



**Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche  
Scientifique  
Université Ziane Achour DE Djelfa**



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

**Module: Microbiologie**

**Niveau: L2 (Sciences Biologiques, Sciences Agronomiques , Ecologie  
Environnement et Sciences Alimentaires)**

**TP 04: Etude de la sensibilité aux antibiotiques  
(L'antibiogramme)**

**Préparé par :  
Melle BENMOUAFFEKI FATIMA (M.A.A)**

## **Connaissances préalables recommandées :**

-L'étudiant doit avoir une notion globale sur les agents pathogène , la croissance bactérienne et les agents antimicrobiens .

## **Ressources d'aide :**

- Les livres et les articles suivants sont des références qui peuvent aider les étudiants :  
apport d'une meilleure compréhension, développement d'un sujet d'intérêt:

- Mims' medical microbiology, Mims C. et al, 5th Ed.,2012, Elsevier

- Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from

Animals; Approved Standard –Second edition. NCCLS : Document M31- A2- Vol.22

N°6 May 2002.

- Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Informational Supplement. NCCLS : Document M31- S1- Vol.24 N°.17 May 2004.
- Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie – Communiqué Janvier 2005.
- Introduction à la microbiologie, Tortora G.J. et al, 2nd Ed., 2012, ERPI, Editions du Renouveau Pédagogique Inc.

➤ **Site web recommandé :**

**<http://www.microbes-edu.org>**

➤ **Des liens de quelques vidéos :**

**<https://www.youtube.com/watch?v=Co8JE7yLRjI>**

**[https://www.youtube.com/watch?v=\\_Vv6Z0HeECM](https://www.youtube.com/watch?v=_Vv6Z0HeECM)**

**<https://www.youtube.com/watch?v=z20GceXwfEQ>**

# INTRODUCTION

La lecture d'un antibiogramme est semée d'embûches qu'il faut savoir reconnaître avant de prescrire un antibiotique. Avec l'augmentation croissante de bactéries résistantes aux agents anti-infectieux, l'antibiogramme est devenu un outil indispensable dans le choix judicieux de l'antibiotique. Il existe une résistance naturelle et une résistance acquise aux antibiotiques. Par exemple *Escherichia coli* est naturellement résistant à la pénicilline alors que la résistance à l'ampicilline peut être acquise. Les résistances naturelles ne posent pas de problème au médecin car elles sont définies et bien connues.

En revanche, le développement de résistances acquises des bactéries pose un problème en raison du principe d'incertitude qu'elles introduisent dans l'efficacité de la prescription empirique d'un antibiotique et de l'impasse thérapeutique qui peut en résulter.

## Objectifs:

- *La mise en évidence de la sensibilité des souches bactériennes vis à vis quelques antibiotiques;*
- *La lecture d'un antibiogramme;*
- *Suivi de la croissance des microorganismes en présence d'un antibiotique ;*
- *Détermination de CMI et la CMB .*
- *l'appropriation et le développement de concepts fondamentaux en microbiologie tout en développant l'esprit d'observation, d'analyse et de synthèse. Les liens avec d'autres disciplines seront favorisés tant en théorie qu'en pratique. De plus, les activités d'apprentissage permettront d'y appliquer la démarche scientifique.*

# L'antibiogramme

Pour ce but, deux types de méthodes ont été abordés en vue de mettre en évidence les effets antimicrobiens des antibiotiques:

Étude qualitative de l'effet antibactérien des antibiotiques (test de criblage);

Études quantitative de l'effet antibactérien des antibiotiques, en déterminant la CMI et la CMB, en En se basant sur les essais préalables d'antibiogramme sur un milieu gélosé .

## **NB:**

Deux notions sont à connaître avant de faire un antibiogramme :

- La **CMI** ou Concentration Minimale Inhibitrice. Il s'agit de la concentration de l'antibiotique la plus faible pour laquelle la croissance bactérienne est inhibée (pas de croissance de la population ; 100% de survivants)

- La **CMB** ou Concentration Minimale Bactéricide. C'est la concentration de l'antibiotique la plus faible permettant de détruire 99.99% des bactéries présentes au départ (soit une bactérie survivante sur 10000). Si  $CMB < 5 CMI$  l'antibiotique est très efficace.

Au contraire si  $CMB > 10 CMI$ , on le considère peu efficace.

## Principe:

Le principe de l'antibiogramme par la méthode de diffusion des disques sur gélose consiste à appliquer un disque contenant un antibiotique, sur un milieu gélosé Mueller Hinton (M.H) préalablement coulé dans les boîtes de pétri et ensemencé par 1ml de micro-organismes testés ( $10^7$  ufc/ml). afin de voir quels effets il joue sur la bactérie ciblée.

## Matériels nécessaire :

- 5 boites de pétri
- Une suspension bactérienne
- Du désinfectant
- Un bec Bunsen
- Des pinces stériles
- Pipettes graduées, pro-pipettes
- Râteaux
- Antibiotiques à tester.

## Protocole

5 boîtes de gélose sont nécessaires à cette manipulation :

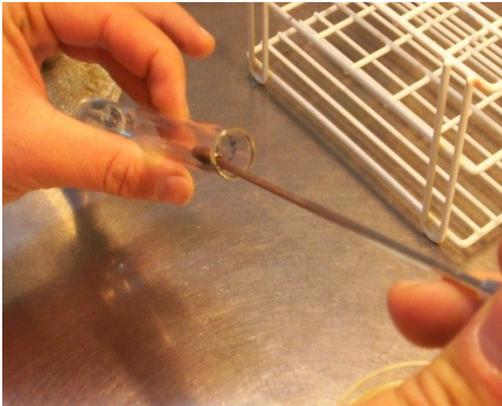
- 1 boîte témoin (sans aucun antibiotique, seulement la suspension bactérienne).
- Des boîtes contenant 3 antibiotiques différents
- 1 boîte contenant de la pénicilline G.
- 1 boîte contenant de l'ampicilline.
- 1 boîte contenant de la Tétracycline.

**NB : Pour des raisons évidentes de sécurité, la seule souche bactérienne manipulable pour nous est celle de la bactérie E. Coli.**

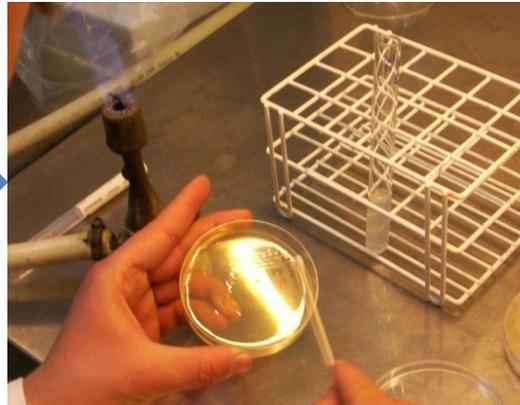
# Mode opératoire

- Couler la gélose dans une boîte de pétri ;
- Laisser prendre en masse;
- Prélever 2 ou 3 gouttes de la suspension bactérienne, les déposer à la surface de la gélose les étaler avec un râteau;
- S'assurer que la surface de la gélose est bien séchée, et y déposer les disques de celluloses imprégnées d'antibiotique;
- Placer la boîte de pétri à basse température  $+4^{\circ}\text{C}$  pendant 15 à 30 mn afin de permettre aux antibiotiques de diffuser dans la gélose avant que les bactéries ne commencent à se multiplier :
- Retirer la boîtes du réfrigérateur et la placer dans l'incubateur, à la température optimale de croissance du germe à étudier ( $37^{\circ}\text{C}$ ) pendant 24 h Rappel : les boîtes doivent être placées couvercle en bas

# Technique de l'antibiogramme



**Préparation de l'inoculum**



**Ensemencement**



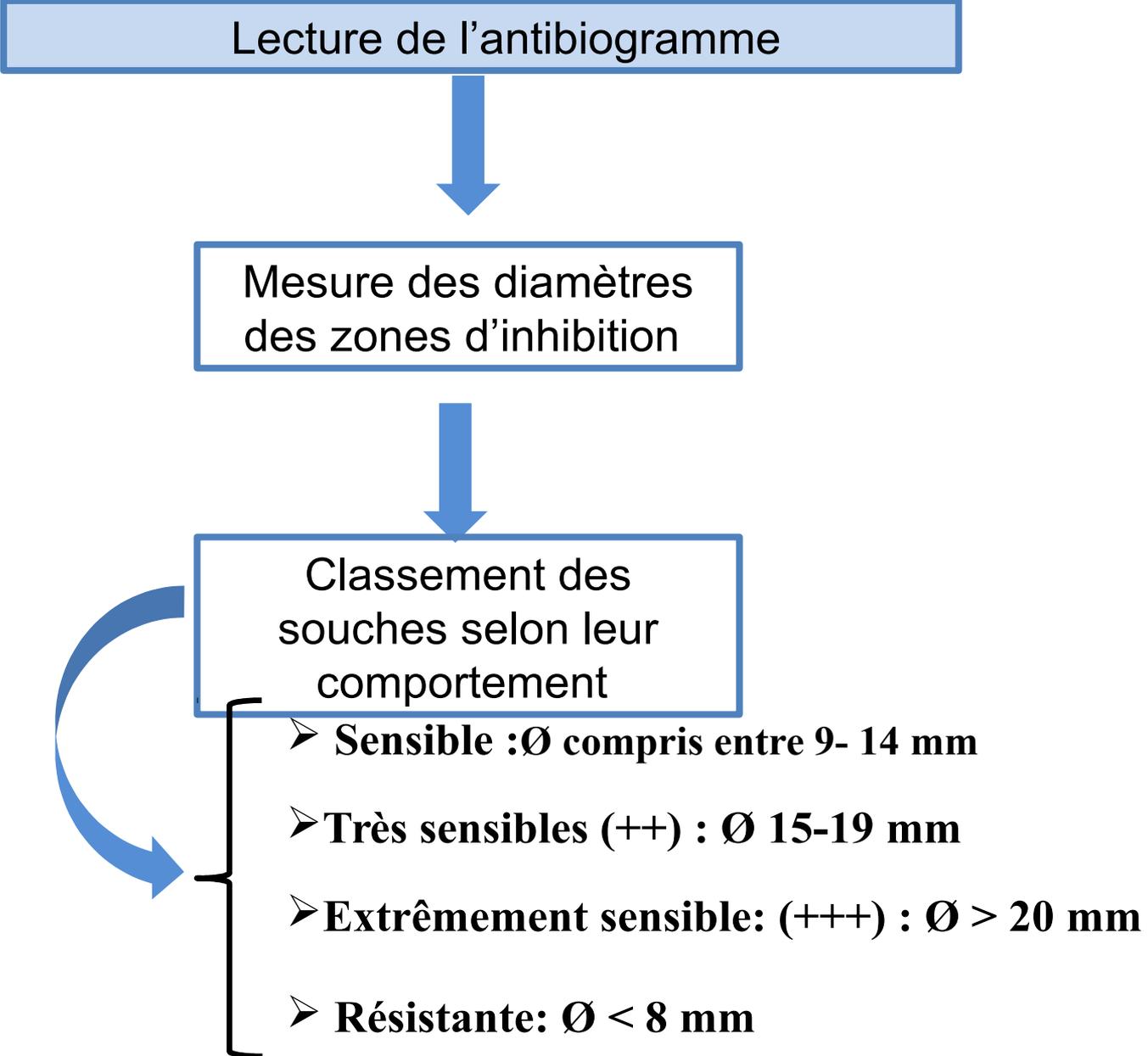
**Application des disques**



**Lecture des résultats: Mesure des diamètres des zones d'inhibition**



Lecture de l'antibiogramme



```
graph TD; A[Lecture de l'antibiogramme] --> B[Mesure des diamètres des zones d'inhibition]; B --> C[Classement des souches selon leur comportement]; C --> D[➤ Sensible : Ø compris entre 9- 14 mm]; C --> E[➤ Très sensibles (++) : Ø 15-19 mm]; C --> F[➤ Extrêmement sensible: (+++) : Ø > 20 mm]; C --> G[➤ Résistante: Ø < 8 mm];
```

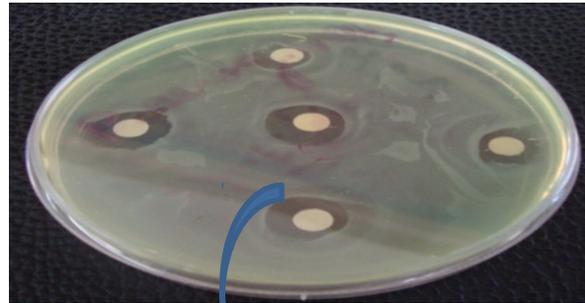
Mesure des diamètres  
des zones d'inhibition

Classement des  
souches selon leur  
comportement

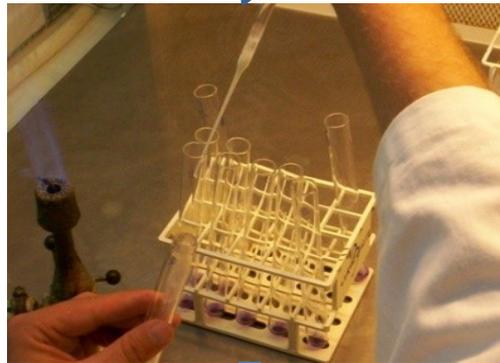
- **Sensible** : Ø compris entre 9- 14 mm
- **Très sensibles (++)** : Ø 15-19 mm
- **Extrêmement sensible: (+++)** : Ø > 20 mm
- **Résistante**: Ø < 8 mm

# Détermination de la nature de l'activité antibactérienne des ATB testés

Aromatogrammes de  
48h



Prélèvement à partir  
de la zone d'inhibition



Ensemencer le bouillon BHIB

Incubés à 37°C pdt 24h

Milieu BHIB clair  
Activité bactériicide

Milieu BHIB trouble  
Activité bactériostatique

Détermination de la CMI et la CMB

Détermination de la CMI

## Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI):

Afin de pouvoir conclure sur la sensibilité d'une souche à un antibiotique donné, il faut déterminer sa CMI

vis à vis de cette molécule. Plusieurs méthodes sont à la disposition du laboratoire. On différencie :

- les techniques en milieu liquide (en tube, en microplaque) - la technique en milieu solide gélosé (Etest)
- Dans ce TP ,nous avons utilisé la méthode de la macrodilution en milieu liquide

**La méthode de dilution en milieu liquide (Macrométhode):** consiste à préparer une série de vue à hémolyse avec le même milieu de culture liquide (deux ml) puis constituer une gamme de concentrations de l'antibiotique à tester, par exemple 0,5 mg/l 1, 2, 4, 8, 16 (raison géométrique de base 2).

Il reste un tube (contrôle) ou témoin de croissance de la souche à tester. Enfin on ajoute la même quantité de germes dans chacun tube (inoculum). La galerie ainsi préparée sera incubée à 37°C pendant 18 heures. Enfin elle sera examinée à l'oeil nu et dans l'exemple ci-dessous, la CMI sera la concentration en antibiotique la plus faible pour laquelle il n'y a pas de croissance visible. En fait, elle est comprise entre le tube correspondant à cette définition et le premier tube dans lequel une croissance est observée.



**Détermination de la CMI en milieu liquide en tube**

# Compte-rendu

- Détails techniques nécessaires et suffisants dans le cadre du travail proposé.
- L'étudiant doit remplir le tableau ci-dessous en enregistrant les résultats obtenus suivi du commentaire (Lecture interprétative de l'antibiogramme).

<b>L'antibiotique</b>	<b>diamètres de zone d'inhibition.</b>	<b>CMI</b>	<b>CMB</b>
<b>la pénicilline G</b>			
<b>l'ampicilline</b>			
<b>la Tétracycline</b>			