

République Algérienne
Démocratique et Populaire
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
Centre Universitaire de Jijel
Institut des Sciences de la Nature

الجمهورية الجزائرية
الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي
و البحث العلمي
المركز الجامعي - جيجل -
معهد علوم الطبيعة

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme d'étude supérieur
en biologie moléculaire et cellulaire
Option : Microbiologie

Thème

INTERACTION DE DIFFERENTS MILIEUX
DE CULTURE
SUR LE DEVELOPPEMENT OU NON D'UNE
RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES
D'UNE SOUCHE
D'ESCHERICHIA COLI (E.coli).

Jury :

Président : M^r. KISSERLI O.
Examineur : M^{eme} ROULA S.
Encadreur : M^r BOUNAMOUS A.
Co-encadreur : M^r ZABAYOU K.

Réalisé par :

- **CHETIBI Farida**
- **MERMOUDA Lynda**
- **TOUBANE Fouzia**

PROMOTION : *Octobre*

Numéro d'ordre :

Année Universitaire : 2000 - 2001



REMERCIEMENT

R E M E R C I E M E N T

Nous souhaitons toutes les trois remercier vivement toutes les personnes qui nous ont aidés précieusement à la conception du rapport, par leurs savoirs et leurs techniques. Ils nous ont été indispensables pour réaliser convenablement ce mémoire.

Et particulièrement Monsieur ZABAYOU.K et les gens du labo d'hygiène et de l'Institut de la Nature et de la vie au Centre Universitaire de Jijel.

CHETIBI Farida
MERMOURDA Lynda
TOUBANE Fouzia

DEDICACE

D E D I C A C E

Nous souhaiterions dédicacer ce mémoire à certaines personnes de notre entourage pour leurs soutiens et leur présence lors de la conception de notre mémoire. Ils nous ont été très précieux à nos yeux.

CHETIBI Farida. Je souhaiterai dédicacer mon mémoire :

- A mes parents, à mes frères, à mes sœurs et à la famille CHETIBI et BOUDJEMIA.
- A monsieur ZABAYOU K. qui nous a aidé à la réalisation de ce mémoire.

MERMOUDA Lynda. Je souhaiterai dédicacer mon mémoire :

- A mes parents, à mes frères, à ma sœur et à la famille MERMOUDA et BOUTASSATA
- A monsieur ZABAYOU K. qui nous a aidé la réalisation de ce mémoire.

TOUBANE Fouzia. Je souhaiterai dédicacer mon mémoire :

- A mes parents, à mes frères, à mes sœurs.
- A monsieur ZABAYOU K. qui nous a aidé la réalisation de ce mémoire.

**INTERACTION DE DIFFERENTS MILIEUX DE
CULTURE
SUR LE DEVELOPPEMENT OU NON D'UNE
RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES D'UNE
SUCHE
D'ESCHERICHIA COLI (E.COLI).**

S O M M A I R E

Sommaire	Page
I- INTRODUCTION.....	11
II- ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	
II-1- Description de l'E.coli.....	13
1.1- <u>Habitat naturel</u>	13
1-2- <u>Classification</u>	13
1-3- <u>Domaine pathologique</u>	14
1-4- <u>Morphologie</u>	14
1-5- <u>Caractères Culturels</u>	14
1-6- <u>Caractères Biochimiques</u>	16
1-7- <u>Caractères antigéniques</u>	17
1-8- <u>Milieus de culture pour E.Coli</u>	17
- Milieux d'isolement	
- Milieux d'identification.	
II-2- Comportement de la souche vis-à-vis des antibiotiques.....	18
2-1- <u>Historique et définition des antibiotiques</u>	18
2-2- <u>Classification générale des antibiotiques</u>	18

2-3- Sites d'action des antibiotiques dans la bactérie.....	23
1- <i>Antibiotiques agissant au niveau de la paroi.....</i>	23
2- <i>Antibiotiques agissant au niveau de la membrane Cytoplasmique.....</i>	23
3- <i>Antibiotiques agissant au niveau de la synthèse des protéines.....</i>	24
4- <i>Antibiotiques agissant au niveau de l'information génétique.....</i>	24
2-4- Résistance des bactéries aux antibiotiques.....	26
• Résistance naturelle ou spontanée.....	26
• Résistance acquise ou provoquée.....	27
• Mécanismes génétiques de la résistance.....	27
1. Résistance chromosomique.....	27
2. Résistance extra chromosomique....	28
2-5- Détermination de la sensibilité des bactéries aux Antibiotiques.....	30
- Détermination de la CMI (Bactériostase).....	30
- Détermination de la CMB (Bactéricide).....	31

III- MATERIELS ET METHODES

III-1- Matériels.....	35
1-1- <u>Appareillage</u>	35
1-2- <u>Milieux de culture</u>	35
1-3- <u>Antibiotiques utilisés</u>	36

III-2- Méthodes.....	38
IV- RESULTATS.....	43
V- DISCUSSION.....	46
VI- CONCLUSION.....	48
ANNEXES	
BIBLIOGRAPHIE	

I- INTRODUCTION

I- INTRODUCTION

Sans aucun doute, les antibiotiques représentent actuellement l'un des groupes des médicaments les plus employés en médecine. Leur utilisation clinique a radicalement modifié le pronostic des maladies Infectieuses d'origine bactérienne (4).

A cause de l'apparition des souches bactériennes résistantes rencontrées en pathologie infectieuse, il est devenu primordial de reconnaître avec certitude, la sensibilité ou la résistance d'une bactérie vis-à-vis des antibiotiques qui est généralement évalué au laboratoire par la méthode de l'antibiogramme (4)

La résistance bactérienne aux antibiotiques peut être naturelle ou acquise.

La résistance naturelle (spontanée) est un caractère présent chez quelques souches bactériennes appartenant à la même espèce (17).

La résistance acquise n'apparaît que chez quelques souches d'une espèce donnée normalement sensibles, elle résulte en générale d'une mutation chromosomique (ou parfois extra-chromosomique) soit de l'acquisition d'un (ou plusieurs) gène(s) qui rend(ent) la bactérie insensible à l'antibiotique (11).

Notre travail consiste à tester les influences de différents milieux de culture sur le développement ou non d'une résistance aux antibiotiques sur une souche d E.coli après repiquages successifs de cette dernière sur ces milieux.

II- ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

II-1-3- Domaine pathologique

Le rôle pathogène du germe dans son habitat normal, a été depuis longtemps discuté, en règle, il est nul ; Seules quelques rares variétés de colibacilles aujourd'hui identifiées par leur constitution antigénique, paraissent être à l'origine de diarrhées chez le nourrisson et l'enfant, ou même de toxicoses mortelles (9).

Chez l'adulte, c'est seulement lors qu'une lésion de la paroi existe (hernie étranglée, cancer) que le franchissement de la muqueuse intestinale par la colibacille lui permet de déterminer des complications infectieuses locales (9).

Par contre, les localisations extra intestinales pathologiques ; Les plus fréquentes concernent les voies urinaires et les voies biliaires (9).

II-1-4- Morphologie

Bâtonnets droits de 2 à 3 μ de long sur 0,6 μ de large, asporulés, non capsulés, mobiles grâce à des cils peritriches et gram négatifs (15,17).

II-1-5- Caractères cultureux :

Aérobies anaérobies facultatifs, ils cultivent facilement sur les milieux à une température optimale de 37°C et un PH optimum de 7. Leur vitalité est sensible à l'action de la chaleur (tues en un heure à 56°C), du chlore et de ses dérivés, mais résistent à l'acide phénique en solution à 1% (17).

On les conserve très facilement en culture à 4°C. Ils ne sécrètent pas de toxines solubles, mais ils ont une endotoxine (antigène 0) qui présente les caractères de celle des entérobactéries (17).

- En bouillon nutritif : trouble homogène abondant avec une onde moirée et dépôt grisâtre, parfois léger voile en surface.

- Sur gélose nutritive : colonies arrondies, de 2 à 3 mm de diamètre, humides et brillantes, de couleur blanchâtre ou légèrement jaunâtre.

- Sur milieux sélectifs :

- Colonies de coloration rouge brique (sur milieu SS).
- Colonies épaisses et brillantes jaune-verdâtre sur milieu de kristensen
- Colonies petites violets-foncés avec reflet métallique sur milieu à l'éosine bleu de méthylène de lévine (17)
- Colonies plates :
 - Rose saumon sur hektoen
 - Jaunes sur gélose lactosé au bromocrésol pourpre (BCP)
 - Rose sur mac conkey.
- Colonies petites de couleur violette sur l'endo (avec reflet métallique)



II-1-6- Caractères biochimiques : (16)

Mobilité	+	<u>Légende :</u>
Lactose	+ ou x	
Tcstc ONPG	+	LDC : Lysine Décarboxylase
H ₂ S	-	ODC : Ornithine Décarboxylase
LDC	d	ADH : Argénine Dihydrolase
ODC	d	TDA } des aminases du Tryptophane PDA } et de la phénylalanine.
ADH	d	
Uréase	-	ONPG : Ortho-nitro-phenyle-B-D- glactopyranoside.
TDA,PDA	-	VP : Voges- proskawer.
Indol	+	RM: Rouge de Méthyle
Citrate de simmons	-	TTR :Tétrathionate réductase
Malonate	-	d : Différents type biochimiques
VP	-	x: Tardivement et irrégulièrement positif ou négatif
RM	+	+ : Positif en 24 h
TTR	-	- : Négative en 24 h
Gélatinase	-	
Gaz/Glucose	+	
Mannitol	+	
Rhamnose	d	
Saccharose	d	
Inositol	-	
Adonitol	-	
Oxydase	-	
Catalase	-	
Nitrate	-	
Nitrite (NO ₂)	+	

II-1-7- Caractères antigéniques

Les E.coli possèdent une structure antigénique complexe avec trois variétés d'antigènes : Somatique (O), flagellaire (H) et d'enveloppe ou de surface (K) (17).

- Antigène (O) :Somatique lipopolysaccharidique, il existe environ 160 antigènes (O) différents.

Au moyen d'immunosérums spécifiques, il est possible de classer sérologiquement les souches de l'E.coli dans les groupes O. Les antigènes (O) sont thermostables, ne sont pas détruits par l'alcool, mais le sont par le formol.(1,17)

- Antigène (H) : généralement peu abondant. de nature protéique, thermolabile, et détruit par l'alcool, mais pas par le formol. A l'heure actuelle, on a individualisé 49 antigènes H différents, qui agglutinent les germes qui les possèdent (17)

- Antigènes K : Ils recouvrent les antigène O , les masquent et rendent les germes correspondant inagglutinables par les sérums anti-O (9).

II-1-8- Milieux de Culture pour E.Coli

- Milieux d'isolement

Différents milieux d'isolement sont utilisés pour la culture des colibacilles (E.coli). Ils contiennent le plus souvent du lactose avec un indicateur coloré permettant de repérer les colonies lactose (+), aussi que divers substances inhibant la prolifération de cocci, de Bacilles Gram positifs, et de certains champignons (15).

- Milieux d'identification

L'identification des colonies est effectuée suivant les méthodes d'étude des caractères biochimiques des entérobactéries (15).

II-2- COMPORTEMENT DE LA SOUCHE VIS-A-VIS DES ANTIBIOTIQUES.

II-2-1-Historique et définition des antibiotiques :

En 1942, Waksman a défini les antibiotiques comme des substances chimiques, produites par des microorganismes et capables à faible concentration d'inhiber la croissance d'autres microorganismes ou même de les détruire. Cette définition classique ; permettant de différencier les antibiotiques des substances de synthèse dotées d'un pouvoir antibactérien ne semble plus justifiée car de nombreuses substances autre fois obtenues à partir de culture, ' sont actuellement synthétisées ou modifiées par synthèse (22).

En bactériologie médicale, on préfère donc retenir une définition plus large : les antibiotiques sont des composés chimiques élaborés par les microorganismes ou produits par synthèse et dont l'activité spécifique se manifeste à dose faible sur les microorganismes (22)

II-2-2- Classification générales des antibiotiques

Il existe de nombreuses classifications en ce qui concerne les antibiotiques. Elles sont fondées sur la formule chimique, le site d'action, l'origine et la résorption dans l'organisme(pharmacocinetique).

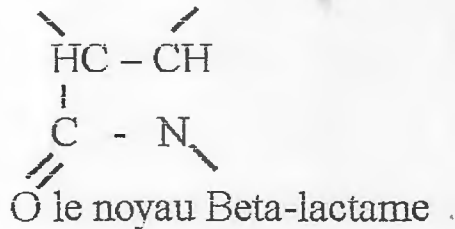
L'usage dans le milieu médical à fait ressortir différentes familles d'antibiotiques classés selon leurs analogies structurales (8)

PRINCIPALES FAMILLES D'ANTIBIOTIQUES

Vu la grande diversité des substances antibiotiques, voici en bref quelques familles rencontrées :

1°/ Les beta-lactamines

bien que les Beta-lactamines restent la principale famille d'antibiotiques, leur mode d'action complexe est encore incomplètement élucidé, elles forment un groupe homogène sur le plan biochimique puisque elles sont caractérisées chimiquement par un cycle Beta-lactame (15) ils perturbent la synthèse de la paroi bactérienne jusqu'à induire une lyse cellulaire (18).



Les chercheurs ultérieurs permirent de classer les Beta-Lactamines en deux principaux groupes selon la structure du cycle Beta-lactame.

- Les pénicillines
- Les cephalosporines

2°/ Les amino-Glycosides :

Cette famille regroupe les antibiotiques dont la structure chimique est à base de sucres, le plus souvent de sucres aminés (8).

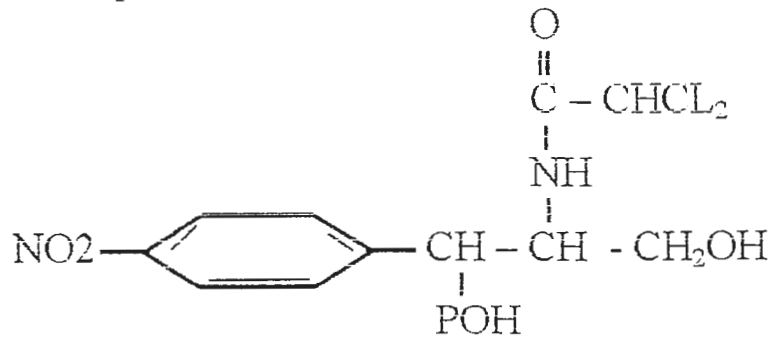
Ils sont indispensables dans le traitement des infections à germes aérobies Gram négatif. (19)

Les amino-glycosides comme la streptomycine et la gentamycine se fixent sur la petite sous unité du ribosome, inhibent la synthèse protéique et sont bactéricides. (18)

3°/ Les phénicoles :

Ce groupe est relativement limité. Son représentant le plus courant est le chloramphénicol dont la formule est relativement simple cet antibiotique comprend les groupes antibactériens suivantes :

- Chloramphénicol (8)
- Thiamphenicol



La formule de chloramphénicol

4° Les tétracyclines :

Ils ont en commun un noyau constitué de quatre groupes hexagonaux. Cette familles regroupe :

- Les doxycycline
- Minocycline
- Aureomycine

Les tétracyclines se fixent sur la petite sous-unité du ribosome et inhibent la synthèse protéique. (18)

10°/ Les Substances diverses :

Comprend par exemple :

- Vancomycine : c'est un glycopeptide dont la structure compliquée inclut un heptapeptide linéaire contenant cinq cycles aromatiques, un disaccharide (glucose et vancosamine) et des acides aminés.(13)

II-2-3- Sites d'action des antibiotiques dans la bactérie

Compte tenu des données actuellement acquises sur les modes de pénétration (fixation sur des sites membranaires à l'extérieur du cytoplasme, pénétration réelle dans le cytoplasme) on peut maintenant envisager les modes d'action des différents antibiotiques en se rappelant qu'ils agissent à l'échelle moléculaire. (17)

1. Antibiotiques agissant au niveau de la paroi :

La paroi bactérienne contient des mucopéptides et certains constituants particuliers comme la D-alanine, la D-glutamine et l'acide N-acétyl muramique. (17)

Exemple :

- Les Béta-lactamines (pénicilline et céphalosporines) inhibent la synthèse de la paroi (sont capables de se lier à plusieurs enzymes actifs dans la synthèse du peptidoglycane de la paroi). (12)
- La vancomycine bloque le transport des substrats vers leur site d'insertion dans la paroi. (12)

2. Antibiotiques agissant au niveau de la membrane cytoplasmique :

En se fixant sur la membrane de la bactérie, l'antibiotique modifie l'équilibre osmotique (se fixe entre les deux feuilletts de la membrane et permet la fuite du contenu cellulaire) et donc modification de la perméabilité de la membrane bactérienne

Exemple : les polypeptides (colistine). (12)

3. Antibiotiques agissant sur la synthèse des protéines :

Nous savons que la synthèse des protéines à partir des acides aminés est réalisée par les ribosomes qui, pour fabriquer une chaîne polypeptidique donnée, interprètent les instructions données par l'ARN messager et assemblent les acides aminés convenables dans un ordre donné grâce à l'ARN de transfert. (17)

Un certain nombre d'antibiotiques agissent au niveau des ribosomes en se liant à l'une de ces parties. Ils provoquent ainsi des troubles à des niveaux différents. (17)

Exemple :

- Les aminosides, par leur action au niveau de la fraction 30s provoquent des erreurs de la lecture de l'ARN, entraînant une perturbation de la synthèse des protéines.
- Les macrolides et les phénicolols agissent au niveau de la fraction 50s du ribosome et bloquent l'élongation de la chaîne protéique au cours de synthèse. (12)

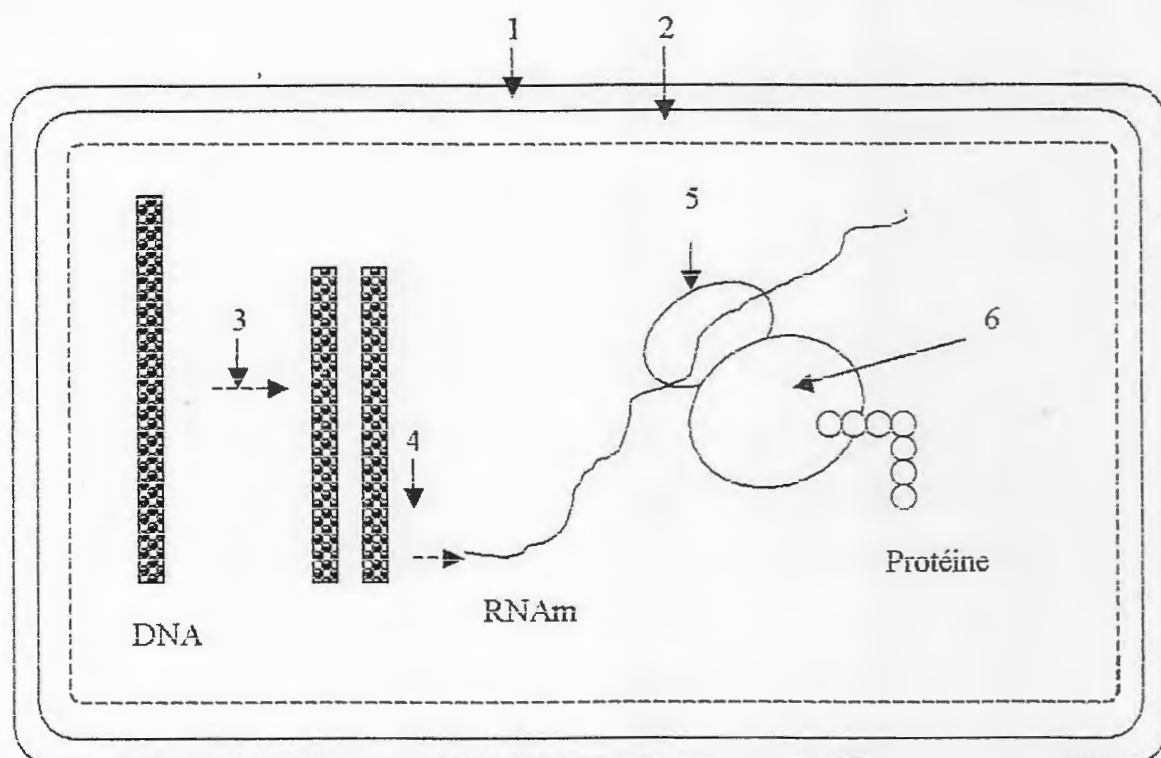
4. Antibiotiques agissant au niveau de l'information génétique :

Les antibiotiques peuvent agir à plusieurs stades de la transcription du code génétique :

- *Réplique de l'information génétique*
C'est le cas de l'acide nalidixique
- *Transcription de l'information génétique.*
C'est le cas de l'actinomycine. (17)

FIGURE 1

SCHEMA DES SITES D'ACTION DES ANTIBIOTIQUES SUR UNE BACTERIE.



- 1 : paroi : Action des bêta-lactamines
- 2 : membrane cytoplasmique : Action des polymyxines
- 3 : Molécule fille de DNA : Action de la mitomycine (et des acridines), de l'acide nalidixique.
- 4 : Transcription de l'information : Action de actinomycine, de la novamycine
- 5 : fixation sur le ribosome (30s) : Action des aminosides, des tétracyclines
- 6 : synthèse des protéines : Action des macrolides, du chloramphénicol, des synarglatines

II-2-4- Résistance des bactéries aux antibiotiques :

La résistance d'une bactérie à un antibiotique signifie que cette bactérie peut croître en présence d'une concentration élevée de cet antibiotique (que la concentration tolérée par les autres bactéries de la même espèce) (11,14)

Donc la résistance aux antibiotiques d'une espèce bactérienne n'est pas un phénomène stable dans le temps, l'évolution des résistances est extrêmement variable selon les antibiotiques ou les germes. Rappelons le cas des sulfamides et du gonocoque. La résistance à la pénicilline du Staphylococcus aureus est aussi un cas intéressant, car l'évolution fut très rapide, en 1941 moins de 1% des souches isolées sont résistantes à ces antibiotiques. Dès 1947, 14% des souches sont résistantes, elles ont atteint 38% en 1947 et actuellement 90%. En revanche un germe comme Stréptococcus pyogènes est resté de nos jours sensible à la pénicilline (8).

Les bactéries présentent deux grands types de résistance ; une résistance naturelle, qui est une caractéristique même des procaryotes étudiés ; et une résistance acquise par la modification ou l'apport d'une information génétique (26).

- Résistance naturelle ou spontanée :

Cette résistance naturelle est un caractère qui affecte l'ensemble d'une population bactérienne et qui est caractéristique de l'espèce : c'est la tolérance totale ou relative d'une bactérie pour un antibiotique, c'est ainsi que les bacilles pyocyaniques et les entérocoques sont résistants à la plus part des antibiotiques, mais dans une espèce réputée sensible à un antibiotique, il existe des souches qui sont naturellement résistantes (phénomène de mutation). C'est ainsi que, vis-à-vis de la pénicilline, certaines bactéries possèdent une pénicillinase, soit extracellulaire comme le Bacillus cereus, soit intracellulaire comme le staphylococcus, soit mixte comme le colibacille. Cette enzyme les caractérise genotypiquement et qu'elle soit sécrétée en présence du substrat ne change rien à son appartenance au patrimoine génétique de la bactérie. Certaines colibacilles possèdent naturellement un chloramphénicol, réductase qui les rend résistants à cet antibiotique. (17)

- Résistance acquise ou provoquée :

Ce type de résistance n'affecte au départ qu'une seule souche. La modification de la souche provient d'une mutation ; d'une série de mutation chromosomiques (10% des cas) ou d'un échange de matériel génétique par des plasmides ou des transposons (90% des cas), de façon générale, le transfert s'effectue plutôt par le conjugaison pour les bactéries à paroi Gram négatif (enterobactéries), et plutôt par la transformation pour les bactéries à paroi Gram positif (staphylocoques) (11) les bactéries peuvent acquérir la résistance.

- Par modification de la cible de l'antibiotique qui perd son affinité pour cet antibiotique ou que cette dernière ne peut plus reconnaître.
- Par inactivation enzymatique.
- Par défaut de perméabilité à l'antibiotique (27)

Donc la résistance acquise est la tolérance, pour un antibiotique donné, d'une bactéries primitivement sensible à cet antibiotique (8).

- Mécanisme génétique de la résistance :

La résistance aux antibiotiques présente deux supports génétiques :

- Un support chromosomique
- Un support extra chromosomique (8)

1- Résistance chromosomique

Dans la résistance d'origine chromosomique, l'apparitions de la bactérie résistante au sein d'une population bactérienne sensible est due uniquement à des mutations chromosomique et leur présence est révélée par la sélection due à l'antibiotique.

2- Résistance extrachromosomique :

Alors que la résistance chromosomique par mutation est un événement spontané et rare, qui sélectionne des individus résistants au sein d'une population bactérienne sensible, la résistance extra chromosomique peut apparaître dans deux conditions différentes : résistances par induction enzymatique et résistance par transfert, tous deux gouvernées par des facteurs génétiques (17).

2-1- Résistance par transfert :

Cette résistance est démontrée *in vitro* par la culture mixte de bactéries résistantes et bactéries sensibles, cette dernière est transférable par contact entre les deux types de bactéries. La détermination génétique de cette dernière est un fragment d'ADN extrachromosomique, un plasmide dénommé (facteur de transfert de la résistance, facteur R)

Le transfert peut se faire par 2 façons :

- Directement par conjugaison
- Indirectement par transduction

2-2- Résistance par induction :

Le cas le plus typique et le mieux étudié est celui des staphylocoques résistants à la pénicilline, par production d'une exoenzyme, la pénicillinase, qui catalyse l'hydrolyse de la pénicilline et la rend inactive par ouverture du cycle bêta - lactame, qui conduit à l'acide pénicilloïque inactif (17).

La synthèse de la pénicillinase, inductible en présence de pénicilline n'est pas déterminée par un facteur génétique situé sur le chromosome bactérien, mais est liée à la présence d'un facteur génétique extrachromosomique, situé dans le cytoplasme bactérien, qui est un plasmide.

Remarques :

Comme la résistance, il existe différents type de sensibilité :

Sensibilité d'espèce (genre) :

- La différenciation de la résistance des genres bactériens aux antibiotiques (**Streptocoque** qui est résistant à la kamamycine, les hémophilus à la pénicilline), permet de les utiliser dans les milieux de culture pour l'isolement de ces germes (17)

Sensibilité de type (type sérologique) :

Un **Streptocoque** ne présente pas vis-à-vis d'un antibiotique la même sensibilité qu'un autre streptocoque d'un autre groupe sérologique ayant les mêmes caractères. (17)

Sensibilité individuelle :

Au sein d'une population bactérienne en culture pure, il existe de nombreux variants rendant la population très hétérogène, chacun réagissant à sa façon vis-à-vis des antibiotiques comme vis-à-vis de tous les substrats.(17)

II-2-5 - Détermination de la sensibilité bactérienne aux antibiotiques :

- **Détermination de la concentration minimale inhibitrice : CMI**

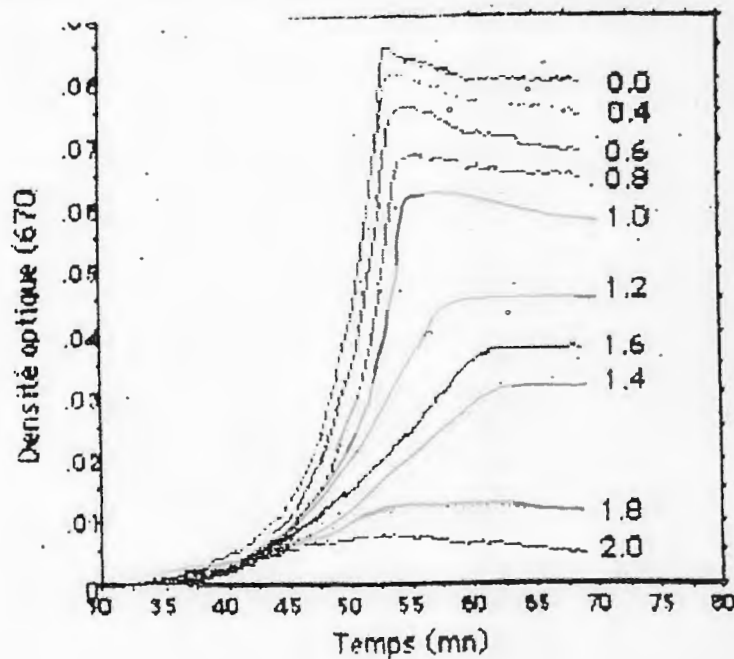
- Définition :

La bactériostase correspond à un ralentissement de la croissance bactérienne (bactériostase partielle), pouvant aller jusqu'à l'arrêt de la croissance, ceci ne s'explique que si la bactérie était en phase exponentielle. Dans le cas contraire une absence de développement peut aussi correspondre à un allongement très prononcé du temps de latence, cette dernière hypothèse est très rarement évoquée (23).

La bactériostase peut être étudiée en milieu liquide par exemple par un suivi photométrique de la croissance des micro-organismes en présence de concentrations variées d'antibiotiques (voir figure 2). Les concentrations sont d'abord sub-inhibitrices puis, à partir de [2,0] elles sont inhibitrices la concentration de [2,0] est donc la première concentration entraînant une bactériostase (23).

FIGURE 2

CROISSANCE D'E.COLI EN PRESENCE DE DIVERSES CONCENTRATIONS D'UN ANTIBIOTIQUE BACTERIOSTATIQUE (22)



- La concentration minimale inhibitrice (CMI) :

Dans des circonstances cliniques sévères, il est indispensables de connaître la concentration minimale inhibitrice (CMI) de certains antibiotiques vis-à-vis du ou des germes incriminés afin de préciser la nature et la posologie exacte de l'antibiothérapie à mettre en œuvre .

La CMI n'est pas, pour une bactérie donnée une constante biologique mais une grandeur phénoménologique (5,11)

- La définition amendée de la CMI :

La CMI est la concentration d'antibiotique, qui entraîne une inhibition suffisante de la croissance pour être thérapeutiquement significative. Dans le cas usuel ceci correspond à l'absence de croissance détectable en moins de 24 heures d'une population initiale de quelques milliers de bactéries.(24, 25)

- **Détermination de la bactéricidie (CMB) :**

Le paramètre le plus utilisé pour caractériser l'effet bactéricide d'un antibiotique est la concentration minimale bactéricide ou CMB. (8) on parle de ce paramètre à un temps donné, lorsque le nombre de bactéries viables est inférieur à celui de l'inoculum (7)

Remarques :

Le rapport CMB sur CMI permet de classer les antibiotiques de la façon suivante :

- Si la CMB d'un antibiotique est proche de sa CMI (rapport de 1 à 2), l'antibiotique est dit **Bactéricide** (8)
- Si la CMB est assez éloignée de la CMI (rapport de 4 à 16) l'antibiotique est dit **Bactériostatique** (8).
- Si CMB et la CMI sont très éloignées (rapport supérieur de 32) cela signifie que l'effet bactéricide n'est obtenu qu'à de très fortes concentrations Ou n'est même pas obtenu du tout, il y a **Tolérance** (8).

III- MATERIELS ET METHODES

III- MATERIELS ET METHODES :

Notre étude est réalisée sur une souche d E.coli qui a été isolée d'une hémoculture positive sur les milieux d'isolement suivants :

- Gélose au sang : qui est utilisée pour l'isolement et la culture des pneumocoques, des streptocoques et des germes exigeants, en plus des germes ordinaires.
- Hektoen : utilisé pour l'isolement des entérobactéries pathogènes.
- Chapman : utilisé pour l'isolement des staphylocoques.

L'analyse pratique est basée sur le repiquage successif de cette souche sur différents milieux de culture de notre choix (4 solides et 3 liquides).

Le repiquage et l'antibiogramme sont réalisées à partir d'une suspension du premier milieuensemencé et ainsi de suite pour les milieux suivants :

➤ **Techniques de l'hémoculture :**

De toutes les analyses bactériologiques réalisées au laboratoire, il en est peu dont l'importance soit égale à celle d'une détection rapide de microorganismes dans le sang, leur isolement, leur identification et la détermination de leur sensibilité aux antibiotiques, permet de choisir une thérapeutique efficace :

Les flacons hemoline pour hémoculture sont disponibles avec différents milieux permettant de développement de germes aérobie ou anaérobies

- Hémoline, bouillons pour hémoculture.
- Hémoline, trypcase. Diphasique (système Castanéda).

Le flacon hémoline trypcase diphasique est particulièrement secondaire pour la recherche des germes exigeants.

L'association de la gélose et du bouillon permet une détection plus précoce des micro-organismes.

Après le prélèvement du sang sur castaneda les cultures sont incubées 35° à 37° en position verticale ou horizontale, de façon que le bouillon ne recouvre pas totalement la gélose, pendant une à deux semaines et examinées ; tous les jours pendant 5 à 7 jours pour déceler l'apparition d'un trouble signant un développement microbien ou de colonies sur la gélose.

Si un développement microbien apparaît il est nécessaire de pratiquer une coloration de gram et des subcultures sur des milieux appropriés. (21)

III-1- MATERIELS

III-1-1- Appareillage

Nous avons utilisé lors de notre manipulation les matériaux et réactifs suivant :

- Bec bensen
- Anse de platine
- Boites de petri
- Pipettes pasteur
- Tubes à essai
- Microscope optique
- Lames et lamelle
- écouvillon
- distributeur à 6 cartouches
- Violet de gentiane
- lugol
- alcool
- Fucshine
- Huile à emmerssion

III-1-2- Milieux de culture :

Les différents milieux de culture utilisés pour notre travail sont :

➤ Milieux solides

- Gélose sabouraud : qui est utilisée pour l'isolement, et l'entretien des champignons microscopiques et des levures.
- Gélose Mac-Conkey : qui est utilisée pour l'isolement et l'identification des germes pathogènes du tube digestif (les entérocoques s'y, développement)
- Gélose d'Endo : qui est utilisé pour l'isolement des coliformes (Entérobactéries).
- Gélose lactosé au bromocrésol pourpre (BCP) qui est utilisée pour l'isolement des coliformes (Entérobactéries)

➤ **Milieux liquides**

- Bouillon glucosé tamponé (BGT) peut être utilisé pour l'enrichissement et la culture de différents germes.
- Bouillon cœur cerveau (BHIB), il est utilisé pour les hémocultures et la culture de la plupart des germes (favorise la production de la staphylocoagulase).
- Bouillon glucosé tamponé plus un disque de tetracycline
- Eau physiologique : utilisée comme diluant (suspension bactérienne pour l'antibiogramme)
- Mueller hinton : utilisé pour l'antibiogramme.

III-1-3- Les antibiotiques utilisés :

En ce qui concerne les antibiotiques, notre choix a été porté sur sept (7) antibiotiques de différentes familles et dont le mode d'action au sein de la bactéries se situe au niveau de différents points (voir tableau n° 1).

TABLEAU N°1
LES DIFFERENTS ANTIBIOTIQUES UTILISEES : (21)

Famille	Dénomination Commune		Signe	Charge de disque	Diamètre de la zone d'inhibition			Sites D'action
					R	I	S	
Beta – Lactamines	Pénicilline	Ampicilline	Am	10µg	≤11	12-13	≥14	Paroi
	céfazoline	Céfazoline	CZ	30µg	≤14	15-17	≥18	
Phénicoles		Chloram phénicol	C	30ug	≤12	13-17	≥18	Fraction 50s (ribosone)
Tetracycline		Tetracycline	TE	30UI	≤14	15-18	≥19	ARN/ ribosome
Quinolone		Acide nalidixique	NA	30µg	≤13	14-18	≥19	ADN
Aminosides		Amikacine	AN	30µg	≤14	15-16	≥17	Fraction 30s (ribosome)
Sulfamides		Sulfamides + triméthopri me	SXT	1,25µg + 23,75µg	≤10	11-15	≥16	Acide nucléique et les membranes

R : Zone de la résistance.

I :Zone Intermédiaire

S :Zone de la sensibilité

III-2- METHODES

Tout le long de l'analyse pratique l'incubation est toujours fait à 37° pendant 24 heures.

➤ 1^{er} (premier) jour

- l'ensemencement depuis l'hémoculture à été réalisé sur :
 - Gélose au sang
 - Hektoen
 - Chapman
- Incubation

➤ 2^{ème} (deuxième) jour

- Lecture :
 - Sur milieu chapman ; pas de pousse bactérienne
 - Sur gélogc au sang ; petites colonics bombées luisantes
 - Sur milieu hektoen : petites colonies de couleur rose saumon (orange) avec une odeur caractéristique
- La coloration de Gram montre la présence des bacilles Gram négatifs.
- réalisation d'une galerie biochimique et d'un antibiogramme à partir d'une suspension bactérienne préalablement effectuée a partir des colonies sur milieu Hektoen
- Incubation

➤ 3^{ème} (Troisième) jour

- l'identification biochimique montre la présence de E.coli
- Lecture de l'antibiogramme (voir tableaux n° 2)
- Ensemencement sur milieu sabouraud
- Incubation

➤ **4^{ème} (Quatrième) jour**

- Lecture :
 - Sur milieu sabouraud : petites colonies légèrement bombées luisantes et transparentes .
- Réalisation d'un antibiogramme et réensemencement sur le milieu BCP à partir du milieu sabouraud
- Incubation

➤ **5^{ème} (Cinquième) jour**

- Lecture :
 - Sur milieu BCP : colonies lactose négatif, opaques, plates avec un centre surélevé
 - Antibiogramme (voir tableau n° 2)
- Réalisation d'un antibiogramme et réensemencement sur le milieu D'Endo à partir du milieu BCP
- Incubation

➤ **6^{ème} (Sixième) jour**

- Lecture :
 - Sur milieu d'Endo : petites colonies brillantes de couleur violette à reflet légèrement métallique
 - L'antibiogramme (voir tableau n°2)
- Réalisation d'un antibiogramme et réensemencement sur le milieu Mac conkey à partir du milieu d'Endo
- Incubation

➤ **7^{ème} (septième) jour**

- Lecture :
 - Sur milieu Mac conkey : petites colonies plates de couleur rose
 - L'antibiogramme (voir tableau n° 2)
- Réalisation d'un antibiogramme et réensemencement sur le premier milieu liquide (BGT) à partir du milieu Mac-conkey
- Incubation



➤ **8^{ème} (Huitième) jour**

- Lecture
 - Dans le bouillon glucosé temponé : un trouble homogène
 - L'antibiogramme (voir tableau n°2)
- Réalisation d'un antibiogramme réensemencement sur le deuxième milieu liquide (BHIB) à partir du milieu BGT.
- Incubation

➤ **9^{ème} (Neuvième) jour**

- Lecture
 - Sur bouillon BHIBm : trouble homogène
 - L'antibiogramme (voir tableau n° 2)
- Réalisation d'un antibiogramme et réensemencement sur le troisième milieu liquide (BGT+ un disque de tétracycline (TE)) à partir du milieu BHIB
- Incubation pendant 48 heures

➤ **11^{ème} (onzième) jour**

- Lecture
 - Sur milieu BGT + un disque de TE : Léger trouble
 - Antibiogramme : voir tableau n° 2

- Réalisation d'un antibiogramme à partir du milieu (BGT + TE)

- Ensemencement sur milieu BGT (pour avoir si la résistance est due à un phénomène d'adaptation ou non)

➤ **13^{ème} (Treizième) jour**

- Lecture :
 - Sur BGT : Léger trouble

- Réalisation d'un antibiogramme

➤ **14^{ème} (Quatorzième) jour**

- Lecture de l'antibiogramme montre que la résistance à la tétracycline est toujours présente avec le même résultat pour les autres antibiotiques (voir tableau n°2).

IV- RESULTATS

IV- RESULTATS

TABLEAU N° 2
TABLEAU DES RESULTATS

PH des milieux utilisés	7.6	5.6	7.4	7.4	6.8	7.2	7.4	7.2	7.2
Antibiotiques utilisés	2 ^{ème} jour	4 ^{ème} jour	5 ^{ème} jour	6 ^{ème} jour	7 ^{ème} jour	8 ^{ème} jour	9 ^{ème} jour	11 ^{ème} jour	14 ^{ème} jour
Ampicilline	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Céfazoline	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Chloramphénicol	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Tétracycline	S	S	S	S	S	S	S	R	R
	19mm de ø	23mm de ø	21mm de ø	22mm de ø	26mm de ø	23mm de ø	19mm de ø	10mm de ø	9mm de ø
Acide nalidixique	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	25mm de ø	25mm de ø	25mm de ø	22mm de ø	27mm de ø	24mm de ø	21mm de ø	18mm de ø	18mm de ø
Amikacine	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	29mm de ø	29mm de ø	26mm de ø	24mm de ø	31mm de ø	28mm de ø	25mm de ø	30mm de ø	30mm de ø
Sulfamide + Trimethoprime	R	R	R	R	R	R	R	R	R

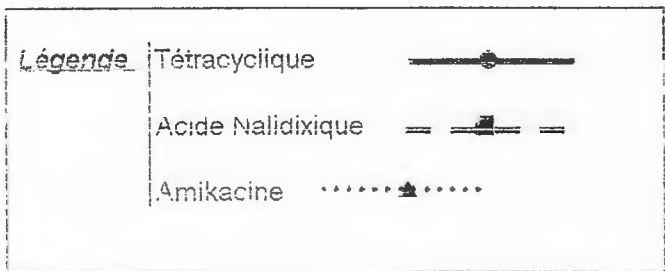
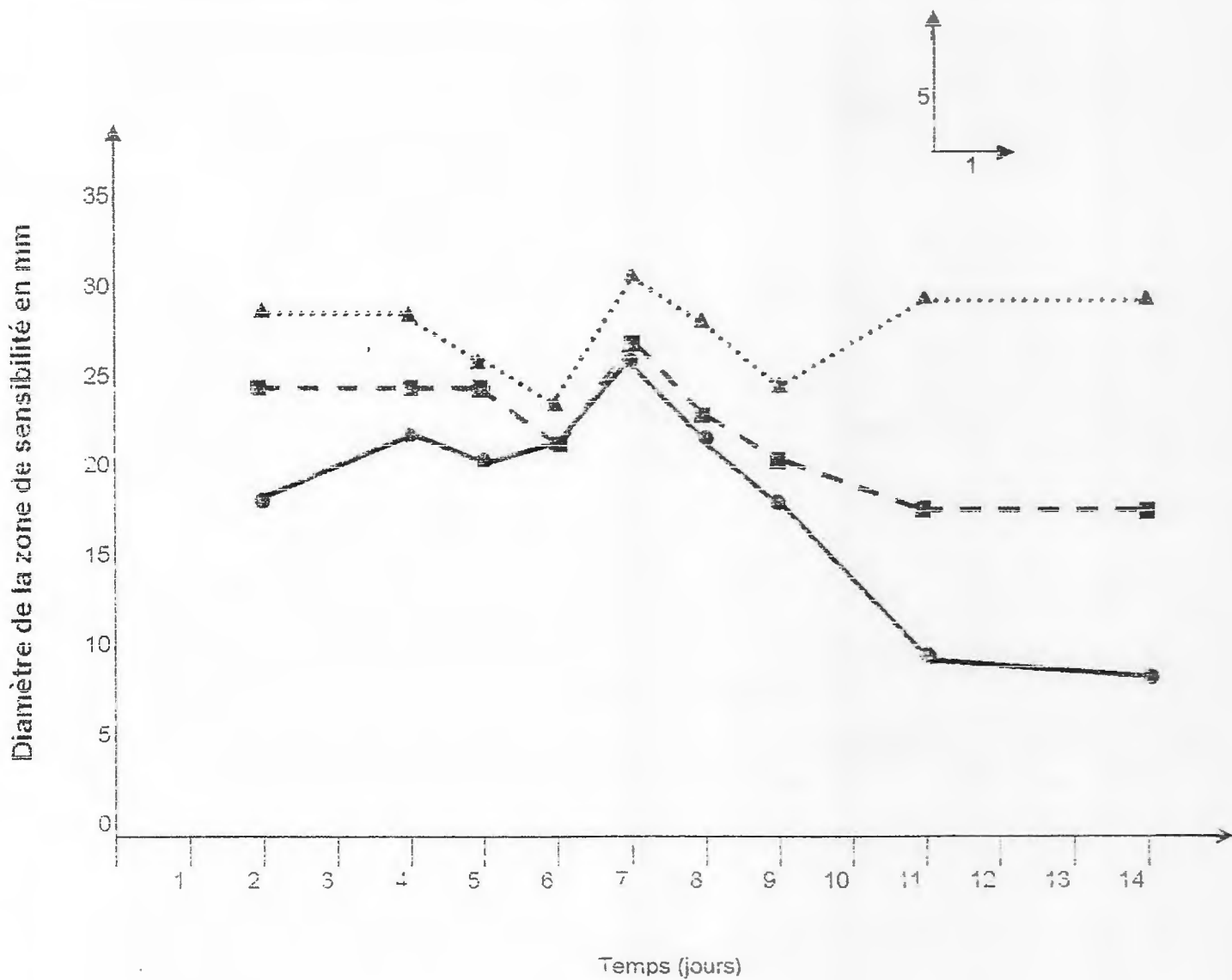
LEGENDES

R : Résistante

S : Sensible

Ø : Diamètre de la zone de sensibilité en millimètres

Figure 3 :
Représentation graphique des différentes
zones de sensibilité avec les trois antibiotiques
pour lesquels la bactérie est sensible



V- DISCUSSION

V- DISCUSSION

Suite à notre brève étude nous remarquons que plusieurs paramètres peuvent intervenir, dans la modification de l'activité d'un antibiotique, que ce soit du point de vue diffusion sur le milieu Mueller Hinton ou du point de vue apparition ou non d'une résistance.

Du point de vue diffusion, la composition et le PH du milieu pourraient jouer un rôle dans la modification de la zone de sensibilité vue que celle ci a tendance à varier d'un milieu à un autre avec quelque millimètres de différence sans toute fois affecter la sensibilité du germe vis à vis de l'antibiotique.

Du point de vue apparition au nom d'une résistance, on remarque que le repiquage successif du germe étudié sur les différents milieux, n'affecte en rien sa sensibilité sauf dans le cas de l'avant dernier milieu utilisé (ensemencement du 9^{ème} jour) où le germe a été laissé longtemps en contact avec un antibiotique (la tétracycline) ou il était sensible et pour lequel il est devenu résistant.

L'ensemencement à la suite sur le BGT dépourvu de tétracycline a été réalisé pour confirmer si oui ou non ce nouveau caractère qui est la résistance à la tétracycline pouvait être un phénomène réversible ou non, chose qui a été confirmée par la persistance de la résistance à la tétracycline pouvant être due à un phénomène de mutation donc caractère irréversible.

VI- CONCLUSION

VI- CONCLUSION

L'idée de notre modeste travail vient du fait que dans la vie quotidienne et plus exactement dans le domaine médical, certains problèmes se rencontrent sans qu'ils soient tout à fait résolus, puisqu'ils persistent.

En conclusion à notre travail, il suffit tout simplement d'extrapoler notre expérience à l'être humain, en comparant d'une part la composition des différents milieux à un groupe d'individus de poids corporel différent avec des habitudes alimentaires différents, un système immunitaire différent et d'autre part l'apparition des résistances bactériennes aux antibiotiques chez différents individus.

En ce qui concerne le premier cas de comparaison, l'action de l'antibiotique sur le germe peut être différente d'un individu à l'autre dans le but d'éradiquer l'infection, cette action peut être prolongée, comme on peut être amené à changer la dose en antibiotique dans le but de parvenir au même résultat.

Pour le deuxième cas de comparaison l'apparition d'une résistance à un antibiotique peut être due au fait que les posologies dans une primo-infection sont insuffisantes pour éradiquer l'infection. Celle ci traitée une deuxième fois avec la même dose en antibiotique aboutit à l'apparition de phénomènes de résistance.

Les résultats de notre étude ont montré que les milieux utilisés n'avaient aucun rôle apparent dans le développement d'une résistance bactérienne aux antibiotiques, sauf pour le milieu contenant la tétracycline, où l'expérience a prouvée une fois encore en plus des remarques faites sur des patients traités et qui développent une résistance aux antibiotiques que la présence prolongée d'une bactérie avec un antibiotique risquerait de développer une résistance à cet antibiotique (bactéries des infections nosocomiales : pseudomonas, staphylocoques...), par contre il ne faudrait pas écarter l'hypothèse que des substances autres que les antibiotiques entrant en contact avec une bactérie peuvent être responsables du

développement d'une résistance aux antibiotiques, on peut citer l'exemple des rayonnements (rayonnement(x) qui peuvent être responsables de l'apparition de certaines mutations (phénomènes spontanés) d'où développement de résistances aux antibiotiques.

ANNEXES

ANNEXE

➤ **L'état frais**

- Prélever une goutte de la suspension bactérienne sur une lame et la recouvrir par une lamelle
- Observer au microscope optique

➤ **Coloration de Gram**

- Sur lame parfaitement dégraissée, réaliser un frottis mince.
- Ensuite le faire sécher et le fixer à la chaleur.
- Recouvrir la lame pendant une minute avec du violet de gentiane.
- Rincer à l'eau courante et la recouvrir avec une solution de lugol (mordant) pendant une minute.
- Décolorer à l'alcool (90°) pendant 20 à 30 secondes
- Décolorer par une solution de fuschine (colorant de contraste) pendant une minute.
- Observer au microscope à l'émersion (x100)

➤ **Technique de l'antibiogramme**

Pour la majorité des bactéries responsables de pathologies infectieuses, il est impossible de connaître exactement les antibiotiques auxquels une espèce sera sensible. Donc l'utilisation des antibiotiques passe d'abord in vitro par la réalisation d'un antibiogramme, il existe deux techniques : technique classique et technique standardisée.

➤ **Technique classique par inondation**

Verser quelques millilitres d'une suspension bactérienne réalisée à partir d'une culture positive sur mueller Hinton de façon à inonder complètement la surface du milieu (2 à 5 ml selon la surface de la boîte), réaspirez le liquide le plus complètement possible et laissez sécher la boîte 15 minutes à 37°C. Bien appliquer les disques sur la gélose.

➤ **Technique standardisée (ensemencement par écouvillon)**

Inoculer le milieu Mueller Hinton par stries serrées transversales à l'aide d'un écouvillon préalablement trempé dans la suspension bactérienne sur toute la surface de la gélose. Quelque soit la méthode d'ensemencement utilisée, disposer les disques à l'aide d'un distributeur d'antibiotiques (à six cartouches), bien appliquer les disques sur la gélose.

Après 18 heures à 24 heures d'incubation les boîtes sont examinées et la lecture des diamètres est réalisée avec précision à l'aide d'une règle.

➤ **Remarque**

La coloration de Gram et l'état frais sont réalisés à partir du 4^{ème} jour au 10^{ème} jour, la lecture de celle-ci montre à chaque fois la présence de coccobacilles Gram négatif, mobiles, la confirmation de la mobilité est réalisée sur le milieu mannitol mobilité.

MILIEUX UTILISES POUR L'ISOLEMENT DE LA SOUCHE

1- Gélose au sang :

- Formule en grammes par litre d'eau distillée

Infusion de cœur et de muscle	375
Bio-thione	10
chlorure de sodium	5
Gélose	15

PH final 7.3

- Utilisation :

Isolement et culture des pneumocoques, des streptocoques et des germes exigeants.

2- Hektoen

- Formule en gramme par litre d'eau distillées :

Bio-thione	12.000
Extrait de levure	3.000
Sels biliaires	9.000
Lactose	12.000
Saccharose	12.000
Salicine	2.000
Chlorure de sodium	5.000
Hyposulfite de sodium	5.000
Citrate de fer ammoniacal	1.500
Bleu de bromothymal	0.064
Fuchsine acide	0.040
Gélase	13.50

PH final 7.6

- Utilisation

Isolement des Entérobactéries pathogènes.

3- Chapman

- Formule en grammes par litres d'eau distillée :

Extrait de viande de bœuf	1.000
Bio-Polytone	10.000
Chlorure de sodium	75.000
D-Hannital	10.000
Gélose	15.000
Rouge de phénol	0.025

PH final 7.4

- Utilisation :

Isolément des staphylocoques

MILIEUX UTILISES POUR LE REPIQUAGE

a) Milieux solides :

1- Milieu sabouraud :

- Formule en gramme par litre d'eau distillé

Bio-polytone	10
Glucose	40
Gélose	15

PH final 5.6

2- Milieu Mac conkey

- Formule en gramme par litre d'eau distillée :

Bio-gelytone	17.00
Bio-polytone	3.00
Lactose	10.00
Sels biliaires	5.00
Chlorure de sodium	5.00
Gélose	12.50
Rouge neutre	0.04
PH finale 7.4	

3- Milieu d'Endo

- Formule en gramme par litre d'eau distillée :

Phosphate bipotassique	3.5
Bio-thione	10.0
Gélose	15.0
Lactose	10.00
Sulfite de sodium	2.5
Fuschsine basique	0.5

PH final 7.4

- Utilisation
Isolement des coliformes

4- Milieu BCP : Gélose au bromocrésol pourpre :

- Formule en gramme par litre d'eau distillée :

Extrait de viande de bœuf	3.00
Bio-Polytone	5.0
Lactose	10.00
Gélose	10.00
Bromocrésol pourpre	0.025

PH final 6.8

- Utilisation

Isolement des coliformes (Entérobactéries)

b) Milieux liquides

1- Milieu BGT : bouillon glucosé temponé

Bouillon à base de glucose.

2- Milieu BHIB : Bouillon cœur cerveau :

- Formule en grammes par litre d'eau distillée :

Infusion de cervelle de veau	200.0
Infusion de cœur de bœuf	250.00
Bio-Gelytone	10.0
Chlorure de sodium	5.0
Phosphate disodique	2.5
Glucose	2.0

PH final 7.4

- Utilisation

Très utilisé pour les hémoculture et la culture de certains germes

3- Milieu : bouillon au sélénite :

- Formule en gramme par litre d'eau distillée :

Bio Polytone	5
Lactose	4
Phosphate de sodium	10
Sélénite acide de sodium	4

PH Final 7.0

- Utilisation

L'enrichissement pour l'isolement des salmonelles et de quelque espèces de shigella (*S. sonnei*)

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- (1). Avril J.L, Henry D. François D, 1992
Bactériologie Clinique – Ed : Copyright, 2
- (2). Bugnicourt M, 1995
Dictionnaire de microbiologie générale
- (3). Bertrand C, 1990
Bactériologie médicale, étude et méthode d'identification des bactéries aerobies et facultatives d'intérêt médical – Ed : vigot
- (4). Berche D., Gaillard J.L, Simon M, 1988
Bactériologie : Bactéries des infections humaines – Ed : Flammarion médecine science
- (5). Carbonnelle B, Denis F. Marmonnier A., Pinon G., Vargues R, 1987
Bacteriologie Medicale, Technique Usuelle – Ed : Simmer/Sa, 2
- (6). Eyquem A. Alouf J. Montagnie L, 1997
Traité de Microbiologie Clinique, L'institut Pasteur
- (7) Eberlin T, 1997
Les infections microbiennes – Ed : Eric Périlleux, 2
- (8) Eberlin T, 1994
Les antibiotiques : classification, mode d'action, utilisation thérapeutique-Ed : Eric Périlleux, 2
- (9). Fasquelle R, 1974
Elément de bactériologie médicale, Ed : 2

- (10). Ferron A, 1972
Bacteriologie : à l'usage des étudiants en médecine – Ed : Crouan et Rooues, 5
- (11). Ferron A.
Bactériologie : à l'usage des étudiants en médecine – Ed : Crouan et Rooues, 12
- (12). Mémoire de fin d'étude de Houicha N, 2000, *Paramédical*
L'évolution de la sensibilité aux antibiotiques des souches bactériennes isolées sur prélèvement d'usine
- (13). Larpent J.P, 1997
Mémento technique de microbiologie, Ed : 3
- (14) . Lectere H., Gaillard J.H, Simonet M, 1994
Microbiologie générale : la bactéries et le monde bactérien
- (15). Lemnor L, Verron M , 1989
Bactériologie médicale – Ed : Flammarion médecine science, 2
- (16). Lemnor L, Verron M , 1982
Bactériologie médicale – Ed : Flammarion médecine science, 2
- (17). Moustardier G, 1972
Bactériologie médicale, Ed: 4
- (18). Prescott H.K, 1995
Microbiologie, Ed : 3
- (19). Schorderet M, 1992
*Parmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques, Ed :
Office des publications universitaires, 2*
- (20). Zouchileche D, 1990
Les diagnostiques biochimiques bactériens
- (21). Bacteriologie ,virologie, culture cellulaires biomerieux (Lab)
- (22) Jenzoby J.P , 2001
Dictionnaire de bactériologie vétérinaire.
(www.BACTERIO.CIEL.FR
- (23). crdp.dc.clermont.fr

(24). Lyon Sud.univ.Lyon1 fr/bacterio

(25). www.uvp5.univ.paris 5.fr

(26). www.cybercable.tm.fr,2000

<p>Noms et prénoms des étudiantes :</p> <ul style="list-style-type: none"> • CHETIBI Farida • MERMOUDA Lynda • TOUBANE Fouzia 	<p>THEME:</p> <p>Interaction de différents milieux de culture sur le développement ou non d'une résistance aux antibiotiques d'une souche d'Escherichia coli (E.coli)</p>	<p>Date de soutenance : ../10/2001</p>
--	---	--

Résumé :

Dans la pratique médicale, en ce qui concerne le domaine de l'infection, le traitement par les antibiotiques pose souvent des problèmes, sachant que des germes peuvent à tout moment développer des résistances, qu'on ne peut contrôler mais dont les causes sont plus ou moins connus, c'est pour cela qu'on a essayé de faire subir à un germe différents traitements dans le but de voir changer son comportement. Ce qui a abouti à certains résultats.

Summary :

In the medical practice, in what concerns the domain of the infection, the treatment antibiotic often puts problems, knowing that germs can developed at any time of resistances, that one can not control, but whose reasons are to the more minus concerned.

It is for it that one tried to make a germ undergo different treatments in stumbles it to see to change its behavior what leads to certain results.

ملخص:

في الميدان الطبي، وفي ما يخص الإصابات البكتيرية فإن المعالجة بالمضادات الحيوية تطرح عدة مشاكل لأن البكتيريا تستطيع في كل لحظة إظهار مقاومة لأي مضاد حيوي و التي لا يمكن مراقبتها غير أن أسبابها معروفة، لهذا حاولنا إجراء عدة معالجات على بكتيريا بهدف ملاحظة تغير سلوكها و حصلنا على نتائج معينة.

Encadré par :

- BOUNAMOUS A.
- ZABAYOU K.