,121	0,933	0,639	0,016
	16	0,477	0,101	1	0,927	0,119	0,241	0,436
C	17	0,535	0,121	0,927	1	0,143	0,280	0,384
	18	0,398	0,933	0,119	0,143	1	0,700	0,019
	19	0,645	0,639	0,241	0,280	0,700	1	0,051
	20							

Niveau de signification corrigé de Bonferroni : 0,0024

[agar] = concentration agar-agar.

Annexe 10.

Comparaisons multiples par paires entre les échantillons de la variable temps d'incubation suivant la procédure de Nemenyi (test bilatéral) chez *Staphylococcus aureus*.

Antibiotique	Temps incubation (h)	24	48	72	96
CX	24	1	0,000	< 0,0001	< 0,0001
	48	0,000	1	0,807	0,137
	72	< 0,0001	0,807	1	0,592
	96	< 0,0001	0,137	0,592	1
P	24	1	0,008	< 0,0001	< 0,0001
	48	0,008	1	0,630	0,018
	72	< 0,0001	0,630	1	0,306
	96	< 0,0001	0,018	0,306	1
E	24	1	0,964	0,964	0,964
	48	0,964	1	1,000	1,000
	72	0,964	1,000	1	1,000
	96	0,964	1,000	1,000	1
CD	24	1	1,000	1,000	1,000
	48	1,000	1	1,000	1,000
	72	1,000	1,000	1	1,000
	96	1,000	1,000	1,000	1
TE	24	1	1,000	0,964	0,964
	48	1,000	1	0,964	0,964
	72	0,964	0,964	1	1,000
	96	0,964	0,964	1,000	1
GEN	24	1	1,000	1,000	1,000
	48	1,000	1	1,000	1,000
	72	1,000	1,000	1	1,000
	96	1,000	1,000	1,000	1
COT	24	1	0,964	0,774	0,774
	48	0,964	1	0,964	0,964
	72	0,774	0,964	1	1,000
	96	0,774	0,964	1,000	1
R	24	1	1,000	0,774	0,774
	48	1,000	1	0,774	0,774
	72	0,774	0,774	1	1,000

	96	0,774	0,774	1,000	1
OF	24	1	0,984	0,984	0,995
	48	0,984	1	1,000	0,933
	72	0,984	1,000	1	0,933
	96	0,995	0,933	0,933	1
TEC	24	1	1,000	1,000	1,000
	48	1,000	1	1,000	1,000
	72	1,000	1,000	1	1,000
	96	1,000	1,000	1,000	1
VA	24	1	1,000	1,000	1,000
	48	1,000	1	1,000	1,000
	72	1,000	1,000	1	1,000
	96	1,000	1,000	1,000	1
C	24	1	0,405	0,079	0,007
	48	0,405	1	0,837	0,338
	72	0,079	0,837	1	0,837
	96	0,007	0,338	0,837	1

Annexe 11.

$$\ln(MIC) = \ln(c) - (2D)^{-1} \left(V \pm \sqrt{V^2 - 4D} \right) x$$

avec

c : concentration d'antibiotique.
D : coefficient de diffusion d l'antibiotique.
V : coefficient de dissipation de l'antibiotique.
x : diamètre de zone d'inhibition
MIC : concentration minimale inhibitrice

Formule 1.

$$\mathbf{J}_j = -\rho \mathcal{D}_{ij} \nabla c_j$$

avec

\mathbf{J}_j flux massique ($\text{kg.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$),
 ρ masse volumique (kg.m^{-3}),
 \mathcal{D}_{ij} coefficient de diffusion binaire ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$),
 c_j fraction massique (sans unité).

Formule 2.

