



**UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH**  
**FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES**  
**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**

**Projet de Fin d'Etudes**

**Licence Sciences & Techniques**  
**Sciences Biologiques Appliquées et Santé**  
**(LST - SBAS)**

**Techniques d'antibiogrammes par la méthode de  
diffusion en milieu gélosé**

**Présenté par : Mlle KHOUKH Maroua**

**Encadré par : Pr .IRAQUI HOUSSAINI Mohammed (FST Fès)**

**Pr. OUMOKHTAR Bouchra (FMPF)**

**Soutenu le : 11 juin 2019**

**Devant le jury composé de :**

- **Pr. Tazi Abdelali**
- **Pr.Iraqi Mohammed**
- **Pr.Oumokhtar Bouchra**

**Stage effectué à : Faculté de médecine et de pharmacie –Fès**

**Année universitaire 2018-2019**

# Remerciements

Mes premiers mots de remerciements seront à l'égard de Dieu, Le Tout Puissant ,le Tout Miséricordieux, , qui m'a donné la capacité d'achever ce travail et qui m'a aidé à dépasser toutes les difficultés que j'ai rencontrées.

Je lui demande de guider mes pas dans le chemin qui méritera son approbation.

J' adresse ma reconnaissance à Madame le professeur Bouchra OUMOKHTAR, de m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Microbiologie à la Faculté de Médecine et de pharmacie de Fès afin d'effectuer mon stage de fin d'études, pour son encouragement, ses conseils et son énorme soutien durant cette période.

Je tiens particulièrement à remercier mon encadrant de mémoire Pr. IRAQUI Mohammed, professeur à la faculté des sciences et techniques de Fès, qui a accepté favorablement de m'encadrer pendant ce stage, pour sa disponibilité, ses conseils et son aide si précieux. Je lui exprime mes sincères gratitude et mon profond respect.

J'exprime également mes gratitude à Professeur Tazi Abdelali Membre du jury dont sa présence constitue pour moi un grand honneur, pour avoir accepté de juger et d'évaluer ce Travail.

Je remercie le Professeur A. Tazi Chef du département de la Biologie à la FSTF et le Professeur S.Haloti coordonnateur de la filière SBAS pour leurs aides.

Je tiens aussi à remercier et à témoigner toute ma reconnaissance au personnel du laboratoire, Salma et Kawtar, ayant contribué à la réussite de cet humble projet de fin d'études dans les meilleures conditions.

Merci



# *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A la mémoire de ma mère, Qu'elle puisse reposer en paix.*

*A mon cher et précieux père, le symbole du courage, de la responsabilité et de l'amour ... Les mots ne suffisent pas pour exprimer toute l'affection que*

*j'éprouve pour toi. Que Dieu te garde, te comble de santé, et te donne longue vie.*

*A mes sœurs et mon frère qui m'ont toujours encouragés et Soutenu.*

*Que le grand Dieu vous offre un avenir plein de réussite et de bonheur.*

*A mes tantes qui m'ont soutenu tout au long de ces nombreuses années. Merci pour votre confiance en moi, votre encouragements et votre amour, que Dieu vous garde.*

*A mes chères amies à qui j'exprime mes plus profonds sentiments d'amour.*

*A tous mes professeurs pour leur sérosité et le partage de leur savoir.*

*Je remercie également toutes les personnes que je n'ai pas citées, qui ont contribué de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.*

# Sommaire :

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Cadre de stage :

- Présentation du lieu de stage .....1
- Techniques maîtrisées durant ce stage.....2

Applications pratiques.....11

- Techniques d'antibiogrammes par la méthode de diffusion en milieu gélosé

INTRODUCTION .....12

## CHAPITRE 1: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>I.</b>	<b>LES ANTIBIOTIQUES.....</b>	<b>14</b>
	1. Définition et origine des antibiotiques .....	14
	2. Classification des familles d'antibiotiques .....	14
	3. Cibles et Modes d'actions des antibiotiques .....	16
<b>II.</b>	<b>LA RESISTANCE BACTERIENNE .....</b>	<b>18</b>
	1. Définition .....	18
	2. Types de résistances .....	18
	2.1. Résistance naturelle .....	18
	2.2. Résistance acquise aux antibiotiques .....	19
	a. Résistance par mutation chromosomique .....	19
	b. Résistance extra-chromosomique ou plasmatique .....	19
<b>III.</b>	<b>L'ANTIBIOGRAMME .....</b>	<b>20</b>
	1. Définition .....	20
	2. Techniques d'antibiogramme .....	20
	a. CMI par la méthode de diffusion en milieu gélosé .....	20
	b. CMI en milieu liquide ou microdilution .....	21
	c. CMI par diffusion en gradient ou méthode ETEST® .....	22
	3. Erreurs fréquentes et contrôle de qualité .....	23
	4. Limites de l'antibiogramme .....	23
	5. Staphylocoques et bêta-lactamines .....	25

6. Entérobactéries et bêta-lactamines .....	26
---	----

## **CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES**

I. Techniques d'antibiogrammes par la méthode de diffusion en milieu gélosé.....	29
1. Milieu MH.....	29
2. Préparation de culture fraîche .....	29
3. Réalisation de l'inoculum.....	30
4. Ensemencement .....	30
5. Dépôt des disques .....	30
6. Lecture d'antibiogramme .....	31
II. Réalisation de l'antibiogramme pour les Entérobactéries et les Staphylocoques....	32
1. Les Entérobactéries .....	32
2. Les Staphylocoques.....	33

## **CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION**

I. Pour les Entérobactéries : Recherche des BLSE .....	35
II. Pour les Staphylocoques : Résistance à la méticilline .....	36

<b>CONCLUSION .....</b>	<b>38</b>
-------------------------	-----------

<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>39</b>
---	-----------

Liste des tableaux:

<b>Tableau 1 :</b> Classification des différentes familles d'antibiotiques.....	<b>16</b>
<b>Tableau 2 :</b> Paramètres affectant l'interprétation de l'antibiogramme.....	<b>25</b>
<b>Tableau 3 :</b> Les antibiotiques spécifiques à <i>E. coli</i> .....	<b>32</b>
<b>Tableau 4 :</b> Les antibiotiques spécifiques à <i>staphylococcus aureus</i> .....	<b>33</b>
<b>Tableau 5 :</b> Les antibiotiques testés sur <i>E. coli</i> .....	<b>35</b>
<b>Tableau 6 :</b> Les antibiotiques testés sur <i>Staphylococcus aureus</i> .....	<b>37</b>

## Liste des Figures :

<b>Figure 1</b> : Résultat de test oxydase.....	7
<b>Figure 2</b> : Résultat de test catalase.....	9
<b>Figure 3</b> : Galerie API 20 <sup>E</sup> .....	9
<b>Figure 4</b> : Exemple d'antibiogramme réalisé.....	10
<b>Figure 5</b> : Les différents mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	18
<b>Figure 6</b> : Droite de concordance entre les valeurs de diamètre d'inhibition en milieu gélosé et les valeurs de CMI par une méthode appropriée.....	21
<b>Figure 7</b> : Détermination de la CMI par dilution en milieu liquide: macro-méthode en tube.....	21
<b>Figure 8</b> : Micro-méthode en plaque de microtitration (jaune : croissance+, rouge : absence de croissance).....	22
<b>Figure 9</b> : Détermination de la CMI par la méthode ETEST <sup>®</sup> .....	22
<b>Figure 10</b> : Réalisation de l'inoculum.....	30
<b>Figure 11</b> : Ensemencement de l'inoculum par écouvillonnage.....	30
<b>Figure 12</b> : Dépôt des disques d'antibiotiques sur milieu gélosé.....	31
<b>Figure 13</b> : Classification selon les diamètres d'inhibition.....	31
<b>Figure 14</b> : Schéma représentant un antibiogramme.....	31
<b>Figure 15</b> : La disposition de quelques Antibiotiques spécifiques à <i>E. coli</i> .....	33
<b>Figure 16</b> : Test de synergie des E.BLSE.....	33
<b>Figure 17</b> : Antibiogramme réalisé pour <i>Escherichia coli</i> .....	35
<b>Figure 18</b> : Antibiogramme réalisé pour <i>staphylococcus aureus</i> .....	36

## Liste des Abréviations:

**ATB** : Antibiotique.

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ARN** : Acide ribonucléique

**ATP** : Adénosine-Triphosphate

**BHI** : milieu Bouillon cœur-cervelle

**BLSE** : Beta-Lactamase à Spectre Élargi

**BMR** : bactérie multi résistante

**CMI** : concentration minimale d'inhibition

**CMA** : concentration minimale active

**CI** : concentration inhibitrice

**CA-SFM** : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

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

**EMB** : gélose éosine bleu de méthylène

**E. coli** : Escherichia coli

**KH** : Kligler-Hajna

**LPS** : lipopolysaccharides

**MH** : milieu Mueller-Hinton

**MRVP** : METHYL RED-VOGES PROSKAUER

**MLS<sub>B</sub>** : Macrolide-lincosamide-streptogramin B

**MDR** : multidrug resistance

**MFS** : Major Facilitator Superfamily

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé.

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**pH** : potentiel en Hydrogène

**PLP** : Protéines Liant la Pénicilline

**S.A** : staphylocoque aureus

**SARM** : Staphylocoque aureus résistant à la méticilline

**TSA** : Trypto-caséine soja



# Cadre de stage

---

## Présentation du lieu de stage

Mon stage de fin d'étude en licence Sciences biologique appliquées et santé été réalisé au sein du laboratoire de microbiologie, l'un des 8 laboratoires de recherches de la Faculté de Médecine et Pharmacie de Fès.

## I. Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire

Le laboratoire de « **Microbiologie et Biologie Moléculaire** » fait partie du Laboratoire de recherche en « **Pathologie Humaine, Biomédecine et Environnement** »

## II. Structure du Laboratoire de Recherche Biologique

Les différentes équipes dont se compose le laboratoire de **Laboratoire Pathologie Humaine, Biomédecine et Environnement** :

- Anatomie Pathologique
- Microorganismes et Facteur oncogènes
- Physiopathologie et Nutrition
- Génomique et Santé
- Maladie de l'appareil digestif
- Les éléments traces Métalliques



## III. Équipement du Laboratoire

Le laboratoire est équipé d'un appareillage de pointes qui permet de réaliser :

- L'identification des bactéries par des tests d'identifications Biochimiques ou par les galeries API.
- L'antibiogramme.
- Extraction d'ADN.
- PCR.

## Techniques maîtrisées durant ce stage

Encadré par Pr. Oumokhtar Bouchra, chef du laboratoire de microbiologie, j'ai pu manipuler et maîtriser les différentes techniques du laboratoire.

Parmi les différentes compétences que j'ai acquises durant ces deux mois de stage je peux citer :

### I. Protocole de préparation et stérilisation des milieux de culture

-Pour permettre le développement des micro-organismes, les milieux de culture doivent réunir certaines qualités:

- Contenir en quantité suffisante tous les aliments et l'eau exigés par leur croissance et leur entretien.
- Respecter les conditions environnementales du germe étudié à savoir:
  - ✓ Leur besoin en oxygène ;
  - ✓ Un pH convenable;
  - ✓ Une température optimale de croissance;
  - ✓ Un potentiel redox et une pression osmotique convenables
- Fournir les conditions nécessaires à la croissance de certains germes exigeants (les facteurs de croissance, une atmosphère enrichie en gaz carbonique...).

-Dès la réception du milieu de culture :

- ✓ Consigner le milieu avec la date de réception.
- ✓ Conserver le milieu en suivant les recommandations données sur l'étiquette.

-Lors de la première ouverture du produit :

- ✓ Vérifier la date de péremption.
- ✓ Noter la date d'ouverture du produit.

- Pour préparer un milieu de culture il faut respecter le protocole suivant :

#### ❖ Dissolution :

1 - Peser la quantité appropriée de milieu en prenant soin de mettre en place les équipements de protection individuelle indiqués dans les fiches de données de sécurité.

2- Dans un flacon, ajouter un peu d'eau distillée puis la quantité de milieu pesée.

3- Ajouter progressivement le volume d'eau distillée nécessaire à la reconstitution (indiquée sur l'étiquette et la fiche technique de la boîte de chaque milieu).

4- Agiter lentement la solution préparée pour solubiliser les composants et répartir la gélose de façon homogène.

5- Porter à ébullition la solution dans un bain marie.

❖ Stérilisation :

- Il est nécessaire de stériliser les milieux de culture préparés avant leur utilisation, pour obtenir après ensemencement des cultures pures.

- Autoclaver le flacon pendant une heure à une température de 121°C.

❖ Refroidissement :

-Après autoclavage, il est important de refroidir le milieu rapidement de manière à empêcher toute surchauffe.

- Refroidir les flacons en surfusion dans un bain d'eau thermostat à une température comprise entre 44 °C et 47 °C.
- Après la stérilisation et le refroidissement, le milieu doit être manipulé dans des conditions aseptiques afin de le protéger contre les contaminations extérieures
- Couler les géloses dans les boîtes de pétri de façon à obtenir une épaisseur de 3 mm pour les boîtes d'un diamètre de 90 mm et 5 mm pour les boîtes d'un diamètre de 55 mm (soit 18 ml à 20 ml de gélose).

(Pour éviter les contaminations : couler les géloses le plus rapidement possible)

-Test de la qualité et de la stérilité des milieux :

Avant de conserver les milieux il faut tous d'abord les incuber dans l'étuve pendant 24h à une température de 37 °C.

-Conservation des milieux préparés :

Les milieux préparés doivent être conservés au laboratoire dans des conditions empêchant la modification de leur composition : à l'abri de la lumière, de la dessiccation et si nécessaire dans un réfrigérateur à 2-8 °C.

## II. Techniques d'ensemencement d'un prélèvement

Après la récupération des prélèvements à partir des différents services du Complexe Universitaire Hassan II de Fès, on y ajoute 1ml du milieu bouillon cœur-cerveille (BHI) concentré puis on incube pendant 24 heures à 37°C. La culture du bouillon est ensemencée par la méthode de strie par épuisement tout en diminuant la charge bactérienne sur l'anse afin d'obtenir des colonies isolées. Les boîtes ensemencées sont incubées à 37°C.

- Nous avons réalisé plusieurs types et différentes techniques d'ensemencement

### 1. Ensemencement sur un milieu solide

Pour ce type d'ensemencement il existe des techniques d'ensemencement sur des boîtes et d'autres sur des tubes.

- Pour les techniques d'ensemencement sur des boîtes de pétri :

#### a. Ensemencement par épuisement

-C'est la technique des 4 quadrants qui consiste à disperser le microorganisme à la surface d'un milieu solide afin d'isoler des bactéries et d'obtenir des colonies séparées.

Tout d'abord, l'échantillon est déposé sur le plus grand cadran, puis il est étalé. Ensuite la boîte est retournée afin d'étaler les bactéries sur un cadran plus petit. Finalement la boîte est retournée une autre fois afin d'ensemencer le dernier petit cadran.

Les stries doivent être serrées et l'anse de platine doit être flambée entre chaque cadran.

**C'est la technique utilisée pour l'ensemencement des milieux sélectifs (EMB et Chapman).**

-Après l'ensemencement, il faut incuber les boîtes dans l'étuve à 37°C pendant 24h pour tous les milieux sauf **le milieu Chapman** qui nécessite une incubation de **48h**.

#### b. Ensemencement en tapis

-C'est la technique utilisée pour la réalisation de l'antibiogramme.

- Pour les techniques d'ensemencement sur tubes :
  - a. Pour un milieu incliné en pente : ensemencer toujours du bas en haut par des stries serrées.
  - b. Pour un milieu en culot : ensemencement par pique centrale.
  - c. Pour un milieu en culot + pente : commencer par ensemencement de la pente par des stries serrées puis ensemencer le culot par pique centrale.

C'est la technique utilisée pour l'identification biochimique des *Entérobactéries*.

## 2. Ensemencement sur milieu liquide

On peut ensemer un milieu liquide soit à partir d'un produit liquide (mettre quelques gouttes dans le milieu à ensemer à l'aide d'une micropipette), soit à partir d'un produit solide (écraser la colonie prélevée à l'aide d'une anse de platine ou pipette de pasteur sur la paroi du tube, pour obtenir une suspension homogène).

- ❖ **Remarque :** les différentes techniques d'ensemencement citées au dessus doivent être effectuées dans des conditions aseptiques.

## III. Milieux sélectifs

### 1. Milieu EMB

-Le milieu EMB (Eosine Bleu de Méthylène) est un milieu sélectif qui favorise la croissance d'*Escherichia coli*, des *Entérobactéries* ainsi que les bactéries intestinales à Gram négative. Le bleu de méthylène et l'éosine jaune sont deux colorants inhibiteurs partiels des bactéries Gram +. Ces colorants assurent la différenciation entre les germes ayant l'aptitude à fermenter ou non le lactose (lactose + ou lactose -).

**La lecture se fait après 24h à une température de 37°C.**

- ✓ Les colonies violettes foncées désignent un PH acide. Dans ce cas, les bactéries fermentent le lactose en produisant des acides -> Lactose+.
- ✓ Les colonies grisâtres désignent quant à elles un PH neutre ou basique. Dans ce cas, les bactéries ne fermentent pas le lactose -> Lactose-.

### 2. Milieu Chapman

-La gélose Chapman est un milieu sélectif des bactéries halophiles et plus particulièrement fermentant le mannitol. C'est un milieu semi synthétique, utilisé pour l'isolement des *staphylococcus*. La teneur en NaCl du milieu permet la sélection des bactéries halophiles et inhibe la grande majorité des autres bactéries.

**La lecture se fait après 48h à une température de 37 °C.**

La fermentation du mannitol est révélée grâce au virage de l'indicateur coloré de pH : Rouge de phénol qui permet une orientation vers certaines espèces.

- ✓ Absence de virage (le milieu reste rouge) : les colonies sont mannitol- car elles ne fermentent pas le mannitol.
- ✓ Virage du milieu au jaune : les colonies sont mannitol+ car elles fermentent le mannitol.

#### IV. Culture sur milieu non sélectif

##### 1. Milieu TSA

-La gélose Trypto-caséine soja (TSA) est un milieu universel convenant à assurer une excellente nutritivité. Elle peut être utilisée, d'une part, pour la culture et l'isolement des bactéries aérobies et anaérobies et d'autre part pour favoriser la croissance des germes particulièrement exigeants.

Après une incubation de 18 - 24h à 37°C, une croissance bactérienne est alors constatée.

##### 2. Milieu MH

-La gélose Mueller-Hinton est un **milieu de base non sélectif** permettant la réalisation de l'antibiogramme standard. C'est un milieu relativement riche, mais qui reste un milieu de base qui permet la culture des bactéries non exigeantes.

#### V. Isolement des colonies

Après l'ensemencement sur des milieux sélectifs, les différents types de colonies sont isolées puis chaque colonie est conservée dans des tubes qui contiennent de la gélose nutritive TSA (culture fraîche) ensuite, les tubes sont incubés dans l'étuve à une température de 37°C pendant 24h.

#### VI. Identification

- Les bactéries peuvent être identifiées morphologiquement : selon la taille des colonies, le contour, l'opacité, l'aspect ...

##### 1. Coloration de Gram

- C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. Elle permet ainsi, avec la reconnaissance de la morphologie et le mode de groupement des bactéries, de renseigner sur l'ordre dont fait partie les bactéries étudiées.

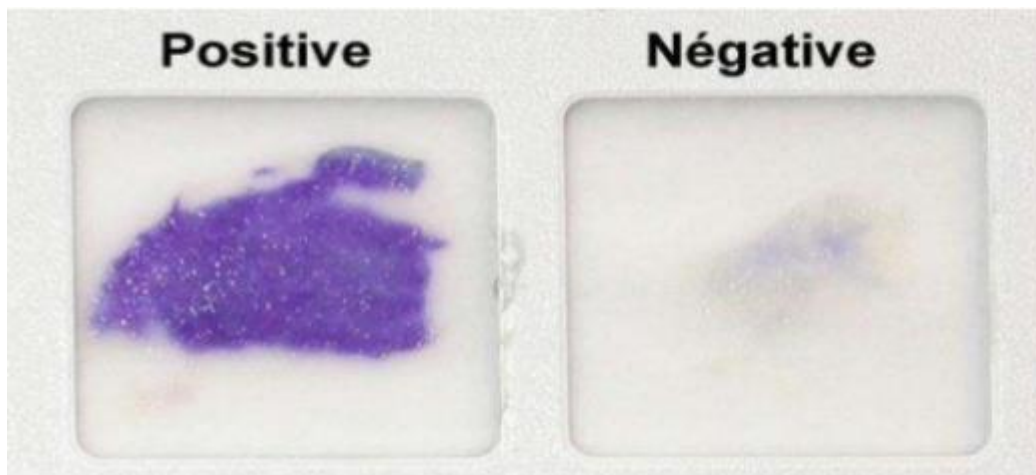
Cette coloration est effectuée de la façon suivante :

- Le frottis est réalisé sur une lame de microscope à partir d'une suspension bactérienne puis on le fixe à la flamme du bec bunsen
- Le frottis fixé est recouvert de cristal violet oxalaté (réactif prêt à l'emploi). Laisser agir une minute. Rejeter le cristal de violet.
- Recouvrir alors l'étalement de lugol (réactif prêt à l'emploi). Laisser 1min. Toutes les bactéries sont colorées en violet puis rincer à l'eau.

- Décoloration par l'alcool : On ajoute l'alcool goutte à goutte sur la lame inclinée obliquement. Laisser agir de 5 à 10 secondes, puis laver immédiatement à l'eau.
- Contre coloration avec de la Safranine: ajouter une solution de safranine et laisser agir 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à l'eau, puis sécher la lame à la flamme du bec bunsen.
- observation microscopique, à l'immersion (x1000) ; les bactéries à Gram positif sont colorées en violet, les bactéries à Gram négatif sont colorés en rose.

## 2. Test d'oxydase : pour les Gram-

-La réaction d'oxydase se fait à l'aide de disques de commerce prêts à l'emploi sur lequel on dépose une colonie. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration violet à l'endroit où on a déposé la colonie (Figure 1), soit immédiatement, soit quelques secondes après, il s'agit donc de *Pseudomonas aeruginosa*.



**Figure 1 : Résultat de test oxydase**

## 3. Tests d'identification classique

### - Milieu Kligler-Hajna (KH)

- Ce milieu est coulé en pente et en culot, c'est un milieu renfermant du lactose, du glucose, du thiosulfate et des ions ferreux et le rouge de phénol comme indicateur de pH.

C'est un milieu au niveau duquel on recherche 4 caractères :

- ✓ la fermentation du glucose qui se traduit par virage au jaune du milieu qui était rouge à l'origine (culot) ;
- ✓ la fermentation du lactose sur la pente qui se traduit également par virage au jaune ;
- ✓ la présence de gaz qui se matérialise par le décollement du culot et/ou la présence de bulles d'air ;

- ✓ la production de H<sub>2</sub>S qui se traduit par une coloration noire.

- Milieu citrate de Simmons

-Ce milieu coulé en tubes est utilisé pour l'étude de l'utilisation du citrate comme seule source de carbone. Les bactéries qui utilisent le citrate comme seule source de carbone entraînent une alcalinisation du milieu, d'où le virage du vert au bleu. Les colonies sont ensemencées en surface de la gélose, la lecture se fait après 24 heures d'incubation à 37°C.

- Milieu MRVP

-Ce milieu permet l'étude des produits de fermentation du glucose ainsi la différenciation entre les fermentations : « acides mixtes », identifiée par le test de rouge méthyle et « butylène glycolique » par le test VP.

Une souche RM (+) est habituellement VP (-) et vice-versa, ainsi ces test ont été effectués en ajoutant des gouttes de rouge de méthyle à une culture de 24 heures.

Le virage du milieu en rouge indique le test RM (+) et VP (-), pour le RM (-) le milieu reste inchangé.

- Milieu Urée – Indole

- C'est un milieu liquide utilisé pour rechercher la production d'uréase qui se révèle par un changement de la coloration du jaune au rose, ainsi que la présence d'indole qui se matérialise par un anneau rouge, après addition du réactif de Kovacs.

#### 4. Identification des staphylocoques

- ❖ Test coagulase libre :

- La coagulase ou staphylocoagulase est une enzyme capable de faire coaguler le plasma sanguin. La mise en évidence de la coagulase dans un bouillon de culture de *Staphylococcus* est considérée comme un critère absolu d'identification de *Staphylococcus aureus* en médecine humaine. Ce test a été effectué selon le protocole qui suit :

- Dans un tube à hémolyse contenant 0,3ml du bouillon Cœur-cervelle (BHI), inoculer l'isolat puis incuber 24 heures à 37°C

-Verser 0,3 ml de plasma de lapin;

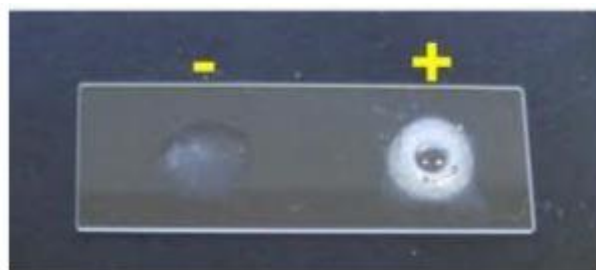
-Homogénéiser et incuber à 37 °C.



Les résultats ont été obtenus dans un délai de 4 à 24 heures d'incubation. La coagulation a été observée en inclinant le tube à hémolyse ; si le plasma a coagulé, le germe possède une coagulase. Cela implique que le fibrinogène a été transformé en fibrine (insoluble) : Il s'agit de *Staphylococcus aureus*

❖ Recherche de la catalase :

- Ce test a pour but d'orienter l'identification des coques et bacilles Gram (+) positives. En effet, il permet de différencier les staphylocoques des streptocoques (qui sont catalases négatifs). Sur une lame de verre propre, on dépose une goutte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur une colonie prélevée directement avec une anse (figure 2). Ainsi, si des bulles se forment, la bactérie possède la catalase, sinon elle n'en possède pas.



**Figure 2 : Résultat de teste catalase**

❖ Galerie API :

- Une galerie API est un ensemble de petits tubes prêts à l'emploi permettant l'identification de microorganismes par la réalisation rapide et facile de tests biochimiques miniaturisés. La galerie API 20E (BioMerieux) (figure 3) a été utilisée pour identifier les entérobactéries.



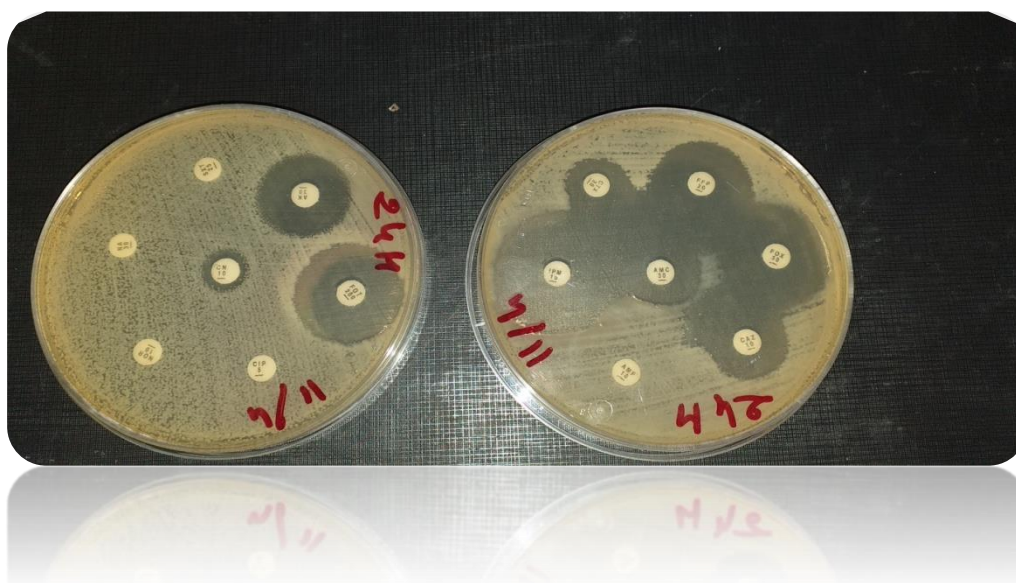
**Figure 3 : Galerie API 20<sup>E</sup>**

Un inoculum de 0,5McFarland a été préparé à partir d'une culture jeune (18-24 heures), puis ensemencé sur la Galerie selon les recommandations du fabricant.

La lecture a été effectuée après incubation de 24 heures à 37°C, puis le code obtenu a été déchiffré en se référant au catalogue.

## 5. L'ANTIBIOGRAMME

-Un antibiogramme correspond à l'étude de l'activité bactériostatique de plusieurs antibiotiques en même temps, et permet ainsi la catégorisation S, I ou R d'une souche bactérienne pour chaque antibiotique (figure 4). Ceci permet au clinicien de connaître les molécules efficaces. Il sélectionnera parmi celle-ci les mieux tolérées, les moins pourvoyeuses de résistance, et si possible les moins chères pour le traitement de l'infection (voir les techniques dans la partie application).



**Figure 4 : Exemple d'antibiogramme réalisé**

## 6. La technique PCR

-Dans la microbiologie on utilise la technique PCR soit pour identifier des bactéries, soit pour isoler des gènes de résistances. Chaque cycle de PCR est constitué de 3 étapes :

- ✓ Une dénaturation de l'ADN,
- ✓ une hybridation des amorces
- ✓ et une élongation grâce à l'action de la tac polymérase,

Ces 3 étapes sont réalisées dans un thermocycleur.

-La révélation des produits de PCR est réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose.

# Applications pratiques

---

## Techniques d'antibiogrammes par la méthode de diffusion en milieu gélosé

# INTRODUCTION

---

L'évolution des résistances bactériennes aux antibiotiques est un problème de plus en plus préoccupant. Ce qui n'était qu'un phénomène marginal il y a quelques années est entrain de devenir un enjeu de santé publique majeur dans le monde entier, régressant les progrès de la médecine moderne [1].

L'antibiogramme tente d'apprécier l'activité bactériostatique d'un ou de plusieurs antibiotiques sur une bactérie. Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique.

Cette étude peut être réalisée en milieu liquide, avec une ou deux concentrations d'antibiotique correspondant aux concentrations critiques ; ou en milieu solide par la méthode de diffusion en gélose à l'aide de disques imprégnés d'antibiotique. Le résultat est donné de la manière suivante (catégorisation clinique) : germe sensible, germe de sensibilité intermédiaire ou résistant.

-Quelle que soit la technique, la base de l'antibiogramme est la mesure d'une concentration active d'antibiotique. On a le choix entre la concentration minimale active (CMA), la concentration traditionnelle inhibant 50% ou 99% de la population bactérienne (CI50%/CI99%), et la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui est la plus petite concentration d'antibiotique(en mg/L) suffisante pour inhiber la croissance visible d'une souche de bactéries au laboratoire, c'est-à-dire *in vitro*. Depuis quelques décennies, de nombreuses études ont montré la relation entre la CMI des souches et les résultats thérapeutiques [2, 3].

Dans cette étude la détermination de La CMI a été choisie d'emblée comme concentration active car c'est la valeur la plus facile à déterminer et la plus évidente. Le principe des techniques de base de détermination de la CMI existe depuis quarante ans mais aucune nouveauté réelle n'est apparue. Par contre, les conditions techniques de la détermination peuvent varier (densité de l'inoculum, phase de croissance des bactéries ensemencées, constituants du milieu de culture...etc.) [2].

Le but de mon stage (stage d'observation) est l'apprentissage des différentes techniques de laboratoire en microbiologie. Aussi dans ce contexte et pour appuyer ces connaissances, j'ai réalisé des antibiogrammes afin de déterminer la CMI pour les *Entérobactéries* et *Staphylococcus aureus*.

*Chapitre I : Revue*  
*bibliographique*

## I. Les antibiotiques

### 1. Définition et origine des antibiotiques

Un antibiotique est une substance chimique produite par un micro-organisme, capable de détruire (bactéricide) ou d'inhiber la croissance des bactéries (bactériostatique), sans affecter l'hôte. Il permet aux défenses naturelles du corps telles que le système immunitaire, de les éliminer.

Le premier antibiotique connu, la sulfanilamide (sulfamide) a été isolé en 1935 [4, 5]. Au départ de molécules naturelles, des modifications chimiques sont souvent apportées aux antibiotiques (semi-synthétiques) pour améliorer et/ou modifier des paramètres pharmacocinétiques essentiels [6, 7]. Par extension, toute substance de synthèse susceptible d'empêcher le développement des micro-organismes est appelée antibiotique.

Les antibiotiques proviennent de trois sources majeures :

- Les moisissures ou champignons.
- Les bactéries
- La synthèse partielle ou totale.

Les espèces de *Penicillium* et de *Stréptomyces* représentent les plus importantes sources d'antibiotiques [8].

Il est commun de dire que l'apparition de la résistance est la conséquence de l'utilisation des antibiotiques. Mais l'antibiotique ne crée pas la résistance, tout au plus favorise-t-il l'émergence des bactéries déjà équipées pour la résistance.

### 2. Les familles et la classification des antibiotiques

Les antibiotiques sont divisés en familles (tableau 1) ; le classement n'est pas tout à fait cohérent, puisque le point commun des divers antibiotique d'une classe peut être tantôt chimique (les bêta-lactamines, les sulfamides, les polypeptidiques, les aminosides, les macrolides, les floroquinolones), tantôt une bactérie sur laquelle ils sont efficaces (les antituberculeux, les anti-staphylococciques).

Les familles chimiques contiennent plusieurs molécules, dont les spectres d'action sont semblables, mais non identiques, et les effets indésirables assez voisins [9, 10].

#### Les Bêta-lactamines

Ces antibiotiques incluent : les pénicillines et céphalosporines, les carbapénèmes, les clavames et les monobactames. Toutes ces molécules comprennent un cycle à quatre atomes dont un azote, le noyau  $\beta$ -lactame.

Les  $\beta$ -lactamines agissent en perturbant la synthèse de l'enveloppe cellulaire dans les cellules en croissance [11, 12].

#### + Les Aminosides

Ces antibiotiques, à large spectre, typiquement bactéricides, incluent *l'amikacine, la gentamicine, la kanamycine, la néomycine* et la streptomycine. Ils sont actifs contre les bactéries Gram-négatives aussi bien que Gram-positives. Les aminoglycosides détruisent la bactérie en se liant à la sous-unité 30S du ribosome bactérien et en inhibant la synthèse des protéines [11].

#### + Les Tétracyclines

Ces antibiotiques bactériostatiques, à large spectre inhibent la synthèse des protéines en se liant au ribosome et empêchent la fixation des aminoacy-ANRt au site A [11].

#### + Les Macrolides, le chloraphenicol et les streptogramines

Tous ces antibiotiques inhibent la synthèse des protéines, en se fixant à la sous unité ribosomique 50S [11].

#### + Les Polymixines

Les polymixines sont des peptides actifs contre beaucoup de bactéries Gram-négatives. La plus part des bactéries Gram-positives y sont résistantes [11].

#### + Les Quinolones et la novobiocine

Les quinolones sont des agents synthétiques qui contiennent toutes un anneau 4-Quinolone substitué. Ils détruisent la bactérie en inhibant la synthèse de l'ADN bactérien en détruisant l'activité de l'ADNgyrase bactérienne.

Les quinolones de la 1<sup>ère</sup> génération : cinoxacine, acide nalidixique, acide oxolinique et acide pipémidique, sont surtout actives sur les bactéries Gram-négatives [11, 12].

#### + Les Métronidazole

Le métronidazole est un dérivé du nitroimidazole. C'est un agent antiparasitaire, antianaérobie qui diffuse dans le germe par la paroi et le détruit en produisant des radicaux libres. Il est donc employé contre les anaérobies stricts [11, 12].

#### + Les Rifamycines

Ces antibiotiques mactocyclique (la rifampicine ou rifampine) sont généralement actif contre les bactéries Gram-positives et contre certaines bactéries Gram-négatives [12].

#### + Les Sulfamides, le triméthoprim et le cotrimoxazole

Les sulfamides sont habituellement bactériostatique pour les bactéries Gram-positives et Gram – négatives qui y sont sensibles. Les sulfamides arrêtent la prolifération bactérienne en interférant avec la cascade de synthèse de l'acide folique [11, 12].

**Tableau 1 :** Classification des différentes familles d'antibiotiques

Familles	Mode d'action	Effets secondaires	Action sur bactéries à Gram + et/ou -
Les BETALACTAMINES	Action bactéricide	Diarrhée, allergie, toxicité digestive, rénal...	GRAM +/-
Les AMINOSIDES	Action bactéricide	Toxicité au niveau de l'audition et rénale.	GRAM +/-
Les MACROLIDES	Action bactériostatique	Allergie, troubles digestifs, toxicité hépatique...	GRAM +
Les LINCOSAMIDES	Action bactériostatique	Allergie, troubles digestifs, toxicité hépatique...	GRAM +/-
Les SYNERGISTINES	Action bactériostatique	Allergie, troubles digestifs, toxicité hépatique...	GRAM +/-
Les TETRACYCLINES	Action bactériostatique	Allergie, toxicité digestive, rénale, au niveau neuronal...	GRAM +/-
Les QUINOLONES	Action bactéricide	Réaction allergique, toxicité auditive, tendinite ...	GRAM -
Les SULFAMIDES	Action bactériostatique	Allergie, toxicité sanguine, rénale...	GRAM -
Les GLYCOPEPTIDES	Action bactéricide	Réaction allergique	GRAM +

### 3. Cibles et Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques agissent à un niveau bien précis, appelé site d'action ou cible (figure 5), perturbent ou inhibent certaines biosynthèses essentielles à la vie bactérienne.

#### a. Inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne

La paroi bactérienne est une structure rigide composée d'un réseau tridimensionnel d'acides aminés et de chaînes polysaccharidiques. Il s'agit du peptidoglycane [13].

Les antibiotiques tel les  $\beta$ -lactamines, perturbent la synthèse du peptidoglycane en se fixant sur les enzymes de la dernière étape de la biosynthèse (PBP=penicillin binding proteins) en particulier sur la transpeptidase. Ces antibiotiques ont donc une très grande



efficacité sur les bactéries en pleine croissance ou bactéries jeunes dont la paroi est en cours d'édification [4].

b. Modifiant la perméabilité membranaire

Les antibiotiques de nature polypeptidique (les polymyxines, les gramicidines et tyrosidine) ont pour cible la membrane plasmique bactérienne avec une action bactéricide. Ils se fixent aux phospholipides de la membrane cytoplasmique qui se trouve ainsi désorganisée. Suite à cette action, la membrane devient perméable, et il en résulte une fuite des constituants cytoplasmiques qui entraîne la mort cellulaire [4, 13].

c. les antibiotiques qui ciblent les ribosomes

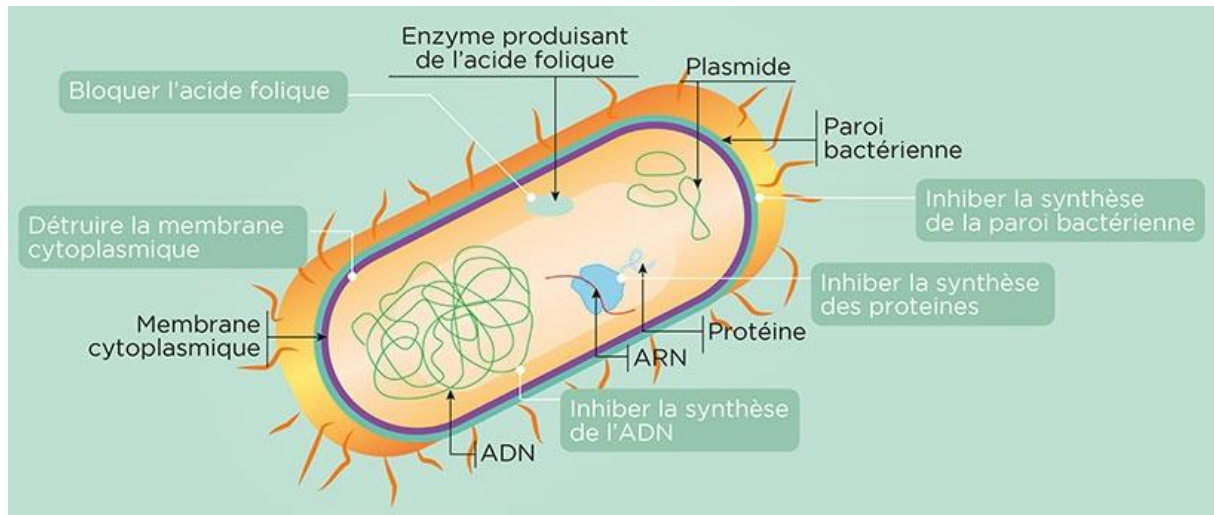
Les ribosomes sont des organites présents dans les cellules bactériennes, leur structure se compose de protéines et d'ARN. Les ribosomes synthétisent les protéines en décodant l'information contenue dans l'ARN messager. Les antibiotiques qui agissent sur la synthèse protéique peuvent voir leur activité annihilée par une mutation de leur site de fixation sur le ribosome bactérien, induisant ainsi une incapacité de synthétiser les protéines qui lui sont vitales [4, 13].

d. Inhibiteurs de la synthèse des protéines (ciblent l'ARN)

Pour ce mode d'action, on dénombre la famille des rifamycines et rifabutine qui sont des molécules hémi-synthétisées à partir de la rifamycine B. Ces antibiotiques bloquent la formation de la chaîne d'ARN messager en se liant à l'ARN polymérase. Il en résulte une modification de la configuration ribosomale responsable d'erreur de traduction, entraînant la formation de protéines anormales ayant perdu leurs fonctions [4, 13].

e. Inhibiteurs de la biosynthèse des acides nucléiques (ciblent l'ADN)

L'ADN est la cible des quinolones, qui forment une large famille d'antibiotiques de synthèse et dérivent de l'acide nalidixique. La région de la molécule qui comporte le groupe carbonyle de la quinone forme une liaison hydrogène à l'ADN bactérien. Ces antibiotiques établissent également une interaction spécifique avec les enzymes de types topoisomérase, inhibant ainsi la synthèse ou même le fonctionnement des acides nucléiques [4, 13].



**Figure 5 : Les différents mécanismes de résistance aux antibiotiques**

## II. La résistance bactérienne

### 1. Définition

- La résistance est la capacité que possède une bactérie de s'opposer à l'action d'un antibiotique. L'organisation mondiale de la santé a définie la résistance bactérienne aux antibiotiques dès 1961 de deux façons différentes :
  - ✓ Définition thérapeutique : une souche est dite « résistante » lorsque la concentration d'antibiotique qu'elle est capable de supporter est notablement plus élevée que la concentration atteignable *in vivo*.
  - ✓ Définition épidémiologique : une souche est dite « résistante » lorsqu'elle est capable de supporter une concentration d'antibiotique notablement plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce [14].

Il résulte de cette résistance bactérienne que les traitements classiques deviennent inefficaces et que les infections persistent et accroissent le risque de propagation.

### 2. Types de résistances

#### 2.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle à un antibiotique donné et les mécanismes de résistances intrinsèques sont des caractères présents chez toutes les souches de la même espèce.

Pour chaque classe d'antibiotique, il existe des espèces bactériennes sur lesquelles l'antibiotique est inactif par défaut de cible ou d'accès à la cible [13].

On peut dire que les micro-organismes ont une résistance naturelle vis-à-vis un antibiotique lorsque ils sont capable d'affronter le pouvoir destructibles de ces molécules.

Ce type de résistance est détecté dès les premières études réalisées afin de déterminer l'activité d'un antibiotique et contribuer à définir son spectre antibactérien [15].

## 1.2 Résistance acquise aux antibiotiques

La résistance bactérienne acquise à un antibiotique est un phénomène qui apparait au niveau des souches d'une espèce donnée, normalement sensible à cet antibiotique [13]. Elle résulte d'une modification du capitale génétique de la bactérie, lui permettant de tolérer une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce [16].

Les gènes de résistance aux antibiotiques peuvent être portés par des chromosomes (résistance chromosomique) ou par des éléments extra-chromosomiques appelés plasmides (résistance plasmidique) [14].

### a. Résistance par mutation chromosomique

La résistance chromosomique résulte généralement d'une mutation au niveau de l'ADN chromosomique, affectant spécifiquement le mécanisme d'action d'un antibiotique ou d'un groupe d'antibiotiques soit par un problème de perméabilité, soit par neutralisation des cibles spécifiques des antibiotiques [14, 17].

Cette résistance se caractérise par :

- ✓ Sa faible fréquence d'apparition de l'ordre du milliardième au millionième. Ainsi, la résistance chromosomique à plusieurs antibiotiques à la fois, à une très infime probabilité d'apparition,
- ✓ Sa spontanéité, car elle apparait en absence d'antibiotique
- ✓ Sa stabilité et son aspect héréditaire : lors de la division bactérienne la bactérie mutée transmet son caractère aux bactéries filles [13].

### b. Résistance extra-chromosomique ou plasmidique

La résistance plasmidique résulte de la mutation d'un gène d'ADN extra-chromosomique. Le plasmide est une structure extra-chromosomique constitué d'ADN bicaténaire circulaire, se répliquant de façon autonome et peut porter un ou plusieurs gènes de résistance. La transmission de plasmides peut se faire entre des bactéries de la même espèce ou d'espèces différentes [18].

A travers ce mécanisme, les bactéries ont une facilité élevée d'acquisition de la résistance et même la de multi-résistance .L'une des conséquences de cette facilité de transmission intra et interspécifique est que la résistance plasmidique peut intéresser plusieurs antibiotique à la fois (bactérie multi-résistance).

Cette résistance peut se faire selon trois mécanismes différents :

- ✓ La transduction (avec un bactériophage comme vecteur),
- ✓ La transformation (capture d'ADN nu par la bactérie),
- ✓ Et la conjugaison (transfert de plasmide d'une bactérie à une autre) [18].

### III. L'antibiogramme

#### 1. Définition

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou de plusieurs antibiotiques [19]. Il correspond à l'étude de l'activité bactériostatique de plusieurs antibiotiques en même temps, et permet ainsi la détermination du degré de résistance de la catégorisation (S, I ou R) d'une souche bactérienne pour chaque antibiotique. Ceci permet au clinicien de mesurer la capacité d'un antibiotique à inhiber la croissance bactérienne et connaître les molécules efficaces. Il sélectionnera parmi celle-ci les mieux tolérées, les moins pourvoyeuses de résistance, et si possible les moins chers pour le traitement de l'infection [20].

Un antibiogramme sert également à la surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne et à l'identification des bactéries par la mise en évidence de la résistance naturelle [21].

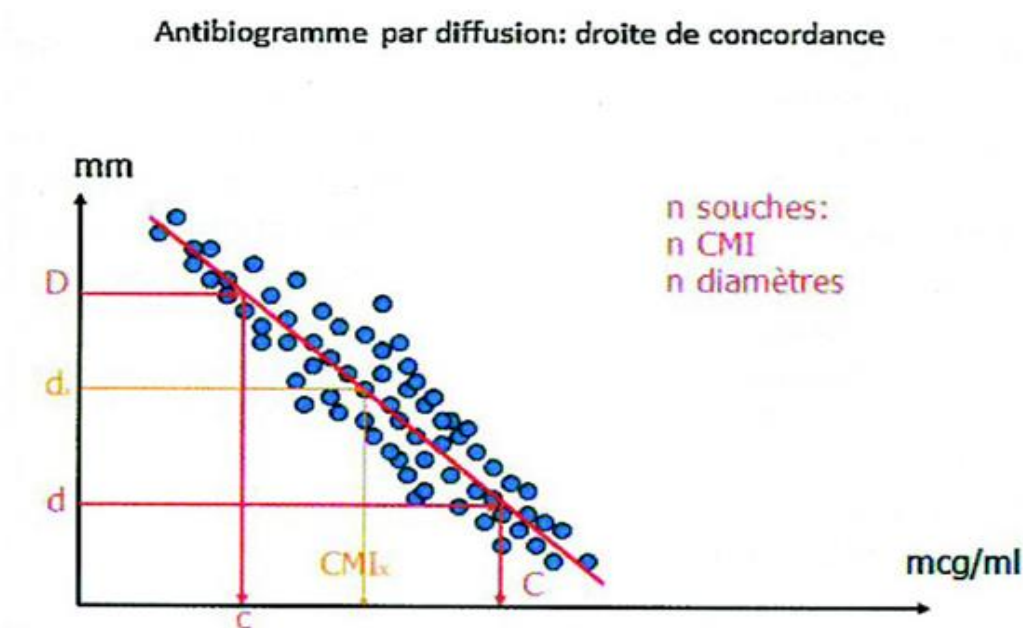
#### 2. Techniques d'antibiogramme

##### a. CMI : La méthode de diffusion en milieu gélosé

Cette technique consiste à réaliser une série de milieux gélosés coulés en boites de pétri, sur lesquelles on dépose des disques de papier buvard imprégnés des antibiotiques à tester. Les antibiotiques vont diffuser de manière radiale et en profondeur à partir de ces disques, induisant un gradient de concentration décroissant dans la gélosé [22].

La surface de la gélose estensemencée avec un inoculum des souches dont on veut mesurer la CMI. Après 18h d'incubation à 37°C, il en résulte une zone d'inhibition circulaire de la croissance bactérienne, dont le diamètre est corrélé à la CMI (figure 6).

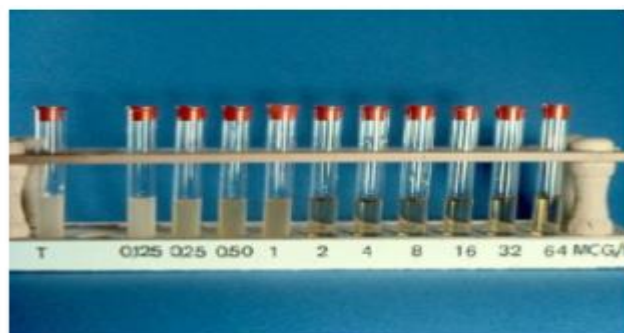
La concentration minimale inhibitrice (CMI) correspond à la plus petite concentration d'antibiotique pour laquelle il n'y a pas de croissance bactérienne visible à l'œil nu [6].



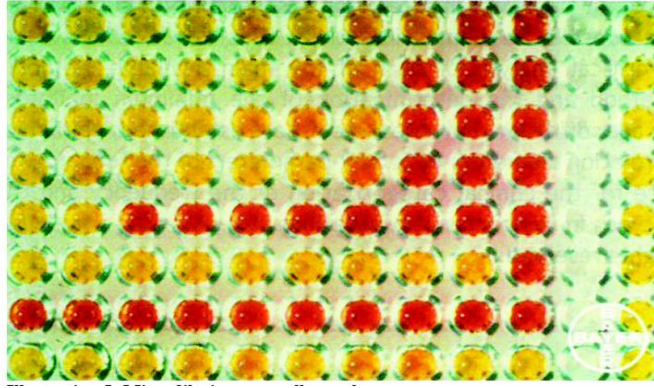
**Figure 6 : Droite de concordance entre les valeurs de diamètre d'inhibition en milieu gélosé et les valeurs de CMI par une méthode appropriée**

b. CMI en milieu liquide ou microdilution

Cette méthode consiste à la distribution de l'inoculum bactérien dans une série de tubes contenant l'antibiotique (figure 7). La CMI est indiquée, après incubation, par le tube ou la cupule qui contient la plus faible concentration d'antibiotique et où aucune croissance n'est visible [6]. Il existe également des automates destinés à la réalisation des antibiogrammes en milieu liquide (figure 8). Ces systèmes effectuent une lecture turbidimétrique de la croissance bactérienne en milieu liquide, à différentes dilution de l'antibiotique, en fonction du temps [20].



**Figure 7 : Détermination de la CMI par dilution en milieu liquide : macro-méthode en tube**

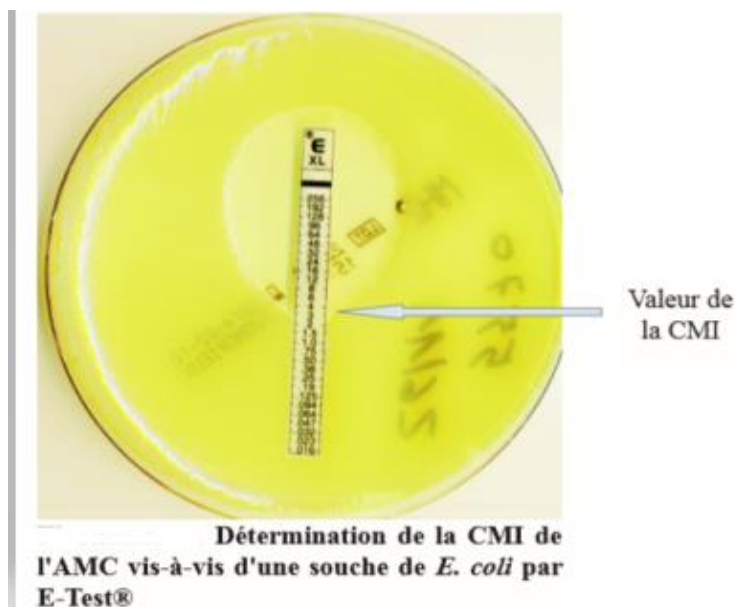


**Figure 8 :Micro-méthode en plaque de microtitration (jaune : croissance+, rouge : absence de croissance)**

c. CMI par diffusion en gradient ou méthode ETEST®

C'est une méthode rapide et courante pour déterminer la CMI pour un antibiotique isolé, grâce à des bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel de cet antibiotique. Elle consiste à placé sur une gélose préalablement ensemencé avec la souche à tester (figure 9), une bandelette, qui va diffuser dans la gélose, générant une concentration décroissante à mesure que l'on s'éloigne de la source.

Après 18 heures d'incubation, une ellipse d'inhibition, symétrique et centrée le long de la bandelette, se forme. La CMI correspond alors à la concentration d'antibiotique présente à la jonction de la zone d'inhibition de la bandelette [20].



**Figure 9 : Détermination de la CMI par la méthode ETEST®**

### 3. Erreurs fréquentes et contrôle de qualité

Le contrôle de qualité de l'antibiogramme est destiné à vérifier que les conditions techniques, humaines et matérielles, mises en œuvre dans un laboratoire. Ce contrôle n'a donc de sens que s'il est effectué régulièrement et dans des conditions de routine. L'antibiogramme, c'est-à-dire chacun de ses composants (exécutant, milieu, disques ou réactifs et appareillage), devra satisfaire à une certaine performance. Il existe deux types de contrôle : interne et externe.

#### a. Contrôle de qualité interne

Ce contrôle, propre à chaque laboratoire s'effectue sur une base volontaire. Il est destiné à vérifier **la respectabilité** et la **reproductibilité** des résultats ainsi que leur **conformité** à une réponse considérée comme exacte.

La conformité et l'exactitude des résultats sont étudiée à l'aide de souches de référence. Un minimum de trois souches « *staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* » doit être inclus. Une bonne conservation des souches de référence est capitale pour la valeur du contrôle de qualité [2].

#### b. Contrôle de qualité externe

Un contrôle de qualité externe en bactériologie fait partie du système officiel de contrôle de qualité des analyses médicales. Fonctionnant depuis 1975 sur une base volontaire, il est devenu obligatoire en 1978 pour environ 4000 laboratoires privés et publics.

Ce contrôle consiste en un sondage de tous les laboratoires d'analyses de biologie médicale, dans le but d'inspecter les diverses réponses obtenues dans les conditions habituelles de travail de chacun des participants [2].

### 4. Limites de l'antibiogramme

A une époque où toutes les étapes d'un examen biologique peuvent être automatisées, standardisées et rendues extrêmement fiables grâce à l'utilisation d'une technologie sophistiquée, l'antibiogramme est resté, à peu de choses près, ce qu'il était il ya quarante ans. Contrairement aux examens biologiques qui mesurent un paramètre **quantifiable**, l'antibiogramme ne fournit qu'une **estimation** qualitative.

Les problèmes pratiques liés à la réalisation de l'antibiogramme, les difficultés d'interprétation des résultats *in vivo* et leur transposition chez les malades constituent les limites de l'antibiogramme [2].

a. Limites techniques de l'antibiogramme

La réalisation d'un antibiogramme est soumise au respect d'un certain nombre de conditions techniques rapportées dans le tableau 2. Elles concernent la bactérie, l'antibiotique, le milieu de culture, les conditions d'incubation et la lecture [2].

b. Erreurs de lecture et de transcription

Quand bien même un antibiogramme est réalisé à la perfection, il n'est pas à l'abri d'erreurs de lecture et de transcription. Le contrôle de qualité externe est, à cet égard, très révélateur. L'automatisation contribue clairement à la suppression de ce dernier type d'erreurs [2].



**Tableau 2 :** Paramètres affectant l'interprétation de l'antibiogramme

**Bactérie :**

- cinétique de croissance (temps de latence, temps de génération)
- qualité (phase de croissance) de l'inoculum
- nombre de bactéries

**Antibiotique :**

- stabilité
- conservation (disque, poudre, solution)
- Diffusion dans le milieu
- modalité d'action

**Milieu de culture :**

- état : liquide, solide, semi-solide
- Volume et épaisseur
- pH, rH
- osmolarité
- concentration en NaCl et cation divalent (Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>)
- composition en acides aminés et en glucides
- teneur en thymidine
- présence de facteurs de croissance.

**Condition d'incubation :**

- durée
- température
- atmosphère (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>).

**Lecture :**

- à l'œil
- automatique (photomètre).

**Remarque :** l'antibiogramme ne peut prédire le comportement de l'antibiotique *in vivo*. L'activité d'un antibiotique dans l'organisme résulte d'une dynamique d'interactions entre l'antibiotique, la bactérie et l'hôte. Trente à quarante pour cent de discordances entre les résultats observés *in vitro* et *in vivo* ont été rapportés [2].

5. Staphylocoques et bêta-lactamines :

La bonne évaluation de la sensibilité d'une souche *Staphylococcus aureus* (S.A) aux bêta-lactamines passe par la compréhension des mécanismes de résistance à ces antibiotiques. Si la

mise en évidence et l'interprétation de la résistance pour la souche productrice de la pénicillinase est généralement facile, il n'est pas de même pour les souches résistantes à la méticilline [2].

- Mécanisme de résistance

Deux mécanismes expliquent actuellement la résistance des S.A aux bêta-lactamines : la production de bêta-lactamase et la modification de leur cible.

- ✚ Résistance liée à la production de bêta-lactamases (pénicillinase)

Quatre types de bêta-lactamase (A, B, C et D) ont été décrits chez S.A., dont les gènes sont le plus souvent portés par des plasmides. Elles sont généralement inductibles (leur production est accrue en présence de faible concentration de certaines bêta-lactamines comme la pénicilline G), plus rarement constitutive (leur production est d'emblée maximale) [2].

- ✚ Résistance à la méticilline (et oxacilline et dérivés)

La particularité de ce type de résistance est liée à son expression hétérogène ; plus la souche est hétérogène plus la mise en évidence de cette résistance est difficile. Ceci veut dire que seule une fraction de la population est capable d'exprimer la résistance : en moyenne, une bactérie sur  $10^4$  à  $10^6$  exprime la résistance.

Différents facteurs sont susceptibles de modifier l'expression de cette résistance, on en cite :

- ✓ Température
- ✓ Osmolarité du milieu
- ✓ Lumière
- ✓ pH
- ✓ Durée d'incubation
- ✓ Inoculum [2].

## 6. Entérobactéries et beta-lactamines

Les *Entérobactéries* étant naturellement résistantes aux pénicillines des groupes G et M essentiellement à cause de leur médiocre perméabilité à l'égard de ces bêta-lactamines [2].

Pour les *Entérobactéries*, on peut citer les mécanismes de résistance suivants :

- ✓ Défaut de pénétration de l'antibiotique

La perméabilité de la membrane externe des bactéries à Gram négatif dépend principalement du lipopolysaccharide (LPS) et des porines ancrées dans cette membrane.

La sensibilité aux  $\beta$ -lactamines dépend du nombre de porines fonctionnelles. L'altération des porines par mutation est à l'origine de résistances acquises aux  $\beta$ -lactamines, soit par une modification structurale d'une porine essentielle, ce qui a été décrit chez *E. coli*, soit par une diminution quantitative des porines [23].

✓ Modification des PLPs

La sensibilité aux  $\beta$ -lactamines peut-être diminuée par des mutations dans les gènes chromosomiques qui codent pour des PLPs normales ou à l'acquisition de gènes étrangers codant pour des PLPs ayant peu d'effet pour les  $\beta$ -lactamines. La résistance résultant de ces altérations varie suivant les bactéries, la nature des modifications (types de mutations, sur- ou sous-expression des protéines concernées) et l'affinité spécifique des  $\beta$ -lactamines pour les différentes PLPs [23]

✓ Diminution de l'affinité de la cible

La modification de la cible ribosomale entraîne une résistance par diminution d'affinité à la cible. Elle est constitutive par production de méthylase codée par des gènes plasmidiques ou des transposons, ou bien par mutation de l'ARN ou de protéines ribosomales. On parle de phénotype  $MLS_B$ .

En effet, cette résistance est due à la méthylation d'une seule adénine à la position 2058 de l'ARN ribosomal 23S, adénine qui joue un rôle clé dans la fixation des  $MLS_B$  [3].

✓ Excrétion par des systèmes d'efflux

Le système d'efflux actif est efficace grâce aux protéines transmembranaires ancrées dans la membrane plasmique mais également dans la membrane externe des bactéries Gram négatif. Ces protéines sont spécifiques d'une classe d'antibiotiques et peuvent être responsables de « multidrug resistance » (MDR). Pour fonctionner, les pompes à efflux utilisent l'énergie fournie par dissipation d'un gradient de protons ou d'ions sodium ou encore par hydrolyse d'ATP.

Chez les bactéries à Gram positif, la résistance par efflux actif peut être due à deux classes de pompes, appartenant à la famille des ATP-binding cassette (ABC) transporteurs et de la Major Facilitator Superfamily (MFS) [3, 23].

*Chapitre II:*

*Matériel et Méthodes*

## L'antibiogramme

Afin de déterminer la résistance des entérobactéries et des staphylocoques aux différentes familles d'antibiotiques, nous avons isolé et identifié à partir des prélèvements cliniques récupérés du Complexe Universitaire Hassan II de Fès :

- Des *Entérobactéries* isolées à partir d'un prélèvement rectal sur milieu sélectif EMB
- Des *Staphylocoques* isolés à partir d'un prélèvement nasal sur milieu Chapman

Pour cela nous avons réalisé pour chacun de ces deux genres bactériens un antibiogramme contenant des antibiotiques spécifiques.

### I. Techniques d'antibiogrammes par la méthode de diffusion en milieu gélosé

Un antibiogramme permet de mesurer la capacité d'un antibiotique à inhiber la croissance bactérienne. Le principe consiste à placer la culture de bactéries en présence du ou des antibiotiques et à observer les conséquences sur le développement et la survie de celles-ci. Il a été réalisé par la méthode de diffusion sur disque, en milieu gélosé MH selon les recommandations du CA-SFM 2013. Un inoculum de 0,5 McFarland a été préparé pour chaque souche bactérienne, puis dilué à un dixième. Le milieu MH a étéensemencé par écouvillonnage et des disques d'antibiotiques ont été déposés.

Après une incubation pendant 18 à 24 heures à 37°C, les diamètres d'inhibition ont été mesurés manuellement à l'aide d'une règle graduée. La comparaison pour chaque antibiotique du diamètre d'inhibition mesuré à celui donné par le CA-SFM nous a permis de définir les catégories cliniques des souches: Sensible (S), Résistant (R) et Intermédiaire (I).

#### - Milieu MH :

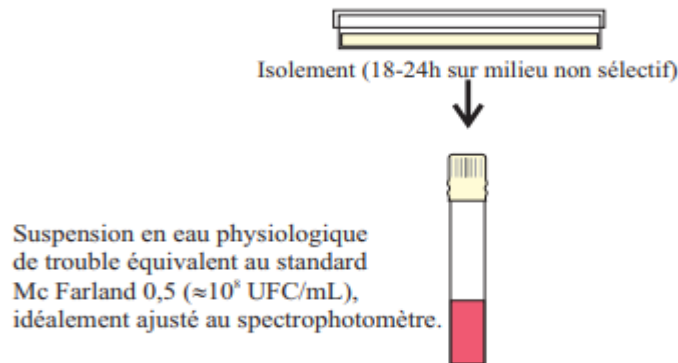
La gélose Mueller-Hinton est un **milieu de base non sélectif, c'est un milieu** de référence pour les tests de sensibilité des germes aux antibiotiques et sulfamides. Sa formulation est conforme aux recommandations du CLSI, du CA-SFM ou de l'EUCAST.

#### - Préparation de culture fraîche :

Pour obtenir une culture jeune, il faut suspendre une colonie bien isolée, l'ensemencer sur une gélose nutritive et ensuite l'incuber pendant une durée entre 18-24 heures à une température de 37 °C.

- Réalisation de l'inoculum :

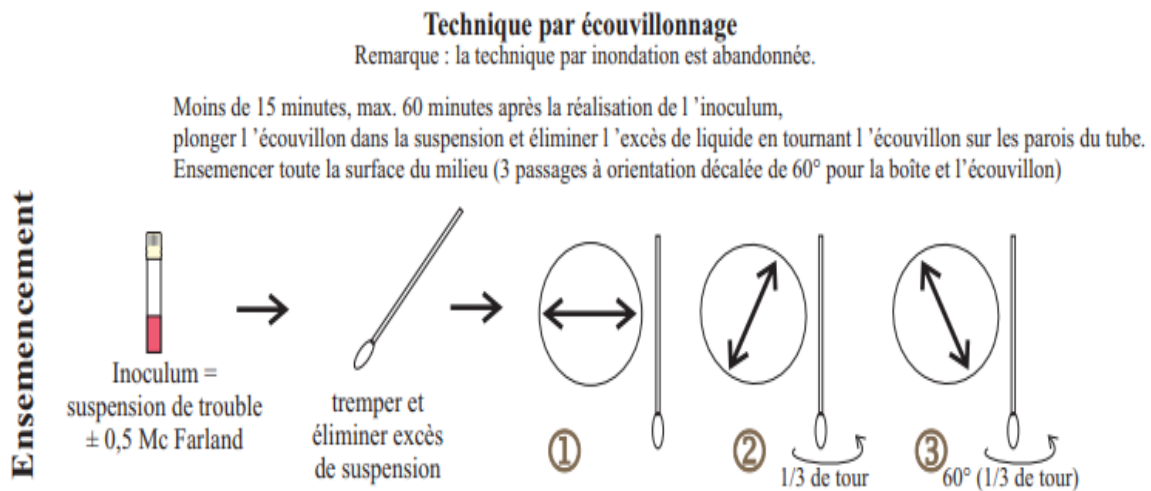
Suite à la préparation du milieu non sélectif gélosé Mueller-Hinton, une dilution au 1/10 dans l'eau physiologique (0,9 % NaCl) est préparée et bien homogénéisée (figure 10). Elle est équivalente au standard McFarland 0,5.



**Figure 10 : Réalisation de l'inoculum**

**Remarque :** cette préparation est directement utilisée comme inoculum

-Ensemencement de l'inoculum sur milieu gélosé

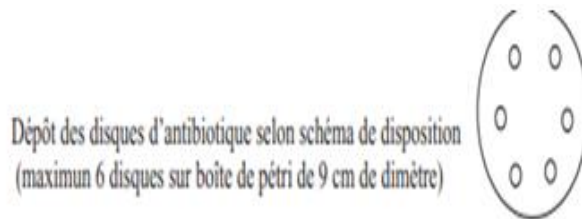


**Figure 11 : Ensemencement de l'inoculum par écouvillonnage**

Dépôt des disques :

Nous disposons de tubes à essai portant le nom de différents antibiotiques

Avec la pince fine, on prend une pastille de papier filtre et on la trempe dans un des tubes à essai puis on dépose sur la gélose en suivant le schéma ci-contre :



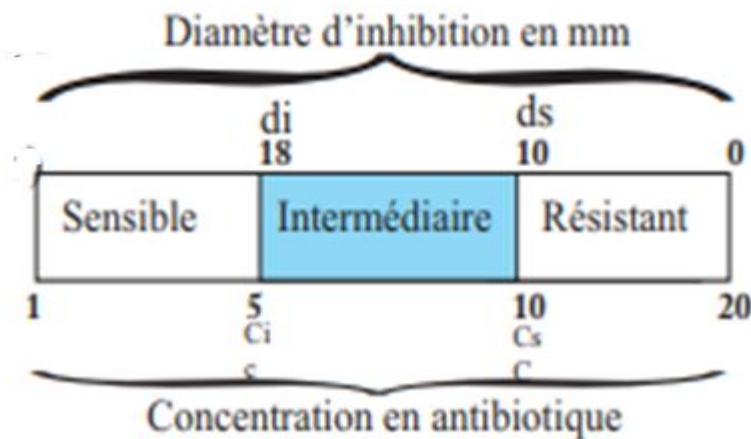
**Figure 12 : Dépôt des disques d'antibiotiques sur milieu gélosé**

**Remarque :** incubation rapide dans les 15 min qui suivent le dépôt des disques (au delà de 30 min les zones d'inhibition seront faussement agrandies)

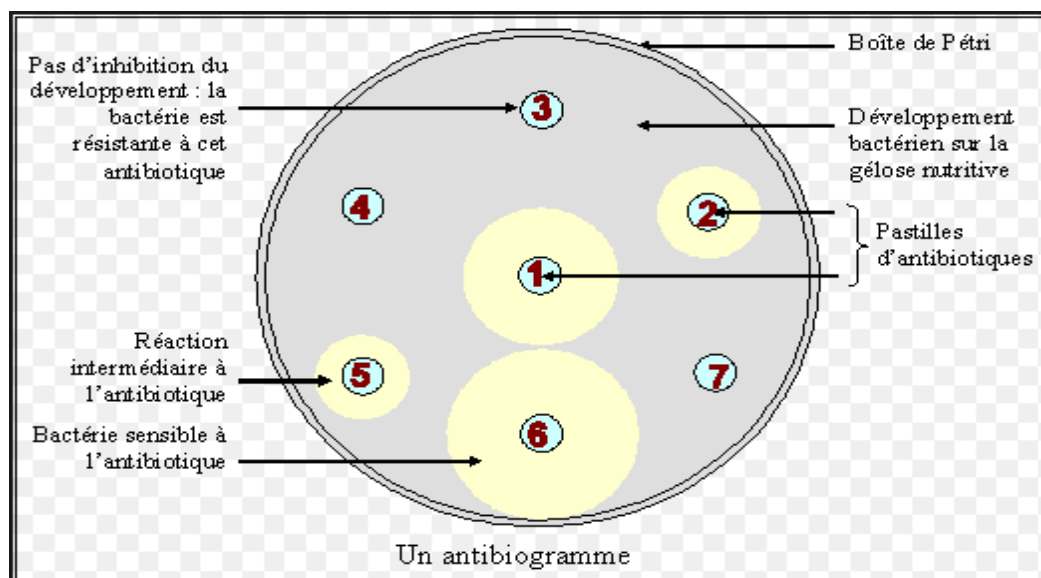
Lecture d'antibiogramme :

L'efficacité d'un antibiotique vis-à-vis d'une colonie bactérienne est directement visible en évaluant le diamètre (ou le rayon) de l'anneau entourant la pastille contenant l'antibiotique (figure 14).

Les résultats pour chaque disque d'antibiotique sont interprétés selon les recommandations fournies par le CASFM en: sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R) (figure 13).



**Figure 13 : Classification selon les diamètres d'inhibitions**



**Figure 14 : Schéma représentant un antibiogramme**

## II. Réalisation de l'antibiogramme pour les *Entérobactéries* et les *staphylocoques*

Nous avons réalisé l'antibiogramme pour déterminer la résistance des *entérobactéries* et de *staphylocoques* vis-à-vis des antibiotiques spécifiques.

### 1. Les *Entérobactéries*

-Les *entérobactéries* sont des bacilles gram négatif, qui se retrouvent dans les matières fécales des animaux et des humains.

Afin de déterminer la résistance des entérobactéries aux bêta-lactamines, nous avons réalisé l'antibiogramme sur *Escherichia coli* Comme exemple d'E-BLSE (*Entérobactérie* productrice de Beta-Lactamase à Spectre Élargi).

**Tableau 3 : Les antibiotiques spécifiques à *E. coli***

Sigle	Antibiotique	Famille	Charge du disque (µg)
<u>AM</u>	Ampicilline	Aminopénicilline	10
<u>AMC</u>	Amoxicilline + acide clavulanique	Aminopénicilline	25/10
<u>AN</u>	Amikacine	Aminosides	30
<u>CAZ</u>	Céftazidimes	Céphalosporine 3ème génération	30
<u>CIP</u>	Ciprofloxacine	Fluoroquinolone	5
<u>CN</u>	Céfalexine	Céphalosporine 1ère génération	30
<u>CTX</u>	Céfotaxime	Céphalosporine 3ème génération	30
<u>FEP</u>	Céfépime	Céphalosporine 3ème génération	30
<u>FOX</u>	Céfoxitine	Céphalosporine 2ème génération	30
<u>IPM</u>	Imipénème	Carbapénème	10
<u>NA</u>	Acide nalidixique	Quinolones 1ère génération	30
<u>NOR</u>	Norfloxacine	Fluoroquinolone	5
<u>SXT</u>	Triméthoprim/sulfaméthoxazole (cotrimoxazole)	Sulfamides-Triméthoprim	1,25/23,75



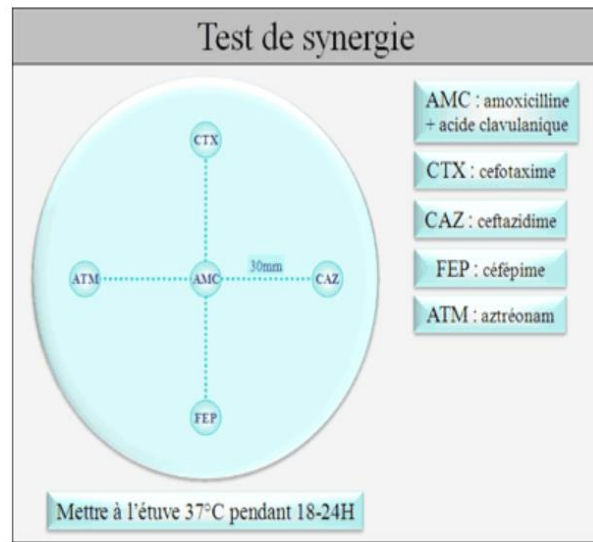
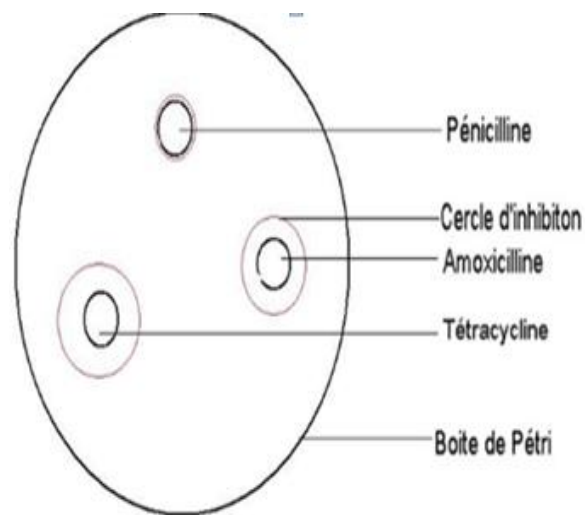


Figure 15 : La disposition de quelques

Figure 16 : Test de synergie des E.BLSE

### Antibiotiques spécifiques à *E. coli*

#### 2. Les staphylocoques

Les *Staphylocoques* sont des Cocci à Gram positif classiquement disposés en amas, immobiles, non sporulés qui se retrouvent fréquemment chez les personnes en bonne santé, habituellement dans la muqueuse du nez.

Nous avons réalisé l'antibiogramme pour *Staphylococcus aureus* pour déterminer sa résistance à la méticilline.

Tableau 4 : Les antibiotiques spécifiques à *staphylococcus aureus*

Sigle	Antibiotique	Famille	Charge du disque (µg)
<u>P</u>	Pénicilline G	Pénicillines	6
<u>FOX/CX</u>	Céfoxitine	Céphalosporine 2ème génération	30
<u>CN</u>	Céfalexine	Céphalosporine 1ère génération	10
<u>E</u>	Erythromycine	Macrolides	15
<u>CM/CC</u>	Clindamycine	Lincosamides	2
<u>NOR</u>	Norfloxacine	Fluoroquinolone	5
<u>COT</u>	Cotrimoxazole		
<u>FA</u>	Acide fusidique	Divers	10
<u>RA</u>	Rifampicine	Divers	30
<u>TM</u>	Tobramycine	Aminosides	10
<u>TE</u>	Tétracycline	Tétracyclines	30
<u>FOS</u>	Fosfomycine	Divers	50

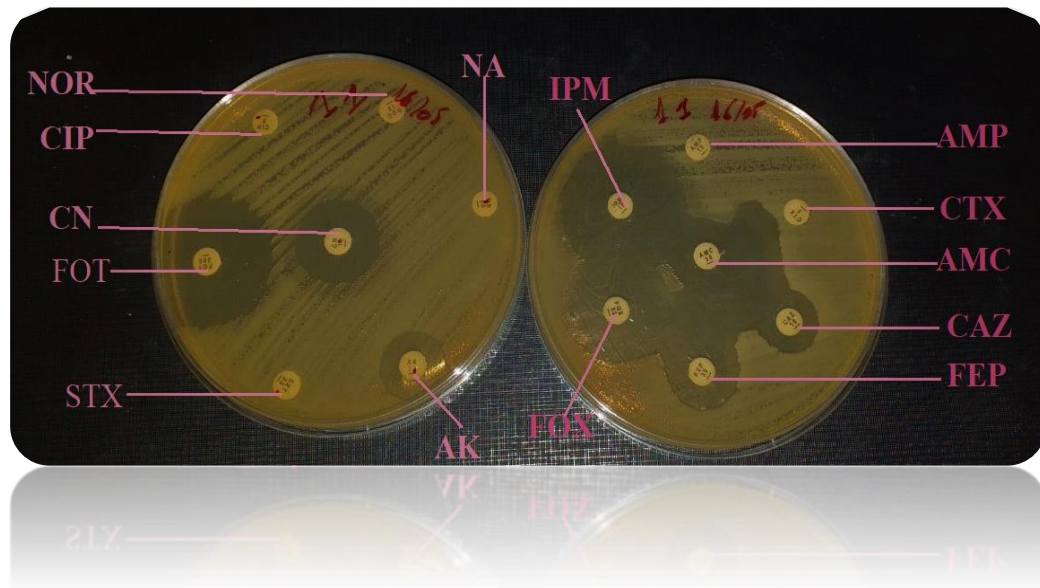
*Chapitre III :*

*Résultat et discussion*

Les résultats de ce travail concernent l'étude de la résistance des *Entérobactéries* productrices des bêta-lactamines à spectre étendu (E-BLSE) et la résistance des *Staphylococcus aureus* à la méticilline (SARM).

### I. Réalisation d'un antibiogramme chez *E. coli*

Nous avons réalisé l'antibiogramme pour une souche d'*E. coli* et nous avons obtenu le résultat suivant :



**Figure 17 : Antibiogramme réalisé pour *Escherichia coli***

Nous avons testé 14 types d'antibiotiques dans l'ordre suivant :

**Tableau 5 : Les antibiotiques testés sur *E. coli***

AMP : Ampicilline	CN : Céfalexine
AMC : Amoxicilline + acide clavulanique	NA : Amikacine
FOX : Céfoxitine	CIP : Ciprofloxacine
CTX : Céfotaxime	STX : Triméthoprième/sulfaméthoxazole
IPM : Imipénème	NOR : Norfloxacine
CAZ : Ceftazidime	AK : Amikacine
FEP : Céfépime	FOT :

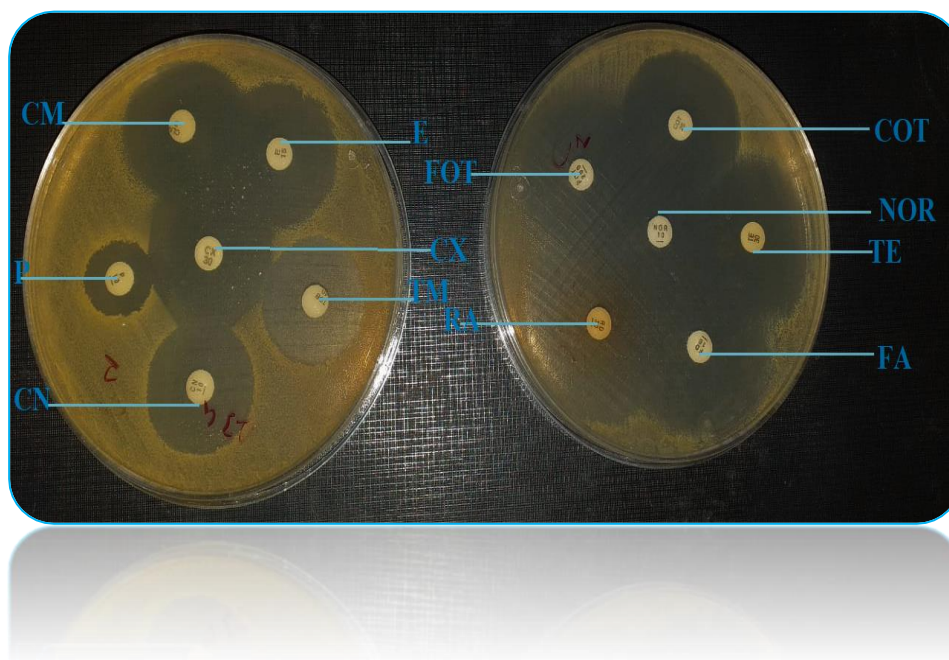
-Les résultats obtenus montrent que *E. coli* est résistante à : IPM, FOX, CAZ, FEP, AMC NOR, AK et FOT. Par contre cette bactérie est sensible à CTX et AMP, NA, NOR, STX et CIP . Ce qui montre que cette souche est résistante à de nombreux antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines. Il s'agit donc d'une souche E.BLSE (*Entérobactérie* productrice de Beta-Lactamase à Spectre Élargi). En plus, le résultat obtenu (Figure 17) montre la formation d'un bouchon de champagne entre AMC et CAZ, ce qui indique que le test de synergie entre ces deux antibiotiques est positif.

-Ce travail montre que la souche d'*E. coli* est résistante de nombreux antibiotiques. Cette résistance est un phénomène très répandu qui présente une menace potentielle pour la santé.

D'après le rapport de l'observatoire National de l'Epidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques (ONERBA, 2013-2014), le pourcentage de souches d'*E. coli* et d'*Entérobactéries* résistantes est en augmentation constante depuis quelques années. Ce pourcentage était inférieur à 1% avant 2002, par contre aujourd'hui ces souches constituent 6 à 7%. La surveillance des souches E.BLSE (résistantes à plusieurs antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines) est fondamentale pour mieux comprendre leur dissémination.

## II. Réalisation d'un antibiogramme chez *Staphylococcus aureus*

Nous avons réalisé un antibiogramme pour étudier la résistance de *Staphylococcus aureus* et nous avons obtenu le résultat suivant :



**Figure 18 : Antibiogramme réalisé pour *staphylococcus aureus***

**Tableau 6 :** Les antibiotiques testés sur *Staphylococcus aureus*

COT : Cotrimoxazole	P : Pénicilline G
FOT : Fosfomycine	CN : Céfalexine
NOR : Norfloxacin	TM : Tobramycine
TE : Tétracycline	CX : Céfoxitine
RA : Rifampicine	E : Erythromycine
FA : Acide fusidique	CM : Clindamycine

Ces résultats montrent que la souche utilisée est résistante à l'ensemble des antibiotiques testés.

La céfoxitine permet de détecter 100% des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline (souche SARM) [24,25]. Ainsi la souche étudiée peut être considérée comme étant résistante à la méticilline.

Les recommandations pour le contrôle des SARM mettent l'accent sur les mesures « hygiéniques » visant à prévenir la transmission par manuportage. Certains auteurs estiment que le contrôle de l'utilisation des antibiotiques, s'ajoutant aux précédentes mesures, est la meilleure approche pour contrôler la pandémie à SARM.

### **Conclusion :**

Ce travail nous a permis de mettre nos connaissances théoriques en pratique, en apprenant les différentes techniques d'identification biochimique des micro-organismes ainsi que la méthode de réalisation et d'interprétation des antibiogrammes.

Deux souches (*E. coli* et *S. aureus*) d'origine clinique ont été testées pour leur sensibilité aux antibiotiques. Les résultats obtenus montrent que la souche d'*E. coli* correspond à une souche E-BLSE résistante à de nombreux antibiotiques. De même, cette étude montre que la souche de *S. aureus* testée est également multirésistante. Cette souche est de type SARM puisqu'elle présente une résistance à la méticilline.

La problématique de l'antibiorésistance des bactéries concerne tous les acteurs de la santé humaine. Ce travail met le point sur l'importance de la surveillance de la résistance des germes aux antibiotiques. Ce contrôle doit être réalisé périodiquement pour prévenir la survenue des infections d'origine alimentaire et pour une meilleure détermination du profil de résistance des bactéries circulant dans une région donnée.

## Liste des références :

- [ 1 ] Institut de veille sanitaire InVs <http://invs.santepubliquefrance.fr/> et Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé ANSM <https://ansm.sante.fr/>
- [ 2 ] P.Courvalin , F.goldstein , A.philippon ,J.siro (1985), L'antibiogramme 1<sup>er</sup> édition mpc-vidéom
- [ 3 ] MOREL Anne-Sophie, thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie ( 2017). Fosfomycine et lincomycine sur Staphylococcus aureus et non aureus Proposition de diamètres critiques. Concentrations minimales bactéricides de la lincomycine. Université d'Aix-Marseille – Faculté de Pharmacie AIX Marseille Université, spécialisées de biologie médicale
- [ 4 ] MAZRI Radhia , thèse doctorat en sciences ( 2015 ). Nouvelle approche des relations structures activités dans des molécules antibiotiques (these doctorat). Université Mohamed Khider biskra-Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la vie, Département des Sciences de la Matière.
- [ 5 ] Levy SB, Marshall B: Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nat Med.2004, 10 : 122-129. 10.1038/nml 145
- [ 6 ] HNICHA Hajar , thèse pour l'obtention du doctorat en médecine (2017). La résistance bactérienne: Mécanismes et méthodes de détection au laboratoire.Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès.
- [ 7 ] P. Vuillemin. Antibiose et symbiose, Association française pour l'avancement des sciences, compte rendu de la 18<sup>e</sup> session, seconde partie, Notes et mémoires, vol. 11 (1890), p. 525-543
- [ 8 ] Hehre W J. Practical Strategies for Electronic Structure Calculations Wave function Inc Irvine California 1995.
- [ 9 ] Kier LB. Molecular Orbital Theory in Drug Research Academic Press New York NY USA 1971.
- [ 10 ] Agirbas H, Guner S, Budak F .Bioorg Med Chem 2007; 15: 2322–2333  
<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jm960023h>.
- [ 11 ] Paul Singelton (2004). Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies 6<sup>e</sup> édition.
- [ 12 ] [www.sofia.medicalistes.fr](http://www.sofia.medicalistes.fr)
- [ 13 ] Aboya Moroh J-L, thèse doctorat (2013). Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes issues de Morinda morindoides. Agricultural sciences. Université de Bretagne occidentale – Brest ; Université Félix Houphouët- Boigny.
- [ 14 ] Organisation mondiale de la santé (OMS) thème de santé .résistance aux médicaments  
<https://www.who.int/fr> .

- [ 15 ] Lahlou-Amine I. et Baaj A.J, (2002). résistance bactérienne aux antibiotiques. Animalis, , vol 1, n° 3, pp. 8-16
- [16] Wright G.D., Bacterial resistance to antibiotics : enzymatic degradation and modification, Adv. Drug Deliv.Rev., 2005,57, 1451-1470
- [ 17 ] Henriques Normak B. et Normar S, (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. Journal of internal medicine, vol 252, pp. 91-106
- [ 18 ] Baudry C. Brézellec H, (2006). Microbiologie, immunologie. 2ème édition. Groupe Liaisons, 126p. ISBN (2915585261).
- [ 19 ] Muhire Jean Berchimas, mémoire master (2015). Etude du Portage Nasal de Staphylococcus aureus et des Infections du site opératoire en chirurgie Orthopédique. Faculté des Sciences et Techniques – Fès Master Sciences et Techniques :Biotechnologie microbienne.
- [ 20 ] Gaëtan Bourgoïn, thèse doctorat (2017). Étude de la sensibilité aux antibiotiques par méthode semi-automatisée en milieu liquide de 293 souches consécutives de Escherichia coli isolées d'ECBU au CHU de Rouen: apport de la méthode E-Test® pour l'évaluation de la sensibilité à l'association amoxicilline-acide clavulanique. Sciences pharmaceutiques. 2016. HAL Id :dumas-01413493.
- [ 21 ] Seydina M. Diene, thèse doctorat (2016). Détermination de la sensibilité et de la résistance des bactéries aux agents antimicrobiens. Association des Enseignants de Microbiologie et d'Immunologie des Facultés de Pharmacie .
- [ 22 ] CASFM. Recommandations 2014 CASFM <https://www.sfm-microbiologie.org/2019/05/06/casfm-eucast-2019-v2/> consulté le 20 avril 2019.
- [ 23 ] Stéphanie Faure, thèse doctorat(2010). Transfert d'un gène de résistance aux beta-lactamines blaCTX- M -9 entre Salmonella et les entérobactéries de la flore intestinale humaine: influence d'un traitement antibiotique. Médicaments. Université Rennes 1, 2009. Français. HAL Id : tel-00449376.
- [ 24 ] [http://nosobase.chu-lyon.fr/recommandations/cclin\\_arlin/cclinOuest/2007\\_BMR\\_CCLIN.pdf](http://nosobase.chu-lyon.fr/recommandations/cclin_arlin/cclinOuest/2007_BMR_CCLIN.pdf)
- [ 25 ] [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com) dernière consultation le 8/06/2019



