

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur Et de La Recherche Scientifique

جامعة غرداية

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



كلية علوم الطبيعة والحياة  
وعلوم الأرض  
قسم البيولوجيا

Département de Biologie

Université de Ghardaïa

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de  
Master académique en Ecologie et Environnement  
Spécialité : Ecologie

## THEME

**Effet de la concentration de l'inoculum d' *Escherichia coli* 25922 (ATCC), *Pseudomonas aeruginosa* 27853 (ATCC) et *Staphylococcus aureus* 25923 (ATCC) sur la zone d'inhibition d'un antibiogramme**

Présenté par

**ABISMAIL Aoumeur**

Membres du jury

M. S. BELGHIT  
M. G. DIF  
M. A. BEKLLI  
M. Y. DAOUDI  
M. N. BOURAS

Univ. de Ghardaïa (MCA)  
Univ. de Ghardaïa (MAA)  
Univ. de Ghardaïa (MAA)  
Laboratoire Ibn Rochd (Ing)  
Univ. De Ghardaïa (Pr)

Président  
Examineur  
Examineur  
Coencadreur  
Encadreur

**Mai 2017**

# Dédicaces

*Je dédie ce travail :*

*Ma mère, qui a oeuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils.*

*Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie.*

*À tous mes proches, et plus spécialement, mes sœurs et mes frères.*

*À tous mes chers amis et mes collègues .*

*Et à tous ceux qui m'ont enseigné le long de ma vie scolaire*

*ABISMAIL AOUMEUR*

## *Remerciements*

Ce travail a été réalisé au Laboratoire d'Analyses Médicales Ibn Rochd de Ghardaïa.

Au terme de ce travail, je tiens tout particulièrement à témoigner mon profond gratitude à mon promoteur Nouredine BOURAS professeur au Département de Biologie à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Ghardaïa, qui a accepté de m'encadrer et de me suivre tout le long de mes travaux, de me guider dans mes recherches, de me consacrer beaucoup de son temps et de corriger ce manuscrit. Je le remercie infiniment pour ses conseils judicieux et la confiance qui il ma accordée.

Je voudrais également exprimer toute ma gratitude et mes remerciements à Monsieur Yacine DAOUDI, mon co-encadreur, pour son aide et sa disponibilité ont été des atouts précieux.

Je remercie vivement les membres du jury :

Monsieur S. BELGHIT, Maître de conférences A à l'Université de Ghardaia, pour avoir accepté de présider le Jury.

Monsieur G. DIF, Maître Assistante A à l'Université de Ghardaia, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Monsieur A. BEKLLI, Maître Assistante A à l'Université de Ghardaia, d'avoir accepté de se joindre à ce jury et d'examiner ce travail.

Je voudrais également exprimer toute ma gratitude et mes remerciements à Monsieur SHEIKH SALAH Abou el Kacem, Maître Assistante A à l'Université de Ghardaia, pour son aide et sa disponibilité ont été des atouts précieux.

Mes sincères remerciements iront également à Monsieur BOUAL Zakaria, pour ses conseils précieux et sa vision de la recherche scientifique.

Je tiens à adresser mon vifs remerciements à Monsieur Ammi Saïd Mustapha, et toute son équipe pour nous avoir accueillis dans son laboratoire.

Je remercie chaleureusement Monsieur BENOUDINA Belkheir, pour son soutien et aide.

Je tiens à exprimer également ma reconnaissances à tous mes enseignants des différents niveaux d'étude qui nous ont formés.

Je voudrais exprimer mes remerciements à toute personne que j'ai peut être oublié de citer et qui m'aurait aidé ou contribué à la réalisation de cette mémoire.

Enfin, pour leur soutien sans faille et permanent, Je tiens à remercier de tout cœur mes parents.

Merci

## RESUME

L'antibiogramme par diffusion dont les règles d'exécution ont été codifiées par l'OMS, est très employé en pathologie médicale. Afin de contrôler la validité des résultats obtenus lorsqu'il est pratiqué à des concentrations d'inoculum inférieures ou supérieures au 0,5 McFarland, des séries d'épreuves ont été effectuées simultanément à 0,4 jusqu'à 4 degré de McFarland et la lecture est réalisée après 24 d'incubation. Les souches bactériennes et les antibiotiques testés avaient été préalablement choisies. Les moyennes des diamètres d'inhibition déduites de 0,5 à 6 mm en fonction de la valeur de McFarland sauf avec l'antibiotique aztréonam la diminution était de 12 mm obtenu avec *Pseudomonas aeruginosa*. Malgré cette diminution le résultat de l'interprétation des antibiogrammes ne change pas, et donc l'antibiogramme reste efficace même si est réalisé avec un inoculum de 0,4 jusqu'à 4 degré de McFarland, le résultat est toujours interprétable avec tous les antibiotiques testés et avec les trois souches bactériennes.

Ensuite, nous avons réalisé une analyse statistique sur une série de trois répliques analytiques. Les résultats obtenus indiquent qu'il y a une linéarité négative, fortement corrélée, significative statistiquement (le test student), reliant le diamètre de la zone d'inhibition et le McFarland, ce qui ne permet de prédire le diamètre de la zone d'inhibition en fonction de McFarland tout en utilisant le modèle linéaire obtenu avec chaque antibiotique nous constatons que l'interprétation de l'antibiogramme reste la même si l'antibiogramme est réalisé par un inoculum vachement concentré avec tous les antibiotiques utilisés. Notre étude détermine exactement l'intervalle de McFarland où l'interprétation de l'antibiogramme ne se change pas. Ce qui nous permet d'avoir une lecture interprétable, soit pour les conditions de travail d'urgence ou même pour les analyses courantes.

**Mots clés :** Inoculum, zone d'inhibition, antibiogramme, bactérie.

## ملخص

اختبار حساسية الميكروبات ضد المضادات الحيوية هي واحدة من أهم الاختبارات الطبية اليومية إذ يتم اختبار عدد من المضادات الحيوية ضد البكتيريا المعزولة من مختلف العينات البيولوجية، وعلى أساس قطر منطقة التثبيط المتشكلة حول كل قرص من أقراص المضاد الحيوي يتم تحديد ما إذا كانت البكتيريا حساسة أو متوسطة الحساسية أو مقاومة لمضاد حيوي معين.

توجد عدة عوامل تتحكم في نتيجة اختبار حساسية المكروبات للمضادات الحيوية ومن أهمها تركيز المحلول البكتيري المستعمل أثناء الاختبار، لذلك توصي المنظمة العالمية للصحة باستخدام محلول بكتيري ذو تركيز مساوي لـ:  $1.5 \times 10^8$  وحدة تشكيل مستعمرة/ملل، أي ما يعادل 0.5 مكفار لاند. إلا أنه في بعض الحالات الاستعجالية وحتى في بعض الظروف اليومية العادية في المختبرات خاصة مع كثرة إجراء هذا الاختبار لا يتم التقيد بذلك التركيز للمحلول البكتيري، مما قد يؤثر في مصداقية نتائج الاختبار لدى نتساءل ما هو تأثير تركيز المحلول البكتيري على منطقة التثبيط أثناء اختبار حساسية المكروبات للمضادات الحيوية.

للإجابة على هذه الإشكالية قمنا بتحضير محاليل أم لثلاث سلالات بكتيرية (*Escherichia coli* 25922 (ATCC)

*Staphylococcus aureus* 25923 (ATCC) و *Pseudomonas aeruginosa* 27853 (ATCC) ثم قمنا بتخفيفها

قصد الحصول على التخفيفات الموافقة للتركيز الآتية: 0.4، 0.5، 1، 2، 3، و 4 مكفار لاند، وتم استعمال هذه المحاليل البكتيرية في انجاز اختبار حساسية المكروبات للمضادات الحيوية وذلك باستعمال خمسة مضادات حيوية وبعد 24 ساعة من التحضين في 37 درجة مئوية يتم قياس قطر منطقة التثبيط، ثم حساب معدلات قطر منطقة التثبيط على أساس ثلاثة تكرارات، وكانت النتائج أن قطر منطقة التثبيط ينقص بـ 0.5 إلى 6 مم عند جميع المضادات الحيوية المستعملة مع السلالات البكتيرية الثلاث، عدا المضاد أرتريونام (30 ميكروغرام) فقد لاحظنا تناقص لقطر منطقة التثبيط من 12 مم مع 0.4 مكفار لاند إلى 0 مم مع 4 مكفار لاند عند البكتيريا *Pseudomonas aeruginosa*، إلا أنه ومهما كان التناقص فإن تفسير اختبار حساسية المكروبات للمضادات الحيوية حسب القيم الصادرة عن المنظمة العالمية للصحة يبقى نفسه.

ثم تمت بعد ذلك معالجة إحصائية للنتائج المتحصل عليها أفضت إلى أن هناك علاقة ترابط خطية سالبة وقوية بين قطر منطقة التثبيط وتركيز المحلول البكتيري ذات مصداقية ومعنى إحصائي، والنتائج تدل ان النتيجة التفسيرية لاختبار حساسية المكروبات للمضادات الحيوية لا تتغير ولو أنجز بمحلول بكتيري ذو تركيز عالي وهذا عند السلالات البكتيرية الثلاث مع المضادات الحيوية الخمسة المستعملة مع كل واحدة منها، مما يسهل إجراء هذا الاختبار وبمصداقية سواء في بعض الظروف الإستعجالية أو حتى ظروف العمل العادية.

الكلمات المفتاحية : منطقة التثبيط، المضادات الحيوية، اختبار حساسية المكروبات للمضادات الحيوية، البكتيريا.

## SOMMAIRE

<b>Remerciements</b> .....	I
<b>RÉSUMÉS</b> .....	IV
<b>INDEX DES TABLEAUX</b> .....	IV
<b>INDEX DES FIGURES</b> .....	IV
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	IV
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	01
<b>I.- REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>I ANTIBIOTIQUES</b> .....	03
1.- Généralités.....	03
2.- Classification des antibiotiques.....	03
2.1.- Classification selon la structure chimique.....	03
2.2.- Autres classifications.....	04
2.2.1.- Classification d'après le spectre d'action.....	04
2.2.2.- Classification d'après leur type d'action.....	05
2.2.3.- Classification d'après leur origine.....	05
2.2.4.- Classification d'après leur mode d'action.....	06
2.2.5.- Classification d'après leur charge électrique	06
3.- Mode d'action des antibiotiques .....	06
4.- Microorganismes producteurs d'antibiotiques.....	06
4.1.- Bactéries non mycéliennes et champignons.....	06
4.2.- Actinomycètes .....	07
5.- Phénomène de résistance aux antibiotiques.....	07
5.1.- Production d'enzymes inactivant les antibiotiques.....	08
5.2.- Modification de la cible des antibiotiques.....	08
5.3.- Pompes d'efflux.....	09
6.- Microorganismes résistants aux antibiotiques.....	09
6.1.- Microorganismes résistants à Gram positif .....	09
6.1.1- <i>Staphylococcus aureus</i> .....	09
6.1.2- <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	10
6.1.3- Entérocoques.....	10
6.2.- Microorganismes résistants à Gram-négatif.....	10
6.2.1- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	10
6.2.2- <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	11
6.2.3.- <i>Enterobacteriaceae</i> .....	11
6.2.3.1- <i>Salmonella</i> .....	11
6.2.3.2- <i>Escherichia coli</i> .....	12
6.2.3.3.- <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	12
<b>II- ANTIBIOGRAMME</b> .....	12
1.- But de l'antibiogramme.....	12
2.- Définitions de CMI et CMB.....	13
3.- Interaction entre antibiotiques.....	13

4.- Antibiogramme en milieu gélosé : méthode des disques.....	13
4.1- Principe général.....	13
4.2- Technique de l'antibiogramme.....	14
4.3- Lecture interprétative de l'antibiogramme.....	18
4.4- Standardisation de l'antibiogramme .....	18
<b>CHAPITRE II</b>	
<b>II.- MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	
I.- MATERIEL DU LABORATOIRE.....	20
1.- Appareillage.....	20
2.- Petit matériel.....	20
3.- Produits chimiques.....	20
4.- Matériel biologique.....	20
5.- Milieu de culture.....	21
6.- Repiquage des souches bactériennes.....	22
II.- METHODES UTILISEES	
1.- Antibiogramme par diffusion en milieu Mueller Hinton gélosé.....	23
1.1.- Préparation de la solution mère et ajustement de l'inoculum.....	23
1.2.- Préparation des dilutions.....	24
1.3.- Détermination de la concentration d'inoculum.....	25
1.3.1- la standardisation de l'inoculum.....	25
1.4.- Ensemencement.....	26
1.5.- Choix des antibiotiques et incubation.....	27
1.6.- Lecture et interprétation.....	30
2. – Analyse statistique.....	30
<b>CHAPITRE III</b>	
<b>III.- RESULTATS ET DISCUSSION</b>	
<b>PARTIE 1 : <i>Escherichia coli</i></b>	
1.- la standardisation de l'inoculum.....	31
2.- Résultats de l'antibiogramme.....	32
3.- Interprétations des antibiogrammes.....	34
4.- Analyse statistique.....	35
4.1.- Modélisation.....	35
4.2.- Intensité de linéarité McFarland-zone d'inhibition.....	38
4.3.- Test de significativité.....	40
<b>PARTIE 2 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	
1.- la standardisation de l'inoculum.....	44
2.- Résultats de l'antibiogramme.....	44
3.- Interprétations des antibiogrammes.....	45
4.- Analyse statistique.....	47
4.1.- Modélisation.....	47
4.2.- Intensité de linéarité McFarland-zone d'inhibition.....	51
4.3.- Test de significativité.....	51
<b>PARTIE 3 : <i>Staphylococcus aureus</i></b>	
1.- la standardisation de l'inoculum.....	54
2.- Résultats de l'antibiogramme.....	54
3.- Interprétations des antibiogrammes.....	56
4.- Analyse statistique.....	56
4.1.- Modélisation.....	56
4.2.- Intensité de linéarité McFarland-zone d'inhibition.....	60

4.3.- Test de significativité.....	60
<b>IV.- CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>62</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>64</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>68</b>

## INDEX DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Classification des antibiotiques selon leur structure chimique (Berdy <i>et al.</i> , 1987).....	04
<b>Tableau 2.</b> Classification des quelques antibiotiques selon leur spectre d'action.....	05
<b>Tableau 3.</b> Principales familles d'antibiotiques et cibles cellulaires.....	06
<b>Tableau 4.</b> Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour Entérobactéries <i>Escherichia coli</i> ATCC25922 (Rahal <i>et al.</i> , 2005).....	15
<b>Tableau 5.</b> Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Acinetobacter</i> sp.(Rahal <i>et al.</i> , 2005).....	16
<b>Tableau 6.</b> Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI <i>Staphylococcus</i> sp.(Rahal <i>et al.</i> , 2005).....	17
<b>Tableau 7.</b> Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI <i>Enterococcus</i> sp (Rahal <i>et al.</i> , 2005).....	18
<b>Tableau 8.</b> Description des souches utilisé (Beddou, 2015 ; Grosjean, <i>et all.</i> , 2011).....	21
<b>Tableau 9.</b> Relation McFarland, Absorbance et concentrations bactérienne (URL 1 (McFARLAND et JAMA ;1907) (URL 2).....	26
<b>Tableau 10.</b> Familles des antibiotiques utilisés (C.A.S.F.M, 2010).....	27
<b>Tableau 11.</b> Résultats de la standardisation de l'inoculum d' <i>Escherichia coli</i> .....	31
<b>Tableau 12.</b> Résultats des antibiogrammes et écartype pour <i>Escherichia coli</i> .....	32
<b>Tableau 13.</b> Interprétations des antibiogrammes d' <i>Escherichia coli</i> .....	34
<b>Tableau 14.</b> Le modèle linéaire pour chaque antibiotique utilisé avec <i>E. coli</i> .....	38
<b>Tableau 15.</b> Les moyens de Ø des zones d'inhibition en mm et le coefficient de corrélation de Pearson ® pour <i>Escherichia coli</i> .....	39
<b>Tableau 16.</b> Coefficient de corrélation de Pearson ® et résultats de test de Student avec <i>Escherichia coli</i> .....	41
<b>Tableau 17.</b> Interprétations des antibiogrammes selon le Ø des zones d'inhibitions calculé pour <i>Escherichia coli</i> .....	42
<b>Tableau 18.</b> Résultats de la standardisation de l'inoculum de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	44
<b>Tableau 19.</b> Résultats des antibiogrammes et écartype pour de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	45
<b>Tableau 20.</b> Interprétations des antibiogrammes de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	46
<b>Tableau 21.</b> Le modèle linéaire pour chaque antibiotique utilisé avec <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	50
<b>Tableau 22.</b> Les moyens de Ø des zones d'inhibition en mm et le coefficient de corrélation de Pearson ® pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	51
<b>Tableau 23.</b> Coefficient de corrélation de Pearson ® et résultats de test de Student avec <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	52

<b>Tableau 24.</b> Interprétations des antibiogrammes selon le Ø des zones d'inhibitions calculé pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	53
<b>Tableau 25.</b> Résultats de la standardisation de l'inoculum de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	54
<b>Tableau 26.</b> Résultats des antibiogrammes et écartype pour de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	54
<b>Tableau 27.</b> Interprétations des antibiogrammes de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	56
<b>Tableau 28.</b> Le modèle linéaire pour chaque antibiotique utilisé avec <i>Staphylococcus aureus</i> .....	59
<b>Tableau 29.</b> Les moyens de Ø des zones d'inhibition en mm et le coefficient de corrélation de Pearson ® pour <i>Staphylococcus aureus</i> .....	60
<b>Tableau 30.</b> Coefficient de corrélation de Pearson ® et résultats de test de Student avec <i>Staphylococcus aureus</i> .....	60
<b>Tableau 31.</b> Interprétations des antibiogrammes selon le Ø des zones d'inhibitions calculé pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	61

## INDEX DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries (Fred, 2006).....	07
<b>Figure 2.</b> Exemple de gélose avec des disques d'antibiotiques et une souche bactérienne ayant une sensibilité variable aux antibiotiques testés. (Photo Originale).....	14
<b>Figure 3.</b> McFarland standards No : 0.5, 1 et 2 (Wikipedia 2017).....	19
<b>Figure 4.</b> Flacons contiens la gélose Mueller Hinton utilisé comme milieu de culture pour l'antibiogramme. (Photo Originale).....	21
<b>Figure 5.</b> Colonies d' <i>Escherichia coli</i> repiquées par la méthode des stries, incubées à 37 °C, durant 24 h. (Photo Originale).....	22
<b>Figure 6.</b> Etape de la démarche expérimentale.....	23
<b>Figure 7.</b> Préparation de la solution mère a partir d'une culture pure d' <i>Escherichia coli</i> . (Photo Originale).....	24
<b>Figure 8.</b> Gamme de dilution pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Photo Originale).....	25
<b>Figure 9.</b> Mesure de la densité optique (DO) par un spectrophotomètre (Photo Originale).....	26
<b>Figure 10.</b> Ensemencement d' <i>Escherichia coli</i> et application des disques d'antibiotiques (Photo Originale).....	29
<b>Figure 11.</b> Incubation des boites dans l'étuve à 37°C durant 24 h (Photo Originale).....	29
<b>Figure 12.</b> Principe de la lecture d'un antibiogramme. (Photo Originale).....	30
<b>Figure 13.</b> Courbe représente la variation de diamètre de zone d'inhibition en fonction de McFarland pour <i>Escherichia coli</i> .....	33
<b>Figure 14.</b> Résultats des antibiogrammes pour <i>Escherichia coli</i> (Photo Originale).....	34
<b>Figure 15.</b> Courbe de linéarité obtenue avec Ampicilline testés contre <i>E. coli</i> 25922 (ATCC).....	35
<b>Figure 16.</b> Courbe de linéarité obtenue avec Gentamicine testés contre <i>E. coli</i> 25922 (ATCC).....	36
<b>Figure 17.</b> Courbe de linéarité obtenue avec Amoxicilline+acide clavulanique testés contre <i>E. coli</i> 25922 (ATCC) .....	36
<b>Figure 18.</b> Courbe de linéarité obtenue avec Céfaloine testés contre <i>E. coli</i> 25922 (ATCC).....	37
<b>Figure 19.</b> Courbe de linéarité obtenue avec Ciprofloxacine testés contre <i>E. coli</i> 25922 (ATCC).....	37
<b>Figure 20.</b> Propriétés et interprétations du coefficient de corrélation de Person ® (URL3).....	39
<b>Figure 21.</b> Courbe représente la variation de diamètre de zone d'inhibition en fonction de McFarland pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	45
<b>Figure 22.</b> Résultats des antibiogrammes pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Photo Originale).....	46
<b>Figure 23.</b> Courbe de linéarité obtenue avec Amikacine testés contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853 (ATCC).....	47
<b>Figure 24.</b> Courbe de linéarité obtenue avec Ceftazidime testés contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853 (ATCC).....	48
<b>Figure 25.</b> Courbe de linéarité obtenue avec Ciprofloxacine testés contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853 (ATCC).....	48

<b>Figure 26.</b> Courbe de linéarité obtenue avec Ticarcilline + acide clavulanique testés contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853 (ATCC).....	49
<b>Figure 27.</b> Courbe de linéarité obtenue avec Aztréonam testés contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853 (ATCC).....	49
<b>Figure 28.</b> Courbe représente la variation de diamètre de zone d'inhibition en fonction de McFarland pour <i>Staphylococcus aureus</i> .....	55
<b>Figure 29.</b> Résultats des antibiogrammes pour <i>Staphylococcus aureus</i> (Photo Originale).....	55
<b>Figure 30.</b> Courbe de linéarité obtenue avec Céfoxitine testés contre <i>Staphylococcus aureus</i> 25923 (ATCC).....	57
<b>Figure 31.</b> Courbe de linéarité obtenue avec Gentamicine testés contre <i>Staphylococcus aureus</i> 25923 (ATCC).....	57
<b>Figure 32.</b> Courbe de linéarité obtenue avec Triméthoprim/sulfaméthoxazole (cotrimoxazole) testés contre <i>Staphylococcus aureus</i> 25923 (ATCC).....	58
<b>Figure 33.</b> Courbe de linéarité obtenue avec Tétracycline testés contre <i>Staphylococcus aureus</i> 25923 (ATCC).....	58
<b>Figure 34.</b> Courbe de linéarité obtenue avec Chloramphénicol testés contre <i>Staphylococcus aureus</i> 25923 (ATCC).....	59

## LISTE DES ABREVIATIONS

**ATCC** : American Type Culture collection

**BLSE** :  $\beta$ - lactamase à spectre étendu

**CASFM** : Comité de l'Antibiogramme de Société  
Française de Microbiologie

**CLSI** : The Clinical and Laboratory Standards  
Institute

**DO** : Densité Optique

**EUCAST** : European Committee on Antimicrobial  
Susceptibility Testing

**LCR** : Liquide céphalo-rachidien



**INTRODUCTION**

## **INTRODUCTION GENERALE**

L'antibiogramme est l'un des tests médicaux importants, réalisé quotidiennement au laboratoire médical, apporte une aide très importante au médecin pour choisir l'antibiotique à prescrire, lorsqu'une bactérie pathogène est identifiée dans un prélèvement bactériologique, celui-ci consiste à tester un panel d'antibiotiques vis à vis de la bactérie isolée. Il permettra ainsi de définir, pour chaque antibiotique, si la bactérie y est sensible (dans ce cas la l'antibiotique est efficace sur le germe), ou la bactérie est intermédiaire (l'antibiotique n'est efficace que dans certaines conditions), à fortes doses ou résistante (l'antibiotique est inefficace). Même certains mécanismes particuliers de résistance aux antibiotiques avec la souche testée peuvent parfois être mentionnés.

La fiabilité des résultats d'un antibiogramme est influencée par de nombreux paramètres qui doivent être rigoureusement contrôlés. La standardisation est régie par des documents émanant de l'O.M.S. et des divers comités nationaux (pour l'Algérie, c'est l'institut Pasteur).

Parmi les principales recommandations influant sur le résultat de l'antibiogramme la densité de l'inoculum bactérien est un élément primordial et elle doit être ajustée à l'aide d'un spectrophotomètre ou par comparaison avec un étalon d'opacité (la suspension bactérienne est standardisée à l'aide du témoin 0,5 degré McFarland).

Les recommandations de l'O.M.S. et l'EUCAST ne répondent certainement pas à certaines situations d'urgence, c'est pour ça n'excluent pas la possibilité de réalisation d'un antibiogramme direct sur la primo-culture sans repiquage pour les prélèvements (LCR, Hémoculture, etc.) réalisés dans des situations d'urgence (CASFM, 2017), mais le problème qui se pose dans ces conditions critiques et même dans des conditions de travail normales (au on détermine la concentration de l'inoculum bactérien par comparaison à l'oeil nu la turbidité de la suspension bactérienne à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de McFarland) c'est le suivant : quelle est l'effet de la concentration de l'inoculum sur la zone d'inhibition d'un antibiogramme, car un antibiogramme réalisé de manière non standardisée est dépourvu de sens, et donc le résultat est non interprétable, qui nous amène à l'absence de l'antibiothérapie et aussi à l'hyperconsommation des antibiotiques qui conduit à la résistance des bactéries aux antibiotiques. Ce dernier phénomène influe sur la qualité de vie des patients et la santé publique d'une façon générale, car au cours de ces dernières décennies, le monde de la santé a été marqué par une augmentation inquiétante du nombre de bactéries pathogènes multirésistantes aux antibiotiques

et par l'émergence de nouveaux agents pathogènes en particulier, encore plus dans les pays en voie de développement (Boughachiche *et al.*, 2005). Ceci a mené parfois à un blocage thérapeutique (Katsumi *et al.*, 2003; Sekhsokh *et al.*, 2008) des traitements des infections respiratoires, digestives et urinaires, et des infections de la peau et des tissus mous, ainsi que de certaines maladies sexuellement transmissibles et des méningites (O.M.S., 2003).

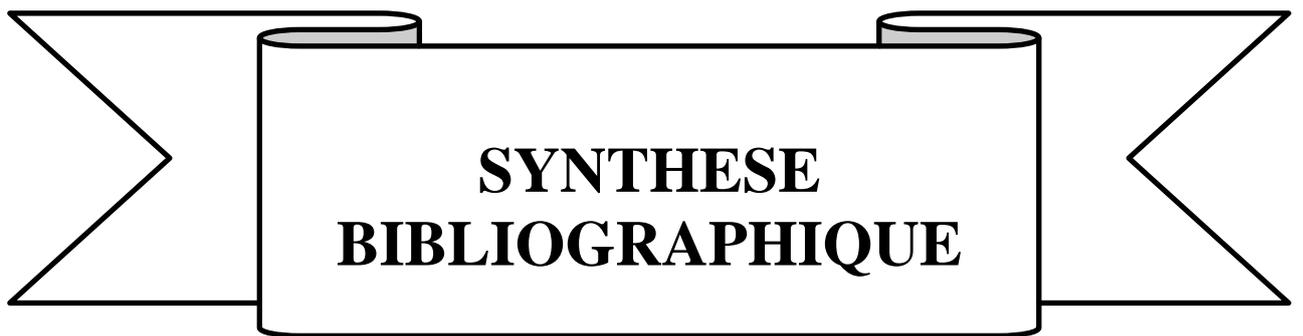
La dissémination des bactéries multirésistantes présente une nouvelle menace grave qui met en cause la validité de l'arsenal antibiotique actuellement disponible (Mkaouar *et al.*, 2008). Actuellement, plusieurs stratégies dans le monde ont été entreprises, dont celles qui reposent sur la recherche systématique de nouveaux antibiotiques naturels à partir d'organismes (Yang, 2008).

Le but de ce travail est de vérifier l'effet de la concentration de l'inoculum sur la zone d'inhibition de trois bactéries testées, à savoir *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Cette vérification permet d'ajuster la densité de l'inoculum, et de choisir judicieusement les concentrations à tester et de pratiquer une lecture correcte et interprétative.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à une présentation bibliographique, d'une part, sur la classification des antibiotiques, leur spectre et leur mode d'action, les microorganismes producteurs d'antibiotiques, le phénomène de résistance aux antibiotiques et les microorganismes résistants.

La seconde partie est consacrée à la présentation du matériel et des méthodes utilisés et la troisième partie, aux résultats obtenus et à leurs discussions.

# **CHAPITRE I**



## **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **I.- ANTIBIOTIQUES**

### **1. Généralités**

Les grands progrès réalisés dans le domaine de la chimiothérapie anti-infectieuse, depuis l'âge de la pénicilline jusqu'à celui des céphalosporines et des nouvelles quinolones, permet actuellement aux médecins de lutter d'une façon efficace contre la majorité des agents infectieux. À l'heure actuelle, plusieurs antibiotiques sont connus, mais leur utilisation croissante tend à entraîner des cas de résistance parfois alarmants, ce qui a exigé la poursuite des recherches dans ce domaine. De nos jours, des milliers d'antibiotiques sont découverts, dont seulement 2% sont utilisés dans les domaines médical, vétérinaire, agro-alimentaire et agricole (Thiele-Bruhn, 2003).

### **2.- Classification des antibiotiques**

Les antibiotiques constituent un groupe hétérogène de molécules biologiquement actives présentant différentes structures chimiques. Ils peuvent être classés selon plusieurs critères: la structure chimique, le mécanisme d'action, l'origine ou le spectre d'action (Berdy *et al.*, 1987; Bycroft, 1988; Yala *et al.*, 2001).

#### **2.1.- Classification selon la structure chimique**

En raison de leur structure chimique souvent complexe et de nature très variée, plusieurs classifications sont possibles pour les antibiotiques. Berdy *et al.* (1987) proposèrent un système de classification qui regroupe tous les antibiotiques. Ce système, est généralement le plus utilisé, fait apparaître neuf grandes familles chimiques présentées dans le Tableau 1.

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

Familles d'antibiotiques		Sous-familles	Exemples
1	Antibiotiques contenant des glucides et apparentés	Glucides purs	Nojirimycine.
		Aminoglycosides	Streptomycine, gentamicine, kanamycine.
		G-Glycosides et N-glycosides	Vancomycine, streptothricine.
		Glycolipides	Moenomycine.
2	Lactones macrocycliques	Macrolides	Spiramycine, érythromycine.
		Polyènes	Amphotéricine, nystatine, candicidine.
		Macrotétrolides	Tetranactine, nonactine.
		Macrolactames	Rifamycine.
3	Quinones et antibiotiques apparentés	Polycycliques accolés linéairement	Tétracyclines.
		Dérivés naphthoquinoniques	Anthracyclines.
		Dérivés benzoquinoniques	Mitomycine.
4	Acides aminés et peptides	Dérivés d'acides aminés	Cyclosérine, pénicilline, nocardicine.
		Homopeptides	Bacitracine, cyclosporine.
		Hétéropeptides	Aculéacine.
		Peptolides	Valinomycine.
5	Antibiotiques hétérocycliques contenant de l'azote	Hétérocycles non accolés	Caerulomycine, mildiomyce.
		Hétérocycles accolés	Phénazines, herbicidine.
6	Antibiotiques hétérocycliques contenant de l'oxygène	Polyéthers	Monensine, nigéricine.
7	Composés alicycliques	Dérivés du cycloalcane	Cycloheximide.
		Terpènes	Acide marasmique.
8	Antibiotiques aromatiques	Dérivés benzéniques	Chloramphénicol.
		Aromatiques accolés	Griséofulvine.
		Composés non benzéniques	Fusariocine.
9	Antibiotiques aliphatiques	Dérivés des alcanes	Élaiomycine.
		Dérivés d'acides carboxyliques	Cérolénine.
		Composés contenant du phosphore ou du soufre	Fosfomycine.

## 2.2.- Autres classifications

Les autres types de classifications sont utilisés surtout en médecine, en pharmacologie et en toxicologie. Ces classifications sont basées sur le spectre d'action, le type d'action, le mode d'action, l'origine de l'antibiotique ou sa charge électrique.

### 2.2.1.- Classification d'après le spectre d'action

On distingue 4 types de spectres d'action vis-à-vis des micro-organismes cibles présentées dans le Tableau 2.

**Tableau 2.** Classification des quelques antibiotiques selon leur spectre d'action.

Spectre très large	Spectre large	Spectre moyen	Spectre étroit ou très étroit
Tétracyclines, Chloramphénicol Céphalosporines	Streptomycine Rifampicine Fosfomycine	Pénicilline Lincomycine Novobiocine Erythromycine	Vancomycine: contre les bactéries (G +). Polymyxines: contre les bactéries (G -). Nystatine, amphotéricine B, cycloheximide: contre les champignons.

### 2.2.2.- Classification d'après leur type d'action

Selon leur type d'action, les antibiotiques sont classés en bactéricides et bactériostatiques (activité contre les bactéries) ou fongicides et fongistatiques (activités contre les champignons).

Pour les antibactériens on distingue deux types d'action:

- **bactériostatiques:** qui inhibent la croissance des bactéries (tétracyclines, chloramphénicol, érythromycine, lincomycine, etc.).
- **bactéricides:** qui tuent les bactéries en phase de croissance (pénicilline, céphalosporine), ou en phase de croissance et stationnaire (streptomycine et polymyxine, etc.).

Cette classification est importante par exemple dans le cas d'infections sévères chez les personnes immunodéprimées qui demandent un antibiotique de type bactéricide.

### 2.2.3.- Classification d'après leur origine.

Les antibiotiques sont sécrétés par divers organismes vivants (bactéries, champignons, algues, etc.), mais peuvent également être produits par des microorganismes hybrides (clonage de gènes), par hémisynthèse, ou par synthèse chimique:

- bacitracine et polymyxines par des bactéries non mycéliennes.
- pénicillines, céphalosporines et griséofulvine par des champignons.
- actinobactéries (actinomycètes): la majorité des antibiotiques, sécrétés surtout par le genre *Streptomyces*.

Plusieurs molécules actives peuvent être produites par une même souche de microorganisme et inversement des souches appartenant à des espèces différentes peuvent produire le même antibiotique. D'autres molécules actives, comme par exemples les huiles essentielles, sont également obtenues des plantes.

### 2.2.4.- Classification d'après leur mode d'action

Il existe généralement quatre niveaux cibles dans la cellule microbienne:

- Les antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne.
- Les antibiotiques actifs sur la membrane plasmique. Les polyènes antifongiques agissent sur la membrane plasmique des cellules eucaryotes par complexation avec les stérols.
- Les antibiotiques actifs sur les acides nucléiques.
- Les antibiotiques actifs sur la synthèse protéique.

Les exemples de ces antibiotiques sont cités ci-dessous (tableau 3).

### 2.2.5.- Classification d'après leur charge électrique

Les antibiotiques peuvent être à caractère neutre (ex.: steffimicines, mutactimycines), acide (ex: pénicilline, céphalosporine, novobiocine et fosfomycine.) ou basique (ex.: la majorité des macrolides, aminosides, rifamycines, érythromycine, polymyxines)

## 3.- Mode d'action des antibiotiques

Le mode d'action d'un antibiotique est en relation avec sa structure chimique. En général, à chaque classe d'antibiotique est associé un site d'action dans la cellule microbienne. Ce site peut être la paroi cellulaire, la membrane plasmique, les ribosomes ou les composants génétiques. Le tableau 3, résume les principales familles d'antibiotiques et leurs cibles et spectre d'action.

**Tableau 3.** Principales familles d'antibiotiques et cibles cellulaires.

Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi	Antibiotiques altérant la membrane plasmique	Antibiotiques inhibant la synthèse protéique	Antibiotiques inhibant la synthèse des acides nucléiques
$\beta$ -lactamines, glycopeptides, fosfomycine.	Polymyxines, tyrothricine, polyènes.	Macrolides, tétracyclines, aminosides, chloramphénicol.	Rifampicine

## 4.- Microorganismes producteurs d'antibiotiques

### 4.1.- Bactéries non mycéliennes et les champignons

Les bactéries non mycéliennes produisent environ 13% des antibiotiques d'origine microbienne, dont 8% sont sécrétés par les *Bacillaceae*, 2,3% par les *Pseudomonadaceae* et 2,7% par d'autres bactéries appartenant à des genres très divers tels que *Micrococcus*, *Chromobacterium*, *Proteus*, etc. (Breton *et al.*, 1989).

Parmi les champignons producteurs, nous citerons les genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* et *Coleophoma* (champignons imparfaits, ascomycètes) et aussi certains

basidiomycètes et zygomycètes (Laskin et Lechevalier, 1984; Barrett, 2002). Les antibiotiques sécrétés les plus connus sont la pénicilline, la céphalosporine, l'acide fusidique et la griséofulvine.

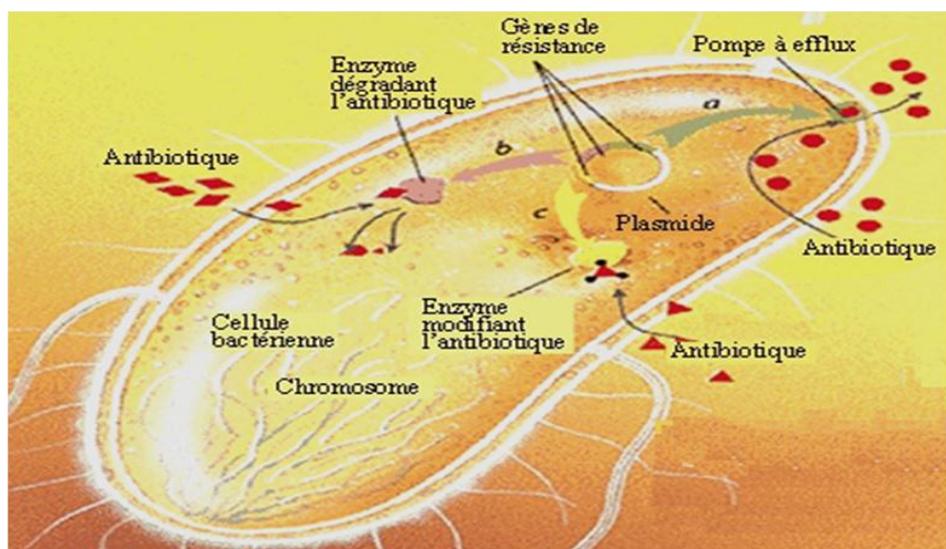
En fait, le nombre d'antibiotiques commercialisés d'origine fongique est faible, les plus importants étant les  $\beta$ -lactamines (pénicillines et céphalosporines).

#### 4.2.- Actinobactéries

Les actinobactéries constituent la principale source d'antibiotiques, avec près de 64% des molécules d'origine microbienne (Lazzarini *et al.*, 2000; Watve *et al.*, 2001). Les *Streptomyces* sont à l'origine de la majorité avec plus de 50% du total des antibiotiques connus et près de 80% de ceux sécrétés par les actinomycètes. Environ 10% des antibiotiques sont produits par les souches de *Micromonospora* et de *Nocardia*, tandis que les 10% restants le sont par les autres genres rares: *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Streptosporangium*, *Saccharopolyspora*, *Nocardiopsis*, *Saccharothrix*, etc. (Breton *et al.*, 1989). Parmi les molécules élaborées par les actinomycètes, seuls 20% sont des antifongiques, les 80% restantes ont des activités biologiques diverses: antibactériennes (surtout), antivirales, antitumorales, antiprotozoaires, insecticides, etc. (Sanglier *et al.*, 1993).

#### 5.- Phénomène de résistance aux antibiotiques

Les bactéries peuvent résister aux antibiotiques par plusieurs mécanismes. Quelques espèces bactériennes sont résistantes d'une manière naturelle, à une ou plusieurs classes d'antibiotiques (Tenover, 2006). La résistance bactérienne aux antibiotiques se caractérise par son caractère naturel ou acquis (Yala *et al.*, 2001). En général, cette résistance aux antibiotiques se manifeste selon trois modalités (figure 1):



**Figure 1.** Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries (Fred, 2006).

### 5.1.- Production d'enzymes inactivant les antibiotiques

Plusieurs bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* produisent des enzymes inactivant les antibiotiques, telles que *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* et *Salmonella enterica* qui présentent une résistance naturelle aux aminopénicillines (ampicilline-amoxicilline) et aux carboxypénicillines. Cette résistance est due à une pénicillinase constitutive (Cattoir, 2004). D'autres bactéries à Gram négatif telles *Enterobacter*, *Proteus* et *Serratia*, présentent une résistance aux aminopénicillines et aux céphalosporines de 1ère génération, mais sont sensibles aux carboxypénicillines. Cette résistance est due à une céphalosporinase chromosomique (Yala *et al.*, 2001).

Les bêta-lactamases représentent le mécanisme essentiel de la résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines, par un clivage dans le cycle  $\beta$ -lactame. La synthèse d'une ou de plusieurs  $\beta$ -lactamases représente le mécanisme le plus efficace utilisé par les bactéries pour échapper à l'action létale des  $\beta$ -lactamines (Bush, 1999; Handal et Olsen, 2000; Alekshun et Levy, 2007). Elles sont produites par quelques bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Roberts, 1998; Alekshun, 2007). Les bêta-lactamases peuvent être regroupées en 3 catégories:

- 1- Les pénicillinases actives sur la pénicilline G, l'ampicilline et la carbénicilline.
- 2- Les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) actives sur les pénicillines et les céphalosporines y compris celles de troisième génération.
- 3- Les bêta-lactamases résistantes aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (Villalobos et Struelens, 2006).

### 5.2.- Modification de la cible des antibiotiques

Ce type de mécanisme est souvent utilisé chez *Staphylococcus aureus* et les staphylocoques à coagulase comme un mécanisme de résistance intrinsèque par modification des protéines de liaison à la pénicilline (PLP) ou par acquisition de nouvelles PLP (Mainardi *et al.*, 1996; Quincampoix et Mainardi, 2001). La modification de la cible des quinolones implique une mutation au niveau des gènes chromosomiques *grlA* ou *grlB* de la topoisomérase IV (Roberts, 1999; Quincampoix et Mainardi, 2001). La modification de la cible par les macrolides se fait par une méthylase codée par des gènes spécifiques (Portillo *et al.*, 2000). La résistance aux aminoglycosides chez les bactéries à Gram négatif et à Gram positif se fait par la modification de la cible qui est le mécanisme le plus répandu. Les enzymes impliquées sont les aminosides acétyltransférases (AAC), et les aminosides phosphotransférases (APH) (Kamp *et al.*, 1997).

### 5.3.- Pompes d'efflux

Les bactéries peuvent résister aux antibiotiques par une exportation active grâce à des transporteurs membranaires appelés pompes d'efflux. Ces protéines sont spécifiques d'une classe d'antibiotiques ou de plusieurs classes d'antibiotiques (Poole, 2004). Les gènes encodant les pompes d'efflux spécifiques sont souvent retrouvés sur des éléments génétiques mobiles (plasmides ou transposons), ou sur le chromosome (Butaye *et al.*, 2003; Poole, 2004). Chez les bactéries à Gram positif, le système d'efflux n'est constitué que par le transporteur alors que chez les bactéries à Gram négatif, c'est généralement un complexe protéique tripartite (Zgurskaya, 2002).

Les bactéries utilisent les pompes d'efflux pour se protéger des effets de nombreuses toxines de l'environnement (pesticides, métaux lourds, sels biliaires, solvants organiques, antiseptiques, etc.) et c'est ce rôle de détoxification qui a surtout été mis en évidence. Cependant, les transporteurs ont aussi un autre rôle physiologique caractérisé par l'élimination des déchets métaboliques endogènes ou de sécrétion de produits cellulaires. Ils peuvent servir à l'exportation des toxines bactériennes ou encore de molécules nécessaires au pouvoir invasif du germe des bactéries pathogènes (Cattoir, 2004). La pompe d'efflux utilisée pour la résistance aux tétracyclines, aux macrolides et au chloramphénicol fonctionne comme un transporteur d'antibiotiques spécifiques qui permet de pomper l'antibiotique hors de la cellule ou de la membrane cellulaire (Fluit *et al.*, 2000).

## 6.- Microorganismes résistants aux antibiotiques

### 6.1.- Microorganismes résistants à Gram positif

Les coques à Gram positif se caractérisent par la capacité d'évolution de leurs phénotypes de résistance aux antibiotiques, ainsi que par leur grande faculté d'acquisition de nouveaux mécanismes de résistance, que ce soit par l'intermédiaire de transferts de matériel génétique au sein d'une même espèce bactérienne ou entre espèces différentes (Quincampoix et Mainardi, 2001).

#### 6.1.1- *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif qui tendent à se grouper en amas irrégulier à la façon d'une grappe de raisin (Avril, 2000). *Staphylococcus aureus* est un germe aérobic-anaérobie facultatif, doit son nom d'espèce à l'aspect pigmenté de ses colonies. Il tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales, possède une coagulase, ce qui le distingue de la plupart des autres espèces de staphylocoques (Roberts, 1998). *S. aureus* est un coque pyogénique qui colonise la peau et les membranes muqueuses. Entre 20 à 30% des individus portent *S. aureus* dans les narines antérieures (Roberts, 1998). Cette espèce est responsable des infections de la peau et des tissus (furuncles, endocardite, abcès rénaux, etc.). Beaucoup de ces

souches sécrètent également des toxines et sont responsables d'intoxications alimentaires (Roberts, 1998).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines chez les staphylocoques repose sur deux grands types de mécanismes: un mécanisme de résistance extrinsèque par production d'enzymes inactivant l'antibiotique et un mécanisme de résistance intrinsèque par modification des protéines de liaison à la pénicilline (PLP) ou par acquisition de nouvelles PLP. Cette PLP additionnelle a moins d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines (Fluit *et al.*, 2001).

### **6.1.2- *Streptococcus pneumoniae***

La résistance aux  $\beta$ -lactame par *S. pneumoniae* est due à la diminution de l'affinité pour les antibiotiques (Fluit *et al.*, 2001). Cependant cette espèce utilise le mécanisme d'efflux et aussi une méthylase pour résister aux Macrolides (Fluit *et al.*, 2001).

Le mécanisme de résistance aux fluoroquinolones, macrolides et lincosamides repose sur différents mécanismes: modification enzymatique de la cible et pompe à efflux des antibiotiques (Fluit *et al.*, 2001).

### **6.1.3- Entérocoques**

Les entérocoques peuvent être pathogènes, provoquant des endocardites, des infections urinaires et sanguines, etc (Fluit *et al.*, 2001). Ils sont également responsables des infections nosocomiales particulièrement chez les personnes diabétiques, immunodéprimés, etc. Pendant la dernière décennie, une augmentation dramatique de la résistance à niveau élevé envers les aminoglycosides (vancomycine, gentamicine) a été signalée. Cette résistance a été expliquée par l'utilisation abusive de la vancomycine dans le traitement des entérocolites et à usage vétérinaire (Fluit *et al.*, 2001; Aggoune *et al.*, 2008).

## **6. 2- Microorganismes résistants à Gram négatif**

### **6.2.1- *Pseudomonas aeruginosa***

Les *Pseudomonas* sont aérobies stricts, oxydase positif, mobiles, produisant souvent des pigments diffusibles et naturellement résistants à de très nombreux antibiotiques, saprophytes et on les trouve essentiellement dans l'eau. Ils peuvent contaminer des solutés pour perfusion, des solutions antiseptiques, des préparations médicamenteuses liquides.

L'espèce principale, *Pseudomonas aeruginosa* (ou bacille pyocyanique), a les caractères suivants : protéolytique, production d'une exotoxine nécrosante par certaines souches, production de deux pigments : la pyocyanine (pigment bleu), qui est spécifique de *P. aeruginosa*, et la pyoverdine ou fluorescéine qui est présente chez d'autres *Pseudomonas*.

C'est une bactérie pathogène opportuniste capable d'infecter de nombreuses espèces animale dont l'homme. Elle provoque de plusieurs pathologies en particulier chez les patients immunodéprimés (diabète, cancer, sida, etc.). Elle est la plus fréquemment responsable de pneumonies nosocomiales après *Staphylococcus aureus*. Cette bactérie peut causer des pneumonies chroniques. Ainsi, *P. aeruginosa* est caractérisé par une aptitude particulière à l'acquisition de mécanismes de résistance pouvant conduire à une impasse thérapeutique avec une grande capacité d'adaptation à l'environnement (Tenover, 2006). Cette espèce, opportuniste majeur, exprime son potentiel pathogène lorsqu'il est introduit dans des zones aux défenses immunitaires diminuées.

#### **6.2.2- *Acinetobacter baumannii***

C'est une espèce pathogène opportuniste qui peut être responsable d'infections nosocomiales sévères malgré sa faible virulence, en particulier chez les patients immunodéprimés. Cette espèce produit naturellement des  $\beta$ -lactamases de type céphalosporinase et oxacillinase (Poirel et Nordmann, 2006).

#### **6.2.3.- *Enterobacteriaceae***

Les *Enterobacteriaceae* sont responsables d'importantes infections digestives, urinaires, respiratoires et sanguines. Beaucoup d'espèces d'*Enterobacteriaceae* possèdent une résistance à un niveau élevé aux antibiotiques par leurs changements génétiques (Paterson, 2006).

Le groupe *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, dit K.E.S, sont rassemblés dans des enterobacteriaceae qui ont en commun les caractères suivants : ce sont des bactéries pathogènes, la réaction de Voges-Proskauer (VP) est généralement positive et sont souvent multi-résistantes aux antibiotiques (Avril, 2000).

##### **6.2.3.1- *Salmonella***

Les salmonelles (*Salmonella enterica* et *S. bongori*) sont des bactéries responsables de fièvres typhoïdes et de salmonelloses non typhiques qui représentent une cause majeure de diarrhées dans le monde, avec un taux important de mortalité infantile. La résistance au chloramphénicol, aux fluoroquinolones et à l'ampicilline est portée par un plasmide ou des plasmides multirésistants. Le traitement des infections aux salmonelles repose sur l'utilisation de l'amoxicilline et surtout du chloramphénicol (Dagnra *et al.*, 2007).

### 5.2.3.2- *Escherichia coli*

C'est l'espèce dominante de la flore aérobie du tube digestif. *Escherichia coli* est habituellement une bactérie commensale. Elle peut devenir pathogène si les défenses de l'hôte se trouvent affaiblies ou si elle acquiert des facteurs de virulence particuliers (Nauciel, 2000). Elle est la principale espèce bactérienne impliquée dans les infections digestifs et urinaires (Tagajdid *et al.*, 2008). Les seuls mécanismes de résistance aux quinolones connus sont d'origine plasmidique (Nordmann et Mammeri, 2007; Skurnik et Andremont, 2007). Les souches de *E.coli* peuvent produire des  $\beta$ -lactamases qui hydrolysent et inactivent les aminopénicillines, tels que l'amoxicilline ou l'ampicilline, et les céphalosporines à spectre étroit (Rupp et Fey, 2003; Landgren *et al.*, 2005). Certaines souches de *E. coli* développent d'autres mécanismes comme la diminution ou l'élimination des autres  $\beta$ -lactamines à travers la membrane plasmique. Les fluoroquinolones et les  $\beta$ -lactamines sont des molécules de choix pour traiter l'infection du tractus urinaire due à *E. coli* (Tenover, 2006).

### 6.2.3.3.- *Klebsiella pneumoniae*

C'est une bactérie pathogène importante qui cause des pneumonies, mais aussi des infections des appareils urinaire et intra-abdominal. Elle est impliquée dans des infections nosocomiales de la circulation sanguine, tout comme *E. coli* (Podschun et Ullmann, 1998). La résistance de bas niveau aux carboxypénicillines est due à la production de pénicillinases chromosomiques et celle à niveau élevé de pénicilline est liée à la production de  $\beta$ -lactamases codées par un gène acquis plasmidique (Tumbarello *et al.*, 2006; Maltezou, 2008). La résistance de *K. pneumoniae* peut se développer aux  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) et à d'autres classes d'antibiotiques comme les quinolones, les aminosides, les macrolides, les tétracyclines et les phénicolés (Ben Achour *et al.*, 2009).

## II. ANTIBIOGRAMME

### 1.- But de l'antibiogramme

Un antibiogramme permet de tester sur milieu de culture, l'action de molécules antibiotiques sur une souche bactérienne. Il donnera donc des indications sur l'efficacité *in vitro* de ces antibiotiques. Le choix de l'antibiotique est réalisé de manière très empirique dans la plupart des infections banales débutantes; le médecin prescrit, en fonction de l'examen clinique, la molécule dont l'efficacité lui paraît la plus probable (antibiothérapie dite probabiliste). Ce n'est que dans les infections graves, récidivantes ou les échecs thérapeutiques que l'on fait appel au laboratoire qui réalisera une culture et un antibiogramme (Anonyme 1).

## 2.- Définitions de CMI et CMB

Deux notions sont à connaître avant de faire un antibiogramme :

- La CMI ou Concentration Minimale Inhibitrice. Il s'agit de la concentration de l'antibiotique la plus faible pour laquelle la croissance bactérienne est inhibée (pas de croissance de la population).
- La CMB ou Concentration Minimale Bactéricide. C'est la concentration de l'antibiotique la plus faible permettant de détruire 99,99% des bactéries présentes au départ (soit une bactérie survivante sur 10000). Si  $CMB < 5 CMI$  l'antibiotique est très efficace. Au contraire si  $CMB > 10 CMI$ , on le considère peu efficace. La mesure de la CMI permet de déterminer si une souche est sensible ou résistante à l'antibiotique testé. Pour chaque antibiotique, on a pu mesurer les concentrations sériques obtenues chez le patient (humain) dans le cadre d'une posologie normale. on distingue alors :
  - la souche est dite **RESISTANTE** : la CMI ne peut être atteinte par un traitement réalisé à l'aide de cet antibiotique sans être toxique pour l'animal.
  - la souche est dite **SENSIBLE** : la CMI peut être atteinte par un traitement usuel réalisé à l'aide de cet antibiotique .
  - La souche est dite **INTERMEDIARE** : la CMI ne peut être atteinte qu'en augmentant les doses (Freney *et al.*, 2007).

## 3.- Interaction entre antibiotiques

Outre le fait que certaines molécules inhibent ou au contraire exacerbent l'effet des antibiotiques (acide, sucre, thymine, etc.), les différents antibiotiques peuvent interagir entre eux. Trois grands types d'interactions peuvent être définis :

- **La synergie** : chaque antibiotique voit son action augmentée par l'autre.
- **L'antagonisme** : les effets des deux antibiotiques se contrarient
- **L'indifférence** : que l'on utilise chaque antibiotique séparément ou en association, le résultat est le même (Anonyme 1)

## 4.- Antibiogramme en milieu gélosé : méthode des disques

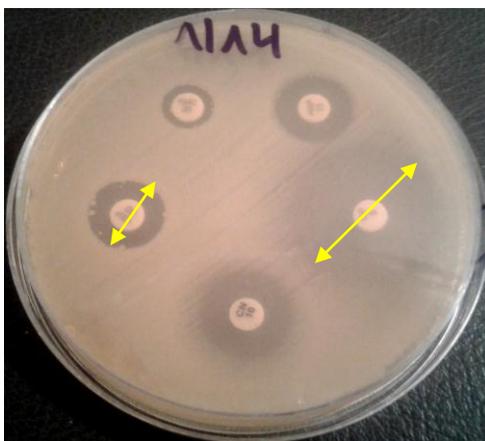
### 4.1.- Principe général

Pour réaliser l'antibiogramme par le méthode des disques, la culture bactérienne est ensemencée à la surface d'une gélose spécialement étudiée, la gélose de Mueller-Hinton (éventuellement additionnée de sang). Des disques pré-imprégnés d'une dose connue d'antibiotique sont déposés à la surface de la gélose. L'antibiotique diffuse à partir du disque en créant un gradient

de concentration. La détermination du diamètre de la zone d'inhibition permet une estimation de la concentration minimale inhibitrice. Les caractères de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne en seront déduits (SFM, 2010).

#### **4.2.- Technique de l'antibiogramme**

En pratique, on réalise à partir de l'isolement (c'est-à-dire une souche pure), et un ensemencement en tapis sur le milieu de culture. On dispose ensuite les disques d'antibiotiques et on place les boîtes de Petri à l'incubateur. Au bout de 24 h, on lit les différents diamètres d'inhibition (Figure 2 et Tableaux 4, 5, 6 et 7), recommandé par l'OMS et la Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (SFM, 2010).



**Figure 2.** Exemple de gélose avec des disques d'antibiotiques et une souche bactérienne ayant une sensibilité variable aux antibiotiques testés (Photo Originale)

**Tableau 4.** Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour une Entérobactérie : *Escherichia coli* ATCC25922 (Rahal *et al.*, 2005).

Antibiotiques testés	Charge des Disques (µg)	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)	
		Résistant	Intermédiaire	Sensible	Résistant	Sensible
<b>β-lactamines:</b> Ampicilline	10	≤ 13	14–16	≥17	≥32	≤ 8
Amoxicilline +Ac.clavulanique	20/10	≤ 13	14–17	≥18	≥32/16	≤ 8/4
Céfalotine	30	≤12	13-17	≥18	≥32	≤ 8
Cefazoline	30	≤ 14	15–17	≥18	≥32	≤ 8
Cefoxitine	30	≤ 14	15–17	≥18	≥32	≤ 8
Cefotaxime	30	≤ 14	15–22	≥23	≥64	≤ 8
Ceftriaxone	30	≤ 13	14 - 20	≥21	≥64	≤ 8
Imipeneme	10	≤ 13	14 -15	≥16	≥16	≤ 4
<b>Aminosides</b> Amikacine	30	≤ 14	15–16	≥17	≥32	≤ 16
Gentamicine	10	≤ 12	13–14	≥15	≥8	≤ 4
<b>Quinolones</b> Ofloxacin	5	≤ 12	13–15	≥16	≥8	≤ 2
Ciprofloxacine	5	≤ 15	16–20	≥21	≥4	≤ 1
<b>Autres</b> Chloramphenicol	30	≤ 12	13–17	≥18	≥32	≤ 8
Furanes	300	≤ 14	15–16	≥17	≥128	≤ 32
Fosfomycine	200	≤ 12	13–15	≥16	≥256	≤ 64
Trimethoprime /Sulfamethoxazole	1,25/23,75	≤ 10	11 - 15	≥16	≥8/152	≤ 2/38

**Tableau 5.** Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter sp* (Rahal et al., 2005).

Antibiotiques testés	Charge des Disques (µg)	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques(µg/ml)	
		Résistant	Intermédiaire	Sensible	Résistant	Sensible
<b>β-lactamines: Ticarcilline:</b>	75					
P.aeruginosa		≤14	-	≥15	≥128	≤64
Acinetobacter sp		≤14	15 - 19	≥20	≥128	≤16
<b>Ticarcilline+ac.clavulanique:</b>	75/10					
P.aeruginosa		≤14	-	≥15	≥128/2	≤64/2
Acinetobacter sp		≤14	15-19	≥20	≥128/2	≤16/2
<b>Piperacilline:</b>	100					
P.aeruginosa		≤17	-	≥18	≥128	≤64
Acinetobacter sp		≤17	18-20	≥21	≥128	≤16
<b>Ceftazidime</b>	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8
<b>Aztreonam</b>	10	≤15	16-21	≥22	≥32	≤8
<b>Imipeneme</b>	10	≤13	14-15	≥16	≥16	≤4
<b>Aminosides Amikacine</b>	30	≤14	15-16	≥17	≥32	≤16
<b>Gentamicine</b>	10	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4
<b>Tobramycine</b>	10	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4
<b>Quinolones: Ciprofloxacine</b>	5	≤15	16-20	≥21	≥4	≤1
<b>Tetracyclines: Tetracycline</b>	30	≤14	15-18	≥19	≥16	≤4
<b>Autres: Trimethoprime/Sulfamethoxazole</b>	1,25/23,75	≤10	11-15	≥16	≥8/152	≤2/38
<b>Chloramphenicol</b>	30	≤12	13-17	≥18	≥32	≤8
<b>Rifampicine</b>	30	≤14	14-18	≥19	≥16	≤4
<b>Fosfomycine</b>	50	<14	-	>14	≥32	≤32

**Tableau 6.** Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI *Staphylococcus* sp (Rahal *et al.*, 2005).

Antibiotiques testés	Charge des Disques (µg)	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques(µg/ml)	
		Résistant	Intermédiaire	Sensible	Résistant	Sensible
<b>β-lactamines:</b> Penicilline	10 UI	≤28	-	≥29	β-lactamase	≤0,1
Oxacilline	1					
<i>S.aureus</i>		≤10	11-12	≥13	≥4	≤2
Staphylocoque à coagulase négative		≤17	-	≥18	≥0,5	≤0,25
Cefoxitine	30					
<i>S.aureus S.lugdunensis</i>		≤19	-	≥20	≥4	≤2
Staphylocoque à coagulase négative		≤24	-	≥25	≥0,5	≤0,25
<b>Aminosides</b> Gentamicine	10	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4
Amikacine	30	≤14	15-16	≥17	≥32	≤16
<b>Macrolides:</b> Erythromycine	15	≤13	14-22	≥23	≥8	≤0,5
Clindamycine	2	≤14	15-20	≥21	≥4	≤0,5
<b>Glycopeptides:</b> Vancomycine	30	-	-	≥15	-	≤4
Teicoplanine	30	≤10	11-13	≥14	≥32	≤8
<b>Quinolones</b> Ofloxacine	5	≤14	15-17	≥18	≥4	≤1
<b>Autres:</b> Trimethoprime/sulfamethoxazole	1,25/23,75	≤10	11-15	≥16	≥8/152	≤2/38
Rifampicine	15	≤16	17-19	≥20	≥4	≤1
Tetracycline	30	≤14	15-18	≥19	≥16	≤4
Chloramphenicol	30	≤12	13-17	≥18	≥32	≤8
Fosfomycine	50	<14	-	>14	≥32	≤32

**Tableau 7.** Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI *Enterococcus sp* (Rahal *et al.*, 2005).

Antibiotiques testés	Charge des Disques (µg)	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques(µg/ml)	
		Résistant	Intermédiaire	Sensible	Résistant	Sensible
<b>β-lactamines:</b> Ampicilline	10	≤16	-	≥17	≥16	≤8
<b>Cyclines:</b> Tétracycline	30	≤14	15-18	≥19	≥16	≤4
<b>Glycopeptides:</b> Vancomycine	30	≤14	15-16	≥17	≥32	≤4
Teicoplanine	30	≤10	11-13	≥14	≥32	≤8
<b>Aminosides:</b> GentamicineHN	120	≤6	7-9	≥10	>500	≤500
StreptomycineHN	300	≤6	7-9	≥10	-	-
<b>Fuoroquinolones:</b> Levofloxacin	5	≤13	14-16	≥17	≥8	≤2
<b>Autres:</b> Erythromycine	15	≤13	14-22	≥23	≥8	≤0,5
Furanes	300	≤14	15-16	≥17	≥128	≤32
Clindamycine	2 UI	<14	-	>14	>2	≤2

#### 4.3.- Lecture interprétative de l'antibiogramme

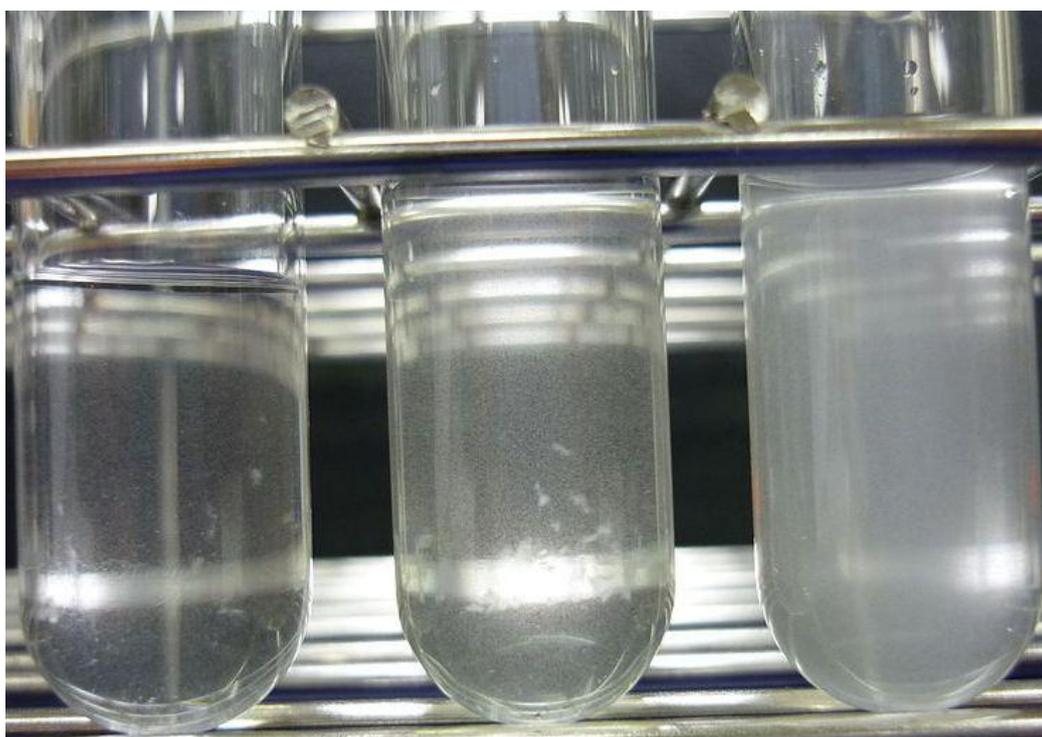
La lecture interprétative de l'antibiogramme est fondée sur la connaissance des phénotypes de résistance. Elle a pour principal but de transformer un résultat catégorisé "sensible" en un résultat "intermédiaire" ou "résistant" en raison d'un risque d'échec thérapeutique. La lecture interprétative nécessite une identification correcte de la souche et une méthode d'antibiogramme parfaitement standardisée. La mise en évidence de phénotypes de résistance hautement improbables compte tenu de l'identification de la souche doit conduire à vérifier l'identification bactérienne, à contrôler la pureté de l'inoculum et à contrôler également la technique de l'antibiogramme (SFM, 2003).

#### 4.4.- Standardisation de l'antibiogramme

La fiabilité des résultats d'un antibiogramme est influencée par de nombreux paramètres qui doivent être rigoureusement contrôlés. La standardisation est régie par des documents émanant de l'O.M.S. et des divers comités nationaux (pour la France par exemple, c'est le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie). Selon les pays, il peut exister des variations techniques et il est important de respecter une technique identique à celle utilisée pour

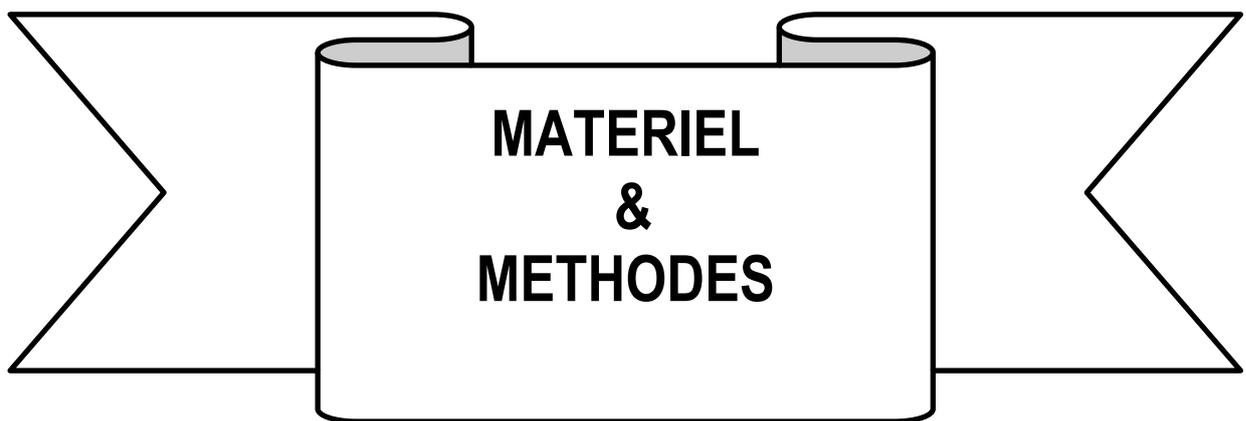
l'établissement des courbes de concordance. Parmi les principales recommandations, on peut citer les points suivants :

- ❖ Le milieu de culture doit permettre la croissance de nombreuses bactéries et il ne doit pas contenir d'inhibiteurs des antibiotiques. Le milieu retenu pour la majorité des espèces bactériennes est celui de Mueller-Hinton.
- ❖ Le pH influence l'activité de plusieurs antibiotiques (les aminosides et les macrolides sont plus actifs en milieu alcalin, alors que les tétracyclines sont plus actives en milieu acide) et il doit être compris entre 7,2 et 7,4 (valeur qui permet une bonne croissance bactérienne et qui réalise un compromis pour l'activité des antibiotiques).
- ❖ Pour les méthodes de diffusion, la source d'antibiotique est en fait constituée par le disque et le cylindre de gélose sous-jacente. L'épaisseur de la gélose va donc conditionner la concentration de la source d'antibiotique et elle doit être de 4 mm.
- ❖ Les antibiotiques, ainsi que les disques doivent être standardisés. Cette standardisation est effectuée par les fabricants et le laboratoire a pour unique responsabilité de stocker les disques dans des conditions optimales et de ne pas utiliser des disques périmés. Avant utilisation, les disques doivent être amenés à température ambiante.
- ❖ La densité de l'inoculum bactérien est un élément primordial et elle doit être ajustée à l'aide d'un spectrophotomètre ou par comparaison avec un étalon d'opacité, c'est-à-dire l'échelle de McFarland) (SFM, 2003); comme indiqué dans la Figure 3.



**Figure 3.** La turbidité qui correspond aux McFarland standards No : 0.5, 1 et 2 (URL 4).

## **CHAPITRE II :**



## **I. MATERIEL DU LABORATOIRE**

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

### **1.- Appareillage**

Autoclave, étuve (Nüve EN 400), spectrophotomètre (Dialab DTN-410) et Bain-marie.

### **2.- Petit matériel**

Bec Bunsen, anse de platine, boîtes de Pétri, pipettes Pasteur, pince bactériologique, verreries (tube à vis, éprouvettes graduées), micropipettes réglables, disques d'antibiotiques, portoir, écouvillon, flacons à prélèvement thermostérile de 40 mL, règle graduée, seringues en plastique de 5 mL stériles.

### **3.- Produits chimiques**

Eau distillée, eau physiologique.

### **4.- Matériel biologique**

Pour le déroulement de notre travail, nous avons utilisé 3 souches bactériennes différentes de référence ATCC (*American type culture collection*) qui font parties de deux groupes de microorganismes : Gram positive (une seule souche) et Gram négative (deux souches). Ces trois souches ont été choisies car elles ont une croissance rapide (moins de 24 heures) à 37°C et sont fréquemment isolées des échantillons cliniques (Tableau 8).

**Tableau 8.** Description des souches utilisé (Beddou, 2015; Grosjean, *et al.*, 2011).

Germe	Souche	Référence	Habitat préférentiel	Infections hospitalières
Bacille Gram -	<i>Escherichia coli</i>	25922 (ATCC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eaux usées</li> <li>• Matière fécales</li> <li>• Aliments contaminés</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infections respiratoires</li> <li>• Infections urinaires</li> <li>• Plaies septicémies</li> </ul>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853 (ATCC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sol, eau, plantes</li> <li>• Voies respiratoires</li> <li>• Matières fécales</li> <li>• Appareils sanitaires</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infections pulmonaires et urinaires</li> <li>• Brûlures</li> <li>• Plaies septicémies</li> </ul>
Cocci Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923 (ATCC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peau, cheveux</li> <li>• Nasopharynx</li> <li>• Périnée</li> <li>• Poussières, air</li> <li>• Aliments contaminé</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infections cutanées, plaies, abcès</li> <li>• Ostéites, ostéomyélites</li> <li>• Infections pulmonaires</li> <li>• Intoxications alimentaires</li> </ul>

Les souches utilisées ont été fournies par le Laboratoire d'Analyses Médicales Ibn Rochd de Ghardaïa.

### 5.- Milieu de culture

Nous avons utilisé le milieu gélose Mueller Hinton (Figure 4), qui est un milieu d'isolement des Salmonelles et des Shigelles, bien que de nombreuses bactéries à Gram négatif et positif puissent se développer sur ce milieu 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.



**Figure 4.** Flacons contiens la gélose Mueller Hinton utilisé comme milieu de culture pour l'antibiogramme (Photo Originale).

## 6.- Repiquage des souches bactériennes

Les trois 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 (Figure 5).



**Figure 5.** Colonies d'*Escherichia coli* repiquées par la méthode des stries, incubées à 37 °C, durant 24 h (Photo Originale).

## II.- METHODES UTILISEES

Notre démarche expérimentale est résumée ci-dessous:

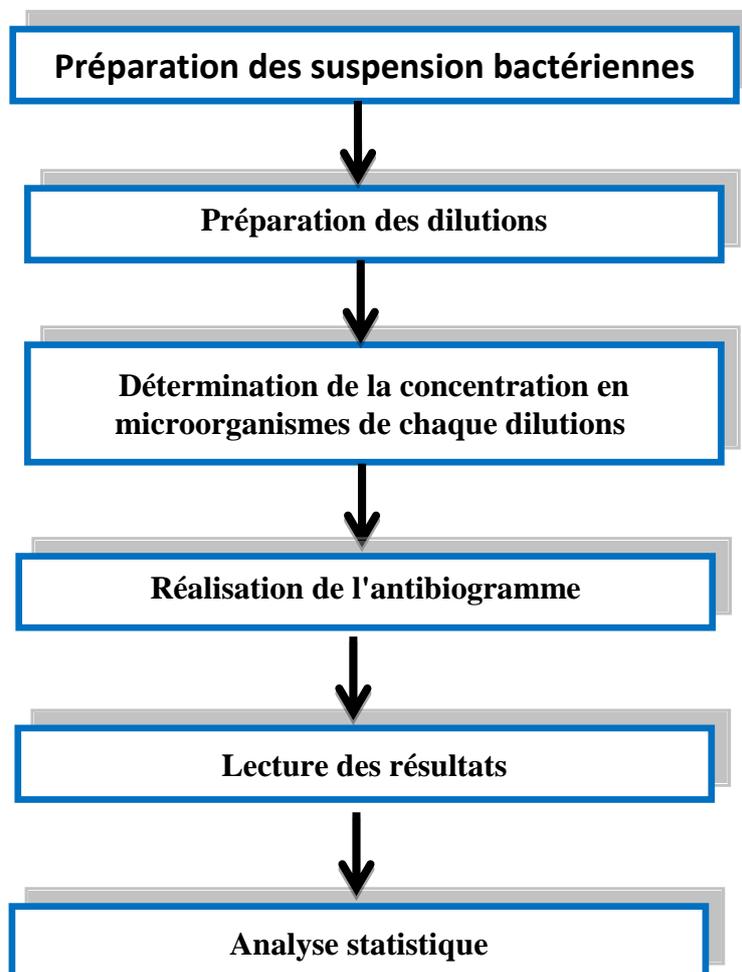
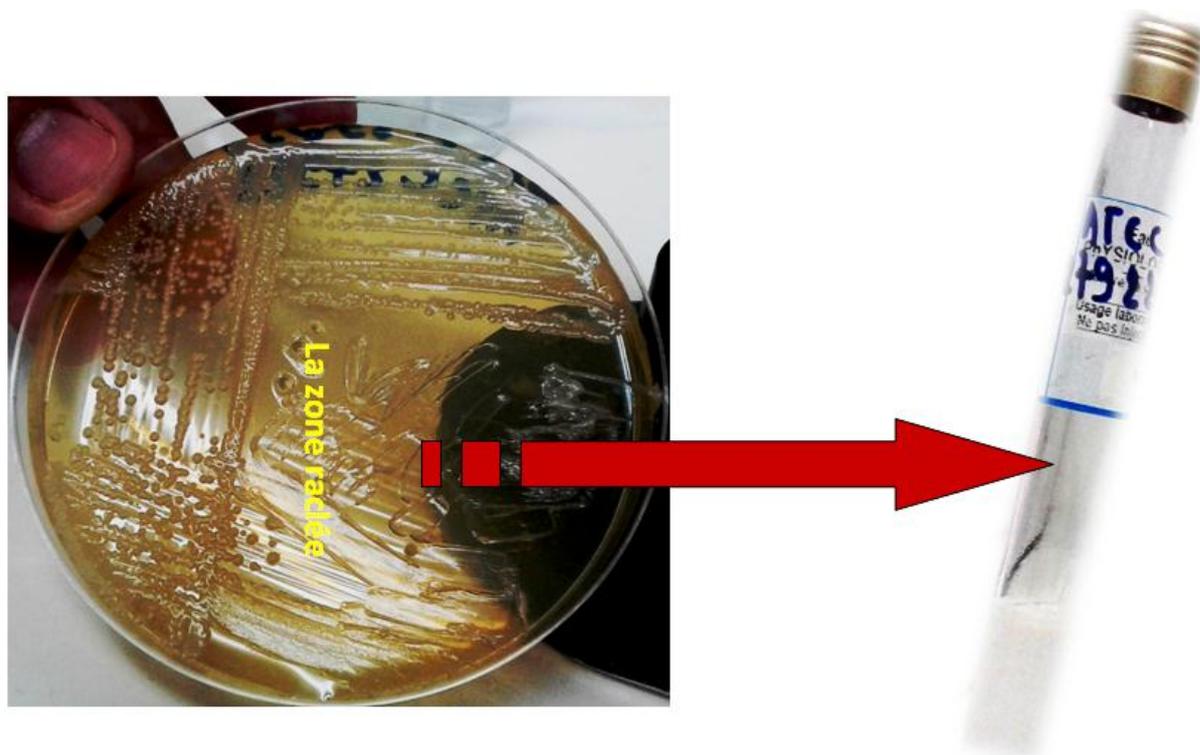


Figure 6. Etape de la démarche expérimentale.

### 1.- Antibiogramme par diffusion en milieu Mueller Hinton gélosé

#### 1.1.- Préparation de la solution mère et ajustement de l'inoculum

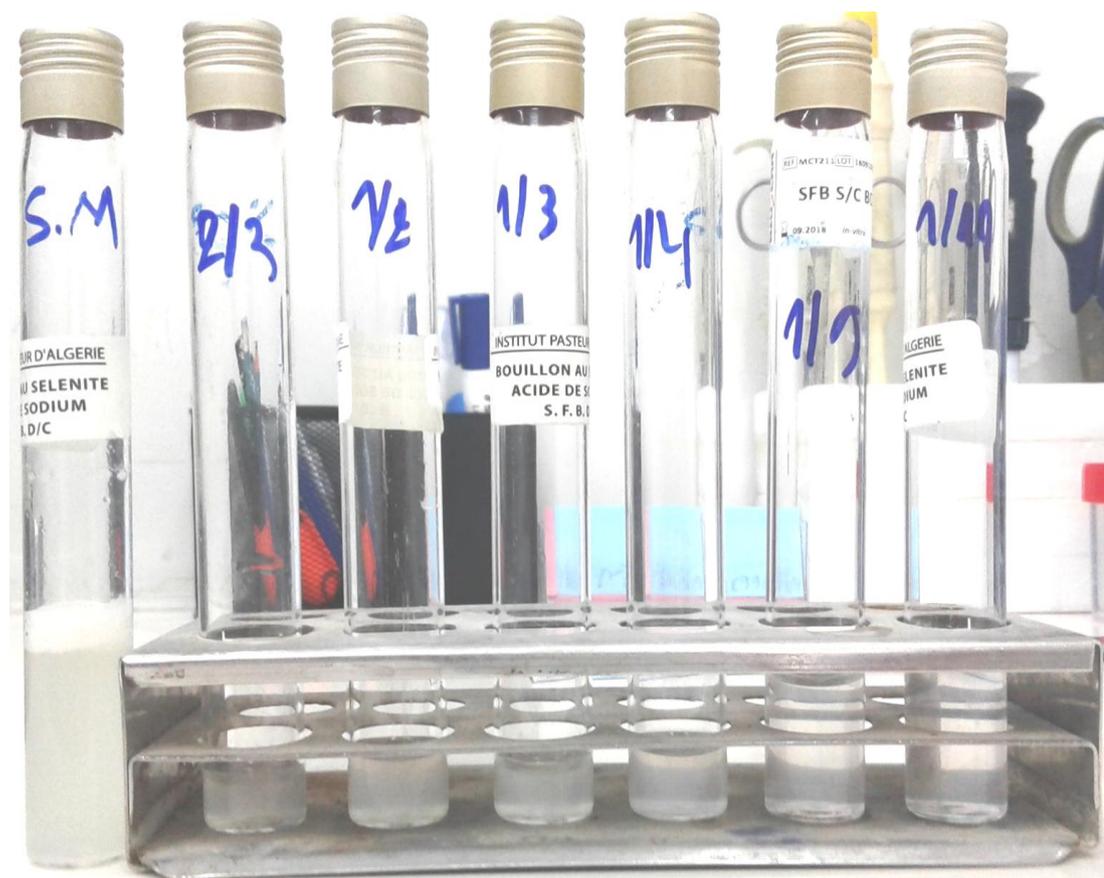
A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu Mueller Hinton solide, on fait racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies, visiblement bien isolées et parfaitement identiques. On décharge l'anse dans 20 mL d'eau physiologique stérile à 0,9% NaCl (Figure 7). On fait bien homogénéiser la suspension bactérienne (solution mère) avant de mesurer sa densité optique (Figure 9), son opacité doit être au maximum entre 0,9 et 1,0 (absorbance à 625 nm), l'inoculum est ajusté à cette valeur en ajoutant des colonies (si nécessaire).



**Figure 7.** Préparation de la solution mère a partir d'une culture pure d'*Escherichia coli* (Photo Originale).

## 1. 2.- Préparation des dilutions

A partir de chaque solution mère (suspension bactérienne) on prépare une gammes de dilution pour chaque souche dans des tubes à essais stérile et numérotés (Figure 8), par l'utilisation des volumes de la solution mère et des volumes de l'eau physiologiques selon une progression qui nous permet de déduire les dilutions qui correspondent au 0,4 0,5 1, 2, 3 et 4 McFarland par la comparaison avec les valeurs du Tableau 9 (et l'application de la règle de trois pour 0,4 McFarland car il y a un rapporte direct entre la dilution, la densité cellulaire et le McFarland). Il est a signaler que les dilutions sont re préparés avant chaque essai d'antibiogrammes.

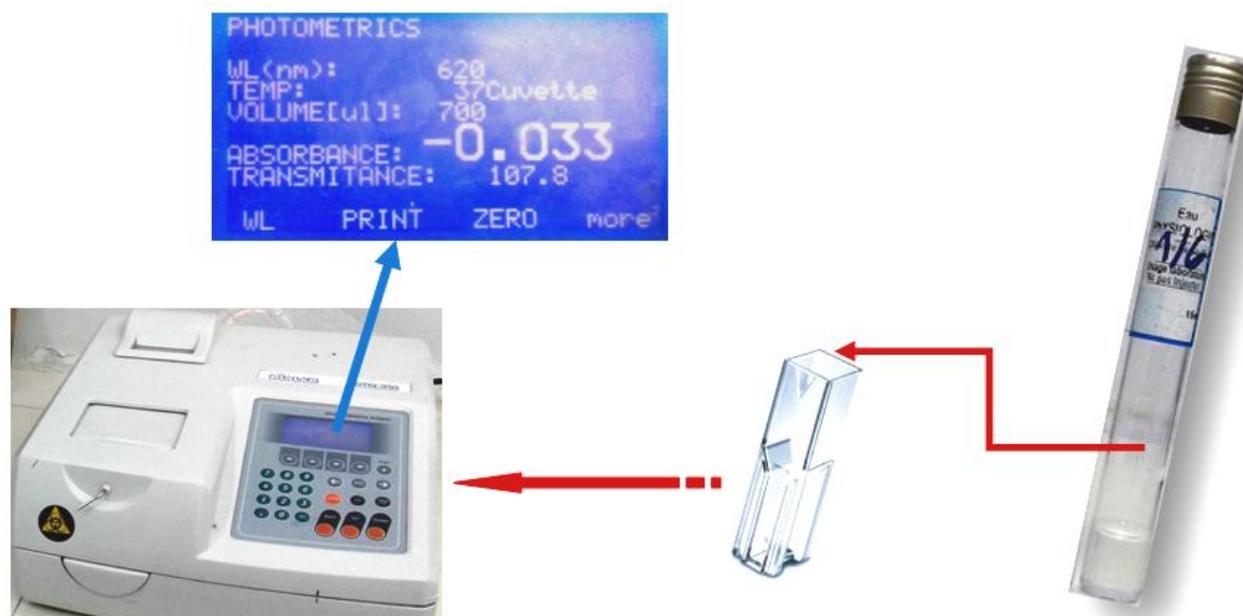


**Figure 8.** Gamme de dilution pour *Pseudomonas aeruginosa* (Photo Originale).

### 1. 3.- Détermination de la concentration d'inoculum

#### 1.3.1- la standardisation de l'inoculum

Les concentrations bactériennes des dilutions de chaque souche sont évaluées par turbidité et sont exprimées par la mesure de la densité optique (DO) par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde 620 nm tout en déterminant le zéro d'absorbance avec une cuve remplie d'eau physiologique stérile. Après avoir mesuré les densités optiques de la gamme de dilution (Figure 8), on les standardise au degré de McFarland par une comparaison avec les valeurs du Tableau 9 pour bien déterminer la densité bactérienne.



**Figure 9.** Mesure de la densité optique (DO) par un spectrophotomètre (Photo Originale).

**Tableau 9.** Relation McFarland, Absorbance et concentrations bactérienne (URL 1 (Mcfarland et Jama, 1907) (URL 2)).

McFarland	0,4	0,5	1	2	3	4
1,0% de chlorure de barium (mL)	0,04	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4
1,0% d'acide sulfurique (mL)	9,96	9,95	9,9	9,8	9,7	9,6
Absorbance a 625 nm	/	0,08 – 0,10	0,14 – 0,17	0,27 – 0,31	0,38 – 0,42	0,51 – 0,55
Absorbance a 600 nm	/	0,08 – 0,1	0,257	0,451	0,582	0,669
Densité bactérienne ( $\times 10^8$ CFU/mL)	1,2	1,5	3,0	6,0	9,0	12,0

#### 1.4.- 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 une

température ambiante avant leur emploi. La gamme de dilution pour chaque souche était ensemencé par écouvillonnage dans les 5 min qui suivent la préparation de ces dilutions servant d'inoculum; on fait bien homogénéiser la solution de chaque dilutions avant de tremper un écouvillon de coton dans cette suspension. Presser fermement contre la paroi intérieure du tube à vis juste au-dessus du niveau du liquide, on tourne l'écouvillon pour se débarrasser le liquide excédentaire. 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).

### 1.5.- Choix des antibiotiques et incubation

Un antibiogramme permet de tester sur milieu de culture solide l'action des antibiotiques (antibactériens) sur les souches bactériennes dans le but de déterminer la sensibilité (ou la résistance) de chaque antibiotique vis-à-vis chaque souche bactérienne. 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 (Tableau 10).

**Tableau 10.** Familles des antibiotiques utilisés (C.A.S.F.M, 2010).

Souche testée	Abréviation	Antibiotique	Famille	site d'action	Charge du disque (µg)
<i>Staphylococcus aureus</i>	SXT	Triméthoprimé/ sulfaméthoxazole (cotrimoxazole)	Sulfamides-Triméthoprimé	Appareil nucléaire	30
	GM	Gentamicine	Aminosides	Ribosome	10
	TE	Tétracycline	Tétracyclines		25

	C	Chloramphénicol	Phénicolés		30
	FOX	Céfoxitine	Céphalosporine 2ème génération		30
<i>Escherichia coli</i>	AM	Ampicilline	Aminopénicilline	Peptidoglycane	10
	CF	Céfalotine	Céphalosporine 1ère génération		30
	AMC	Amoxicilline + acide clavulanique	Aminopénicilline		30
	GM	Gentamicine	Aminosides	Ribosome	10
	CIP	Ciprofloxacine	Fluoroquinolone	Appareil nucléaire	5
	CIP	Ciprofloxacine	Fluoroquinolone		5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CAZ	Ceftazidime	Céphalosporine 3 <sup>ème</sup> génération		30
	TCC	Ticarcilline + acide clavulanique	Carboxypénicillines	Peptidoglycane	75
	ATM	Amikacine(AK)	Monobactame		30
	AN	Aztréonam(AT)	Aminosides	Ribosome	

Cinq disques d'antibiotiques de différentes familles 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, 2006). 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 6,35 mm (Figure 10). Les boîtes sont incubées à l'étuve à 37°C en position inversée durant 24 h (Parsaeimehr *et al.*, 2010) ( Figure 11).



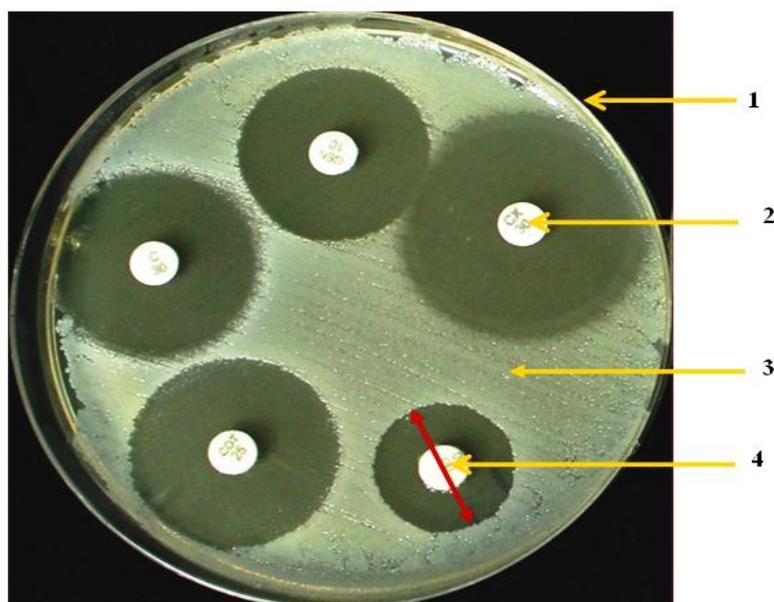
**Figure 10.** Ensemencement d'*Escherichia coli* et application des disques d'antibiotiques (Photo Originale).



**Figure 11.** Incubation des boîtes de Pétri dans l'étuve à 37°C durant 24 h (Photo Originale).

### 1.6.- Lecture et interprétation

La lecture de l'antibiogramme, après incubation, est faite en termes de diamètre de la zone d'inhibition. L'absence de croissance bactérienne se traduit par un halo translucide (transparente) autour du disque dont le diamètre est mesuré avec précision à l'aide d'une règle graduée et exprimé en millimètre (Figure 12). Les résultats sont interprétés selon les critères du Comité d'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2016). Les trois différentes souches testées ont été classées dans plusieurs 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 (Pibiri, 2006). La lecture des résultats se fait en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour des disques, et les écart-types entre les différents diamètres des zones d'inhibition mesurés ont été calculés à partir de trois séries d'expériences.



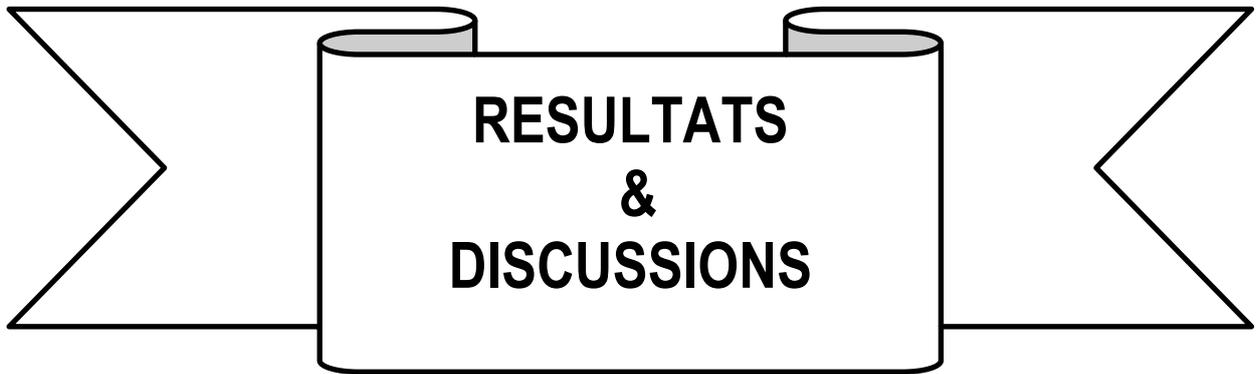
**Figure 12.** Principe de la lecture d'un antibiogramme (Photo Originale).

1 : Boîte de Pétri; 2 : Disque d'antibiotique; 3 : Croissance bactérienne; 4. Zone d'inhibition.

## 2. - Analyse statistique

Les données recueillies ont été saisies en utilisant le logiciel Excel version 2007. Les résultats expérimentaux sont exprimés selon la moyenne des valeurs obtenues  $\pm$  l'écart type, et une modélisation est réalisée. De plus, le coefficient de corrélation est calculé, le test student est réalisé, pour déterminer et apprécier la corrélation entre le McFarland et le diamètre de la zone d'inhibition.

## **CHAPITRE III**



**RESULTATS  
&  
DISCUSSIONS**

**PARTIE I**

*Escherichia coli* 25922 (ATCC)

### 1.- la standardisation de l'inoculum

La concentration bactérienne des dilutions de la solution mère (SM) d'*E. coli* sont évaluées par le degré de turbidité, et sont exprimées par la mesure de la densité optique (DO) et le McFarland. Le Tableau 11 montre les résultats obtenus:

**Tableau 11.** Résultats de la standardisation de l'inoculum d'*Escherichia coli* 25922 (ATCC)

Solution mère et dilutions	SM	2/3	1/2	1/3	1/4	1/5	1/6	1/9	1/11	1/12	1/14
DO mesurée à 620 nm	1,016	0,696	0,533	0,302	0,277	0,201	0,169	0,125	0,093	0,091	0,066
DO Théorique (à 600 nm)		0,669	0,582	0,451			0,257			0,08-0,10	
DO Théorique (à 625 nm)		0,51-0,55	0,38-0,42	0,27-0,31			0,14-0,17			0,08-0,10	
McFarland		4	3	2			1			0,5	0,4
Densité cellulaire ( $\times 10^8$ CFU/mL)		12	9	6			3			1,5	1,2

Selon le Tableau 11 nous constatons que pour avoir un inoculum d'*Escherichia coli* qui réponds à la recommandation de l'OMS et de CASFM (0,5 McFarland) il faut préparer une dilution de 1/12 de la solution mère, donc toute préparation approximative de la solution bactériennes peut conduire à des erreurs considérables. Il est recommandé d'employer un spectrophotomètre pour ajuster l'inoculum.

Sachons que CASFM n'exclut pas la possibilité d'étalonner l'inoculum au 0,5 McFarland par la comparaison à l'oeil nu la turbidité de la suspension bactérienne à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de McFarland (un produit commercialisé ou préparé au laboratoire par un mélange de chlorure de barium et d'acide sulfurique). Il est recommandé dans ce cas de vérifier la densité de la suspension McFarland à l'aide d'un spectrophotomètre avec un faisceau de 1 cm et des cuvettes assorties. L'absorbance à 625 nm doit être comprise entre 0,08 et 0,10. Il faut aussi agiter vigoureusement l'étalon de turbidité sur un Vortex avant usage. Pour faciliter la comparaison des deux échantillons, se placer face à un fond blanc avec des lignes noires. Car un inoculum lourd engendre des diamètres de zone d'inhibition plus petits et inversement (CASFM, 2017).

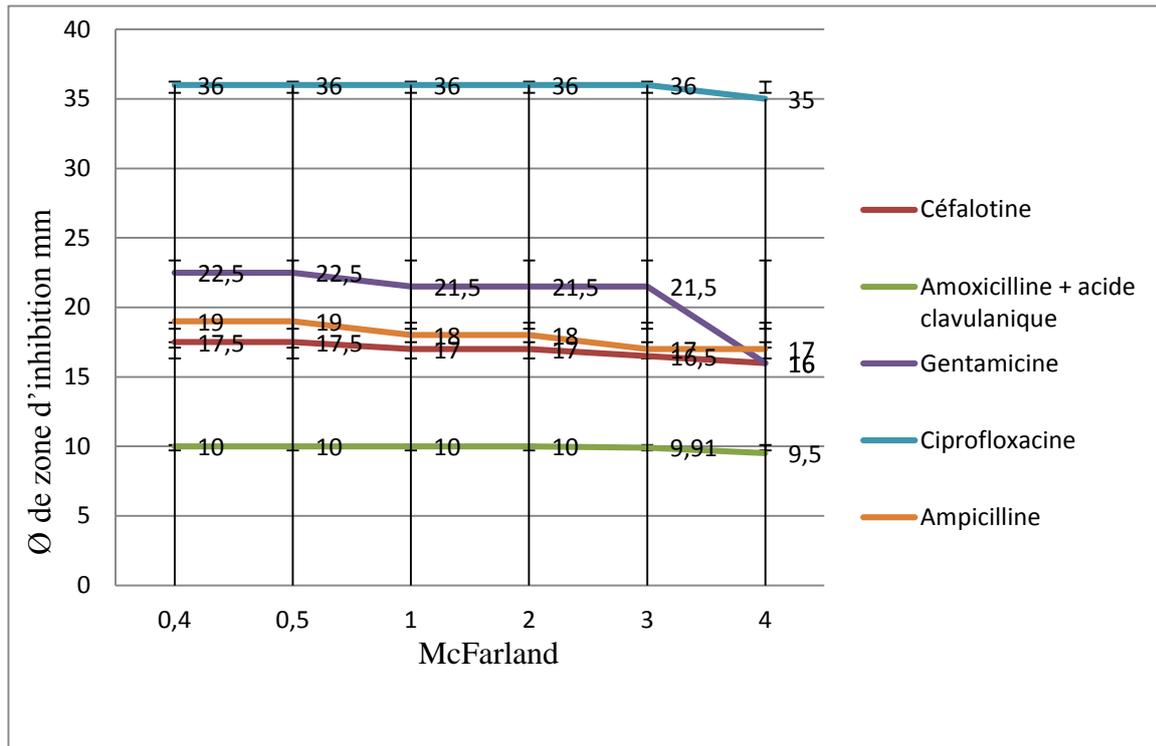
## 2.- Résultats de l'antibiogramme

La sensibilité d'*Escherichia coli* vis-à-vis des cinq antibiotique utilisé est exprimée par la mesure de diamètre des zones d'inhibition autour de ces disques, et pour éviter au maximum les erreurs de parallaxe en maintenant la règle graduée perpendiculairement à l'axe optique.

Les résultats de la sensibilité vis-à-vis les antibiotiques sont exprimée par le calcul de la moyen du diamètre des zones d'inhibition et l'écart type entre les trois réplikas analytiques, les résultats sont présentées dans les Figure 13, 14 et le Tableau 12:

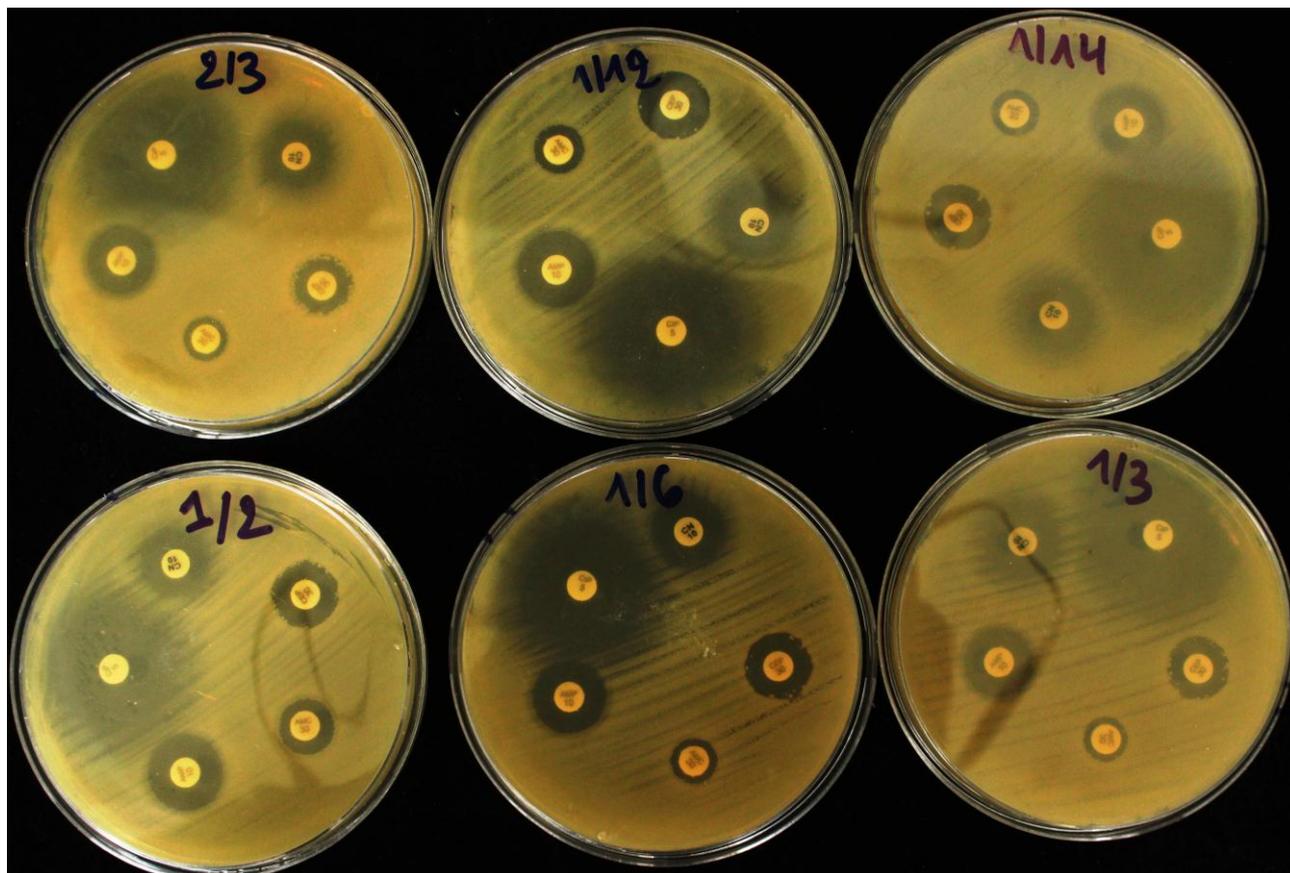
**Tableau 12.** Résultats des antibiogrammes et écartype pour *Escherichia coli* 25922 (ATCC)

Dilutions		2/3	1/2	1/3	1/6	1/12	1/14
McFarland		4	3	2	1	0,5	0,4
Densité bactérienne (CFU/mL)		$12 \times 10^8$	$9 \times 10^8$	$6 \times 10^8$	$3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
DO Théorique (à 600 nm)		0,669	0,582	0,451	0,257	0,08-0,1	/
DO Théorique (à 625 nm)		0,51-0,55	0,38-0,42	0,27-0,31	0,14-0,17	0,08-0,10	/
DO mesurée à 620 nm (1 <sup>er</sup> essai)		0,690	0,496	0,302	0,172	0,05	0,012
DO mesurée à 620 nm (2 <sup>ème</sup> essai)		0,500	0,300	0,250	0,140	0,08	0,082
DO mesurée à 620 nm (3 <sup>ème</sup> essai)		0,595	0,398	0,276	0,156	0,065	0,047
Ecartypes et la moyen de diamètres des zones d'inhibition (mm)	Céfalotine	16±3	16,5±2,5	17±3	17±3	17,5±2,5	17,5±2,5
	Amoxicilline + acide clavulanique	9,5±0,5	9,91±0,14	10±0	10±0	10±0	10±0
	Gentamicine	16±0	21,5±5,5	21,5±5,5	21,5±5,5	22,5±5,5	22,5±5,5
	Ciprofloxacine	35±5	36±4	36±4	36±4	36±4	36±4
	Ampicilline	17±1	17±1,6	18±2	18±2	19±1	19±1



**Figure 13.** La variation de diamètre des zones d'inhibition en fonction des valeurs de McFarland chez *E. coli* 25922 (ATCC)

Les résultats illustrés dans le Tableau 12 et la figure 13, indiquent que le diamètre des zones d'inhibition a diminué de 0,5 à de 2 mm au maximum avec l'ensemble des antibiotiques utilisés malgré que la concentration d'inoculum a augmenté de 0,4 à 4 degré de McFarland. Ce résultat montre que la concentration de l'inoculum influe légèrement sur le diamètre des zones d'inhibition.



**Figure 14.** Résultats des antibiogrammes obtenus pour la souche *Escherichia coli* 25922 (ATCC) (Photo Originale).

### 3.- Interprétations des antibiogrammes

Les mesures de diamètre des zones d'inhibitions sont comparées soigneusement aux valeurs critiques figurant dans les Tableaux de lecture (Tableau 4), (Tableau 5), (Tableau 6), (Tableau 7), afin de les interpréter les résultats selon les catégories : S, I ou R; les résultats sont présentés dans le Tableau 13:

**Tableau 13.** Interprétations des antibiogrammes d'*Escherichia coli* 25922 (ATCC)

Dilutions	2/3	1/2	1/3	1/6	1/12	1/14
Densité bactérienne (CFU/mL)	$12 \times 10^8$	$9 \times 10^8$	$6 \times 10^8$	$3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
McFarland	4	3	2	1	0,5	0,4
Céfalotine	I	I	I	I	I	I
Amoxicilline + acide clavulanique	R	R	R	R	R	R
Gentamicine	S	S	S	S	S	S
Ciprofloxacine	S	S	S	S	S	S
Ampicilline	S	S	S	S	S	S

Selon le Tableau 13, nous constatons une forte sensibilité d'*Escherichia coli* au ciprofloxacine, ampicilline, gentamicine et céfalotine, mais l'antibactérien céfalotine est intermédiaire. La bactérie montre une résistance naturelle à l'AMC (Amoxicilline + acide clavulanique) car *Escherichia coli* fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae* qui produisent des enzymes inactivant ce type d'antibiotiques (Cattoir, 2004).

Il ressort de ces résultats aussi que l'interprétation d'antibiogramme reste la même pour les valeurs de McFarland allant de 0,4 à 4 degré, malgré que l'OMS et la SFM exigent pour la réalisation des antibiogrammes une concentration d'inoculum correspond au 0,5 McFarland (DO de 0,09). pour *Escherichia coli* et avec l'ensemble des antibiotiques utilisé (cinq antibactériens), nous avons constaté que le résultat d'antibiogramme est le même, donc l'chèque thérapeutique et les complication médical d'un résultat d'une analyse médicale erronée n'aurons pas lieu.

#### 4.- Analyse statistique

##### 4.1.- Modélisation

Pour moduler la relation entre le McFarland et le diamètre de la zone d'inhibition, on établit un diagramme de corrélation, c'est à dire un diagramme croisant les modalités de McFarland et du diamètre de la zone d'inhibition. L'ensemble des valeurs forme un nuage de points dont la forme permet de caractériser la relation. les résultats ont été présentés sous forme de courbes de tendance pour chaque antibiotique testé (les Figures 15, 16, 17, 18 et 19), avec l'affichage de la barre d'erreur pour une valeur de 5%.

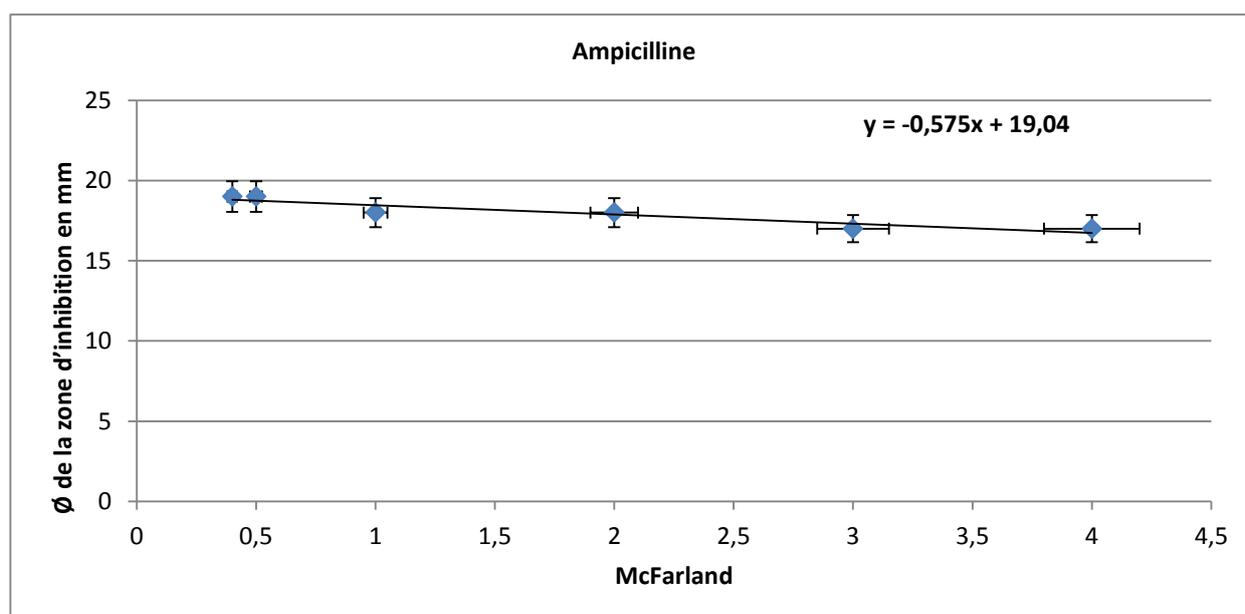


Figure 15. Courbe de linéarité obtenue avec Ampicilline testés contre *E. coli* 25922 (ATCC)

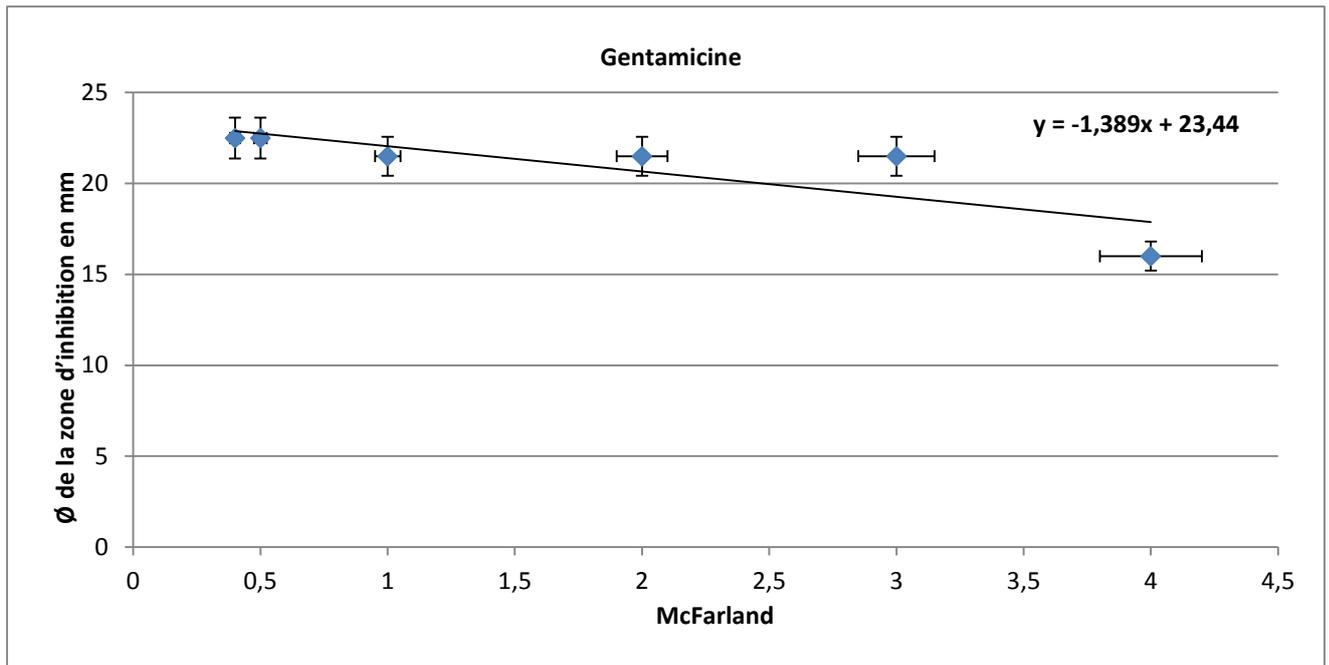


Figure 16. Courbe de linéarité obtenue avec Gentamicine testés contre *E. coli* 25922 (ATCC)

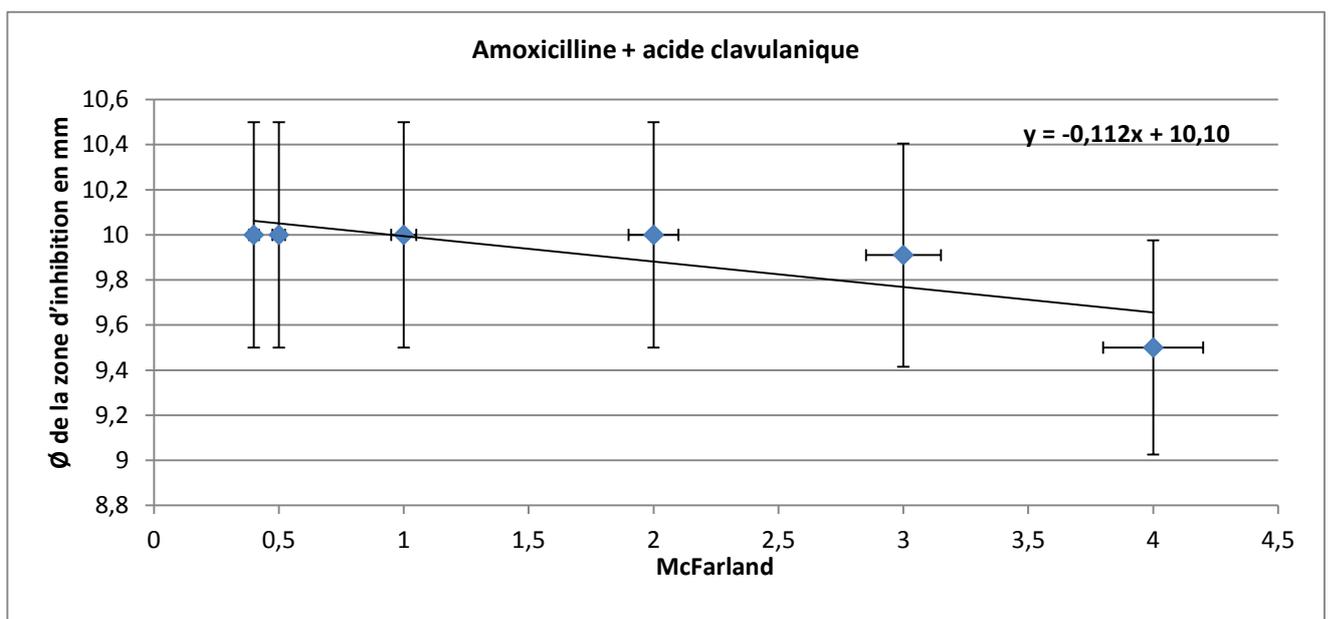
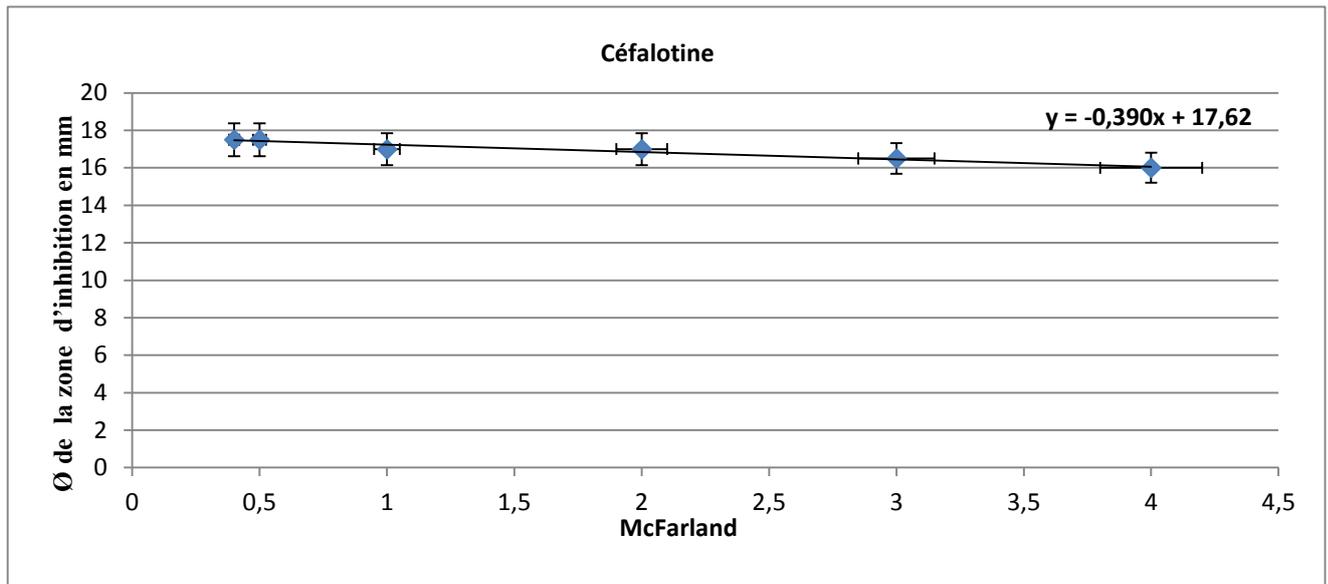
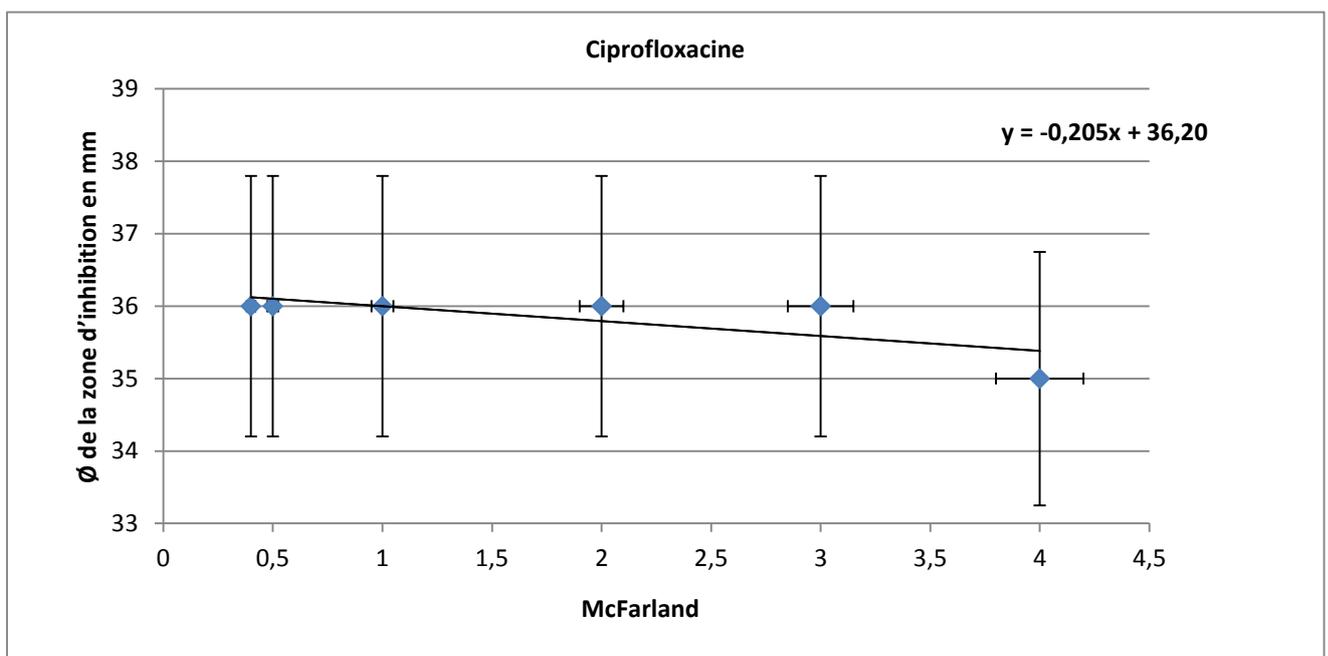


Figure 17. Courbe de linéarité obtenue avec Amoxicilline+acide clavulanique testés contre *E. coli* 25922 (ATCC)



**Figure 18.** Courbe de linéarité obtenue avec Céfalotine testés contre *E. coli* 25922 (ATCC)



**Figure 19.** Courbe de linéarité obtenue avec Ciprofloxacin testés contre *E. coli* 25922 (ATCC)

D'après les courbes présentées dans les Figure 15, 16, 17, 18 et 19 nous avons constaté que le nuage de point peut s'ajuster correctement à une droite, c'est à dire que nous sommes en présence d'un modèle linéaires (type  $Y=aX+b$ ) reliant le diamètre de la zone d'inhibition et le McFarland. Pour les cinq antibiotiques utilisé, nous avons remarqué que le nuage de point prend la forme d'une ligne dont les points s'écartent peu, donc il y a une relation linéaire forte entre le McFarland et le diamètre de la zone d'inhibition, sauf chez les deux dernier point de nuage obtenus avec

ciprofloxacine et ‘amoxicilline + acide clavulanique’ qui sont plus écartent de lignes directrices par rapport au autre point de nuage dans la même courbe, cette léger particularité est peut être liée a la déférence entre le résultat théorique et le résultat expérimentale.

Il ressort de ces résultats aussi que cette linéarité est négative, c'est à dire que le diamètre de la zone d'inhibition varie en sens inverse avec le McFarland.

Malgré que les valeurs de McFarland augment, le diamètre des zones d'inhibitions déminue légèrement car le coefficient directeur en valeur absolue de la droite de régression (correspond à la pente de la droite de régression) de chaque antibiotique utilisé est faible, qui varie de 0,11 a 1,38 comme il est représenté dans le Tableau 14 suivant :

**Tableau 14.** Le modèle linéaire pour chaque antibiotique utilisé avec *E. coli* 25922 (ATCC)

Antibiotiques	Modèl linéaire	Coefficient directeur valeur absolue
Gentamicine	$y = -1,389x + 23,44$	1,389
Ampicilline	$y = -0,575x + 19,04$	0,575
Céfalotine	$y = -0,390x + 17,62$	0,390
Ciprofloxacine	$y = -0,205x + 36,20$	0,205
Amoxicilline + acide clavulanique	$y = -0,112x + 10,10$	0,112

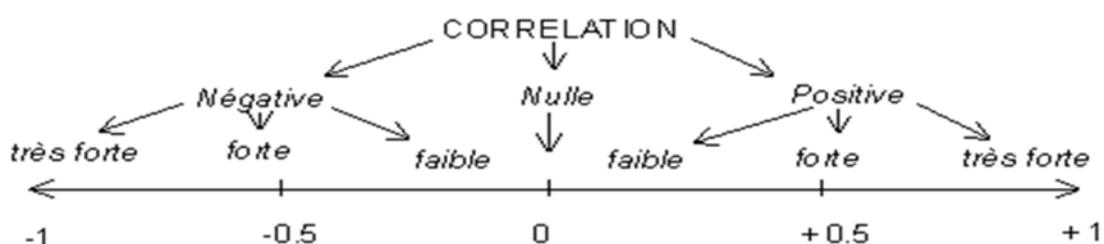
#### 4.2.- Intensité de linéarité McFarland-zone d'inhibition

Pour déterminer l'intensité exacte de cette linéarité négative entre le McFarland et le diamètre des zones d'inhibition on calcule le coefficient de corrélation de Person (**r**), l'interprétation de ce coefficient qui varie entre -1 et +1, est la suivante:

- si **r** est proche de 0, il n'y a pas de relation linéaire entre le McFarland et le diamètre des zones d'inhibition.

- si **r** est proche de -1, il existe une forte relation linéaire négative entre le McFarland et le diamètre des zones d'inhibition.

- si **r** est proche de 1, il existe une forte relation linéaire positive entre le McFarland et le diamètre des zones d'inhibition (URL 3)(Figure 20).



**Figure 20.** Propriétés et interprétations du coefficient de corrélation de Person (r) (URL 3).

Le signe de **r** indique donc le sens de la relation tandis que la valeur absolue de **r** indique l'intensité de la relation c'est-à-dire la capacité à prédire les valeurs de diamètre des zones d'inhibition en fonctions des valeurs de McFarland. Les résultats sont présentés dans le Tableau 15 suivant :

**Tableau 15.** les moyens de dialètres des zones d'inhibition en mm et le coefficient de corrélation de Pearson (r) pour *Escherichia coli* 25922 (ATCC)

Dilutions	1/14	1/12	1/6	1/3	1/2	2/3
Densité bactériennes (CFU/mL)	$1,2 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$3 \times 10^8$	$6 \times 10^8$	$9 \times 10^8$	$12 \times 10^8$
McFarland	0,4	0,5	1	2	3	4
Céfalotine	17,5	17,5	17	17	16,5	16
Coefficient de corrélation	<b>-0,97</b>					
Amoxicilline + acide clavulanique	10	10	10	10	9,91	9,5
Coefficient de corrélation	<b>-0,82</b>					
Gentamicine	22,5	22,5	21,5	21,5	21,5	16
Coefficient de corrélation	<b>-0,82</b>					
Ciprofloxacine	36	36	36	36	36	35
Coefficient de corrélation	<b>-0,73</b>					
Ampicilline	19	19	18	18	17	17
Coefficient de corrélation	<b>-0,94</b>					

D'après le tableau 15, on constate que nous sommes en présence d'une corrélation négative forte, c'est à dire le McFarland est fortement corrélé avec le diamètre de la zone d'inhibition.

Il ressort de ces résultats aussi que la valeur de **r** indique qui il y a une forte capacité à prédire les valeurs de diamètre de zone d'inhibition en fonctions de McFarland selon le modèle

linéaire obtenu avec chaque antibiotique (voire le Tableau 14), c'est-à-dire que la connaissance des valeurs de McFarland permet de prévoir les valeurs de diamètre de la zone d'inhibition.

#### 4.3.- Test de significativité

Le calcul d'un coefficient de corrélation ne constitue qu'une première étape dans l'analyse de la relation entre le McFarland et la zone d'inhibition. Il s'agit tout au plus d'une étape exploratoire qui doit être validée par un test de la significativité.

Les coefficients de corrélation de Pearson ne renseignent pas sur le degré de significativité de la relation entre le McFarland et la zone d'inhibition car celle-ci dépend également du nombre d'observation.

Pour déterminer si les coefficients de corrélation entre le McFarland et la zone d'inhibition est significative, on procède le test de Student (test d'hypothèse). Au premier temps on suppose qu'il y a deux hypothèses :

- 1- L'hypothèse nulle  $H_0$  : il n'y a pas de signification statistique pour le coefficient de corrélation entre le McFarland et la zone d'inhibition.
- 2- L'hypothèse alternative  $H_1$  : il y a une signification statistique pour le coefficient de corrélation entre le McFarland et la zone d'inhibition.

Pour prendre une décision en ce qui concerne les hypothèses, on calcule la valeur critique du

test de Student "t" par la loi suivant :  $t^* = \frac{|r_{xy}|}{\sqrt{\frac{(1-r_{xy}^2)}{n-2}}}$  (r : le coefficient de corrélation de

Pearson,  $t^*$  : la valeur expérimentale du test de Student), pour chaque antibiotiques utilisé et puis on calcule le  $t^{\text{théorique}}$  d'après le Tableau de Student (Annexe 01) avec un degré de liberté (ddl) égale a  $n-2$  et risque d'erreur  $\alpha = 0,05$ . En suit on compare  $t^*$  avec  $t^{\text{théorique}}$  pour prendre la décision soie on accepte au on rejete l'une des hypothèses :

- si  $t^* > t^{\text{théorique}}$  on rejète  $H_0$  et on accèpte  $H_1$ , donc existe une signification statistique pour le coefficient de corrélation.

- si  $t^* < t^{\text{théorique}}$  on accèpte  $H_0$  et on rejète  $H_1$ , donc n'existe pas une signification statistique pour le coefficient de corrélation.

Les résultats de test Student sont présentés dans le Tableau 16 suivant :

**Tableau 16.** coefficient de corrélation de Pearson (r) et résultats de test de Student avec *Escherichia coli*25922 (ATCC)

Antibiotiques	Coefficient de corrélation	t*	t théorique
Céfalotine	-0,97	7,9800	2,4469
Amoxicilline + acide clavulanique	-0,82	2,8653	
Gentamicine	-0,82	2,8653	
Ciprofloxacine	-0,73	2,1362	
Ampicilline	-0,94	5,5103	

Ces résultats ont montré que  $t^* > t^{\text{théorique}}$  avec quatre antibiotiques : céfalotine, ‘amoxicilline + acide clavulanique’, gentamicine et ampicilline signifier que le coefficient de corrélation calculer avec ces antibiotiques a une signification statistique, c'est-à-dire que le résultat n'est pas le fruit du hasard, donc les résultats sont significatif a 95%. Mais pour l'antibiotique ciprofloxacine on remarque que  $t^* < t^{\text{théorique}}$  signifier que le coefficient de corrélation n'a pas une signification statistique, c'est-à-dire que le résultat peut être est le fruit du hasard.

Tant qu'il y a une forte capacité à prédire les valeurs de diamètre de zone d'inhibition en fonctions de McFarland selon le modèle linéaire obtenu avec chaque antibiotique et les résultats généralement ne sont pas le fruit du hasard; on peut calculer alors les valeurs du diamètre des zones d'inhibitions tout en utilisons le modèle linéaire obtenu avec chaque antibiotiques. Les résultats sont présentés dans le Tableau 17 suivant :

**Tableau 17.** Interprétations des antibiogrammes selon le Ø des zones d’inhibitions calculé pour *Escherichia coli* 25922 (ATCC)

McFarland	0,125	0,25	0,5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Céfalotine	17,57	17,52	17,43	17,23	16,84	16,45	16,06	15,67	15,28	14,89	14,50	14,11	13,72	13,33	12,94	12,55	12,16	11,77
Interprétation	I												R					
Amoxicilline + acide clavulanique	10,09	10,07	10,04	9,99	9,88	9,76	9,65	9,54	9,43	9,32	9,20	9,09	8,98	8,87	8,76	8,64	8,53	8,42
Interprétation	R																	
Gentamicie	23,27	23,09	22,75	22,05	20,66	19,27	17,88	16,50	15,11	13,72	12,33	10,94	9,55	8,16	6,77	5,38	3,99	2,61
Interprétation	S									I	R							
Ciprofloxacine	36,17	36,15	36,10	36,00	35,79	35,59	35,38	35,18	34,97	34,77	34,56	34,36	34,15	33,95	33,74	33,54	33,33	33,13
Interprétation	S																	
Ampicilline	18,97	18,90	18,75	18,47	17,89	17,32	16,74	16,17	15,59	15,02	14,44	13,87	13,29	12,72	12,14	11,57	10,99	10,42
Interprétation	S						I						R					

D’après le tableau 17 on constate que l’interprétation de l’antibiogramme reste la même lorsque l’antibiogramme est réalisé par des inocula allant de 0,125 à 3 degré de McFarland pour l’ampicilline, et par des inocula allant de 0,125 et 6 degré de McFarland pour les antibactériens : céfalotine, ‘amoxicilline + acide clavulanique’, gentamicie et ciprofloxacine. Malgré que les recommandations de l’OMS, EUCAST et CASFM exige un inoculum de l’ordre de 0,5 McFarland qui correspond à un inoculum d’environ  $1 \text{ à } 2 \times 10^8$  UFC/mL pour la bactérie *Escherichia coli* (CASFM, 2017).

Il est à signaler que CASFM n’exclut pas la possibilité de réaliser un antibiogramme direct sur la primo-culture sans repiquage pour les prélèvements (LCR, Hémoculture, etc.) dans certaines situations d’urgence (CASFM, 2017).

Notre étude a déterminé exactement la gamme de McFarland ou le résultat et l'interprétation ne changent pas, soit pour les situations d'urgence et même dans les conditions de travail ordinaire (les analyses de tous les jours). Sachant qu'il y a un groupe de chercheurs qui se penche actuellement sur la faisabilité de réaliser des antibiogrammes directement sur les flacons d'hémoculture (CASFM, 2017).

**PARTIE II**

*Pseudomonas aeruginosa* 27853 (ATCC)

### 1.- la standardisation de l'inoculum

Les concentrations bactériennes des dilutions de la solution mère de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* sont évaluées par turbidité et sont exprimées par la mesure de la densité optique (DO) et le Mc Farland, et les résultats obtenus sont indiqués dans le Tableau 18:

**Tableau 18.** Standardisation de l'inoculum *Pseudomonas aeruginosa* 27853 (ATCC)

Solution mère et les dilutions	SM	2/3	1/2	1/3	1/4	1/6	1/8	1/9	1/10	1/11	1/12
DO mesurée à 620 nm	1,11	0,75	0,50	0,37	0,20	0,17	0,11	0,09	0,07	0,06	0,04
DO Théorique à 625 nm		0,51-0,55	0,38-0,42	0,27-0,31				0,14-0,17		0,08-0,10	
DO Théorique à 600 nm		0,669	0,582	0,451				0,257		0,08-0,1	
Mc Farland.		4	3	2	1			0,5		0,4	
Densité bactérienne (×10 <sup>8</sup> CFU/mL)		12	9	6	3			1,5		1,2	

Selon le Tableau 18, nous constatons que pour avoir un inoculum qui réponds à la recommandation de l'OMS et CASFM (0,5 McFarland) il faut utiliser une dilution de 1/9, donc toute préparation approximative de la solution bactériennes peut conduire à des erreurs non souhaitable.

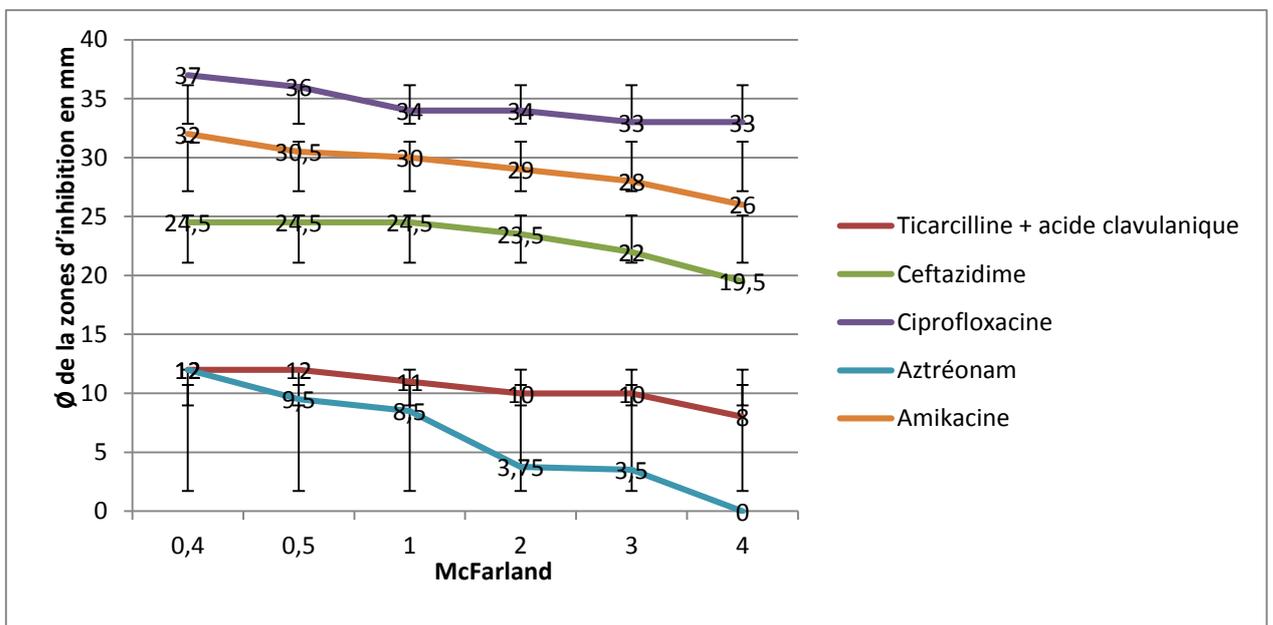
### 2.- Résultats de l'antibiogramme

La sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis les cinq antibiotique employés est exprimée par la mesure de diamètre des zones d'inhibition autour de ces disques.

Les résultats présentés dans les Figures 21, 22 et le Tableau 19 sont le moyen du diamètre des zones d'inhibition et l'écart type entre les trois répliques analytiques :

**Tableau 19.** Résultats des antibiogrammes et les écart types pour *Pseudomonas aeruginosa* 27853 (ATCC)

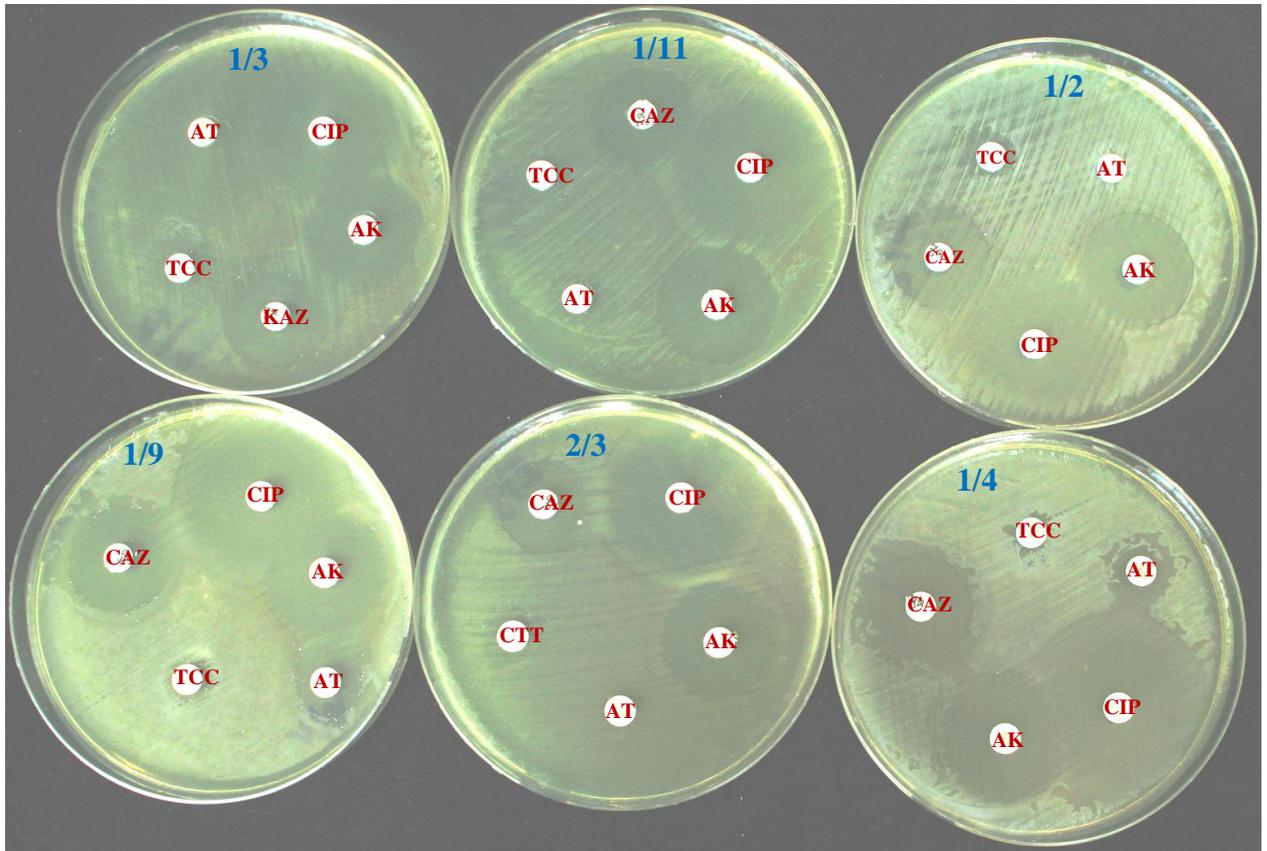
Dilutions		2/3	1/2	1/3	1/4	1/9	1/11
McFarland		4	3	2	1	0,5	0,4
Absorbance Théorique à 600 nm		0,669	0,582	0,451	0,257	0,08-0,1	
Absorbance Théorique à 625 nm		0,51-0,55	0,38-0,42	0,27-0,31	0,14-0,17	0,08-0,10	
DO mesurée à 620 nm (1 <sup>er</sup> essaie)		0,67	0,52	0,36	0,23	0,1	0,12
DO mesurée à 620 nm (2 <sup>ème</sup> essaie)		0,51	0,36	0,35	0,23	0,13	0,03
DO mesurée à 620 nm (3 <sup>ème</sup> essaie)		0,59	0,44	0,35	0,23	0,11	0,075
Écartypes et la moyen de Ø des zones d'inhibition mm	Ticarcilline + acide clavulanique	8±0	10±0	10±0	11±0	12±0	12±0
	Ceftazidime	19,5±0,5	22±1	23,5±0,5	24,5±0,5	24,5±0,5	24,5±0,5
	Ciprofloxacine	33±1	33±1	34±2	34±2	36±2	37±3
	Aztréonam	0±0	3,5±3,5	3,75±3,75	8,5±0,5	9,5±0,5	12±1
	Amikacine	26±2	28±4	29±3	30±4	30,5±3,5	32±4



**Figure 21.** Courbe représente la variation de diamètre de zone d'inhibition en fonction de McFarland chez *Pseudomonas aeruginosa* 27853 (ATCC)

Les résultats illustrés dans le Tableau 19 et la figure 21, indiquent que le diamètre des zones d'inhibition diminue de 4 à 6 mm avec 'ticarcilline + acide clavulanique', ciprofloxacine, ceftazidime et amikacine si les valeurs de McFarland passent de 0,4 à 4. La diminution la plus

forte est de de 12 à 0 mm obtenu avec l'antibiotique aztréonam, signifier que l'augmentation de la concentration d'inoculum a influencé d'une façon remarquable le diamètre de la zone d'inhibition chez les cinq antibiotique utilisé avec *Pseudomonas aeruginosa*.



**Figure 22.** Résultats des antibiogrammes pour *Pseudomonas aeruginosa* 27853 (ATCC) (Photo Originale). CIP:Ciprofloxacine, CAZ : Ceftazidime, AT:Aztréonam, TCC:Ticarcilline+acide clavulanique, AK :Amikacine

### 3.- Interprétations des antibiogrammes

Les mesures de diamètre des zones d'inhibitions sont comparées soigneusement aux valeurs critiques figurant dans les Tableaux Tableau 4, 5, 6 et 7, afin de les interpréter en plusieurs catégories: S, I ou R. Les résultats sont présentés dans le Tableau 20 suivant :

**Tableau 20.** Interprétations des antibiogrammes selon le Ø des zones d'inhibitions pour *Pseudomonas aeruginosa* 27853 (ATCC)

Dilutions	1/11	1/9	1/4	1/3	1/2	2/3
Densité bactérienne (CFU/mL)	$1,2 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$3 \times 10^8$	$6 \times 10^8$	$9 \times 10^8$	$12 \times 10^8$
McFarland	0,4	0,5	1	2	3	4
Ticarcilline + acide clavulanique	R	R	R	R	R	R
Aztréonam	R	R	R	R	R	R
Ceftazidime	S	S	S	S	S	S
Ciprofloxacine	S	S	S	S	S	S
Amikacine	S	S	S	S	S	S

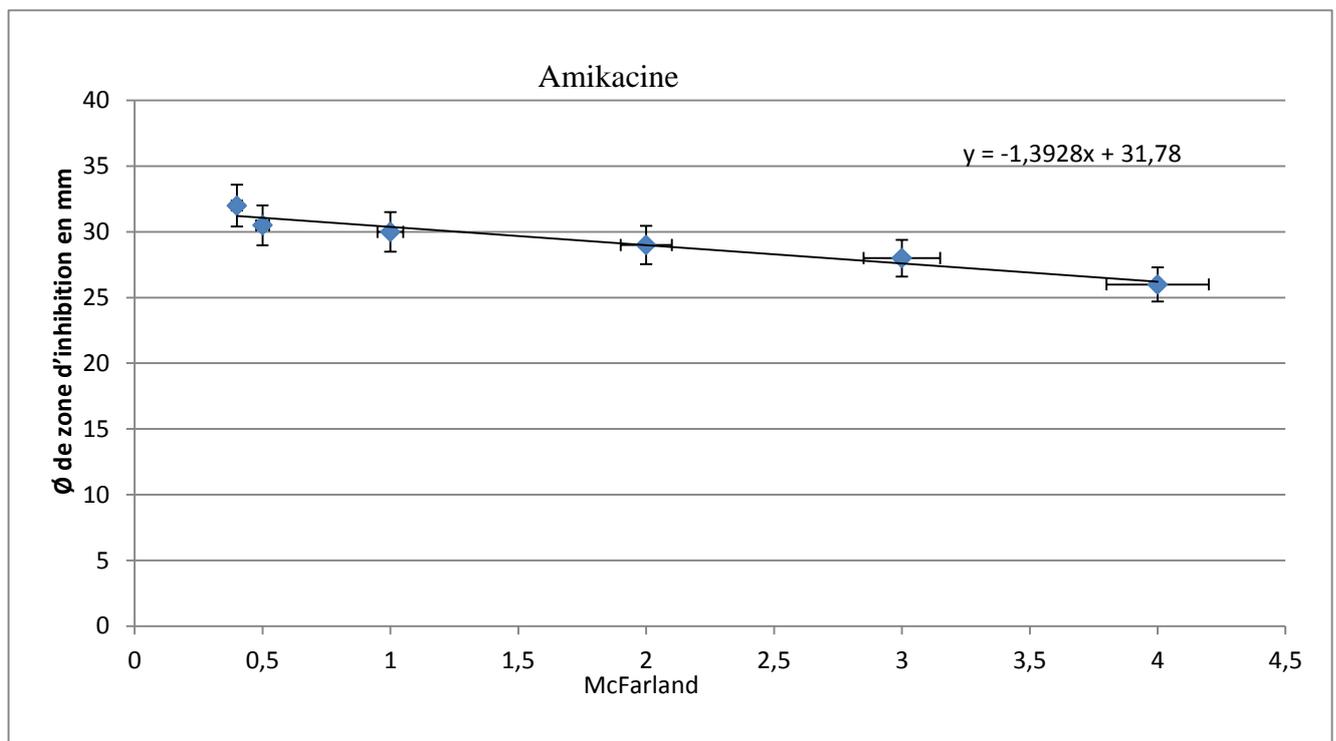
Selon le Tableau 20 nous constatons une forte sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* vis-a-vis des antibiotiques : ciprofloxacine, ceftazidime et amikacine, mais en revanche, pour l'antibiotique 'ticarcilline + acide clavulanique' et aztréonam, *P. aeruginosa* montre une résistance.

Il ressort de ces résultats aussi que le résultat de l'interprétation d'antibiogramme reste la même de 0,4 a 4 degré de McFarland, malgré que l'inoculum influe remarquablement la zone d'inhibition surtout pour l'antibiotique aztréonam.

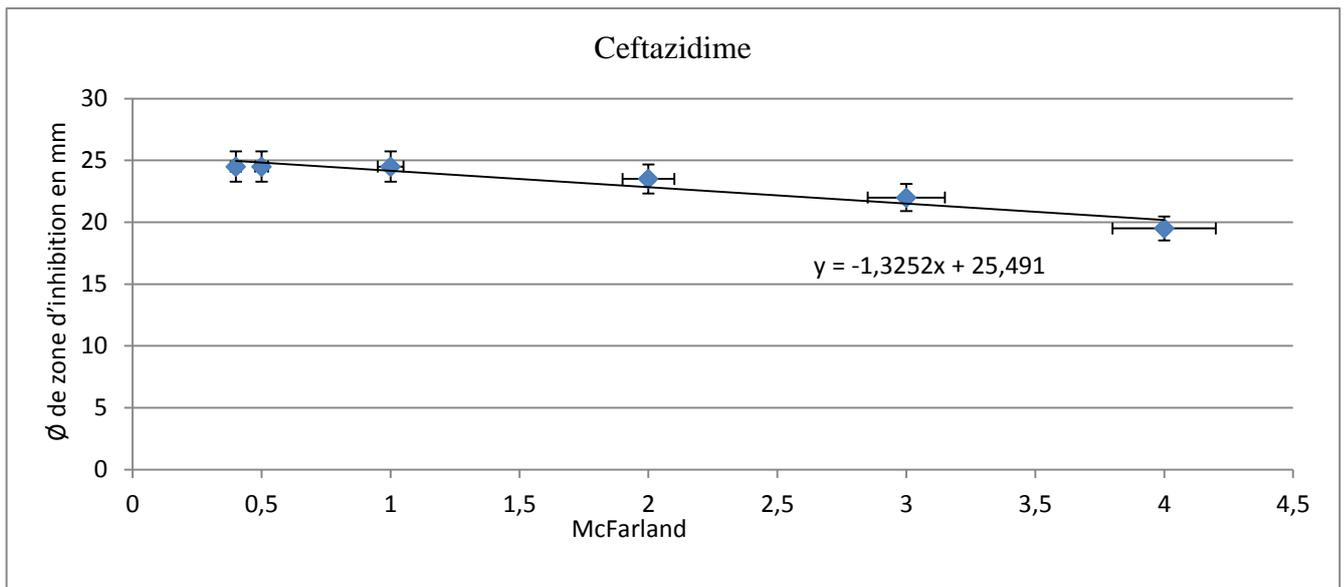
#### **4.- Analyse statistique**

##### **4.1.- Modélisation**

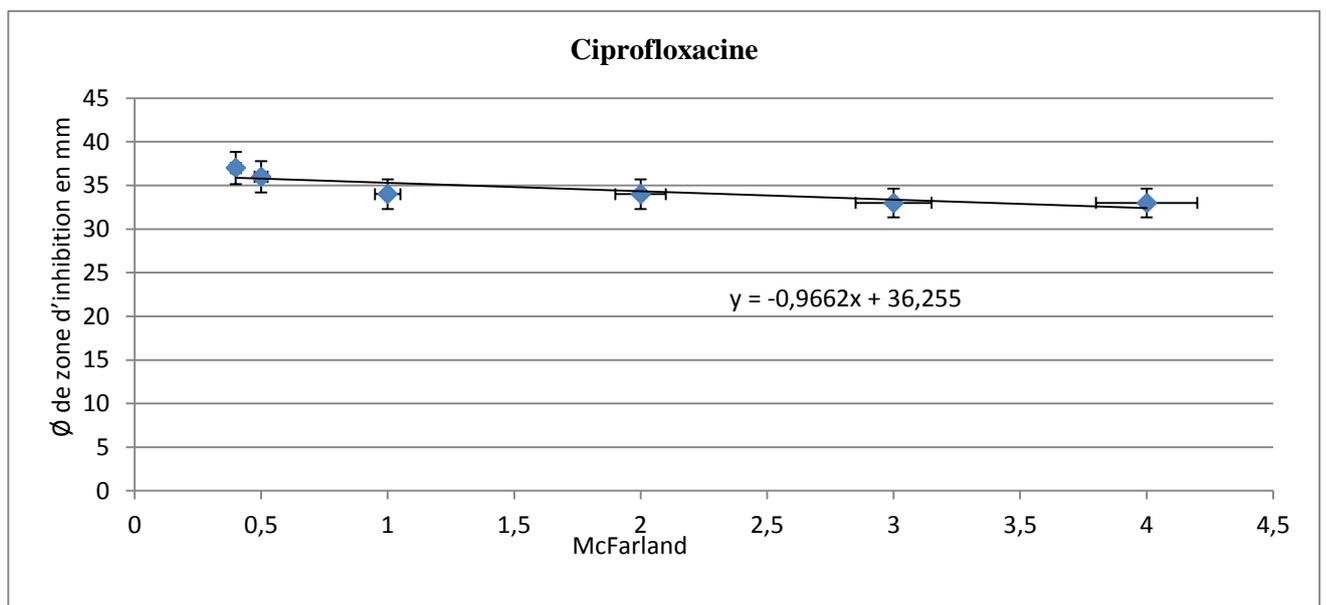
Pour moduler la relation entre le McFarland et le diamètre de la zone d'inhibition, on a suivi exactement les mêmes étapes utilisées pour *E. coli*. L'ensemble des points forme un nuage de points dont la forme permet de caractériser la relation, on présente les résultats sous forme des courbes de tendance pour chaque antibiotique testé (les Figures 23, 24, 25, 26 et 27), avec l'affichage de la barre d'erreur pour une valeur de 5%.



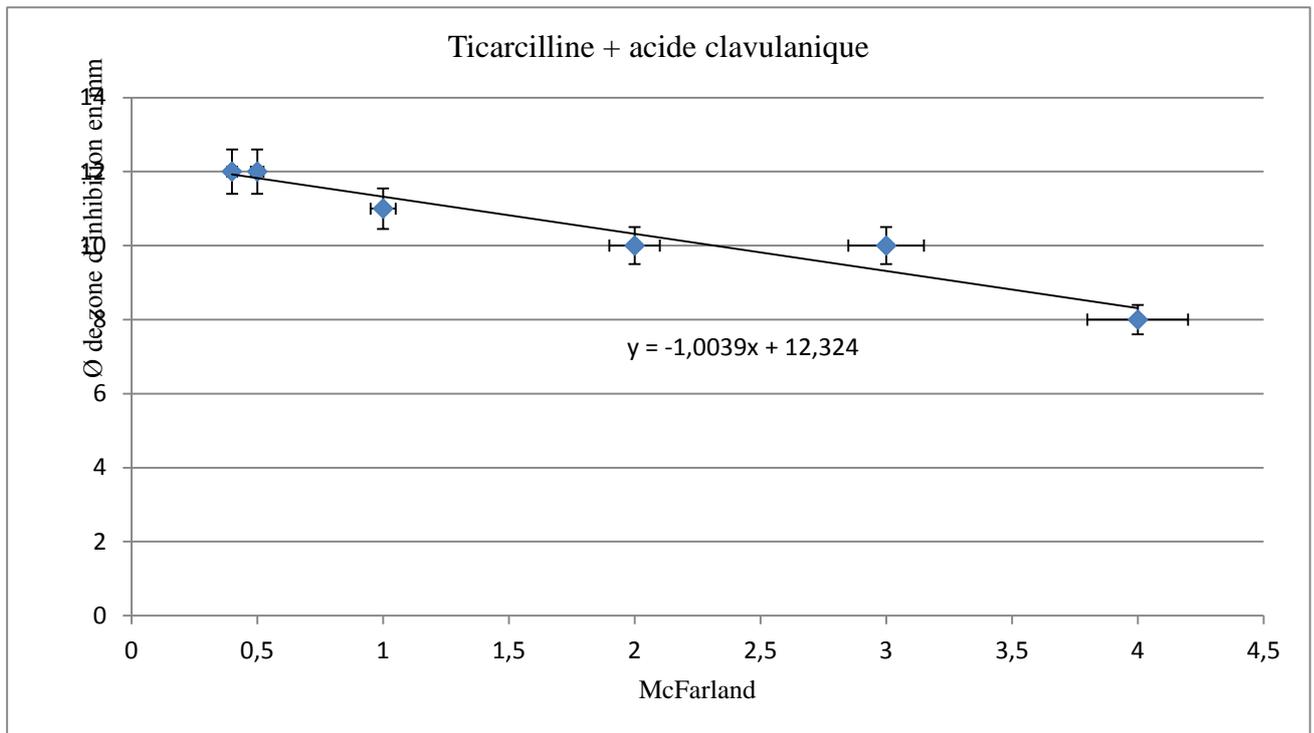
**Figure 23.** Courbe de linéarité obtenue avec Amikacine testés contre *Pseudomonas aeruginosa* 27853 (ATCC).



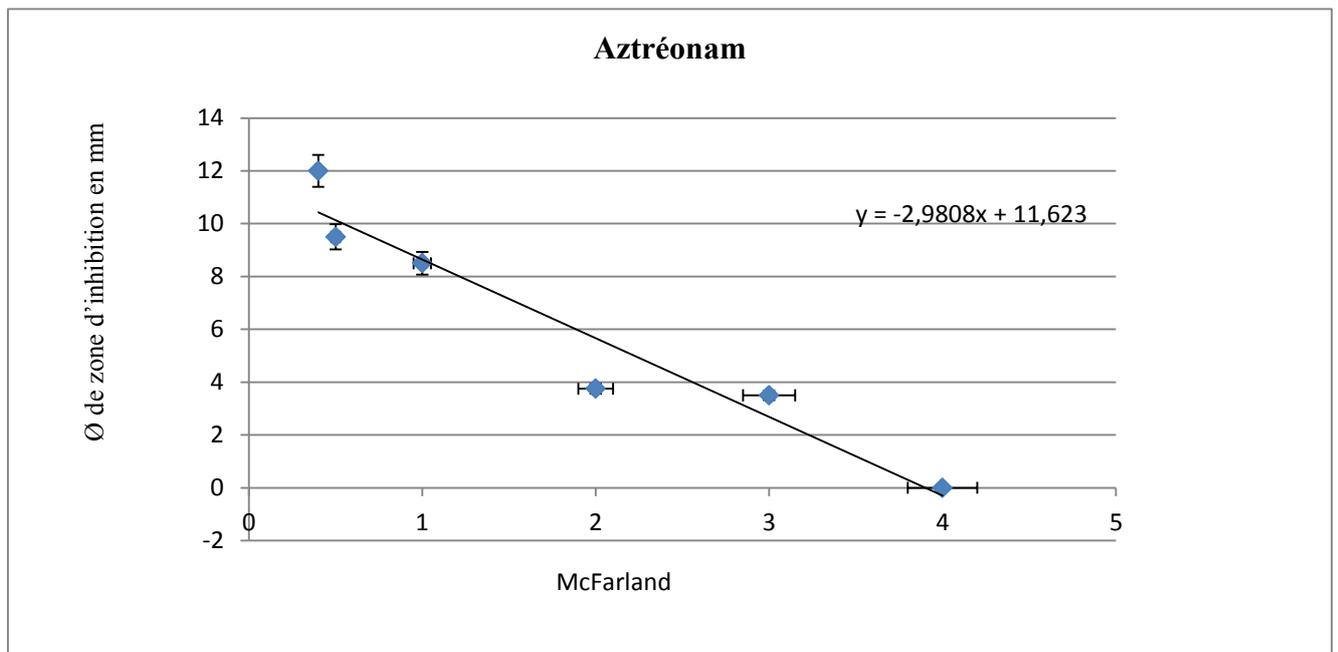
**Figure 24.** Courbe de linéarité obtenue avec Ceftazidime testés contre *Pseudomonas aeruginosa* 27853 (ATCC)



**Figure 25.** Courbe de linéarité obtenue avec Ciprofloxavine testés contre *Pseudomonas aeruginosa* 27853 (ATCC)



**Figure 26.** Courbe de linéarité obtenue avec Ticarcilline + acide clavulanique testés contre *Pseudomonas aeruginosa* 27853 (ATCC)



**Figure 27.** Courbe de linéarité obtenue avec Aztréonam testés contre *Pseudomonas aeruginosa* 27853 (ATCC)

D'après les courbes présentées dans les Figures 23, 24, 25, 26 et 27 on constate que le nuage de point peut s'ajuster correctement à une droite, c'est à dire sous forme d'un modèle linéaires (type  $Y=aX+b$ ) reliant le diamètre de la zone d'inhibition et le McFarland. pour les cinq antibiotiques utilisé on remarque qu'il y a une relation linéaire forte entre le McFarland et le diamètre de la zone d'inhibition, une linéarité est négative, c'est à dire que le diamètre de la zone d'inhibition varie en sens inverse avec le McFarland.

Malgré que les valeurs de McFarland augment, le diamètre des zones d'inhibitions déminue légèrement car le coefficient directeur en valeur absolue de la droite de régression pour 'ticarcilline + acide clavulanique, ceftazidime, ciprofloxacine et amikacine est faible allant de 0,966 à 1,39, mais pour l'antibiotique aztréonam le coefficient directeur en valeur absolue et élevé 2,980 (la pente de la droite de régression est aigu (Tableau 19) signifié qu'on observe :

- les valeurs fortes de McFarland correspondent généralement aux valeurs faibles de la zone d'inhibition.

- les valeurs moyennes de McFarland correspondent généralement aux valeurs moyennes de la zone d'inhibition.

- les valeurs faibles de McFarland correspondent généralement aux valeurs fortes de la zone d'inhibition.

Pour cette bactérie *P. aeruginosa* soi le coefficient directeur est faible ou aigu l'interprétation de l'antibiogramme ne change pas avec tous les antibiotique testés (Tableau 20).

**Tableau 21.** Le modèle linéaire pour chaque antibiotique utilisé avec *Pseudomonas aeruginosa* 27853 (ATCC)

Antibiotiques	Modèle linéaire	Coefficient directeur valeur absolue
<b>Ticarcilline + acide clavulanique</b>	$y = -1,003x + 12,32$	1,003
<b>Aztréonam</b>	$y = -2,980x + 11,62$	2,980
<b>Ceftazidime</b>	$y = -1,325x + 25,49$	1,325
<b>Ciprofloxacine</b>	$y = -0,966x + 36,25$	0,966
<b>Amikacine</b>	$y = -1,392x + 31,78$	1,392

#### 4.2.- Intensité de linéarité McFarland-zone d'inhibition

Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 22 suivant :

**Tableau 22.** Diamètre de zone d'inhibition en mm et le coefficient de corrélation de Pearson (r) pour *Pseudomonas aeruginosa* 27853 (ATCC)

Dilutions	1/11	1/9	1/4	1/3	1/2	2/3
Densité bactérienne (CFU/mL)	$1,2 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$3 \times 10^8$	$6 \times 10^8$	$9 \times 10^8$	$12 \times 10^8$
McFarland	0,4	0,5	1	2	3	4
Ticarcilline + acide clavulanique	12	12	11	10	10	8
Coefficient de corrélation	-0,96					
Ceftazidime	24,5	24,5	24,5	23,5	22	19,5
Coefficient de corrélation	-0,96					
Ciprofloxacine	37	36	34	34	33	33
Coefficient de corrélation	-0,86					
Aztréonam	12	9,5	8,5	3,75	3,5	0
Coefficient de corrélation	-0,96					
Amikacine	32	30,5	30	29	28	26
coefficient de corrélation	-0,97					

Le signe de **r** indique le sens de la relation, et la valeur absolue de **r** indique l'intensité de la relation c'est-à-dire la capacité à prédire les valeurs de diamètre des zones d'inhibition en fonctions des valeurs de McFarland.

D'après le tableau 22, on constate que nous sommes en présence d'une corrélation négative forte (c'est à dire le McFarland est fortement corrélé avec le diamètre de la zone d'inhibition).

Egalement, il ressort de ces résultats que la valeur de **r** indique qui il y a une forte capacité à prédire les valeurs de diamètre de zone d'inhibition en fonctions de McFarland selon le modèle linéaire obtenu avec chaque antibiotique (voire le Tableau 19), et donc la connaissance des valeurs de McFarland permet de prévoir les valeurs de diamètre de la zone d'inhibition.

#### 4.3.- Test de significativité

Pearson,  $t^*$  : la valeur expérimentale du test de Student), pour chaque antibiotiques utilisé et puits on calcule le  $t^{\text{théorique}}$  d'après le Tableau de Student (Annexe 01) avec un degré de liberté (ddl) égale a  $n-2$  et risque d'erreur  $\alpha = 0,05$ .

Les résultats de test Student sont présentés dans le Tableau 23 suivant :

**Tableau 23.** coefficient de corrélation de Pearson (r) et résultats de test de Student avec *Pseudomonas aeruginosa* 27853 (ATCC)

Antibiotiques	Coefficient de corrélation	t*	t théorique
Ticarcilline + acide clavulanique	-0,96	6,8571429	2,4469
Aztréonam	-0,96	6,8571429	
Ceftazidime	-0,86	3,3706057	
Ciprofloxacine	-0,96	6,8571429	
Amikacine	-0,97	7,9800937	

Ces résultats ont montré que  $t^* > t^{\text{théorique}}$  avec les cinq antibiotique utilisé signifie que le coefficient de corrélation a une signification statistique, et donc le résultat n'est pas le fruit du hasard, donc les résultats sont significatif a 95%.

Tant qu'il y a une forte capacité à prédire les valeurs de diamètre de zone d'inhibition en fonctions de McFarland selon le modèle linéaire obtenu avec chaque antibiotique et les résultats généralement ne sont pas le fruit du hasard.

On peut calculer facilement les valeurs du diamètre des zones d'inhibitions tout en utilisons le modèle linéaire obtenu avec chaque antibiotiques, Les résultats sont présentés dans le Tableau 24 suivant :

**Tableau 24.** Interprétations des antibiogrammes selon le diamètre des zones d’inhibitions calculé pour *Pseudomonas aeruginosa* 27853 (ATCC)

McFarland	0,125	0,25	0,5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Ticarcilline + acide clavulanique	12,19	12,07	11,82	11,32	10,31	9,31	8,31	7,31	6,30	5,30	4,30	3,29	2,29	1,29	0,28	-0,72	-1,72	-2,73
intrpritation	<b>R</b>																	
Ceftazidime	25,32	25,16	24,83	24,17	22,84	21,52	20,19	18,87	17,54	16,22	14,89	13,57	12,24	10,92	9,59	8,27	6,94	5,62
intrpritation	<b>S</b>						<b>I</b>			<b>R</b>								
Ciprofloxacine	36,13	36,01	35,77	35,28	34,32	33,35	32,39	31,42	30,45	29,49	28,52	27,56	26,59	25,62	24,66	23,69	22,73	21,76
intrpritation	<b>S</b>																	
Aztréonam	11,25	10,88	10,13	8,64	5,66	2,68	-0,30	-3,28	-6,26	-9,24	-12,22	-15,20	-18,18	-21,16	-24,14	-27,12	-30,10	-33,08
intrpritation	<b>R</b>																	
Amikacine	31,61	31,43	31,08	30,39	29,00	27,60	26,21	24,82	23,43	22,04	20,64	19,25	17,86	16,47	15,08	13,68	12,29	10,90
intrpritation	<b>S</b>												<b>I</b>			<b>R</b>		

D’après le tableau 24, on constate que l’interprétation de l’antibiogramme reste la même si l’antibiogramme est réalisé par un inoculum allant de 0,125 à 5 degré de McFarland pour l’antibiotique ceftazidime, et par un inoculum entre 0,125 et 10 degré de McFarland pour ‘ticarcilline + acide clavulanique, ciprofloxacine, aztréonam et amikacine. Malgré que les recommandations de l’OMS, EUCAST et CASFM exige un inoculum de 0,5 McFarland (CASFM, 2017). Notre étude détermine exactement l’intervalle de McFarland ou le résultat n’est pas changé.

**PARTIE II**

*Staphylococcus aureus* 25923(ATCC)

### 1.- la standardisation de l'inoculum

Les concentrations bactériennes des dilutions de la solution mère de *Staphylococcus aureus* sont évaluées par turbidité, et sont exprimées par la mesure de la densité optique (DO) et le Mc Farland. Le Tableau 25 montre les résultats obtenus:

**Tableau 25.** Résultats de la standardisation de l'inoculum de *Staphylococcus aureus* 25923 (ATCC)

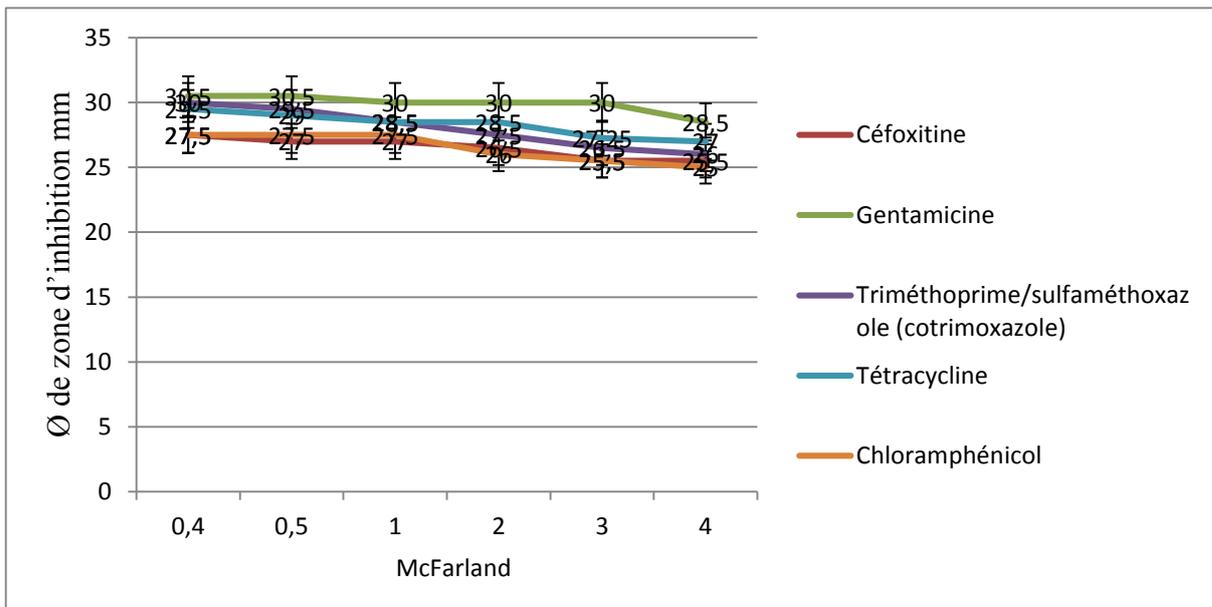
Solution mère et les dilutions	SM	1/2	1/3	1/4	1/5	1/6	1/8	1/9	1/10	1/11	1/12
DO mesurée à 620 nm	1,213	1,141	0,76	0,57	0,43	0,32	0,21	0,13	0,1	0,07	0,04
DO Théorique à 600 nm			0,669	0,582	0,451			0,257	0,08-0,1		
DO Théorique à 625 nm			0,51-0,55	0,38-0,42	0,27-0,31			0,14-0,17	0,08-0,10		
Mc Farland.			4	3	2			1	0,5	0,4	
Densité bactérienne ( $\times 10^8$ CFU/mL)			12	9	6			3	1,5	1,2	

### 2.- Résultats de l'antibiogramme

Les résultats de la sensibilité vis-à-vis les antibiotiques sont exprimée par le calcul de la moyenne du diamètre des zones d'inhibition et l'écart type entre les trois répliques analytiques, les résultats sont présentés dans les Figure 28, 29 et le Tableau 26 suivante :

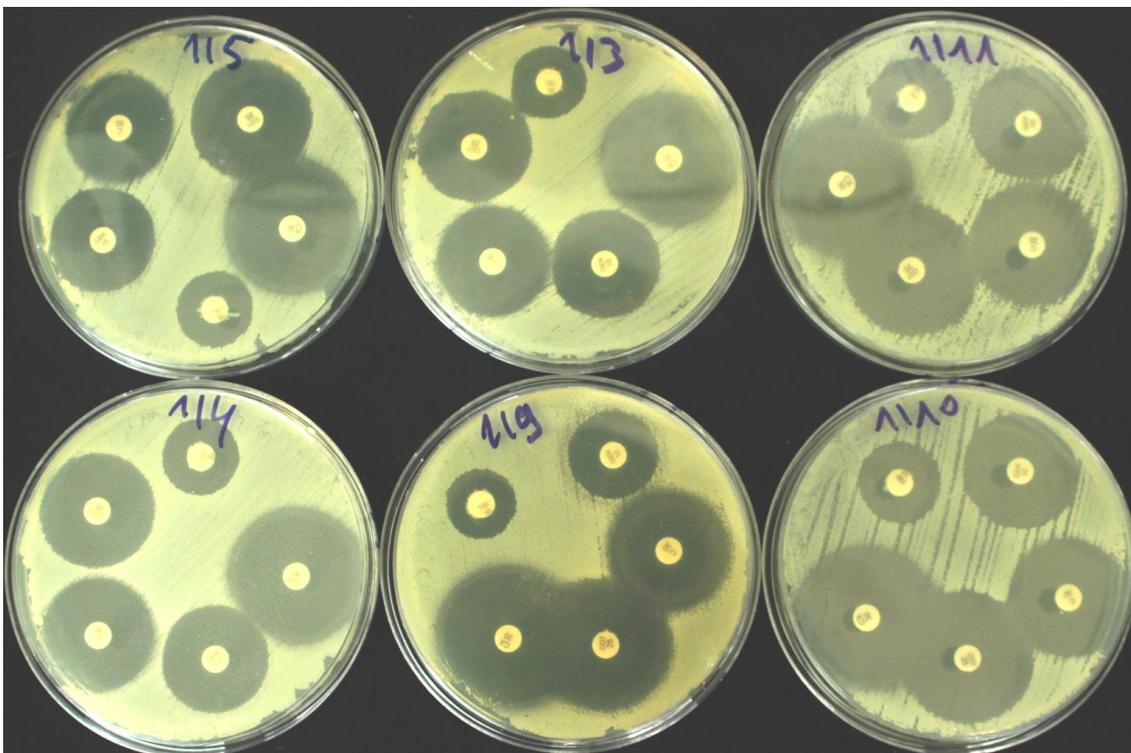
**Tableau 26.** Résultats des antibiogrammes et les Ecartypes pour *Staphylococcus aureus* 25923 (ATCC)

Dilutions		1/3	1/4	1/5	1/9	1/10	1/11
McFarland		4	3	2	1	0,5	0,4
DO Théorique (600 nm)		0,669	0,582	0,451	0,257	0,08-0,1	
DO Théorique (625 nm)		0,51-0,55	0,38-0,42	0,27-0,31	0,14-0,17	0,08-0,10	
DO mesuré à 620 nm (1 <sup>er</sup> essai)		0,33	0,23	0,21	0,113	0,128	0,093
DO mesuré à 620 nm (2 <sup>ème</sup> essai)		0,21	0,19	0,14	0,13	0,17	0,13
DO mesuré à 620 nm (3 <sup>ème</sup> essai)		0,27	0,21	0,175	0,121	0,149	0,111
Ecartypes et la moyenne de Ø des zones d'inhibition mm	Céfoxitine	25,5±6,5	25,5±6,5	26,5±7,5	27±7	27±7	27,5±6,5
	Gentamicine	28,5±1,5	30±3	30±3	30±3	30,5±2,5	30,5±2,5
	Triméthoprime/sulfaméthoxazole (cotrimoxazole)	26±1	26,5±1,5	27,5±2,5	28,5±2,5	29,5±2,5	30±2
	Tétracycline	27±9	27,25±8,75	28,5±9,5	28,5±9,5	29±9	29,5±9,5
	Chloramphénicol	25±2	25,5±1,5	26±1	27,5±2,5	27,5±2,5	27,5±2,5



**Figure 28.** La variation de diamètre de zone d'inhibition en fonction de McFarland chez *Staphylococcus aureus* 25923(ATCC)

Les résultats illustrés dans le Tableau 26 et la figure 28, indiquent que le diamètre des zones d'inhibition a diminué de 2 ou 4 mm au maximum avec tout les antibiotiques testés, malgré que la concentration d'inoculum augment de 0,4 a 4 degré de McFarland. Ce résultats montrent que l'augmentation de l'inoculum à une influence légère sur le diamètre de la zone d'inhibition.



**Figure 29.** Résultats des antibiogrammes pour *Staphylococcus aureus* 25923 (ATCC) (Photo Originale)

### 3.- Interprétations des antibiogrammes

Les mesures de diamètre des zones d'inhibitions sont comparées soigneusement aux valeurs critiques figurant dans les Tableaux 4, 5, 6 et 7, afin de les interpréter en plusieurs catégories (S, I ou R). Les résultats sont présentés dans le Tableau 27:

**Tableau 27.** Interprétations des antibiogrammes selon le Ø des zones d'inhibitions pour *Staphylococcus aureus* 25923 (ATCC)

Dilutions	1/3	1/4	1/5	1/9	1/10	1/11
Densité bactérienne (CFU/mL)	$12 \times 10^8$	$9 \times 10^8$	$6 \times 10^8$	$3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
McFarland	4	3	2	1	0,5	0,4
Céfoxitine	S	S	S	S	S	S
Gentamicine	S	S	S	S	S	S
Triméthoprim/sulfaméthoxazole (cotrimoxazole)	S	S	S	S	S	S
Tétracycline	S	S	S	S	S	S
Chloramphénicol	S	S	S	S	S	S

Selon le Tableau 27 nous constatons une sensibilité de *Staphylococcus aureus* a tous les antibiotique utilisé.

Il ressort de ces résultats aussi que le résultat de l'interprétation d'antibiogramme reste le même de 0,4 a 4 degré de McFarland, malgré que l'OMS et la SFM exige pour les antibiogrammes une concentration d'inoculum correspond au 0,5 McFarland. Pour les cinq antibiotiques utilisé le résultat d'antibiogramme ne change pas (même c'est on utilise une concentration d'inoculum égale au supérieur a 0,5 McFarland).

### 4.- Analyse statistique

#### 4.1.- Modélisation

Pour moduler la relation entre le McFarland et le diamètre de la zone d'inhibition, les mêmes étapes précédentes ont été suivies. Les résultats ont été présenté sous forme des courbes de tendance pour chaque antibiotique testé (les Figures 30, 31, 32, 33 et 34), avec l'affichage de la barre d'erreur pour une valeur de 5%.

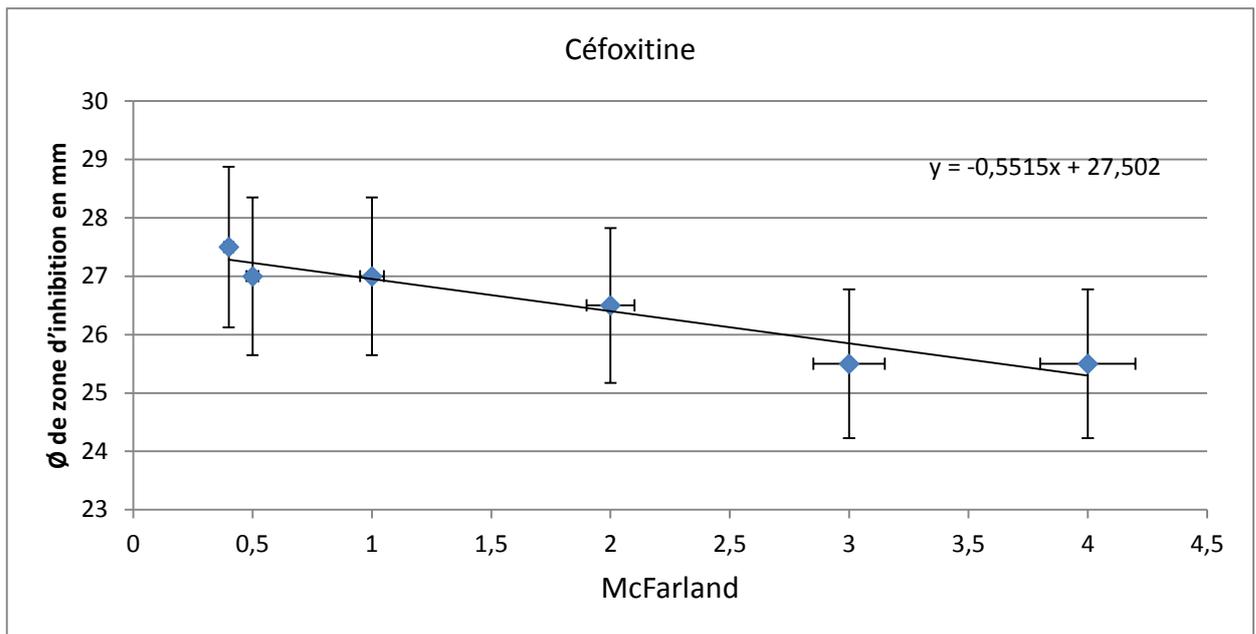


Figure 30. Courbe de linéarité obtenue avec Céfoxitine testés contre *Staphylococcus aureus* 25923 (ATCC)

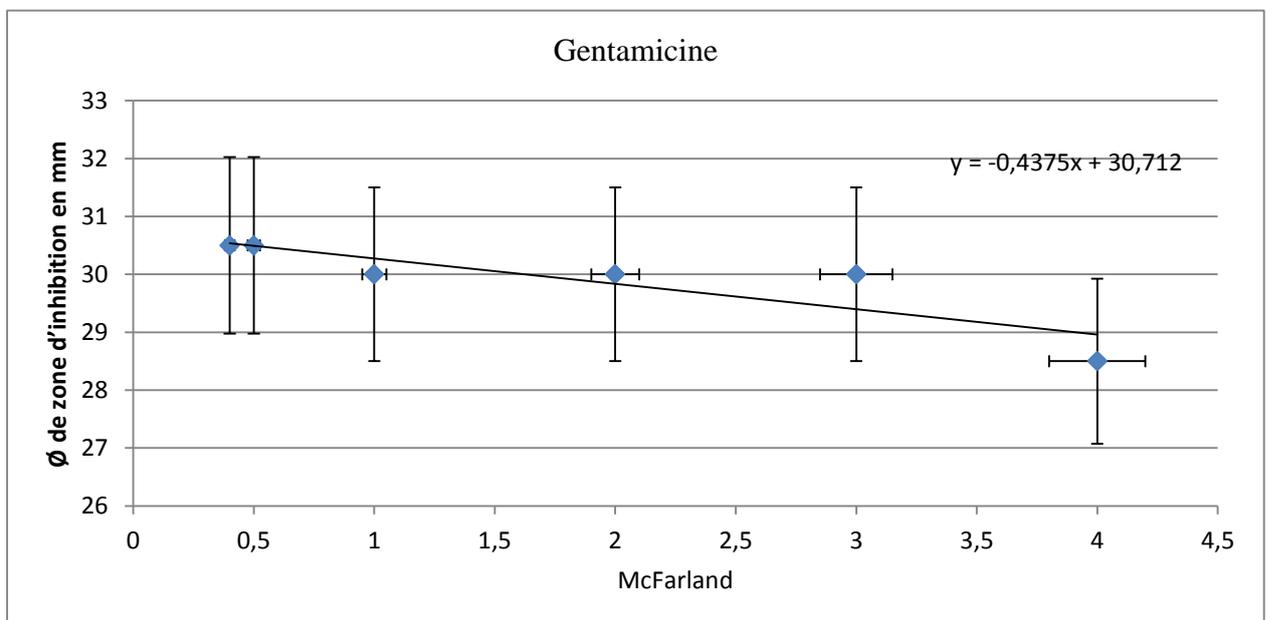
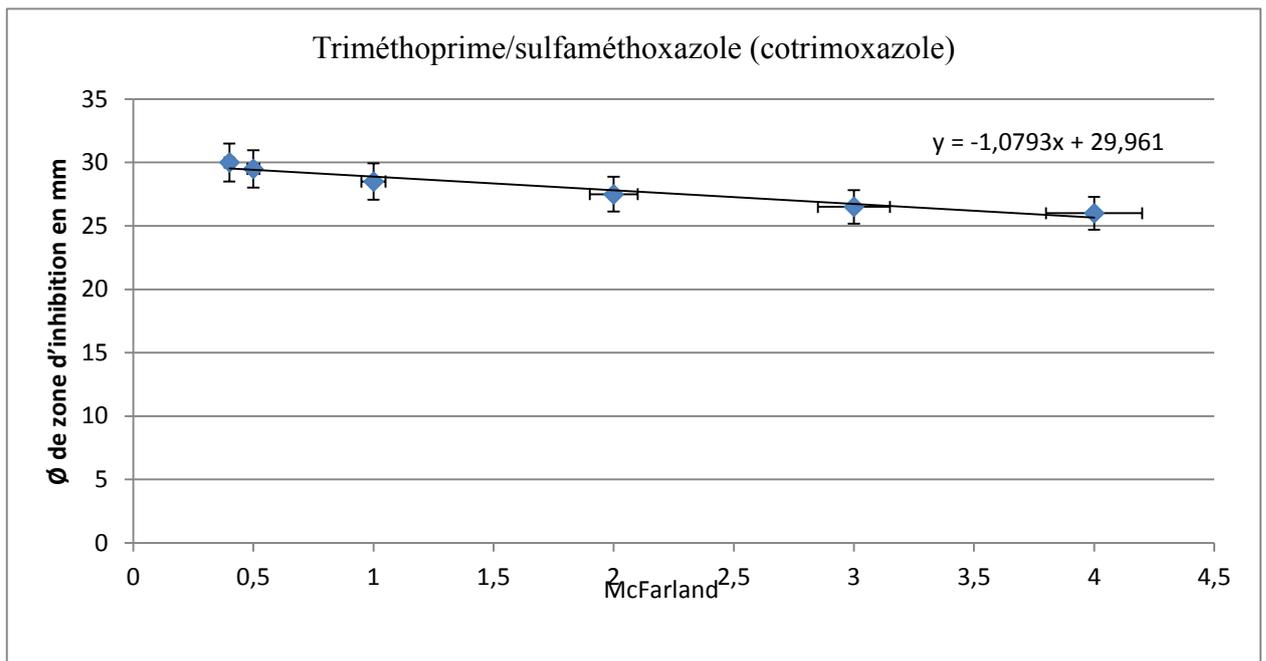
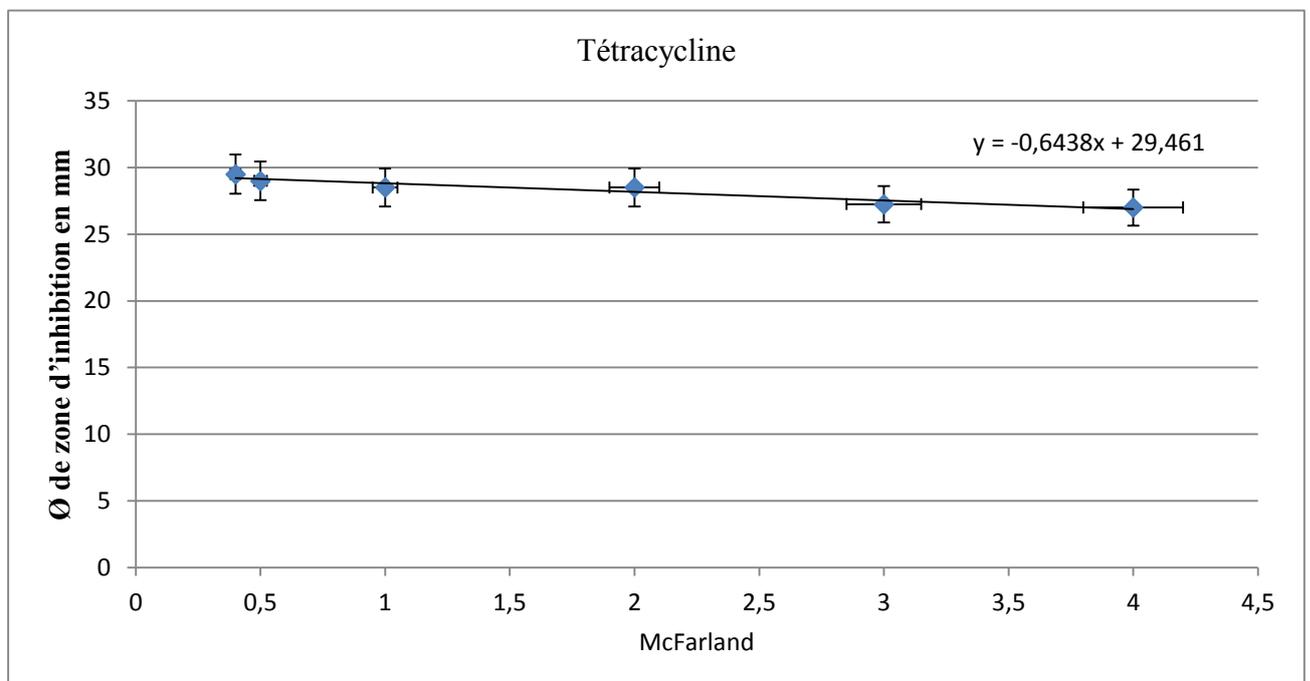


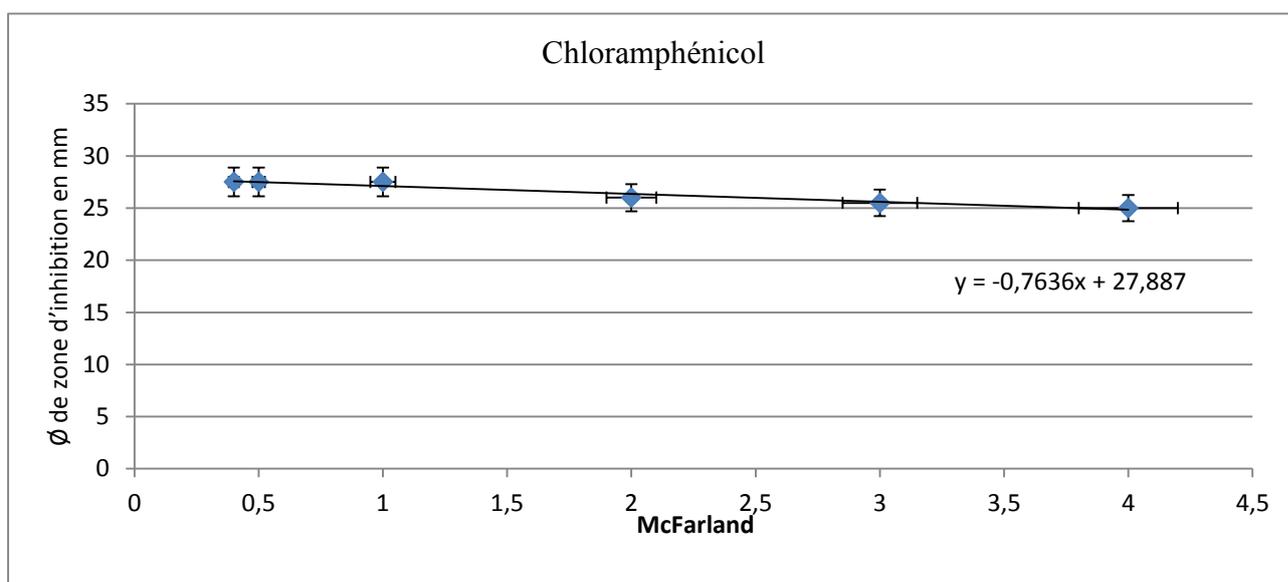
Figure 31. Courbe de linéarité obtenue avec Gentamicine testés contre *Staphylococcus aureus* 25923 (ATCC)



**Figure 32.** Courbe de linéarité obtenue avec Triméthoprim/sulfaméthoxazole (cotrimoxazole) testés contre *Staphylococcus aureus* 25923 (ATCC)



**Figure 33.** Courbe de linéarité obtenue avec Tétracycline testés contre *Staphylococcus aureus* 25923 (ATCC)



**Figure 34.** Courbe de linéarité obtenue avec Chloramphénicol testés contre *Staphylococcus aureus* 25923 (ATCC)

Les résultats obtenus (les Figures 30, 31, 32, 33 et 34) montrent la présence d'un modèle linéaire (type  $Y=aX+b$ ) reliant le diamètre de la zone d'inhibition et le McFarland, pour tous les antibiotiques utilisés, et donc il y a une relation linéaire forte entre le McFarland et le diamètre de la zone d'inhibition. Le type de cette linéarité est négative, et donc le diamètre de la zone d'inhibition varie en sens inverse avec le McFarland.

Malgré que les valeurs de McFarland augmentent, le diamètre des zones d'inhibitions diminue légèrement car le coefficient directeur en valeur absolue de la droite de régression (correspond à la pente de la droite de régression) de chaque antibiotique utilisé est faible, variée de 0,437 à 1,079 comme il est présenté dans le Tableau 28:

**Tableau 28.** Le modèle linéaire pour chaque antibiotique utilisé avec *Staphylococcus aureus* 25923 (ATCC)

Antibiotiques	Modèle linéaire	Coefficient directeur (valeur absolue)
Céfoxitine	$y = -0,551x + 27,50$	0,551
Gentamicine	$y = -0,437x + 30,71$	0,437
Triméthoprime/sulfaméthoxazole (cotrimoxazole)	$y = -1,079x + 29,96$	1,079
Tétracycline	$y = -0,643x + 29,46$	0,643
Chloramphénicol	$y = -0,763x + 27,88$	0,763

#### 4.2.- Intensité de linéarité McFarland-zone d'inhibition

Les résultats sont présentés dans le Tableau 29 suivant :

**Tableau 29.** les moyens de Ø des zones d'inhibition en mm et le coefficient de corrélation de Pearson (r) pour *Staphylococcus aureus* 25923 (ATCC)

Dilutions	1/11	1/10	1/9	1/5	1/4	1/3
Densité bactérienne (CFU/mL)	$1,2 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$3 \times 10^8$	$6 \times 10^8$	$9 \times 10^8$	$12 \times 10^8$
McFarland	0,4	0,5	1	2	3	4
Céfoxitine	27,5	27	27	26,5	25,5	25,5
coefficient de corrélation	-0,960					
Gentamicine	30,5	30,5	30	30	30	28,5
coefficient de corrélation	-0,866					
Triméthoprim/sulfaméthoxazole (cotrimoxazole)	30	29,5	28,5	27,5	26,5	26
coefficient de corrélation	-0,975					
Tétracycline	29,5	29	28,5	28,5	27,25	27
coefficient de corrélation	-0,957					
Chloramphénicol	27,5	27,5	27,5	26	25,5	25
coefficient de corrélation	-0,975					

D'après le tableau 29, on constate que nous sommes en présence d'une corrélation négative forte, c'est à dire le McFarland est fortement corrélé avec le diamètre de la zone d'inhibition.

Les résultats obtenus (Tableau 28), montrent que la connaissance des valeurs de McFarland permet de prévoir les valeurs de diamètre de la zone d'inhibition.

#### 4.3.- Test de significativité

Les résultats de test Student sont présentés dans le Tableau 30 suivant :

**Tableau 30.** coefficient de corrélation de Pearson (r) et résultats de test de Student avec *Staphylococcus aureus* 25923 (ATCC)

Antibiotiques	Coefficient de corrélation	t*	t théorique
Céfoxitine	-0,96	6,857	2,4469
Gentamicine	-0,86	3,370	
Triméthoprim/sulfaméthoxazole (cotrimoxazole)	-0,97	7,980	
Tétracycline	-0,95	6,084	
Chloramphénicol	-0,97	7,980	

Ces résultats ont montré que  $t^* > t_{théorique}$  avec les cinq antibiotique utilisé signifie que le coefficient de corrélation a une signification statistique c'est-à-dire que le résultat n'est pas le fruit du hasard, donc les résultats sont significatif a 95%.

Tant qu'il y a une forte capacité à prédire les valeurs de diamètre de zone d'inhibition en fonctions de McFarland selon le modèle linéaire obtenu avec chaque antibiotique et les résultats généralement ne sont pas le fruit du hasard. On peut calculer dans ce cas la, les valeurs du diamètre des zones d'inhibitions tout en utilisons le modèle linéaire obtenu avec chaque antibiotiques, Les résultats, sont présentés dans le Tableau 31 suivant :

**Tableau 31.** Interprétations des antibiogrammes selon le Ø des zones d'inhibitions calculé pour *Staphylococcus aureus* 25923 (ATCC)

McFarland	0,125	0,25	0,5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Céfoxitine	27,43	27,36	27,22	26,95	26,40	25,85	25,30	24,75	24,19	23,64	23,09	22,54	21,99	21,44	20,89	20,34	19,79	19,24
Intrpritation	<b>S</b>															<b>R</b>		
Gentamicine	30,66	30,60	30,49	30,27	29,84	29,40	28,96	28,53	28,09	27,65	27,21	26,78	26,34	25,90	25,47	25,03	24,59	24,16
Intrpritation	<b>S</b>																	
Triméthoprim/sulfaméthoxazole (cotrimoxazole)	29,83	29,69	29,42	28,88	27,80	26,72	25,64	24,57	23,49	22,41	21,33	20,25	19,17	18,09	17,01	15,93	14,85	13,78
Intrpritation	<b>S</b>															<b>I</b>		
Tétracycline	29,38	29,30	29,14	28,82	28,17	27,53	26,89	26,25	25,60	24,96	24,32	23,67	23,03	22,39	21,74	21,10	20,46	19,82
Intrpritation	<b>S</b>																	
Chloramphénicol	27,78	27,69	27,50	27,12	26,35	25,59	24,83	24,07	23,30	22,54	21,78	21,01	20,25	19,49	18,72	17,96	17,20	16,44
Intrpritation	<b>S</b>															<b>I</b>		

D'après le tableau 31 on constate que l'interprétation de l'antibiogramme reste la même si l'antibiogramme est réalisé par un inoculum de 0,125 à 12 degré de McFarland avec tous les antibiotique utilisé. Notre étude détermine exactement l'intervalle de McFarland ou le résultat n'est pas changé.



**CONCLUSION GENERALE  
ET PERSPECTIVES**

Dans ce travail, on s'est intéressé à la réalisation des antibiogrammes est de prédire la sensibilité de trois souches bactériennes vis-à-vis de plusieurs antibiotiques. La méthode de diffusion ou antibiogramme standard est la plus utilisée, cette méthode consiste à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations d'antibiotiques. Lorsque la technique est parfaitement standardisée, les diamètres des zones d'inhibition dépendent théoriquement uniquement de la sensibilité des microorganisme. Un antibiogramme réalisé de manière non standardisée est dépourvu de sens et donc donne un résultat non interprétative. Pour éviter cela, nous conduit a vérifier l'effet de la concentration de l'inoculum sur la zone d'inhibition, pour trois bactéries, deux a Gram négatif: *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* et une a Gram positif : *Staphylococcus aureus*, avec cinq antibiotiques utilisés avec chaque souche bactérienne. Cette vérification permet d'ajuster la densité de l'inoculum, et de choisir judicieusement les concentrations à tester et de pratiquer une lecture correcte et interprétative. L'influence de la concertation de l'inoculum dans les lois de la diffusion est une donnée classique, et il était prévisible que ce phénomène se manifeste dans le cas de l'antibiogramme.

Nous avons préparé pour chaque souche six dilutions qui corresponde à 0,4 , 0,5, 1, 2, 3, et 4 McFarland standardisé par un spectrophotomètre. Dans les quinze minutes qui suit la préparation on réaliser des antibiogrammes et la lecture est réalisée après 24 d'incubation à 37 C°. Par la suite, on calculé les moyens de diamètre des zone d'inhibition sur la base de trois réplica analytique. Les résultats montre que le diamètre de la zone d'inhibition diminue en fonction de l'augmentation de McFarland de 0,5 jusqu'a 6 mm pour tous les antibiotiques utilisés avec les trois souches bactériennes, à l'exception de l'aztréonam (30 µg) qui a montré une diminution du diamètre de la zone d'inhibition de 12 mm (obtenu avec 0,4 MacFarland) à 0 mm (obtenu avec 4 MacFarland) chez *Pseudomonas aeruginosa*. Malgré cette diminution, et quand on compare les diamètres aux valeurs critiques publiées par l'Organisation mondiale de la santé on trouve que les résultats de l'interprétation restent les mêmes, soit l'antibiogramme réalisé par l'inoculum le moine concentré (4,0 McFarland) ou par le plus concentré.

Dans une deuxième étape, nous avons modulé la relation entre la zone d'inhibition et le McFarland, et nous avons constaté que la relation réponde à un modèle linière négative pour tous les antibiogrammes réalisés avec les trois souches testées, c'est à dire que le diamètre de la zone d'inhibition varie en sens inverse avec le McFarland.

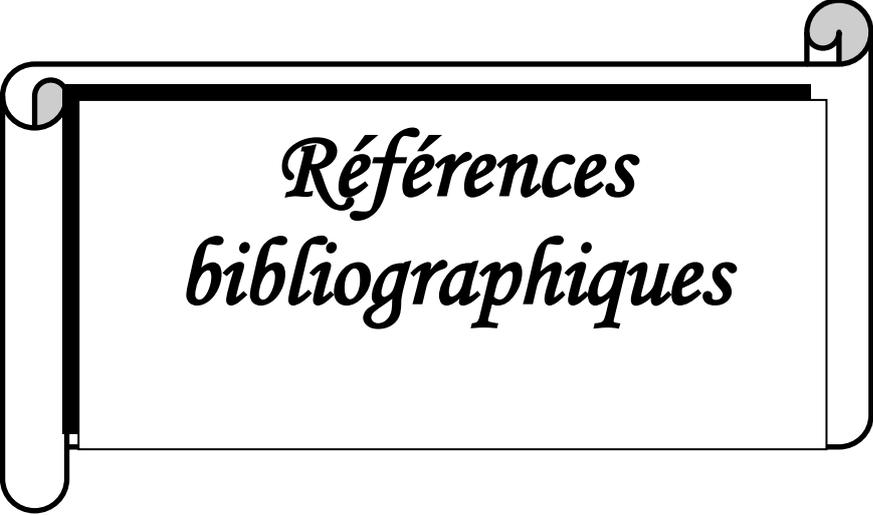
Pour déterminer l'intensité exacte de cette linéarité négative entre le McFarland et le diamètre des zones d'inhibition nous avons calculé le coefficient de corrélation de Person (r) pour tous les antibiogrammes réalisés, et nous avons constaté que nous sommes en présence d'une corrélation négative forte, c'est à dire que le McFarland est fortement corrélé avec le

diamètre de la zone d'inhibition. Donc il y a une forte capacité à prédire les valeurs de diamètre de zone d'inhibition en fonctions de McFarland selon le modèle linéaire obtenu avec chaque antibiotique.

Pour dernière étape, nous avons étudié le degré de significativité de la relation entre le McFarland et la zone d'inhibition par le test Student, car celle-ci dépend de coefficient de corrélation et également du nombre d'observation. Les résultats ont montré que le coefficient de corrélation a une signification statistique pour tout l'antibiogramme réalisé, c'est-à-dire que le résultat n'est pas le fruit du hasard, donc les résultats sont significatif a 95%.

Finalement, Pour une meilleure évaluation de l'effet de la concentration de l'inoculum sur la zone d'inhibition il serait intéressant d'élargir l'étude pour d'autre souches et d'autre antibiotiques a fin d'voire de nouveaux tableau dans les quelle on montre l'intervalle de McFarland sécurisé ou l'interprétation de l'antibiogramme reste la même, et pour choisir facilement les concentrations à tester et avoir une lecture interprétative, soit pour les condition de travaille d'urgence ou même pour les analyses courantes.

Il est à noter aussi que l'antibiogramme est influencé par plusieurs facteurs comme le milieu de culture, la température, le pH, etc. Il serait intéressant d'étudié plus profondément l'antibiogramme dans les travaux futures pour avoir une vision claire et un résultat fiable pour une meilleur gestion des soins sans avoir crier une résistance au antibiotiques chez les bactéries et maitre la santé personnel et publique en danger.



*Références  
bibliographiques*

- 1- **Aggoune-Khinache N., Bensorsa D., Henniche F.Z., Daoudi M., Abdouni M.A., Chabani A., Tiouit D. and Naim M.** (2008).- Metallo-B-lactamases producing *Pseudomonas aeruginosa* in Algeria. *Med. Mal. Infect.* Sous presse.
- 2- **Ahoyo A.T., Baba-Moussa L., Makoutode M., Gbohoun A., Bossou R., Dramane K., Sanni A. and Prévo G.** (2006).- Incidence de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline dans le service de néonatalogie du centre hospitalier départemental du Zou et des Collines au Bénin. *Archives de Pédiatrie.*, **13**, 1391–1396.
- 3- **Alekshun Michael N. and Levy S.B.** (2007).- Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *J. Cell.* **128** (6), 1037-1050.
- 4- **Anonyme 1.** <http://www.dmipfmv.ulg.ac.be/bacvet/m/cours3VMB/TP/antibiogramme.doc>. Site visité le 30/04/2017.
- 5- **AVRIL J-L., DABERNAT H., DENIS F., MONTEIL H.,** 2000 -Bactériologie clinique. 3ème édition Ellipses (Ed) Paris, 602 p.
- 6- **Boughachiche F, Reghioa S, Oulmi L, Zerizer H, Kitouni M, Boudemagh A, Boulahrouf A.,** 2005. Isolement d'actinomycétales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la sebkhia de Ain Mlila, *Sci. Technol.* **23**, 5-10.
- 7- **Berdy J., Aaszalos A. and Mc Nitt K.L.** (1987).- CRC Handbook of antibiotic compounds. Vol. XIII. *Microbial metabolites.* part 1, 2, 3. Florida, USA. CRC Press, Boca Raton.
- 8- **Bycroft B.W.** (1988). – Dictionary of antibiotics and related substances. Chapman and Hall (Eds.). London, 944 p.
- 9- **Breton A., Theilleux J., Sanglier J.J. and Vobi G.** (1989).- Organismes producteurs : biologie, taxonomie et écologie. *In: Biotechnologie des antibiotiques.* Larpent J.P. and Sanglier J.J. (Eds.). Masson. Paris, pp. 33-70.
- 10- **Barrett D.** (2002). - From natural products to clinically useful antifungals. *Biochimica and Biophysica Acta*, **1587**, 224-233.
- 11- **Bush K.** (1999). -  $\beta$ - lactamase of increasing clinical importance. *Curr. Pharm. Des.*, **5**, 839-45.
- 12- **Butaye P, Cloeckaert A. and Schwarz S.** (2003).- Mobile genes coding for efflux mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram negative bacteria. *Intr. J. Antimicrob Agents.*, **22**, 205–10.
- 13- **Ben Achour N. Mercuri P.S., Power P., Belhadj C., Ben Moussa M., Galleni M. and Belhadj O.** (2009).- First detection of CTX-M-28 in a Tunisian hospital from a cefotaxime-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain. *Pathologie Biologie.*, **57**, 343–348.
- 14- **Beddou Fawzia ;** 2015.-Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex vesicarius* L. et *Anvillea radiata* Coss. & Dur. Thèse De Doctorat de l'Université De Abou Bekr Belkaid, Telmcen:144p.
- 15- **C.A.S.F.M. ;** 2003. - Société Française de Microbiologie, COMITE DE L'ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIETE FRANCAISE DE MICROBIOLOGIE :114p.
- 16- **C.A.S.F.M. ;** 2010. - Société Française de Microbiologie, COMITE DE L'ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIETE FRANCAISE DE MICROBIOLOGIE :114p.
- 17- **C.A.S.F.M. ;** 2016. - Société Française de Microbiologie, COMITE DE L'ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIETE FRANCAISE DE MICROBIOLOGIE.
- 18- **C.A.S.F.M. ;** 2017. - Société Française de Microbiologie, COMITE DE L'ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIETE FRANCAISE DE MICROBIOLOGIE.
- 19- **Cattoir V.** (2004).-Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathologie Biologie.*, **52**, 607–616.

- 20- **Dagnra A.Y., Akolly K., Gbadoe A., Aho K. and David M.** (2007).- Émergence des souches de salmonelles multirésistantes aux antibiotiques à Lomé (Togo). *Médecine et maladies infectieuses.*, **37**, 266–269.
- 21- **Fluit A .D .C., Maarten R. and Josef schmitz F.** (2001) .- Molecular Detection of Antimicrobial Resistance . *Clin. Microbiol. Rev.* **14** (4), 836–871.
- 22- **FRENEY J. RENAUD F.HANSEN W;** (08/2007). Manuel de bactériologie clinique 2e édition, volume 1 Editions Elsevier – p. 413-464.
- 23- **Fred A.** (2006).- Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Am. J. Infect. Control.*, **34**, 3-10.
- 24- **Grosjean J .,** 2011. - Bactériologie et Virologie pratique . France : DE BOECK, 2e : 290p.
- 25- **Handal et Olsen,** 2000; - Calcium dependent anticandidal action of pradimicin A. *J. Antibiot.*, **43**, 715–721.
- 26- **K.Rahal., R.Belouni., A.Benslimani., Tali-Maamar., M.F.K.Missoum., M.Boudouane., A.Aboun.** (2005).- Standardisation de l’antibiogramme à l’échelle nationale selon les recommandations de l’OMS 2002, 4 ème édition., Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière, Algérie, 79–84 p.
- 27- **Katsumi S., Kazshi T., Hiroshi O.**( 2005).- Pathogen occurrence and antimicrobial susceptibility of urinary tract infection cases a 20 year period (1983–2002) at a single institution in Japan. *Jpn J Infect Dis.*, **58**:303–8.
- 28- **Laskin A.I. et Lechevalier H.** (1984). – Handbook of Microbiology. Vol. 3, CRC Press.
- 29- **Lazzarini A., Cavaletti L., Toppo G. and Marinelli F.** (2000). – Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*, **78**, 399-405.
- 30- **Landgren M., Oden H., Kuhn I., Osterlund A. and Kahlmeter G.** (2005).- Diversity among 2481 *Escherichia coli* from women with community-acquired lower urinary tract infections in 17 countries. *J. Antimicrob. Chemother.*, **55**, 928-37.
- 31- **Mkaouar D., Mahjoubi F, Mezghani S., Znazen A., Ktari S., Hammami A.,** (2008).- Étude de la résistance des entérobactéries aux céphalosporines de troisième génération dans les hôpitaux de Sfax, Tunisie (1999–2005). *Médecine et Maladies Infectieuses.*, **38** ,293–298
- 32- **Mohammedi Zohra.,** 2006.- Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen [Ouvrage]. - Tlemcen (Algérie) : Université Abou Bakr Belkaid, 103 p.
- 33- **Maltezou H. C.**(2008).- Maltezou Metallo-β-lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance. *Int. J. Anti .Agents.*, 09.003.
- 34- **McFARLAND JOSEPH., JAMA M D.,** (1907).- THE NEPHELOMETER:AN INSTRUMENT FOR ESTIMATING THE NUMBER OF BACTERIA IN SUSPENSIONS USED FOR CALCULATING THE OPSONIC INDEX AND FOR VACCINES; XLIX(14):1176-1178.
- 35- **Nordmann P, Mammeri H.** (2007).- Résistance plasmidique aux quinolones. *Antibiotiques.*, **9**, 246–53.
- 36- **NAUCIEL C.,** 2000 - Bactériologie médicale. Masson (Ed).Paris, 276p
- 37- **Pibiri M.,** 2006- Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat, école polytechnique fédérale de lausanne. 161p.

- 38- **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*, Vol.15, pp.1668-1678.
- 39- **Podschun, R. and Ullmann, U.** (1998).- *Klebsiella* spp.as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev.*, **11**, 589–603.
- 40- **Paterson D. L.** (2006). - Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *Am. J. Infect. Control.*, **34**, S20-8.
- 41- **Poole K.** (2001).- Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr. Opin. Microbiology.*, **4** (5) 500-508.
- 42- **Poole K.** (2004).- Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev.*, Vol.10, p12–26.
- 43- **Portillo A., Ruiz-Larrea F., Zarazaga M., Alonso A., Martinez JL. and Torres C.**(2000).- Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrob Agents Chemother.*, **44** , 967-71.
- 44- **Quincampoix J.C. and Mainardi J.L.** (2001). - Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. *Réanimation.*, **10**, 267-75.
- 45- **Roberts M.C.**(1998).- Antibiotic resistance mechanisms in bacteria of oral and upper respiratory origin . *Int. J. Antimicrob. Agents.* **9**, 255–267.
- 46- **Roberts**, 1999 - L-671,329, a new antifungal agent. I. Fermentation and isolation. *J. Antibiot.*, **42**, 163–167.
- 47- **Rupp ME. and Fey PD.** (2003). - Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing
- 48- *Enterobacteriaceae*: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs.*, **63**, 353-65.
- 49- **Sekhsoxh Y., Chadli M., El Hamzaoui S.A.** (2008).- Fréquence et sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées dans les urines. *Médecine et Maladies Infectieuses.*, **38**, 324–32738.
- 50- **Soussy G.S.**, (2007);- la résistance bactériennes aux antibiotiques. *in*: « les infections urinaires » (Lobel B et Soussy G. J. Eds.). Springer Paris., pp. 21-46.
- 51- **Sanglier J.J. Haang H., Huck T.A. and Fehr T.** (1993). – Novel bioactive compounds from actinomycetes: a short review (1988-1992). *Res. Microbiol.*, **144**, 633-642.
- 52- **Skurnik D. and Andremont A.** (2006).-Antibiothérapie sélectionnante: de la théorie à la pratique. *Reanim.*, **15**, 198–204.
- 53- Service de Bactériologie., 2002 – 2003 - Bactériologie Université Pierre et Marie, Niveau DCEM1, 73p.
- 54- **Thiele-Bruhn S.** (2003). – Pharmaceutical antibiotic compounds in soils. A review. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **166**, 145-167.
- 55- **Tenover F. C.** (2006).- Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am. J. Infect. Control.*, **34**, S3-10.
- 56- **Tagajdid M.R., Boumhil L., Iken M., Adnaoui M. and Benouda A.** (2008).- Étude de la résistance des souches de *Escherichia coli* isolées dans les urines aux fluoroquinolones et aux céphalosporines de troisième génération. *J. Med. Mal.*, **15**,10.015.
- 57- **Tumbarello M., Teresa S., Sanguinetti M., Citton R., Montuori E, Leone., Fadda G. and Cauda R.** (2006).- Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum-  $\beta$  -

- Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Risk Factors, Molecular Epidemiology, and Clinical Outcome . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*, p 498–504
- 58- **URL 1.** [https://en.wikipedia.org/wiki/McFarland\\_standards](https://en.wikipedia.org/wiki/McFarland_standards). Site visité le 28/02/2017.
- 59- **URL 2.** [https://catalog.hardydiagnostics.com/cp\\_prod/Content/hugo/McFarlandStds.htm](https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/McFarlandStds.htm) Site visité le 25/04/2017.
- 60- **URL 3.** [http://grasland.script.univ-paris-diderot.fr/STAT98/stat98\\_6/stat98\\_6.htm](http://grasland.script.univ-paris-diderot.fr/STAT98/stat98_6/stat98_6.htm) Site visité le 03/05/2017.
- 61- **URL 4.** [https://en.wikipedia.org/wiki/McFarland\\_standards](https://en.wikipedia.org/wiki/McFarland_standards) Site visité le 10/05/2017.
- 62- **Villalobos et Struelens**, 2006 – Novel bioactive compounds from actinomycetes: a short review (1988-1992). *Res. Microbiol.*, **144**, 633-642
- 63- **Watve M.G., Tickoo R., Jog M.M. and Bhole B.D.** (2001). - How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces* ? *Arch. Microbiol.*, **176**, 386-390.
- 64- **Weill f. X.** (2008).- *Salmonella*: épidémiologie, typage et résistance aux antibiotiques. *Revue Francophone des Laboratoire* .**38** (400), 38-48.
- 65- **Yala D., Merad A.S., Mohamedi D. and Ouar Korich M.N.** (2001).– Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb.*, **91**, 5-12.
- 66- **Yang Y., Qiang L., Chun-Ping, T.** ( 2008).- Natural Products Chemistry Research 2006's Progress in China. *Chinese Journal of Natural Medicines.*, **6**, 70 -78.
- 67- **Zgurskaya HI.** (2002).- Molecular analysis of efflux pump-based antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol.*, **292**, 95–105.

# **Annexes**

## Annexes 01

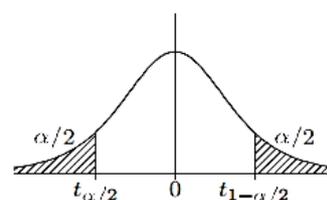
## Tables de Probabilités et Statistique

## LOIS DE STUDENT

Si  $T$  est une variable aléatoire suivant la loi de Student à  $\nu$  degrés de liberté, la table donne, pour  $\alpha$  fixé, la valeur  $t_{1-\alpha/2}$  telle que

$$\mathbb{P}\{|T| \geq t_{1-\alpha/2}\} = \alpha.$$

Ainsi,  $t_{1-\alpha/2}$  est le quantile d'ordre  $1 - \alpha/2$  de la loi de Student à  $\nu$  degrés de liberté.



$\nu \backslash \alpha$	0,900	0,500	0,300	0,200	0,100	0,050	0,020	0,010	0,001
1	0,1584	1,0000	1,9626	3,0777	6,3138	12,7062	31,8205	63,6567	636,6193
2	0,1421	0,8165	1,3862	1,8856	2,9200	4,3027	6,9646	9,9248	31,5991
3	0,1366	0,7649	1,2498	1,6377	2,3534	3,1824	4,5407	5,8409	12,9240
4	0,1338	0,7407	1,1896	1,5332	2,1318	2,7764	3,7469	4,6041	8,6103
5	0,1322	0,7267	1,1558	1,4759	2,0150	2,5706	3,3649	4,0321	6,8688
6	0,1311	0,7176	1,1342	1,4398	1,9432	2,4469	3,1427	3,7074	5,9588
7	0,1303	0,7111	1,1192	1,4149	1,8946	2,3646	2,9980	3,4995	5,4079
8	0,1297	0,7064	1,1081	1,3968	1,8595	2,3060	2,8965	3,3554	5,0413
9	0,1293	0,7027	1,0997	1,3830	1,8331	2,2622	2,8214	3,2498	4,7809
10	0,1289	0,6998	1,0931	1,3722	1,8125	2,2281	2,7638	3,1693	4,5869
11	0,1286	0,6974	1,0877	1,3634	1,7959	2,2010	2,7181	3,1058	4,4370
12	0,1283	0,6955	1,0832	1,3562	1,7823	2,1788	2,6810	3,0545	4,3178
13	0,1281	0,6938	1,0795	1,3502	1,7709	2,1604	2,6503	3,0123	4,2208
14	0,1280	0,6924	1,0763	1,3450	1,7613	2,1448	2,6245	2,9768	4,1405
15	0,1278	0,6912	1,0735	1,3406	1,7531	2,1314	2,6025	2,9467	4,0728
16	0,1277	0,6901	1,0711	1,3368	1,7459	2,1199	2,5835	2,9208	4,0150
17	0,1276	0,6892	1,0690	1,3334	1,7396	2,1098	2,5669	2,8982	3,9651
18	0,1274	0,6884	1,0672	1,3304	1,7341	2,1009	2,5524	2,8784	3,9216
19	0,1274	0,6876	1,0655	1,3277	1,7291	2,0930	2,5395	2,8609	3,8834
20	0,1273	0,6870	1,0640	1,3253	1,7247	2,0860	2,5280	2,8453	3,8495
21	0,1272	0,6864	1,0627	1,3232	1,7207	2,0796	2,5176	2,8314	3,8193
22	0,1271	0,6858	1,0614	1,3212	1,7171	2,0739	2,5083	2,8188	3,7921
23	0,1271	0,6853	1,0603	1,3195	1,7139	2,0687	2,4999	2,8073	3,7676
24	0,1270	0,6848	1,0593	1,3178	1,7109	2,0639	2,4922	2,7969	3,7454
25	0,1269	0,6844	1,0584	1,3163	1,7081	2,0595	2,4851	2,7874	3,7251
26	0,1269	0,6840	1,0575	1,3150	1,7056	2,0555	2,4786	2,7787	3,7066
27	0,1268	0,6837	1,0567	1,3137	1,7033	2,0518	2,4727	2,7707	3,6896
28	0,1268	0,6834	1,0560	1,3125	1,7011	2,0484	2,4671	2,7633	3,6739
29	0,1268	0,6830	1,0553	1,3114	1,6991	2,0452	2,4620	2,7564	3,6594
30	0,1267	0,6828	1,0547	1,3104	1,6973	2,0423	2,4573	2,7500	3,6460
40	0,1265	0,6807	1,0500	1,3031	1,6839	2,0211	2,4233	2,7045	3,5510
60	0,1262	0,6786	1,0455	1,2958	1,6706	2,0003	2,3901	2,6603	3,4602
80	0,1261	0,6776	1,0432	1,2922	1,6641	1,9901	2,3739	2,6387	3,4163
120	0,1259	0,6765	1,0409	1,2886	1,6577	1,9799	2,3578	2,6174	3,3735
$\infty$	0,1257	0,6745	1,0364	1,2816	1,6449	1,9600	2,3263	2,5758	3,2905

Lorsque  $\nu = \infty$ ,  $t_{1-\alpha/2}$  est le quantile d'ordre  $1 - \alpha/2$  de la loi normale  $\mathcal{N}(0, 1)$ .

## Annexes 02

Résultats des antibiogrammes 1 er essaie <i>Escherichia coli</i> 25922 (ATCC)							
La solution mère et les dilutions	SM	2/3	1/2	1/3	1/6	1/12	1/14
DO mesuré a 620 nm	1,009	0,69	0,496	0,302	0,172	0,05	0,012
McFarland		4	3	2	1	0,5	0,4
Densité cellulaire (CFU/mL)		$12 \times 10^8$	$9 \times 10^8$	$6 \times 10^8$	$3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
Ø des zones d'inhibition mm	Céfalotine	13	14	14	14	15	15
	Amoxicilline + acide clavulanique	10	10	10	10	10	10
	Gentamicine	16	16	16	16	17	17
	Ciprofloxacine	30	32	32	32	32	32
	Ampicilline	16	17	16	16	18	18

## Annexes 03

Résultats des antibiogrammes 2 éme essaie <i>Escherichia coli</i> 25922 (ATCC)							
La solution mère et les dilutions	SM	2/3	1/2	1/3	1/6	1/12	1/14
DO mesuré a 620 nm	0,9	0,5	0,3	0,25	0,14	0,08	0,082
McFarland		4	3	2	1	0,5	0,4
Densité cellulaire (CFU/mL)		$12 \times 10^8$	$9 \times 10^8$	$6 \times 10^8$	$3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
Ø des zones d'inhibition mm	Céfalotine	19	19	20	20	20	20
	Amoxicilline + acide clavulanique	9	10	10	10	10	10
	Gentamicine	16	27	27	27	28	28
	Ciprofloxacine	40	40	40	40	40	40
	Ampicilline	18	20	20	20	20	20

## Annexes 04

Résultats des antibiogrammes 3 <sup>ème</sup> essaie <i>Escherichia coli</i> 25922 (ATCC)							
La solution mère et les dilutions	SM	2/3	1/2	1/3	1/6	1/12	1/14
DO mesuré a 620 nm	0,954	0,595	0,398	0,276	0,156	0,065	0,047
McFarland		4	3	2	1	0,5	0,4
Densité cellulaire (CFU/mL)		$12 \times 10^8$	$9 \times 10^8$	$6 \times 10^8$	$3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
Ø des zones d'inhibition mm	Céfalotine	16	16,5	17	17	17,5	17,5
	Amoxicilline + acide clavulanique	9,5	9,75	10	10	10	10
	Gentamicine	16	21,5	21,5	21,5	22,5	22,5
	Ciprofloxacine	35	36	36	36	36	36
	Ampicilline	17	17,5	18	18	19	19

## Annexes 05

Résultats des antibiogrammes 1 <sup>er</sup> essaie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853 (ATCC)							
la solution mère et les dilutions	SM	2/3	1/2	1/3	1/4	1/9	1/11
DO mesuré a 620nm	1,06	0,67	0,52	0,36	0,23	0,1	0,12
McFarland		4	3	2	1	0,5	0,4
Densité cellulaire (CFU/mL)		$12 \times 10^8$	$9 \times 10^8$	$6 \times 10^8$	$3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
Ø des zones d'inhibition mm	Ticarcilline + acide clavulanique	8	10	10	11	12	12
	Ceftazidime	19	21	24	24	24	24
	Ciprofloxacine	32	32	32	32	34	34
	Aztréonam	0	0	0	9	9	13
	Amikacine	24	24	26	26	27	28

## Annexes 06

Résultats des antibiogrammes 2 <sup>ème</sup> essaie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853 (ATCC)							
la solution mère et les dilutions	SM	2/3	1/2	1/3	1/4	1/9	1/11
DO mesuré a 620nm	0,93	0,51	0,36	0,35	0,23	0,13	0,03
McFarland		4	3	2	1	0,5	0,4
Densité cellulaire (CFU/mL)		12 $\times 10^8$	9 $\times 10^8$	6 $\times 10^8$	3 $\times 10^8$	1,5 $\times 10^8$	1,2 $\times 10^8$
Ø des zones d'inhibition mm	Ticarcilline + acide clavulanique	8	10	10	11	12	12
	Ceftazidime	20	23	23	25	25	25
	Ciprofloxacine	34	34	36	36	38	40
	Aztréonam	0	7	7,5	8	10	11
	Amikacine	28	32	32	34	34	36

## Annexes 07

Résultats des antibiogrammes 3 <sup>ème</sup> essaie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853 (ATCC)							
la solution mère et les dilutions	SM	2/3	1/2	1/3	1/4	1/9	1/11
DO mesuré a 620nm	0,995	0,59	0,44	0,355	0,23	0,115	0,075
McFarland		4	3	2	1	0,5	0,4
Densité cellulaire (CFU/mL)		12 $\times 10^8$	9 $\times 10^8$	6 $\times 10^8$	3 $\times 10^8$	1,5 $\times 10^8$	1,2 $\times 10^8$
Ø des zones d'inhibition mm	Ticarcilline + acide clavulanique	8	10	10	11	12	12
	Ceftazidime	19,5	22	23,5	24,5	24,5	24,5
	Ciprofloxacine	33	33	34	34	36	37
	Aztréonam	0	3,5	3,75	8,5	9,5	12
	Amikacine	26	28	29	30	30,5	32

## Annexe 08

Résultats des antibiogrammes 1 er essaie <i>Staphylococcus aureus</i> 25923 (ATCC)							
La solution mère et les dilutions	SM	1/3	1/4	1/5	1/9	1/10	1/11
DO mesuré a 620nm	1,06	0,33	0,23	0,21	0,113	0,128	0,093
McFarland		4	3	2	1	0,5	0,4
Densité cellulaire (CFU/mL)		$12 \times 10^8$	$9 \times 10^8$	$6 \times 10^8$	$3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
Ø des zones d'inhibition mm	Céfoxitine	32	32	34	34	34	34
	Gentamicine	27	27	27	27	28	28
	Triméthoprim/sulfa méthoxazole (cotrimoxazole)	27	28	30	31	32	32
	Tétracycline	18	18,5	19	19	20	20
	Chloramphénicol	27	27	27	30	30	30

## Annexe 09

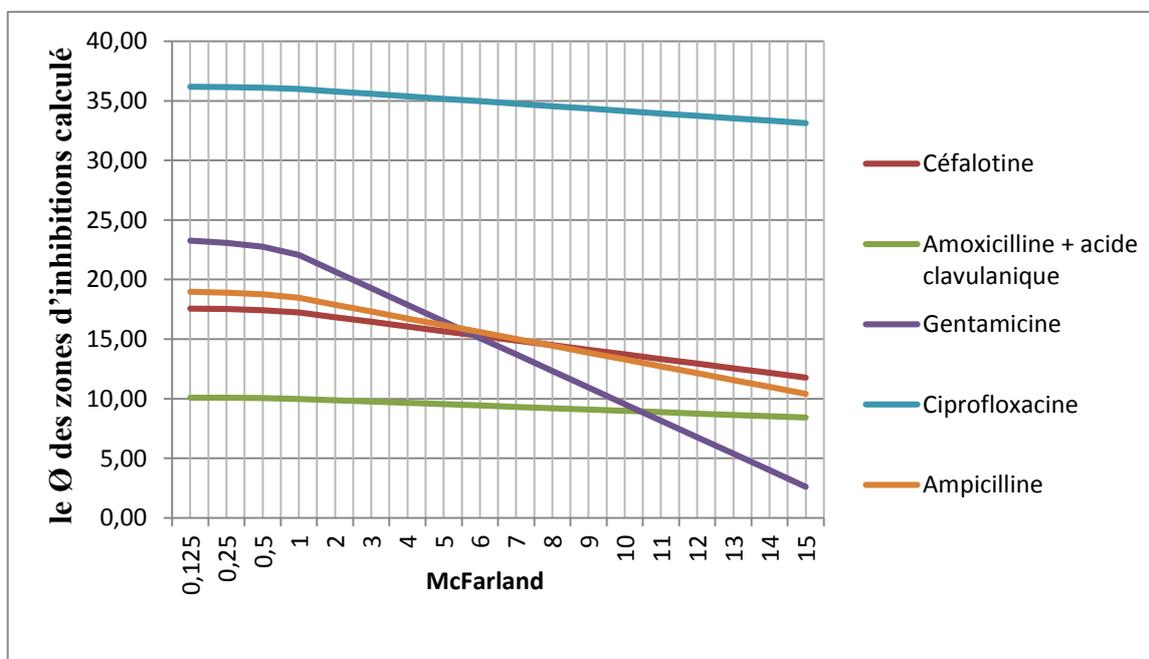
Résultats des antibiogrammes 2 éme essaie <i>Staphylococcus aureus</i> 25923 (ATCC)							
La solution mère et les dilutions	SM	1/3	1/4	1/5	1/9	1/10	1/11
DO mesuré a 620nm	0,95	0,21	0,19	0,14	0,13	0,17	0,13
McFarland		4	3	2	1	0,5	0,4
Densité cellulaire (CFU/mL)		$12 \times 10^8$	$9 \times 10^8$	$6 \times 10^8$	$3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
Ø des zones d'inhibition mm	Céfoxitine	19	19	19	20	20	21
	Gentamicine	30	33	33	33	33	33
	Triméthoprim/sulfa méthoxazole (cotrimoxazole)	25	25	25	26	27	28
	Tétracycline	36	36	38	38	38	39
	Chloramphénicol	23	24	25	25	25	25

## Annexe 10

Résultats des antibiogrammes 3 <sup>ème</sup> essai <i>Staphylococcus aureus</i> 25923 (ATCC)							
La solution mère et les dilutions	SM	1/3	1/4	1/5	1/9	1/10	1/11
DO mesuré à 620nm	1,005	0,27	0,21	0,175	0,1215	0,149	0,1115
McFarland		4	3	2	1	0,5	0,4
Densité cellulaire (CFU/mL)		$12 \times 10^8$	$9 \times 10^8$	$6 \times 10^8$	$3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
diamètre des zones d'inhibition	Céfoxitine	25,5	25,5	26,5	27	27	27,5
	Gentamicine	28,5	30	30	30	30,5	30,5
	Triméthoprim/sulfaméthoxazole (cotrimoxazole)	26	26,5	27,5	28,5	29,5	30
	Tétracycline	27	27,25	28,5	28,5	29	29,5
	Chloramphénicol	25	25,5	26	27,5	27,5	27,5

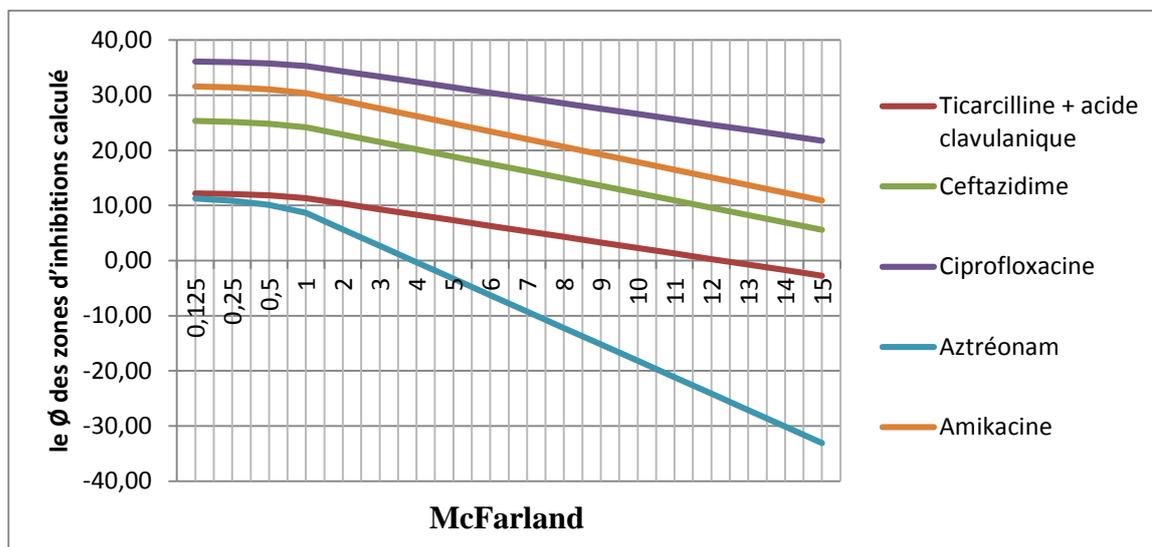
## Annexe 11

Courbes représentent la variation de diamètre de zone d'inhibition calculé en fonction de McFarland chez *Escherichia coli* 25922 (ATCC)



## Annexe 12

Courbes représentent la variation de diamètre de zone d'inhibition calculé en fonction de McFarland chez *Pseudomonas aeruginosa* 27853 (ATCC)



## Annexe 13

Courbes représentent la variation de diamètre de zone d'inhibition calculé en fonction de McFarland chez *Staphylococcus aureus* 25923 (ATCC)

