

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 science biologique
Spécialité : Biochimie appliquée

THEME

**Effet des milieux de culture sur la zone d'inhibition des
antibiogrammes des souches : *Escherichia coli* HO25,
Pseudomonas aeruginosa HO80 et *Staphylococcus aureus* HO90**

Présenté par

DAOUDI Yacine
DAOUDI Smail

Membres du jury

S. KRAIMAT
S. BELGHIT
N. BOURAS

Univ. de Ghardaïa (MCA)
Univ. de Ghardaïa (MCB)
Univ. de Ghardaïa (Pr)

Président
Examineur
Encadreur

Juin 2018

Dédicaces

Je dédie ce travail :

Ma mère, qui a œuvré 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

DAOUDI Yacine

DAOUDI Smail

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu « le tout Puissant » de nous avoir accordé la force et le courage afin de réaliser ce modeste travail.

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de contrôle de qualité « CACQE », El Atteuf (Ghardaïa).

Au terme de ce travail, nous tiens tout particulièrement à témoigner notre profonde gratitude à notre 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 nous encadrer et de nous suivre tout le long de nos travaux, de nous guider dans nos recherches, de nous consacrer beaucoup de son temps et de corriger ce manuscrit. Nous le remercions infiniment pour ses conseils judicieux et la confiance qui il nous a accordée.

Nous voudrions également exprimer toute notre gratitude et nos remerciements à directeur du CACQE, El Atteuf (Ghardaïa): M. Rezzag Moussa et les chercheurs du CACQE:

Moulay Abdallah Karima, Kchaou Nawel, Ouled Belkhir Mohamed et Hachemi Taher pour nous avoir accueillis dans leur laboratoire.

Nous remercions vivement les membres du jury :

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

Monsieur S. BELGHIT, Maître de conférences B à l'Université de Ghardaïa, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous voudrions également exprimer toute notre gratitude et nos remerciements à directeur du "Laboratoire d'Analyses Médicales El Amel": Dr. Hadjadj Sofiane et toute son équipe et M. El-Alouani Salah, pour leur aide et leurs encouragements ont été des atouts précieux.

.Nos sincères remerciements iront également à Monsieur le Dr Kheireddine Aliouche d'avoir fourni les souches bactériennes de notre étude.

Nous tenons à adresser nos vifs remerciements à Monsieur Ammi Saïd Mustapha, et toute son équipe pour leur aide.

Nous tenons à exprimer également nos reconnaissances à tous nos enseignants des différents niveaux d'étude qui nous ont formés.

Nous voudrions exprimer nos remerciements à toute personne que nous avons peut être oublié de citer et qui nous aurait aidé ou contribué à la réalisation de cette mémoire.

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

Merci

RESUME

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique. 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 milieux de culture hors le milieu Mueller-Hinton recommandé par l'OMS, des séries des antibiogrammes ont été effectuées sur neuf (09) milieux de culture et la lecture est réalisée après 24 d'incubation. Les souches bactériennes et les antibiotiques testés avaient été préalablement choisis. Les analyses statistiques: la moyenne et le test de significativité ont porté sur une série de trois répliques analytiques. Les moyennes des diamètres d'inhibition varient en fonction des milieux de culture utilisés.

Malgré cette variation des diamètres des zones d'inhibition à travers les neuf (09) milieux culture testés, le résultat de l'interprétation des antibiogrammes ne change pas, à l'exception de la gentamicine (GEN) pour *Escherichia coli* HO25, et GEN, TCC, CAZ et ATM pour *Pseudomonas aeruginosa* HO80 et GEN, AK et P pour *Staphylococcus aureus* HO90. Nous avons constaté donc que l'antibiogramme reste valable et efficace même si est réalisé sur ces neuf (09) milieux de culture, et le résultat est toujours interprétable avec tous les antibiotiques utilisés et avec les trois souches bactériennes testés.

Mots clés : Milieux de culture, zone d'inhibition, antibiogramme, bactérie.

ABSTRACT

The bute of performing an antibiogram is to predict the susceptibility of a germ to one or more antibiotics for essentially therapeutic purposes. The diffusion susceptibility test, the rules of which have been codified by the WHO, is widely used in medical pathology. In order to check the validity of the results obtained when the Mueller-Hinton medium is used next to culture media recommended by the WHO, antibiogram series have been performed on nine (09) culture media and the reading is performed after 24 hours of incubation. The bacterial strains and the antibiotics tested had previously been chosen. Statistical analyzes: the mean and the significance test were based on a series of three analytical replicas. The averages of the inhibition diameters vary depending on the culture media used.

Despite this variation in the diameters of the inhibition zones across the nine (09) culture media tested, the result of the interpretation of the antibiograms does not change, except GEN for *Escherichia coli* HO25, and except GEN, TCC, CAZ and ATM for *Pseudomonas aeruginosa* HO80 and except GEN, AK and P for *Staphylococcus aureus* HO90. Thus, the antibiogram remains effective even if it is carried out with these nine (09) culture media tested, the result is always interpretative with all the antibiotics tested and with the three bacterial strains.

Key words: Culture media, zone of inhibition, antibiogram, bacteria.

ملخص

الغرض من اختبار حساسية الميكروبات ضد المضادات الحيوية هو التنبؤ بحساسية البكتيريا لمضاد حيوي واحد أو أكثر لأغراض علاجية. ويستخدم اختبار حساسية الميكروبات ضد المضادات الحيوية بطريقة الانتشار، التي تم تدوين قواعدها من قبل منظمة الصحة العالمية، على نطاق واسع في علم الأمراض الطبية. وللتحقق من صحة النتائج عندما نستعمل أوساط مغذية أخرى لزرع للبكتيريا خلاف الوسط الغذائي " Mueller-Hinton " الذي أوصت به منظمة الصحة العالمية، قمنا باختبار حساسية الميكروبات ضد المضادات الحيوية على تسع (09) أوساط مغذية لزرع البكتيريا، حيث قرأنا نتائج الوسائط الغذائية لزرع البكتيريا بعد 24 ساعة من التحضين.

السلالات البكتيرية والمضادات الحيوية تم اختيارها مسبقا. ثم تمت بعد ذلك معالجة إحصائية للنتائج المتحصل عليها: متوسط النتائج بين التجارب، المعنى الإحصائي بين الأوساط المغذية لزرع للبكتيريا. المعالجة الإحصائية للنتائج أفضت إلى أن هناك تغير في قطر منطقة التثبيط عندما نغير الوسط المغذي لزراعة البكتيريا، إلا أن هذا التغير في قطر منطقة التثبيط لا يغير من النتيجة التفسيرية لاختبار حساسية المكروبات للمضادات الحيوية باستثناء مضاد GEN لـ *Escherichia coli* HO25 ، وباستثناء مضاد GEN و TCC و CAZ و ATM لـ *Pseudomonas aeruginosa* HO80 وباستثناء مضاد GEN و AK و P لـ *Staphylococcus aureus* HO90. وبالتالي اختبار حساسية الميكروبات ضد المضادات الحيوية يبقى فعالا حتى لو تم إجراؤه على هذه الأوساط المغذية التسع لزرع البكتيريا. وتبقى النتيجة دائما تفسيرية مع جميع المضادات الحيوية الأخرى التي تم اختبارها مع السلالات البكتيرية الثلاثة.

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

SOMMAIRE

Dédicaces

Remerciements

RESUME

INDEX DES TABLEAUX

INDEX DES FIGURES

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1	3
1 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	3
1.1 Généralités sur les antibiotiques	3
1.1.1 Historique	3
1.1.2 Définition	3
1.1.3 Classification	3
1.1.3.1 Leur origine	3
1.1.3.2 Mode d'action	4
1.1.3.3 Nature chimique	4
1.1.4 Cibles bactériennes des antibiotiques	5
1.2 Résistance des bactéries aux antibiotiques	6
1.2.1 Définition de la résistance	6
1.2.1.1 Résistance naturelle intrinsèque	7
1.2.1.2 Résistance acquise extrinsèque	7
1.2.2 Mécanismes de résistance	7
1.2.2.1 Mécanismes génétiques	7
1.2.2.2 Mécanismes biochimiques	8
1.3 Milieux de culture	9

1.3.1	Milieux de base _____	10
1.3.2	Milieux d'enrichissement _____	10
1.3.3	Milieux d'isolement _____	11
1.3.3.1	Géloses de base _____	11
1.3.3.2	Géloses enrichies _____	11
1.3.4	Caractères culturaux _____	13
1.3.4.1	<i>Enterobacteriaceae</i> _____	13
1.3.4.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> _____	14
1.3.4.3	<i>Staphylococcus spp</i> _____	15
1.4	Antibiogramme _____	16
1.4.1	Principe _____	16
1.4.2	Technique _____	17
1.4.3	Interprétation _____	17
	CHAPITRE 2 _____	21
2	MATÉRIEL ET MÉTHODES _____	21
2.1	Cadre d'étude _____	21
2.2	MATERIEL DU LABORATOIRE _____	21
2.2.1	Appareillage _____	21
2.2.2	Petit matériel _____	21
2.2.3	Produits chimiques _____	21
2.2.4	Matériel biologique _____	22
2.2.5	Milieux de culture _____	22
2.3	Méthodes utilisées _____	24
2.3.1	Antibiogramme par diffusion en milieu de culture _____	24
2.3.1.1	Préparation de la solution mère et ajustement de l'inoculum _____	24
2.3.1.2	Détermination de la concentration d'inoculum _____	24
2.3.1.3	Ensemencement _____	25
2.3.1.4	Choix des antibiotiques et incubation _____	25
2.3.1.5	Lecture et interprétation _____	30
2.3.2	Analyse statistique _____	30
	Préparation des suspension bactériennes _____	31
	CHAPITRE 3 _____	32

3	RESULTATES ET DISCUSSION	32
Partie I		33
3.1	<i>Escherichia coli</i> HO25	32
3.1.1	Résultats de l'antibiogramme	32
3.1.2	Interprétations des antibiogrammes	34
Partie II		36
3.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> HO80	36
3.2.1	Résultats de l'antibiogramme	36
3.2.2	Interprétations des antibiogrammes	38
Partie III		40
3.3	<i>Staphylococcus aureus</i> HO90	40
3.3.1	Résultats de l'antibiogramme	40
3.3.2	Interprétations des antibiogrammes	44
4	Discussion générale	46
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	47
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	49
	ANNEXES	53

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1. Classification des antibiotiques en fonction de leur mode d'action (FMC, 2017).	4
Tableau 2. Classification de quelques antibiotiques selon leur spectre d'action (Abismail, 2017).	4
Tableau 3. Antibiotiques bactériostatiques et bactéricides (Van Bambeke et al., 2008).	5
Tableau 4: Résumé de la résistance aux grandes familles d'antibiotiques (Ndorma, 2004).	9
Tableau 5. Composition des principaux milieux de culture (François et al., 2016).	12
Tableau 6. Liste des antibiotiques testés sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CA-SFM, 2015).	18
Tableau 7. Les Antibiotiques testés et les valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour <i>S. aureus</i> (CA-SFM, 2015).	20
Tableau 8. Description des souches utilisé (Beddou, 2015; Grosjean, et al., 2011).	22
Tableau 9. Familles des antibiotiques utilisés (CA-SFM, 2010).	26
Tableau 10. Les diamètres des zones d'inhibition (en mm) obtenus pour chaque milieu de culture / combinaison d'antibiotiques pour <i>Escherichia coli</i> HO25.	32
Tableau 11. Normes de performance pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens (en mm) utilisés pour les entérobactéries (Standardisation des antibiogrammes pour la médecine humaine et vétérinaire, 2011).	34
Tableau 12. Interprétations des antibiogrammes selon le Ø des zones d'inhibitions pour d' <i>Escherichia coli</i> HO25.	35
Tableau 13. Les diamètres des zones d'inhibition (en mm) obtenus pour chaque milieu de culture / combinaison d'antibiotiques pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> HO80.	36
Tableau 14. Interprétations des antibiogrammes selon le Ø des zones d'inhibitions pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> HO80.	39
Tableau 15. Les diamètres des zones d'inhibition (en mm) obtenus pour chaque milieu de culture / combinaison d'antibiotiques pour <i>Staphylococcus aureus</i> HO90.	41
Tableau 16. Interprétations des antibiogrammes selon le Ø des zones d'inhibitions pour <i>Staphylococcus aureus</i> HO90.	45

INDEX DES FIGURES

Figure 1. Situe les cibles des principaux antibiotiques (FMC 2017).	6
Figure 2. Schéma récapitulatif des mécanismes de résistance aux antibiotiques (Bouchakour, 2016).	8
Figure 3. Aspect des cultures des différentes espèces d'entérobactéries sur géloses spéciales.	14
Figure 4. Production de pyocyanine et de pyoverdine caractéristique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur milieux de King A et B (A). La pyocyanine est hydrosoluble (à gauche) et la pyoverdine soluble dans le chloroforme (à droite) (B) (François <i>et al.</i> , 2016).	15
Figure 5. A. Gram de <i>S. aureus</i> (positif). B. <i>Staphylocoques</i> en microscopie à balayage. (Elsevier Masson, 2016).	16
Figure 6. Exemple des milieux de culture préparés au niveau du laboratoire « TSA, Sabouraud et PDA» (Photo Originale).	23
Figure 7. Aspect des cultures des 3 souches bactériennes sur géloses chromagar, incubées à 37 °C durant 24 h. (Photo Original).	23
Figure 8. Mesure de la densité optique (DO) par un spectrophotomètre (Photo Originale).	24
Figure 9. Ensemencement les trois souches bactériennes et application des disques d'antibiotiques (Photo Originale).	29
Figure 10. Incubation des boîtes de Pétri dans l'étuve à 37°C durant 24 h (Photo Originale).	29
Figure 11. Principe de la lecture d'un antibiogramme (Photo Originale).	30
Figure 12. Etapes expérimentales.	31
Figure 13. Résultats des antibiogrammes obtenus pour la souche <i>Escherichia coli</i> HO25 (Photo Originale).	33
Figure 14. La variation de diamètre des zones d'inhibition en fonction des milieux de culture chez <i>Escherichia coli</i> HO25.	33
Figure 15. La courbe de teste de Tukey des différentes signification entre les milieux de culture pour <i>Escherichia coli</i> HO25.	34
Figure 16. Résultats des antibiogrammes pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> HO80 (Photo Originale).	37
Figure 17. Variation de diamètre des zones d'inhibition en fonction des milieux de culture chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> HO80.	37

Figure 18. La courbe de teste de Tukey des différentes signification entre les milieux de culture pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> HO80. _____	38
Figure 19. Résultats des antibiogrammes pour <i>Staphylococcus aureus</i> HO90 (Photo Originale) _____	42
Figure 20. Variation de diamètre des zones d'inhibition en fonction des milieux de culture chez <i>Staphylococcus aureus</i> HO90. _____	43
Figure 21. La courbe de teste de Tukey des différentes signification entre les milieux de culture pour <i>Staphylococcus aureus</i> HO90. _____	44

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN: acide désoxyribonucléique
AFSSA: Agence française de sécurité sanitaire des aliments
AK: Amikacine
AM: Ampicilline
AMC: Amoxicilline + acide clavulanique
ARN: acide ribonucléique
BAM: Milieu d'agar de Bennett.
CASFM: Comité de l'Antibiogramme de Société Française de Microbiologie
CD: Clindamycine
CEP: Céfalotine
CLED: Cystine-Lactose-Electrolyte Déficient
CLSI: The Clinical and Laboratory Standards Institute
COT: Triméthoprime/sulfaméthoxazole (cotrimoxazole)
CTX: Céfotaxime
CX: Céfoxitine
DO: Densité Optique
E: Erythromycine
FOS: Fosfomycine
GEN: Gentamicine
GN: gélose nutritive.
HK: gélose Hektoen.
ISP2: International *Streptomyces* Projet 2.
MH: Mueller-Hinton.
MHA: gélose de Mueller-Hinton.
MLS: macrolides-lincosamides-streptogramines
MSA: Sel de mannitol Agar = milieu de Chapman.
OF: Ofloxaine
OMS: Organisation mondiale de la santé
P: Pénicilline
PDA: Gélose de pomme de terre et dextrose.
PLP: protéines liant les pénicillines"
PR: Pristinamycine
R: Rifampicine
SA: Gélose de Sabouraud.
SCN: Staphylocoque à coagulase négatif
SCV: small colony variants
TE: Tétracycline
TSA: Gélose trypticase soja.

INTRODUCTION



De nombreuses méthodes ont été décrites dans la littérature pour les tests antibactérien de la sensibilité des souches bactériennes de l'environnement et/ou médical et/ou vétérinaire, y compris la dilution en milieu liquide (Perreten *et al.*, 1997), la diffusion en milieu gélosé appelée aussi diffusion-disque (Perreten *et al.*, 1998), et la dilution en gélose (Butaye *et al.*, 2000). Parmi ces techniques, la méthode de diffusion sur disque est la plus largement utilisée dans les laboratoires médicaux et de recherche, en raison de son degré de fiabilité vers la standardisation de l'antibiotique, sa concentration et sa relative facilité de performance (Huys *et al.*, 2002).

Le premier rôle de tous les composants de milieu de culture, dans le test de diffusion de disque, est de fournir les éléments nutritifs nécessaires pour supporter la croissance de la bactérie testée. De plus, le milieu solide fournit une matrice appropriée permet une diffusion uniforme et reproductible de l'antibiotique qui minimise les interactions chimiques possibles entre les composants du milieu et l'antibiotique (Huys *et al.*, 2002). La méthode de diffusion de disque a été recommandée par le Comité Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (ACFMS) et aussi par le Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des bactéries aux antibiotiques (ANMRBA), c'est-à-dire la gélose de Mueller-Hinton (= Müller Hinton) est considérée comme étant le milieu qui contient le moins d'antagonistes vis-à-vis la majorité des molécules antimicrobiennes (Huys *et al.*, 2002).

Par la suite, la gélose Mueller-Hinton est le seul milieu de culture recommandé pour réaliser les antibiogrammes (Standardisation des antibiogrammes au niveau national, pour la médecine humaine et vétérinaire, 2011).

Cette étude vienne pour résoudre la problématique suivante : est-ce que on peut remplacer le milieu Mueller-Hinton par d'autre milieux de culture dans les antibiogrammes?

À notre connaissance, très peu de données ont été publiées sur l'effet des milieux de culture dans les tests de susceptibilité par diffusion sur disque dans le cadre de la réalisation des antibiogrammes.

Donc notre étude a un objective de vérifier l'effet des milieux de culture sur la zone d'inhibition de trois souches bactériennes.

Dans la présente étude, plusieurs milieux de culture solides ont été comparés avec le milieu de culture de référence, le milieu Mueller-Hinton, par l'essai de diffusion de disque de trois

souches bactériennes : *Escherichia coli* HO25, *Pseudomonas aeruginosa* HO80 et *Staphylococcus aureus* HO90. Dans cette étude, neuf (09) milieux de culture complexes ont été évalués avec 25 antibiotiques pour évaluer le changement des valeurs des zones d'inhibitions.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à une présentation bibliographique sur la classification des antibiotiques, leur spectre et leur mode d'action, les milieux de culture et les caractères culturels des souches bactériennes testées.

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.

Le but de ce travail est de vérifier l'effet des milieux de culture sur la zone d'inhibition des trois bactéries testées, à savoir *Escherichia coli* HO25, *Pseudomonas aeruginosa* HO80 et *Staphylococcus aureus* HO90. Cette vérification permet de choisir les milieux de culture adéquats qui peuvent être utilisés à côté de milieu Mueller-Hinton dans les antibiogrammes.

CHAPITRE 1



REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Généralités sur les antibiotiques

1.1.1 Historique

Le terme d'antibiose créé par Vuillemin (France) en 1889 rend compte de ce phénomène et l'idée de l'utiliser pour lutter contre les maladies bactériennes.

En 1928, Fleming (Grande Bretagne) constate que les staphylocoques ensemencés sur une gélose nutritive ne se sont pas développés à proximité d'un champignon de type *Penicillium*, il émet l'hypothèse que le *Penicillium* secrète une molécule qui inhibe le développement des staphylocoques. La pénicilline fut le premier antibiotique utilisé à partir de 1942 (Pechere, 1991).

En 1944, la streptomycine est découverte; et en 1952, l'érythromycine est commercialisée; et en 1956 la vancomycine est découverte. Suivent alors le développement des quinolones à partir de 1962 et leurs dérivés, les fluoroquinolones dans les années 1980 et le linézolide en 2000 (Bouchakour, 2016).

1.1.2 Définition

Les antibiotiques sont des molécules produites par des champignons, des bactéries, ou par synthèse chimique; capables d'inhiber la multiplication d'une bactérie ou de la tuer sans affecter l'hôte. Pour que l'antibiotique choisi puisse être actif sur le/les germe(s) à l'origine de l'infection, il faut :

- Qu'il reconnaisse et atteigne la cible: pénétrer à travers la membrane externe hydrophobe des bactéries à Gram négatif par le biais des porines, ou par diffusion passive chez les bactéries à Gram positif.
- Qu'il possède un mode d'action qui lui permette d'agir sur ce germe.
- Qu'il parvienne là où est ce germe, à des concentrations suffisantes de sa forme active, jusqu'au site d'action (au niveau du germe).
- Qu'il y reste le temps suffisant pour lui permettre soit de le détruire (bactéricidie) soit d'en arrêter la multiplication (bactériostase) (Bouchakour, 2016).

1.1.3 Classification

La classification des antibiotiques peut se faire selon:

1.1.3.1 Leur origine

élaboré par un organisme (naturel) ou produit par synthèse chimique (synthétique ou semi synthétique).

1.1.3.2 Mode d'action

il agit sur la paroi, la membrane cytoplasmique, la synthèse des protéines ou la synthèse des acides nucléiques (Bouchakour, 2016).

Les tableaux 1 et 2, résument les principales familles d'antibiotiques et leurs cibles et spectre d'action.

Tableau 1. Classification des antibiotiques en fonction de leur mode d'action (FMC, 2017).

Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne	Inhibition de la synthèse de l'ADN	Inhibition de la synthèse des protéines	Lésions de la membrane
bêta-lactamines glycopeptides lipoglycopeptides fosfomycine	quinolones ansamycines 5-nitro-imidazolés nitrofuranes sulfamides benzylpyrimidines	aminoglycosides tétracyclines macrolides lincosamides streptogramines phénicolés acide fusidique	polymyxines

Tableau 2. Classification de quelques antibiotiques selon leur spectre d'action (Abismail, 2017).

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.

1.1.3.3 Nature chimique

très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex: cycle β lactame) sur laquelle il y a hémi-synthèse. La classification selon la nature chimique, nous permet de classer les antibiotiques en familles (β -lactamines, aminosides, tétracyclines, etc.) (Mohammedi, 2010). La classification des antibiotiques est basée sur leur modalité d'action: antibiotiques bactériostatiques ou bactéricides (Van bambeke *et al.*, 2008).

Le tableau 3 présente la classification des antibiotiques selon leur action (bactériostatique ou bactéricide).

Tableau 3. Antibiotiques bactériostatiques et bactéricides (Van Bambeke *et al.*, 2008).

Classes d'antibiotiques a action	
Bactériostatique	Bactéricide
Macrolides Sulfamidés Tétracyclines Lincosamides Nitrofuranes Phénicolés Ethambutol Cyclosérine	β -lactames Fluoroquinolones Aminoglycosides Nitroimidazoles Glycopeptides (Bactéricidie lente) Polymyxines Synergistines Ansamycines Acide fusidique Isoniazide Pyrazinamide

1.1.4 Cibles bactériennes des antibiotiques

Les antibiotiques interagissent avec une cible, entraînant une altération de la physiologie bactérienne inhibition de la croissance (effet bactériostatique) ou du métabolisme, entraînant la mort cellulaire (effet bactéricide). Les différentes cibles possibles des antibiotiques sont :

Les enzymes bactériennes à l'origine de la synthèse de certains éléments de la paroi bactérienne (par exemple les protéines liant les pénicillines [PLP]).

Les enzymes bactériennes à l'origine de la synthèse de l'acide désoxyribonucléique (ADN).
 Antibiotiques inhibition de la synthèse des protéines (FMC 2017).

La figure 1 montre les sites des cibles des principaux antibiotiques.

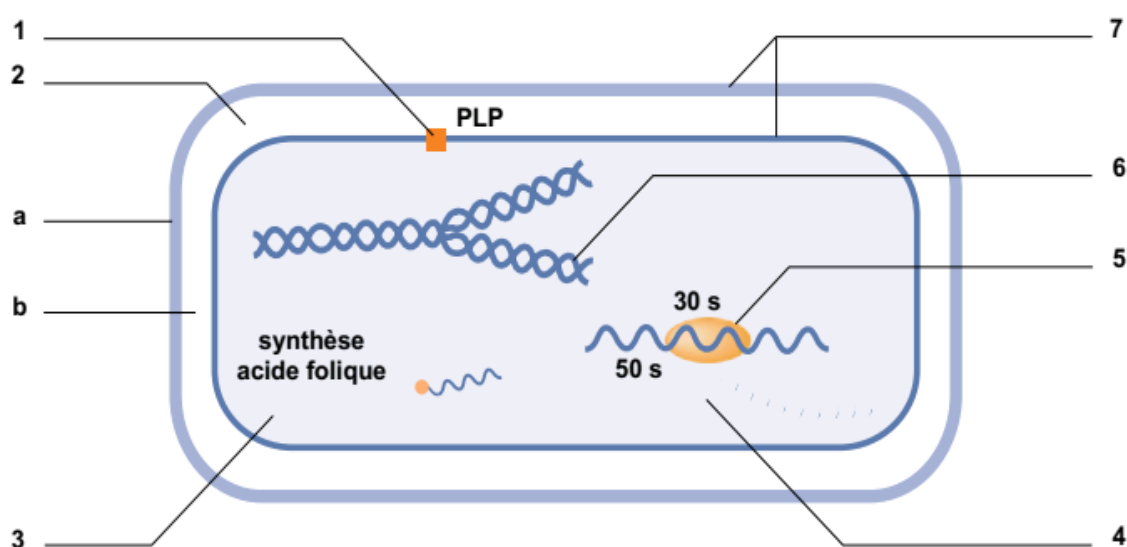


Figure 1. Les cibles des principaux antibiotiques (FMC 2017).

a. Paroi bactérienne; b. espace périplasmique; 1. bêtalactamine (PLP); 2. glycopeptides (D ala); 3. dihydroptérorate synthétase (sulfamides); 4. fixation à la sous-unité 50S du ribosome (macrolides, synergistines, lincosamides, phénicolés); 5. fixation à la sous-unité 30S du ribosome (aminosides, tétracyclines); 6. Acides nucléiques (quinolones, rifamycines, nitroimidazolés); 7. membranes cytoplasmiques (polymyxines) (FMC 2017).

1.2 Résistance des bactéries aux antibiotiques

1.2.1 Définition de la résistance

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a proposé deux définitions de la résistance:

La première stipule qu'une souche est dite « résistante » quand elle supporte une concentration d'antibiotique notablement plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce (AFSSA, 2006).

La deuxième définition, basée sur des critères pharmacologiques et cliniques, définit une souche résistante lorsque la concentration d'antibiotique qu'elle est capable de supporter est plus élevée que la concentration qu'il est possible d'atteindre *in vivo*.

Cette résistance est classée en deux types : la résistance naturelle et la résistance acquise.

1.2.1.1 Résistance naturelle intrinsèque

Est une caractéristique propre à une espèce bactérienne et partagée par toutes les souches de cette espèce. Elle peut être due à la présence d'un gène chromosomique commun à toutes les bactéries de l'espèce (Carles, 2009).

1.2.1.2 Résistance acquise extrinsèque

Est présente seulement dans certaines souches de l'espèce. Cette résistance résulte d'une modification génétique par mutation chromosomique ou d'une acquisition de matériel génétique étranger (plasmides, transposons et intégrons) (Sabine robert-dernuet, 1995).

L'accumulation de ces deux types de résistance rend une bactérie sensible qu'à un petit nombre d'antibiotiques habituellement actifs en thérapeutique, on parle d'une bactérie « multirésistante ».

1.2.2 Mécanismes de résistance

1.2.2.1 Mécanismes génétiques

Le potentiel génétique d'une bactérie est constitué du chromosome extra-génomiques (les plasmides). Une bactérie peut ainsi acquérir une résistance aux antibiotiques par deux grands mécanismes génétiques.

1.2.2.1.1 Résistance chromosomique

Soit par mutation ponctuelle dans un gène de résistance ou dans un gène de structure, ou bien par remaniement du génome. Toutes ces mutations ont pour conséquence la perte ou la modification d'une protéine structurale ou enzymatique et une bactérie mutée souvent contre-sélectionnée en l'absence d'antibiotique. Cette mutation est transmissible et permanente : transmission verticale à la descendance de bactérie-mère à bactéries-filles (Bouchakour, 2016).

1.2.2.1.2 Résistance extra chromosomique

Les plasmides sont des fragments d'ADN que certaines bactéries ont à côté de leur chromosome. Les gènes qu'ils portent ne sont pas indispensables à la bactérie mais lui sont souvent avantageux, ils sont transférables d'une bactérie à l'autre par conjugaison, par transduction ou par transformation, ce qui permet un transfert horizontal qui est à l'origine d'une dissémination très importante de la résistance au sein des populations bactériennes.

Une bactérie peut héberger plusieurs plasmides et un plasmide peut véhiculer plusieurs gènes de résistance. L'acquisition d'un tel plasmide par une bactérie lui permet d'être multirésistante en une seule étape (Bouchakour, 2016).

1.2.2.2 Mécanismes biochimiques

Les mécanismes biochimiques de la résistance acquise peuvent être regroupés en trois grands types de mécanismes (figure 2):

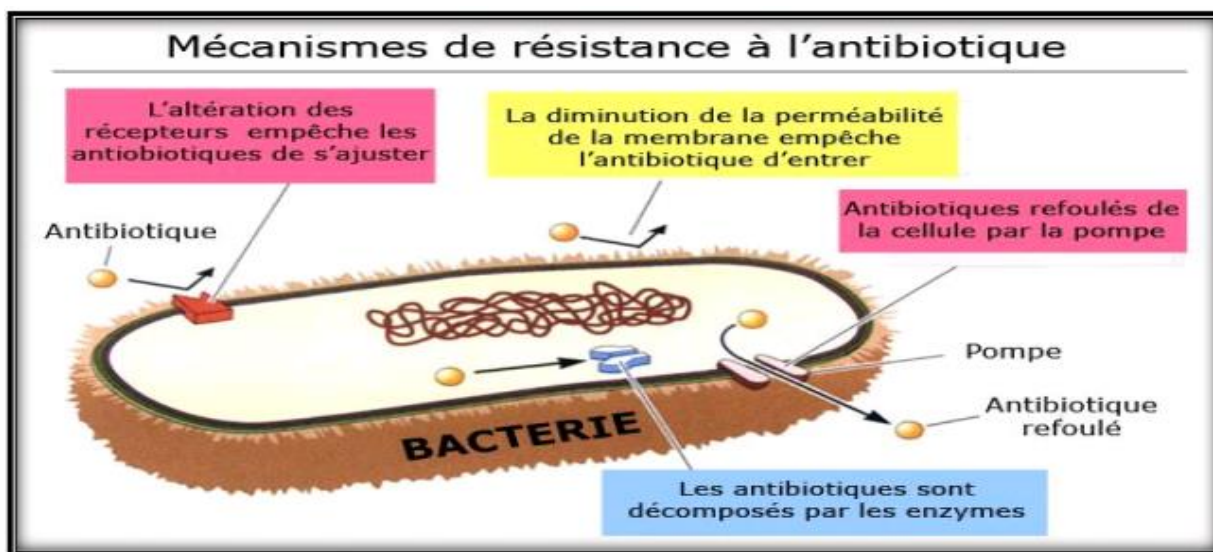


Figure 2. Schéma récapitulatif des mécanismes de résistance aux antibiotiques (Bouchakour, 2016).

1.2.2.2.1 Diminution de la perméabilité

Par mutation affectant la structure, ou diminuant la synthèse des porines par lesquelles l'antibiotique peut pénétrer dans la bactérie, et par efflux actif : l'efflux repose sur une pompe insérée dans la membrane et capable d'éjecter l'antibiotique hors de la bactérie grâce un canal; cet efflux conduit à une diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique.

1.2.2.2.2 Modification de la cible des antibiotiques

Une enzyme spécifique effectue une modification chimique covalente de la cible, ce qui inhibe la fixation de l'antibiotique sans qu'il y ait altération du génome. Exemple : Modification des PLP "protéines liant les pénicillines" qui sont des enzymes qui catalysent la biosynthèse du peptidoglycane et qui sont la cible des bêta-lactamines (Bouchakour, 2016).

1.2.2.2.3 Par inactivation enzymatique

Certaines bactéries vont produire des enzymes capables de modifier (ou de détruire) un antibiotique, conduisant à son inactivité. Les principales familles d'antibiotiques concernées sont les β -lactamines, les aminosides, la famille des macrolides-lincosamides-streptogramines (MLS) et les phénicolés (COPYRIGHT MEDQUAL, 2012).

Le tableau 4 résume la résistance aux grandes familles d'antibiotiques.

Tableau 4: Résumé de la résistance aux grandes familles d'antibiotiques (Ndorma, 2004).

Antibiotiques	Résistance chromosomique	Résistance extra chromosomique
Aminosides	Diminution de la perméabilité Modification de la cible (protéine S 12 de la sous-unité 30 S) Diminution de la perméabilité	Inactivation enzymatique par des acétyltransférases, des nucléotidyltransférases et des phosphotransférases
β -lactamines	Diminution d'affinité des PLP	
Glycopeptides	Augmentation de la synthèse des PLP Synthèse de nouvelles PLP	Modification de la cible (synthèse de D alanine-D-lactate au lieu de peptide D-alanyl D-alanine) Hydrolyse du peptide D-alanyl-D-alanine)
Macrolides et apparentés	Inactivation enzymatique par des céphalosporinases	Méthylation de l'ARNr
Quinolones	Diminution de la perméabilité Modification de la cible (gène gyrA, gyrB, parC)	Efflux actif spécifique inactivation enzymatique par des chloramphénicol acétyltransférases
Rifampicines	Modification de la cible (ARN polymérase AND dépendante) Diminution de la perméabilité	
Sulfamides	Modification par mutation de la dihydroptéroate synthétase	dihydroptéroate synthétase additionnelle et sans affinité pour les sulfamides
Tétracyclines	Diminution de la perméabilité	Efflux actif spécifique
Triméthoprime	la dihydrofolate réductase additionnelle et insensible au triméthoprime Diminution de la perméabilité	Modification par mutation de la dihydrofolate réductase

1.3 Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés en bactériologie doivent contenir les éléments nécessaires à la survie et à la multiplication des bactéries et doivent posséder les propriétés

physicochimiques convenant à cette culture (pH en particulier). Les milieux sont de différents types. Il s'agit soit de milieux de base, permettant la croissance d'espèces non ou peu exigeantes, soit de milieux enrichis par l'addition de diverses substances (sérum, œuf, sang, vitamines, etc.) qui autorisent la croissance de bactéries plus exigeantes. Il peut s'agir également de milieux rendus sélectifs par addition d'antibiotiques Résumé de la résistance aux grandes familles d'antibiotiques (Ndorma, 2012). d'antiseptiques ou de colorants qui vont inhiber les bactéries sensibles à ces composés (François *et al.*, 2016).

1.3.1 Milieux de base

Le milieu liquide de base est représenté par le bouillon nutritif ordinaire qui est composé de trois composants principaux, les peptones, les extraits de viande et les extraits de levure. Les peptones sont des hydrolysats enzymatiques de protéines animales ou végétales riches en acides aminés et en petits peptides. En fonction des enzymes utilisées, les compositions des peptones et leurs propriétés sont différentes. Les extraits de viande apportent des sels minéraux, des vitamines, des protéines peu dégradées et des glucides. Les extraits de levure, quant à eux, représentent une source d'acides aminés et de vitamines hydrosolubles. Du chlorure de sodium est habituellement ajouté à la concentration de 5 g/L. Les milieux se présentent sous forme liquide ou sous forme solide. Par addition dans les milieux liquides d'un agent solidifiant, on obtient des milieux solides appelés communément gélose. En effet, l'agent le plus souvent utilisé est l'agar-agar (agar ou gélose) qui est un polysaccharide complexe provenant d'algues marines. Cette substance permet, à des concentrations de 15 à 20 g/L, de solidifier les milieux liquides. Cette gélose fond à 80 °C, reste en surfusion à des températures voisines de 50 °C et se solidifie à des températures inférieures. D'autres agents solidifiants peuvent être utilisés, comme les œufs coagulés dans le milieu de Löwenstein-Jensen utilisé pour la recherche des mycobactéries et le sérum coagulé pour le milieu de Loeffler utilisé pour la recherche du bacille de la diphtérie (François *et al.*, 2016).

1.3.2 Milieux d'enrichissement

Ces milieux permettent de favoriser une croissance bactérienne à partir de prélèvements microbiens. Il s'agit en général de milieux liquides riches permettant la multiplication de bactéries, y compris des milieux permettant le développement de bactéries anaérobies strictes. Parmi les plus utilisés, le bouillon nutritif, le milieu de Schaedler, le milieu cœur-cerveau (*brain-heart infusion* [BHI]), le milieu de Rosenow. Des milieux d'enrichissement peuvent également être utilisés pour favoriser le développement de certaines bactéries de façon

préférentielle aux bactéries présentes dans des flores. Il s'agit dans ce cas de milieux d'enrichissement sélectifs. Ainsi, la recherche par exemple de bactéries entéropathogènes dans les coprocultures utilise ces milieux (milieu de Muller-Kauffmann, eau peptonée alcaline, etc.). Le milieu de Muller Kauffmann ou bouillon de base au tétrathionate est un milieu d'enrichissement sélectif pour les salmonelles contenant de la bile et du vert brillant. La composition des milieux de culture est présentée dans (Tableau 5) (François *et al.*, 2016).

1.3.3 Milieux d'isolement

Les milieux d'isolement, contrairement aux précédents, sont des milieux solides qui permettent d'obtenir des colonies isolées permettant d'effectuer les tests d'identification ou d'étudier la sensibilité aux antibiotiques des bactéries d'intérêt médical. Seules les géloses les plus couramment utilisées seront abordées (François *et al.*, 2016).

1.3.3.1 Géloses de base

Ces géloses sont constituées par les géloses nutritives ordinaires, les géloses tryptone soja (ou trypticase soja). Ces milieux permettent la culture des bactéries non exigeantes (Tableau 5). Par exemple, la gélose de base Columbia est un milieu hautement nutritif permettant la culture des germes exigeants. La gélose CLED (Cystine-Lactose-Electrolyte Déficient) est un milieu recommandé pour l'analyse bactériologique des urines. Ce milieu permet la croissance et l'isolement de la plupart des bactéries responsables d'infections urinaires. La déficience en électrolytes s'accompagne d'une absence de mobilité des *Proteus* (François *et al.*, 2016).

1.3.3.2 Géloses enrichies

Géloses au sang frais: les géloses au sang frais, en général sang de mouton ou de cheval, sont obtenues en ajoutant à des géloses ordinaires du sang frais dans des proportions de 5 à 10 % en volume. Ce sont des géloses qui permettent la croissance des bactéries exigeantes grâce à la présence de facteurs de croissance contenus dans le sang.

Géloses au sang cuit : Les géloses au sang cuit, appelées géloses « chocolat », permettent de libérer par la cuisson des facteurs de croissance supplémentaires (François *et al.*, 2016).

Tableau 5. Composition des principaux milieux de culture (François *et al.*, 2016).

Bouillon nutritif			
▪ Extrait de viande de bœuf	1 g/l	▪ Chlorure de sodium	5 g/l
▪ Extrait de levure	2 g/l	▪ Agar	10 g/l
▪ Peptone	5 g/l	▪ pH 7,3 ± 0,2	
▪ Chlorure de sodium	5 g/l	Gélose CLED (cystine-lactose-électrolyte déficient)	
▪ pH 7,4 ± 0,2		▪ Peptone	4 g/l
Bouillon cœur-cervelle		▪ Extrait de viande de bœuf	3 g/l
▪ Infusion de cervelle de veau	12,5 g/l	▪ Tryptone	4 g/l
▪ Infusion de cœur de bœuf	5 g/l	▪ Lactose	10 g/l
▪ Protéose-peptone	10 g/l	▪ L-cystine	0,128 g/l
▪ Glucose	2 g/l	▪ Bleu de bromothymol	0,02 g/l
▪ Chlorure de sodium	5 g/l	▪ Agar	15 g/l
▪ Phosphate disodique	2,5 g/l	▪ pH 7,3 ± 0,2	
▪ pH 7,4 ± 0,2		Gélose de Mueller-Hinton (MH)	
Bouillon de Schaedler		▪ Infusion de viande de bœuf	300 g/l
▪ Bouillon tryptone soja	10 g/l	▪ Hydrolysate de caséine	17,5 g/l
▪ Peptone spéciale	5 g/l	▪ Amidon	1,5 g/l
▪ Extrait de levure	5 g/l	▪ Agar	17 g/l
▪ Glucose	5 g/l	▪ pH 7,4 ± 0,2	
▪ Chlorhydrate de cystéine	0,4 g/l	Gélose HTM (<i>Haemophilus Test Medium</i>)	
▪ Hémine	0,01 g/l	▪ Gélose de Mueller-Hinton	38 g/l
▪ Tampon Tris	0,75 g/l	▪ Extrait de levure	5 g/l
▪ pH 7,4 ± 0,2		▪ pH 7,4 ± 0,2	
Gélose nutritive ordinaire		Ce milieu est supplémenté en hémine et en NAD, indispensables à la croissance de <i>H. influenzae</i> .	
▪ Extrait de viande de bœuf	1 g/l	Gélose de Wilkins-Chalgren	
▪ Extrait de levure	2 g/l	▪ Tryptone	10 g/l
▪ Peptone	5 g/l	▪ Peptone de gélatine	10 g/l
▪ Chlorure de sodium	5 g/l	▪ Extrait de levure	5 g/l
▪ Agar	15 g/l	▪ Glucose	1 g/l
▪ pH 7,4 ± 0,2		▪ Chlorure de sodium	5 g/l
Gélose tryptone soja (TS)		▪ L-arginine	1 g/l
▪ Tryptone (hydrolysate trypsique de caséine)	15 g/l	▪ Pyruvate de sodium	1 g/l
▪ Peptone de soja	5 g/l	▪ Ménadione	0,0005 g/l
▪ Chlorure de sodium	5 g/l	▪ Hémine	0,005 g/l
▪ Agar	15 g/l	▪ Agar	10 g/l
▪ pH 7,3 ± 0,2		▪ pH 7,1 ± 0,2	
Gélose de base Columbia			
▪ Peptone (hydrolysate pepsique de viande)	23 g/l		
▪ Amidon	1 g/l		

1.3.4 Caractères cultureux

1.3.4.1 *Enterobacteriaceae*

L'ensemble de ces bactéries pousse habituellement très aisément sur milieux ordinaires. La température optimale de croissance est généralement de 35 à 37 °C, à l'exception des *Yersinia* (30 à 37 °C), des *Pantoea* et des *Erwinia* (27 à 30 °C), certaines ne poussant pas à 37 °C. Elles sont toutes aéro-anaérobies facultatives, encore que certaines *Erwinia* puissent donner une culture plus lente en anaérobiose.

L'aspect général des colonies de ces bactéries sur gélose nutritive est florissant: colonie de 1 à 3 mm de diamètre généralement bombées, lisses et brillantes. Il existe de nombreuses exceptions:

Colonies petites pour *Shigella dysenteriae*, *Salmonella Typhi* et *Yersinia*, envahissement de la gélose en voile, montrant des vagues successives pour *Proteus mirabilis* et *Proteus vulgaris*.

Le plus souvent, ces colonies sont opaques et blanchâtres, mais il en est de plus transparentes telles les *Salmonella*, des pigmentées telles les *Serratia* en rouge ou les *Erwinia* en jaune.

Les *Klebsiella* forment des colonies souvent très muqueuses, larges et luisantes. Enfin, des dissociations peuvent s'observer entre variantes: muqueux, lisse ou *smooth* (S), rugueux ou *rough* (R) (François *et al.*, 2016).

La Figure 3 montre l'aspect des cultures des différentes espèces d'entérobactéries sur géloses spéciales.

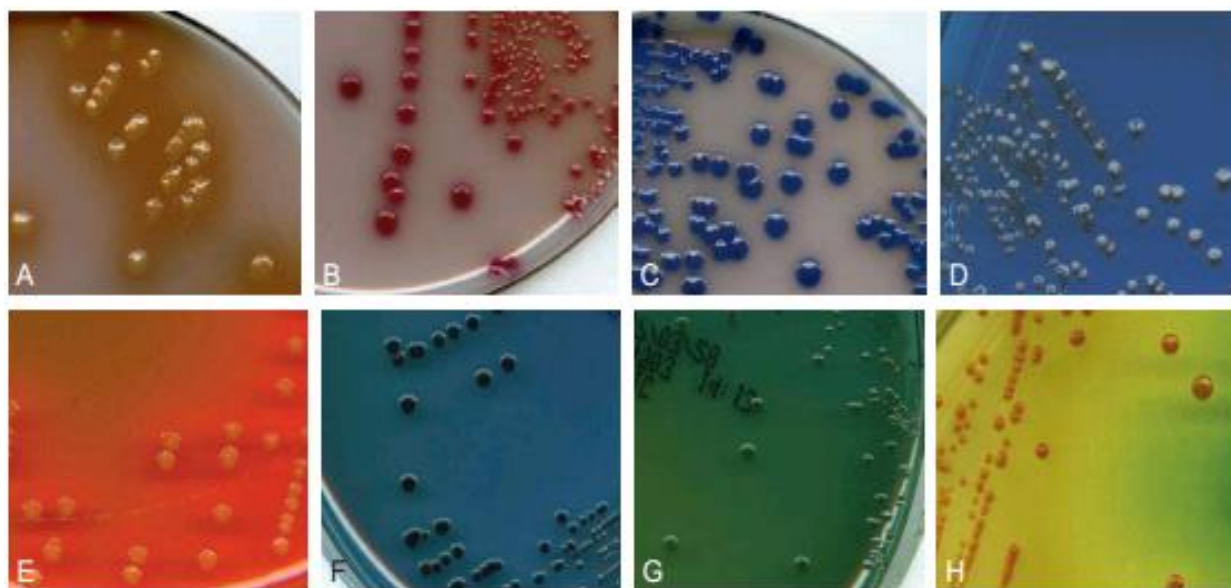


Figure 3. Aspect des cultures des différentes espèces d'entérobactéries sur géloses spéciales.

A. *Proteus mirabilis* : gélose UriSelect 4® (Bio-Rad), colonies brunes TDA positives. **B.** *Escherichia coli* : gélose UriSelect 4® (Bio-Rad), colonies roses β -galactosidase positives. **C.** *Klebsiella pneumoniae* : gélose UriSelect 4® (Bio-Rad), colonies bleues β -galactosidase positives. **D.** *Citrobacter freundii* : gélose Drigalski, colonies lactose négatives. **E.** *Escherichia coli* : gélose Hektoen, colonies lactose positives. **F.** *Salmonella enteritidis* : gélose Hektoen, colonies lactose négatives H_2S positives. **G.** *Shigella flexneri* : gélose Hektoen, colonies lactose négatives. **H.** *Escherichia coli* : gélose Drigalski, colonies lactose positives. (François *et al.*, 2016).

1.3.4.2 *Pseudomonas aeruginosa*

La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* est cultivée facilement sur milieux ordinaires en développant une odeur particulière. La température optimale de croissance est de 30 °C. Sur milieux solides, trois types de colonies peuvent être observés simultanément ou de manière isolée:

colonies larges (« la ») de 2 à 3 mm de diamètre, à bord irrégulier, rugueuses, avec une partie centrale bombée présentant des reflets métalliques; colonies plus petites lisses (« S ») bombées à bord régulier; colonies muqueuses («M»), bombées, coalescentes, filantes, rencontrées chez les souches produisant un *slime* composé d'un polymère exopolysaccharidique appelé alginate. Pour les souches pigmentées (95%), les milieux de King A et King B permettent une identification de *P. aeruginosa* par la mise en évidence de la production de deux pigments : la pyocyanine (hydrosoluble) et la pyoverdine (soluble dans le

chloroforme), respectivement (Figure 04). D'autres pigments hydrosolubles peuvent être produits parfois de manière transitoire : la pyomélanine brune et la pyorubrine rouge.

À partir de prélèvements polymicrobiens, il est nécessaire d'avoir recours à un milieu sélectif contenant du cétrimide (ammonium quaternaire) associé ou non à de l'acide nalidixique (François *et al.*, 2016).



Figure 4. Production de pyocyanine et de pyoverdine caractéristique de *Pseudomonas aeruginosa* sur milieux de King A et B (A). La pyocyanine est hydrosoluble (à gauche) et la pyoverdine soluble dans le chloroforme (à droite) (B) (François *et al.*, 2016).

1.3.4.3 *Staphylococcus* spp.

Les staphylocoques sont des bactéries peu exigeantes et peuvent être isolés en bouillon ou sur milieux solides simples (tels que géloses ordinaires ou géloses au sang à 35–37 °C en aérobiose). Sur les milieux usuels, les colonies de staphylocoques, de taille variable (1 à 3 mm après 24 heures d'incubation) sont circulaires, opaques, légèrement bombées ou aplaties (Figure 5).

À noter que certaines espèces comme *S. saccharolyticus* ou *S. aureus* subsp. *anaerobius* sont cultivées plus lentement et préférentiellement en présence de CO₂. Les souches de type *small colony variants* (SCV), notamment associées aux infections chroniques, sont-elles défectives pour certains gènes du métabolisme, et présentent une culture plus lente, sur milieux enrichis, avec une morphologie et des caractères phénotypiques atypiques. La pigmentation des colonies peut varier du blanc au jaune ou au jaune orangé. Sur gélose au sang, les souches « typiques » de *S. aureus* peuvent produire des colonies de couleur jaune doré, entourées d'une hémolyse β (voir Figure 5). La plupart des espèces de *Staphylocoque* à

coagulase négatif (SCN), dont certaines peuvent également présenter un halo d'hémolyse sur gélose au sang, ne peuvent être différenciées entre elles après une culture de 24 heures; aussi est-il recommandé d'attendre une incubation de 2 à 3 jours pour distinguer les différentes colonies sur milieu gélosé (François *et al.*, 2016).

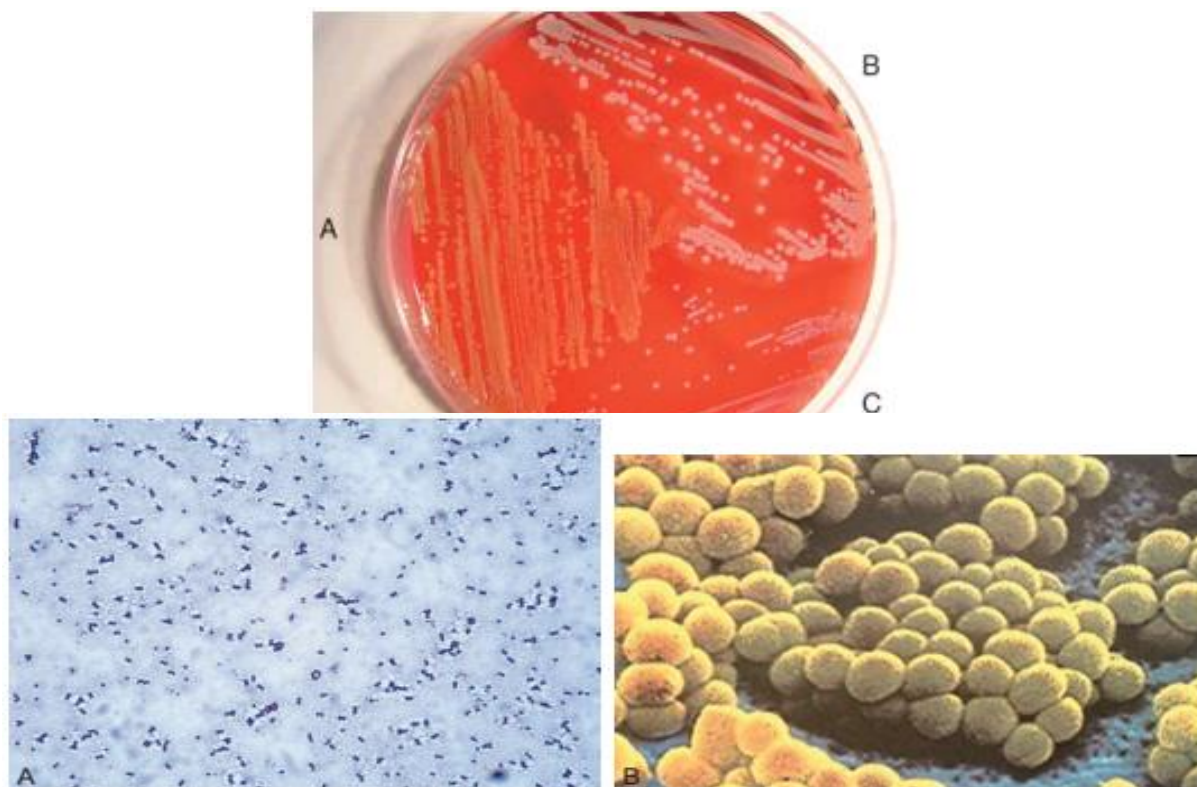


Figure 5. A. Gram de *S. aureus* (positif). B. Staphylocoques en microscopie à balayage. (Elsevier Masson, 2016).

1.4 Antibiogramme

L'antibiogramme permet de déterminer la sensibilité d'une bactérie vis-à-vis des ATB. Il a été réalisé selon la méthode diffusion en milieu gélosé, méthode des disques (Antibiogramme standard).

1.4.1 Principe

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 (CA-SFM, 2010).

1.4.2 Technique

Préparer une suspension bactérienne (à partir d'une culture jeune de 18 heures), et prélever au moins 3 colonies et émulsionner dans 5 mL d'eau physiologique stérile. Par la suite, il faut bien homogénéiser la suspension bactérienne. Son opacité doit être équivalente à une DO de 0,08 à 0,1 lue à 625 nm (soit 0,5 la valeur de Mac Farland). Cela correspond à une culture pure à peine confluyente de 10^6 à 10^8 UFC/mL (CA-SFM, 1998).

1.4.3 Interprétation

Pour chaque antibiotique: il faut mesurer le diamètre de la zone d'inhibition au revers de la gélose.

L'interprétation des souches (sensibles, intermédiaires ou résistantes) se fait selon les diamètres

critiques recommandés par CA-SFM (2008). Chaque disque a une concentration minimale inhibitrice, caractérisée par un diamètre d'inhibition, la comparaison des diamètres mesurés autour des disques déposés et ceux recommandés permettra de détecter le phénotype sensible, intermédiaire, et résistant:

Si le diamètre de la zone d'inhibition est $\geq D$: la souche est dite sensible (S).

Si le diamètre de la zone d'inhibition est $< d$: la souche est dite résistante (R).

Si $d \leq$ diamètre de la zone d'inhibition $< D$: la souche est dite intermédiaire (I) (CA-SFM, 1998).

(D = sensible) et (d = résistante)

Voici deux exemples des antibiotiques testés et leurs valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour *Pseudomonas aeruginosa* (tableau 6), et pour *S. aureus* (tableau 7).

Tableau 6. Liste des antibiotiques testés sur *Pseudomonas aeruginosa* (CA-SFM, 2015).

Famille	Antibiotique	Sigle	Charge	Diamètres critiques	
				R (d)	I S (D)
β-Lactamines	Carboxypénicilline	Ticarcilline	TIC	75 µg	<18 ≥22
	Carbapénème	Imipénème	IPM	10 µg	<17 ≥22
	C3G	Ceftazidime	CAZ	30 µg	<19 ≥19
		Céfpirome	CPO	30 µg	<19 ≥19
		Cefsulodine	CSD	30 µg	<14 ≥22
		Céfépime	FEP	30 µg	<19 ≥19
	Monobactames	Aztréonam	ATM	30 µg	<19 ≥27
Pénames	Pipéracilline	PIP	30 µg	<12 ≥18	
Aminosides	Amikacine	AK	30 µg	<15 ≥17	
	Gentamicine	GN	15µg/ 10UI	<16 ≥16	
	Tobramycine	TOB	10 µg	<16 ≥16	
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	CIP	5 µg	<19 ≥22	
Fosfomycines	Fosfomycine	FOS	50 µg (10 UI)	<14 ≥14	

β-Lactamines	Aminopénicilline	Amoxicilline	AMX	25 µg	<14	≥21
	Carboxypénicilline	Ticarcilline	TIC	75 µg	<18	≥22
	Carbapénème	Imipénème	IPM	10 µg	<17	≥24
	Clavams	Amoxicilline+Acide clavulanique	AMC	20+10 µg	<14	≥21
	Monobactame	Aztréonam	ATM/AO	30 µg	<21	≥27
	C1G	Céfalotine	KF	30 µg	<12	≥18
	C2G	Céfoxitine	FOX	30 µg	<15	≥22
	C3G	Céfotaxime	CTX/CE	30 µg	<23	≥26
	C3G	Ceftazidime	CAZ	30 µg	<19	≥26
Aminosides	Amikacine	AK	30 µg	<15	≥17	
	Gentamicine	GN	15µg/10UI	<16	≥18	
	Tobramycine	TOB	10 µg	<16	≥18	
Quinolones	Quinolones 1^{ère}G	Acide nalidixique	NA	30 µg	<15	≥20
	Quinolones 2^{ème}G	Ofloxacin	OFX	5 µg	<22	≥25
		Ciprofloxacine	CIP	5 µg	<22	≥25
Fosfomycines	Fosfomycine	FOS	50 µg	<14	≥14	
Furanes	Nitrofuranes	F	300 µg	<14	≥17	
Phénicolés	Chloramphénicol	C	30 µg	<19	≥23	
Triméthoprime-sulfamides	Co-trimoxazole	COT	25 µg	<10	≥16	
Tétracyclines	Tétracycline	TE	30 UI	<17	≥19	

C1G: céphalosporines première génération,

C2G : céphalosporines deuxième génération,

C3G : céphalosporines troisième génération.

Tableau 7. Les Antibiotiques testés et les valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour *S. aureus* (CA-SFM, 2015).

Famille	Antibiotiques	Abréviations	Charge du disque	Diamètres critiques (mm)	
				R	S
β-lactamines	Pénicilline	P	10 UI	< 26	≥ 26
	Oxacilline	OX	5 µg	< 20*	≥20*
	Céfoxitine	FOX	30 µg	< 22	≥25
Amiosides	Gentamicine	GMN	10 µg	<18	≥18
	Kanamicine	KMN	30 µg	<14	≥18
MLS	Clindamycine	CMN	10 µg	<19	≥22
	Erythromycine	E	15 µg	<18	≥21
	pristinamycine	PTN	15 µg	<19*	≥22*
	Lincomycine	L	10 µg	<17*	≥21*
	Clarithromycine	CLR	15 µg	<18	≥23
Glycopeptides	Vancomycine	VA	30 µg	#	#
Fluoroquinolones	ciprofloxacine	CIP	5 µg	<20	≥20
Autres	Rifampicine	RIF	5 µg	<23	≥26
	Tétracycline	TE	30 µg	<19	≥22
	Chloramphénicol	CHL	30 Mg	<18	≥18
	Acide fusidique	FA	10 µg	<24	≥24

UI: unité international, **µg:** microgramme, ***** : selon le CA-SFM (2015).

CHAPITRE 2



MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Cadre d'étude

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire des analyses microbiologiques de contrôle de qualité de El Atteuf, Ghardaïa.

2.2 MATERIEL DU LABORATOIRE

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

2.2.1 Appareillage

Etuve (Nüve EN 400), spectrophotomètre (Dialab DTN-410), autoclave (HIRYAMA "HICLAV HV 110") et Bain-marie.

2.2.2 Petit matériel

Bec Bünsen, anse de platine, boîtes de Pétri (90 mm), pipettes Pasteur, pince bactériologique, verreries (tube à vis de 10 mL, flacons à prélèvement thermostérile de 180 mL, éprouvette graduée, Erlenmeyer, agitateur magnétique chauffant, disques d'antibiotiques, portoir, écouvillon, règle graduée.

2.2.3 Produits chimiques

Eau distillée, eau physiologique, milieux de culture:

MHA: gélose de Mueller-Hinton; GN: gélose nutritive; HK: gélose Hektoen; TSA: Gélose trypticase soja; MSA*: Sel de mannitol Agar = milieu de Chapman; ISP2: Projet international Streptomyces 2; BAM: Milieu d'agar de Bennett; PDA: Gélose de pomme de terre et dextrose; SA: Gélose de Sabouraud; *: acheté prêt.

Et antibiotique:

AMP: Ampicilline (10 µg); AMC: Amoxicilline + acide clavulanique (30 µg); CEP: Céphalothine (30 µg); CX: Céfoxitine (30 µg); CTX: céfotaxime (30 µg); GEN: Gentamicine (10 µg); FOS: La fosfomycine (200 µg); COT: Co-Trimoxazole: Triméthoprim / sulfaméthoxazole (25 µg); IMP: Imipénème (10 µg); CL: Colistine (30 µg); PI: Pipéracilline (100 µg); ATM: Aztréonam (30 µg); TCC: Ticracilline + acide clavulanique (75+10 µg); CAZ: Ceftazidime (30 µg); OF: Ofloxacin (5 µg); AK: Amikacine (30 µg); TEI: Teicoplanine (30 µg); PR: Pristinamycine (15 µg); TE: Tétracycline (30 µg); R: Rifampicine (05 µg); VA: Vancomycine (30µg); CD: Clindamycine (2 µg); E: Erythromycine (15 µg); P: Pénicilline (10 UI)

2.2.4 Matériel biologique

Pour le déroulement de notre travail, nous avons utilisé 3 souches bactériennes différentes originaires de l'hôpital de Ouargla. Ces souches bactériennes font parties de deux groupes bactériens: une bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus* HO90) et deux bactérie à Gram négatif (*Escherichia coli* HO25 et *Pseudomonas aeruginosa* HO80). 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	Habitat préférentiel	Infections hospitalières
Bacille Gram -	<i>Escherichia coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Eaux usées • Matière fécales • Aliments contaminés 	<ul style="list-style-type: none"> • Infections respiratoires • Infections urinaires • Plaies septicémies
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Sol, eau, plantes • Voies respiratoires • Matières fécales • Appareils sanitaires 	<ul style="list-style-type: none"> • Infections pulmonaires et urinaires • Brûlures • Plaies septicémies
Cocci Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Peau, cheveux • Nasopharynx périnée • Poussières, air • Aliments contaminé 	<ul style="list-style-type: none"> • Infections cutanées, plaies, abcès • Ostéites, ostéomyélites • Infections pulmonaires • Intoxications alimentaires

2.2.5 Milieux de culture

Nous avons utilisé 9 milieux de culture, dont 6 milieux de culture sont préparés au laboratoire (Figure 6) et 3 milieux de culture sont achetés déjà préparés*.

Les milieux de culture préparés au laboratoire sont:

- Milieu Bennett.
- Milieu ISP2.
- Milieu Sabouraud.
- Milieu gélose nutritive.
- Milieu PDA.
- Milieu TSA.

*Les 03 milieux de culture achetés déjà préparés sont :

- Milieu Chapman.
- Milieu Héктоine.
- Milieu Muller Hinton (MH).



Figure 6. Exemple des milieux de culture préparés au niveau du laboratoire « TSA, Sabouraud et PDA » (Photo Originale).

Repiquage des souches bactériennes

Les trois souches bactériennes utilisées ont été repiquées par la méthode des stries sur milieu gélosé Chromagar, puis incubées à 37 °C, durant 24 h, afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum (Figure 7).

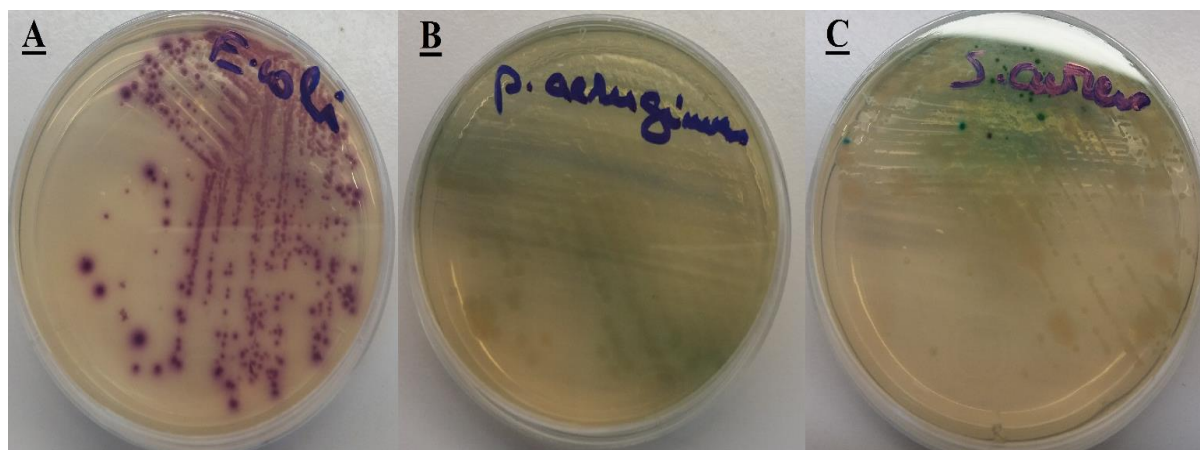


Figure 7. Aspect des cultures des 3 souches bactériennes sur géloses chromagar, incubées à 37 °C durant 24 h. (Photo Original).

A. *Escherichia coli* HO25. B. *Pseudomonas aeruginosa* HO80. C. *Staphylococcus aureus* HO90.

2.3 Méthodes utilisées

2.3.1 Antibiogramme par diffusion en milieu de culture

2.3.1.1 Préparation de la solution mère et ajustement de l'inoculum

A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur gélose nutritive, on fait racler quelques colonies à l'aide d'une pipette Pasteur, visiblement bien isolées et parfaitement identiques. On décharge la pipette Pasteur dans 10 mL d'eau physiologique stérile à 0,9% NaCl. On fait bien homogénéiser la suspension bactérienne (solution mère) avant de mesurer sa densité optique (Figure 10), son opacité doit être au maximum entre 0,08 et 0,1 (absorbance mesurée à 620 nm), l'inoculum est ajusté à cette valeur en ajoutant des colonies (si nécessaire).

2.3.1.2 Détermination de la concentration d'inoculum

Les concentrations bactériennes 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 des différentes suspensions bactériennes (Figure 8), on les standardise au 0,5 McFarland.



Figure 8. Mesure de la densité optique (DO) par un spectrophotomètre (Photo Originale).

2.3.1.3 Ensemencement

Les 09 milieux de culture (prête à l'usage) sont coulés dans des boîtes de Pétri stériles (de 90 mm de diamètre) et laissés 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. Chaque souche étaitensemencé par écouvillonnage dans les 5 min qui suivent la préparation de l'inoculum; on fait bien homogénéiser la solution de chaque souche 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 surface de la gélose), l'écouvillon est rechargé chaque fois qu'une nouvelle boîte de Pétri estensemencée, l'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des souches bactériennesensemencées (CA-SFM, 2017).

2.3.1.4 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 9).

Tableau 9. Familles des antibiotiques utilisés (CA-SFM, 2010).

Souche testée	Abréviation	Antibiotique	Famille	site d'action	Charge du disque (µg)
<i>Staphylococcus aureus</i> HO90	P	Péniciline	Penicillines	Ribosome	10
	GM	Gentamicine	Aminosides		10
	TE	Tétracycline	Tétracyclines		25
	E	Erythromycine	Macrolides		15
	CD	Clindamycine	Macrolides		2
	VA	Vancomycine	Glycopeptides		30
	PR	Pristinamycine	Streptogramines		15
	R	Rifampicine	Rifamycines	Blocage de la RNA-Polymérase	5
	TEI	Teicoplanine	Glycopeptides	Peptidoglycane	30
	AK	Amikacine	Monobactame		30

	CX	Céfoxitine	Céphalosporine 2 ^{ème} génération	Peptidoglycane	30
	COT	Triméthoprime/ sulfaméthoxazole (cotrimoxazole)	Sulfamides- Triméthoprime	Appareil nucléaire	30
	OF	Ofloxaine	Fluroquinolone		5
<i>Escherichia coli</i> HO25	AM	Ampicilline	Aminopénicilline	Peptidoglycane	10
	AMC	Amoxicilline + acide clavulanique	Aminopénicilline		30
	CEP	Céfalotine	Céphalosporine 1 ^{ère} génération		30
	CX	Céfoxitine	Céphalosporine 2 ^{ème} génération		30
	CTX	Céfotaxime	Céphalosporine 3 ^{ème} génération		30
	FOS	Fosfomycine	Non classé	Paroi bactérienne	200
	GEN	Gentamicine	Aminosides	Ribosome	10
	COT	Triméthoprime/ sulfaméthoxazole (cotrimoxazole)	Sulfamides- Triméthoprime	Appareil nucléaire	30

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> HO80	TCC	Ticarcilline + acide clavulanique	Carboxypénicillines	Peptidoglycane	75
	CAZ	Ceftazidime	Céphalosporine 3 ^{ème} génération		30
	PI	Pipéracilline	Uréidopénicilline		100
	IMP	Imipénème	Carbapénèmes		10
	CL	Colistine	Polymyxine	La membrane	30
	FOS	Fosfomycine	Non classé	Paroi bactérienne	200
	GEN	Gentamicine	Aminosides	Ribosome	10
	ATM	Aztréonam (AT)	Aminosides		30
	R	Rifampicine	Rifamycine	Blocage de la RNA- Polymérase	5

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 (CA-SFM, 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 9). Les boîtes sont incubées à l'étuve à 37°C en position inversée durant 24 h (Parsaeimehr *et al.*, 2010) (Figure10).

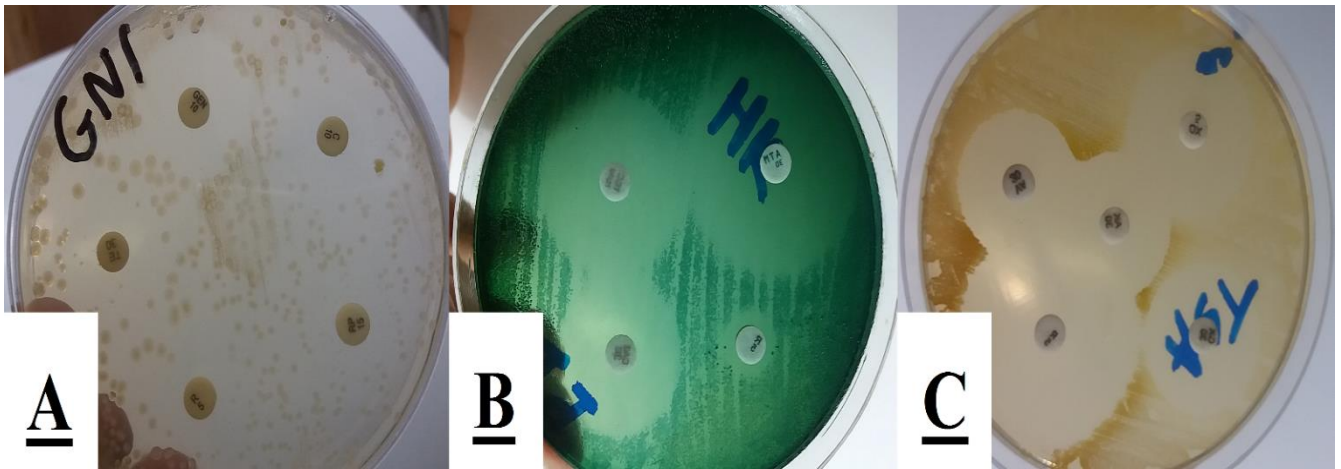


Figure 9. Ensemencement les trois souches bactériennes et application des disques d'antibiotiques (Photo Originale).

A. *Escherichia coli* HO25. B. *Pseudomonas aeruginosa* HO80. C. *Staphylococcus aureus* HO90.



Figure 10. Incubation des boîtes de Pétri dans l'étuve à 37°C durant 24 h (Photo Originale).

2.3.1.5 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 (une zone transparente) autour du disque dont le diamètre est mesuré avec précision à l'aide d'une règle graduée et exprimé en millimètre (Figure 11). 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.

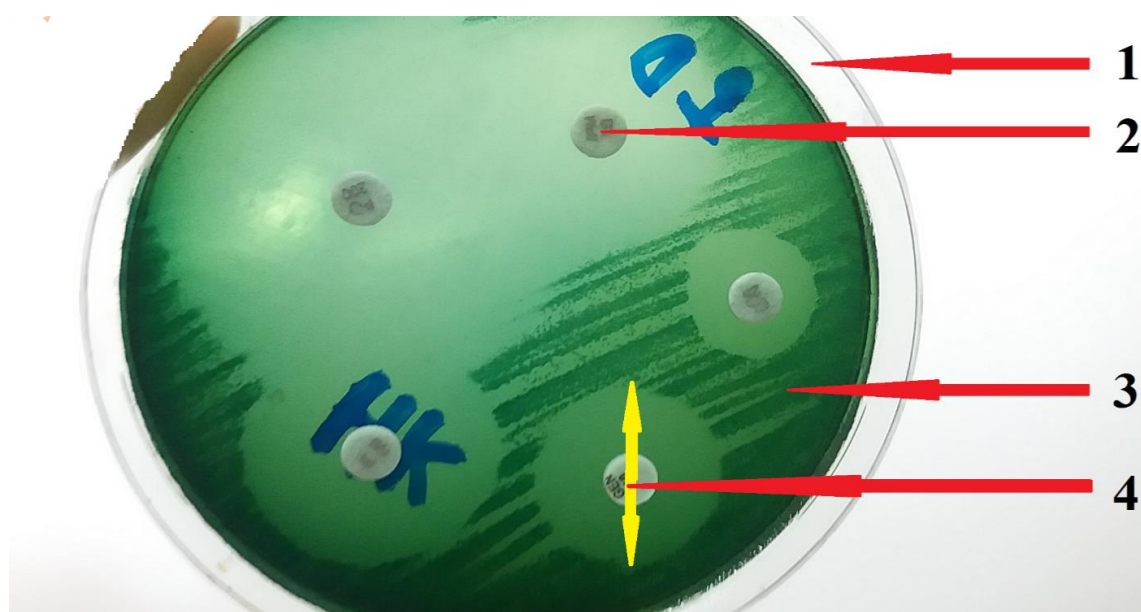


Figure 11. Principe de la lecture d'un antibiogramme (Photo Originale).

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

2.3.2 Analyse statistique

Les données collectées ont été analysées statistiquement par test factoriel ANOVA et Tukey, en utilisant XLSTAT 2014 au niveau de probabilité $P \leq 0,05$.

Notre démarche expérimentale est résumée ci-dessous:

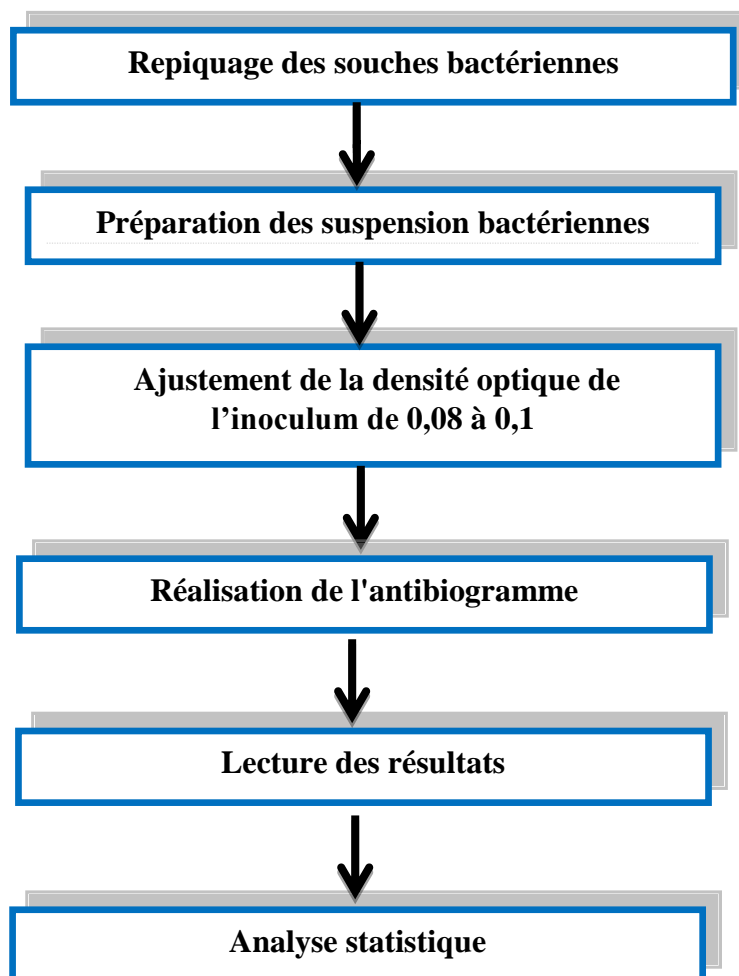


Figure 12. Etapes expérimentales.

CHAPITRE 3



RESULTATES ET DISCUSSION

Partie I



Escherichia coli H025

3.1 *Escherichia coli* HO25

3.1.1 Résultats de l'antibiogramme

Les résultats obtenus indiquent qu'il y a un effet significatif des milieux de culture, ainsi qu'un effet significatif des différents antibiotiques ($P \leq 0,05$).

De plus, un effet significatif de l'interaction «milieu de culture \times antibiotiques» a également été observé ($p < 0,05$).

Les effets des différents milieux de culture sont résumés dans le tableau 10 et les Figure 13 et 14. Les analyses statistiques ont montré, sur les neuf milieux de culture utilisés, que *Escherichia coli* HO25 est très sensible aux FOS (zone d'inhibition comprise entre 37,5 et 49 mm); modérément sensible au CTX (zone d'inhibition comprise entre 12,5 et 22,5 mm) et GEN (zone d'inhibition comprise entre 9,5 et 23 mm); résistant à CX (zone d'inhibition comprise entre 0 et 10 mm) et CEP (zone d'inhibition comprise entre 0 et 7 mm); et totalement résistant aux AMC, AMP et COT. Nos résultats ont montré que la bactérie *Escherichia coli* HO25 pousse bien sur tous les milieux de culture testés (9 milieux de culture), sauf le milieu Chapman (Mannitol salt Agar), qui est généralement utilisé pour les bactéries halophiles telles que les *Bacillaceae* et les *Staphylococcaceae* (Ex. *Staphylococcus aureus*).

Tableau 10. Les diamètres des zones d'inhibition (en mm) obtenus pour chaque milieu de culture / combinaison d'antibiotiques pour *Escherichia coli* HO25.

Milieu de culture	AMP	AMC	CEP	CX	CTX	GEN	FOS	COT
BAM	0	0	0	0	22.0 \pm 5.0	14.5 \pm 0.5	43.0 \pm 2.0	0
ISP2	0	0	0	0	13.5 \pm 0.5	15.0 \pm 1.0	38.0 \pm 0.0	0
SA	0	0	0	0	22.5 \pm 0.5	9.5 \pm 0.5	37.5 \pm 0.5	0
HK	0	0	7.0 \pm 1.0	10 \pm 0.0	22.0 \pm 4.0	23.0 \pm 1.0	41.0 \pm 1.0	0
GN	0	0	0	0	21.0 \pm 1.0	19.0 \pm 1.0	49.0 \pm 1.0	0
GN*	0	0	0	0	17.5 \pm 1.5	20.0 \pm 0.0	45.5 \pm 0.5	0
PDA	0	0	0	6.5 \pm 0.5	20.5 \pm 0.5	13.5 \pm 0.5	39.0 \pm 1.0	0
TSA	0	0	0	0	21.0 \pm 1.0	10.0 \pm 0.0	37.5 \pm 0.5	0
MHA*	0	0	0	0	12.5 \pm 0.5	11.5 \pm 0.5	38.5 \pm 0.5	0

Les valeurs indiquées sont les valeurs moyennes moyennes \pm écart-type.

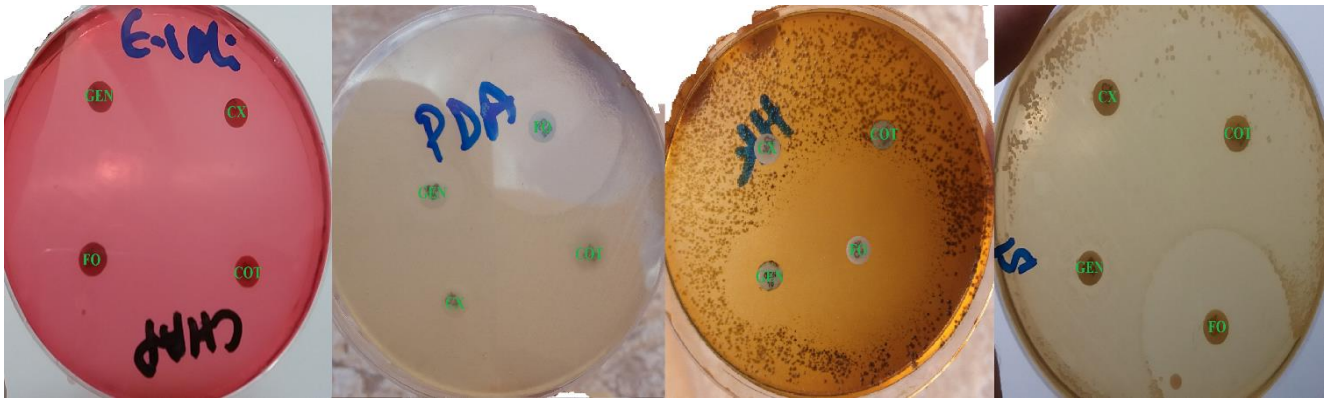


Figure 8. Résultats des antibiogrammes obtenus pour la souche *Escherichia coli* HO25 (Photo Originale).

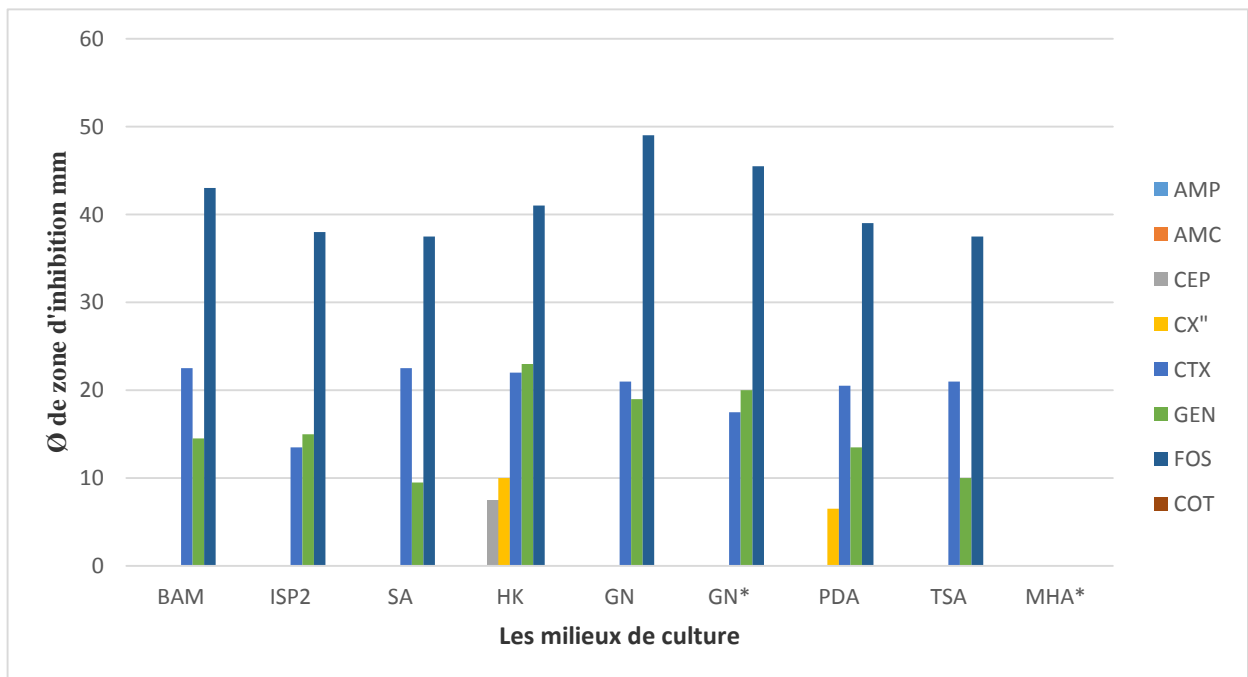


Figure 9. La variation de diamètre des zones d'inhibition en fonction des milieux de culture chez *Escherichia coli* HO25.

Sur la base d'analyses statistiques, nous avons remarqué qu'il n'y a pas de différence significative entre MHA* et les milieux de culture suivants : SA, TSA, ISP2 (basé sur le test de Tukey) (Voir la Figure 15 et l'annexe 7). Par conséquent, le MHA* pourrait être remplacé par ces quatre milieux de culture dans les laboratoires médicaux et de recherche. De plus, nous avons observé que les milieux de culture suivants : GN, GN*, PDA et BAM pourraient également être utilisés dans les antibiogrammes. Cependant, le milieu de culture HKA a montré l'effet le plus significatif par rapport aux autres milieux utilisés.

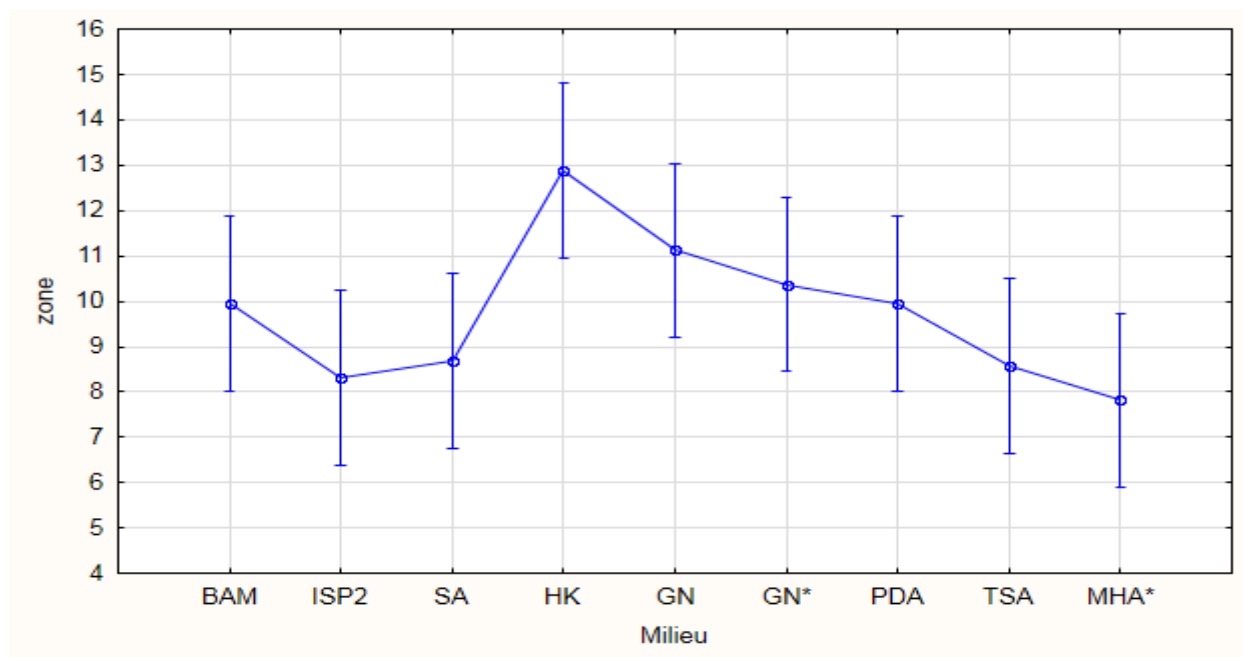


Figure 10. La courbe de teste de Tukey des différentes signification entre les milieux de culture pour *Escherichia coli* HO25.

3.1.2 Interprétations des antibiogrammes

Le tableau 11 indique les points de rupture du diamètre de la zone des antibiotiques utilisés pour les entérobactériacées (*Escherichia coli* et genres apparentés).

Tableau 11. Normes de performance pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens (en mm) utilisés pour les entérobactéries (Standardisation des antibiogrammes pour la médecine humaine et vétérinaire, 2011).

	R	I	S
AMP	≤ 13	14-16	≥ 17
AMC	≤ 13	14-17	≥ 18
CEP	≤ 14	15-17	≥ 18
CX	≤ 14	15-17	≥ 18
CTX	≤ 22	23-25	≥ 26
GEN	≤ 12	13-14	≥ 15
FOS	≤ 12	13-15	≥ 16
COT	≤ 10	11-15	≥ 16

R = Résistant, S = Sensible, I = Intermédiaire.

Le tableau 12 montre les résultats de l'effet de différents milieux de culture sur les zones d'inhibition de différents antibiotiques testés contre *E. coli*.

Tableau 12. Interprétations des antibiogrammes selon le Ø des zones d'inhibitions pour d'*Escherichia coli* HO25.

Milieu de culture	AMP	AMC	CEP	CX	CTX	GEN	FOS	COT
BAM	R	R	R	R	R	I/S	S	R
ISP2	R	R	R	R	R	S	S	R
SA	R	R	R	R	R/I	R	S	R
HK	R	R	R	R	R	S	S	R
GN	R	R	R	R	R	S	S	R
GN*	R	R	R	R	R	S	S	R
PDA	R	R	R	R	R	I	S	R
TSA	R	R	R	R	R	R	S	R
MH*	R	R	R	R	R	R	S	R

(R = Résistant, S = Sensible, I = Intermédiaire).

Sur la base du tableau 13, nous avons observé qu'à l'exception de la GEN, tous les antibiotiques ne présentaient aucun changement dans le profil de résistance en utilisant différents milieux de culture. Cette constatation a confirmé que le milieu de Mueller-Hinton pourrait être remplacé par de nombreux autres milieux de culture dans les laboratoires médicaux et de recherche pour réaliser les antibiogrammes. La précaution unique doit être prise dans le cas de GEN (et peut-être d'autres antibiotiques non testés dans cette étude).

Partie II



Pseudomonas
aeruginosa **HO80**

3.2 *Pseudomonas aeruginosa* HO80

3.2.1 Résultats de l'antibiogramme

Les résultats obtenus indiquent qu'il y a un pas un effet significatif des milieux de culture, ainsi qu'il y a pas un effet significatif des différents antibiotiques ($P > 0,05$).

De plus, il y a un pas un effet significatif de l'interaction «milieu de culture \times antibiotiques» a également été observé ($p > 0,05$).

Les effets des différents milieux de culture sont résumés dans le tableau 13 et les Figure 16 et 17. Les analyses statistiques ont montré, sur les neuf milieux de culture utilisés, que *Pseudomonas aeruginosa* HO80 est très sensible aux IMP (zone d'inhibition comprise entre 28 et 41 mm) et ATM (zone d'inhibition comprise entre 30 et 38 mm) et TCC (zone d'inhibition comprise entre 18 et 31 mm); modérément sensible aux PI (zone d'inhibition comprise entre 20 et 29 mm) et GEN (zone d'inhibition comprise entre 14 et 26 mm) et CAZ (zone d'inhibition comprise entre 7 et 25 mm) et CL (zone d'inhibition comprise entre 11 et 22 mm) et R (zone d'inhibition comprise entre 10 et 18 mm).

Nos résultats ont montré que *Pseudomonas aeruginosa* HO80 pousse bien sur tous les milieux de culture testés (9 milieux de culture), à l'exception de milieu Chapman (Mannitol salt Agar), qui est généralement utilisé pour les bactéries halophiles telles que *Staphylococcus aureus*.

Tableau 13. Les diamètres des zones d'inhibition (en mm) obtenus pour chaque milieu de culture / combinaison d'antibiotiques pour *Pseudomonas aeruginosa* HO80.

Milieu de culture	IMP	CL	PI	ATM	TCC	GEN	R	CAZ
BAM	37.0 \pm 1.0	11.0 \pm 0.0	29.0 \pm 1.0	38.0 \pm 2.0	31.0 \pm 1.0	14.0 \pm 0.0	10.5 \pm 0.5	21.0 \pm 1.0
ISP2	39.0 \pm 1.0	13.0 \pm 0.0	24.0 \pm 4.0	0	22.5 \pm 0.5	15.0 \pm 1.0	18.0 \pm 1.0	7.0 \pm 1.0
SA	30.0 \pm 0.0	16.5 \pm 0.5	28.0 \pm 2.0	30.0 \pm 1.0	20.5 \pm 1.5	21.0 \pm 1.0	10.0 \pm 0.0	18.0 \pm 1.0
HK	28.0 \pm 2.0	19.5 \pm 1.5	28.5 \pm 1.5	38.0 \pm 1.0	28.0 \pm 0.0	22.0 \pm 0.0	11.0 \pm 1.0	25.0 \pm 1.0
GN	38.0 \pm 2.0	15.5 \pm 0.5	22.0 \pm 2.0	30.0 \pm 0.0	18.0 \pm 1.0	22.0 \pm 0.0	15.0 \pm 1.0	16.0 \pm 0.0
GN*	41.5 \pm 0.5	13.0 \pm 1.0	24.0 \pm 1.0	32.0 \pm 0.0	25.0 \pm 1.0	21.0 \pm 1.0	10.0 \pm 0.0	19.0 \pm 1.0
PDA	38.0 \pm 2.0	15.0 \pm 0.0	23.0 \pm 0.0	30.5 \pm 0.5	19.0 \pm 1.0	21.0 \pm 1.0	11.0 \pm 1.0	18.0 \pm 0.0
TSA	34.5 \pm 0.5	22.0 \pm 2.0	20.0 \pm 2.0	32.0 \pm 2.0	22.5 \pm 1.5	25.0 \pm 1.0	10.0 \pm 0.0	23.5 \pm 0.5
MH*	36.0 \pm 0.0	20.5 \pm 0.5	26.0 \pm 0.0	34.0 \pm 0.0	24.0 \pm 1.0	26.0 \pm 0.0	10.0 \pm 0.0	21.5 \pm 0.5

Les valeurs indiquées sont les valeurs moyennes moyennes \pm écart-type.

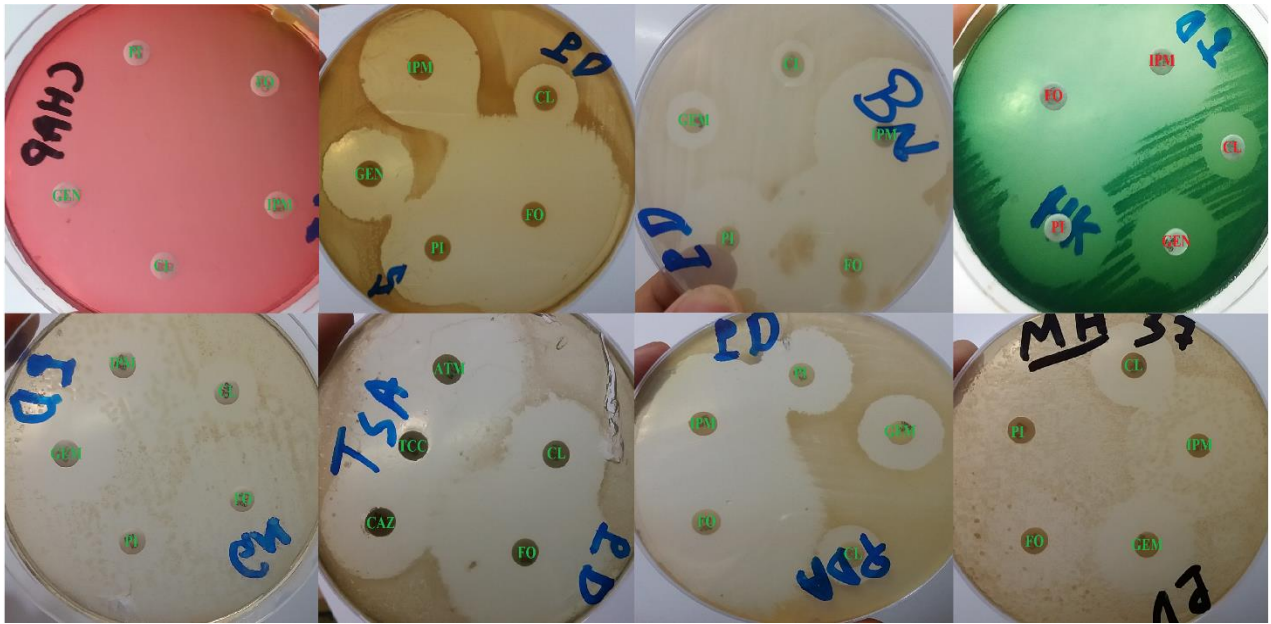


Figure 11. Résultats des antibiogrammes pour *Pseudomonas aeruginosa* HO80 (Photo Originale).

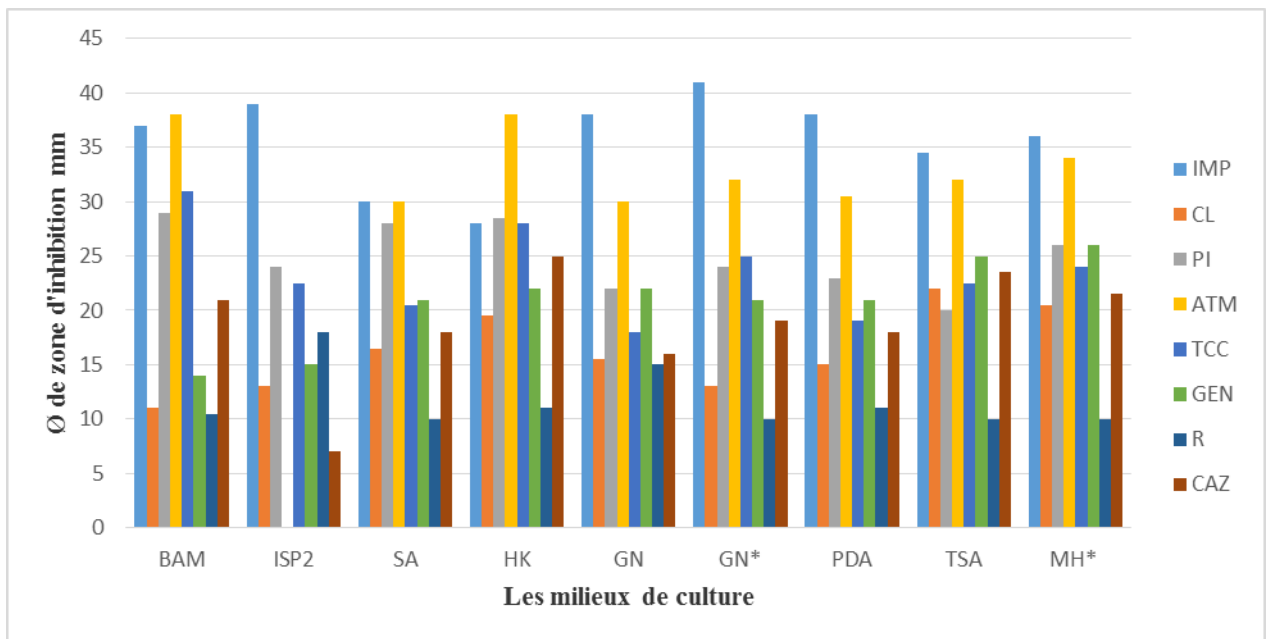


Figure 12. Variation de diamètre des zones d'inhibition en fonction des milieux de culture chez *Pseudomonas aeruginosa* HO80.

Sur la base d'analyses statistiques, nous avons remarqué qu'il y a pas de différence significative entre MHA* et les milieux de culture suivants: HK, BAM, TSA (basé sur le test de Tukey). (Voir la Figure 18 et l'annexe 8). Par conséquent, le MHA* pourrait être remplacé par ces quatre milieux de culture suivants: GN, GN*, PDA et SA dans les laboratoires

médicaux et de recherche. Cependant, le milieu de culture ISP2 a montré l'effet hautement significatif par rapport au MHA*.

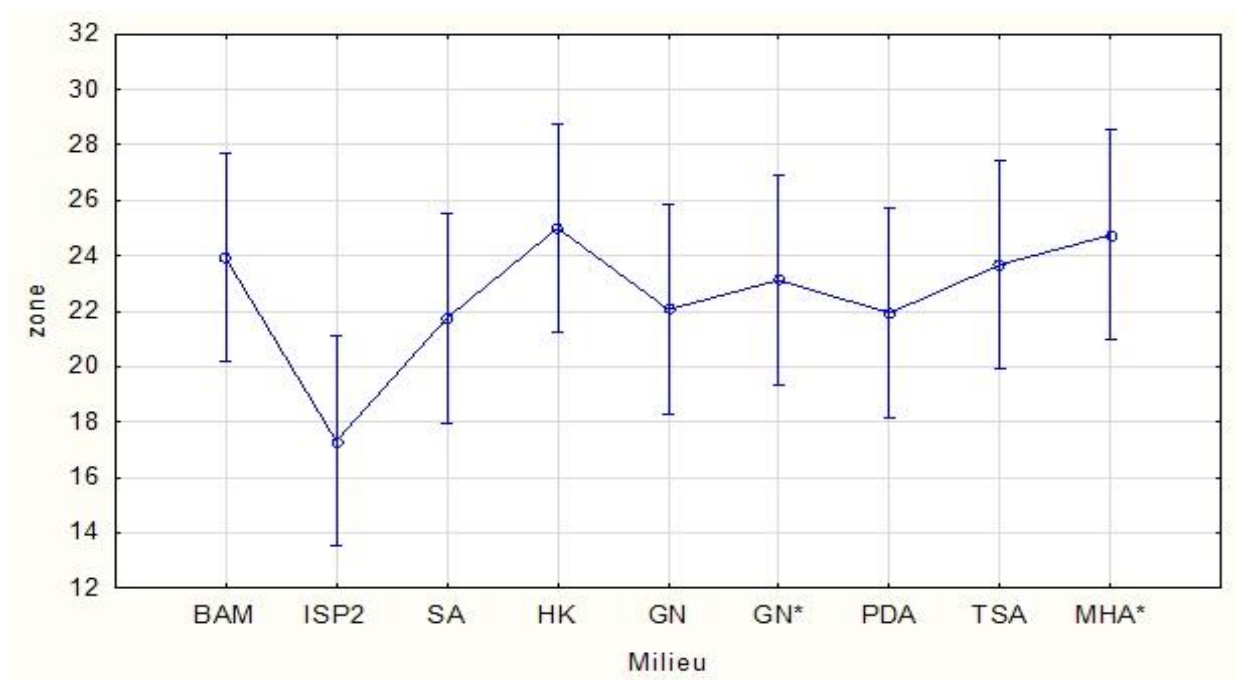


Figure 13. La courbe de teste de Tukey des différentes significations entre les milieux de culture pour *Pseudomonas aeruginosa* HO80.

3.2.2 Interprétations des antibiogrammes

Les mesures de diamètre des zones d'inhibitions sont comparées soigneusement aux valeurs critiques figurant dans les Tableaux 6 et 7, afin de les interpréter en plusieurs catégories: S, I ou R. Les résultats sont présentés dans le Tableau 14 suivant.

Tableau 14. Interprétations des antibiogrammes selon le Ø des zones d'inhibitions pour *Pseudomonas aeruginosa* HO80.

Milieu de culture	IMP	CL	PI	ATM	TCC	GEN	FOS	CAZ
BAM	S	S	S	S	S	I	S	S
ISP2	S	S	S	R	I	S	S	R
SA	S	S	S	S	I	S	S	S
HK	S	S	S	S	S	S	S	S
GN	S	S	S	S	I	S	S	I
GN*	S	S	S	S	S	S	S	S
PDA	S	S	S	S	I	S	S	S
TSA	S	S	S	S	I	S	S	S
MH*	S	S	S	S	S	S	S	S

(R = Résistant, S = Sensible, I = Intermédiaire).

Sur la base du tableau 15, nous avons observé que, sauf GEN, TCC, CAZ et ATM, tous les antibiotiques ne présentaient aucun changement dans le profil de sensibilité utilisant différents milieux de culture. Cette observation a confirmé que le milieu de Mueller-Hinton pourrait être remplacé par de nombreux autres milieux de culture dans les laboratoires médicaux et de recherche pour la réalisation des antibiogrammes. La précaution unique doit être prise dans le cas de GEN, TCC, CAZ et ATM, (et peut-être d'autres agents antibactériens non testés dans cette étude).

Partie III



Staphylococcus aureus

HO90

3.3 *Staphylococcus aureus* HO90

3.3.1 Résultats de l'antibiogramme

Les résultats obtenus indiquent qu'il y a un effet significatif des milieux de culture, ainsi qu'un effet significatif des différents antibiotiques ($P \leq 0,05$).

De plus, un effet significatif de l'interaction «milieu de culture \times antibiotiques» a également été observé ($p < 0,05$).

Les effets des différents milieux de culture sont résumés dans le tableau 15 et les Figure 19, 20.

Les analyses statistiques ont montré, sur les neuf milieux de culture utilisés, que *Staphylococcus aureus* HO90 est très sensible aux P (zone d'inhibition comprise entre 21 et 47 mm) et R (zone d'inhibition comprise entre 33 et 45 mm) et TE (zone d'inhibition comprise entre 19 et 43 mm) et PR (zone d'inhibition comprise entre 26 et 42 mm) et OF (zone d'inhibition comprise entre 29 et 41 mm) et E (zone d'inhibition comprise entre 26 et 41 mm) et CD (zone d'inhibition comprise entre 27,5 et 38 mm) et AK (zone d'inhibition comprise entre 23 et 37,5 mm) et CX (zone d'inhibition comprise entre 23,5 et 33,5 mm) et COT (zone d'inhibition comprise entre 26,5 et 33 mm) et VA (zone d'inhibition comprise entre 22,5 et 29,5 mm) et GEN (zone d'inhibition comprise entre 14,5 et 26 mm).

Nos résultats ont montré que *Staphylococcus aureus* HO90 pousse bien sur tous les milieux de culture testés (9 milieux de culture), sauf le milieu Hektoen, qui est généralement utilisé pour stimuler la croissance des bacilles à Gram négatif.

Tableau 15. Les diamètres des zones d'inhibition (en mm) obtenus pour chaque milieu de culture / combinaison d'antibiotiques pour *Staphylococcus aureus* HO90.

Milieu de culture	OF	AK	TEI	CX	PR	GEN	TE	R	VA	CD	COT	E	P
BAM	29.0±1.0	18.5±1.5	31.0±1.0	26.5±1.5	31.0±1.0	18.5±0.5	19.5±1.5	37.0±3.0	27.0±1.0	38.0±6.0	26.5±6.5	36.0±4.0	42.0±2.0
ISP2	32.0±2.0	18.0±1.0	31.5±1.5	33.5±0.5	34.0±1.0	21.0±0.0	31.5±1.5	37.5±2.5	26.5±1.5	33.5±2.5	33.0±1.0	31.5±0.5	47.0±1.0
SA	34.5±0.5	20.0±0.0	33.0±1.0	30.0±2.0	28.0±2.0	20.0±0.0	43.0±1.0	42.0±0.0	29.5±0.5	30.5±0.5	30.5±0.5	27.0±2.0	41.0±3.0
GN	40.0±0.0	18.5±1.5	32.0±2.0	26.5±1.5	31.0±1.0	17.5±0.5	39.0±1.0	34.0±4.0	23.0±0.0	31.0±1.0	33.0±2.0	31.0±1.0	36.0±0.0
GN*	41.0±1.0	24.0±0.0	35.5±0.5	28.0±1.0	35.0±1.0	23.5±0.5	38.0±2.0	41.0±1.0	28.5±0.5	33.0±1.0	32.5±0.5	32.0±2.0	39.0±1.0
PDA	30.5±0.5	18.5±0.5	34.5±0.5	26.0±0.0	26.5±0.5	17.5±0.5	34.0±1.0	37.5±0.5	24.5±0.5	27.5±0.5	30.0±1.0	26.0±1.0	37.5±0.5
TSA	39.5±0.5	25.5±0.5	37.5±0.5	26.5±0.5	35.0±1.0	26.0±0.0	32.5±0.5	37.5±0.5	23.5±0.5	34.5±0.5	32.5±0.5	32.0±2.0	45.0±1.0
MSA*	35.0±1.0	13.5±0.5	28.0±1.0	27.5±1.5	42.0±2.0	14.5±0.5	40.0±0.0	45.0±1.0	27.5±0.5	38.0±2.0	26.5±1.5	41.0±1.0	43.0±1.0
MH*	38.5±3.5	28.0±2.0	23.0±1.0	23.5±1.5	29.0±3.0	25.0±0.0	27.0±3.0	33.0±1.0	22.5±0.5	28.0±2.0	31.5±2.5	31.5±1.5	21.0±1.0

Les valeurs indiquées sont les valeurs moyennes moyennes \pm écart-type.

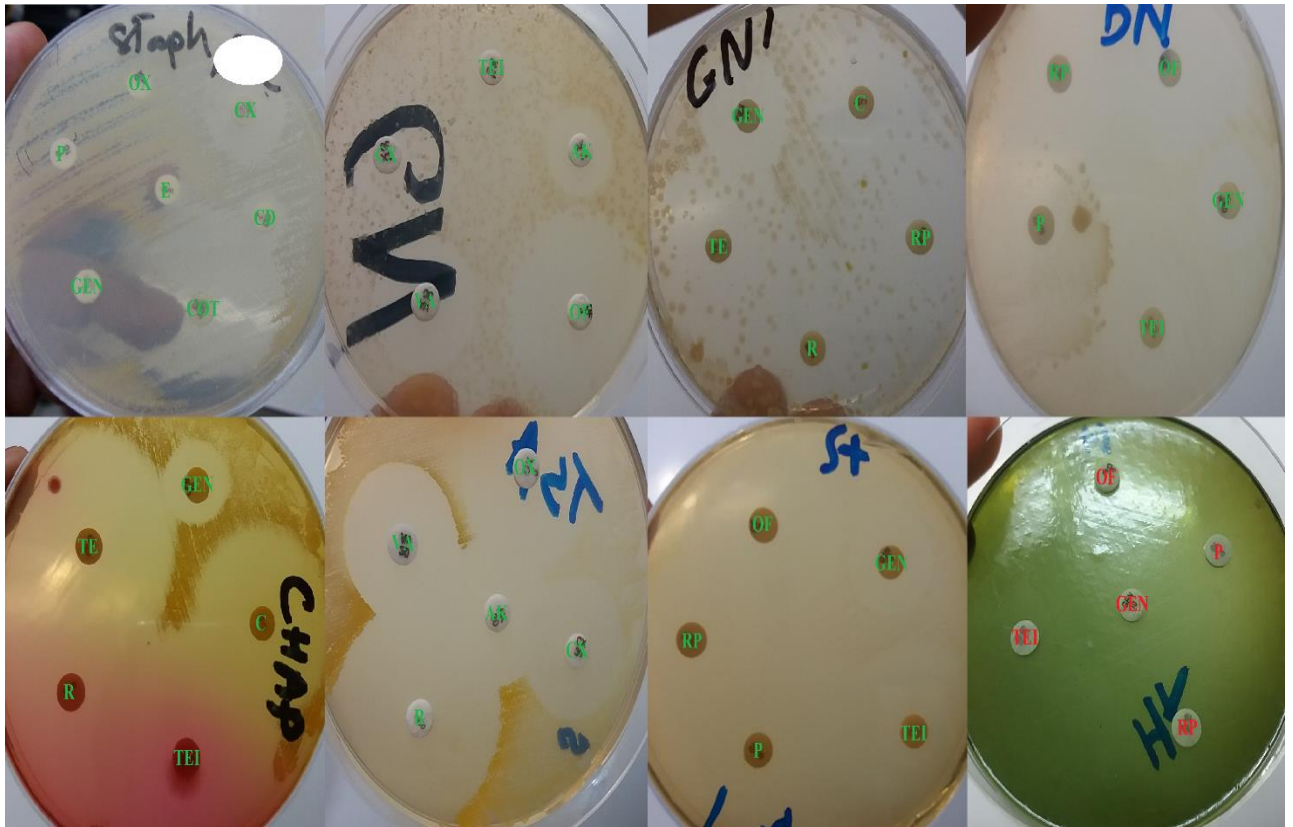


Figure 14. Résultats des antibiogrammes pour *Staphylococcus aureus* HO90 (Photo Originale)

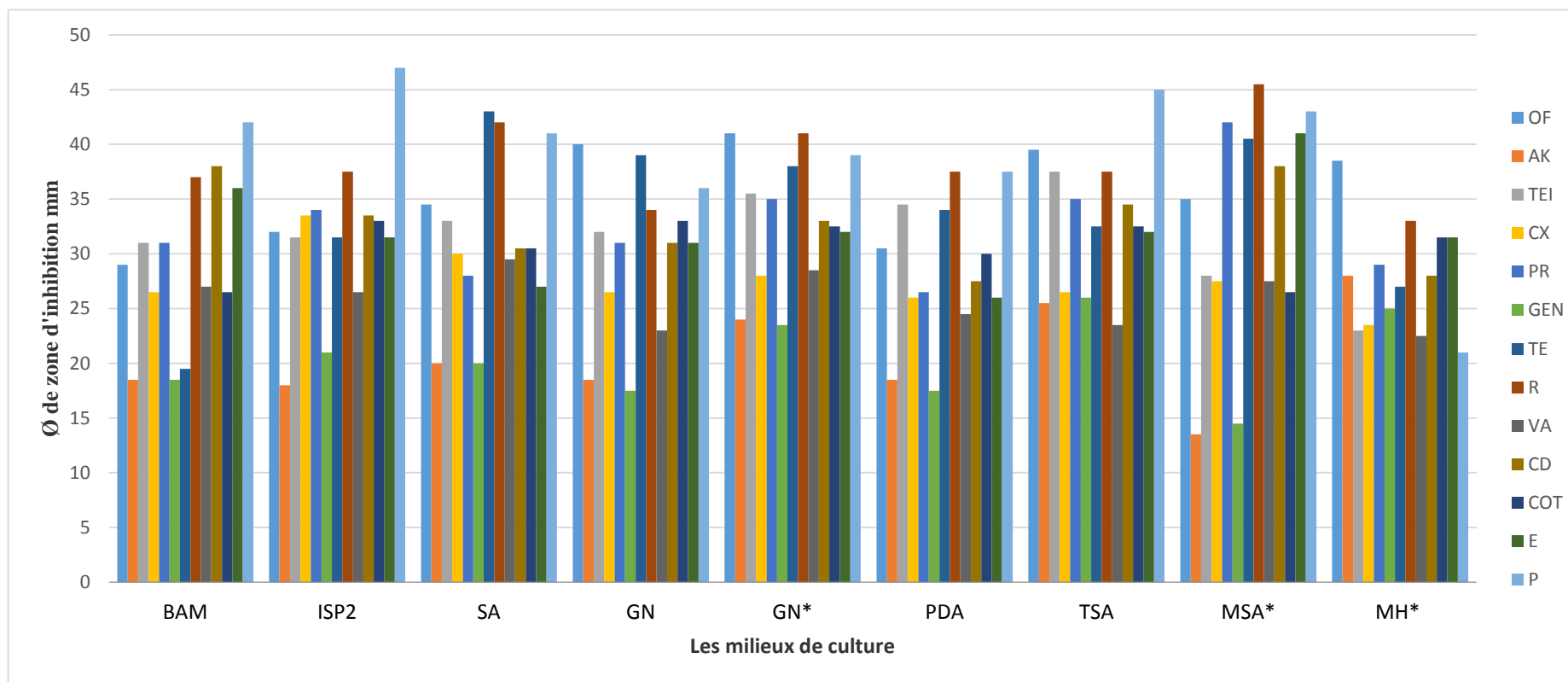


Figure 15. Variation de diamètre des zones d'inhibition en fonction des milieux de culture chez *Staphylococcus aureus* HO90.

Sur la base d'analyses statistiques, nous avons remarqué qu'il n'y a pas de différence significative entre MHA* et les deux milieux de culture suivants: BAM et PDA (basé sur le test de Tukey). (Voir la Figure 21 et l'annexe 9). Par conséquent, le MHA* pourrait être remplacé par ces trois milieux de culture dans les laboratoires médicaux et de recherche. De plus, nous avons observé que les milieux de culture suivants: GN, MSA*, SA, ISP2 et TSA pourraient également être utilisés dans les antibiogrammes. Cependant, le milieu de culture GN* a montré l'effet le plus significatif par rapport aux autres milieux utilisés.

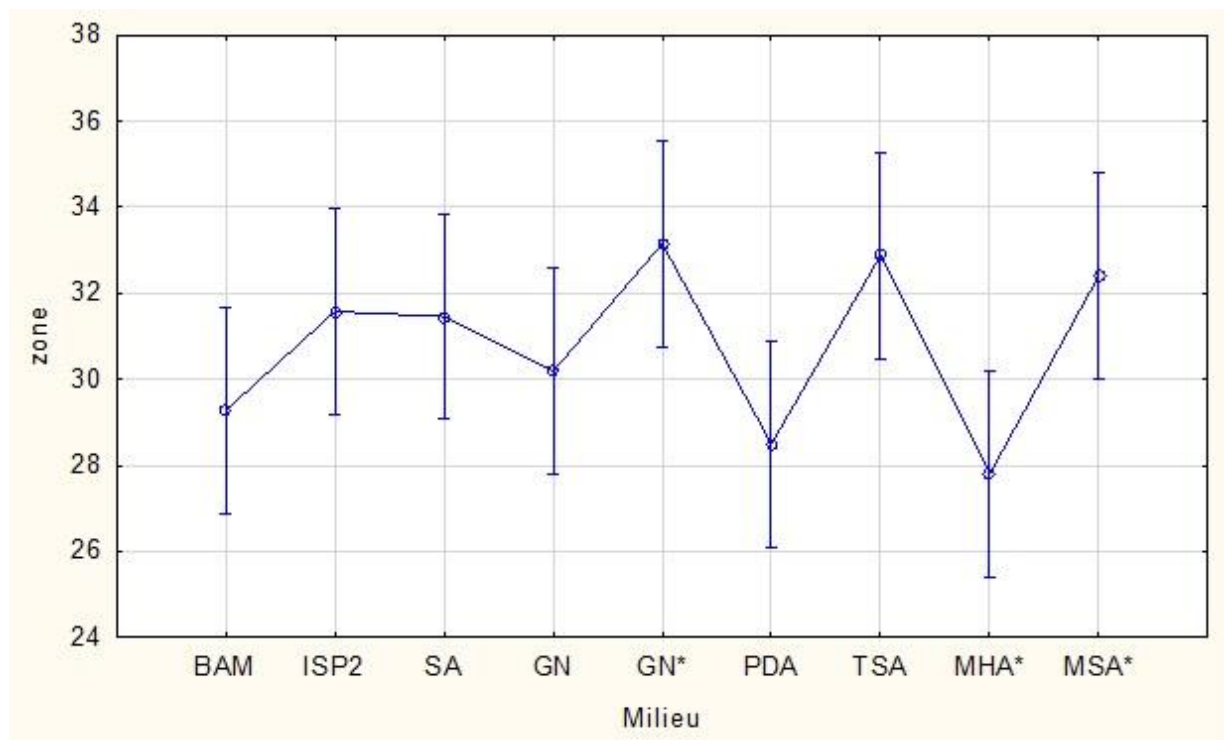


Figure 16. La courbe de teste de Tukey des différentes signification entre les milieux de culture pour *Staphylococcus aureus* HO90.

3.3.2 Interprétations des antibiogrammes

Les mesures de diamètre des zones d'inhibitions sont comparées soigneusement aux valeurs critiques figurant dans les Tableaux 6 et 7, afin de les interpréter en plusieurs catégories (S, I ou R). Les résultats sont présentés dans le Tableau 16.

Tableau 16. Interprétations des antibiogrammes selon le Ø des zones d'inhibitions pour *Staphylococcus aureus* HO90.

Milieu de culture	OF	AK	TEI	CX	PR	GEN	TE	R	VA	CD	COT	E	P
BAM	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ISP2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
GN	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
GN*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PDA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TSA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MSA*	S	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S
MH*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R

Sur la base du tableau 17, nous avons observé que, sauf GEN, AK, P tous les antibiotiques ne présentaient aucun changement dans le profil de sensibilité en utilisant différents milieux de culture. Ce constat a confirmé que le milieu de Mueller-Hinton pourrait être remplacé par de nombreux autres milieux de culture dans les laboratoires médicaux et de recherche pour les antibiogrammes. La précaution unique doit être prise dans le cas de GEN, AK, P (et peut-être d'autres molécules antibactériennes non testés dans cette étude).

Discussion générale

Il a été démontré que la composition du milieu de culture exerce une influence importante sur les susceptibilités antimicrobiennes de tous les microorganismes: procaryotes (bactéries) et eucaryotes (levures et champignons filamenteux) (Arikan *et al.*, 1999; Meletiadis *et al.*, 2001; Pfaller *et al.*, 1998). Les effets des milieux de culture (*in vitro*) sur l'activité antifongique ont été évalués pour des champignons filamenteux, tels que *Aspergillus* spp., mais avec des résultats contradictoires (Arikan *et al.*, 1998; Arikan *et al.*, 2002; Meletiadis *et al.*, 2001; Pfaller *et al.*, 1998). Les tests *in vitro* peuvent aider à déterminer les activités de nouveaux médicaments et pour trouver la bonne thérapie. Les méthodes à base d'agar sont rapides et faciles à réaliser (Fernández-Torres *et al.*, 2006). Garrod et Waterworth (1971) ont signalé que le milieu de culture utilisé doit être exemptes autant que possible des inhibiteurs (en particulier de la tétracycline, sulfonamide et activité triméthoprime). D'un autre côté, Mock *et al.* (1998) ont indiqué que les méthodes ne sont pas recommandées pour tester les azoles, car ces médicaments peuvent diffuser mal dans l'agar agar. Bien que les méthodes de référence recommandent l'utilisation du milieu Mueller Hinton pour les tests sur milieu solide, d'autres milieux moins coûteux ont également été utilisé avec succès (Llop *et al.*, 1999, Müller *et al.*, 2001, Pfaller *et al.*, 1998). Cependant, les résultats obtenus indiquent qu'il n'est pas nécessaire d'utiliser que MHA pour la réalisation des antibiogrammes, et de nombreux autres milieux de culture pourraient être utilisés pour obtenir exactement les mêmes profils de résistance.

**CONCLUSION ET
PERSPECTIVES**

Dans ce travail, on s'est intéressé à la réalisation des antibiogrammes et de prédire la sensibilité de trois souches bactériennes vis-à-vis de plusieurs antibiotiques sur 09 milieux de culture différents.

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 microorganismes.

Un antibiogramme réalisé de manière non standardisée est dépourvu de sens et donc donne un résultat non interprétable. Pour éviter cela, nous conduits à vérifier l'effet des milieux de culture sur la zone d'inhibition, pour trois bactéries, deux à Gram négatif: *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* et une à Gram positif : *Staphylococcus aureus*, avec 25 antibiotiques utilisés avec la totalité des 03 souches bactériennes. Cette vérification permet de tester l'effet des milieux de culture sur la zone d'inhibition des antibiotiques, et de pratiquer une lecture correcte et interprétable. L'influence des milieux de culture 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 un inoculum qui correspond à 0,5 McFarland (densité optique entre 0,08 et 0,1 : absorbance mesurée à 620 nm, standardisé par un spectrophotomètre). Dans les quinze minutes qui suivent la préparation on réalise des antibiogrammes dans neuf 09 milieux de culture, et la lecture est réalisée après 24 heures d'incubation à 37 °C. Par la suite, les moyens de diamètre des zones d'inhibition ont été calculés sur la base de trois répliques analytiques. Les résultats montrent que le diamètre de la zone d'inhibition varie légèrement en fonction des 09 milieux de culture utilisés pour tous les antibiotiques utilisés avec les trois souches bactériennes testées.

Dans une deuxième étape, les données collectées ont été analysées statistiquement par test factoriel ANOVA et Tukey, en utilisant XLSTAT 2014 à un niveau de probabilité de $P \leq 0,05$ pour étudier le degré de significativité entre les 09 milieux de culture utilisés pour les 3 souches bactériennes testées. Et nous avons remarqué :

- qu'il n'y a pas de différence significative entre MHA* et les milieux de culture suivants : SA, TSA, ISP2, et le MHA* pourrait être remplacé par ces quatre milieux de culture suivants : GN, GN*, PDA et BAM dans les antibiogrammes pour *Escherichia coli* HO25 et;

- qu'il y a pas de différence significative entre MHA* et les milieux de culture suivants: HK, BAM, TSA, et le MHA* pourrait être remplacé par ces quatre milieux de culture suivants: GN, GN*, PDA et SA dans les antibiogrammes pour *Pseudomonas aeruginosa* HO80 et;
- qu'il n'y a pas de différence significative entre MHA* et les deux milieux de culture suivants: BAM et PDA, et le MHA* pourrait être remplacé par ces cinq milieux de culture suivants: GN, MSA*, SA, ISP2 et TSA dans les antibiogrammes de *Staphylococcus aureus* HO90. (Voir les annexes 7, 8 et 9).

Pour la dernière étape, nous avons étudié pour chaque antibiotique l'interprétation des souches (sensibles, intermédiaires ou résistantes) selon les diamètres critiques recommandés par CA-SFM pour voir le profil de sensibilité de chaque antibiotique vis-à-vis des 09 milieux de culture utilisés, et nous avons observé que :

- A l'exception de GEN, tous les antibiotiques ne présentaient aucun changement dans le profil de résistance en utilisant différents milieux de culture pour *Escherichia coli* HO25.
- A l'exception de GEN, TCC, CAZ et ATM, tous les antibiotiques ne présentaient aucun changement dans le profil de sensibilité utilisant différents milieux de culture pour *Pseudomonas aeruginosa* HO80.
- sauf GEN, AK, P tous les antibiotiques ne présentaient aucun changement dans le profil de sensibilité en utilisant différents milieux de culture pour *Staphylococcus aureus* HO90.

Finalement, Pour une meilleure évaluation de l'effet des milieux de culture sur la zone d'inhibition il serait intéressant d'élargir l'étude pour d'autre milieux de culture et d'autre souches bactériennes et même avec d'autre antibiotiques a fin d'voire de nouveaux tableau dans les quelles on montre l'effet des milieux de culture et leurs emploi rassuré où l'interprétation de l'antibiogramme reste la même, et pour choisir facilement les milieux de culture à utilisés à pour voir une lecture interprétative, soit pour les condition de travail d'urgence ou même pour les analyses courantes, ou encore pour utiliser des milieux de culture à bas prix (par rapport à Mueller-Hinton).

Il est à noter aussi que l'antibiogramme est influencé par plusieurs facteurs comme la qualité de l'antibiotique (la marque commerciale) et sa charge, la concentration de l'étuve d'incubation en O₂ et CO₂, la durée d'incubation à l'étuve, 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 créé une résistance aux antibiotiques chez les bactéries et maitre la santé personnel et publique en danger.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

-Abismail A., 2017. Effet de la concentration de l'inoculum sur la zone d'inhibition d'un antibiogramme. (Mémoire). Université de Ghardaïa Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre.

-ARIKAN S., LOZANO-CHIU M., PAETZNICK V., NANGIA S. and REX J.H., 1999. Microdilution susceptibility testing of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* and *Fusarium* species. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 37: 3946-3951.

-ARIKAN S., PAETZNICK V., and REX J.H., 2002.- Comparative evaluation of disk diffusion with microdilution assay in susceptibility testing of caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 46: 3084-3087.

-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, Tلمcen:144p.

-Bouchakour S., 2016. Analyse des prescriptions d'antibiotiques en ambulatoire chez l'enfant et du rôle du pharmacien d'officine dans leur bon usage., (Thèse). Tizi Ouzou Université Mouloud Mammeri Faculté de médecine.

-BUTAYE P., VAN DAMME K., DEVRIEZE L.A., VAN DAMME L., BAELE M., LAUWERS S. and HAESEBROUCK F., 2000.- *In vitro* susceptibility of *Enterococcus faecium* isolated from food to growthpromoting and therapeutic antibiotics. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 54: 181-187.

- CARLE S. « La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important ! ». *Pharmactuel* Vol. 42 Supplément 2 Décembre 2009.

-C.A.S.F.M. ; 1998. - Société Française de Microbiologie, COMITE DE L'ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIETE FRANCAISE DE MICROBIOLOGIE :114p.

- C.A.S.F.M. ; 2010. - Société Française de Microbiologie, COMITE DE L'ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIETE FRANCAISE DE MICROBIOLOGIE :114p.
- C.A.S.F.M. ; 2015. - Société Française de Microbiologie, COMITE DE L'ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIETE FRANCAISE DE MICROBIOLOGIE.
- C.A.S.F.M. ; 2016. - Société Française de Microbiologie, COMITE DE L'ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIETE FRANCAISE DE MICROBIOLOGIE.
- C.A.S.F.M. ; 2017. - Société Française de Microbiologie, COMITE DE L'ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIETE FRANCAISE DE MICROBIOLOGIE.
- COPYRIGHT MEDICAL, 2012.Les mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques.FisheN°824-Mécanisme-R-ATB.
- Douadi I., 2014. Etude de l'antibiorésistances des souches bactériennes à l'origine des infections urinaires à l'EPH de Ouargla. (Mémoire). Ouargla Université Kasdi Merbah Faculté de Sciences de la Nature de la Vie.
- FERNÁNDEZ-TORRES B., CARRILLO-MUÑOZ A., INZA I. and OSEP GUARRO J., 2006.- Effect of culture medium on the disk diffusion method for determining antifungal susceptibilities of dermatophytes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 50: 2222-2224.
- FMC 2017. Le manuel du généraliste de l'antibiotique a l'antibiothérapie 2ème édition référence FMC, 2017; 55-56p.
- François D., Marie-Cécil P., Christian M. et Vincent C., 2016. Bactériologie médicale Techniques usuelles, 3ème édition Paris : Elsevier Masson.
- HUYS G., D'HAENE K. and SWINGS J., 2002.- Influence of the culture medium on antibiotic susceptibility testing of food-associated lactic acid bacteria with the agar overlay disc diffusion method. Letters in Applied Microbiology, vol. 34: 402-406.

-L. P. GARROD L.P. and WATERWORTH P.M., 1971.- A study of antibiotic sensitivity testing with proposals for simple uniform methods. *Journal of clinical Pathology*, vol. 24: 779-789.

-LLOP C., SALA J., RIBA M.D., AND GUARRO J., 1999.- Antimicrobial susceptibility testing of dematiaceous filamentous fungi: effect of medium composition at different temperatures and times of reading. *Mycopathologia*, vol. 148: 25-31.

-MELETIADIS J., MEIS J.F.G.M., MOUTON J.W. and VERWEIJ P.E., 2001.- Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 39: 478-484.

-MOCK M., MONOD M., BAUDRAZ-ROSSELET F. and PANIZZON R.G., 1998.- Tinea capitis dermatophytes: susceptibility to antifungal drugs tested *in vitro* and *in vivo*. *Dermatology*, vol. 197: 361-367.

-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.

- MOHAMAD I.D., 2010. Classification et mode d'action des antibiotiques. 3P -10 P.

-MÜLLER, F-M.C., KURZAI O., HACKER J., FROSCHE M., and MÜHLSCHLEGEL F., 2001.- Effect of the growth medium on the *in vitro* antifungal activity of micafungin (FK-463) against clinical isolates of *Candida dubliniensis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 48: 713-715.

-NDORMA OMER, 2004. La résistance aux antibiotiques. Oscar S.VI-4 FSR Rabat AGDAL. 17P ,191P.

-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.

-PECHERE.J.C, 1991.3^{ème} édition reconnaître comprendre-traiter les infections.395 P

PERRETEN V., GIAMPA N., SCHULER-SCHMID U. and TEUBER M., 1998.- Antibiotic resistance genes in coagulase-negative Staphylococci isolated from food. *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 21: 113-120.

-PERRETEN V., KOLLÖFFEL B. and TEUBER M., 1997.- Conjugal transfer of the Tn916-like transposon TnFO1 from *Enterococcus faecalis* isolated from cheese to other Gram-positive bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 20: 27-38.

-PFALLER M.A., MESSER S.A., KARLSSON A. and BOLMSTRÖM A., 1998.- Evaluation of the Etest method for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeast isolates by using three different agar media. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 36: 2586-2589.

-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.

-SABINE ROBERT-DERNUET. « Antibiotiques et antibiogrammes ». Edition vigot.1995.

-Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (Médecine humaine et vétérinaire). République algérienne démocratique et populaire. Réseau Algérien de la Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques. Document édité avec la collaboration de l'OMS, 6^{ème} édition, 2011.

- Van Bambeke F, Glupczynski Y ; Mingeot-Leclercq MP Etienne Sonveaux. Pharmacologie et Pharmacothérapie Anti-infectieuse Antibiotiques / Antifongiques. Bruxelles, E. Mounier, 2008.

ANNEXES



Annexes 1

Les diamètres des zones d'inhibition (en mm) obtenus pour chaque milieu de culture / combinaison d'antibiotiques pour <i>Escherichia coli</i> HO25.								
Milieu de culture	AMP	AMC	CEP	CX	CTX	GEN	FOS	COT
BAM	0	0	0	0	17	14	41	0
BAM	0	0	0	0	27	15	45	0
BAM	0	0	0	0	22	14,5	43	0
ISP2	0	0	0	0	13	14	38	0
ISP2	0	0	0	0	14	16	38	0
ISP2	0	0	0	0	13,5	15	38	0
SA	0	0	0	0	23	10	38	0
SA	0	0	0	0	22	9	37	0
SA	0	0	0	0	22,5	9,5	37,5	0
HK"	0	0	6	10	18	24	42	0
HK"	0	0	8	10	26	22	40	0
HK"	0	0	7	10	22	23	41	0
GN"	0	0	0	0	20	18	48	0
GN"	0	0	0	0	22	20	50	0
GN"	0	0	0	0	21	19	49	0
GN*	0	0	0	0	16	20	46	0
GN*	0	0	0	0	19	20	45	0
GN*	0	0	0	0	17,5	20	45,5	0
PDA	0	0	0	7	21	14	40	0
PDA	0	0	0	6	20	13	38	0
PDA	0	0	0	6,5	20,5	13,5	39	0
TSA	0	0	0	0	22	10	37	0
TSA	0	0	0	0	20	10	38	0
TSA	0	0	0	0	21	10	37,5	0
MH*	0	0	0	0	12	11	39	0
MH *	0	0	0	0	13	12	38	0
MH*	0	0	0	0	12,5	11,5	38,5	0

Annexe 2

Les diamètres des zones d'inhibition (en mm) obtenus pour chaque milieu de culture / combinaison d'antibiotiques pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> HO80.								
Milieu de culture	IMP	CL	PI	ATM	TCC	GEN	R	CAZ
BAM	36	11	30	14	36	31	10	20
BAM	38	11	28	14	40	32	11	22
BAM	37	11	29	14	38	30	10,5	21
ISP2	40	13	20	17	0	22	17	8
ISP2	38	13	28	16	0	23	19	6
ISP2	39	13	24	15	0	22,5	18	7
SA	30	17	30	21	32	22	10	17
SA	30	16	26	22	30	19	10	19
SA	30	16,5	28	20	31	20,5	10	18
HK	30	21	27	22	40	28	11	24
HK	26	18	30	22	38	28	12	26
HK	28	19,5	28,5	22	39	28	10	25
GN	36	16	24	22	30	18	14	16
GN	40	15	20	22	30	20	16	16
GN	38	15,5	22	22	30	19	15	16
GN*	41	12	26	21	32	24	10	18
GN*	42	14	24	22	32	26	10	20
GN*	41,5	13	25	20	32	25	10	19
PDA	40	15	23	20	30	18	10	18
PDA	36	15	23	22	31	20	12	18
PDA	38	15	23	21	30,5	19	11	18
TSA	34	20	20	24	34	23	10	24
TSA	34	20	22	25	34	21	10	23
TSA	35	24	20	26	32	24	10	24
MSA*	0	0	0	0	0	0	0	0
MSA*	0	0	0	0	0	0	0	0
MSA*	0	0	0	0	0	0	0	0

Annexes 3

Les diamètres des zones d'inhibition (en mm) obtenus pour chaque milieu de culture / combinaison d'antibiotiques pour <i>Staphylococcus aureus</i> HO90.													
Milieu de culture	OF	AK	TEI	CX	PR	GEN	TE	R	VA	CD	COT	E	P
BAM	34	18	19	32	28	32	17	30	28	44	20	40	44
BAM	40	21	18	30	25	30	20	28	26	32	33	32	40
BAM	37	19,5	18,5	31	26,5	31	18,5	29	27	38	26,5	36	42
ISP2	35	30	21	35	34	33	19	34	28	31	34	32	48
ISP2	40	33	21	33	33	30	17	30	25	36	32	31	46
ISP2	37,5	31,5	21	34	33,5	31,5	18	32	26,5	33,5	33	31,5	47
SA	42	42	20	26	32	32	20	35	29	31	31	25	44
SA	42	44	20	30	28	34	20	34	30	30	30	29	38
SA	42	43	20	28	30	33	20	34,5	29,5	30,5	30,5	27	41
HK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GN	38	38	17	30	28	36	17	40	23	30	31	32	36
GN	30	40	18	32	25	32	20	40	23	32	35	30	36
GN	34	39	17,5	31	26,5	34	18,5	40	23	31	33	31	36
GN*	40	36	24	34	27	35	24	40	28	34	32	30	38
GN*	42	40	23	36	29	36	24	42	29	32	33	34	40
GN*	41	38	23,5	35	28	35,5	24	41	28,5	33	32,5	32	39
PDA	37	36	18	27	26	35	18	30	25	28	29	27	37
PDA	38	34	17	26	26	34	19	31	24	27	31	25	38
PDA	37,5	35	17,5	26,5	26	34,5	18,5	30,5	24,5	27,5	30	26	37,5
TSA	38	32	26	36	26	38	25	40	24	35	32	30	46
TSA	37	33	26	34	27	37	26	39	23	34	33	34	44
TSA	37,5	32,5	26	35	26,5	37,5	25,5	39,5	23,5	34,5	32,5	32	45
MSA*	46	40	15	44	29	29	14	34	28	40	25	42	42
MSA*	44	40	14	40	26	27	13	36	27	36	28	40	44
MSA*	45	40	14,5	42	27,5	28	13,5	35	27,5	38	26,5	41	43

Annexes 4

ANOVA Test de significativité de l'interaction (milieu de culture × antibiotiques) pour <i>Escherichia coli</i> HO25.					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	6825,01	1	6825,014	923,9807	0,000000
Milieu	163,80	8	20,475	2,7719	0,011785
antibiogra	13701,04	7	1957,292	264,9811	0,000000
Error	413,65	56	7,387		

Annexes 5

ANOVA Test de significativité de l'interaction (milieu de culture × antibiotiques) pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> HO80.					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	36833,50	1	36833,50	1294,431	0,000000
Milieu	344,28	8	43,03	1,512	0,173785
antibiogra	3611,97	7	516,00	18,134	0,000000
Error	1593,50	56	28,46		

Annexes 6

ANOVA Test de significativité de l'interaction (milieu de culture × antibiotiques) pour <i>Staphylococcus aureus</i> HO90.					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	111046,3	1	111046,3	5874,092	0,000000
Milieu	396,7	8	49,6	2,623	0,012143
antibiogra	3725,9	12	310,5	16,424	0,000000
Error	1814,8	96	18,9		

Annexes 7

ANOVA Test de Tukey HSD pour <i>Escherichia coli</i> HO25.				
Cell No.	Milieu	Zone Mean	1	2
9	MHA*	7,81250	****	
2	ISP2	8,31250	****	
8	TSA	8,56250	****	****
3	SA	8,68750	****	****
1	BAM	9,93750	****	****
7	PDA	9,93750	****	****
6	GN*	10,37500	****	****
5	GN	11,12500	****	****
4	HK	12,87500		****

Annexes 8

ANOVA Test de Tukey HSD pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> HO80.			
Cell No	Milieu	Zone Mean	1
2	ISP2	17,31250	****
3	SA	21,75000	****
7	PDA	21,93750	****
5	GN	22,06250	****
6	GN*	23,12500	****
8	TSA	23,68750	****
1	BAM	23,93750	****
9	MHA*	24,75000	****
4	HK	25,00000	****

Annexes 9

ANOVA Test de Tukey HSD pour <i>Staphylococcus aureus</i> HO90.			
Cell No	Milieu	zone Mean	1
9	MHA*	27,80769	****
7	PDA	28,50000	****
1	BAM	29,26923	****
5	GN	30,19231	****
3	SA	31,46154	****
2	ISP2	31,57692	****
4	MSA*	32,42308	****
8	TSA	32,88462	****
6	GN*	33,15385	****