

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 Biologie
Spécialité : Biochimie Appliquée

THEME

Effet de la Température et de pH sur la zone
d'inhibition d'un antibiogramme
d'*Escherichia coli* HO25, de *Pseudomonas aeruginosa*
HO80 et de *Staphylococcus aureus* HO 90

Présenté par

BENNACER Slimane
SAID Abdelkrim

Membres du jury

M. S. BELGHIT
M. S. HADDAD
M. N. BOURAS

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

Président
Examineur
Encadreur

Juin 2018

SOMMAIRE

REMERCEIMNT
INDEX DES TABLEAUX
INDEX DES FIGURES
LISTE DES ABRÉVIATIONS
RÉSUMÉS.....
INTRODUCTION GENERALE	1
I.- REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
I ANTIBIOTIQUES.....	3
1.- Généralités.....	3
2.- Définition	3
3.- Classification des antibiotiques	4
3.1.- Classification selon leurs structures chimiques	4
3.2.- Autre classification	6
3.2.1.- Classification d'après le spectre d'action	6
3.2.2.- Classification d'après leur type d'action	7
3.2.3.- Classification d'après leur origine	7
3.2.4.- Classification d'après leur mode d'action	7
3.2.5.- Classification d'après leur charge électrique.....	7
4.- Mode d'action des antibiotiques.....	8
5.- Microorganismes producteurs d'antibiotiques	10
5.1.- Bactéries non mycéliennes et	10
5.2.- Champignons	10
5.3.-Actinobacteries	11
6.- Phénomène de résistance aux antibiotiques	11
6.1.- Le types de résistance	11
6.1.1.- La résistance naturelle	11
6.1.2.- La résistance acquise.....	12
6.2.- Mécanismes biochimique de résistance bactérienne aux agents antibactériens	12
6.2.1.- Modification de la cible des antibiotiques.....	12
6.2.2.- Pompes d'efflux	13
6.2.3.- Production d'enzymes inactivant les antibiotiques.....	13

7.- Microorganismes résistants aux antibiotiques.....	14
7.1.- Microorganismes résistants à Gram positif.....	14
7.1.1.- <i>Staphylococcus aureus</i>	14
7.1.2.- <i>Streptococcus pneumoniae</i>	15
7.1.3.- Entérocoques	15
7.2.- Microorganismes résistants à Gram-négatif.....	16
7.2.1- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
7.2.2- <i>Acinetobacter baumannii</i>	16
7.2.3.- <i>Enterobacteriaceae</i>	16
7.2.3.1- <i>Salmonella</i>	17
7.2.3.2- <i>Escherichia coli</i>	17
7.2.3.3.- <i>Klebsiella pneumoniae</i>	18
II- ANTIBIOGRAMME	18
1.- Définition	18
2.- Détermination des catégories S/I/R	19
3.- Définition bactériostase et bactéricide	19
4.- Association d'antibiotiques	20
5.- AntibioGramme en milieu gélosé.....	20
5.1.- principe général	20
5.2.- Technique de l'antibioGramme	21
5.3.- Lecture interprétative de l'antibioGramme	25
5.4.- Standardisation de l'antibioGramme	26
CHAPITRE II	
II.- MATÉRIEL ET MÉTHODES	
I.- MATERIEL DU LABORATOIRE.....	28
1.- Appareillage	28
2.- Petit matériel.....	28
3.- Produits chimiques.....	28
4.- Matériel biologique.....	28
5.- Milieu de culture.....	29
6.- Repiquage des souches bactériennes	30
II.- METHODES UTILISEES.....	31
1.- AntibioGramme par diffusion en milieu Mueller Hinton gélosé	32
1.1.- Préparation de la solution mère et ajustement de l'inoculum	32
1.2.- Préparation des dilutions	32

1. 3.- Détermination de la concentration d'inoculum	33
1.3.1- la standardisation de l'inoculum	33
1.4.- Ensemencement	33
1.5.- Choix des antibiotiques et incubation	34
1.6.- Lecture et interprétation	38
2. – Analyse statistique	39

CHAPITRE III

III.- RESULTATS ET DISCUSSION

PARTIE 1 : *Escherichia coli*

1.- Résultat de l'antibiogramme température	40
2.- Interprétations des antibiogrammes	41
3.- Analyse statistique	43
3.1.- Modélisation	43
4.- Résultat de l'antibiogramme pH.....	45
5.- Interprétations des antibiogrammes	47
6.- Analyse statistique	48
6.1.- Modélisation	48

PARTIE 2 : *Pseudomonas aeruginosa*

1.- Résultat de l'antibiogramme température	52
2.- Interprétations des antibiogrammes	54
3.- Analyse statistique	55
3.1.- Modélisation	55
4.- Résultat de l'antibiogramme pH.....	57
5.- Interprétations des antibiogrammes	59
6.- Analyse statistique	60
6.1.- Modélisation	60

PARTIE 3 : *Staphylococcus aureus*

1.- Résultat de l'antibiogramme température	64
2.- Interprétations des antibiogrammes	66
3.- Analyse statistique	68
3.1.- Modélisation	68
4.- Résultat de l'antibiogramme pH.....	72
5.- Interprétations des antibiogrammes	74
6.- Analyse statistique	75
6.1.- Modélisation	75

IV.- CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES.....	

INDEX DES TBLEAUX

Tableau 1. Classification des quelques antibiotiques selon leur spectre d'action.	06
Tableau 2. Principaux mécanismes d'actions des antibiotiques (Prescott <i>et al.</i> , 2003).....	08
Tableau 3. Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour une Entérobactérie : <i>Escherichia coli</i> ATCC25922 (Rahal <i>et al.</i> , 2011).....	21
Tableau 4. Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour <i>Pseudomonas aeruginosa et Acinetobacter sp</i> (Rahal <i>et al.</i> , 2011).	22
Tableau 5. Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI <i>Staphylococcus sp</i> (Rahal <i>et al.</i> , 2011).	23
Tableau 6. Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI <i>Staphylococcus sp</i> (Rahal <i>et al.</i> , 2011).	24
Tableau 7. Description des souches utilisé (Beddou, 2015; Grosjean, <i>et al.</i> , 2011).	21
Tableau 8. Familles des antibiotiques utilisés (C.A.S.F.M, 2010).	26
Tableau 9. Résultats des antibiogrammes et écartype de chaque température pour <i>Escherichia coli</i> HO25.....	31
Tableau 10. Interprétations des antibiogrammes de chaque température pour la souche d' <i>Escherichia coli</i> HO25.	32
Tableau 11. Interprétations des antibiogrammes selon le Ø des zones d'inhibitions calculés en fonction de température pour la souche testée <i>Escherichia coli</i> HO25.....	35
Tableau 12. Résultats des antibiogrammes et écartype de chaque pH pour la souche testée <i>Escherichia coli</i> HO25	36
Tableau 13. Interprétations des antibiogrammes de chaque pH pour la souche testée.....	37
Tableau 14. Interprétations des antibiogrammes selon le Ø des zones d'inhibitions calculé en fonction de pH pour <i>Escherichia coli</i> HO25.	40
Tableau 15. Résultats des antibiogrammes et écartype de chaque température pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> HO80.....	42
Tableau 16. Interprétations des antibiogrammes de chaque température pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> HO80.	43
Tableau 17. Interprétations des antibiogrammes selon le diamètre des zones d'inhibitions calculés en fonction de température pour la souche testée <i>Pseudomonas aeruginosa</i> HO80. .	46
Tableau 18. Résultats des antibiogrammes et écartype de chaque pH pour la souche testée <i>Pseudomonas aeruginosa</i> HO80.....	48

Tableau 19. Interprétations des antibiogrammes de chaque pH pour la souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i> HO80.	49
Tableau 20. Interprétations des antibiogrammes selon le diamètre des zones d'inhibitions calculé en fonction de pH pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> HO80.	52
Tableau 21. Résultats des antibiogrammes et écartype de chaque température pour la souche testée de <i>Staphylococcus aureus</i> HO90.	54
Tableau 22. Interprétations des antibiogrammes de chaque température pour la souche testée de <i>Staphylococcus aureus</i> HO90.	56

Figure 1. Exemple de gélose avec des disques d'antibiotiques et une souche bactérienne ayant une sensibilité variable aux antibiotiques testés (Photo Originale)	20
Figure 2. Flacons contiens la gélose Mueller Hinton utilisé comme milieu de culture pour l'antibiogramme (Photo Originale).	29
Figure 3. Colonies d' <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> repiquées par la méthode des stries, incubées à 37 °C, durant 24 h (Photo Originale).	29
Figure 4. Etape de la démarche expérimentale.	30
Figure 6. Mesure de la densité optique (DO) par un spectrophotomètre (Photo Originale). ...	32
Figure 7. Ensemencement d' <i>Escherichia coli</i> et application des disques d'antibiotiques	35
Figure 8. Incubation des boîtes de Pétri dans l'étuve à 37°C durant 24 h (Photo Originale). ...	35
Figure 9. Principe de la lecture d'un antibiogramme (Photo Originale).	37
Figure 10. La variation de diamètre des zones d'inhibition en fonction de la température chez <i>Escherichia coli</i> HO25.	41
Figure 11. Reultats de l'antibiogramme pour <i>Escherichia coli</i> HO25(photo original)	42
Figure 12. Courbes de tendance entre le diamètre de zone d'inhibition (mm) et la température (comprise entre 0 et 65°C) pour la souche testée d' <i>Escherichia coli</i> HO25.	44
Figure 13. La variation de diamètre des zones d'inhibition en fonction de pH chez la souche <i>Escherichia coli</i> HO25.	47
Figure 14. Résultats de l'antibiogramme pour <i>Escherichia coli</i> HO25(photo original)	47
Figure 15. Courbes de tendance entre le diamètre de zone d'inhibition(mm) et le pH (comprise entre 0 et 14) pour la souche testée d' <i>Escherichia coli</i> HO25.	49

Figure 16. Variation de diamètre des zones d'inhibition en fonction de la température chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> HO80.....	53
Figure 17. Résultats de l'antibiogramme pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> HO80	54
Figure 18. Courbes de tendance entre le diamètre de zone d'inhibition (mm) et la température (comprise entre 0 et 65°C) pour la souche testée <i>Pseudomonas aeruginosa</i> HO80.....	56
Figure 19. Variation de diamètre des zones d'inhibition en fonction de pH chez la souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i> HO80.....	59
Figure 20. Résultats de l'antibiogramme pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> HO80	60
Figure 21. Courbes de tendance entre le diamètre de zone d'inhibition (mm) et le pH (comprise entre 0 et 14 mm) pour la souche testée de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> HO80.....	62
Figure 22. Variation de diamètre des zones d'inhibition en fonction de la température chez la souche testée de <i>Staphylococcus aureus</i> HO90.....	67
Figure 23. Résultats de l'antibiogramme pour <i>Staphylococcus aureus</i> HO90 (Photo original)	68
Figure 24. Courbes de tendance entre le diamètre de zone d'inhibition (mm) et la température (comprise entre 0 et 65°C) pour la souche testée de <i>Staphylococcus aureus</i> HO90.	70
Figure 25. Variation de diamètre des zones d'inhibition en fonction de pH chez la souche <i>Staphylococcus aureus</i> HO90.....	75
Figure 26. Résultats de l'antibiogramme pour <i>Staphylococcus aureus</i> HO90 (Photo original)	76
Figure 27. Courbes de tendance entre le diamètre de zone d'inhibition (mm) et le pH (comprise entre 0 et 14) pour la souche testée de <i>Staphylococcus aureus</i> HO90.....	78

INDEX DES FIGURES

ATCC: American Type Culture collection

BLSE: β - lactamase à spectre étendu

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

CLSI :The Clinical and Laboratory Standards
Institute

DO : Densité Optique

EUCAST :European Committee on Antimicrobial
Susceptibility Testing

LCR : Liquide céphalo-rachidien

RESUME

L'antibiogramme est une technique de routine d'analyse médicale. Il est réalisé lorsque l'examen bactériologique d'un prélèvement biologique a mis en évidence la présence de bactéries. Afin de contrôler la validité des résultats obtenus lorsqu'il est réalisé dans des températures inférieure ou supérieure à 37°C et des pH de milieu inférieur ou supérieur à 7

Dans cette étude, nous avons évalué l'influence de la température et le pH de milieu sur l'activité antibactérienne contre 03 souches bactériennes *Escherichia coli* HO25, *Pseudomonas aeruginosa* HO80 et de *Staphylococcus aureus* HO 90 en mesurant les diamètres des zones d'inhibition par une méthode de diffusion sur gélose. Le profil de sensibilité aux antibiotiques a été déterminé en testant premièrement quatre valeurs de températures : 25, 30, 37 et 44 ° C. et deuxièmes quatre valeurs de pH 6, 6,5, 7, 7,5, 8

Les résultats obtenus par la première série d'épreuve de température indiquent qu'il n'y a pas de différence significative entre 30 et 37 ° C (test de Tukey) pour les trois souches bactériennes.

Les résultats obtenus par la deuxième série d'épreuve de PH indiquent que l'interprétation d'antibiogramme reste la même pour les pH 6-6,5 et 8, et presque les même pour pH 7 et 7,5, malgré l'exigence de l'OMS et la SFM un ph milieu de culture des trois souches pour la réalisation des antibiogrammes a des valeurs de pH entre 7,2 et 7,4

Nous avons constaté que les résultats d'antibiogramme sont les même pour les valeurs de pH de 6, 6,5, 7, 7,5 et 8, et donc l'chèque thérapeutique n'est pas envisageable dans ces conditions.

ABSTRACT

An antibiogram is a routine technique of medical analysis. It is carried out when bacteriological examination of a biological sample has revealed the presence of bacteria. In order to check the validity of the results obtained when it is carried out in temperatures lower or higher than 37 ° C and pH of medium less than or greater than 7

In this study, we evaluated the influence of temperature and medium pH on the antibacterial activity against 03 bacterial strains *Escherichia coli* HO25 *Pseudomonas aeruginosa* HO80 and *Staphylococcus aureus* HO 90 by measuring the diameters of the inhibition zones by agar diffusion method. The antibiotic sensitivity profile was determined by first testing four temperature values: 25, 30, 37 and 44 ° C and second four pH values of 6, 6.5, 7, 7.5, 8

The results obtained by the first series of temperature tests indicate that there is no significant difference between 30 and 37 ° C (Tukey test) for the three bacterial strains.

The results obtained by the second series of pH tests indicate that the antibiogram interpretation remains the same for pH 6-6.5 and 8, and almost the same for pH 7 and 7.5, despite the requirement from WHO and SFM a culture medium of the three strains for performing antibiograms at pH values between 7.2 and 7.4.

We found that the antibiogram results are the same for the pH values of 6, 6.5, 7, 7.5 and 8, and therefore the therapeutic check is not possible under these conditions.



INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les bactéries, comme tous les micro-organismes possèdent des systèmes de croissance et de métabolisme soumis à des régulations imposées par leur environnement. Ce dernier est défini par un nombre important de paramètres physicochimiques.

En microbiologie la réponse d'une bactérie aux variations des paramètres physico-chimique relève d'une grande complexité et son étude nécessite de bien caractériser la nature de cette réponse afin de prévoir le comportement de ces bactéries en présence d'un antibiogramme.

En effet même si de nombreuses mesures physiques et chimiques sont possibles aujourd'hui, de nombreux verrous subsistent lorsqu'il s'agit de caractériser des souches bactériennes.

Le but de réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotique dans une optique essentiellement thérapeutique. Il sert également :

- A la surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne
- A l'identification bactérienne par la mise en évidence de résistances naturelle

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

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

Parmi les principales recommandations influant sur le résultat de l'antibiogramme la température et la durée de l'incubation recommandées et le pH du milieu sont des éléments primordiaux et doivent être respectés pour chaque souche bactérienne.

Cette étude a été réalisée afin de déterminer l'influence de la température et de pH du milieu sur la zone d'inhibition d'un antibiogramme d'*Escherichia coli* HO25, de *Pseudomonas aeruginosa* HO80 et de *Staphylococcus aureus* HO 90.

INTRODUCTION

L'objectif de notre travail consiste à :

- Evaluation des profils de résistance des souches vis-à-vis le changement de la température et le pH
- vérifier l'effet de la température et le pH sur la zone d'inhibition de trois bactéries testées, à savoir *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Cette vérification permet de choisir judicieusement les températures et le pH du milieu.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.- ANTIBIOTIQUES

1.- Généralités

Depuis que l'utilisation répandue de la chimiothérapie antimicrobienne a commencé dans les années 1950, il est apparu, grâce à la surveillance des résistances, que presque tous les microorganismes pathogènes avaient développé une résistance à des agents chimiothérapeutiques, ceci en grande partie en raison de leur mauvaise utilisation. Les molécules de pénicilline et de sulfamide, les premiers agents chimio-thérapeutiques couramment employés, connaissent aujourd'hui une utilisation plus limitée parce que beaucoup de microbes pathogènes y sont résistants. Même les organismes ou toutes les souches restent sensibles à la pénicilline, comme *Streptococcus pyogènes* (bactérie responsable d'angine, de la scarlatine et de rhumatismes articulaires) exigent maintenant des doses plus fortes de pénicilline qu'il y a dix ans, pour une efficacité de traitement égale (Madigan et Martinko, 2007).

Devant cette situation alarmante, l'utilisation appropriée des antibiotiques restent absolument nécessaire pour prolonger la durée de validité clinique de ces molécules.

Cependant, la solution à long terme pour contrer les résistances microbiennes est de développer ou rechercher de nouvelles molécules (Madigan et Martinko, 2007 ; Saisivam *et al.*, 2008).

Dans les années 1990, la découverte de métabolites bioactifs d'origine microbienne a progressé de manière exponentielle grâce aux progrès technologiques. Malheureusement, parmi les métabolites découverts, nombreux sont des analogues de molécules déjà connues, des composés n'ayant pas d'activité antibiotique ou encore des composés mineurs. La découverte de nouvelles familles chimiques innovantes se raréfie (Berdy, 2005).

Pourtant de nouveaux besoins émergents, des germes multi résistants (Sharma *et al.*, 2005) et de nouveaux virus apparaissent. Face à ces besoins, de nouveaux composés chimiques doivent donc être identifiés et la recherche de nouvelles molécules bioactives évolue.

2.- Définition :

Définition de WAKSMAN 1951 :

Composés chimiques naturels produits par des microorganismes qui ont la propriété d'inhiber la croissance et même de détruire des bactéries ou d'autres microorganismes, en solution diluée, in vivo et in vitro.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Définition actuelle : Composés chimiques élaborés par un microorganisme vivant ou produits par synthèse et qui ont la propriété d'inhiber à faible dose des processus vitaux des virus, microorganismes (bactéries, champignons) ou certaines cellules des êtres pluricellulaires (cellule cancéreuse).

Certaines antibiotiques ont été identifiés et beaucoup ont été développés pour être des médicaments destinées aux traitements des maladies infectieuses.

3.- Classification des antibiotiques :

Pour pouvoir mieux connaître les antibiotiques afin qu'ils soient utilisés à bon escient, on a procédé à leur classification selon certains critères :

- Les antibiotiques ayant une même structure chimiques, à l'origine de leur mécanisme d'action, se classent dans une même famille ;

- au sein d'une même famille, les antibiotiques peuvent se différencier par leur spectre d'activité et sont réunis alors dans des groupes ;

- au sein d'un même groupe, l'activité antimicrobienne est identique mais les antibiotiques peuvent se différencier par leur propriété pharmacologique ou leur tolérance (Talbert, et al;2009).

3.1.- Classification selon leurs structures chimiques :

Les principales familles des antibiotiques On a 5 grandes familles des antibiotiques :

a. β - lctamines :

Les bêtalactamines constituent la famille d'antibiotiques la plus utilisée en antibiothérapie. Ils représentent une vaste famille d'antibiotiques bactéricides qui possèdent comme structure de base le cycle bêta-lactame qui regroupe : Les pénames 1= S: Pénicilline qui comportent plusieurs groupes :

- Pénicilline G (voie parentérale) et V (voie orale)
- Pénicilline M (méticilline)
- Pénicilline A (aminopénicilline)
- Carboxy-pénicillines (ticarcilline) à usage hospitalier

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

- Uréido-pénicillines (pipéracilline)
- Amidino-pénicillines (pivmécillinam) (Laurent, 2009).

Les céphems 1=S : qui comportent plusieurs groupes :

- Céfalotine
- Céfuroxime, céfamandole
- Céfotaxime, ceftriaxone
- Céfépime, cefpirome

Les carbapénèmes : pénams 1= C

- Imipénème
- monobactams (Archambaud, 2009)

b. Glycopeptides :

Les antibiotiques importants que renferme cette famille sont la Vancomycine et Teicoplanine. Ces deux molécules n'agissent que sur les bactéries à Gram positif en inhibant la synthèse du peptidoglycane et donc la croissance des bactéries (Mouton, *et al.*, 2000).

c. Aminosides

Leur structure est à base de sucres aminés Les principales molécules sont : Streptomycine, Gentamicine, Netilmicine, Tobramycine, Amikacine. Est un antibiotique bactéricide. Ils se fixent de façon irréversible sur le ribosome des bactéries et inhibent la traduction en provoquant des erreurs de lecture de l'ARN messager (Archambaud, 2009).

d. Macrolides

Les antibiotiques macrolides sont caractérisés par le cycle lactone relié aux molécules de sucres .Il y a une grande variété d'antibiotiques macrolides, le plus connu est l'érythromycine. Il est un inhibiteur de synthèse de protéine au niveau de la sous-unité 50S du ribosome (bactériostatiques) (Madigan et Martinko, 2007).

e. Quinolones

Les quinolones sont des antibiotiques bactéricides à large spectre, on distingue les antibiotiques de :

- 1ère génération : Acide nalidixique ;

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

- 2ème génération : fluoroquinolones : Norfloxacin, Ofloxacin, Ciprofloxacin ;
- 3ème génération : Lévoﬂoxacin, Moxiﬂoxacin.

Ils sont très efficaces contre les bactéries entériques comme *E. coli* et *Klebsiella pneumoniae* et contre *Haemophilus*, *Neisseria*, *Pseudomonas aeruginosa* et d'autres bactéries pathogènes Gram négatives, ainsi que les Gram positives telles que *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* et *Mycobacterium tuberculosis*. Ils sont utilisés dans le traitement des infections du système urinaire (Prescott, et al., 2007).

3.2.- Autre classifications

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

3.2.1.- Classification d'après le spectre d'action

L'expression des spectres d'activité antibactérienne des antibiotiques a évolué dans sa forme. En 1995, l'Agence du Médicament avait élaboré une rédaction des spectres en quatre classes, actualisée en 1998. La version 2002 met la rédaction des spectres en conformité avec les recommandations européennes « Note for Guidance on the Pharmacodynamic section of the SmPC for antibacterial medicinal products » (CPMP December 1997).

Les spectres sont établis en tenant compte d'une administration de l'antibiotique par voie générale.

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

Tableau 1. Classification des quelques antibiotiques selon leur spectre d'action.

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

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

3.2.2.- Classification d'après leur type d'action

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

Pour les antibactériens on distingue deux types d'action :

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

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

3.2.3.- Classification d'après leur origine.

Un grand nombre des antibiotiques existants sont constitués de molécules naturelles, fabriquées par des micro-organismes : des champignons ou d'autres bactéries. Ces dernières les produisent pour éliminer les bactéries concurrentes avec lesquelles elles sont en compétition dans leur biotope. Cependant, seul un petit nombre des antibiotiques naturels est utilisable en thérapeutique humaine, pour des raisons de disponibilité dans l'organisme ou d'effets indésirables. Un grand nombre de molécules aujourd'hui sur le marché sont des molécules de synthèse, dérivées ou non d'antibiotiques naturels, en particulier pour contourner les problèmes de résistance.

3.2.4.- Classification d'après leur mode d'action

D'après Rychembusch (2003) on distingue selon le mode d'action :

- des antibiotiques actifs sur la paroi bactérienne
- des antibiotiques actifs sur la synthèse protéique
- des antibiotiques actifs sur le métabolisme des acides nucléiques et de leurs précurseurs
- des antibiotiques inhibiteurs des voies métaboliques
- des antibiotiques antis anaérobies

3.2.5.- Classification d'après leur charge électrique

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

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

4.- Mode d'action des antibiotiques

Les agents antimicrobiens détruisent les bactéries en s'attaquant directement à leurs structures essentielles (paroi cellulaire, ribosomes, membrane plasmique et ADN) et/ou en perturbant leurs métabolismes et par conséquent leurs fonctions (Tortora *et al.*, 2003).

Les modes d'action majeurs des antibiotiques incluent l'interférence avec la synthèse de la paroi cellulaire (β -lactames), l'inhibition de la synthèse protéique (macrolides et aminoglycosides), l'interférence avec la synthèse de l'acide nucléique (fluoroquinolones) et l'inhibition d'une voie métabolique (Tenover, 2006). L'action sur la membrane est aussi un mécanisme antibactérien très répandu. Les polymixines induisent l'augmentation de la perméabilité membranaire causant la perte du contenu de la cellule bactérienne (Storm, 1997), tandis que le lipopeptide cyclique daptomycine agit, apparemment, par l'insertion de sa queue lipidique à l'intérieur de la membrane, causant sa dépolarisation et éventuellement la mort bactérienne (Carpenter et Chambers, 2004). Le tableau 2 résume les principaux modes d'action des antibiotiques.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 2. Principaux mécanismes d'actions des antibiotiques (Prescott *et al.*, 2003).

Antibiotique	Mécanisme d'action
	Inhibition de la synthèse de la paroi
Pénicilline	Active les enzymes lytiques de la paroi.
Ampicilline	Inhibe les enzymes de transpeptidation impliquées dans le pontage des chaînes polysaccharidiques du peptidoglycane de la paroi bactérienne.
Vancomycine	Se fixe directement sur la terminaison D-Ala- D-Ala et inhibe la transpeptidation.
Bacitracine	Inhibe la synthèse du peptidoglycane en interférant avec l'action des transporteurs lipidiques qui transfèrent les précurseurs de ce polymère à travers la membrane cellulaire.
	Inhibition de la synthèse protéique
Streptomycine	Se fixe à la sous unité 30S du ribosome bactérien pour inhiber la synthèse protéique et provoquer des erreurs dans la lecture de l'ARNm.
Gentamicine	
Chloramphénicol	Se fixe à la sous unité 50S du ribosome et empêche la formation des liaisons peptidiques par l'inhibition de la peptidyl-transférase.
Erythromycine	Se fixe à la sous unité 50S du ribosome et inhibe l'élongation de la chaîne peptidique.
	Inhibition de la synthèse des acides nucléiques
Ciprofloxacine et autres quinolones	Inhibe l'ADN gyrase bactérienne et donc interfère avec la réplication de l'ADN, la transcription et autres activités impliquant l'ADN.
	Destruction de la membrane cellulaire
Polymyxine B	Se fixe à la membrane cellulaire et perturbe sa structure et ses propriétés de perméabilité.
	Antagonisme métabolique
Sulfamide	Inhibe la synthèse de l'acide folique par compétition avec l'acide p-aminobenzoïque.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

5.- Microorganismes producteurs d'antibiotiques

Les antibiotiques sont produits par un large éventail de microorganismes fongiques et bactériens, et inhibent ou tuent à faibles concentrations spécifiquement d'autres microorganismes (Marinelli, 2009). Un grand nombre d'antibiotiques a été identifié en milieu naturel, mais moins de 1% sont médicalement utiles. Beaucoup d'antibiotiques naturels ont été structurellement modifiés en laboratoire pour augmenter leur efficacité formant la classe des antibiotiques semi-synthétiques (Madigan et Martinko, 2007).

Les antibiotiques peuvent être produits par divers microorganismes. Près de 70% de ces molécules actives sont synthétisées par des actinomycètes, environ 10% par des bactéries non mycéliennes et 10% par des champignons (Breton *et al.*, 1989; Sanglier, 1990).

Un même antibiotique peut être synthétisé par divers microorganismes taxonomiquement éloignés comme c'est le cas de l'acide fusidique (utilisé dans le traitement d'infection à staphylocoques résistants à la pénicilline) isolé à partir des genres *Fusidium*, *Cephalosporium*,

Microsporium, *Mucor* et *Chrysosporium* (Von Daehne *et al.*, 1984). Inversement, plusieurs antibiotiques peuvent être produits par un même microorganisme, comme c'est le cas de *Streptomyces hygroscopicus* qui synthétise 58 antibiotiques différents (Berdy *et al.*, 1987).

5.1.- Bactéries non mycéliennes

Près de 7% des antibiotiques d'origine bactérienne sont élaborés par les *Bacillaceae* (ex. : *Bacillus subtilis*), 1,3% par les *Pseudomonadaceae* (ex. : *Pseudomonas*) et 1,7% par d'autres bactéries de genres très divers, tels que *Micrococcus*, *Proteus*, *Chromobacterium*, etc. Ces antibiotiques sont souvent de nature peptidique (Vandamme, 1985) ou parfois aminoglycosidique, hétérocyclique, lipidique, phénazinique, etc. (ex.: bacitracine, polymyxine, phénazines, etc.) (Berdy *et al.*, 1987).

5.2.- Champignons

Environ 2000 espèces des champignons décrites sont productrices d'antibiotiques. Le nombre de ces molécules d'origine fongique est supérieur à 1200 (Berdy, 2005).

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Parmi ces champignons producteurs, nous citerons les genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cephalosporium* et *Fusarium* (des ascomycètes ou des formes imparfaites) et aussi certains basidiomycètes et zygomycètes (Betina, 1983 ; Laskin et Lechevalier, 1984). Les antibiotiques les plus connus sont la pénicilline, la céphalosporine, l'acide fusidique et la griséofluline (Barrett *et al.*, 2001).

5.3.- Actinobactéries

Près de 80% des antibiotiques d'origine actinomycétale sont synthétisés par *Streptomyces*, le genre le plus répandu dans l'environnement (Watve *et al.*, 2001;Lazzarini *et al.*, 2000). Environ 15% de ces molécules actives sont sécrétés par les souches de *Nocardia*, *Micromonospora*, *Actinoplanes* et *Actinomadura*, tandis que les 5% restants le sont par les autres genres, peu répandus ou parfois même rares, tels que *Nocardioopsis*, *Saccharothrix*, etc. Les actinobactéries, surtout celles qui ont une structure mycélienne, sont réputées pour la production d'antibiotiques, en particuliers le genre *Streptomyces* qui sécrète près de la moitié des antibiotiques naturels d'origine microbienne (Solecka *et al.*, 2012) mais aussi d'autres genres que l'on retrouve peu fréquemment ou parfois même rarement (Tiwari et Gupta, 2011). *Streptomyces sannanensis*, une actinobactérie halophile et alcaliphile isolée à partir d'un sol alcalin, produit un antibiotique puissant contre les bactéries à Gram positif (Singh *et al.*, 2006). *Actinopolyspora mortivallis*, actinobactérie modérément halophile isolée d'un sol salé, sécrète un antibiotique nucléosidique (Yoshida *et al.* 1991).

6.- Phénomène de résistance aux antibiotiques.

La résistance aux antibiotiques est un phénomène aussi ancien que l'apparition des antibiotiques. Les antibiotiques sont au départ des substances naturelles générées par des champignons mais aussi par certaines bactéries pour se défendre contre les autres bactéries.

6.1.- Les types de résistance.

6.1.1.- La résistance naturelle.

Les bactéries n'étant pas suicidaires, les premières qui ont appris à synthétiser des antibiotiques ont développé dans le même temps, les moyens de s'en protéger. Il s'agit de la résistance naturelle aux antibiotiques (Lozniewski et Rabaud, 2010).

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

La résistance naturelle est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce (Smaoui, 2010), elle fait partie du patrimoine génétique normale du germe (Yala *et al.*, 2001).

Klebsiella spp produit naturellement des bêta-lactamases, et les bactéries anaérobies sont naturellement résistantes aux aminosides (Lozniewski et Rabaud, 2010).

6.1.2.- La résistance acquise

A côté de la résistance naturelle, existe aussi des résistances acquises, c'est l'acquisition de nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique ou à un groupe d'antibiotiques, ces nouveaux gènes peuvent être obtenu soit par mutation au niveau du chromosome, soit par transfert d'ADN des plasmides conjugatifs ou de transposons (Yala *et al.*, 2001 ; Summers, 2006 ; Wright, 2007).

6.2.- Mécanismes biochimiques de résistance bactérienne aux agents antibactériens

Ils peuvent être regroupés en trois grands types de mécanismes : diminution de la perméabilité et efflux actif, modification de la cible des antibiotiques, production d'enzymes inactivant les antibiotiques (Levy et Marshall, 2004 ; Wright, 2007).

6.2.1.- Modification de la cible des antibiotiques

Par mutation affectant la structure des porines ou diminuant leurs synthèse par les quelles l'antibiotique ne peut pas pénétrer dans la bactérie (Lozniewski et Rabaud, 2010).

Les PLP sont des protéines possédant une activité enzymatique (transpeptidases, carboxypeptidases ou glycosyltransférases) impliquée dans la synthèse de la paroi bactérienne et possédante une affinité pour les β -lactamines.

La résistance à la méticilline, qui entraîne une résistance à toutes les β -lactamines, est déterminée par la présence d'un gène chromosomique (*mecA*) qui code pour la PLP2a. Cette PLP additionnelle a moins d'affinité pour les β -lactamines et en particulier pour la méticilline (De Jonge 1993; Ryffel, 1992) . Ce mécanisme est présent chez les *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) et chez les SCN.

La régulation du gène *mecA* est principalement sous la dépendance de deux gènes : les gènes *mecI* (répresseur du gène *mecA*) et *mecR* (antirépresseur).

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

La résistance conférée par *mecA* peut être homogène (résistance exprimée par toutes les souches) ou hétérogène (résistance exprimée seulement par une proportion des colonies filles issues d'une coloniemère exprimant la résistance).

Chez les souches présentant une résistance hétérogène à la méticilline, le niveau de résistance n'est pas corrélé avec la quantité de PLP2a, mais semble être sous la dépendance de quatre gènes *fem A, B, C, D* (facteurs essentiels à la méticillino-résistance) chromosomiques impliqués dans la formation du pont interpeptidique pentaglycine du peptidoglycane. À l'heure actuelle, aucun des gènes régulateurs impliqués dans la résistance aux β -lactamines ne permet d'expliquer le caractère hétérogène de cette résistance (De lancastrre ,1993).

6.2.2.- Pompes d'efflux

Un certain nombre de bactéries possède une capacité intrinsèque de rejeter hors de la cellule la substance qui vient d'y entrer. Cette propriété est très connue chez les bactéries à Gram négatif (c'est le cas de *Pseudomonas aeruginosa*) qui possèdent dans leur membrane des protéines, appelées pompes effluentes, qui expulsent les antibiotiques (Lee, 2006 ; Jayaraman, 2009).

6.2.3.- Production d'enzymes inactivant les antibiotiques

Les antibiotiques sont susceptibles d'être dégradés par voie enzymatique. L'exemple le plus connu est l'hydrolyse du noyau bêta-lactame par des bêta-lactamases dont certaines de ces enzymes sont à spectre élargi (Braford, 2001).

Le nombre de bêta-lactamases plasmidiques est très élevé et elles sont classées selon leurs vitesses d'hydrolyse, leurs constantes d'affinité pour les bêta-lactamines, leurs faculté à être inhibée par les inhibiteurs tels que l'acide clavulanique (Lozniewski et Rabaud, 2010).

***Les pénicillinases sensu stricto** ; chez les espèces *Staphylococcus aureus*, elles inactivent la pénicilline G, la pénicilline A, elles sont par contre sans action sur la pénicilline M ainsi que sur les céphalosporines.

***Les pénicillinases à spectre élargi** ; Ces bêta-lactamases entraînent une résistance (ou une diminution d'activité) vis-à-vis des pénicillines G, des pénicillines M, des carboxypénicillines, des uréidopénicillines, des céphalosporines de la 1ère et de la 2ème génération.

***Les Bêta-Lactamases à Spectre Etendu (BLSE)** ; ces bêta-lactamases dérivent des enzymes précédentes par mutation des gènes codant pour les bêta-lactamases à spectre élargi.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Le profil de résistance conféré est identique à celui conféré par les bêta-lactamases à spectre élargi mais il s'étend aux céphalosporines de la 3ème génération et à l'aztréonam. Les bêta-lactamases à spectre étendu sont sensibles aux inhibiteurs (Bonnet, 2004).

***Les bêta-lactamases résistantes aux inhibiteurs** ; les bêta-lactamases résistantes aux inhibiteurs dérivent de certains bêta-lactamases à spectre élargi par mutation ponctuelle. Le profil conféré est identique à celui des bêta-lactamases à spectre élargi mais ces enzymes ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique, le sulbactam ou le tazobactam.

D'autres enzymes hydrolysent de nombreux antibiotiques, tels céphotaximases (Bonnet, 2004 ; Conton et Coque, 2006). Les enzymes inactivant les aminosides sont divisées en trois classes : aminosides-phosphotransférases, aminosides-nucléotidyltransférases, aminoacétyltransférases (Doi et Arakawa, 2007).

Les stréptogramines sont inhibés par streptogramine A (O-) acétyltransférase (Seoane et Garcia-Lobo, 2000 ; Sukanito et Roderick, 2002) et streptogramines B (CO-) lyase (Mukhtar *et al.*, 2001).

7.- Microorganismes résistants aux antibiotiques

La sensibilité des microorganismes aux différents antibiotiques est très diverse, les bactéries à coloration de Gram positive et les bactéries à coloration de Gram négative peuvent avoir un comportement différent vis-à-vis un antibiotique spécifique, alors que certains antibiotiques à large spectre présentent la même efficacité sur ces deux groupes (Madigan *et al.*, 1997).

7.1.- Microorganismes résistants à Gram positif

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

7.1.1.- *Staphylococcus aureus*

Les *Staphylococcus aureus* est une bactérie extrêmement pathogène pour l'homme. Elle est la cause de multiples infections, qui vont de la lésion cutanée (furuncles, panaris, impétigo, etc.), à l'endocardite, la pneumonie aiguë, l'ostéomyélite ou la septicémie. Elle est

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

très redoutée en milieu hospitalier et arrive au premier rang des germes à Gram positif responsables d'infections nosocomiales. Les souches les plus dangereuses sont celles qui sont multi-résistantes aux antibiotiques. C'est le cas du Sarm, résistant à la pénicilline (comme 60% des souches multi-résistantes), mais aussi, et plus récemment, le SARV : souche de *Staphylococcus aureus* résistant à la vancomycine.

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

7.1.2.- *Streptococcus pneumoniae*

Un pourcentage élevé de souches de pneumocoques a par ailleurs acquis une résistance aux tétracyclines, à l'érythromycine, au cotrimoxazole. Les pneumocoques sont restés sensibles aux glycopeptides et aux synergistines. Ils sont sensibles à certaines des nouvelles fluoroquinolones (lévofloxacine, moxifloxacine), aux kétolides et au linézolide. Le traitement des méningites à pneumocoques de sensibilité diminuée aux β -lactamines pose un problème difficile. Le traitement de choix est habituellement la pénicilline G (ou une aminopénicilline).

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

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

7.1.3.- Entérocoques

Les entérocoques se caractérisent par une résistance naturelle aux pénicillines et une résistance naturelle de bas niveau aux aminosides (Leclercq, 1997) L'espèce *E. faecalis* se caractérise en plus par une résistance naturelle aux lincosamides et aux sulfamides. Tous les entérocoques possèdent une PLP particulière (PLP5), de faible affinité pour les β -lactamines et responsable de CMI des pénicillines dix à 100 fois supérieures à celles retrouvées pour les autres streptocoques.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

De même, les céphalosporines sont naturellement inactives sur les entérocoques (Patterson, 1988).

7.2.- Microorganismes résistants à Gram négatif

7.2.1.- *Pseudomonas aeruginosa*

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

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

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

7.2.2.- *Acinetobacter baumannii*

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

7.2.3.- *Enterobacteriaceae*

Les *Enterobacteriaceae* sont responsables d'importantes infections digestives, urinaires, respiratoires et sanguines. Beaucoup d'espèces d'*Enterobacteriaceae* possèdent une

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

résistance à un niveau élevé aux antibiotiques par leurs changements génétiques (Paterson, 2006).

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

7.2.3.1.- *Salmonella*

Le genre *Salmonella* est l'un des 32 genres de la famille des Enterobacteriaceae (Bergeron, 2009). *Salmonella* est un bacille Gram négatif non sporulant, dont la mobilité est assurée par des flagelles péri triches (à l'exception de *S. Gallinarum* qui n'en possède pas) et qui est de type aéro-anaérobie. Ces bâtonnets de 2 à 3 µm de long sont des bactéries mésophiles, peu exigeantes d'un point de vue nutritionnel.

Les salmonelles sont des bactéries à Gram négatif aérobies et non sporulées. Ils demeurent l'un des problèmes les plus épineux en aviculture. A ce titre, les études menées au Laboratoire Nationale de l'Elevage et de Recherche Vétérinaire ont montré que 25% des élevages avicoles de Dakar sont contaminés et le même pourcentage a été observé dans les pays développés (Tall, 2004). Ce sont des entérobactéries à tropisme digestif, pathogènes pour l'homme et pour de nombreux vertébrés. Au total, 2501 sérovars différents de *Salmonella* ont été identifiés jusqu'en 2004 (OMS, 2005).

Les germes sont omniprésents dans le milieu extérieur et peuvent persister plus de deux ans dans les fientes à l'abri du soleil et dans une fraîcheur humide (Villat, 2001).

A l'exception des salmonelles spécifiquement adaptées à l'homme (*S. Typhi*, Paratyphi A et C Sendai) toutes les infections à *Salmonella* peuvent être considérées comme des zoonoses (Van Leeuwen et al, 1982). Ce sont des agents de Toxi-infection Alimentaire Collective (TIAC) les plus à craindre.

Les matrices les plus souvent responsables de ces TIAC sont les produits avicoles, oeufs et viandes (Leclerc et al, 1995 ; OMS, 2005).

7.2.3.2.- *Escherichia coli*

Bacille à coloration de Gram négative, aéro-anaérobie facultatif, oxydase négative, mesurant de 2 à 4 µm de long et d'un diamètre d'environ 0,6 µm, *Escherichia coli* (*E. coli*) est une bactérie normalement présente parmi la microflore digestive de l'Homme et des animaux à sang chaud.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Mais certaines souches d'*E. Coli* sont pathogènes car elles ont acquis des facteurs de virulence. Sur la base des signes cliniques observés chez les malades, les souches d'*E. Coli* pathogènes sont regroupées en pathovars (ou pathotypes) parmi lesquels les *E. coli* entérohémorragiques ou EHEC (*enterohemorrhagic E. coli*).

E. coli est à la fois une bactérie commensale majeure du tube digestif et, en fonction de ses facteurs de virulence et de l'état de santé de l'hôte, une bactérie pathogène importante, pour l'Homme et l'animal. Sa résistance aux antibiotiques est donc particulièrement surveillée. En effet, cette antibiorésistance peut être à l'origine d'échecs thérapeutiques vis-à-vis des infections à *E. coli* (Rice, 2009) et peut également constituer un réservoir de gènes de résistance potentiellement transmissibles à d'autres bactéries telle que les salmonelles par exemple (Cloeckaert *et al.*, 2010).

7.2.3.3.-*Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae a largement contribué à la dissémination hospitalière des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) qui leur confèrent une résistance céphalosporines 3^{ème} génération (C3G) (Paterson, 2005 ; Sirot, 1995). Plus récemment, cette espèce occupe une position importante dans l'émergence et la dissémination de certaines enzymes conférant la résistance aux carbapénèmes (KPC, OXA-48).

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

II. ANTIBIOGRAMME

1.- définition :

L'antibiogramme est un examen de laboratoire visant à déterminer la sensibilité d'une bactérie à différents antibiotiques. En effet, de nombreuses bactéries sont devenues,

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

avec le temps, résistantes aux antibiotiques. Il n'est donc pas toujours évident de trouver l'antibiotique qui sera efficace pour traiter une souche bactérienne donnée.

En mettant en contact des bactéries (prélevées chez un malade) avec plusieurs antibiotiques, l'antibiogramme permet de voir quels sont les produits qui inhibent la croissance bactérienne et qui seront efficaces pour traiter l'infection (Anonyme 1).

2.- Détermination des catégories S/I/R:

A la suite des recommandations du Comité d'Experts de Standardisation biologique de l'OMS (1979), la Société Française de Microbiologie a créé un Comité de l'Antibiogramme (CA-SFM) chargé de déterminer les valeurs critiques qui délimitent les catégories cliniques et de proposer un guide pour la détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.

Les valeurs critiques définies pour les concentrations et les diamètres des zones d'inhibition, ainsi que les recommandations spécifiques à certaines espèces ou à certains groupes d'antibiotiques sont publiées dans un communiqué annuel par le CA-SFM.

Trois catégories cliniques ont été retenues pour l'interprétation des tests de sensibilité *in vitro* : Sensible (S), Résistant (R) et Intermédiaire (I).

- Les souches catégorisées S sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est forte dans le cas d'un traitement par voie systémique avec la posologie recommandée dans le résumé des caractéristiques du produit (RCP).
- Les souches catégorisées R sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quels que soient le type de traitement et la dose d'antibiotique utilisée.
- Les souches catégorisées I sont celles pour lesquelles le succès thérapeutique est imprévisible. Ces souches forment un ensemble hétérogène pour lequel les résultats obtenus *in vitro* ne sont pas prédictifs d'un succès thérapeutique.

3.- Définition Bactériostase et bactéricide

Les interactions bactérie/antibiotique dans le temps, en présence de concentrations croissantes d'antibiotique, peuvent se traduire soit par un ralentissement de la croissance bactérienne (bactériostase), soit par un effet létal de l'antibiotique (bactéricide).

La bactériostase est quantifiée par la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la bactéricide par la concentration minimale bactéricide (CMB), les deux concentrations étant exprimées en mg/l.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

La CMI est la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle il n'y a pas de croissance visible à l'œil nu, après 16 à 24 heures d'incubation, de la souche bactérienne étudiée.

La CMB est la plus faible concentration d'antibiotique laissant après 16 à 24 heures d'incubation un pourcentage de survivants $\leq 0,01$ % (soit une bactérie survivante sur 10000) de l'inoculum de départ. Un antibiotique est bactéricide si la CMI et la CMB sont proches. Si le rapport $CMB/CMI \geq 32$, l'antibiotique est bactériostatique, ou s'il s'agit d'un antibiotique habituellement considéré comme bactéricide, la souche est dite tolérante.

4.- Association d'antibiotiques

Les objectifs théoriques de la pratique d'une association sont les suivants :

- *Elargir le spectre*

C'est l'objectif recherché le plus facile à atteindre, particulièrement dans le cadre de l'antibiothérapie probabiliste et du traitement des infections poly microbiennes à flore mixte aéro- et anaérobie.

- *Obtenir une synergie*

La synergie résulte d'une interaction positive entre deux antibiotiques dont l'action antibactérienne conjointe est supérieure à la somme des actions de chacun des deux antibiotiques pris isolément.

- *Diminuer l'émergence de souches résistantes*

Au sein de la population bactérienne visée par le traitement, la proportion de mutants résistants varie selon l'espèce et selon l'antibiotique.

- *Diminuer la toxicité du traitement*

Cet objectif est illusoire. Les antibiotiques utilisés en association doivent être utilisés chacun aux doses préconisées par l'AMM. Les associations additionnent les risques d'effets indésirables de chaque médicament et peuvent être responsables d'une potentialisation de toxicité. (Boyadjiev *et al.*, 2011).

5.- Antibiogramme en milieu gélosé : méthode des disques

5.1.- Principe général

Pour réaliser l'antibiogramme par la 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

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

d'antibiotique sont déposés à la surface de la gélose. L'antibiotique diffuse à partir du disque en créant un gradient de concentration. La détermination du diamètre de la zone d'inhibition permet une estimation de la concentration minimale inhibitrice. Les caractères de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne en seront déduits (SFM, 2010).

5.2.- Technique de l'antibiogramme

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

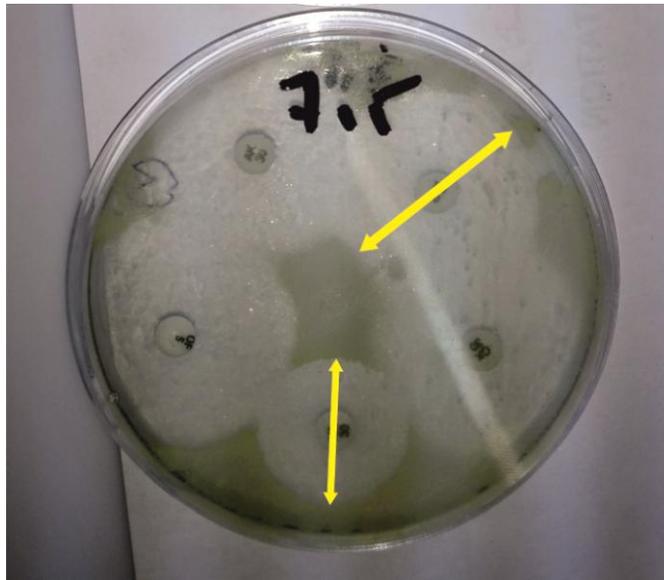


Figure 1. Exemple de gélose avec des disques d'antibiotiques et une souche bactérienne ayant une sensibilité variable aux antibiotiques testés (Photo Originale)

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 3. Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour une Entérobactérie : *Escherichia coli* ATCC25922 (Rahal *et al.*, 2011).

Antibiotiques testés	Charge des Disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)		
		R	I	S	R	I	S
Ampicilline	10µg	≤ 13	14 - 16	≥ 17	≥ 32	16	≤ 8
Amoxicilline +Ac.clavulanique	20/10µg	≤ 13	14 - 17	≥ 18	≥ 32/16	16/8	≤ 8/4
Céfazoline	30µg	≤ 19	20 - 22	≥ 23	≥ 8	4	≤ 2
Céfalotine	30µg	≤ 14	15 - 17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Cefoxitine	30µg	≤ 14	15 - 17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Céfotaxime	30µg	≤ 22	23 - 25	≥ 26	≥ 4	2	≤ 1
Ceftriaxone	30µg	≤ 19	20 - 22	≥ 23	≥ 4	2	≤ 1
Imipénème/Meropénème	10µg	≤ 19	20 - 22	≥ 23	≥ 4	2	≤ 1
Ertapénème	10µg	≤ 19	20 - 22	≥ 23	≥ 1	0,5	≤ 0,25
Amikacine	30µg	≤ 14	15 - 16	≥ 17	≥ 64	32	≤ 16
Gentamicine	10µg	≤ 12	13 - 14	≥ 15	≥ 16	8	≤ 4
Acide nalidixique	30µg	≤ 13	14 - 18	≥ 19	≥ 32	---	≤ 16
Ciprofloxacine	5µg	≤ 15	16 - 20	≥ 21	≥ 4	2	≤ 1
Chloramphénicol	30µg	≤ 12	13 - 17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Colistine	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Furanes	300µg	≤ 14	15 - 16	≥ 17	≥ 128	64	≤ 32
Fosfomycine	200µg	≤ 12	13 - 15	≥ 16	≥ 256	128	≤ 64
Triméthoprime+ Sulfaméthoxazole	1.25/23.75µg	≤ 10	11 - 15	≥ 16	≥ 4/76	-----	≤ 2/38

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 4. Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter sp* (Rahal *et al.*, 2011).

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)		
		R	I	S	R	I	S
Ticarcilline	75 µg	14	---	15	128	----	64
Ticarcilline + ac.clavulanique	75/10µg	14	---	15	128/2	-----	64/2
Pipéracilline	100 µg	17	---	18	128	-----	64
Ceftazidime	30 µg	14	15 - 17	18	32	16	8
Aztréonam	30 µg	15	16 - 21	22	32	16	8
Imipénème	10 µg	13	14 - 15	16	16	8	4
Amikacine	30 µg	14	15 - 16	17	64	32	16
Gentamicine	10 µg	12	13 - 14	15	16	8	4
Nétilmicine	30 µg	12	13 - 14	15	32	16	8
Tobramycine	10 µg	12	13 - 14	15	16	8	4
Ciprofloxacine	5µg	15	16 - 20	21	4	2	1
Lévofloxacine	5µg	13	14 - 16	17	8	4	2
Fosfomycine **	50µg + 50µg G6P	< 14	-----	≥ 14	> 32	----	≤ 32
Rifampicine **	30 µg	< 14	14 - 18	≥ 19	> 16	16-8	≤ 4
Colistine	10µg	10	-----	11	8	4	2

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 5. Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI *Staphylococcus* sp (Rahal *et al.*, 2011).

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)		
		R	I	S	R	I	S
Pénicilline	10 UI	28	---	29	0,25	-----	0,12
Oxacilline (<i>S.aureus</i>)	1 µg	10	11 – 12	13	4	-----	2
Oxacilline (<i>S.lugdunensis</i>)	1 µg	----	-----	-----	4	-----	2
Cefoxitine (<i>S.aureus</i> <i>et S.lugdunensis</i>)	30 µg	21	---	22	8	-----	4
Oxacilline (S.C.N. sauf <i>S.lugdunensis</i>)	1 µg	----	---	-----	0,5	-----	0,25
Céfoxitine (S.C.N.sauf <i>S.lugdunensis</i>)	30 µg	24	---	25	---	----	---
Gentamicine	10 µg	12	13 – 14	15	16	8	4
Kanamycine	30 µg	13	14 – 17	18	64	32	16
Amikacine	30 µg	14	15 – 16	17	64	32	16
Erythromycine	15 µg	13	14 – 22	23	8	1-4	0.5
Clindamycine	2µg	14	15 – 20	21	4	1-2	0,5

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 6. Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI *Staphylococcus* sp (Rahal *et al.*, 2011).

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)		
		R	I	S	R	I	S
Vancomycine	CMI	---	---	-----	32	8-16	4
Teicoplanine	30 µg	10	11 – 13	14	32	16	8
Ofloxacine	5µg	14	15 – 17	18	4	2	1
Triméthoprime+ sulfaméthoxazole	1.25/23.75µg	10	11 – 15	16	4/76	-----	2/38
Rifampicine	5µg	16	17 – 19	20	4	2	1
Tétracycline	30µg	14	15 – 18	19	16	8	4
Chloramphénicol	30µg	12	13 – 17	18	32	16	8
Pristinamycine	15 µg	< 19	19 – 21	≥ 22	> 2		≤ 1
Acide fusidique**	10 µg	< 24	-----	≥ 24	> 1		≤ 1
Fosfomycine**	50 µg	< 14	-----	≥ 14	> 32		≤ 32

5.3.- Lecture interprétative de l'antibiogramme

La lecture interprétative de l'antibiogramme est fondée sur la connaissance des phénotypes de résistance. Elle a pour principal but de transformer un résultat catégorisé "sensible" en un résultat "intermédiaire" ou "résistant" en raison d'un risque d'échec thérapeutique. La lecture interprétative nécessite une identification correcte de la souche et une méthode d'antibiogramme parfaitement standardisée. La mise en évidence de phénotypes de résistance hautement improbables compte tenu de l'identification de la souche doit

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

conduire à vérifier l'identification bactérienne, à contrôler la pureté de l'inoculum et à contrôler également la technique de l'antibiogramme (SFM, 2003).

5.4.- Standardisation de l'antibiogramme

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

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

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

- ❖ La température et la durée d'incubation doivent être fixes. Pour la majorité des bactéries l'incubation est effectuée à 35-37 °C durant 18-24 heures dans une atmosphère normale. (SFM, 2003) ;

MATERIEL & METHODE

I. MATERIEL DU LABORATOIRE

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

1.-Appareillage

Autoclave, étuve (Mettler), spectrophotomètre (Dialab DTN-410), pH-mètre et Bain-marie (Mettler).

2.-Petit matériel

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

3.- Produits chimiques

Eau distillée, eau physiologique, solution tampon soude (NaOH) et (HCl).

4.- Matériel biologique

Pour le déroulement de notre travail, nous avons utilisé 3 souches bactériennes différentes qui font parties de deux groupes de microorganismes : Gram positive (une seule souche) et Gram négative (deux souches). Ces trois souches ont été choisies car elles ont une croissance rapide (moins de 24 heures) à 25,30,37 et 44 °C et sont fréquemment isolées des échantillons cliniques (Tableau 7).

MATERIEL & METHODE

Tableau 7. Description des souches utilisé (Beddou, 2015 ; Grosjean, *et al.*, 2011).

Germe	Souche	Référence	Habitat préférentiel	Infections hospitalières
Bacille Gram ⁻	<i>Escherichia coli</i>	25922 (ATCC)	<ul style="list-style-type: none"> • Eaux usées • Matière fécales • Aliments contaminés 	<ul style="list-style-type: none"> • Infections respiratoires • Infections urinaires • Plaies septicémies
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853 (ATCC)	<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>	25923 (ATCC)	<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 alimentairese

Les souches utilisées ont été fournies par l'hôpital d'Ouargla.

5.- Milieu de culture

Nous avons utilisé le milieu gélose Mueller Hinton (Figure 2), qui est un milieu relativement riche, mais qui reste un milieu de base qui permet la culture des bactéries non exigeantes, est employée lors de la méthode de diffusion en gélose pour les bactéries autres que celles à croissance lente.

La gélose Mueller-Hinton permet la réalisation de l'antibiogramme standard (principale utilisation).

MATERIEL & METHODE



Figure 2. Flacons contiens la gélose Mueller Hinton utilisé comme milieu de culture pour l'antibiogramme (Photo Originale).

6.- Repiquage des souches bactériennes

Les trois souches bactériennes utilisées ont été repiquées par la méthode des stries sur milieu gélosé Mueller Hinton, puis incubées à 37 °C, durant 24 h, afin d'obtenir des colonies isolées jeunes qui vont servir à la préparation de l'inoculum (Figure 3).



Figure 3. Colonies d'*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* repiquées par la méthode des stries, incubées à 37 °C, durant 24 h (Photo Originale).

MATERIEL & METHODE

II.- METHODES UTILISEES

Notre démarche expérimentale est résumée ci-dessous:

Antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu gélifié.

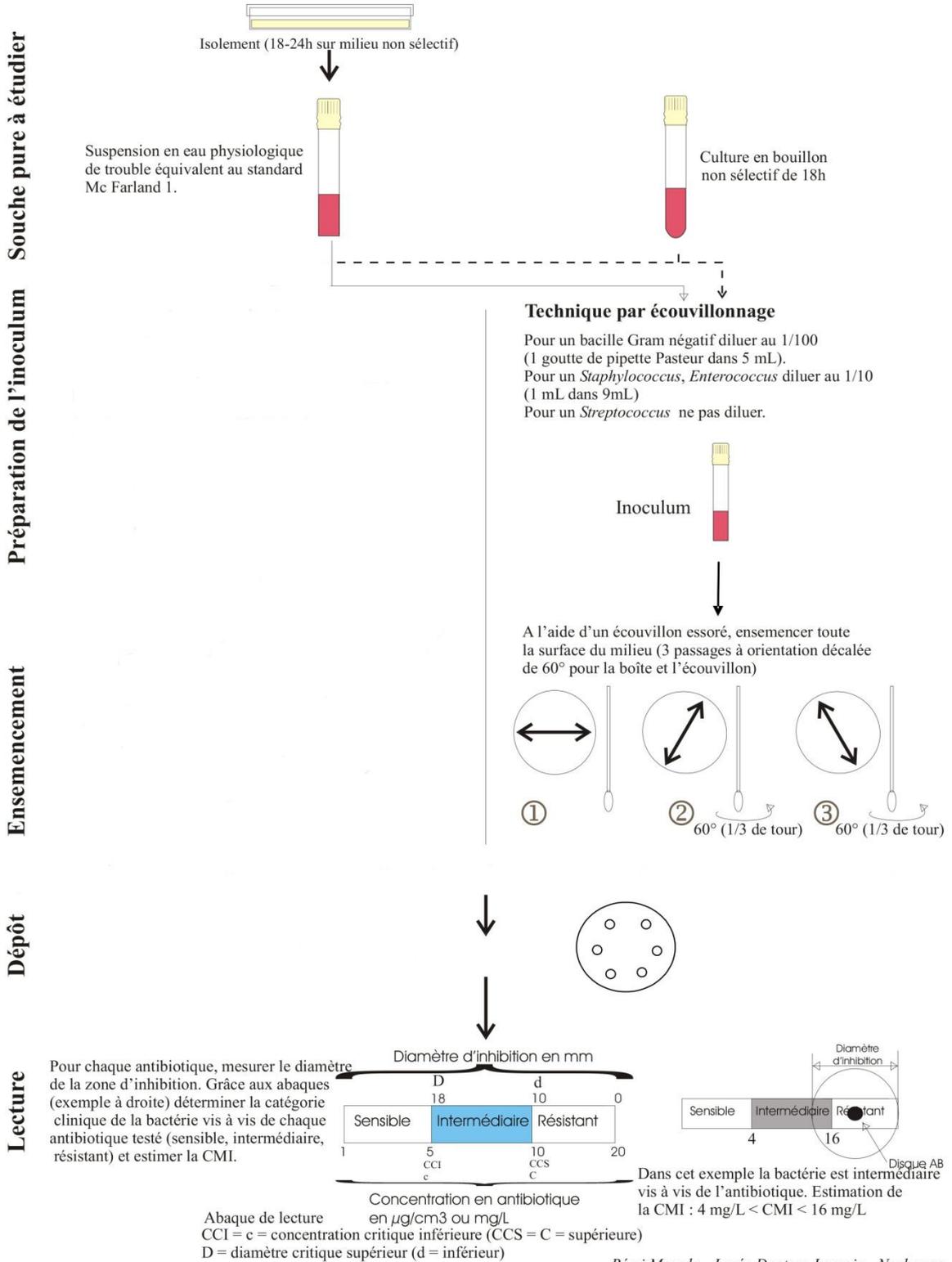


Figure 4. Etape de la démarche expérimentale.

MATERIEL & METHODE

1.- Antibiogramme par diffusion en milieu Mueller Hinton gélosé

1.1.-Préparation des Milieux de culture (différent PH)

Le pH de milieu Mueller Hinton doit être de 7,2 à 7,4 mais dans notre étude nous avons de 5 milieux à pH différent (6 - 6,5 - 7 - 7,5 et 8) pour cette objectif en prépare le milieu MH et à chaque en l'ajoute des gouttes de la solution tampon (NaOH) pour les pH alcalins (7,5 - 8) et des gouttes de (HCl) pour les pH acides (6 – 6,5).

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

A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu Mueller Hinton solide, on fait racler à l'aide d'une pipette quelques colonies, visiblement bien isolées et parfaitement identiques. On décharge la pipette dans 20 ml d'eau physiologique stérile à 0,9% NaCl(Figure 5). On fait bien agiter pour homogénéiser la suspension bactérienne (solution mère) avant de mesurer sa densité optique DO (Figure 6), son opacité doit être au maximum entre 0,08 et 0,1 (absorbance à 625 nm), dont la densité est ajustée au standard McFarland 0,5.

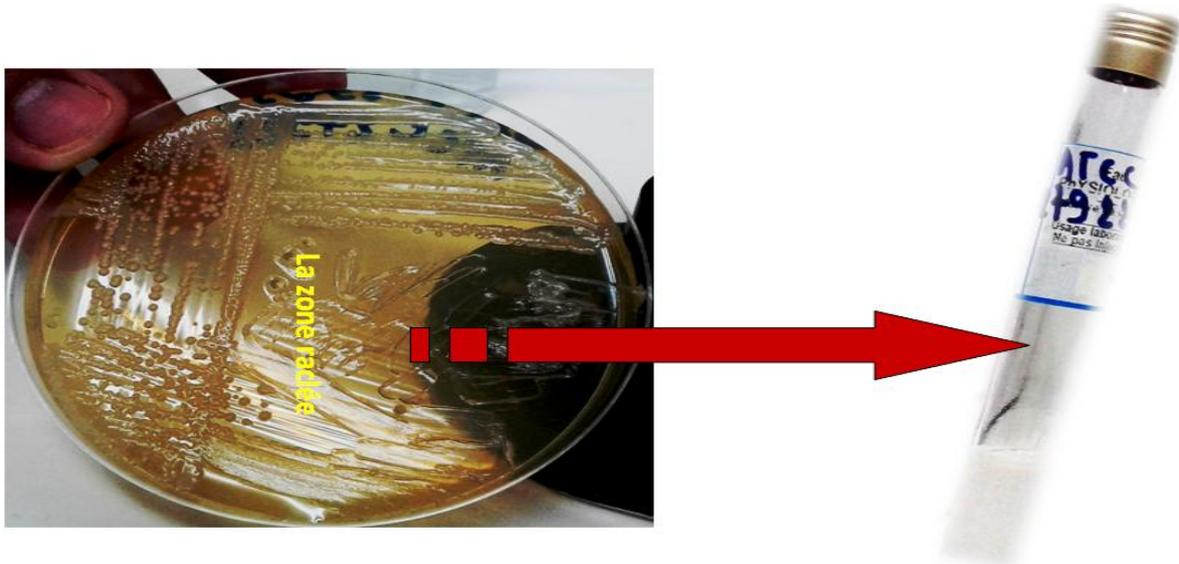


Figure 5. Préparation de la solution mère a partir d'une culture pure d'*Escherichia coli* (Photo Originale).

MATERIEL & METHODE

1.3.- Détermination de la concentration d'inoculum

1.3.1- la standardisation de l'inoculum

La concentration bactérienne des dilutions de chaque souche sont évaluées par turbidité et sont exprimées par la mesure de la densité optique (DO) par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde 620nm tout on déterminant le zéro d'absorbance avec une cuve remplie d'eau physiologique stérile. Il doit avoir un D.O. de 0,08 à 0,1 lue a 620 nm pour l'étalon de 0,5 Mc Farland ($1.5 \cdot 10^8$ UFC/mL).

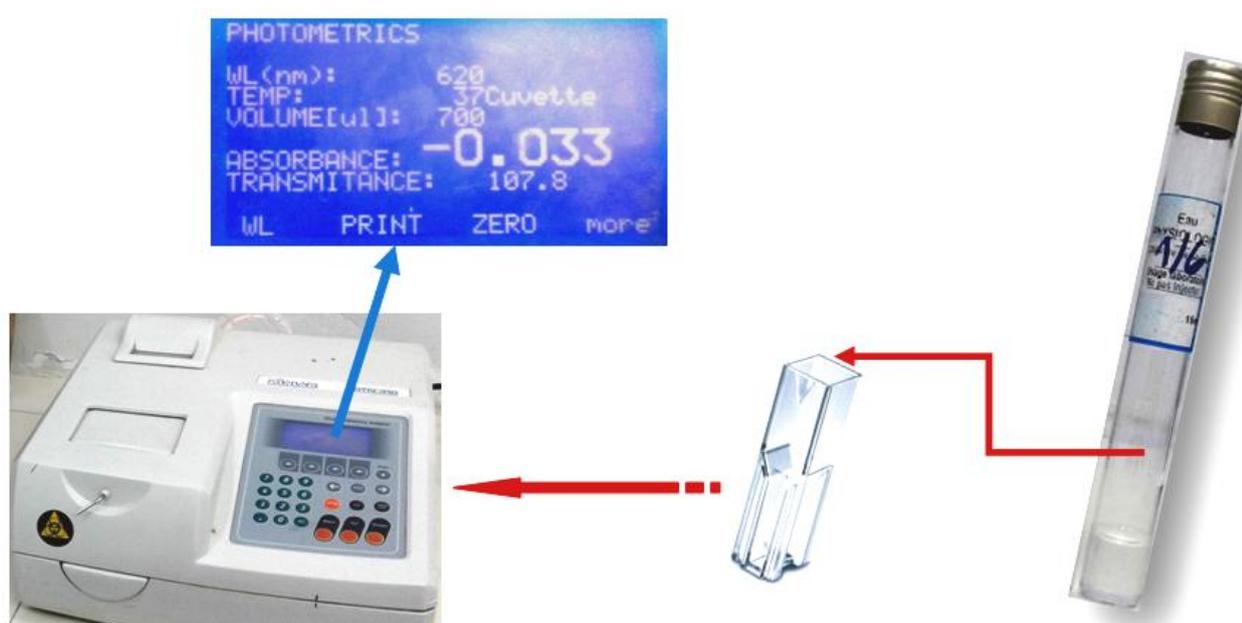


Figure 6. Mesure de la densité optique (DO) par un spectrophotomètre (Photo Originale).

1.4.- Ensemencement

La gélose Mueller-Hinton stérile préalablement préparer avec 5 valeur de pH (6 ,6,5 , 7 , 7,5 et 8) faire fondre aux bain marie après laisse refroidir quelque instants pour couler dans des boites de Pétri stériles (de 90 mm de diamètre) et laissée se gélifier. L'épaisseur de la gélose est de 4 mm répartie uniformément dans les boites. Ces dernières doivent être séchées durant 30 min à une température ambiante avant leur emploi. La dilution pour chaque souche était ensemencée par écouvillonnage dans les 5 min qui suivent la préparation de ces dilutions servant d'inoculum ; on fait bien homogénéiser la solution de chaque dilution 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

MATERIEL & METHODE

débarrasser le liquide excédentaire. On l'étale à une prise sur la surface entière du milieu de culture, en tournant la boîte Pétri à environ 60°C après chaque application (ensemencement) pour obtenir une distribution égale et homogène de l'inoculum. Finalement, on écouvillonne partout autour des bords de la surface du milieu de culture (la gélose), l'écouvillon est rechargé chaque fois qu'une nouvelle boîte de Pétri est ensemencée, l'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des souches bactériennes ensemencées (CLSI, 2012; CASFM, 2017).

1.5.- Choix des antibiotiques et incubation

Un antibiogramme permet de tester sur milieu de culture solide la sensibilité ou la résistance d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques. Malgré la grande diversité des antibiotiques disponibles, ils seront choisis selon leur spectre, donc un antibiotique d'un groupe peut répondre pour un autre appartenant au même groupe. En pratique quotidienne : Choix de 10 (laboratoire privé) à 30 antibiotiques (hôpital) selon la prise en compte de l'examen morphologique : coques, coccobacilles, bacilles disposition (en amas, en chaînette) coloration (Gram + ou -). Cela suppose la connaissance du spectre des antibiotiques. Le choix des antibiotiques a été fait par des spécialistes de la pharmacologie en fonction de leur mode d'action, (Tableau 8).

MATERIEL & METHODE

Tableau 8. Familles des antibiotiques utilisés (C.A.S.F.M, 2010).

Souche testée	Abréviation	Antibiotique	Famille	site d'action	Charge du disque (µg)
<i>Staphylococcus aureus</i>	SXT	Triméthoprimé/ sulfaméthoxazole (cotrimoxazole)	Sulfamides-Triméthoprimé	Appareil nucléaire	30
	GM	Gentamicine	Aminosides	Ribosome	10
	TE	Tétracycline	Tétracyclines		25
	C	Chloramphénicol	Phénicolés	30	
	FOX	Céfoxitine	Céphalosporine 2ème génération	30	
<i>Escherichia coli</i>	AM	Ampicilline	Aminopénicilline	Peptidoglycane	10
	CF	Céfalotine	Céphalosporine 1ère génération		30
	AMC	Amoxicilline + acide clavulanique	Aminopénicilline		30
	GM	Gentamicine	Aminosides	Ribosome	10

MATERIEL & METHODE

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP	Ciprofloxacine	Fluoroquinolone	Appareil nucléaire	5
	CIP	Ciprofloxacine	Fluoroquinolone		5
	CAZ	Ceftazidime	Céphalosporine 3 ^{ème} génération	Peptidoglycane	30
	TCC	Ticarcilline + acide clavulanique	Carboxypénicillines		75
	ATM	Amikacine(AK)	Monobactame		30
	AN	Aztréonam(AT)	Aminosides	Ribosome	

Cinq disques d'antibiotiques de différentes familles sont appliqués avec une légère pression à l'aide d'une pince bactériologique stérile afin d'assurer le contact complet avec la surface de la gélose. Une fois appliqué, le disque ne peut pas être déplacé car la diffusion des antibiotiques est très rapide (CASFM, 2017), les antibiotiques diffusent de manière uniforme si bien que leurs concentrations sont inversement proportionnelles à la distance du disque (Mohammedi, 2006). Les cinq disques utilisés sont distribués de sorte que les zones d'inhibition autour des disques ne se chevauchent pas et qu'ainsi la zone d'inhibition puisse être déterminée. Le diamètre des disques est de 6,35 mm (Figure 7).

Les boîtes à pH 6 ,6,5 ,7 ,7,5 et 8 sont incubées à l'étuve à 37°C en position inversée durant 24 h et d'autre boîtes a pH neutre 7 sont partagée dans 4 étuves à différents températures (25 ,30 ,37 et 44 °C) durant 24 h (Parsaeimehr *et al.*, 2010)(Figure 8).

Déposer les disques fermement à la surface de la gélose inoculée et séchée. Le contact avec la surface doit être étroit. Les disques une fois déposés ne peuvent être déplacés car la diffusion des antibiotiques est très rapide.

Le nombre de disques déposés par boîte est limité du fait du chevauchement des zones d'inhibition et pour limiter les interférences entre les antibiotiques.

MATERIEL & METHODE

Un maximum de six disques convient pour les boîtes de 90 mm de diamètre,

Les boîtes de pétri sont incubées idéalement dans les 15 min. qui suivent le dépôt des disques, sans dépasser 30 min.

Si elles sont abandonnées à température ambiante après dépôt des disques, la pré-diffusion d'antibiotiques engendrera des zones d'inhibition faussement agrandies. (CASFM, 2018)

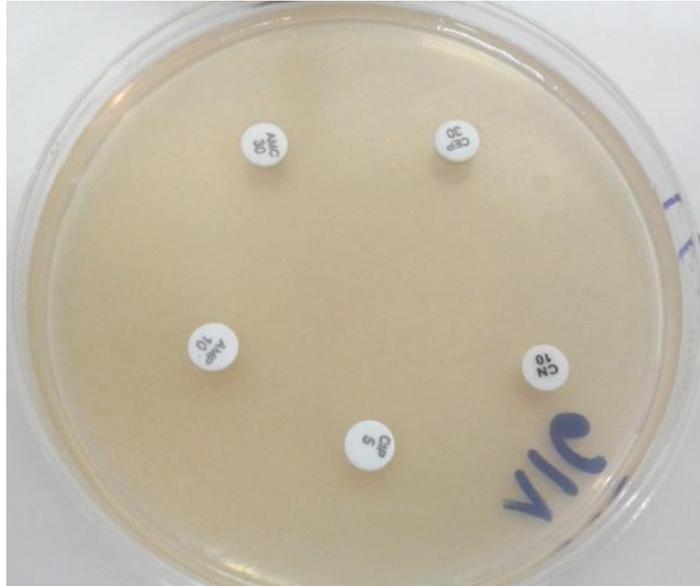


Figure 7. Ensemencement d'*Escherichia coli* et application des disques d'antibiotiques (Photo Originale).

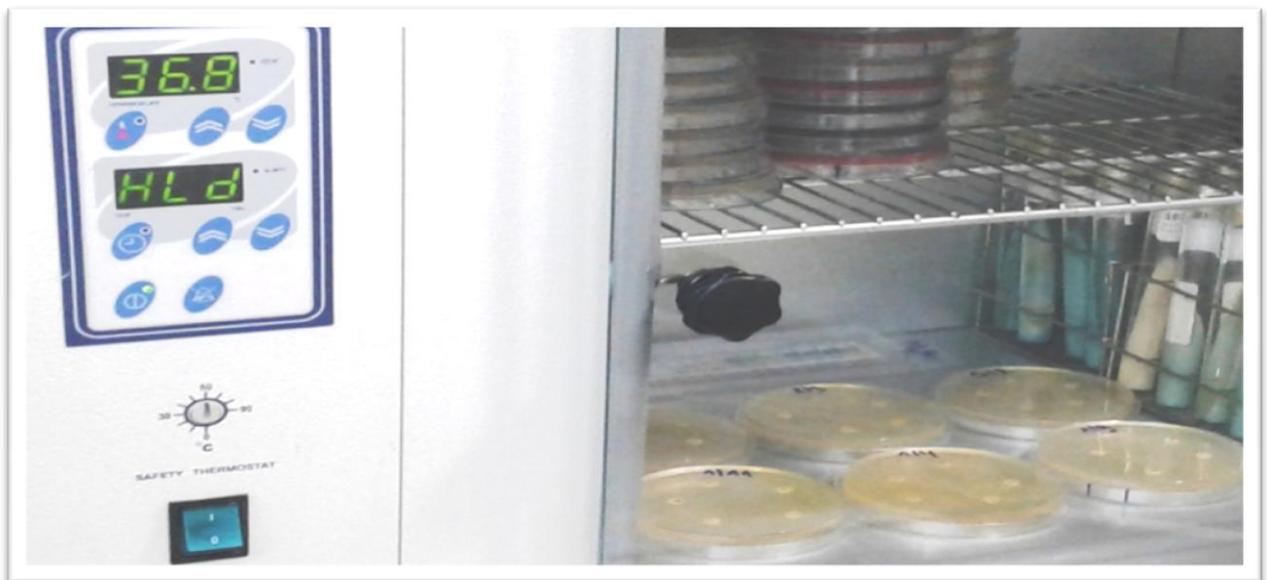


Figure 8. Incubation des boîtes de Pétri dans l'étuve à 37°C durant 24 h (Photo Originale).

MATERIEL & METHODE

1.6.- Lecture et interprétation

La lecture de l'antibiogramme, après incubation, est faite en termes de diamètre de la zone d'inhibition. L'absence de croissance bactérienne se traduit par un halo translucide (transparent) autour du disque dont le diamètre est mesuré avec précision à l'aide d'une règle graduée et exprimé en millimètre (Figure 9). 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. La bordure de la zone d'inhibition doit être lue à l'œil nu et au niveau de la complète inhibition de la culture ; la boîte étant placée à 30 cm de l'œil.

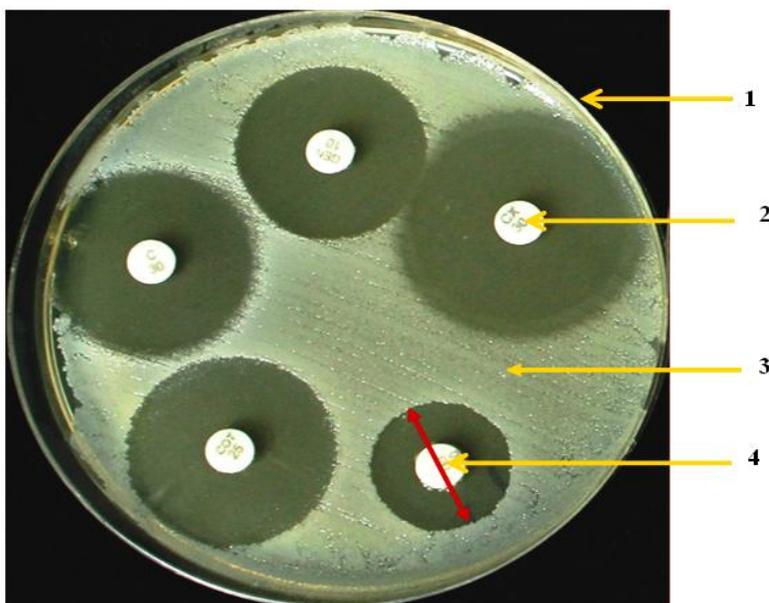


Figure 9. Principe de la lecture d'un antibiogramme (Photo Originale).

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

MATERIEL & METHODE

2.- Analyse statistique

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

RESULTATS ET DISCUSSIONS

1.- Résultats de l'antibiogramme

La sensibilité d'*Escherichia coli* HO25 vis-à-vis des huit antibiotique utilisé est exprimée par la mesure de diamètre des zones d'inhibition autour de ces disques, et pour éviter au maximum les erreurs de parallaxe en maintenant la règle graduée perpendiculairement à l'axe optique.

Les résultats de la sensibilité vis-à-vis les antibiotiques sont exprimés par le calcul de la moyen du diamètre des zones d'inhibition et l'écart type entre les trois répliquas analytiques. Les résultats sont présentés dans les Figure 11, 12 et le Tableau 9.

Tableau 9. Résultats des antibiogrammes et écartype de chaque température pour *Escherichia coli* HO25.

T (°C)	AMP	AMC	CEP	CX	CTX	GEN	FOS	COT
25	0	0	0	0	18,5±0,5	19,0±0,0	37,0±0,0	0
30	0	0	0	0	14,5±0,5	12,5±0,5	37,16±0,3	0
37	0	0	0	0	12,5±0,5	11,5±0,5	38,5±0,5	0
44	0	0	0	10,0±0,5	18,5±0,5	16,5±1,5	43,0±1,0	0

AMP: Ampicillin (10 µg); AMC: Amoxicillin + calvulanic acid (30 µg); CEP : Cephalothin (30 µg); CX : Cefoxitin (30 µg); CTX : Cefotaxime (30 µg); GEN: Gentamicin (10 µg); FOS: Fosfomycin (200 µg); COT: Co-Trimoxazole: Trimethoprim/sulfamethoxazole (25 µg).

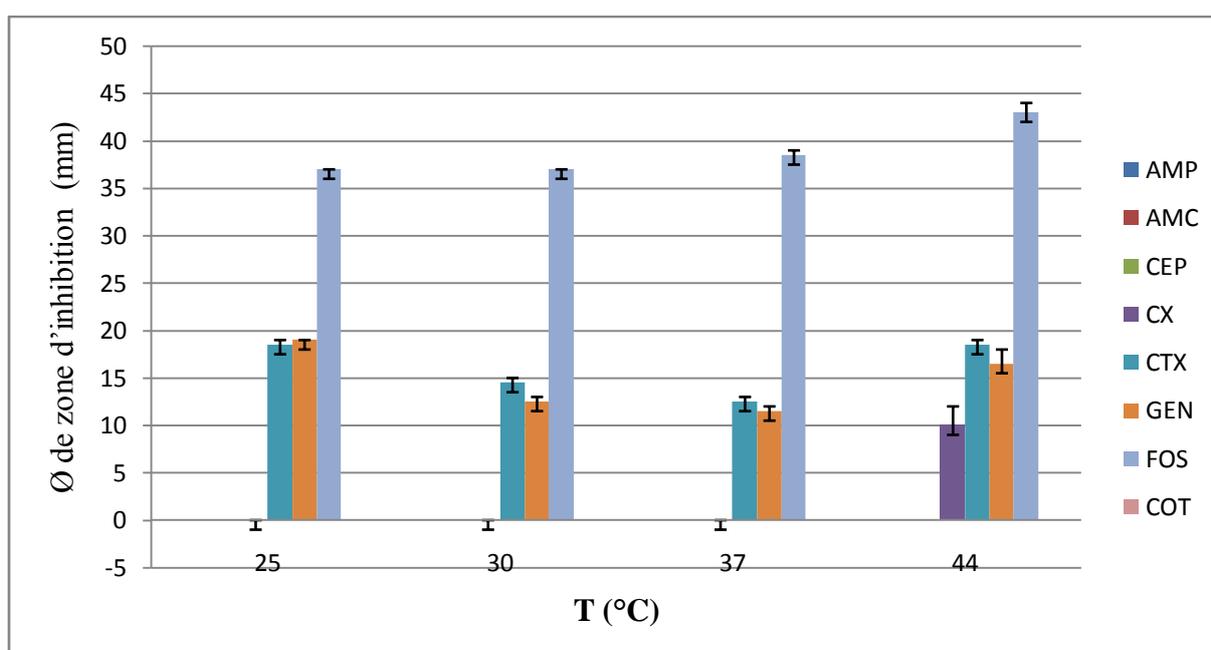


Figure 10. La variation de diamètre des zones d'inhibition en fonction de la température chez *Escherichia coli* HO25.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

AMP: Ampicillin (10 µg); AMC: Amoxicillin + clavulanic acid (30 µg); CEP : Cephalothin (30 µg); CX : Cefoxitin (30 µg); CTX : Cefotaxime (30 µg); GEN: Gentamicin (10 µg); FOS: Fosfomycin (200 µg); COT: Co-Trimoxazole: Trimethoprim/sulfamethoxazole (25 µg).

Les résultats illustrés dans le Tableau 9 et la figure 10, montre l'effet de différente température (25, 30,37 et 44°C) sur les zones d'inhibitions d'*Escherichia coli* HO25. Les résultats obtenus montrent que la souche d'*Escherichia coli* HO25 est très sensible vis-à-vis de l'antibiotique FOS (la zone d'inhibition comprise entre 37 et 43 mm); et moyennement sensible vis-à-vis de l'antibiotique CTX est (zone d'inhibition comprise entre 12,5 et 18,5mm) et de l'antibiotique GEN (zone d'inhibition comprise entre 11,5 et 19,5mm); et la souche est très résistante vis-à-vis de l'antibiotique CX (zone d'inhibition comprise entre 0 et 10mm), et totalement résistante aux antibiotiques : AMP,AMC,CEP et COT.

Les résultats obtenue indiquent que le diamètre des zones d'inhibition a diminué de 4 à de 7,5 mm au maximum avec l'ensemble des antibiotiques utilisés qui attend le maximum à 44°C et le minimum à 37°C. Ce résultat montre que l'effet de la température est relativement important sur le diamètre des zones d'inhibition.

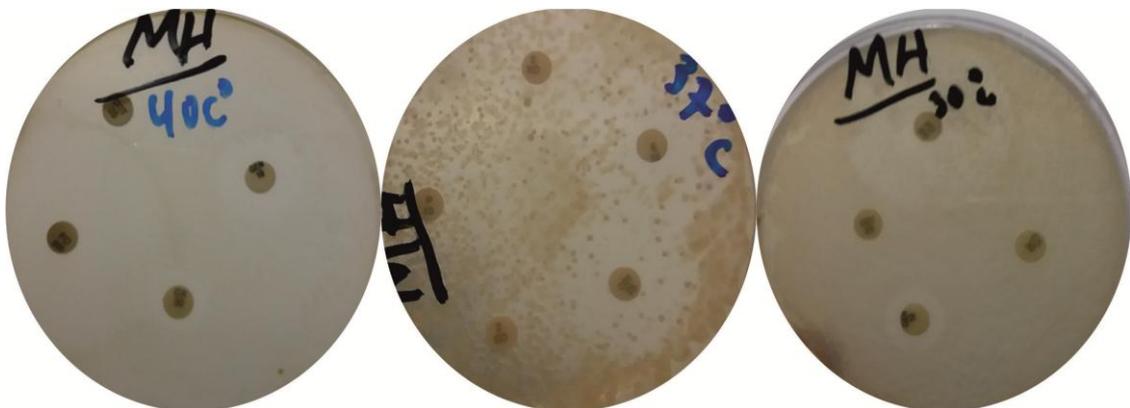


Figure 11. Résultats de l'antibiogramme pour *Escherichia coli* HO25(photo original)

2.- Interprétations des antibiogrammes

Les mesures de diamètre des zones d'inhibitions sont comparées soigneusement aux valeurs critiques figurant dans les Tableaux de lecture (Tableau 3), (Tableau 4), (Tableau 5), (Tableau 6), afin de les interpréter les résultats selon les catégories : S, I ou R; les résultats sont présentés dans le Tableau 10.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Tableau 10. Interprétations des antibiogrammes de chaque température pour la souche d'*Escherichia coli* HO25.

T (°C)	AMP	AMC	CEP	CX	CTX	GEN	FOS	COT
25	R	R	R	R	R	S	S	R
30	R	R	R	R	R	R/I	S	R
37	R	R	R	R	R	R	S	R
44	R	R	R	R	R	S	S	R

AMP: Ampicillin (10 µg); AMC: Amoxicillin + clavulanic acid (30 µg); CEP : Cephalothin (30 µg); CX : Cefoxitin (30 µg); CTX : Cefotaxime (30 µg); GEN: Gentamicin (10 µg); FOS: Fosfomycin (200 µg); COT: Co-Trimoxazole: Trimethoprim/sulfamethoxazole (25 µg).

S :Sensible, R :Résistant, I : intermédiaire.

Selon le Tableau 10, nous constatons une forte résistance d'*Escherichia coli* à l'Ampicilline, Céphalotine, Céfoxitine, Céfotaxime et Triméthoprime + Sulfaméthoxazole, mais l'antibactérien Gentamicine a montré un comportement particulier : les 3 catégories de résistance (sensible, résistant et intermédiaire) à 37°C, résistant/intermédiaire à 30°C et sensible à 25°C et 44°C. La bactérie *E. coli* HO25 montre une résistance naturelle à l'AMC (Amoxicilline + acide clavulanique) car *Escherichia coli* fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae* qui produisent des enzymes inactivant ce type d'antibiotiques (Cattoir, 2004). La bactérie a montré une sensibilité à l'antibiotique Fosfomycine dans tous les degrés de température.

Egalement, il ressort de ces résultats que l'interprétation d'antibiogramme reste la même pour les différents degrés de température malgré l'intervalle important de 19 °C (de 25°C au 44°C) sauf l'antimicrobien gentamicine; et ça malgré que l'OMS et la SFM exigent afin de réaliser les antibiogrammes des souches bactériennes (dont *E. coli*), une température d'incubation de 35±2°C. Nous avons constaté qu'avec l'ensemble des antibiotiques utilisé (sept antibactériens, à l'exception de la gentamicine), le résultat d'antibiogramme est le même, et donc l'chèque thérapeutique et les complications médical d'un résultat d'une analyse médicale erronée n'aurons pas lieu.

A base de l'analyse statistique nous n'avons pas remarqué une différence significative entre 30 et 37°C. Donc on peut remplace 37°C par 30°C pour réaliser un antibiogramme dans les laboratoires médicaux, par contre les valeurs de 25 et 44°C montre une différence significative par rapport à l'intervalle de 30 et 37°C.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.- Analyse statistique

3.1.- Modélisation

Pour moduler la relation entre la température et le diamètre de la zone d'inhibition, on établit un diagramme de corrélation, c'est à dire un diagramme croisant les modalités de température et du diamètre de la zone d'inhibition. L'ensemble des valeurs forme un nuage de points dont la forme permet de caractériser la relation. Les résultats ont été présentés sous forme de courbe de tendance pour chaque antibiotique testé (Figure 12).

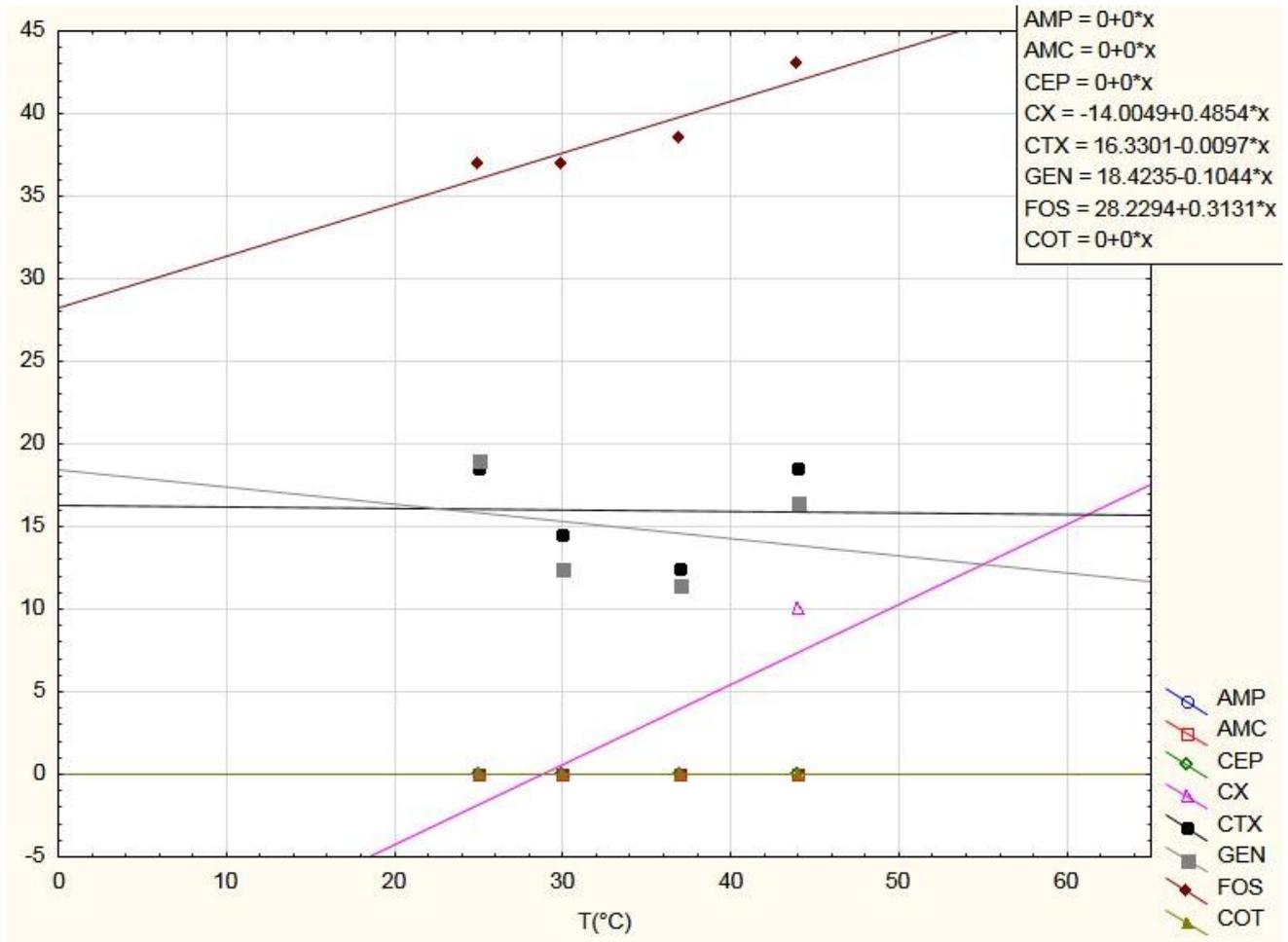


Figure 12. Courbes de tendance entre le diamètre de zone d'inhibition (mm) et la température (comprise entre 0 et 65°C) pour la souche testée d'*Escherichia coli* HO25.

AMP: Ampicillin (10 µg); AMC: Amoxicillin + clavulanic acid (30 µg); CEP : Cephalothin (30 µg); CX : Cefoxitin (30 µg); CTX : Cefotaxime (30 µg); GEN: Gentamicin (10 µg); FOS: Fosfomycin (200 µg); COT: Co-Trimoxazole: Trimethoprim/sulfamethoxazole (25 µg).

D'après les courbes présentées dans la Figure 13 nous avons constaté que le nuage de point peut s'ajuster correctement à une droite, c'est à dire que nous sommes en présence d'un

RESULTATS ET DISCUSSIONS

modèle linéaires (type $Y=aX + b$) reliant le diamètre de la zone d'inhibition et la température. Pour seulement trois antibiotiques utilisés (Cefotaxime, Gentamicine et Fosfomycine), nous avons remarqué que le nuage de point prend la forme d'une ligne dont les points s'écartent peu, donc il y a une forte relation linéaire entre la température et le diamètre de la zone d'inhibition pour le Fosfomycine et une relation linéaire faible entre la température et le diamètre de la zone d'inhibition pour les autres antibiotiques: Cefotaxime et Gentamicine.

Il ressort de ces résultats aussi que cette linéarité est négative pour le Cefotaxime et la Gentamicine, c'est à dire que le diamètre de la zone d'inhibition varie en sens inverse avec la température et cette linéarité positive pour le Fosfomycine donc le diamètre de la zone d'inhibition varie avec la température.

Malgré que la température change, le diamètre des zones d'inhibitions varie aussi légèrement car le coefficient directeur en valeur absolue de la droite de régression (correspond à la pente de la droite de régression) de chaque antibiotique utilisé est faible, qui varie de 0,10 à 0,48.

Tableau 11. Interprétations des antibiogrammes selon le Ø des zones d'inhibitions calculés en fonction de température pour la souche testée *Escherichia coli* HO25.

T(°C)	0	5	10	15	20	25	30	35	37	40	44	50	55	60	65
AMP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Interprétation	R														
AMC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Interprétation	R														
CEP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Interprétation	R														
CX	-14	-11,57	9,15	-6,72	-4,29	-1,86	0,55	2,98	3,95	5,41	7,35	10,26	12,69	15,12	17,54
Interprétation	R													I	R/I
CTX	16,33	16,28	16,23	16,18	16,13	16,08	16,03	15,99	15,97	15,94	15,90	15,84	15,79	15,74	15,69
Interprétation	I														
GEN	18,42	17,90	17,37	16,85	16,33	15,81	15,29	14,76	14,56	14,24	13,82	13,20	12,68	12,15	11,63
Interprétation	S						S/I			I			R/I		R

RESULTATS ET DISCUSSIONS

FOS	28,22	29,79	31,36	32,92	34,49	36,05	37,62	39,81	39,81	40,75	42,00	43,88	45,44	47,01	48,58
Interprétation	S														
COT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Interprétation	R														

AMP: Ampicillin (10 µg); AMC: Amoxicillin + clavulanic acid (30 µg); CEP : Cephalothin (30 µg); CX : Cefoxitin (30 µg); CTX : Cefotaxime (30 µg); GEN: Gentamicin (10 µg); FOS: Fosfomycin (200 µg); COT: Co-Trimoxazole: Trimethoprim/sulfamethoxazole (25 µg).

S :Sensible, R :Résistant, I : intermédiaire.

La figure 12 montre que presque aucun changement dans le diamètre des zones d'inhibition n'a été observé pour le céfotaxime et la gentamicine (pour toutes les températures utilisées). Dans le cas de la fosfomycine, les diamètres des zones d'inhibition sont observées entre 28,5 mm (à 0 ° C) et 48,2 mm (à 65 ° C); et malgré ça, ces résultats n'ont pas d'effet sur le profil de résistance (toujours résistant). Ces résultats ont confirmé qu'une large gamme de températures pourrait également être utilisée pour les antibiogrammes au niveau des laboratoires médicaux.

4.- Résultats de l'antibiogramme pH

La sensibilité d'*Escherichia coli* vis-à-vis des huit antibiotiques utilisés est exprimée par la mesure de diamètre des zones d'inhibition autour de ces disques.

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

Tableau12. Résultats des antibiogrammes et écartype de chaque pH pour la souche testée *Escherichia coli* HO25

pH	AMP	AMC	CEP	CX	CTX	GEN	FOS	COT
6,0	0	0	0	7,0±0,0	18,5±1,5	7,5±0,5	39,0±1,0	0
6,5	0	0	0	7,0±0,0	16,5±0,5	9,0±1,0	34,5±1,5	7,5±0,5
7,0	0	0	0	0	11,5±1,5	13,0±0,0	33±1,0	0
7,5	0	0	0	6,5±0,5	15,0±0,0	12,0±0,0	32,0±0,0	0
8,0	0	0	0	7,5±0,5	17,0±0,0	11,5±0,5	31,0±1,0	0

RESULTATS ET DISCUSSIONS

AMP: Ampicillin (10 µg); AMC: Amoxicillin + clavulanic acid (30 µg); CEP : Cephalothin (30 µg); CX : Cefoxitin (30 µg); CTX : Cefotaxime (30 µg); GEN: Gentamicin (10 µg); FOS: Fosfomycin (200 µg); COT: Co-Trimoxazole: Trimethoprim/sulfamethoxazole (25 µg).

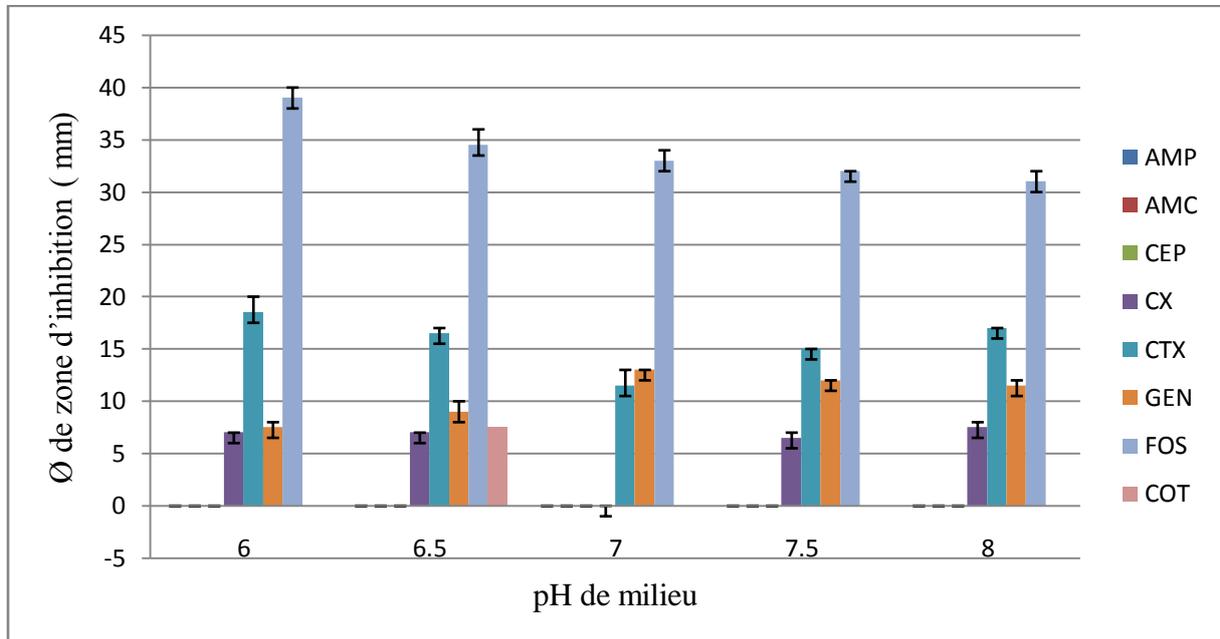


Figure 13. La variation de diamètre des zones d'inhibition en fonction de pH chez la souche *Escherichia coli* HO25.

AMP: Ampicillin (10 µg); AMC: Amoxicillin + clavulanic acid (30 µg); CEP : Cephalothin (30 µg); CX : Cefoxitin (30 µg); CTX : Cefotaxime (30 µg); GEN: Gentamicin (10 µg); FOS: Fosfomycin (200 µg); COT: Co-Trimoxazole: Trimethoprim/sulfamethoxazole (25 µg).

Les résultats illustrés dans le Tableau 12 et la figure 13, montre qu'à différents pH (6, 6,5, 7, 7,5 et 8), la souche d'*Escherichia coli* HO25 est très sensible à la FOS (zone d'inhibition comprise entre 31 et 39 mm); moyennement sensible vis-à-vis de la CTX (zone d'inhibition comprise entre 11,5 et 18,5mm) et GEN (zone d'inhibition comprise entre 7,5 et 13mm); et faiblement sensible à la CX et COT (zone d'inhibition comprise entre 0 et 7,5mm), et totalement résistante aux antibiotiques suivants : AMP, AMC, CEP.

Les résultats obtenus indiquent que le diamètre des zones d'inhibition a diminué de 4 à 8 mm au maximum avec l'ensemble des antibiotiques utilisés. Ce résultat montre que l'effet de pH est relativement important sur le diamètre des zones d'inhibition.

RESULTATS ET DISCUSSIONS



Figure 14. Résultats de l'antibiogramme pour *Escherichia coli* HO25(photo original)

5.- Interprétations des antibiogrammes

Les mesures de diamètre des zones d'inhibitions sont comparées soigneusement aux valeurs critiques figurant dans les Tableaux de lecture (Tableau 3), (Tableau 4), (Tableau 5), (Tableau 6), afin de les interpréter les résultats selon les catégories : S, I ou R; les résultats sont présentés dans le Tableau 13.

Tableau 13. Interprétations des antibiogrammes de chaque pH pour la souche testée
Escherichia coli HO25

pH	AMP	AMC	CEP	CX	CTX	GEN	FOS	COT
6	R	R	R	R	R	R	S	R
6,5	R	R	R	R	R	R	S	R
7	R	R	R	R	R	I	S	R
7,5	R	R	R	R	R	R	S	R
8	R	R	R	R	R	R	S	R

AMP: Ampicillin (10 µg); AMC: Amoxicillin + clavulanic acid (30 µg); CEP : Cephalothin (30 µg); CX : Cefoxitin (30 µg); CTX : Cefotaxime (30 µg); GEN: Gentamicin (10 µg); FOS: Fosfomycin (200 µg); COT: Co-Trimoxazole: Trimethoprim/sulfamethoxazole (25 µg).

S : Sensible, R : Résistant, I : intermédiaire.

Selon le Tableau 13, nous constatons une forte résistance de l'*Escherichia coli* HO25 à l'Ampicilline, Céphalotine, Céfoxitine, Céfotaxime, Triméthoprime + Sulfaméthoxazole et Gentamicine (sauf à pH 7 est intermédiaire). La bactérie montre une résistance naturelle à l'AMC (Amoxicilline + acide clavulanique) car *Escherichia coli* fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae* qui produisent des enzymes inactivant ce type d'antibiotiques (Cattoir,

RESULTATS ET DISCUSSIONS

2004). La bactérie appartient à une sensibilité à l'antibiotique Fosfomycine dans tous les pH de milieu.

Il ressort de ces résultats aussi que l'interprétation d'antibiogramme reste la même pour tous les pH de milieu sauf l'antimicrobien gentamicine, malgré que l'OMS et la SFM exigent l'ensemencement de la souche *Escherichia coli* pour la réalisation des antibiogrammes à pH 7,2-7,4 donc pour cette bactérie et avec l'ensemble des antibiotiques utilisés (sept antibactériens sauf gentamicine), nous avons constaté que le résultat d'antibiogramme est le même, donc l'absence thérapeutique et les complications médicales d'un résultat d'une analyse médicale erronée n'auront pas lieu.

6.- Analyse statistique

6.1.- Modélisation

Pour moduler la relation entre le pH de milieu de culture et le diamètre de la zone d'inhibition, on établit un diagramme de corrélation, c'est à dire un diagramme croisant les modalités de pH et du diamètre de la zone d'inhibition. L'ensemble des valeurs forme un nuage de points dont la forme permet de caractériser la relation. Les résultats ont été présentés sous forme de courbe de tendance pour chaque antibiotique testé (la Figure 15).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

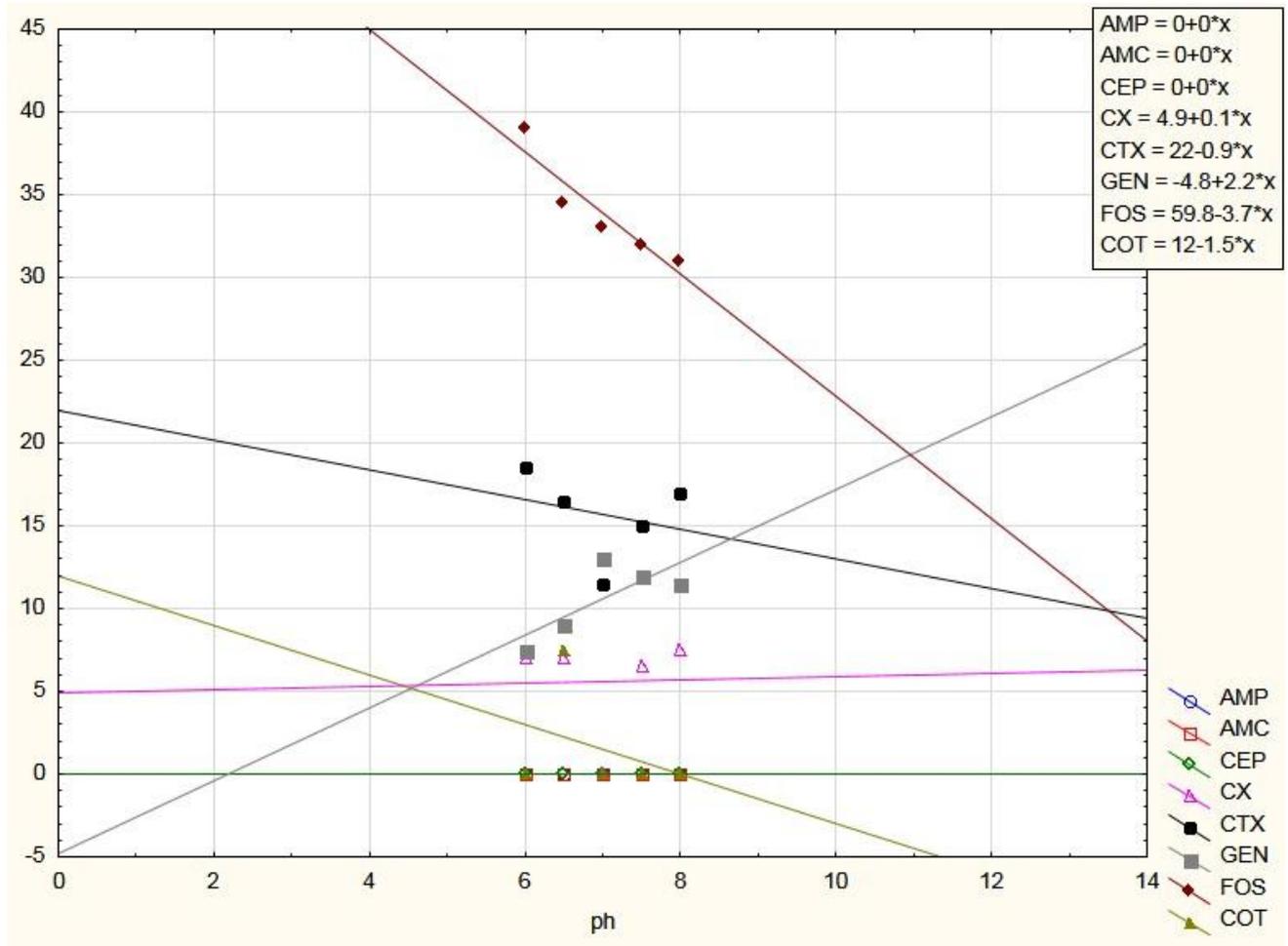


Figure 15. Courbes de tendance entre le diamètre de zone d'inhibition(mm) et le pH (comprise entre 0 et 14) pour la souche testée d'*Escherichia coli* HO25.

AMP: Ampicillin (10 µg); AMC: Amoxicillin + clavulanic acid (30 µg); CEP : Cephalothin (30 µg); CX : Cefoxitin (30 µg); CTX : Cefotaxime (30 µg); GEN: Gentamicin (10 µg); FOS: Fosfomycin (200 µg); COT: Co-Trimoxazole: Trimethoprim/sulfamethoxazole (25 µg).

D'après les courbes présentées dans la Figure 15 nous avons constaté que le nuage de point peut s'ajuster correctement à une droite, c'est à dire que nous sommes en présence d'un modèle linéaires (type $Y=aX+b$) reliant le diamètre de la zone d'inhibition et le pH. Pour cinq antibiotiques utilisés (Cefotaxime, Cefoxitine, Gentamicine, Fosfomycine et Triméthoprime + Sulfaméthoxazole), nous avons remarqué que le nuage de point prend la forme d'une ligne dont les points s'écartent peu, donc il y a une relation linéaire forte entre le pH et le diamètre de la zone d'inhibition pour le Cefotaxime, Gentamicine, Fosfomycine et Triméthoprime + Sulfaméthoxazole, et une relation linéaire faible entre le PH et le diamètre de la zone d'inhibition pour le Cefoxitine.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Il ressort de ces résultats aussi que cette linéarité est négative pour le Cefotaxime, Fosfomycine et Triméthoprime + Sulfaméthoxazole, c'est à dire que le diamètre de la zone d'inhibition varie en sens inverse avec le pH et cette linéarité positive pour le Gentamicine et Cefoxitine donc le diamètre de la zone d'inhibition varie avec le pH.

Tableau 14. Interprétations des antibiogrammes selon le Ø des zones d'inhibitions calculé en fonction de pH pour *Escherichia coli* HO25.

Ph	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
AMP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Interprétation	R															
AMC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Interprétation	R															
CEP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Interprétation	R															
CX	5	5	5,1	5,2	5,3	5,4	5,5	5,6	5,7	5,8	5,9	6	6,1	6,2	6,3	
Interprétation	R															
CTX	22	21,1	20,2	19,3	18,4	17,5	16,6	15,7	14,8	13,9	13	12,1	11,2	10,3	9,4	
Interprétation	S			I					R							
GEN	-4,8	-1,8	-0,4	1,8	4	6,2	8,4	10,6	12,8	15	17,2	19,4	21,6	23,8	26	
Interprétation	R								R /I	S						
FOS	59,8	56,1	52,4	48,7	45	41,3	37,6	33,9	30,2	26,5	22,8	19,1	15,4	11,7	8	
Interprétation	S											R/I		R		
COT	12	10,5	9	7,5	6	4,5	3	1,5	0	-1,5	-3	-4,5	-6	-7,5	-9	
Interprétation	I	R /I	R													

AMP: Ampicillin (10 µg); AMC: Amoxicillin + calvulanic acid (30 µg); CEP : Cephalothin (30 µg); CX : Cefoxitin (30 µg); CTX : Cefotaxime (30 µg); GEN: Gentamicin (10 µg); FOS: Fosfomycin (200 µg); COT: Co-Trimoxazole: Trimethoprim/sulfamethoxazole (25 µg).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

S : Sensible, R : Résistant, I : intermédiaire.

La figure 15 montre que les résultats ont indiqué que presque aucun changement dans le diamètre des zones d'inhibition n'a été observé pour le Cefoxitine, et ça pour toutes les valeurs de pH utilisées. Dans le cas de la Cifotaxime le profil a changé jusqu'à des valeurs de pH de 9-14 pour dévient de catégorie R. Les diamètres des zones d'inhibition, par l'augmentation de pH de 0 à 14, sont observées entre 59,8 et 8mm pour fosfomycine, et donc le profil reste le même qu'à partir de pH9. Pour Gentamicine le profil reste le même (R) au-dessous de pH7; et pour le Triméthoprim + Sulfaméthoxazole reste aussi le même sauf au pH 1. Ces résultats ont confirmé qu'une large gamme de pH a une influence sur les catégories de résistance, et donc on ne peut pas ces valeurs pour réaliser les antibiogrammes.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

1.- Résultats de l'antibiogramme

La sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* HO80 vis-à-vis des neuf antibiotiques utilisés en antibiothérapie est exprimée par la mesure de diamètre des zones d'inhibition autour de ces disques.

Les résultats de la sensibilité des antibiotiques sont exprimés par le calcul de la moyenne du diamètre des zones d'inhibition et l'écart type entre les trois répliques analytiques. Les résultats sont présentés dans les Figure 13, 14 et le Tableau 15.

Tableau 15. Résultats des antibiogrammes et écartype de chaque température pour *Pseudomonas aeruginosa* HO80.

T (°C)	IMP	COL	PIP	FOS	GEN	ATM	TCC	RIF	CAZ
25	38,0±2,0	23,5±0,5	24,5±0,5	45,0±1,0	26,5±0,5	33,5±1,5	20,5±0,5	10,0±0,0	23,0±1,0
30	34,0±2,0	20,5±0,5	25,0±1,0	42,0±0,0	24±0,0	32,0±0,0	22,0±0,0	10,0±0,0	21,5±0,5
37	36,0±0,0	20,5±0,5	26,0±0,0	44,0±0,0	26,0±0,0	34,0±0,0	25,0±0,5	10,0±0,0	21,5±0,5
44	44,5±0,5	23,0±1,0	34,0±2,0	44,0±2,0	32,0±0,0	43,0±1,0	38,0±4,0	13,0±1,0	28,0±2,0

IMP: Imipénème (10 µg); COL: Colistine (30 µg); PIP: Pipéracilline (100 µg); FOS: Fosfomycine (200 µg); GEN: Gentamicine (10 µg); ATM: Aztréonam (30 µg); TCC: Ticracilline + acide clavulanique (75/10 µg); RIF: Rifampicine (5 µg); CAZ: Ceftazidime (30µg).

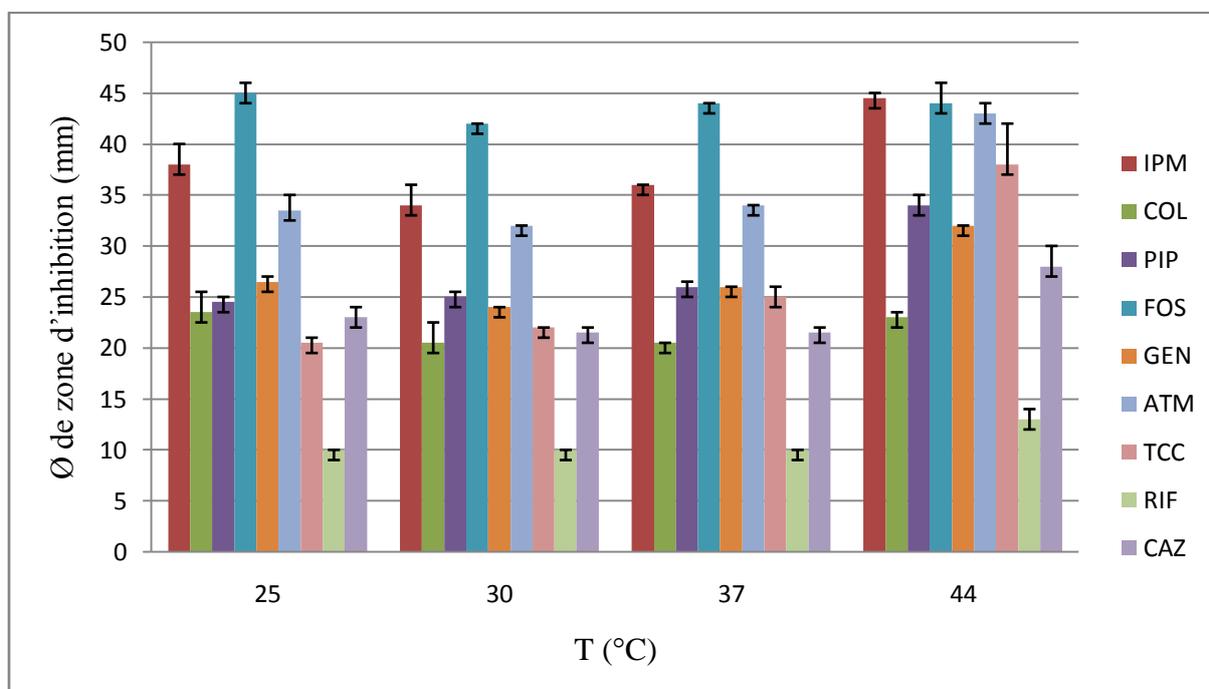


Figure 16. Variation de diamètre des zones d'inhibition en fonction de la température chez *Pseudomonas aeruginosa* HO80.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

IMP: Imipénème (10 µg); COL: Colistine (30 µg); PIP: Pipéracilline (100 µg); FOS: Fosfomycine (200 µg); GEN: Gentamicine (10 µg); ATM: Aztréonam (30 µg); TCC: Ticracilline + acide clavulanique (75/10 µg); RIF: Rifampicine (5 µg); CAZ: Ceftazidime (30 µg).

Les résultats illustrés dans le Tableau 15 et la figure 16, montre l'effet de différente température (25, 30,37 et 44°C) sur les zones d'inhibitions de *Pseudomonas aeruginosa* HO80. Les résultats obtenus montrent que la souche de *Pseudomonas aeruginosa* HO80 est très sensible a l'antibiotique FOS (la zone d'inhibition comprise entre 42 et 45mm); IMP (la zone d'inhibition comprise entre 34 et 44,5 mm) et ATM (la zone d'inhibition comprise entre 32 et 43 mm); et moyennement sensible vis-à-vis de l'antibiotique COL (la zone d'inhibition comprise entre 20,5 et 23,5 mm); PIP (la zone d'inhibition comprise entre 24,5 et 34 mm); GEN (la zone d'inhibition comprise entre 24 et 32 mm); TCC (la zone d'inhibition comprise entre 20,5 et 38 mm) et CAZ (la zone d'inhibition comprise entre 21,5 et 28 mm); et faiblement sensible vis-à-vis de l'antibiotique RIF (la zone d'inhibition comprise entre 10 et 13 mm).

Les résultats obtenue indiquent que le diamètre des zones d'inhibition a diminué de 3 à de 18 mm au maximum avec l'ensemble des antibiotiques utilisés qui attend le maximum à 44°C et à 37°C. Ce résultat montre que l'effet de la température est relativement important sur le diamètre des zones d'inhibition.

Selon ces résultats nous n'avons pas remarqué une différence significative entre 30 et 37°C. Donc on peut remplacer 37°C par 30°C pour réaliser un antibiogramme dans les laboratoires médicaux. En revanche, les valeurs obtenues a 25 et 44°C montre une différence significative entre 30 et 37°C, et précisément à 44°C où le diamètre de la zone d'inhibition atteint le maximum qui signifie a une forte sensibilité aux antibiotiques à cause de la diminution de la croissance bactérienne à cette température.

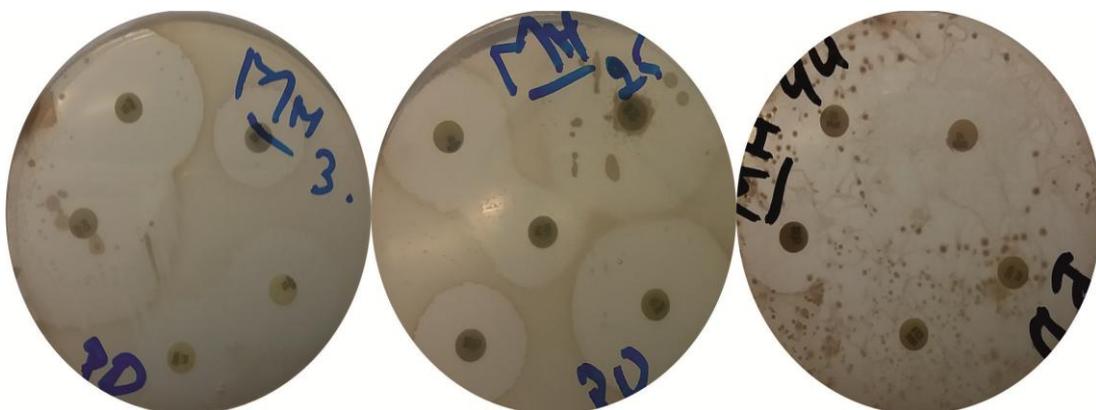


Figure 17. Résultats de l'antibiogramme pour *Pseudomonas aeruginosa* HO80

(Photo original)

RESULTATS ET DISCUSSIONS

2.- Interprétations des antibiogrammes

Les mesures de diamètre des zones d'inhibitions sont comparées soigneusement aux valeurs critiques figurant dans les Tableaux 3,4, 5 et 6, afin de les interpréter en plusieurs catégories (S, I ou R). Les résultats sont présentés dans le Tableau 16.

Tableau 16. Interprétations des antibiogrammes de chaque température pour *Pseudomonas aeruginosa* HO80.

T (°C)	IMP	COL	PIP	FOS	GEN	ATM	TCC	RIF	CAZ
25	S	S	S	S	S	S	S	R	S
30	S	S	S	S	S	S	S	R	S
37	S	S	S	S	S	S	S	R	S
44	S	S	S	S	S	S	S	R	S

IMP: Imipénème (10 µg); COL: Colistine (30 µg); PIP: Pipéracilline (100 µg); FOS: Fosfomycine (200 µg); GEN: Gentamicine (10 µg); ATM: Aztréonam (30 µg); TCC: Ticracilline + acide clavulanique (75/10 µg); RIF: Rifampicine (5 µg); CAZ: Ceftazidime (30 µg). S = Sensible, R = Résistant.

Selon le Tableau 16, nous constatons que *Pseudomonas aeruginosa* HO80 est sensible à tous les antibiotiques testés (Imipénème, Colistine, Pipéracilline, Fosfomycine, Gentamicine, Aztréonam, Ticracilline + acide clavulanique et Ceftazidime) et résistante à Rifampicine.

Egalement, il ressort de ces résultats que l'interprétation d'antibiogramme reste la même pour les différents degrés de température malgré l'intervalle important de 19 °C (de 25°C au 44°C), et sa malgré que l'OMS et la SFM exigent, afin de réaliser les antibiogrammes des souches bactériennes (dont *Pseudomonas aeruginosa*), une température d'incubation de 35±2°C. Nous avons constaté qu'avec l'ensemble des antibiotiques utilisé le résultat d'antibiogramme est le même, et donc l'chèque thérapeutique et les complication médical d'un résultat d'une analyse médicale erronée n'aurons pas lieu.

A base de l'analyse statistique nous n'avons pas remarqué une différence significative entre 30 et 37°C. Donc on peut remplacer 37°C par 30°C pour réaliser un antibiogramme dans les laboratoires médicaux. En revanche, les valeurs de 25 et 44°C montre une différence significative par rapport à l'intervalle de 30 et 37°C.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.- Analyse statistique

3.1.- Modélisation

Pour moduler la relation entre la température et le diamètre de la zone d'inhibition, on établit un diagramme de corrélation, c'est à dire un diagramme croisant les modalités de température et du diamètre de la zone d'inhibition. L'ensemble des valeurs forme un nuage de points dont la forme permet de caractériser une relation bien déterminée. Les résultats ont été présentés sous forme de courbe de tendance pour chaque antibiotique testé (Figure 19).

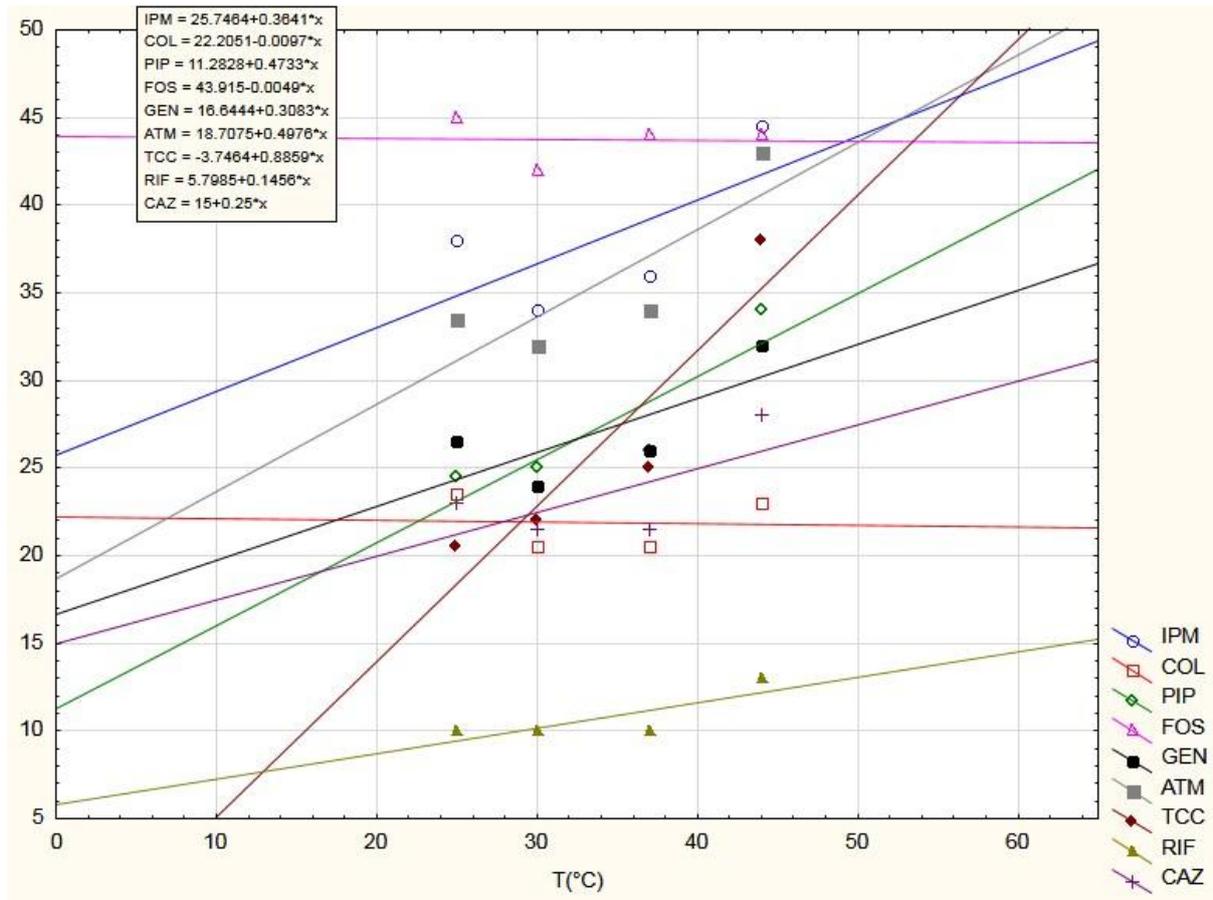


Figure 18. Courbes de tendance entre le diamètre de zone d'inhibition (mm) et la température (comprise entre 0 et 65°C) pour la souche testée *Pseudomonas aeruginosa* HO80.

IMP: Imipénème (10 µg); COL: Colistine (30 µg); PIP: Pipéracilline (100 µg); FOS: Fosfomycine (200 µg); GEN: Gentamicine (10 µg); ATM: Aztréonam (30 µg); TCC: Ticracilline + acide clavulanique (75/10 µg); RIF: Rifampicine (5 µg); CAZ: Ceftazidime (30 µg).

D'après les courbes présentées dans la Figure 18 nous avons constaté que le nuage de point peut s'ajuster correctement à une droite, c'est à dire que nous sommes en présence d'un modèle linéaire (type $Y = aX + b$) reliant le diamètre de la zone d'inhibition et la

RESULTATS ET DISCUSSIONS

température. Pour tous les antibiotiques utilisés (Imipénème, Colistine, Pipéracilline, Fosfomycine, Gentamicine, Aztréonam, Ticracilline + acide clavulanique, Ceftazidime et Rifampicine), nous avons remarqué que le nuage de point prend la forme d'une ligne dont les points s'écartent peu, donc il y a une forte relation linéaire entre la température et le diamètre de la zone d'inhibition pour ces antibiotiques.

Il ressort de ces résultats aussi que cette linéarité est négative pour le Colistine et le Fosfomycine, c'est à dire que le diamètre de la zone d'inhibition varie en sens inverse avec la température. En revanche, cette linéarité positive pour l'Imipénème, Pipéracilline, Gentamicine, Aztréonam, Ticracilline + acide clavulanique, Ceftazidime et Rifampicine et donc le diamètre de la zone d'inhibition varie avec la température.

Tableau 17. Interprétations des antibiogrammes selon le diamètre des zones d'inhibitions calculés en fonction de température pour la souche testée *Pseudomonas aeruginosa* HO80.

T(°C)	0	5	10	15	20	25	30	35	37	40	44	50	55	60	65
IMP	25,74	27,24	28,74	30,24	31,74	33,24	34,74	36,24	36,84	37,74	38,94	40,74	42,24	43,74	45,24
Interprétation	S														
COL	22	22	22	22	22	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
Interprétation	S														
PIP	11,28	13,63	15,98	18,33	20,68	23,03	25,38	27,73	28,67	30,08	31,96	34,78	37,13	39,48	41,83
Interprétation	R			S											
FOS	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43
Interprétation	S														
GEN	16,64	18,14	19,64	21,14	22,64	24,14	25,64	27,14	27,74	28,64	29,84	31,64	33,14	34,64	36,14
Interprétation	S														
ATM	18,7	21,15	23,6	26,05	28,5	30,95	33,4	35,85	36,83	38,3	40,26	43,2	45,65	48,1	50,55
Interprétation	I		S												
TCC	-3,74	0,66	5,06	9,46	13,86	18,26	22,66	27,06	21,34	31,46	34,98	40,26	44,66	49,06	53,46

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Interprétation	R					I	S								
RIF	5,79	6,49	7,19	7,89	8,59	9,29	9,99	10,69	10,97	11,39	11,95	12,79	13,49	14,19	14,89
Interprétation	R													I	
CAZ	15	16,25	17,5	18,75	20	21,25	22,5	23,75	24,25	25	26	27,5	28,75	30	31,25
Interprétation	I			S											

IMP: Imipénème (10 µg); COL: Colistine (30 µg); PIP: Pipéracilline (100 µg); FOS: Fosfomycine (200 µg); GEN: Gentamicine (10 µg); ATM: Aztréonam (30 µg); TCC: Ticracilline + acide clavulanique (75/10 µg); RIF: Rifampicine (5 µg); CAZ: Ceftazidime (30 µg). S : Sensible, R : Résistant, I : intermédiaire.

La figure 18 montre que presque aucun changement dans le diamètre des zones d'inhibition n'a été observé pour le Colistine et le fosfomycine (pour toutes les températures utilisées). Dans le cas de l'imipénème, les diamètres des zones d'inhibitions sont observées entre 25,74 mm (à 0 ° C) et 45,24 mm (à 65 ° C), et dans le cas de la gentamicine, les diamètres des zones d'inhibitions sont observées entre 16,64 mm (à 0 ° C) et 36,14 mm (à 65 ° C); et malgré ça, ces résultats n'ont montré aucun effet sur le profil de résistance (toujours sensible) pour ces deux antibiotiques. Dans le cas de le pipéracilline, les diamètres des zones d'inhibitions sont observées entre 11,28 mm (à 0 ° C) et 41,83 mm (à 65 ° C); dans le cas de l'aztréonam, les diamètres des zones d'inhibitions sont observées entre 18,7 mm (à 0 ° C) et 50,55 mm (à 65 ° C); dans le cas de la ticracilline + acide clavulanique, les diamètres des zones d'inhibitions sont observées entre une valeur théorique de -3,74 mm (à 0 ° C) et 53,46 mm (à 65 ° C); dans le cas de le rifampicine, les diamètres des zones d'inhibitions sont observées entre 5,79 mm (à 0 ° C) et 14,89 mm (à 65 ° C) et dans le cas de le ceftazidime, les diamètres des zones d'inhibitions sont observées entre 15 mm (à 0 ° C) et 31,25 mm (à 65 ° C). Pour ces derniers antibiotiques ou le changement des diamètres des zones d'inhibitions est accompagné par un changement de profil de résistance légèrement à l'extrémité de notre échelle (0 – 65°C).

4.- Résultats de l'antibiogramme

La sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* HO80 vis-à-vis des neuf antibiotiques utilisés est exprimée par la mesure de diamètre des zones d'inhibition autour de ces disques.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les résultats de la sensibilité vis-à-vis des antibiotiques sont exprimés par le calcul de la moyenne du diamètre des zones d'inhibition et l'écart type entre les trois réplicas, les résultats sont présentés dans les Figure 17, 18 et le Tableau 18.

Tableau 18. Résultats des antibiogrammes et écartype de chaque pH pour la souche testée *Pseudomonas aeruginosa* HO80

pH	IMP	COL	PIP	FOS	GEN	ATM	TCC	RIF	CAZ
6,0	31,5±0,5	17,0±0,0	25,0±1,0	37,0±1,0	17,0±1,0	36,0±0,0	30,0±2,0	7,0±0,0	22,5±0,5
6,5	32,0±1,0	17,0±0,0	24,0±4,0	37,0±0,0	19,0±1,0	35,0±1,0	27,0±1,0	6,5±0,5	19,5±1,5
7,0	39,0±1,0	17,0±1,0	9,0±0,0	34,0±2,0	24,0±0,0	34,5±0,5	16,0±0,0	7,0±1,0	14,5±0,5
7,5	34,0±0,0	20,5±0,5	17,5±0,5	40,5±1,5	25,5±0,5	32,0±0,0	20,0±2,0	6,0±0,0	16,5±0,5
8,0	35,0±0,0	20,0±0,0	25,0±1,0	39,0±1,0	25,0±0,0	32,0±0,0	23,5±0,5	7,0±0,0	22,5±1,5

IMP: Imipénème (10 µg); COL: Colistine (30 µg); PIP: Pipéracilline (100 µg); FOS: Fosfomycine (200 µg); GEN: Gentamicine (10 µg); ATM: Aztréonam (30 µg); TCC: Ticracilline + acide clavulanique (75/10 µg); RIF: Rifampicine (5 µg); CAZ: Ceftazidime (30 µg).

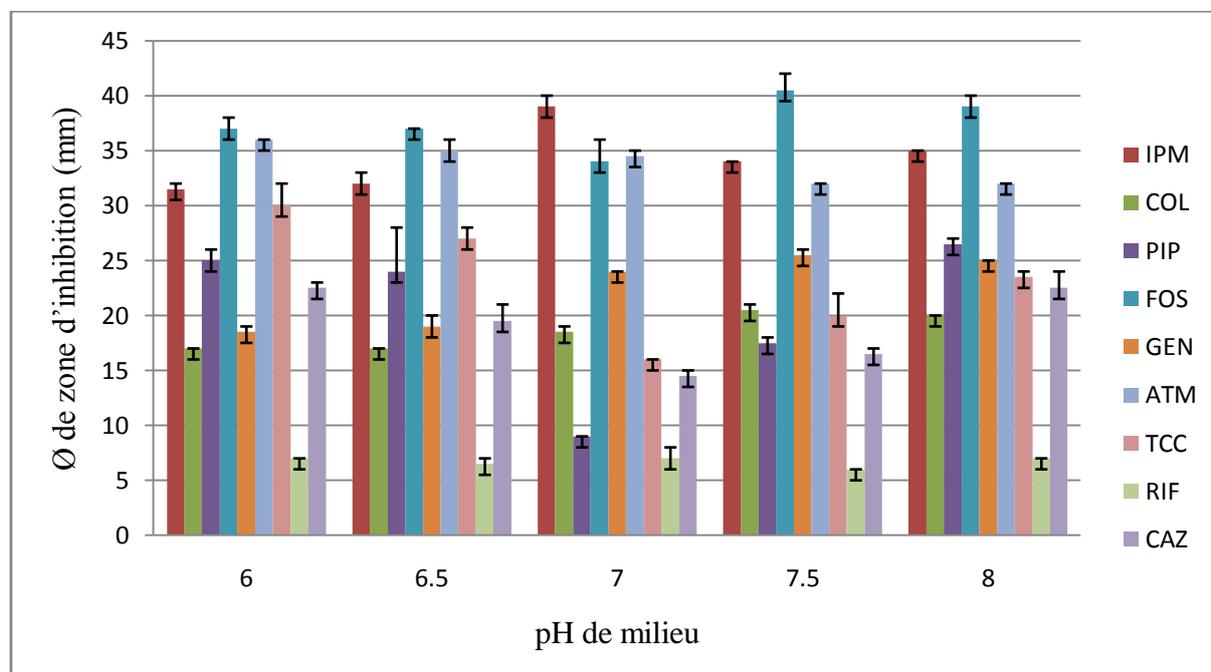


Figure 19. Variation de diamètre des zones d'inhibition en fonction de pH chez la souche *Pseudomonas aeruginosa* HO80.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

IMP: Imipénème (10 µg); COL: Colistine (30 µg); PIP: Pipéracilline (100 µg); FOS: Fosfomycine (200 µg); GEN: Gentamicine (10 µg); ATM: Aztréonam (30 µg); TCC: Ticracilline + acide clavulanique (75/10 µg); RIF: Rifampicine (5 µg); CAZ: Ceftazidime (30 µg).

Les résultats illustrés dans le Tableau 18 et la figure 19, montre qu'à différentes valeurs de pH (6, 6,5, 7,0, 7,5 et 8), la souche de *Pseudomonas aeruginosa* HO80 est très sensible à la FOS (zone d'inhibition comprise entre 34 et 40 mm); IMP (zone d'inhibition comprise entre 31,5 et 39mm) et ATM (zone d'inhibition comprise entre 32 et 36 mm); moyennement sensible vis-à-vis de la COL (zone d'inhibition comprise entre 17 et 20 mm); PIP (zone d'inhibition comprise entre 9 et 25 mm); GEN (zone d'inhibition comprise entre 17 et 25 mm); TCC (zone d'inhibition comprise entre 16 et 30 mm) et CAZ (zone d'inhibition comprise entre 14,5 et 22,5 mm); et faiblement sensible à la RIF (zone d'inhibition comprise entre 6 et 7 mm).

Les résultats obtenus indiquent que le diamètre des zones d'inhibition a diminué de 1 à 14 mm au maximum avec presque la moitié des antibiotiques utilisés qui attendent des diamètres maximum à pH 6. Ce résultat montre que l'effet de pH est relativement important sur le diamètre des zones d'inhibition.



Figure 20. Résultats de l'antibiogramme pour *Pseudomonas aeruginosa* HO80
(Photo original)

5.- Interprétations des antibiogrammes

Les mesures de diamètre des zones d'inhibitions sont comparées soigneusement aux valeurs critiques figurant dans les Tableaux de lecture (Tableau 3), (Tableau 4), (Tableau 5), (Tableau 6) afin de les interpréter en plusieurs catégories (S, I ou R). Les résultats sont présentés dans le Tableau 19.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Tableau 19. Interprétations des antibiogrammes de chaque pH pour la souche *Pseudomonas aeruginosa* HO80.

pH	IMP	COL	PIP	FOS	GEN	AZ	TR+AC	RIF	CAZ
6,0	S	S	S	S	S	S	S	R	S
6,5	S	S	S	S	S	S	S	R	S
7,0	S	S	R	S	S	S	S	R	R/I
7,5	S	S	I	S	S	S	S	R	I
8,0	S	S	S	S	S	S	S	R	S

IMP: Imipénème (10 µg); COL: Colistine (30 µg); PIP: Pipéracilline (100 µg); FOS: Fosfomycine (200 µg); GEN: Gentamicine (10 µg); ATM: Aztréonam (30 µg); TCC: Ticracilline + acide clavulanique (75/10 µg); RIF: Rifampicine (5 µg); CAZ: Ceftazidime (30 µg). S = Sensible, R = Résistant, I = intermédiaire.

Selon le Tableau 19, nous constatons que *Pseudomonas aeruginosa* HO80 est sensible aux antibiotiques testés : Imipénème, Colistine, Fosfomycine, Gentamicine, Aztréonam et Ticracilline + acide clavulanique, sauf Pipéracilline qui est résistante à pH 7 et résistante/intermédiaire à pH 7,5 et Ceftazidime qui est résistante/intermédiaire à pH 7 et intermédiaire à pH 7,5) et résistante à la Rifampicine.

Il ressort de ces résultats aussi que l'interprétation d'antibiogramme reste la même pour les pH 6-6,5 et 8 , et presque les même pour pH 7 et 7,5, malgré que l'OMS et la SFM exigent un pH de milieu de culture de *Pseudomonas aeruginosa* pour la réalisation des antibiogrammes a des valeurs de pH entre 7,2 et 7,4 avec l'ensemble des antibiotiques utilisé (neuf antibactériens au total), et dans ce cas-là, on peut augmenter l'intervalle des valeurs de pH jusqu'à 7 et 7,5 dans les analyses médicaux et pour les thématiques de recherche.

6.- Analyse statistique

6.1.- Modélisation

Pour moduler la relation entre le pH et le diamètre de la zone d'inhibition, on établit un diagramme de corrélation, c'est à dire un diagramme croisant les modalités de pH et du diamètre de la zone d'inhibition. L'ensemble des valeurs forme un nuage de points dont la forme permet de caractériser la relation. Les résultats ont été présentés sous forme de courbe de tendance pour chaque antibiotique testé (la Figure 21).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

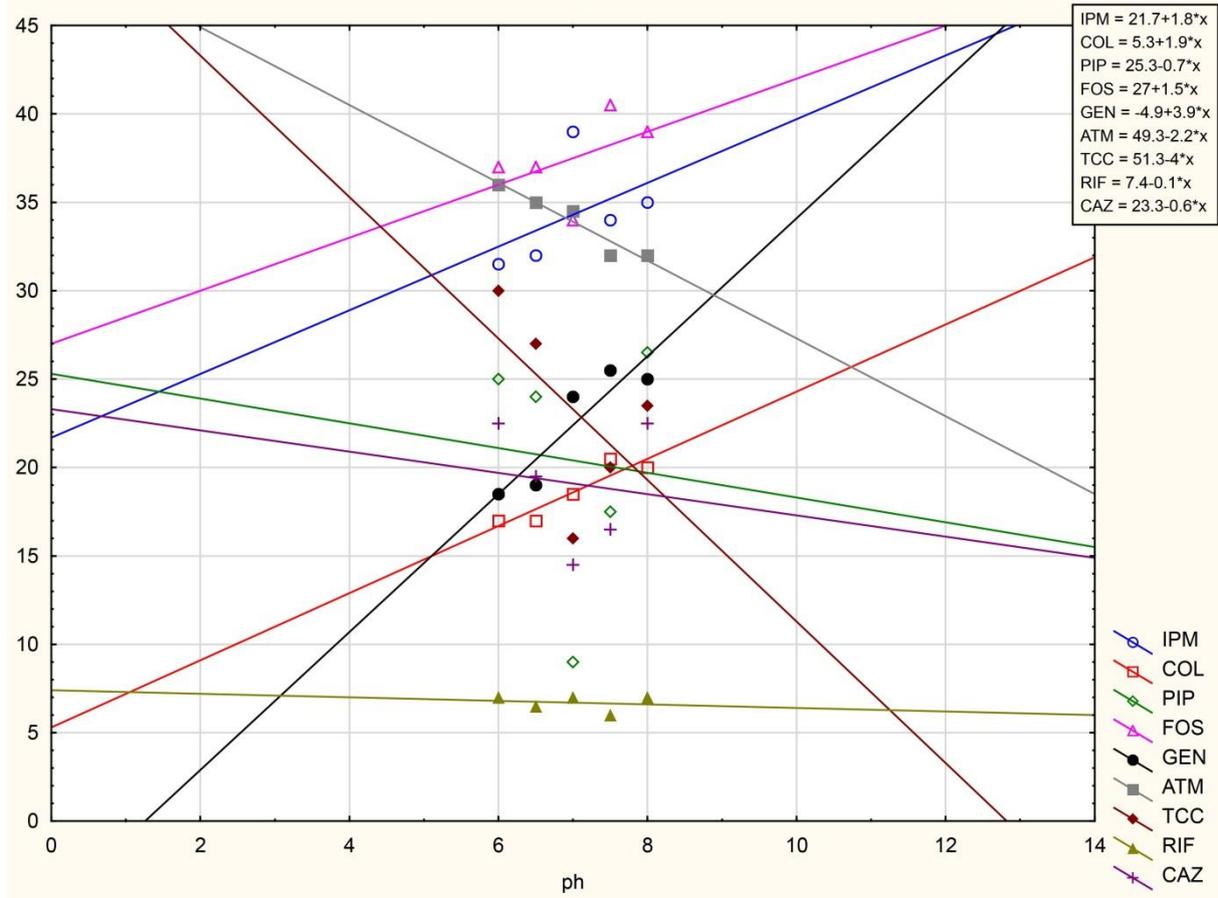


Figure 21. Courbes de tendance entre le diamètre de zone d'inhibition (mm) et le pH (comprise entre 0 et 14 mm) pour la souche testée de *Pseudomonas aeruginosa* HO80.

IMP: Imipénème (10 µg); COL: Colistine (30 µg); PIP: Pipéracilline (100 µg); FOS: Fosfomycine (200 µg); GEN: Gentamicine (10 µg); ATM: Aztréonam (30 µg); TCC: Ticracilline + acide clavulanique (75/10 µg); RIF: Rifampicine (5 µg); CAZ: Ceftazidime (30 µg).

D'après les courbes présentées dans la Figure 21 nous avons constaté que le nuage de point peut s'ajuster correctement à une droite, c'est à dire que nous sommes en présence d'un modèle linéaires (type $Y = aX + b$) reliant le diamètre de la zone d'inhibition et le pH. Pour seulement tous les antibiotiques utilisés : Imipénème, Colistine, Pipéracilline, Fosfomycine, Gentamicine, Aztréonam, Ticracilline + acide clavulanique, Ceftazidime, Rifampicine, nous avons remarqué que le nuage de point prend la forme d'une ligne dont les points s'écartent peu, donc il y a une forte relation linéaire entre le pH et le diamètre de la zone d'inhibition.

Il ressort de ces résultats aussi que cette linéarité est négative pour (Aztréonam, Ticracilline + acide clavulanique, Ceftazidime, Rifampicine et Pipéracilline), c'est à dire que le diamètre de la zone d'inhibition varie en sens inverse avec le pH et cette linéarité positive pour (Imipénème, Colistine, Fosfomycine, Gentamicine) donc le diamètre de la zone d'inhibition varie avec le pH.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Tableau 20. Interprétations des antibiogrammes selon le diamètre des zones d'inhibitions calculé en fonction de pH pour *Pseudomonas aeruginosa* HO80.

Ph	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
IMP	21,7	23,5	25,3	27,1	28,9	30,7	32,5	34,3	36,1	37,9	39,7	41,5	43,3	45,1	46,9
Interprétation	S														
COL	5,3	7,2	9,1	11	12,9	14,8	16,7	18,6	20,5	22,4	24,3	26,2	28,1	30	31,9
Interprétation	R			S											
PIP	25,3	24,6	23,9	23,2	22,5	21,8	21,1	20,4	19,7	19	18,3	17,6	16,9	16,2	15,5
Interprétation	S											I		R	
FOS	27	28,5	30	31,5	33	34,5	36	37,5	39	40,5	42	43,5	45	46,5	48
Interprétation	S														
GEN	-4,9	-1	2,9	6,8	10,7	14,6	18,5	22,4	26,3	30,2	34,1	38	41,9	45,8	49,7
Interprétation	R					I	S								
ATM	49,3	47,1	44,9	42,7	40,5	38,3	36,1	33,9	31,7	29,5	27,3	25,1	22,9	20,7	18,5
Interprétation	S													I	
TCC	51,3	47,3	43,3	39,3	35,3	31,3	27,3	23,3	19,3	15,3	11,3	7,3	3,3	-0,7	-4,7
Interprétation	S									I		R			
RIF	7,4	7,3	7,2	7,1	7	6,9	6,8	6,7	6,6	6,5	6,4	6,3	6,2	6,1	6
Interprétation	R														
CAZ	23,3	22,7	22,1	21,5	20,9	20,3	19,7	19,1	18,5	17,9	17,3	16,7	16,1	15,5	14,9
Interprétation	S									I					

IMP: Imipénème (10 µg); COL: Colistine (30 µg); PIP: Pipéracilline (100 µg); FOS: Fosfomycine (200 µg); GEN: Gentamicine (10 µg); ATM: Aztréonam (30 µg); TCC: Ticracilline + acide clavulanique (75/10 µg); RIF: Rifampicine (5 µg); CAZ: Ceftazidime (30 µg).

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

La figure 21 et le tableau 20 montre que les résultats ont indiqué que presque aucun changement dans le diamètre des zones d'inhibition n'a été observé pour le Rifampicine (pour toutes les valeurs de

RESULTATS ET DISCUSSIONS

pH de milieux utilisées) et le profil de résistance reste le même, pour les autres antibiotiques dans le cas de l'imipénème, les diamètres des zones d'inhibitions sont observées entre 21,7 mm (à pH 0) et 46,9 mm (à pH 14), et dans le cas de la fosfomycine, les diamètres des zones d'inhibitions sont observées entre 27 mm (à pH 0) et 48 mm (à pH 14); et malgré ça, ces résultats n'ont pas d'effet sur le profil de résistance (toujours sensible) pour ces deux antibiotiques. Dans le cas de la colistine, les diamètres des zones d'inhibitions sont observées entre 5,3 mm (à pH 0) et 31,9 mm (à pH 14); dans le cas de la pipéracilline, les diamètres des zones d'inhibitions sont observées entre 25,3 mm (à pH 0) et 15,5 mm (à pH 14); dans le cas de la gentamicine, les diamètres des zones d'inhibitions sont observées entre une valeur théorique de -4,9 mm (à pH 0) et 49,7 mm (à pH 14); dans le cas de l'aztréonam, les diamètres des zones d'inhibitions sont observées entre 18,5 mm (à pH 14) et 49,3 mm (à pH 0); dans le cas de la Ticracilline + acide clavulanique, les diamètres des zones d'inhibitions sont observées entre une valeur théorique de -4,7 mm (à pH 14) et 51,3 mm (à pH 0) et dans le cas de la ceftazidime, les diamètres des zones d'inhibitions sont observées entre 23,3 mm (à pH 14) et 14,9 mm (à pH 0). Pour ces derniers antibiotiques ou le changement des diamètres des zones d'inhibitions est accompagné avec un changement de profil de résistance.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

1.- Résultats de l'antibiogramme

La sensibilité de *Staphylococcus aureus* HO90 vis-à-vis des treize antibiotique utilisés est exprimée par la mesure de diamètre des zones d'inhibition autour de ces disques.

Les résultats de la sensibilité vis-à-vis des antibiotiques sont exprimés par le calcul de la moyen du diamètre des zones d'inhibition et l'écart type entre les trois répliques analytiques. Les résultats sont présentés dans les Figure 18, 19 et le Tableau 21.

Tableau 21. Résultats des antibiogrammes et écartype de chaque température pour la souche testée de *Staphylococcus aureus* HO90.

T (°C)	RIF	TCY	GEN	PRI	FOX	TEC	AMK	OFX	VAN	CLI	SXT	ERY	PEN
25	23,5±0,5	34,0±0,0	30,0±1,0	31,0±1,0	22,0±2,0	23,0±0,0	31,5±0,5	39,5±0,5	19,0±0,0	16,0±1,0	31,0±1,0	32,0±0,0	18,0±0,0
30	37,0±3,0	31,0±1,0	28,5±1,5	32,0±2,0	23,0±0,0	20,0±0,0	38,5±1,5	40,0±2,0	23,0±1,0	20,0±0,0	29,0±1,0	33,5±2,5	19,0±1,0
37	33,0±1,0	27,0±3,0	25,0±0,0	29,0±3,0	23,5±1,5	23,0±1,0	28,0±2,0	38,5±3,5	22,5±0,5	28,0±2,0	31,5±2,5	31,5±1,5	21,0±1,0
44	35,0±1,0	28,0±0,0	28,0±1,0	32,0±2,0	30,5±1,5	29,0±1,0	28,5±1,5	34,0±0,0	23,0±1,0	35,0±1,0	29,0±1,0	32,5±0,5	41,0±1,0

RIF: Rifampicine (05 µg); TCY: Tétracycline(30 µg); GEN: Gentamicine (10 µg); PRI: Pristinamycine (15 µg); FOX: Céfoxitine (30 µg); TEC: Teicoplanine (30 µg); AMK: Amikacine (30 µg); OFX: Ofloxacine (5 µg); VAN: Vancomycine (30µg); CLI: Clindamycine (2 µg) SXT:Triméthoprim+Sulfaméthoxazole (1,25/23,75 µg) ERY: Erythromycine (15 µg); PEN: Péniciline (10 UI).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

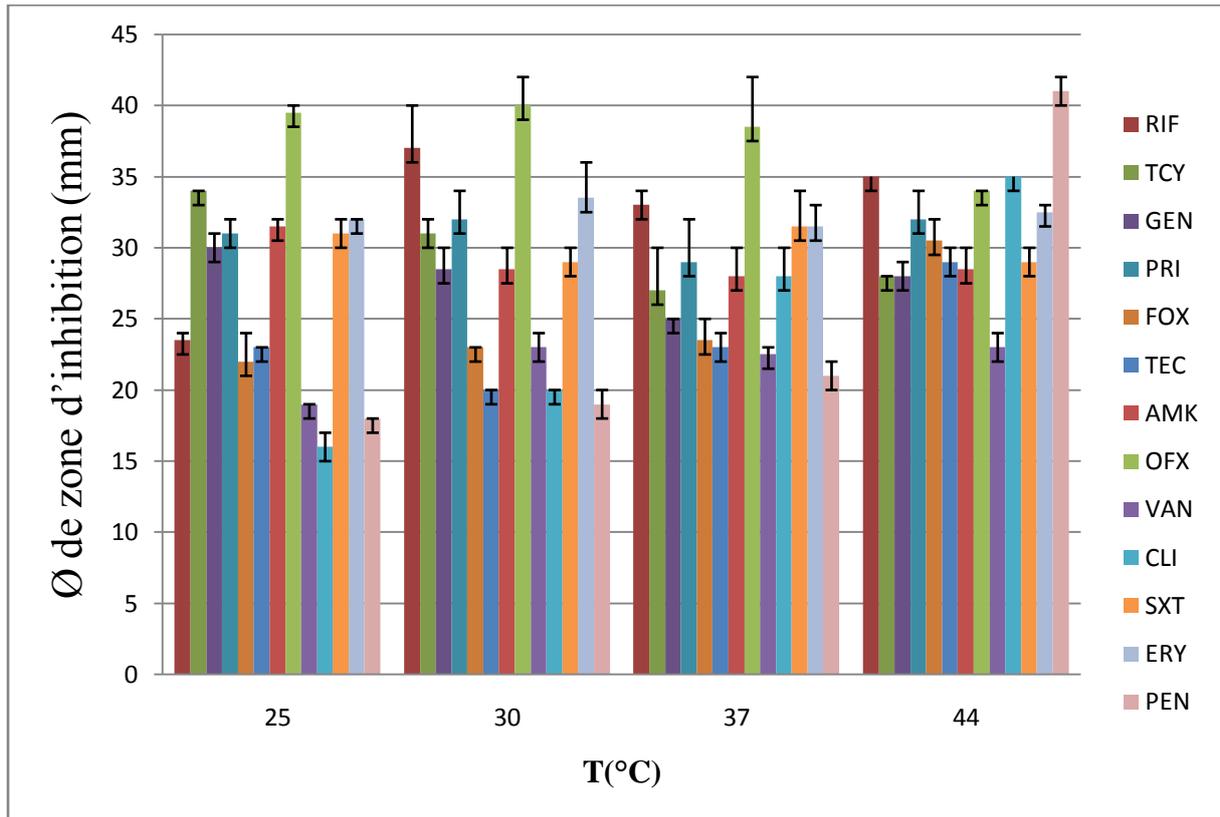


Figure 22. Variation de diamètre des zones d'inhibition en fonction de la température chez la souche testée de *Staphylococcus aureus* HO90.

RIF: Rifampicine (05 µg); TCY: Tétracycline(30 µg); GEN: Gentamicine (10 µg); PRI: Pristinamycine (15 µg); FOX: Céfoxitine (30 µg); TEC: Teicoplanine (30 µg); AMK: Amikacine (30 µg); OFX: Ofloxacine (5 µg); VAN: Vancomycine (30µg); CLI: Clindamycine (2 µg) SXT:Triméthoprim+Sulfaméthoxazole (1,25/23,75 µg) ERY: Erythromycine (15 µg); PEN: Pénicilline (10 UI).

Les résultats illustrés dans le Tableau 21 et la figure 22, montre l'effet de différente température (25, 30, 37 et 44°C) sur les zones d'inhibitions de *Staphylococcus aureus* HO90. Les résultats obtenus montrent que la souche *Staphylococcus aureus* HO90 est très sensible vis-à-vis de l'antibiotique la RIF (la zone d'inhibition comprise entre 23,5 et 37 mm); TCY (la zone d'inhibition comprise entre 27 et 43 mm); GEN (la zone d'inhibition comprise entre 25 et 30 mm); PRI (la zone d'inhibition comprise entre 29 et 32 mm); FOX (la zone d'inhibition comprise entre 22 et 30,5 mm); TEC (la zone d'inhibition comprise entre 20 et 29 mm); AMK (la zone d'inhibition comprise entre 28 et 38,5 mm); OFX (la zone d'inhibition comprise entre 34 et 40 mm); SXT (la zone d'inhibition comprise entre 29 et 31,5 mm) et ERY (la zone d'inhibition comprise entre 21,5 et 33,5 mm) et moyennement sensible vis-à-vis de l'antibiotique à la VAN (la zone d'inhibition comprise entre 19 et 23 mm); CLI (la zone

RESULTATS ET DISCUSSIONS

d'inhibition comprise entre 16 et 35 mm); GEN (la zone d'inhibition comprise entre 25 et 30mm) et PEN (la zone d'inhibition comprise entre 18 et 21 mm sauf à 44°C nous avons remarqué un grande zone 41 mm).

Les résultats obtenue indiquent que les diamètres des zones d'inhibitions ont diminué de 3 à 23 mm au maximum avec l'ensemble des antibiotiques utilisés qui attend le maximum à 44°C et le minimum à 25°C chez quelque antibiotiques, et à 37°C chez les autres antibiotiques. Ce résultat montre que l'effet de la température est relativement important sur les diamètres des zones d'inhibitions.

Selon ces résultats nous avons remarqué une différence significative entre 30 et 37°C (variable entre 10,5 mm et 0 mm). Donc on ne peut pas remplacer 37°C par 30°C (comme le cas d'*Escherichia coli* HO25) pour réalise un antibiogramme dans les laboratoires médicaux par exemple, et c'est la même chose pour les valeurs de 25 et 44°C.

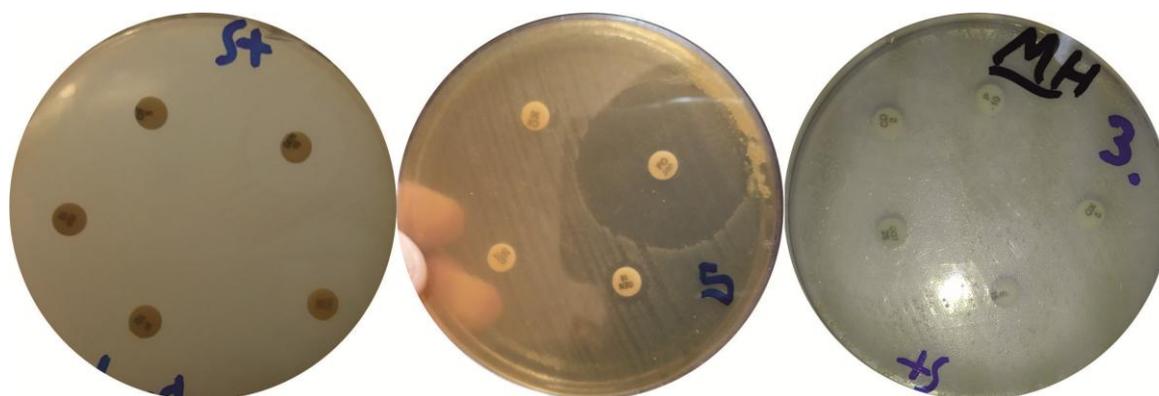


Figure 23. Résultats de l'antibiogramme pour *Staphylococcus aureus* HO90 (Photo original)

2.- Interprétations des antibiogrammes

Les mesures de diamètre des zones d'inhibitions sont comparées soigneusement aux valeurs critiques figurant dans les Tableaux 3, 4, 5 et 6 afin d'interpréter en plusieurs catégories (S, I ou R). Les résultats sont présentés dans le Tableau 22.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Tableau 22. Interprétations des antibiogrammes de chaque température pour la souche testée de *Staphylococcus aureus* HO90.

T (°C)	RIF	TET	GEN	PRI	FOX	TEC	AMK	OF	VAN	CLI	TR+S	ERY	PEN
25	S	S	S	S	S	S	S	S	-	I	S	S	R
30	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S	R
37	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S	R
44	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S	S

RIF: Rifampicine (05 µg); TCY: Tétracycline(30 µg); GEN: Gentamicine (10 µg); PRI: Pristinamycine (15 µg); FOX: Céfoxitine (30 µg); TEC: Teicoplanine (30 µg); AMK: Amikacine (30 µg); OFX: Ofloxacine (5 µg); VAN: Vancomycine (30µg); CLI: Clindamycine (2 µg) SXT:Triméthopriime+Sulfaméthoxazole (1,25/23,75 µg) ERY: Erythromycine (15 µg); PEN: Pénicilline (10 UI).

S :Sensible, R :Résistant, I : intermédiaire.

Selon le Tableau 18, nous constatons que *Staphylococcus aureus* HO90 est sensible a tous les antibiotiques testés (Rifampicine, Tétracycline, Gentamicine, Pristinamycine, Céfoxitine, Teicoplanine, Amikacine, Pristinamycine, Céfoxitine , Ofloxacine, Vancomycine, Triméthopriime+Sulfaméthoxazole, Erythromycine et Clindamycine (a l'exception à 25°C qui montre une sensibilité intermédiaire) de la souche étudié. Les résultats montrent une résistante à la Pénicilline (et exceptionnellement à 44°C qui montre un profil sensible).

Il ressort de ces résultats aussi que l'interprétation d'antibiogramme reste la même pour les degrés de température 30 et 37°C mais pas pour 25°C au 44°C. L'OMS et la SFM exigent l'incubation des souches bactériennes (dont la souche *Staphylococcus aureus*) pour la réalisation des antibiogrammes à 35±2°C. Pour cette bactérie testée, nous avons observé qu'avec l'ensemble des antibiotiques utilisé (treize antibactériens au total), l'antibiogramme est le même à 30 et 37°C, et donc l'chèque thérapeutique et les complications médicale des résultats d'analyse médicale erronée n'aurons pas lieu dans ces conditions (avec le changement de la température d'incubation).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.- Analyse statistique

3.1.- Modélisation

Pour moduler la relation entre la température et le diamètre de la zone d'inhibition, on établit un diagramme de corrélation (un diagramme croisant les modalités de température et du diamètre de la zone d'inhibition). L'ensemble des valeurs forme un nuage de points dont la forme permet de caractériser la relation. Les résultats ont été présentés sous forme de courbe de tendance pour chaque antibiotique testé (Figure 19).

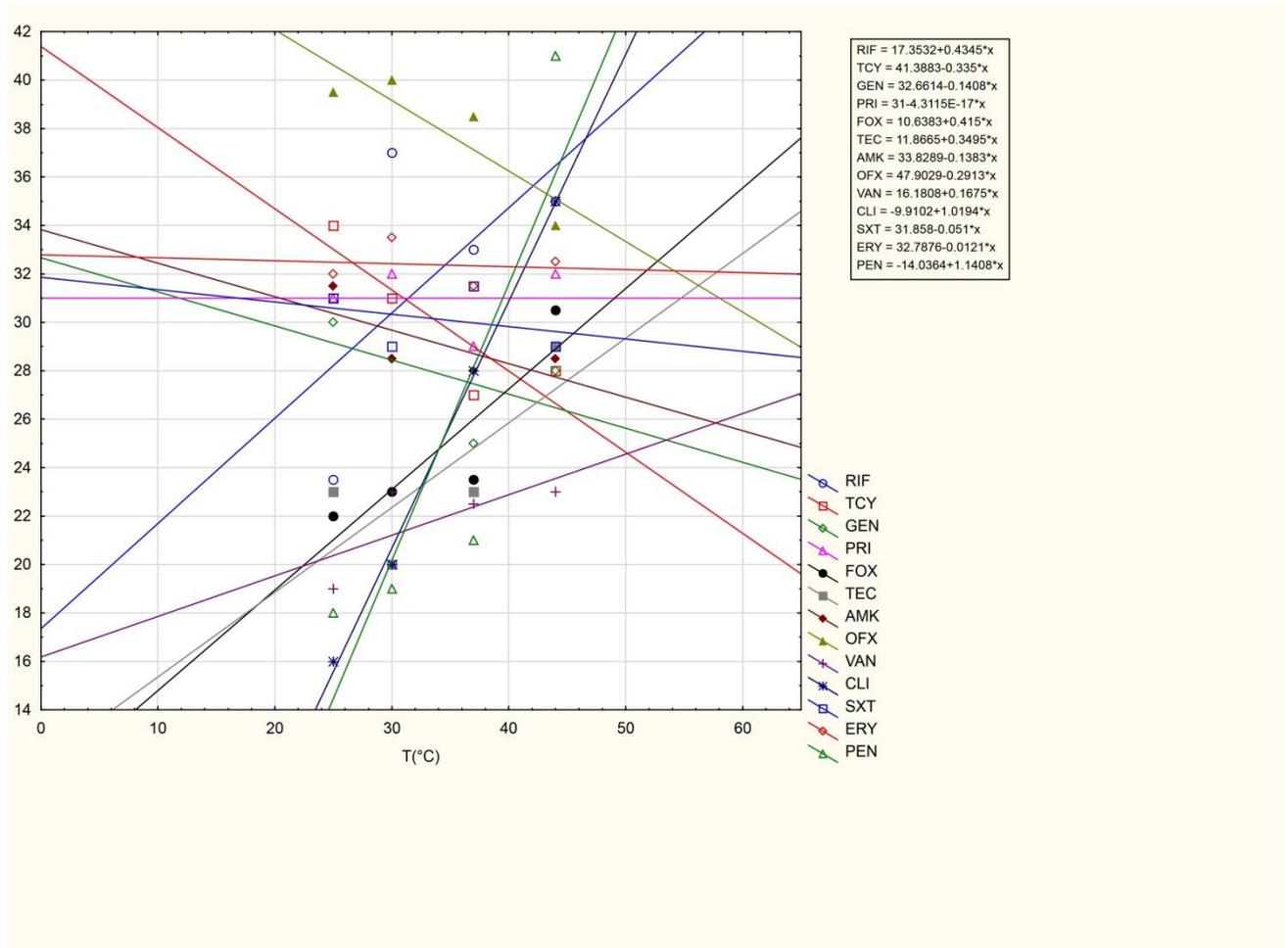


Figure 24. Courbes de tendance entre le diamètre de zone d'inhibition (mm) et la température (comprise entre 0 et 65°C) pour la souche testée de *Staphylococcus aureus* HO90.

RIF: Rifampicine (05 µg); TCY: Tétracycline(30 µg); GEN: Gentamicine (10 µg); PRI: Pristinamycine (15 µg); FOX: Céfoxitine (30 µg); TEC: Teicoplanine (30 µg); AMK: Amikacine (30 µg); OFX: Ofloxacine (5 µg); VAN: Vancomycine (30µg); CLI: Clindamycine (2 µg) SXT:Triméthopri+me+Sulfaméthoxazole (1,25/23,75 µg) ERY: Erythromycine (15 µg); PEN: Pénicilline (10 UI).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

D'après les courbes présentées dans la Figure 24 nous avons constaté que le nuage de point peut s'ajuster correctement à une droite, c'est à dire que nous sommes en présence d'un modèle linéaires (type $Y = aX + b$) reliant le diamètre de la zone d'inhibition et la température pour tous les antibiotiques utilisés sauf Pristinamycine. Nous avons remarqué que le nuage de point prend la forme d'une ligne dont les points s'écartent peu, donc il y a une forte relation linéaire entre la température et le diamètre de la zone d'inhibition pour le Clindamycine et le Pénicilline, et une relation linéaire moyenne entre la température et le diamètre de la zone d'inhibition pour les antibiotiques: Rifampicine, Tétracycline, Gentamicine, Céfoxitine, Teicoplanine, Amikacine, Ofloxacin et le Vancomycine et une relation linéaire faible entre la température et le diamètre de la zone d'inhibition pour les antibiotiques : Triméthoprime + Sulfaméthoxazole, Erythromycine et Pristinamycine.

Il ressort de ces résultats aussi que cette linéarité est négative pour le Tétracycline, Gentamicine, Amikacine, Ofloxacin, Triméthoprime+Sulfaméthoxazole et l'Erythromycine (c'est à dire que le diamètre de la zone d'inhibition varie en sens inverse avec la température). En revanche, cette linéarité est positive pour Rifampicine, Céfoxitine, Teicoplanine, Vancomycine, Clindamycine, Pénicilline, et donc le diamètre de la zone d'inhibition varie avec la température.

Malgré que la température change, le diamètre des zones d'inhibitions varie aussi légèrement car le coefficient directeur en valeur absolue de la droite de régression (correspond à la pente de la droite de régression) de chaque antibiotique utilisé est faible (et varie de 0,012 à 1,14).

Tableau 23. Interprétations des antibiogrammes selon le diamètre des zones d'inhibitions calculé en fonction de température pour la souche testée *Staphylococcus aureus* HO90.

T(°C)	0	5	10	15	20	25	30	35	37	40	44	50	55	60	65
RIF	17,35	19,52	21,69	23,87	26,04	28,21	30,38	32,56	33,42	34,73	36,47	39,07	41,25	43,42	45,59
Interprétation	R			I	S										
TCY	41,38	39,70	38,03	36,35	34,68	33	31,33	29,65	28,98	27,98	26,64	24,63	22,95	21,28	19,6
Interprétation	S														
GEN	32,66	31,96	31,26	30,56	29,86	29,16	28,46	27,76	27,48	27,06	26,5	25,66	24,96	24,26	23,56

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Interprétation	S														
PRI	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31
Interprétation	S														
FOX	37,6	35,53	33,45	31,38	28,89	27,23	25,98	25,15	23,08	21	18,93	16,85	14,78	12,7	10,63
Interprétation	R							S							
TEC	22,75	21	19,25	17,5	15,4	14	12,95	12,25	10,5	8,75	7	5,25	3,5	1,75	0
Interprétation	R					I					S				
AMK	25,37	26,02	26,67	27,32	28,1	28,62	29,01	29,27	29,92	30,57	31,22	31,87	32,52	33,17	33,82
Interprétation	S														
OFX	29,05	30,5	31,95	33,4	35,14	36,3	37,17	37,75	39,2	40,65	42,1	43,55	45	46,45	47,9
Interprétation	S														
VAN	26,58	25,78	24,98	24,18	23,22	22,58	22,1	21,78	20,98	20,18	19,38	18,58	17,78	16,98	16,18
Interprétation	-														
CLI	55,74	50,69	45,64	40,59	34,53	30,49	27,46	25,44	20,39	15,34	10,29	5,24	0,19	-4,86	-9,91
Interprétation	R							I							S
SXT	28,6	28,85	29,1	29,35	29,65	29,85	30	30,1	30,35	30,6	30,85	31,1	31,35	31,6	31,85
Interprétation	S														

RESULTATS ET DISCUSSIONS

ERY	32,78	32,76	32,66	32,6	32,54	32,48	32,42	32,36	32,336	32,3	32,252	32,18	32,12	32,06	32
Interprétation	S														
PEN	0	5,7	11,4	17,1	22,8	28,5	34,2	39,9	42,18	45,6	50,16	57	62,7	68,4	74,1
Interprétation	R					S									

RIF: Rifampicine (05 µg); TCY: Tétracycline(30 µg); GEN: Gentamicine (10 µg); PRI: Pristinamycine (15 µg); FOX: Céfoxitine (30 µg); TEC: Teicoplanine (30 µg); AMK: Amikacine (30 µg); OFX: Ofloxacine (5 µg); VAN: Vancomycine (30µg); CLI: Clindamycine (2 µg) SXT:Triméthoprime+Sulfaméthoxazole (1,25/23,75 µg) ERY: Erythromycine (15 µg); PEN: Péniciline (10 UI).

S :Sensible, R :Résistant, I : intermédiaire.

La figure 24 et le tableau 23 montre que les résultats ont indiqué que malgré l'augmentation de la fourchette de la température (0 à 65°C), aucun changement dans le diamètre des zones d'inhibition n'a été observé pour le Pristinamycine. Dans le cas de la Tétracycline, les diamètres des zones d'inhibition sont observées entre 41,38 mm (à 0 ° C) et 19,6 mm (à 65 ° C); dans le cas de la Gentamicine les diamètres des zones d'inhibition sont observées entre 32,66 mm (à 0 ° C) et 23,56 mm (à 65 ° C); dans le cas de la clindamycine les diamètres des zones d'inhibition sont observées entre une valeur théorique de -9,91 mm (à 0 ° C) et 55,74 mm (à 65 ° C); dans le cas de la Céfoxitine les diamètres des zones d'inhibition sont observées entre 10,63 mm (à 0 ° C) et 37,6 mm (à 65 ° C); dans le cas de la Amikacine les diamètres des zones d'inhibition sont observées entre 33,82 mm (à 0 ° C) et 25,37 mm (à 65 ° C); dans le cas de la Ofloxacine les diamètres des zones d'inhibition sont observées entre 47,9 mm (à 0 ° C) et 29,05 mm (à 65 ° C); dans le cas de la Vancomycine les diamètres des zones d'inhibition sont observées entre 16,18 mm (à 0 ° C) et 26,58 mm (à 65 ° C); dans le cas de la Triméthoprime+Sulfaméthoxazole les diamètres des zones d'inhibition sont observées entre 31,85 mm (à 0 ° C) et 28,6 mm (à 65 ° C); dans le cas de l'Erythromycine les diamètres des zones d'inhibition sont observées entre 32,78 mm (à 0 ° C) et 32 mm (à 65 ° C); dans le cas de la Rifampicine les diamètres des zones d'inhibition sont observées entre 17,35 mm (à 0 ° C) et 45,59 mm (à 65 ° C); dans le cas de la Teicoplanine les diamètres des zones d'inhibition sont observées entre 0 mm (à 0 ° C) et 22,75 mm (à 65 ° C) et dans le cas de la

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Pénicilline les diamètres des zones d'inhibition sont observées entre 0 mm (à 0 ° C) et 74,1 mm (à 65 ° C); et malgré ces valeurs, ces résultats n'ont pas d'effet sur le profil de résistance (toujours résistant pour la majorité des antibiotiques). Ces résultats ont confirmé qu'une large gamme de températures pourrait également être utilisée pour les antibiogrammes au niveau des laboratoires médicaux.

4.- Résultats de l'antibiogramme

La sensibilité de *Staphylococcus aureus* HO90 vis-à-vis des treize antibiotiques utilisés est exprimée par la mesure de diamètre des zones d'inhibition autour de ces disques.

Les résultats de la sensibilité vis-à-vis les antibiotiques sont exprimés par le calcul de la moyenne du diamètre des zones d'inhibition et l'écart type entre les trois répliques, les résultats sont présentés dans les Figure 25, 27 et le Tableau 24.

Tableau 24. Résultats des antibiogrammes et écartype de chaque pH pour la souche testée *Staphylococcus aureus* HO90.

pH	RIF	TCY	GEN	PRI	FOX	TEC	AMK	OFX	NAN	CLI	SXT	ERY	PEN
6,0	43,5±0,5	33,5±0,5	30,5±0,5	35,0±1,0	28,0±0,0	31,5±0,5	29,5±0,5	33,0±1,0	24,5±0,5	43,5±13,5	40,5±0,5	45,0±1,0	40,5±0,1
6,5	45,0±1,0	37,0±1,0	35,0±1,0	42,0±2,0	26,0±1,0	35,5±1,5	31,0±1,0	35,5±0,5	25,5±0,5	45,0±1,0	42,5±1,5	43,5±1,5	42,5±0,5
7,0	43,0±1,0	38,5±0,5	31,5±0,5	35,0±1,0	28,5±1,5	29,5±1,5	30,5±0,5	39±1	24,5±0,5	43±1	39±1	43±1	41,5±0,5
7,5	39±1	35±1	33±1	40±0	34±4	30±2	34±4	40±0	27±2	39±1	37±1	38±2	35±1
8,0	40±0	34,5±0,5	36±0	41±1	27±0	29,5±0,5	33,5±0,5	40±0	25±0	44±0	39,5±0,5	41±1	34±0

RIF: Rifampicine (05 µg); TCY: Tétracycline(30 µg); GEN: Gentamicine (10 µg); PRI: Pristinamycine (15 µg); FOX: Céfoxitine (30 µg); TEC: Teicoplanine (30 µg); AMK: Amikacine (30

RESULTATS ET DISCUSSIONS

µg); OFX: Ofloxacine (5 µg); VAN: Vancomycine (30µg); CLI: Clindamycine (2 µg)
SXT:Triméthoprim+Sulfaméthoxazole (1,25/23,75 µg) ERY: Erythromycine (15 µg); PEN:
Péniciline (10 UI).

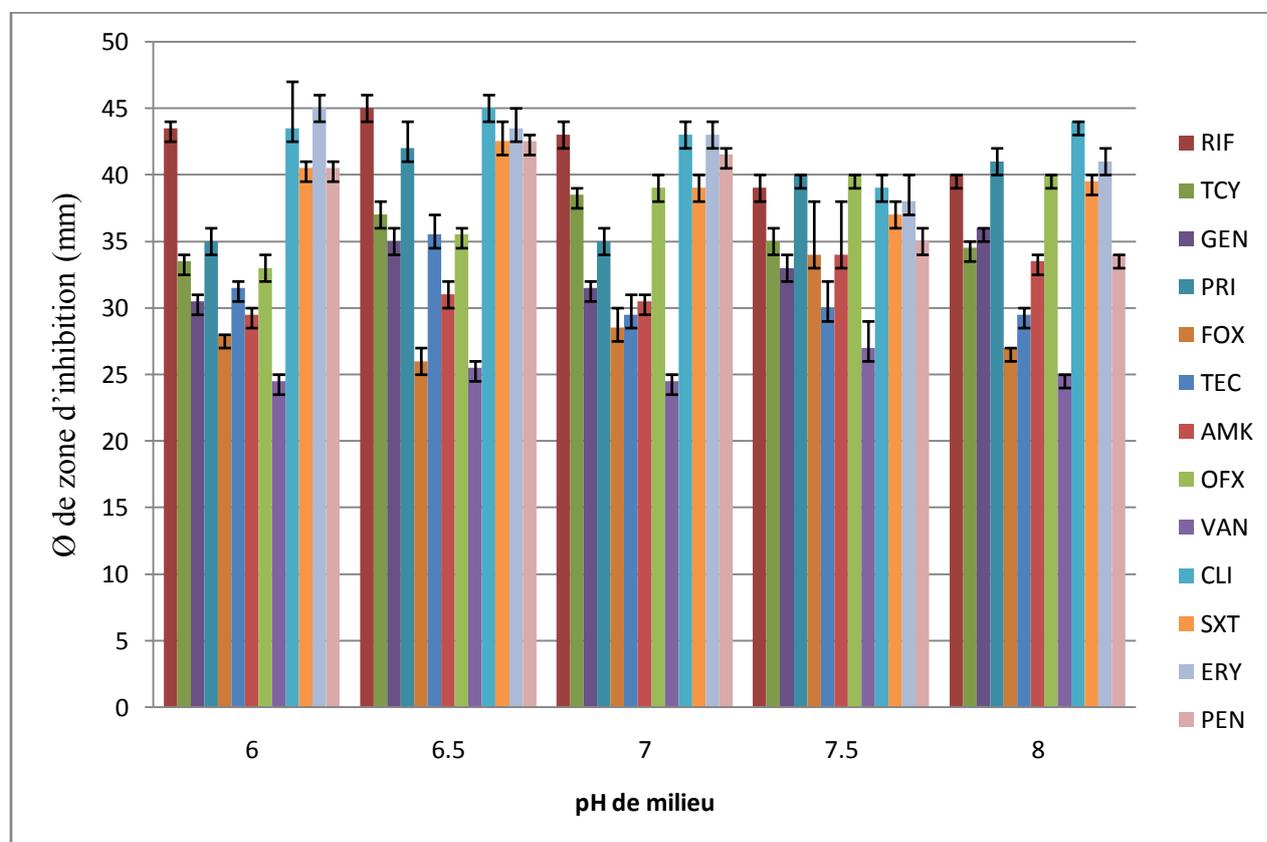


Figure 25. Variation de diamètre des zones d'inhibition en fonction de pH chez la souche *Staphylococcus aureus* HO90.

RIF: Rifampicine (05 µg); TCY: Tétracycline(30 µg); GEN: Gentamicine (10 µg); PRI: Pristinamycine (15 µg); FOX: Céfoxitine (30 µg); TEC: Teicoplanine (30 µg); AMK: Amikacine (30 µg); OFX: Ofloxacine (5 µg); VAN: Vancomycine (30µg); CLI: Clindamycine (2 µg)
SXT:Triméthoprim+Sulfaméthoxazole (1,25/23,75 µg) ERY: Erythromycine (15 µg); PEN: Péniciline (10 UI).

Les résultats illustrés dans le Tableau 19 et la figure 25, montre qu'à des valeurs différentes de différent pH (6, 6,5, 7,0, 7,5 et 8), la souche *Staphylococcus aureus* HO90 est très sensible à la RIF (la zone d'inhibition comprise entre 39 et 45 mm); TCY (la zone d'inhibition comprise entre 33,5 et 38,5 mm); GEN (la zone d'inhibition comprise entre 30,5 et 36 mm); PRI (la zone d'inhibition comprise entre 35 et 42 mm); FOX (la zone d'inhibition comprise entre 26 et 34 mm); TEC (la zone d'inhibition comprise entre 29,5 et 35 mm); AMK (la zone d'inhibition comprise entre 29,5 et 34 mm); OFX (la zone d'inhibition comprise entre

RESULTATS ET DISCUSSIONS

33 et 40 mm) VAN (la zone d'inhibition comprise entre 24,5 et 27 mm); CLI (la zone d'inhibition comprise entre 39 et 45 mm); SXT (la zone d'inhibition comprise entre 37 et 42,5 mm) et ERY (la zone d'inhibition comprise entre 38 et 45 mm) et PEN (la zone d'inhibition comprise entre 34 et 42,5 mm).

Les résultats obtenue indiquent que le diamètre des zones d'inhibition a diminué de 2,5 à 8,5 mm au maximum avec l'ensemble des antibiotiques utilisés. Ce résultat montre le rôle important de pH sur les diamètres des zones d'inhibition.

Selon ces résultats nous avons remarqué une différence significative entre la variation du pH et le diamètre de la zone d'inhibition (augmentation de la zone d'inhibition avec l'augmentation du pH pour quelque antibiotique, et une diminution de la zone d'inhibition avec l'augmentation du pH) donc on ne peut pas généraliser la règle sur tous l'effet des antibiotiques.



Figure 26. Résultats de l'antibiogramme pour *Staphylococcus aureus* HO90 (Photo original)

5.- Interprétations des antibiogrammes

Les mesures de diamètre des zones d'inhibitions sont comparées soigneusement aux valeurs critiques figurant dans les Tableaux 3, 4, 5 et 6 afin de les interpréter en plusieurs catégories de résistance (S, I ou R). Les résultats sont présentés dans le Tableau 25.

Tableau 25. Interprétations des antibiogrammes de chaque pH pour la souche *Staphylococcus aureus* HO90.

pH	RIF	TET	GEN	PRI	FOX	TEC	AMK	OF	VAN	CLI	TR+S	ERY	PEN
6,0	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S	S
6,5	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S	S

RESULTATS ET DISCUSSIONS

7,0	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S	S
7,5	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S	S
8,0	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S	S

RIF: Rifampicine (05 µg); TCY: Tétracycline(30 µg); GEN: Gentamicine (10 µg); PRI: Pristinamycine (15 µg); FOX: Céfoxitine (30 µg); TEC: Teicoplanine (30 µg); AMK: Amikacine (30 µg); OFX: Ofloxacine (5 µg); VAN: Vancomycine (30µg); CLI: Clindamycine (2 µg) SXT:Triméthopriime+Sulfaméthoxazole (1,25/23,75 µg) ERY: Erythromycine (15 µg); PEN: Pénicilline (10 UI).

S :Sensible.

Selon le Tableau 25, nous constatons que *Staphylococcus aureus* HO90 est sensible a tous les antibiotiques testés (Rifampicine, Tétracycline, Gentamicine, Pristinamycine, Céfoxitine, Teicoplanine, Amikacine, Ofloxacine, Vancomycine, Triméthopriime+Sulfaméthoxazole, Erythromycine, Clindamycine et Pénicilline.

Egalement, il ressort de ces résultats que l'interprétation d'antibiogramme reste la même pour les différentes valeurs de pH de milieu de culture, malgré que l'OMS et la SFM exigent le pH de milieu de culture d'incubation doit être entre 7,2 et 7,4 pour les souches bactériennes (dont le *Staphylococcus aureus*) pour la réalisation des antibiogrammes. Nous avons constaté que les résultats d'antibiogramme sont les même pour les valeurs de pH de 6, 6,5, 7, 7,5 et 8, et donc l'chèque thérapeutique n'est pas envisageable dans ces conditions.

6.- Analyse statistique

6.1.- Modélisation

Pour moduler la relation entre le pH et le diamètre de la zone d'inhibition, on établit un diagramme de corrélation, c'est à dire un diagramme croisant les modalités de pH et du diamètre de la zone d'inhibition. L'ensemble des valeurs forme un nuage de points dont la forme permet de caractériser la relation. Les résultats ont été présentés sous forme de courbe de tendance pour chaque antibiotique testé (Figure 27).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

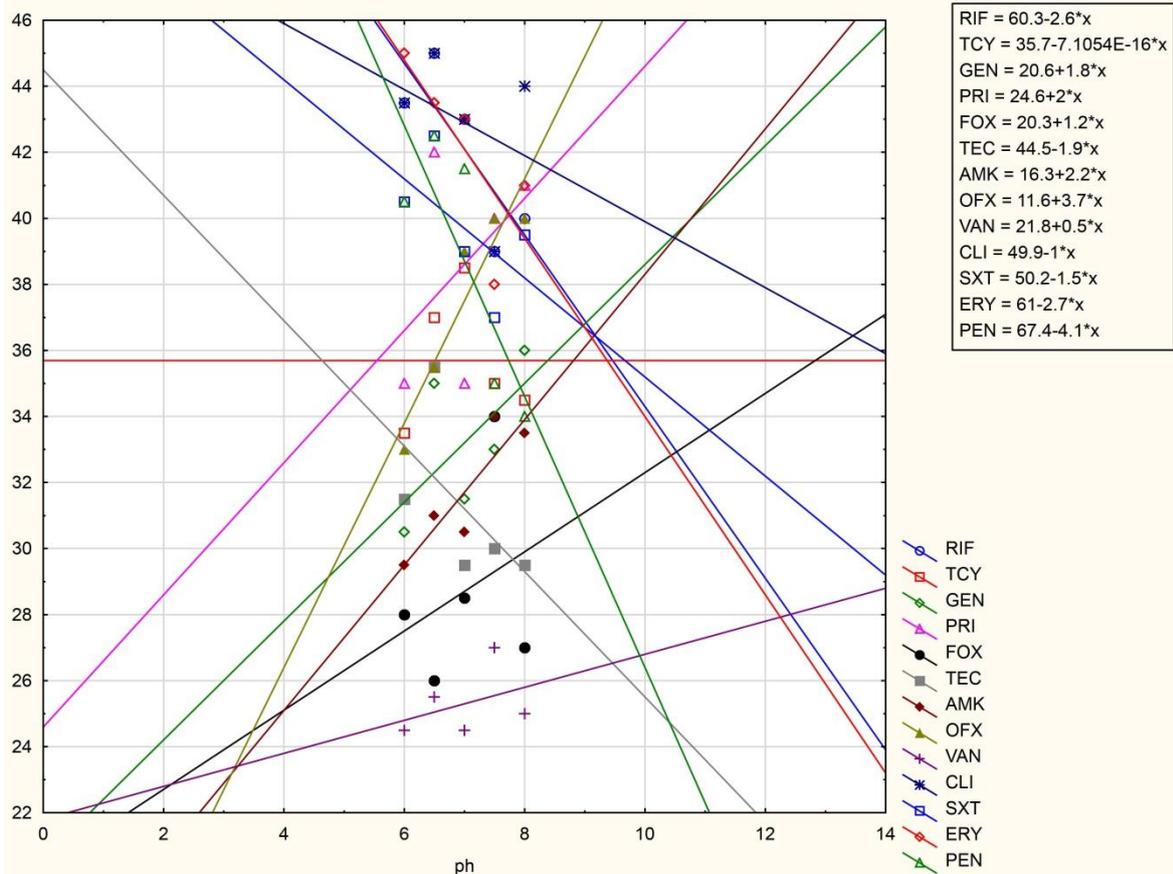


Figure 27. Courbes de tendance entre le diamètre de zone d'inhibition (mm) et le pH (comprise entre 0 et 14) pour la souche testée de *Staphylococcus aureus* HO90.

RIF: Rifampicine (05 µg); TCY: Tétracycline(30 µg); GEN: Gentamicine (10 µg); PRI: Pristinamycine (15 µg); FOX: Céfoxitine (30 µg); TEC: Teicoplanine (30 µg); AMK: Amikacine (30 µg); OFX: Ofloxacine (5 µg); VAN: Vancomycine (30µg); CLI: Clindamycine (2 µg) SXT:Triméthoprim+Sulfaméthoxazole (1,25/23,75 µg) ERY: Erythromycine (15 µg); PEN: Pénicilline (10 UI).

D'après les courbes présentées dans la Figure 27 nous avons constaté que le nuage de point peut s'ajuster correctement à une droite, c'est à dire que nous sommes en présence d'un modèle linéaires (type $Y = aX + b$) reliant le diamètre de la zone d'inhibition et le pH pour tous les antibiotiques utilisé (Rifampicine, Gentamicine, Pristinamycine, Céfoxitine, Teicoplanine, Amikacine, Ofloxacine, Vancomycine, Triméthoprim+Sulfaméthoxazole, Erythromycine, Clindamycine et Pénicilline). A l'exception de Tétracycline, nous avons remarqué que le nuage de point prend la forme d'une ligne dont les points s'écartent peu, donc il y a une forte relation linéaire entre les deux paramètres (le pH et le diamètre de la zone d'inhibition).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Il ressort de ces résultats aussi que cette linéarité est négative pour le Rifampicine, Teicoplanine, Triméthoprime+Sulfaméthoxazole, Erythromycine et Clindamycine et Pénicilline, c'est à dire que le diamètre de la zone d'inhibition varie en sens inverse avec le pH. En revanche, cette linéarité est positive pour le Gentamicine, Pristinamycine, Céfoxitine, Amikacine, Ofloxacine et Vancomycine, et donc le diamètre de la zone d'inhibition varie avec le pH de milieu.

Tableau 26. Interprétations des antibiogrammes selon le diamètre des zones d'inhibitions calculé en fonction de pH pour la souche de *Staphylococcus aureus* HO90.

pH	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
RIF	60,3	57,7	55,1	52,5	49,9	47,3	44,7	42,1	39,5	36,9	34,3	31,7	29,1	26,5	23,9
Interprétation	S														
TCY	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
Interprétation	S														
GEN	20,6	22,4	24,2	26	27,8	29,6	31,4	33,2	35	36,8	38,6	40,4	42,2	44	45,8
Interprétation	S														
PRI	24,6	26,6	28,6	30,6	32,6	34,6	36,6	38,6	40,6	42,6	44,6	46,6	48,6	50,6	52,6
Interprétation	S														
FOX	20,3	21,5	22,7	23,9	25,1	26,3	27,5	28,7	29,9	31,1	32,3	33,5	34,7	35,9	37,1
Interprétation	I	S													
TEC	44,5	42,6	40,7	38,8	36,9	35	33,1	31,2	29,3	27,4	25,5	23,6	21,7	19,8	17,9
Interprétation	S														
AMK	16,3	18,5	20,7	22,9	25,1	27,3	29,5	31,7	33,9	36,1	38,3	40,5	42,7	44,9	47,1
Interprétation	I	S													

RESULTATS ET DISCUSSIONS

OFX	63,4	59,7	56	52,3	48,6	44,9	41,2	37,5	33,8	30,1	26,4	22,7	19	15,3	11,6
Interprétation	S														
VAN	28,8	28,3	27,8	27,3	26,8	26,3	25,8	25,3	24,8	24,3	23,8	23,3	22,8	22,3	21,8
Interprétation	-														
CLI	35,9	36,9	37,9	38,9	39,9	40,9	41,9	42,9	43,9	44,9	45,9	46,9	47,9	48,9	49,9
Interprétation	S														
SXT	29,2	30,7	32,2	33,7	35,2	36,7	38,2	39,7	41,2	42,7	44,2	45,7	47,2	48,7	50,2
Interprétation	S														
ERY	23,2	25,9	28,6	31,3	34	36,7	39,4	42,1	44,8	47,5	50,2	52,9	55,6	58,3	61
Interprétation	S														
PEN	10	14,1	18,2	22,3	26,4	30,5	34,6	38,7	42,8	46,9	51	55,1	59,2	63,3	67,4
Interprétation	S							R							

RIF: Rifampicine (05 µg); TCY: Tétracycline(30 µg); GEN: Gentamicine (10 µg); PRI: Pristinamycine (15 µg); FOX: Céfoxitine (30 µg); TEC: Teicoplanine (30 µg); AMK: Amikacine (30 µg); OFX: Ofloxacine (5 µg); VAN: Vancomycine (30µg); CLI: Clindamycine (2 µg) SXT:Triméthoprim+Sulfaméthoxazole (1,25/23,75 µg) ERY: Erythromycine (15 µg); PEN: Péniciline (10 UI).

S :Sensible, R :Résistant.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

La figure 27 et le tableau 26 montre que les résultats ont indiqué que malgré l'augmentation de la fourchette de pH (de 0 à 14), aucun changement dans le diamètre des zones d'inhibition n'a été observé pour le Tétracycline. Dans le cas de la Triméthoprime+Sulfaméthoxazole les diamètres des zones d'inhibition sont observées entre 50,2 mm (à pH 0) et 29,2 mm (à pH 14); dans le cas de la Gentamicine les diamètres des zones d'inhibition sont observées entre 20,6 mm (à pH 0) et 45,8 mm (à pH 14); dans le cas de la clindamycine les diamètres des zones d'inhibition sont observées entre 49,9 mm (à pH 0) et 35,9 mm (à pH 14); dans le cas de la Céfoxitine les diamètres des zones d'inhibition sont observées entre 20,3 mm (à pH 0) et 37,1 mm (à pH 14); dans le cas de l'amikacine les diamètres des zones d'inhibition sont observées entre 16,3 mm (à pH 0) et 47,1 mm (à pH 14); dans le cas de la Ofloxacin les diamètres des zones d'inhibition sont observées entre 11,6 mm (à pH 0) et 63,4 mm (à pH 14); dans le cas de la Vancomycine les diamètres des zones d'inhibition sont observées entre 21,8 mm (à pH 0) et 28,8 mm (à pH 14); dans le cas de la Pristinamycine les diamètres des zones d'inhibition sont observées entre 24,6 mm (à pH 0) et 52,6 mm (à pH 14); dans le cas de la Erythromycine les diamètres des zones d'inhibition sont observées entre 61 mm (à pH 0) et 23,2 mm (à pH 14); dans le cas de la Rifampicine les diamètres des zones d'inhibition sont observées entre 60,3 mm (à pH 0) et 23,9 mm (à pH 14); dans le cas de la Teicoplanine les diamètres des zones d'inhibition sont observées entre 44,5 mm (à pH 0) et 17,9 mm (à pH 14) et dans le cas de la Pénicilline les diamètres des zones d'inhibition sont observées entre 67,4 mm (à pH 0) et 10 mm (à pH 14). Nous avons constaté que ces résultats n'ont pas d'effet sur le profil de résistance (sensible dans la majorité des antibiotiques). Ces résultats ont confirmé qu'une large gamme de pH pourrait également être utilisée pour les antibiogrammes au niveau des laboratoires médicaux et/ou au niveau des laboratoires de recherche.

CONCLUSION GÉNÉRALE

CONCLUSION

L'antibiogramme permet de déterminer la sensibilité des bactéries à croissances rapide vis-à-vis d'un panel d'antibiotique. Des disques imprégnés d'antibiotiques sont déposés à la surface d'un milieu de culture standardisé milieu de (Mueller-Hinton) préalablement ensemencé avec une dilution calibrée de la bactérie à tester.

La fiabilité de résultats d'un antibiogramme est influencée par de nombreux paramètres qui doivent être rigoureusement contrôlés. La standardisation est régie par des documents émanant de l'O.M.S et de divers comités nationaux. Parmi les principales recommandations on peut citer la température et le pH de milieu.

L'objectif essentiel de ce travail est de réaliser des antibiogrammes et de prédire la sensibilité de trois souches bactériennes vis-à-vis de plusieurs antibiotiques, à des températures et des pH de milieu différents.

Nous avons utilisé 3 souches bactériennes différentes Gram négative (deux souches) *Escherichia coli* HO25, et *Pseudomonas aeruginosa* HO80 Gram positive (une seule souche) *Staphylococcus aureus* HO 90 : et ces trois souches ont été choisies car elles ont une croissance rapide (moins de 24 heures) à 25-30-37 et 44 °C et sont fréquemment isolées des échantillons cliniques.

Le pH de milieu Mueller Hinton doit être de 7,2 à 7,4 mais dans notre étude nous avons préparé 5 milieux à pH différents (6 - 6,5 - 7 - 7,5 et 8) 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. Les boîtes à pH 6 - 6,5 - 7 - 7,5 et 8 sont incubées à l'étuve à 37°C en position inversée durant 24 h et d'autres boîtes à pH neutre 7 sont partagées dans 4 étuves à différentes températures (25 - 30 - 37 et 44 °C) durant 24 h (Parsaeimehr *et al.*, 2010) Par la suite, on a calculé les moyennes de diamètre des zones d'inhibition sur la base de trois répliques analytiques. Les analyses statistiques ont montré à différentes températures testées 25, 30, 37 et 44°C que :

Escherichia Coli HO25 est sensible aux FOS modérément sensible au CTX et GEN très résistant à CX et totalement résistant aux CEP, AMC, MP et COT.

Pseudomonas aeruginosa HO80 est très sensible aux antibiotiques FOS, IMP et ATM et moyennement sensible aux antibiotiques COL, PIP, GEN, TCC et CAZ et faiblement sensible à l'antibiotique RIF.

Staphylococcus aureus HO90 est très sensible aux antibiotiques RIF, TCY, GEN, PRI FOX, TEC, MK, OFX, SXT et ERY et moyennement sensible aux antibiotiques VAN, CLI GEN et PEN.

Sur la base d'analyses statistiques nous avons remarqué qu'il n'y avait pas de différence significative entre 30° et 37°C (test de Tukey) en conséquence le 37°C pourrait être

CONCLUSION GÉNÉRALE

remplacé par 30°C. Les valeurs des températures de 25 et 44°C ont montré l'effet le plus significatif.

Les analyses statistiques montrent qu'à différentes pH (6, 6,5, 7, 7,5 et 8), la souche d'*Escherichia coli* HO25 est très sensible à la FOS et moyennement sensible aux antibiotiques CTX et GEN et faiblement sensible à CX et COT et totalement résistante aux antibiotiques suivants : AMP, AMC, CEP.

Pseudomonas aeruginosa HO80 est très sensible aux antibiotiques FOS, IMP et ATM moyennement sensible à COL PIP GEN TCC et CAZ et faiblement sensible à la RIF.

Staphylococcus aureus HO90 est très sensible aux antibiotiques RIF, TCY, GEN, PRI, FOX, TEC, AMK, OFX, VAN, CLI, SXT, ERY et PEN.

Selon ces résultats nous avons remarqué une différence significative entre la variation du pH et le diamètre de la zone d'inhibition (augmentation de la zone d'inhibition avec l'augmentation du pH pour quelque antibiotique, et une diminution de la zone d'inhibition avec l'augmentation du pH) donc on ne peut pas généraliser la règle sur tous l'effet des antibiotiques.

Ensuite nous avons étudié le degré de significativité de la relation entre le pH de milieu et la température et la zone d'inhibition par le test Student, car celle-ci dépend de coefficient de corrélation et également du nombre d'observation. Les résultats ont montré que le coefficient de corrélation a une signification statistique pour tout l'antibiogramme réalisé.

Les résultats montrent une forte relation entre la zone d'inhibition et la température et le pH du milieu pour quelque antibiotique et pour d'autre antibiotique la zone d'inhibition varie en sens inverse avec la température et donc le diamètre de la zone d'inhibition varie avec la température et le pH de milieu avec et non changement de profile de résistance.

Ces résultats ont confirmé qu'une large gamme de températures et de pH pourrait également être utilisée pour les antibiogrammes au niveau des laboratoires médicaux et les laboratoires de recherche.

Il est à noter aussi que l'antibiogramme est influencé par plusieurs facteurs. Il serait intéressant d'étudier plus profondément l'antibiogramme dans les travaux futures pour avoir une vision claire et un résultat fiable pour une meilleure gestion des soins sans avoir créer une résistance aux antibiotiques chez les bactéries et maître la santé personnel et publique en danger.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1.- **Anonyme 1**: https://www.passeportsante.net/fr/Maux/examens-medicaux_operations/Fiche.aspx?doc=examen-antibiogramme
- 2.- **Anonyme 2**: <http://www.microbes-edu.org/etudiant/antibio2.html>
- 3.- **Archambaud M.**, 2009. Laboratoire Bactériologie-Hygiène .CHU Rangueil Toulouse. P 23, 24, 33,34.
- 4.- **Barrett D., Tanaka A., Harada K., Ohki H., Watabe E., Maki K. and Ikeda F.** (2001). - Synthesis and biological activity of novel macrocyclic antifungals: Acylated conjugates of the ornithine moiety of the lipopeptidolactone FR 901469. *Bioorg. Med. Chem.Lett.*, 11, 479-482.
- 5.- **Berdy J., Aszalos A. and Mc Nitt K.L.** (1987). - CRC Handbook of Antibiotic Compounds. Vol XIII. Microbial metabolites. Parts 1, 2, 3. Florida, USA. CRC Press. Boca Raton.
- 6.- **Berdy J.** (2005) Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot.* 58 :1-26.
- 7.- **Bergeron N.**, 2009. Caractérisation phénotypique d'isolats de *Salmonella* Typhimurium provenant de porcs sains ou septicémiques. Thèse de Microbiologie, soutenue en avril 2009. Pp 263.
- 8.- **Betina V.** (1983). - The chemistry and biology of antibiotics. Nanta W.T. and Rekker R.F. (Eds.). Elsevier, Amsterdam. pp. 493-526.
- 9.- **Boyadjiev I., Garnier F. et Martin C.** (2011). Sepsis grave et choc septique : Deuxième édition
- 10.- **Breton A., Theilleux J., Sanglier J. J. and Vobi G.** (1989). - Organismes producteurs: biologie, taxonomie et écologie. *In*: Biotechnologie des antibiotiques. Larpent J. P. et Sanglier J. J. (Eds.). Paris, Masson. pp. 33-70.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- 11.- **Carpenter C F and Chambers H F** (2004). Daptomycin: another novel agent for treating infections due to drug-resistant gram-positive pathogens. *Clinical Infectious Diseases*, 38, 994-1000.
- 12.- **Cattoir V.** (2004).-Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathologie Biologie.*,52, 607–616.
- 13.-**Cloekaert A., Praud K., Lefevre M, Doublet B, Pardos M, Granier SA, Brisabois A, Weill F.X.** (2010).Antimicrob Agents Chemother., 54, 4484-4486.
- 14.- **CPMP December** 1997. The Committee for Proprietary Medicinal Products held its 33rd plenary meeting on 16-17 December 1997.
- 15.- **Laskin A.I. and Lechevalier, H.** (1984). - Handbook of Microbiology. Vol. 3, CRC Press.
- 16.- **LAURENT. F** ,2009.Principales β -lactamines : Pénicillines G, A, M, inhibiteurs de β - lactamases, Uréidopénicillines, Carboxypénicillines C1G, C2G, C3G, Monobactames Carbapénèmes. Groupement Hospitalier Nord Lyon. P 8.
- 17.- **Lazzarini A., Cavaletti L., Toppo G. and Marinelli F.** (2000). - Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78, 399-405.
- 18.- **Leclerc H., Gaillard J.-L et Simonet M.,** 1995. Microbiologie Générale: La bactérie et le monde bactérien. Nouv. Ed.- Paris : Ed. Doin.-535p.
- 19.- **Lozniewski A., Rabaud C.** 2010. Résistance bactérienne aux antibiotiques. Fiche conseil pour la prevention du risqué infectieux. Centre de Coordination de lute contre les infections Nosocomiales-Sud Est
- 20.- **Madigan M. T et Martinko J.M.** (2007) Biologie des microorganismes. *Pearson Education France*, 11e edition : 331-423, 686-718.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- 21.-**Madigan.M et Martinko. J** ,2007. Biologie de Micro-organismes. Université Carbondale de l'Illinois du sud .11e édition. P 702,705, 711,860, 862.
- 22.-**Marinelli F.** (2009) Antibiotics and *Streptomyces*: the futur and antibiotic discovery. *Microbiology today*. 2: 20-23.
- 23.-**Mouton.Y, Bingen.E, Deboxker.Y et Dubreuil.L**, 2000. Antiviraux Anti-infectieux. Éditions John Libbey Eurotext. Paris.P116.
- 24.-**OMS.**, 2005, Salmonelles multirésistantes [Ressource électronique]. Disponible [http : //www.who.int/mediacentrefactsheets/fs139/fr](http://www.who.int/mediacentrefactsheets/fs139/fr).
- 25.-**Paterson DL., Bonomo R.** β -lactamase à spectre étendu a clinical update. *Clin microbiol rev.* 2005 ;18 :657-86.
- 26.- **Prescott L M, Harley J P and Klein D A** (2003). La chimiothérapie antimicrobienne. *In: Microbiologie*, 2ème édition (Bruxelles), pp: 806-811.
- 27.- **Prescott, Harley et Klein**, (2007) .*Microbiologie* .2e édition française. P 806, 807,813, 819.
- 28.- **Rice LB.**, 2009. *Cuff Opin Microbiol.*, 12, 476-481.
- 29.-**Rychembusch. V** (2003). Les antibiotiques sont de précieux alliés à préserver *Revue : Réussir Lait Élevage / Réussir Bovins Viande : dossier spécial médicament vétérinaire* Décembre 2003.
- 30.- **Saisivam S., Bhikshapathi D. V. R. N., Krishnaveni J., Kishan V.** (2008). Isolation of borrelidin from *Streptomyces californicus* – an India soil isolate. *Int J Biotechnol* 7, 349–355
- 31.- **Singh LS., Baruah I., Bora TC.** (2006). Actinomycetes of Loktak habitat: isolation and screening for antimicrobial activities. *Biotechnology*, 5:217–221.
- 32.- **Sirot D.** Extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamases.*J.Antimicrob. Chemother.*1995 ;36 :19-34.
- 33.- **Solecka J., Zajko J., Postek M. and Rajnisz A.** (2012). Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. *Cent Eur J Biol.*, 7:373–390.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- 33.- **Smaoui S.** 2010. Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat en Génie de Procédés et Environnement. Université de Toulouse. France. 251p.
- 34.- **Storm D R, Rosenthal KS and Swanson P E** (1977). Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annual Review of Biochemistry*, 46, 723-763.
- 35.- **Summers A. O.** 2006. Genetic linkage and horizontal gene transfer, the roots of the antibiotics multi resistance problem. *Animal Biotechnology*. 17: 125-135.
- 36.- **Talbert.M, Willoquet.G et Gervais.R** ,2009. Pharmacologie clinique, Wolters Kluwer France. P 641, 648,655
- 37.- **Tall F.** 2004. Viande de poulets : les Salmonelles, ces ennemies digestives. *SENELEVAGE*, (4) : 7.
- 38.-**Tenover, F.C.** (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119, S3-S10.
- 39.-**Tiwari K., Gupta RK.** (2011). Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel Antibiotics. *Crit Rev Biotechnol.*, 32:108–132.
- 40.-**Tortora G.J., Funke B.R. et Case C.L.** (2003). Introduction à la microbiologie. Edition de Renouveau pédagogique, Québec: 602-632.
- 41.- **Van Leeuwen W.J., Voogd C.E., Guinee P.A.M. et Manten A.,** 1982. Incidence of resistance to ampicilline, chloramphenicol kanamycine, tetracycline and trimethoprime of *Salmonella* strains isolated in the Netherlands during 1975-1980. *Ant. Van Leeuwenhock*, 48, 86-89.
- 42.- **Vandamme E.J.** (1985). – Biotechnology of industrial antibiotics. *Drugs and pharmaceutical sciences*. Vol. 22. Marcel Dekker. New York, p. 808.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- 43.- **Von Daehne W., Jahnsen S., Kirl I., Larsen R. and Iorch H.** (1984). - Fusidic acid: properties, biosynthesis and fermentation. *In: Biotechnology and industrial antibiotics.* Vandamme E.j. (Eds.). Marcel Dekker. New-york, Based. pp. 427-450.
- 44.- **Watve M.G., Tickoo R., Jog M.M. and Bhole B.D.** (2001). - How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch. Microbiol.*, 176, 386-390.
- 45.- **Wright G. D.** 2007. The antibiotic resistance: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Rev.Microbial.* 5: 175-186.
- 46.- **Yala D., Merad A.S., Mohamedi D. et Ouar Korich M.N.** (2001). - Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, 91, 5-12.
- 47.- **Yoshida M., Matsubara K., Kudo T., Horikoshi K.** (1991). *Actinopolyspora mortivallis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete. *Int J Syst Bacteriol.*, 41:15–20.
- 48.- **Sharma, R., Sharma, C.L., Kapoor, B.** (2005). Antibacterial resistance: current problems and possible solutions. *Indian J Med Sci* 59, 120-129.
- 49- **Villat D.**, 2001. *Maladie des volailles.*- 2e Ed.- Paris : Ed. France Agriculture.-399p.

ANNEXES

Tableau 1. Diamètres et écartype de la zone d'inhibition des antibiogrammes de chaque température pour *Escherichia coli* HO25.

T(C°)	AMP	AMC	CEP	CX	CTX	GEN	FOS	COT
25	0	0	0	0	18	19	37	0
25	0	0	0	0	19	19	37	0
25	0	0	0	0	18.5	19	37	0
25	0	0	0	0	0.5	0	0	0
30	0	0	0	0	15	13	37	0
30	0	0	0	0	14	12	37	0
30	0	0	0	0	14.5	12.5	37	0
30	0	0	0	0	0.5	0.5	0	0
37	0	0	0	0	12	11	39	0
37	0	0	0	0	13	12	38	0
37	0	0	0	0	12.5	11.5	38.5	0
37	0	0	0	0	0.5	0.5	0.5	0
44	0	0	0	8	19	15	42	0
44	0	0	0	12	18	18	44	0
44	0	0	0	10	18.5	16.5	43	0
44	0	0	0	2	0.5	1.5	1	0

Tableau 2. Diamètres et écartype de la zone d'inhibition des antibiogrammes de chaque pH pour *Escherichia coli* HO25.

	AMP	AMC	CEP	CX	CTX	GEN	FOS	COT
6	0	0	0	7	17	7	40	0
6	0	0	0	7	20	8	38	0
6	0	0	0	7	18.5	7.5	39	0
6	0	0	0	0	1.5	0.5	1	0
6.5	0	0	0	7	17	10	36	8
6.5	0	0	0	7	16	8	33	7
6.5	0	0	0	7	16.5	9	34.5	7.5
6.5	0	0	0	0	0.5	1	1.5	0.5
7	0	0	0	0	13	13	34	0
7	0	0	0	0	10	13	32	0
7	0	0	0	0	11.5	13	33	0
7	0	0	0	0	1.5	0	1	0
7.5	0	0	0	6	15	12	32	0
7.5	0	0	0	7	15	12	32	0
7.5	0	0	0	6.5	15	12	32	0
7.5	0	0	0	0.5	0	0	0	0
8	0	0	0	7	17	11	32	0
8	0	0	0	8	17	12	30	0
8	0	0	0	7.5	17	11.5	31	0
8	0	0	0	0.5	0	0.5	1	0

Tableau 3. Diamètres et écartype de la zone d'inhibition des antibiogrammes de chaque température pour *Pseudomonas aeruginosa* HO80.

T(C°)	IPM	COL	PIP	FOS	GEN	ATM	TCC	RIF	CAZ
25	40	24	25	46	27	32	21	10	24
25	36	23	24	44	26	35	20	10	22
25	38	23.5	24.5	45	26.5	33.5	20.5	10	23
25	2	0.5	0.5	1	0.5	1.5	0.5	0	1
30	36	20	24	42	24	32	22	10	21
30	32	21	26	42	24	32	22	10	22
30	34	20.5	25	42	24	32	22	10	21.5
30	2	0.5	1	0	0	0	0	0	0.5
37	36	20	26	44	26	34	26	10	22
37	36	21	26	44	26	34	24	10	21
37	36	20.5	26	44	26	34	25	10	21.5
37	0	0.5	0	0	0	0	1	0	0.5
44	45	24	36	46	32	42	34	12	26
44	44	22	32	42	32	44	42	14	30
44	44.5	23	34	44	32	43	38	13	28
44	0.5	1	2	2	0	1	4	1	2

Tableau 4. Diamètres et écartype de la zone d'inhibition des antibiogrammes de chaque pH pour *Pseudomonas aeruginosa* HO80.

pH	IPM	COL	PIP	FOS	GEN	ATM	TCC	RIF	CAZ
6	32	17	26	36	18	36	28	7	22
6	31	17	24	38	19	36	32	7	23
6	31.5	17	25	37	18.5	36	30	7	22.5
6	0.5	0	1	1	0.5	0	2	0	0.5
6.5	33	17	28	37	20	34	28	7	21
6.5	31	17	20	37	18	36	26	6	18
6.5	32	17	24	37	19	35	27	6.5	19.5
6.5	1	0	4	0	1	1	1	0.5	1.5
7	38	19	9	36	24	34	16	8	15
7	40	18	9	32	24	35	16	6	14
7	39	18.5	9	34	24	34.5	16	7	14.5
7	1	0.5	0	2	0	0.5	0	1	0.5
7.5	34	20	17	39	26	32	18	6	16
7.5	34	21	18	42	25	32	22	6	17
7.5	34	20.5	17.5	40.5	25.5	32	20	6	16.5
7.5	0	0.5	0.5	1.5	0.5	0	2	0	0.5
8	35	20	27	40	25	32	24	7	24
8	35	20	26	38	25	32	23	7	21
8	35	20	26.5	39	25	32	23.5	7	22.5
8	0	0	0.5	1	0	0	0.5	0	1.5

Tableau 5. Diamètres et écartype de la zone d'inhibition des antibiogrammes de chaque température pour *Staphylococcus aureus* HO90.

T(C°)	RIF	TCY	GEN	PRI	FOX	TEC	AMK	OFX	VAN	CLI	SXT	ERY	PEN
25	24	34	29	32	24	23	31	40	19	15	30	32	18
25	23	34	31	30	20	23	32	39	19	17	32	32	18
25	23.5	34	30	31	22	23	31.5	39.5	19	16	31	32	18
25	0.5	0	1	1	2	0	0.5	0.5	0	1	1	0	0
30	34	32	27	30	23	20	27	38	22	20	28	31	18
30	40	30	30	34	23	20	30	42	24	20	30	36	20
30	37	31	28.5	32	23	20	28.5	40	23	20	29	33.5	19
30	3	1	1.5	2	0	0	1.5	2	1	0	1	2.5	1
37	32	30	25	32	22	22	26	35	22	26	34	33	20
37	34	24	25	26	25	24	30	42	23	30	29	30	22
37	33	27	25	29	23.5	23	28	38.5	22.5	28	31.5	31.5	21
37	1	3	0	3	1.5	1	2	3.5	0.5	2	2.5	1.5	1
44	34	28	27	30	29	28	27	34	22	36	30	32	42
44	36	28	29	34	32	30	30	34	24	34	28	33	40
44	35	28	28	32	30.5	29	28.5	34	23	35	29	32.5	41
44	1	0	1	2	1.5	1	1.5	0	1	1	1	0.5	1

Tableau 6. Diamètres et écartype de la zone d'inhibition des antibiogrammes de chaque pH pour *Staphylococcus aureus* HO90.

pH	RIF	TCY	GEN	PRI	FOX	TEC	AMK	OFX	VAN	CLI	SXT	ERY	PEN
6	43	33	31	36	28	31	30	34	24	47	41	44	41
6	44	34	30	34	28	32	29	32	25	40	40	46	40
6	43.5	33.5	30.5	35	28	31.5	29.5	33	24.5	43.5	40.5	45	40.5
6	0.5	0.5	0.5	1	0	0.5	0.5	1	0.5	3.5	0.5	1	0.5
6.5	46	38	34	40	25	34	32	35	25	46	44	45	42
6.5	44	36	36	44	27	37	30	36	26	44	41	42	43
6.5	45	37	35	42	26	35.5	31	35.5	25.5	45	42.5	43.5	42.5
6.5	1	1	1	2	1	1.5	1	0.5	0.5	1	1.5	1.5	0.5
7	42	38	31	36	30	28	31	38	25	42	40	42	41
7	44	39	32	34	27	31	30	40	24	44	38	44	42
7	43	38.5	31.5	35	28.5	29.5	30.5	39	24.5	43	39	43	41.5
7	1	0.5	0.5	1	1.5	1.5	0.5	1	0.5	1	1	1	0.5
7.5	40	36	32	40	30	28	30	40	29	40	38	40	34
7.5	38	34	34	40	38	32	38	40	25	38	36	36	36
7.5	39	35	33	40	34	30	34	40	27	39	37	38	35
7.5	1	1	1	0	4	2	4	0	2	1	1	2	1
8	40	34	36	42	27	29	33	40	25	44	39	42	34
8	40	35	36	40	27	30	34	40	25	44	40	40	34
8	40	34.5	36	41	27	29.5	33.5	40	25	44	39.5	41	34
8	0	0.5	0	1	0	0.5	0.5	0	0	0	0.5	1	0

AMP: Ampicillin (10 µg); AMC: Amoxicillin + clavulanic acid (30 µg); CEP : Cephalothin (30 µg); CX : Cefoxitin (30 µg); CTX : Cefotaxime (30 µg); GEN: Gentamicin (10 µg); FOS: Fosfomycin (200 µg); COT: Co-Trimoxazole: Trimethoprim/sulfamethoxazole (25 µg).

IMP: Imipénème (10 µg); COL: Colistine (30 µg); PIP: Pipéracilline (100 µg); FOS: Fosfomycine (200 µg); GEN: Gentamicine (10 µg); ATM: Aztréonam (30 µg); TCC: Ticracilline + acide clavulanique (75/10 µg); RIF: Rifampicine (5 µg); CAZ: Ceftazidime (30µg).

RIF: Rifampicine (05 µg); TCY: Tétracycline(30 µg); GEN: Gentamicine (10 µg); PRI: Pristinamycine (15 µg); FOX: Céfoxitine (30 µg); TEC: Teicoplanine (30 µg); AMK: Amikacine (30 µg); OFX: Ofloxacine (5 µg); VAN: Vancomycine (30µg); CLI: Clindamycine (2 µg) SXT:Triméthoprime+Sulfaméthoxazole (1,25/23,75 µg) ERY: Erythromycine (15 µg); PEN: Péniciline (10 UI).