République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Dr. Yahia Farés de Médéa

Facultés des Sciences

Thèse de mémoire de fin d'étude
En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Microbiologie appliquée
Département : Sciences de la nature et de la vie

Spécialité: Microbiologie appliquée

Présenté par :

- **M elle BOUALAMI Chahinez**
- **M elle MOKRANI Asmaa**

Thème

Etude comparative in vitro entre la résistance de certains germes pathogènes vis-à-vis à l'amoxicilline et à l'amoxicilline + l'acide clavulanique.

Soutenue publiquement le : 21/06/2022

Devant le jury composé de :

Dr : BALKACEM.I	MCB	promotrice
Dr **:** TOUMI. N	MC	Co promotrice
Dr **:** AINAS. M	MCB	Président
Dr : SIOUDA. W	MCB	Examinatrice

2021_2022

Remerciement

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au sein du laboratoire de microbiologie au niveau du Complexe SAIDAL.

Avant tous, nous tenant à remercier le Tout-Puissant « **ALLAH** » de nous montrer la voie, de nous donner la force, le courage et de nous avons gardé en bonne santé afin de mener à bien ce projet de fin d'étude.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à notre promotrice **Dr. BALKACEM IMEN**, d'avoir accepté de nous encadrer, ainsi que pour son soutien, ses remarques pertinentes et son encouragement.

Nous tenons à remercier chaleureusement notre encadrant participant, le **Dr. TOUMI NADJET**, pour le temps et l'attention qu'elle a consacrés pour le bon déroulement de ce travail.

Nos remerciements vont particulièrement au président et membres de jury qui nous font honneur d'accepter de juger notre modeste travail. Veuillez trouver ici le témoignage de notre respect le plus profond.

Nous exprimons tous nos remerciements à madame la directrice du laboratoire de contrôle de qualité du site SAIDAL de Médéa : **Mme BAKHTI F** et tout le personnel du laboratoire microbiologie et en particulière **Mme GHEZAL SARAH** et **Ms. LAIDI KARIM** pour son aide et ses conseils.

Nos remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet de fin d'études.

Dédicaces

A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui a été la lumière de ma vie, malgré sa mort, elle est toujours dans mon cœur : **Mon adorable mère.**

A l'homme, mon précieux offre du dieu, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect : **mon cher père.**

A mes chères sœurs : **Nassima**, **houria**, **hadjer**, qui n'ont pas cessée de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études. Que Dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur, sans oublier ses enfants.

A mon adorable petite sœur **feriel** qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille.

Aux familles : **Boualami** et **benyahia.**

A mon amie d'enfance et ma fidéle : **Fatima.**

A mes proches : **Ikram, radia, manel et sabrina.**

A tous les amis que j'ai connu jusqu'à maintenant, merci pour leur amours et leurs encouragement.

Sans oublier mon binôme **Asma** pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.

Et enfin, a tous mes camarades de l'université du Yahia Fares de Médéa.

Chahinez

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

A mon exemple éternel, mon soutien moral et
source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour
me voir réussir, à toi

Mon père.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de
mon cœur, ma vie et mon bonheur ;

Ma mère que j'adore.
Aux personnes dont j'ai bien aimé

à

Mes sœurs : KAWTHER, HAFSSA, MANEL et son mari
A tous les membres de ma famille, petits et grands.
A tous mes amis et collègue

Imen, wissem., Hiba

Je cite particulièrement mon cher binôme Chahinez.

Aux personnes qui m'ont toujours aidé et
encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagnaient durant
mon chemin d'études, **mes aimables amis**, collègues d'étude.
A tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer … .

ASMA

Résumé

La résistance bactérienne aux antibiotiques est accrue et elle est reconnue comme étant l'une des menaces les plus sérieuses au traitement des infections. Notre travail réalisé au niveau de SAIDAL de MEDEA a porté sur l'étude de la résistance de 4 souches bactériennes au principe actif de l'amoxicilline et celui de l'association : Amoxicilline + Acide clavulanique (AUGMENTIN®). La conformité des deux antibiotiques a été assurée par le test antibiogramme de tous les germes pathogènes, après la confirmation de la conformité de ces antibiotiques aux normes de la pharmacopée européenne ; nous avons effectué des antibiogrammes sur milieu gélosé et confirmer les CMI en milieu liquide. La souche de *Staphylococcus aureus* est sensible à l'amoxicilline mais *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtillis* sont résistances à l'amoxicilline et toutes les souches sont sensibles à l'amoxicilline + l'acide clavulanique. L'objectif d'étude est de bonnes pratiques en antibiothérapie, Interpréter un antibiogramme, Détermination CMI, Comprendre les mécanismes de résistance et leurs impacts sur le spectre d'activité des antibiotiques.Le rôle du laboratoire est d'évaluer les paramètres permettant de lier le dosage à l'efficacité sur la base : d'étude in vitro. Aussi pour étudier la tolérance et l'efficacité de l'Amoxicilline et son association avec l'Acide clavulanique (Augmentin®) sur des germes pathogène et résistant à l'Amoxicilline pour éviter la résistance et la gravité de la maladie.

Mots clés : Bactéries, CMI, Amoxicilline, Augmentin, Résistances.

Summary

Bacterial resistance to antibiotics is increasing and is recognized as one of the most serious threats to the treatment of infections. Our work has carried out at SAIDAL of MEDEA focused on the study of the resistance of 4 bacterial strains to the active ingredient of amoxicillin and the combination: Amoxicillin + Clavulanic acid (AUGMENTIN®). The compliance of both antibiotics was ensured by the was évaluted antibiogram test of all pathogenic germs, after confirmation of the compliance of these antibiotics to the standards of the European Pharmacopoeia; we performed antibiograms on agar medium and confirmed the MICs in liquid medium. The *Staphylococcus aureus* strain is sensitive to amoxicillin but *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtillis* are resistant to minited amoxicillin and all strainsare sensitive to amoxicillin + clavulanic acid. The objective of the study is good practices in antibiotic therapy, Interpretation of an antibiogram, Determination of MIC, Understanding the mechanisms of resistance and their impact on the spectrum of activity of antibiotics.
The role of the laboratory is to evaluate the parameters allowing to link the dosage to the efficacy on the basis of in vitro studies. Also to study the tolerance and efficacy of Amoxicillin and its association with clavulanic acid (Augmentin®) on pathogenic germs resistant to Amoxicillin to avoid resistance and severity of the disease.

Keywords : Bactéria, MIC, Amoxicillin, Augmentin, Résistances.

ملخص

أصبحت مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية أكثر
حدة وذلك باعتبارها من أخطر التهديدات التي تواجه العلاج
وقد ركز عملنا على مستوى مركب صيدال بالمدية على دراسة مقاومة اربع سلالات بكتيرية للمركب النشط اموكسيسيلين ولنظيره الخاص باتحاد الاموكسيسيلين
مع حمض الكلافولانيك (اوغمونتان)
و قد تم ضمان التوافق بين المضادات الحيوية من خلال اختبار على البكتيريا المسببة للامراض بعد التاكد من مطابقة المضادات الحيوية مع المعايير الاوروبية

CMI قمنا بالعمل على السلالات البكتيرية في وسط الجيلوز والسائل
Escherichia coli, Pseudomonas في الوسط المكون من الاموكسيسيلين لكن السلالات الاخر ى*Staphylococcus aueurus*كما لاحظنا تاثر السلالة
*كانت مقاومة للاموكسيسيلين و كل السلالات حساسة للمزيج اموكسيسيلين مع حمض الكلافولانيك*auergonisa, Bcillus subtillus
الهدف من دراستنا هذه هو اظهار تسامح و فعالية الاموكسيسيلين و رابطته مع حمض الكلافولانيك(اوعمونتان) على البكتيريا المرضية ومقاومة الاموكسيسيلين
تجنب حساسية و جسامة المرض
، فهم آليات المقاومة وتأثيرها على طيف والهدف من هذه الدراسة هو الممارسات الجيدة في مجال العلاج المضاد البيولوجي: تفسير مضادات حيوية،
نشاط المضادات الحيوية
على التسامح Amuxiselline ويتمثل دور المختبر في تقييم بارامترات ربط الجرعة بالكفاءة على أساس ما يلي: (د) دراسة في المختبر. كذلك لدراسة قدرة
على الجراثيم المسببة للمرض ومقاومة لأموكسيسيلين لتجنب مقاومة المرض وجذوره. (Aogmenton®) والفعالية وعلاقته بحامض الكلافولانيك

الكلمات المفتاحية بكتيريا . التركيز الادنى للتنشيط اموكسيسيلين اغمونتان المقاومة

Les abréviations

ADN : Acide désoxy ribonucléique.

AMX : Amoxicilline.

AMC : Amoxicilline + Acide clavulanique.

ARNm : Acide ribonucléique messager.

ARNr : Acide ribonucléique ribosomal.

ATB : Antibiotique.

ATCC : American type culture.

A.S : Assez soluble**.**

CMI : Concentration minimal inhibitrice.

T.S : Très soluble.

T.P.S : Très peu soluble**.**

I : Insoluble.

Liste des tableaux

Tableau 1 : principaux caractères biochimiques des germes pathogènes, Gram négatif **(Avril et, 1988).**

Tableau 2 : caractères biochimiques différentiels entre les espèces de staphylococcus.

Tableau 3 : Classification des antibiotiques selon leur mode d'action.

Tableau 4 : Classification de quelques antibiotiques Selon le spectre d'action.

Tableau 5 : Classification de LAMX.

Tableau 6 : principaux mécanismes biochimiques de la résistance aux betalactamines.

Tableau 7 : les souches de référence utilisées dans notre étude.

Tableau 8 : Les concentrations et les critiques de référence pour les différents antibiotiques suivants (CASFM. 2006).

Tableau 9 : résultats de la solubilité des deux principes actifs

Tableau 10 : résultats des analyses d'identification et de dosage par HPLC pour les deux échantillons.

Tableau 11 : résultats de l'antibiogramme pour l'amoxicilline et l'amoxicilline +l'acide clavulanique.

Tableau 12 : les zones d'inhibition des souches bactériennes après chaque dilution.

Tableau 13 : résultats des CMI en milieu liquide déterminées pour Amoxicilline et avec Amoxicilline + acide clavulanique.

Liste des figures

Figure 1 : différentes mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques.

Figure 2 : solution échantillon.

Figure3 : diffusion du disque sur gélose.

Figure 4 : CMIen milieu liquide.

Figure 5 : dosage par HPLC (Chromatographie).

Figure 6: Résultat de hydrolisation pour la souche Bacillus subtilis de Amoxypen.

Figure 7: Résultat de hydrolisation pour la souche Bacillus subtilis de Clamoxypen

Figure 8 : Résultat antibiogramme pour la souche *Pseudomonas aeruginosa.*

de principe actif Amoxypen.

Figure 9 : Résultat d'antibiogramme pour la souche *E coli* de principe actif Amoxypen.

Figure 10 : Résultat d'antibiogramme pour la souche *S aureus* de principe actif Amoxypen.

Figure 11 : Résultat d'antibiogramme pour la souche *S aureus* de principe actif Clamoxypen.

Figure12 : Résultat d'antibiogramme pour la souche *Pseudomonas areuginosa* de principe actif Amoxypen.

Figure 13 : Résultat d'antibiogramme pour la souche *Pseudomonas areuginosa* de principe actif .Clamoxypen

Figure 14 : Résultat de CMI pour la souche *S aureus* de principe actif Clamoxypen.

Figure 15 : Résultat de CMI pour la souche *S.aureus* de principe actif Amoxypen.

Figure 16 : Résultat de CMI pour la souche *E.coli* de principe actif Clamoxypen.

Figure 17 : Résultat de CMI pour la souche *E.coli* de principe actif Amoxypen.

Figure 18 : Résultat de CMI pour la souche *Bacillus subtilis* de principe actif Clamoxypen .

Figure 19 : Résultat de CMI pour la souche *Bacillus subtilis* de principe actif Amoxypen.

Figure 20 : Résultat de CMI pour la souche *Pseudomonas areuginosa* de principe actif Clamoxypen.

Figure 21 : Résultat de CMI pour la souche *Pseudomonas areuginosa* de principe actif Amoxypen.

GLOSSAIRE

Antibiotique : Substance d'origine biologique, généralement produite par des micro-organismes. Elle possède la propriété d'inhiber la croissance bactérienne ou de tuer les bactéries ou autres micro-organismes.

Antibiogramme : Méthode d'étude de la sensibilité dune souche bactérienne aux antibiotiques.

Bactérie : Micro-organisme unicellulaire sans noyau (procaryote) dont le génome est constitué d'ADN circulaire.

Bactéricide : Adjectif qualifiant une substance qui tue les bactéries.

Bactériostatique : Adjectif qualifiant une substance qui inhibe la croissance bactérienne sans les tuer.

B-lactamases : Des enzymes d'inactivation de type serine (classes A, C et D) ou metalloenzymes (classe B) dont les substrats sont des β-lactamines.

Concentration minimale inhibitrice : La plus faible concentration d'antibiotique (mg/l) pour laquelle il n'y a pas de croissance visible de la souche bactérienne étudiée.

Culture bactérienne : propagation de bactérie a la surface d'un milieu nutritif gélosé ou liquide.

Enzyme : molécule (protéique ou ARN dans le cas des ribosomes) qui accélère les réactions chimique du métabolisme, on parle de catalyseur biologie.

Espèce : Ensemble d'individus présentant des similitudes génétiques et/ou physiologiques. Les espèces bactériennes sont regroupées en familles et en genre.

Maladie infectieuse : Ce sont des maladies fréquentes, liées à la présence d'un germe. On distingue les maladies bactériennes dues aux bactéries, et virales, dues aux virus. Il existe également des infections fongiques (champignons, ou mycose), ou parasitaire.

Pénicillinase : C'est une enzyme qui dégrade les molécules de pénicilline. Produire par une bactérie, elle inhibera l'effet d'un traitement antibiotique par pénicilline.

Sommaire

Les abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction général… 01

Chapitre I : Biologie de certaines souches pathogènes

1. Gram négatif **03**

1.1 Famille des enterobactériaceae **03**

1.1.1 Escherichia **04**

1.2 Famille des Pseudomonaceae **05**

1.2.1 Pseudomonas **06**

2. Gram positif **06**

2.1 Famille des Staphylococcaceae **07**

2.1.1 Staphylococcus aureus **07**

2.2 Famille des bacilles **08**

2.2.1 Bacillus subtillis **09**

Chapitre II : Les antibiotiques

Les antibiotiques **11**

1. Historique **11**

2. Definitions **11**

3. Classification des antibiotiques **12**

3.1.1 Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi cellulaire **12**

a. Les betalactamines **12**

b. Les glycopeptides **12**

3.1.2 Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines **13**

a. Les aminosides ou amynoglicosides **13**

b. Les tétracyclines.....**13**

c. Macrolides..... **13**

d. Phenicoles **13**

3.1.3 Antibiotiques inhibant la synthèse d'acide nucléique..... **13**

a. Les quinolones **13**

b. Les rifamycines..... **14**

3.1.4 Antibiotiques inhibant la synthèse d'acide folinique..... **14**

3.2 Classification selon le spectre d'action..... **14**

4 Les effets des antibiotiques sur les bactéries **14**

a. Effet bacteriostase **15**

b. Bactéricidie **15**

5. Amoxicilline **15**

6. Acide clavulanique.....**17**

7. Le mélange Amoxicilline+ Acide clavulanique **22**

Chapitre III : Mécanismes de résistance aux antibiotiques

1. Définition de l'antibiorésistance..... **23**

2. Caractères de la résistance **23**

2.1 Résistance naturelle (Ou intrinsèque) **23**

2.2 Résistance acquise **23**

3. Mécanismes de la résistance **24**

4. Résistance aux béta lactamines..... **25**

5. Détermination de la catégorie S /I/R..... **26**

Chapitre IV : Partie expérimental

Matériel et méthodes

Lieu d'étude **29**

Objectif d'étude **29**

1. Matériel **29**

1.1 Matériel biologique **29**

1.2 Matériel non biologique **29**

2. Méthodes **30**

2.1 Conformité et identification de l'antibiotique **30**

2.1.2 Dosage par HPLC (chromatographie liquide a haute performance) **31**

2.1.3 Effet synergique entre l'amoxicilline et l'acide clavulanique **32**

2.2 Test de sensibilité des souches aux antibiotiques **32**

a. Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé **33**

b. CMI en milieu liquide **34**

c. Relation entre la méthode de diffusion sur gélose et la méthode en milieu liquide **35**

Résultats et discussion

1. Conformité et l'identification de l'antibiotique **38**

1.1 Solubilité **38**

1.2 Dosage HPLC (chromatographie liquide a haute performance) **39**

1.3 Effet synergique entre l'amoxicilline sodique et l'acide clavulanique **40**

2. Test de sensibilité des souches aux antibiotiques **41**

2.1 Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé **45**

2.2 CMI en milieu liquide **51**

3. Relation entre la méthode de diffusion sur gélosé et la méthode en milieu liquide **52**

Conclusion **53**

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

La découverte des antibiotiques a constitué une grande avancée dans le domaine de la médecine car leur utilisation a permis de guérir et prévenir de nombreuses maladies bactériennes infectieuses qui ont été auparavant potentiellement mortelles. Cependant, la surconsommation et l'usage inadapté de ces antibiotiques en santé humaine et animale a accéléré l'émergence du phénomène d'antibiorésistance. Depuis de nombreuses années, la résistance bactérienne aux antibiotiques n'a cessé d'augmenter mettant en danger l'efficacité des antibiotiques et leur capacité de sauver des vies. Si on n'arrive pas à trouver des solutions globales et efficaces pour faire face à ce problème et ralentir son évolution, la résistance bactérienne sera responsable d'un taux élevé de décès dépassant plusieurs fois son taux actuel. Au cours de ce travail nous avons donné un aperçu général sur les bactéries et les antibiotiques précisément l'Amoxicilline et l'amoxicilline + l'acide clavulanique, puis on a expliqué le phénomène de l'antibiorésistance **(A El BOUJNOUNI., 2020).**

Il y a plus de 30 ans, l'Amoxicilline demeure l'antibiotique le plus prescrit dans le traitement des infections respiratoires, urogénitales et bacteriémiques. Mais actuellement, l'âge d'or de cette molécule se réduit, face à la montée croissante des résistances bactériennes par production de betalactamines **(Weber et al., 1995).**

Ainsi, en plus de la résistance naturelle des bactéries aux certains antibiotiques, il existe une résistance acquise. En outre, de nombreux antibiotiques ne sont plus efficaces même à fortes doses **(Tankovic., 2000).**

A la fin de ce travail, nous avons exposé les principales stratégies au niveau de l'entreprise SAIDAL de laboratoire microbiologie pour atténuer et ralentir ce phénomène et le rôle essentiel Amoxicilline, consiste à évaluer l'efficacité et la tolérance de l'amoxicilline + l'acide clavulanique sur des germes résistants a l'amoxicilline.

Partie bibliographique

Chapitre I :

Biologie de certaine souche pathogène

La bactérie est un micro-organisme ubiquiste, unicellulaire et sans noyau (procaryote) dont le génome est constitué d'ADN. Celui-ci consiste en un seul chromosome, et on note éventuellement la présence de plasmides (petit morceau d'ADN circulaire). L'ensemble des bactéries forme le règne des eubactéries (*Eubacteria*).

Elles présentent de nombreuses formes : sphériques (coques), allongées ou en bâtonnets (bacilles) et des formes plus ou moins spiralées. L'étude des bactéries est la bactériologie, soit une des nombreuses branches de la microbiologie.

Les bactéries les plus grosses mesurent plus de 2 µm et jusqu'à début du XXe siècle, les spécialistes considéraient que plus petites mesuraient 0,2 µm, mais il existe des ultramcrobactéries.

I. Bacille à Gram négatif

Les bacilles à Gram négatif occupent une place importante en pathologie humaine. Généralement, on les divise en deux grands groupes : les entérobactéries et les bacilles à Gram négatif non fermentaires **(Liassine., 2000).**

1.1 Famille d'Enterobacteriaceae

A/ Historique et Taxonomie

Les entérobactéries constituent un grand groupe de bactéries ayant une forte similitude. La création de ce groupe a été proposée par, Qu'il dénomma enterobacteriaceae et dans lequel il rassembla les genres bactériens déjà décrits (tels que: *Escherichia, Salmonella, Klebsiella, Shigella*) dans le genre unique Enterobacter.

Les entérobactéries sont des Eubactéries, appartiennent à la division des Proteobacteria, la classe des Gammaproteobacteria**,** à l'ordre des Enterobacteriales et à la famille des Enterobacteriacea.

Les espèces les plus communément isolées en bactériologie clinique dont les principaux sont : *Escherichia, Klebsiella-Enterobacter-Serratia (KES), Proteus, Providencia, Salmonella-Shigella(SS), Yersinia* **(Zouhdi., 2009).**

B/ Habitat

Le nom d'entérobactéries a été donné parce que ces bactéries sont en général des hôtes normaux ou pathologiques, suivant les espèces microbiennes, du tube digestif de l'homme et des animaux. On les trouve aussi dans la cavité buccale, au niveau des vois aériennes supérieures et sur les organes génitaux. On les rencontre dans le sol, l'eau et dans certaines denrées alimentaires **(Fauchère et Avril., 2002 ; Achkour., 2012).**

C/ Pouvoir pathogène

Des entérobactéries chez l'homme est considérable. Les infections sont soit bien définies et peuvent concerner tous les sujets soit non spécifiques touchant les sujets immunodéprimés, en particulier ceux qui sont hospitalisés. Dans la majorité des cas, l'origine de l'infection est soit endogène à partir des flores bactériennes, soit exogène provenant de milieu extérieur. Les entérobactéries sont responsables de nombreuses infections (communautaires et nosocomiales) **(Medboua., 2011).** Les genres les plus fréquemment

rencontrés sont :

1.1.1 Escherichia

Ce genre regroupe les bactéries de forme bacille aérobie facultative de taille moyenne (4×1.2µm) **(Dellemee., 2003-2004).** Il est a mentionner que le chef de file de ce genre est représenté par l'espèce E. coli.

A/ Habitat

Hôte normal de l'intestin et des animaux, c'est l'espèce aérobie la plus représentée dans le tube digestif. La présence de colibacilles ou espèces voisines dans l'eau est un témoin de contamination fécale **(Bakhoum., 2004).**

- **Escherichia coli**

Appelée aussi colibacille aérobie facultative, commensal du tube digestif, est la bactérie la plus fréquemment impliquée dans les infections urinaires. Elle peut aussi provoquer des diarrhées par des mécanismes très divers, ainsi que diverses infections communautaires ou nosocomiales **(Nauciel et vilde., 2005).** Sur gélose nutritive, E. coli donne des colonies rondes, lisses a bords réguliers.

Les principaux caractères biochimiques de E. coli sont : lactose +, indole -, citrate -, H2S -, gaz +, uréase – **(Jarlier et nordmann., 2000).**

B/ Pouvoir pathogène

Aussi devenir un agent pathogène responsable de différents types d'infections :

- Infections extra-intestinales: Infections urinaires.
- Infections extra-intestinales.
- Infections abdominales : cholécystites, péritonites, appendicite.
- Infections génitales : prostatites.
- Infections ostéo-articulaires.
- Bactériémies. Méningites néonatales et neurochirurgicales.
- Infections puerpérales.
- Infections de plaies chirurgicales (nosocomiales).
- Infections intestinales : diarrhées infectieuses **(Allag., 2003).**

C/ Caractéristiques

C/ Caractéristiques

Escherichia coli exprime les caractères généraux des entérobactéries:

- Fermente le lactose,
- Production d'indole (milieu kligler).
- Gazogène,
- Souvent pas de production de H S.
- Uréase négative.
- Pas d'utilisation de citrate et pas de formation d'acétoïne **(Biomerieux., 2004)**

1.2 Les bacilles à Gram négatif non fermentaire

Sont des bactéries aérobies strictes, caractérisées par un mode de production énergétique ne faisant pas intervenir la fermentation. Parmi les bacilles à Gram négatif 10 à 15% sont des BNF dont les 3/4 appartiennent à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*. Les autres espèces appartiennent aux genres: Stenotrophomonas, Burkholderia, Acinetobacter et Achromobacter **(Martin., 2011).**

1.2.1 Etude des principaux genres

1.2.2 Pseudomonas

Ce sont des bacilles à Gram négatif, aérobies stricts, possèdent une oxydase, non fermentaires, mobiles par une ciliature polaire, respirant ou non les nitrates, oxydant ou non le glucose.

A/ Habitat

Ces bactéries occupent des niches écologiques variées, mais se retrouvent plus particulièrement dans les milieux humides tels que les eaux douces, les eaux de mer et les eaux thermales. Elles sont considérées comme une flore commensale chez l'homme ou l'animal. Certaines jouent un rôle pathogène dont *Pseudomonas syringae* chez les plantes et *Pseudomonas aeruginosa* chez l'homme et l'animal.

Les espèces les plus fréquemment isolées en milieu médical sont :

Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas stutzeri, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas putida **(Schuster., 2001).**

- **Pseudomonas aeruginosa**

Elle apparait la plupart du temps isolé ou en diplobacilles. Elle est pathogène et fréquemment rencontrée dans les infections nosocomiales **(Carbonelle et Mamonner., 1997).** C'est un germe ubiquitaire, vivant en milieu humide (robinets, bouchons), très résistant à de nombreux antiseptique (**Jarlier et Nordmann., 2000).**

B/ Pouvoir pathogène

Les Pseudomonas sont peu virulents pour l'individu normal, par contre ils sont considérés comme des agents infectieux redoutables lorsque les défenses immunitaires du sujet sont altérées. Les malades particulièrement sensibles sont les nourrissons, les personnes âgées, les sujets atteints d'affections graves, chroniques, métaboliques (diabète) mais surtout hématologiques ou cancéreuses. Chez les brûlés, cette infection est l'une des causes majeures de mortalité **(Avril et al., 2000).**

C/ Caractéristique

Les espèces les plus fréquemment isolées en milieu médical sont :

- Pseudomonas aeruginosa,
- Pseudomonas stutzeri,
- Pseudomonas fluorescens,
- Pseudomonas putida. **(Schuster., 2001).**

Tableau 1 : principaux caractères biochimiques des germes pathogènes, Gram négatif **(Avrilet., 2000).**

	ONPG	**ADH**	**LDC**	**ODC**	**H2S**	**Urée**
Escherichia Coli	+	-	+	+	-	-
Pseudomonas aeruginosa	-	+	-	-	-	-

II. Les bactéries à Gram Positive

Les bactéries à Gram positive sont des Bactéries en violet par la coloration de gram, de forme sphérique, S'organisent (en chainettes, en amas ou en couple) **(Danois Hans ChristianGram., 1884).**

2.1. Les coques à Gram positive :

2.1.1 Staphylocoques

A/ Habitat et Transmission

Le réservoir naturel des staphylocoques est l'homme et les animaux à sang chaud.

Cependant, éliminées dans le milieu extérieur, ces bactéries très résistantes sont fréquemment retrouvées dans l'environnement. Commence de la peau, des muqueuses et des zones cutanées humides **(Matard B, Donay JL., 2019).**

- La transmission intra ou interhumaine s'opère généralement par contact direct (manuportage).

Plus rarement, elle peut être indirecte à partir d'une source environnementale (vêtements, draps, matériels médicaux).Transmission directesmanu portées au indirectes par les éléments souilles **(Earls MR., 2019).**

- **Principes généraux**

Les Staphylocoques sont des bactéries a gram positives, organises en amas, divises en 2 groupes :

a) S.acoegulase positive (S.dorè ou S.aureus).

b) S.acoegulase négative (autres) **(Tarek Msadek., 2019)**

- **Staphylococcus aureus (Staphylocoque doré)**

C'est un coccus, de forme arrondie, qui se présente sous la forme de diplocoques (des coccis associés par deux) ou sous la forme d'amas ayant la forme de grappes de raisin. Actuellement,

on distingue 44 espèces. Certaines souches sont résistances a la pénicilline M : les ARMs surtout en nosocomial+++ **(J Clin Microbiol., 2015).**

B/ Pouvoir Pathogène

- Suppurations : infections des parties molles osseuses, pulmonaires.
- Sepsis : Staphylococcie maligne de la face endocardite infectieuse.
- TSS : choc toxiques staphylococciques liée à la protéine TSST-1.

(F Rozgonyi, G Seltmann., 1985).

- **Facteurs de pathogénicité**

Les facteurs de pathogénicite de la staphylococcus aureus sont : Protéine A / Adhesines / Toxines : hémolysines, expoliatine, enterotoxine, TSST-1 / PLP-2A.

- **Diagnostic bactériologique :**

Examen Direct : isolement, recherche de toxines toujours associé un antibiogramme **(D OAndrey., 2015).**

C/ Caractéristiques

Staphylococcus aureus est une Cocco bactérie Gram positif, Catalase positive appartenant à la famille des Staphylococcaceae, Il a un diamètre d'environ 0,5 à 1,5 µm, est immobile, Aasporulé et facultativement anaérobique (sauf S. aureus anaerobius) **(Pillet J., 1977).**

Tableau 2 : caractères biochimiques différentiels entre les espèces des staphylococcus :

	Coagulase	Dnase	Nitrate	Posphatase	Mannitol	RNOV	FOSMYCINE
S.aureus	+	+	+	+	+	-	-
S.epedermidis	-	-	+	+	-	+	+

2.2. Les bacilles à Gram positif

Moins nombreuses que les grams négatifs, leur paroi et plus simple mais plus épaisse d'un aspect uniforme elle est constitué de peptidoglycane cause dans lequel sont disperses d'autres composants comme les acides teïchoique, elles sont très variées sur le plan morphologiques, physiologiques et écologiques **(Pogmore AR et al., 2018).**
On distingue deux groupes principaux :
Le groupes qui forme des endospores incluant les genres *clostriduim* et *bacillus,* l'endospore est une forme de résistance aux conditions défavorables.

2.2.1-Bacillus subtillis

Bacillus subtillis est une bactérie à gram positif vivant dans le sol et qui fait partie du groupe des *Firmicutes* comprenant **(Frankland et Frankland., 1887).**

A/ Habitat et transmision

Il se trouve principalement dans le sol et la végétation avec une température de croissance optimale de 25-35 degrés Celsius **(Serra CR Earl AM., 2014).**
B. subtilis est non pathogène, mais peut contaminer les aliments et être considéré comme un pathogène opportuniste chez les personnes immunodéprimées. Ils sont utilisés sur les semences, les légumes et les plantes comme fongicide en raison de leur capacité à produire des antibiotiques. B. subtilis habite le système racinaire de la plante en compétition avec les

organismes pathogènes. Certaines souches de B. subtilis sont capables de produire des toxines pour les insectes. Ces souches sont utilisées par les exploitations agricoles pour protéger leurs cultures **(Hirooka K., 2014).**

B/ Pouvoir pathogène

B. subtilis n'est pas reconnu comme pathogène pour l'Homme, mais elle peut contaminer des aliments et peut exceptionnellement provoquer une intoxication alimentaire

(Anonyme., 2020).

B. subtilis peut servir à repeupler la flore intestinale par un bacille antibiorésistant, non pathogène **(Anonyme., 2020).**

C/ Caractéristiques

Bacillus subtilis bactérie ubiquitaire à Gram positif, catalase positive, aérobie pouvant se développer en anaérobiose, mobile par des flagelles peritriches, formant des spores très résistantes dont l'élimination efficace nécessite des conditions particulières **(Anonyme., 2017).**

Chapitre II :
Les antibiotiques

1. Les antibiotiques

❖ Historique

En 1889, Paul Vuillemin introduit le terme «antibiose» pour décrire le principe actif d'un organisme vivant qui détruit la vie des autres pour protéger sa propre vie.
En 1897, Ernest Duchesne envisagea de faire une activité de moisissures à des fins thérapeutiques, mais son idée ne se mettra en place qu'au XX ème siècle à la suite de la découverte de Sir Alexander Fleming.
En 1929, il remarque qu'une de ses cultures de staphylocoques est en partie décimée : les bactéries ont été contaminées par la moisissure Penicillium notatum. Il constate aussi qu'elles ne se développent plus là où la moisissure prolifère.
Il formule alors l'hypothèse que cette-dernière synthétise une substance, la pénicilline, qui bloque le développement de la bactérie. Il essaye alors d'extraire le principe actif des moisissures, mais toutes ses tentatives se soldent par des échecs.
Dix ans plus tard, le biochimiste américain René Dubos isole le premier antibiotique : la gramicidine. Celle-ci, produite par des bactéries du sol, tue les pneumocoques. Pourtant, ce premier antibiotique reste extrêmement difficile à purifier et hautement toxique.
En 1940, deux hommes cultivent une souche de Penicillium et parviennent à isoler et à purifier un peu de pénicilline G. Après les premiers essais chez des souris infectées où le résultat a été concluant, on administre cette substance à un policier atteint d'une septicémie. L'état du malade s'améliore, mais le stock de pénicilline étant insuffisant, le traitement doit être suspendu. Le policier décède donc, faute de quantité suffisante d'antibiotique.

Pourtant, le premier antibiotique synthétisé a été créé par Gerhard Domagk, un biochimiste allemand.

En 1932, il a découvert qu'un colorant, le sulfamidochrysoïdine avait un effet sur les streptocoques. Il l'a alors tout de suite breveté sous le nom de Prontosil. Il a d'ailleurs reçu le Prix Nobel pour sa découverte en 1939. En découvrant l'hémi synthèse, il a ouvert la voie à la antibiothérapie moderne)

1.1. Définition

Les antibiotiques (du grec *anti* : contre ; *biotikos* : concernant la vie) se définissent comme toute substance capable d'agir sur des cellules bactériennes, soit inhiber la croissance ou même tuer ces microorganismes, sans affecter l'hôte (cellules eucaryotes).
Les antibiotiques sont produits principalement par des champignons, mais parfois aussi par des bactéries **(Van Bambeke et Tulkens., 2007)**.

Les antibiotiques proviennent des moisissures ou champignons, des bactéries ou même de la synthèse partielle ou totale. Les espèces de *Streptomyces* représentent les plus importantes sources d'antibiotiques utilisées en thérapeutique **(Mazri., 2015)**.

2. Classification des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être classes selon plusieurs critères : la nature chimique, le mécanisme d'action, le spectre d'action et la tolérance **(Tankovic., 2000)**

2.1. Classification selon le mode d'action

Les antibiotiques sont capables de détruire les cellules bactériennes (activité bactéricide) ou bien d'inhiber leur croissance (activité bactériostatique). Un antibiotique peut agir à différente niveaux **(Pebret., 2003)** :

- Au niveau de peptidoglycane, matériau de base de la paroi bactérienne (exemple:pénicillines, céphalosporine, carbapenems, monobactams, voncomycine**,** cycloserine et bacitracine).
- Au niveau de la synthèse des protéines bactériennes (exemple : linezolide, Érythromycine et autre macrolide et apparentés, chloramphénicol, Clindamycine et tétracycline).
- Au niveau de la synthèse de l'ADN bactérienne par l'inhibition de la synthèse De l'acide folique.
- En agissant sur la synthèse des ARN des ribosomes.

Pour pouvoir être utilisable en pratique clinique, un antibiotique doit avoir une Action spécifique sur les bactéries cibles sans affecter le fonctionnement des cellules Eucaryotes (hôte). Il devra donc idéalement agir sur une voie métabolique absente ou peu Active chez les eucaryotes mais essentielle aux procaryotes, ou atteindre une cible Spécifique aux procaryotes (**Van Bambeke et Tulkens., 2007)**.

2.1.1. Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi cellulaire :

A/ Les betalactamines

Toutes les molécules de cette famille possèdent un noyau bêta-lactame, les antibiotiques de Cette famille sont bactéricides.

• le groupe principale et le plus ancien, qui comprend les pénicillines G et V , et les pénicillines de groupe A (amoxicilline) , groupe M (cloxaclline, oxacilline) , les carboxypénicillines (ticarcilline), les uréidopénicillines (pipéracilline), les aminidopénicillines (pivmécillinam), la témocilline(dérivé de la trcarclline) .

le sous-groupe principale derrière les pénicillines, est celui des céphalosporines avec les céphalosporines de première génération (céflaxine, céfalotine, céfazoline…) les céphalosporines de deuxième génération (céfuroximes, céfoxitine …) les céphalosporine de troisième génération (céfixime, céfépime …).Dans les bêta-lactamines on a ensuite les carbapénémes avec l'ertapénem, l'imipénem et le Méropénem ainsi qu'un monobatame, l'aztréonam .en plus, il existe des inhibiteurs de bêta-lactamases tels que (acide clavulanique, Augmentin® composé d'amoxicilline), et qui agit sur les bactéries productrices de pénicillinase**(D.YALA et al., 2001).**

B/ Les glycopeptides :

Ce sont les antibiotiques bactéricides de référence pour le traitement d'endocardites ainsi que pour leur prévention en cas d'allergie a la pénicilline **(Brigitte et al., 2007).**

2.1.2. Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines

A/ Les aminosides ou aminoglycosides

On distingue des sous-groupes en fonction de la substitution sur l'aminocyctitol, Ce sont des antibiotiques rapidement bactéricides. Il existe plusieurs centaines de molécules naturelles et hémi-synthétiques .elles sont divisées en trois classes :

• Streptamine
• 2 désoxystreptamine
• Streptidine

le traitement par aminoside ne doit pas excéder 7 jours et la dose journalière doit être unique **(D.YALA et al., 2001).**

B/ Les Tétracyclines

Sont bactériostatiques, elles pénètrent bien dans les cellules, ces molécules présentent une grande homogénéité. On distingue les cyclines naturelles (Chlorotétracyclines), et les cyclines semi-synthétiques (Oxytétracycline, doxycycline, Minocycline) **(D.YALA et al., 2001).**

C/ Les Macrolides

Sont des antibiotiques fréquemment utilisés en pratique de ville à cause de leur facilité d'emploi. Ils ont un spectre étroit, et sont parfaitement actifs sur les germes intracellulaires. Ils ont une excellente pénétration tissulaire, les macrolides possèdent un noyau lactone central qui est à la base de leur classification, selon le nombre d'atomes de carbone. Ce sont des molécules lipophiles **(D.YALA et al., 2001)**.

D/ Les Phénicoles

On distingue :

- **le chloramphénicol :** c'est un antibiotique à large spectre. En Algérie, il est réservé au traitement de la fièvre typhoïde **(D.YALA et al., 2001).**
- **le Thiamphénicol :** est très voisin chimiquement du chloramphénicol, son spectre d'action est similaire **(D.YALA et al., 2001).**

2.1.3. Antibiotiques inhibant la synthèse d'acide nucléiques

2.1.4. A/ Les quinolones et fluoroquinolones

Cette famille d'antibiotique est à utiliser avec précaution car elle présente de nombreuses résistances et sera donc à éviter en première intention, plusieurs sous divisions sont acceptées, ici nous les subdivisions en quinolones urinaires aves les quinolones de première génération (acide pipémidique, fluméquine), et les fluoroquinolones (énoxacine, Ofloxacine, lévofloxacine) **(D.YALA et al., 2001).**

B/ Les rifamycines :

Sont constituées d'un macrocycle et d'un cycle aromatique. et On distingue trois antibiotiques principales : la Rifamycine **SV** (Rifocine ®), et la Rifamide et la Rifampicine **(D.YALA et al., 2001).**

2.1.5. Antibiotiques inhibant la synthèse d'acide folinique

- **LES SULFAMIDES**

  Les sulfamides sont bactériostatiques, cette classe d'antibiotique est très allergisante. Indiques en première intention dans les infections urinaires basse non compliquées, prostatites, pyélonéphrites aigues, pneumocystose pulmonaire **(Brigitte et al., 2007).**

2.2. Classification selon le spectre d'action

Le spectre d'activité d'un antibiotique est une notion théorique permette la caractérisation de l'activité microbiologique d'un antibiotique sur une espèce bactérienne en fonction des résistances naturelles et acquises **(Cavallo et Mérens., 2008 ; Konate., 2019).**

L'établissement du spectre antibactérien d'un antibiotique repose sur la répartition des CMI au sein de la population sauvage d'une espèce bactérienne et la détermination de concentrations critiques, proposées par des Comités d'experts. Ce spectre est réparti en trois sections :

Celle des « espèces habituellement sensibles »: ensemble des espèces naturellement sensibles c'est-à-dire inhibées par les concentrations atteintes après administration du médicament aux posologies validées par l'autorisation de mise sur le marché (AMM). Celle des « espèces modérément sensible »: ensemble des espèces pour lesquelles le succès thérapeutique est imprévisible car ils ont un taux de résistance acquise et ces résistances peuvent représenter un problème thérapeutique **(Muylaert et Mainil., 2013)**.

3. Les effets des antibiotiques sur les Bactéries

L'action des antibiotiques sur les germes peut prendre deux aspects: bactériostase et bactéricidie. On peut dit que ces deux aspects sont complémentaires et sont des degrés différents d'une seule et unique espèce bactérienne **(Sadjia et Sylia., 2017).**

A/ Bactériostase

C'est l'arrêt temporaire du développement bactérien qui se produit par l'inhibition partielle ou totale de leur croissance. Cette inhibition cesse dès que l'ATB disparait, et la croissance peut alors reprendre. L'estimation de cette activité pratiquement se fait par la mesure de la CMI **(Sadjia et Sylia., 2017).**

B/ Bactéricidie

C'est l'arrêt définitivement du développement bactérien par la mort cellulaire avec/ou sans lyse. L'estimation de Cette activité pratiquement se fait par la mesure de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) **(Sadjia et Sylia., 2017)**.

4. Amoxicilline

L'amoxicilline (AMX) est un antibiotique bêta-lactamine avec une action bactéricide de la famille des aminopenicillines, indiquée dans le traitement des infections bactériennes à germes sensibles.

Elles est également indiquée chez adulte dans le traitement de certains ulcères de l'estomac **(Weber et al., 1995).**

Tableau 3 : Classification de L'amoxicilline **(Anonym f., 2004 Soilleux., 2007)**

Famille	Bêta-Lactamines
Sous-famille	Penicillines
Groupe	Aminopénicillines
Antibiotique (dénomination commune internationale)	Amoxicilline Amoxicilline+Acide clavulanique
Nom commercial	Amoxicilline-Clamoxyl®, Clavulanic®, Alti-Amoxiclav°R, Ratio-Amox Clav® ou Apo-Almoxi Clav®

4.1. Caractéristiques

- **Formule brute** C16H19N3O5S
- **Structure**

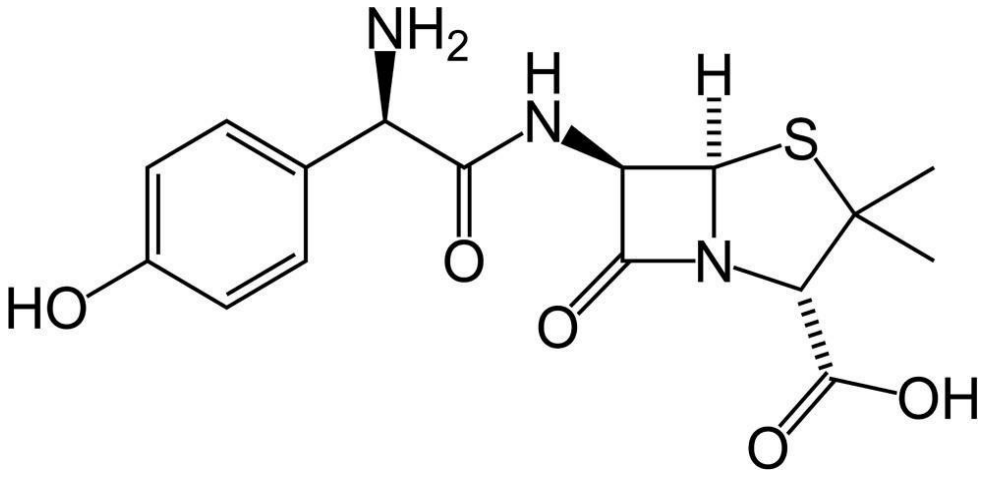


Figure : structure d'amoxicilline (Anonyme., 2021)

4.1.1. Posologie

La dose d'amoxicilline utilisée en thérapeutique humaine s'échelonne de 25 à 150 mg kg^{-1} j^{-1} en deux à quatre prises, variant en fonction du mode d'administration, de l'infection à traiter **(Anonyme d., 2021).**

4.1.2. Voie d'administration

Pour l'amoxicilline simple, ou combinée à l'acide clavulanique, l'administration se fait par voie orale ou intraveineuse (injection ou perfusion). **(Anonyme d., 2021).**

4.1.3. Germes sensibles

Les germes habituellement sensibles à l'amoxicilline sont :

Les streptocoques beta-hémolytiques, les streptpcoccus pneumonie (pneumocoque) et certaines espèces a Gram négatif fragiles, aérobies et anaérobies (Gonocoques, Méningocoque et BOrrelia) **(Weber et al., 1995).**

L'AMX est utilisé dans le traitement de la pneumonie typique et de la méningite à pneumocoque. D'une manière générale, les espèces à Gram positif (Streptocoques, Listeria, Clostridium perfringens). Pour ces bactéries, l'amoxicilline constitue le traitement de première ligne tant la sensibilité des germes es grande. Son action contre le staphylocoque dorée est bonne également à condition que la souche ne produise pas des bêta-lactamase, ce qui deviens de plus en plus fréquent **(Weber et al., 1995).**

Le spectre d'action d'amoxicilline peut être améliore en le combinant avec un inhibiteur de bêta-lactamase, c'est-à-dire une substance qui protège LAMX contre les enzymes défensives anti bêta-lactamase produites par certaines bactéries.

Par exemple une combinaison d'AMX et d'acide clavulanique inclut dans son spectre toutes les souches d'haemophilus influenzae, encore plus Escherichia coli, et de nombreuses souches de proteus **(Weber et al., 1995).**

4.1.4. Effets indésirables

Allergies, pouvant se manifester de façon plus ou moins grave : éruption sur la peau, augmentation de certains globules blancs les betalactamines sont actuellement la cause principale des réactions (présumées) allergiques aux médicaments et l'amoxicilline est actuellement une des molécules les plus prescrites dans plusieurs pays. Les réactions peuvent résulter d'une sensibilisation à l'amoxicilline ou l'acide clavulanique. Bien que les processus de fabrication des betalactamines se soient améliores avec les années, le

nombre de réactions na pas diminue, et ce probablement du fait du nombre croissant de sujets exposes **(Micu et al., 2006).**

Des troubles digestifs : nausées, vomissements, diarrhées. Plus rarement : augmentation modère et transitoire des enzymes du foie (transaminases), anémie. atteinte rénale….etc. **(Anonyme d., 2021).**

4.2. Acide clavulanique(AC)

L'acide clavulanique (AC) est un inhibiteur irréversible de l'enzyme de la soi-lactamase avec une faible activité antibactérienne produite par Streptomyces clavuligerus (S. clavuligerus). L'AC est généralement coformulée avec des antibiotiques à large spectre du type lactame, comme l'amoxicilline, ce qui leur confère un fort potentiel pour traiter les maladies causées par des bactéries qui possèdent une résistance au lactame. L'importance clinique de l'AC et la complexité du processus de production motivent les améliorations d'un point de vue interdisciplinaire en intégrant les stratégies de génie métabolique et les connaissances sur les événements métaboliques et réglementaires par des approches axées sur la biologie des systèmes et la multi-omique. Dans le bio traitement à grande échelle, l'optimisation des conditions de culture, la conception du bioréacteur, le régime d'agitation, ainsi que les progrès dans la séparation et la purification de l'AC sont nécessaires pour améliorer la structure des coûts associés à la production d'AC. Cette revue présente les connaissances récentes sur la production d'AC par S. clavuligerus, en mettant l'accent sur les approches de biologie des systèmes, l'ingénierie des souches et le traitement en aval **(Gómez-Ríos D., Ramírez-Malule H-2017/2018).**

- **Formule brute** C8H9NO5
- **Structure**

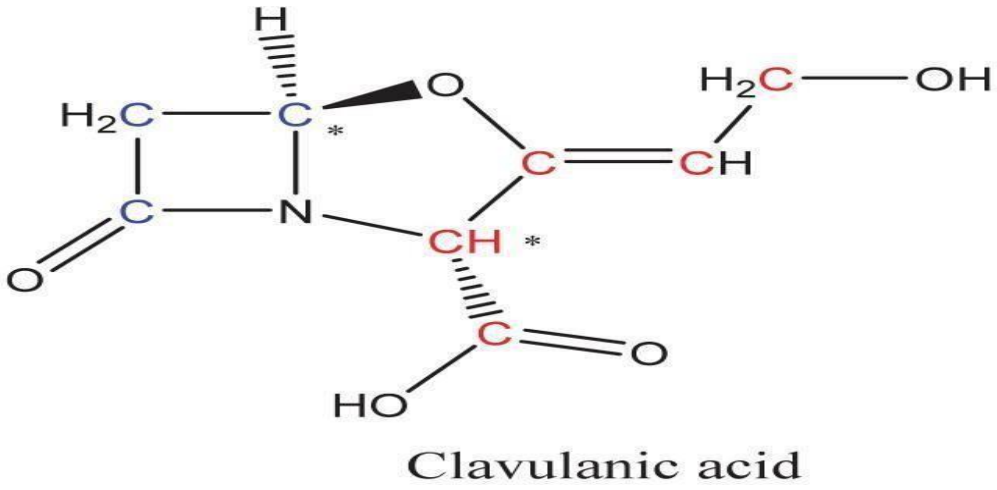


Figure : structure d'acide clavulnique(Anonyme d., 2021).

- **Propriétés physiques**
  -Solubilité : 1.106mg/l d'eau 25°C .300mg/l (sel de potassium).
  -T° fusion : 117,5 à 118°C **(Benardy et al., 1991).**

4.3. Le mélange amoxicilline + Acide clavulanique

L'acide clavulanique améliore le spectre antibactérien de l'amoxicilline en rendant les isolats les plus productifs de lactamase sensibles au médicament. Dans les essais cliniques, l'amoxicilline/acide clavulanique est cliniquement et bactériologiquement supérieure à l'amoxicilline seule et au moins aussi efficace que de nombreux autres agents comparatifs, tels que les céphalosporines administrées par voie orale, le cotrimoxazole, la doxycycline et la bac ampicilline, dans le traitement des adultes et des enfants présentant les formes d'infection les plus courantes rencontrées en pratique générale, à savoir les infections des voies urinaires, les infections des voies respiratoires supérieures et inférieures, les infections otorhinolaryngologiques et les infections de la peau et des tissus mous. Il peut également fournir un traitement efficace pour la gonorrhée non compliquée, les infections du chancre mou et gynécologiques ainsi qu'agir comme agent prophylactique contre l'infection chirurgicale **(Abbas AMA., 1988).**

Ainsi, dans les milieux de pratique générale où la production de la N-lactamase a limité l'efficacité de l'amoxicilline, l'association de l'acide clavulanique et de l'amoxicilline a clairement étendu l'utilité d'un agent antibactérien de première intention éprouvé **(Abbas AMA., 1984).**

4.3.1. Posologie

A titre indicatif, chez les adultes aux fonctions rénales normales, la posologie usuelle est de 1g, 2a4 fois par jour. Dans les infections sévères elle peut être augmentée jusqu'à 12 g/jour, sans jamais dépasser 200mg d'acide clavulanique par injection et 1200 mg d'acide cavulanique par jour **(Anonyme., 2004).**

4.3.2. Activité Antibactérienne

L'acide clavulanique est un inhibiteur « suicide » irréversible des ß-lactamases intracellulaires et extracellulaires, efficace contre une grande variété de ces enzymes, y compris celles des classes II à V de Richmond et Sykes (mais pas les céphalosporinases de classe I), la ß-lactamase staphylococcique et la ß-lactamase produite par Bacteroides fragilis. L'acide clavulanique protège donc l'amoxicilline de l'inactivation par de nombreuses N-lactamases. En conséquence, l'activité antibactérienne de l'amoxicilline a été rétablie à un moment où la propagation de la résistance due à la production de la N-lactamase a gravement menacé son utilité **(Abri O, Schulz L., 1989).**

L'acide clavulanique seul ne possède qu'une faible activité antibactérienne, sauf contre Legionella spp. Et certaines souches de Branhamella catarrhalis, B. fragilis et Neisseria gonorrhoeae. Cependant, l'addition d'acide clavulanique à l'amoxicilline

augmente la sensibilité à l'amoxicilline des souches résistantes à l'amoxicilline de bactéries aérobies et anaérobies Gram négatives et Gram positives où la résistance est provoquée par la production de N-lactamases. Il s'agit de Staphylococcus aureus (mais pas de souches résistantes à la méthicilline), Haemophilus spp., Branhamella catarrhalis, Neisseria gonorrhoeae, Escherichia coli, Proteus spp., Klebsiella pneumoniae, Citrobacter diversus, Salmonella et Shigella spp., Campylobacter jejuni, Bacteroides spp. Et Mycobacterium spp. La sensibilité des souches sensibles à l'amoxicilline n'est généralement pas affectée par l'addition d'acide clavulanique.

L'amoxicilline/acide clavulanique est bactéricide in vitro, habituellement à des concentrations d'au plus une dilution supérieures aux concentrations inhibitrices in vitro. La synergie in vitro de l'acide clavulanique associé à l'amoxicilline a été confirmée in vivo dans de nombreuses infections expérimentales chez l'animal. L'association de l'amoxicilline et de l'acide clavulanique semble supprimer le développement de la résistance dans des conditions expérimentales **(Adam D., 1982).**

4.3.3. Propriétés Pharmacocinétiques

L'association de l'acide clavulanique et de l'amoxicilline n'entraîne aucune modification notable de la pharmacocinétique des deux médicaments par rapport à leur administration séparée. Après administration orale, les deux composants atteignent les concentrations plasmatiques maximales en 1 heure environ et ces concentrations présentent une relation directe avec la dose administrée. La biodisponibilité absolue de l'acide clavulanique est d'environ 60%. L'absorption n'est pas affectée par l'administration concomitante d'aliments, de lait, de ranitidine ou de pirenzépine et peu affectée par l'administration d'antiacides, mais la cimétidine peut augmenter le taux d'absorption des deux composants. Le probénécide augmente la concentration plasmatique de l'amoxicilline mais pas celle de l'acide clavulanique **(Adam D., 1983).**

L'acide clavulanique a un volume de distribution d'environ 25 % du poids corporel et est lié aux protéines à environ 22 % in vitro. La distribution des tissus et des liquides organiques des deux composants est généralement adéquate pour atteindre des niveaux antibactériens, bien que les concentrations puissent être quelque peu faibles dans les sécrétions bronchiques et le liquide céphalorachidien. Les deux composants sont transférés à travers le placenta, mais seules de très petites quantités sont transférées dans le lait maternel **(Agrawal SK., 1987).**

L'acide clavulanique et l'amoxicilline ont une demi-vie d'élimination moyenne d'environ 1 heure et une clairance totale moyenne d'environ 25 L/h chez des sujets sains. La principale voie d'élimination se fait par voie urinaire, et la récupération urinaire du médicament intact après 6 heures d'administration orale est d'environ 60 à 80% pour l'amoxicilline et de 30 à 50% pour l'acide clavulanique. L'acide clavulanique est excrété principalement par filtration glomérulaire et l'amoxicilline par sécrétion tubulaire ; ainsi, le probénécide retarde l'excrétion de l'amoxicilline mais pas de l'acide clavulanique. Alors que l'amoxicilline est principalement excrétée sous forme inchangée, l'acide clavulanique est soumis à une hydrolyse et à une décarboxylation ultérieure **(Ahmad F., 1984).**

Les maladies gastro-intestinales peuvent ralentir la vitesse d'absorption de l'amoxicilline et de l'acide clavulanique. Le profil pharmacocinétique chez les enfants ayant reçu des doses ajustées au poids corporel était similaire à celui des adultes. L'insuffisance rénale diminue la clairance de l'amoxicilline et de l'acide clavulanique de façon moins marquée : des réductions de dose ou une augmentation de l'intervalle entre les doses sont donc nécessaires. Les deux composants sont éliminés par hémodialyse et une supplémentation appropriée en dose est donc nécessaire à la fin d'une séance d'hémodialyse **(Aigner K., 1984).**

4.3.4. Essais Thérapeutiques

L'amoxicilline/acide clavulanique a généralement été administrée empiriquement à des patients présentant des symptômes évocateurs d'une infection bactérienne, sans sélection de patients en fonction de la résistance ou de la sensibilité de l'agent pathogène. Les doses d'amoxicilline/acide clavulanique étaient généralement comprises entre 250/125 et 875/125 mg 2 ou 3 fois par jour chez l'adulte et des doses ajustées en fonction du poids corporel ont été administrées aux enfants **(Al Roomi LG., 1984).**

Chez les patients adultes présentant une infection urinaire compliquée ou non compliquée, l'amoxicilline/acide clavulanique était cliniquement et bactériologiquement supérieure à un niveau statistiquement significatif par rapport à l'amoxicilline seule et à la céfatrizine propylène glycol, et bactériologiquement supérieure par rapport au cotrimoxazole. De plus, il était au moins aussi efficace que le céfaclor, la céfalexine et le pivmécillinam/pivampicilline.

Chez les patients adultes atteints d'infections des voies respiratoires supérieures ou inférieures, l'amoxicilline/acide clavulanique a été cliniquement plus efficace que l'amoxicilline seule ou la josamycine à un niveau statistiquement significatif. Cliniquement et bactériologiquement, il était au moins aussi efficace que la bacampicilline, le pivmécillinam/pivampicilline, la doxycycline, l'érythromycine, le céfuroxime axétil, le céfixime et le céfaclor **(Alvarez S, Jones M., 1985).**

L'amoxicilline/acide clavulanique s'est avéré cliniquement plus efficace à un niveau statistiquement significatif que l'amoxicilline seule dans le traitement de l'otite moyenne aiguë chez l'adulte, mais aucune différence statistiquement significative n'a été identifiée dans les comparaisons avec l'amoxicilline chez les enfants atteints d'otite moyenne ou de sinusite maxillaire. Certaines études ont montré une supériorité statistiquement significative de l'amoxicilline/acide clavulanique par rapport au céfaclor ou à la myringotomie, à la fois cliniquement et bactériologiquement, chez les enfants atteints d'otite moyenne aiguë.

Dans les infections de la peau et des tissus mous, l'amoxicilline/acide clavulanique a produit un taux de réponse bactériologique statistiquement significatif plus élevé et une tendance vers un taux de réponse clinique plus élevé que l'amoxicilline chez les adultes atteints d'une infection des plaies et les enfants atteints d'impétigo non bulleux. De plus, chez les adultes présentant une infection des plaies, l'amoxicilline/acide clavulanique était équivalente au céfuroxime axétil. Chez les

adultes et les enfants atteints d'une infection de la peau et des tissus mous, l'amoxicilline/acide clavulanique et le céfaclor ont présenté des réponses cliniques et bactériologiques similaires **(Ambrose NS., 1988).**

Dans la gonorrhée non compliquée, l'administration de 2 doses d'amoxicilline/acide clavulanique 3000/125 ou 3000/250 mg à 4 à 6 heures d'intervalle ou d'une dose unique en association avec le probénécide 1g s'est avéré la plus satisfaisante et la plus pratique, avec une activité antibactérienne étendue pour couvrir Neisseria gonorrhoeae productrice de pénicillinase. Amoxicilline/acide clavulanique 500/250mg 3 fois par jour pendant 3 jours semble fournir un excellent traitement pour le chancre mou. **(Bee LH., 1985).**

L'amoxicilline/acide clavulanique peut fournir un régime efficace et plus facile à gérer que la triple combinaison standard d'a-lactame/d'aminoglycoside/d'imidazole dans le traitement des infections obstétricales et gynécologiques, mais il faut étudier davantage ce domaine avant de pouvoir tirer des conclusions définitives. L'amoxicilline/acide clavulanique a montré d'excellents résultats par rapport à d'autres traitements prophylactiques tels que les céphalosporines ou les aminosides, et a été supérieur au métronidazole à un niveau statistiquement significatif, dans la prévention des complications infectieuses postopératoires après une chirurgie gynécologique, abdominale et vasculaire **(Beeuwkes H., 1981).**

4.3.5. Effets indésirables

Environ 13% des patients rapportent des effets indésirables avec l'amoxicilline/acide clavulanique, nécessitant l'arrêt du traitement chez moins de 3% des patients. Les effets indésirables sont principalement des troubles gastro-intestinaux légers, dont la diarrhée, les nausées, les vomissements et l'indigestion. Une éruption cutanée et une candidose vaginite ou une stomatite surviennent chez environ **1** % des patients. Des cas isolés d'urticaire, d'anaphylaxie, de modifications comportementales et d'anomalies des tests de laboratoire ont été rapportés **(Umbach G, Lang N, Werner H., 1982).**

Mécanismes de résistance aux antibiotiques

La résistance bactérienne aux antibiotiques est apparue rapidement après leur introduction dans le traitement des maladies infectieuses. Cette résistance est un facteur +majeur compliquant le traitement des infections bactérienne et la dissémination des souches multi-résistance **(Merad et al., 2001).**

1.1 Définition de l'antibiorésistance

Selon l'OMS deux définitions de la résistance ont été proposées :

- Souche capable de supporter une concentration d'antibiotique notablement plus élevée que celle qui inhibe la majorité des autres souches de la même espèce.

- Souche capable de supporter une concentration d'antibiotique notablement plus élevée que celle qu'il possible d'atteindre in vivo **(Jumpeau et al., 1994).**

La résistance bactérienne aux antibiotiques se caractérise par son caractère naturel ou acquise, son mécanisme et son support génétique **(Merad et al., 2001).**

2. Caractères de la résistance

La résistance aux antibiotiques peut être naturelle ou acquise.

2.1 Résistance naturelle (Ou intrinsèque)

C'est une insensibilité aux antibiotiques, existant naturellement chez tous les membres d'une espèce bactérienne. Elle fait, donc, partie du patrimoine génétique normal du germe **(Mainardi et al., 1996).** C'est –à-dire elle est exclusivement chromosomique, donc elle est transmissible à la descendance **(Jarlier., 1997).**

2.2 Résistance acquise

Les résistances acquises sont dues à une imperméabilité accrue de la membrane externe, une modification des porines, une altération des récepteurs aux antibiotiques et à la production d'enzymes inactivantes **.**

L'apparition de nouvelles résistances chez P. aeruginosa est fréquemment liée à l'acquisition de matériel génétique étranger (plasmide, transposon et intégrons) récupéré d'autres bactéries à Gram négatif voire à Gram positif (gènes codant des méthylases de l'ARN 16S) **(Mérens et al., 2012).**

- **Résistance chromosomique** Elle s'agit de la mutation ponctuelle soit dans les gènes structurels de la résistance, soit dans les gènes de régulation (**Roussel-Delvalez., 2001 ; Courvalin et Mabillat., 2007).**

- **Résistance extra chromosomique**

Elle s'agit de transfert d'ADN de plasmides ou de transposons

- **Plasmides**

L'information génétique est portée par des plasmides. Transférables à d''autres bactéries par conjugaison, transduction ou transformation **(Peyret., 1994).**

- **Transposons**

Ce sont des fragments d'ADN * sauteurs * qui peuvent s'intégrer soit dans le chromosome soit dans des plasmides, en allant de l'un à l'autre **(Peyret., 1994).**

3. Mécanismes de la résistance

Pour résister aux effets des antibiotiques, les bactéries peuvent mettre en ouvre différents mécanismes de résistance

- Diminution de l'accès de l'antibiotique dans la bactérie.
- Modification de la cible des antibiotiques.
- Diminution de la perméabilité et efflux actif.
- Production d'enzymes inactivant les antibiotiques **(Gérald., 2008).**

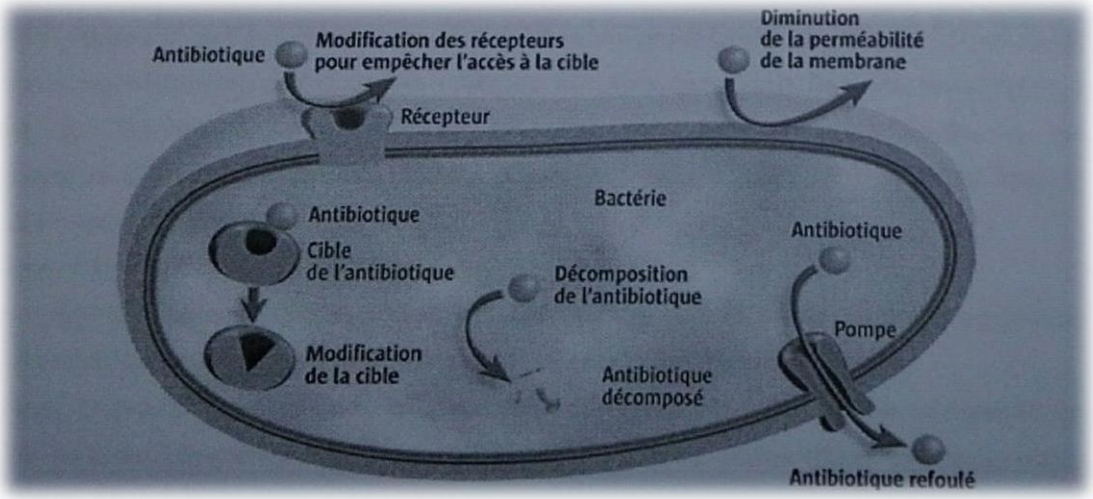


Figure 1 : Différentes mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques

3.1 La modification de la cible de l'antibiotique

Une petite modification du site de fixation peut suffire à empêcher la liaison avec l'antibiotique, sans entraver sa fonction.

3.2 Modification de l'antibiotique

Production d'une enzyme qui modifie la molécule d'antibiotique, qui est alors inactivée.

3.3 Réduction de la perméabilité membranaire

Les bactéries réduisent leur nombre de porines, porte d'entrée intracellulaire des antibiotiques.

3.4 Efflux des antibiotiques

Les bactéries éliminent alors l'antibiotique par pompage actif à partir du milieu intracellulaire.

5. Résistance aux béta lactamines

Elle agissent par inhibition de la synthèse du peptidoglycane (constituant fondamental de la paroi bactérienne) par fixation élective sur certaines protéines enzymatiques appelées protéines de liaison à la pénicilline (P.L.P.) présentes au niveau de la membrane cytoplasmique **(Philippon et al., 1989).** Cette action ne peut être réalisée que si quatre conditions sont respectées.

1- Pénétrer à travers la paroi bactérienne :

- la paroi des bactéries à Gram positif est formée essentiellement de peptidoglycane qui est une structure reticulée, lache laissant passer facilement les béta lactamines.

- par contre, la paroi des bactéries à Gram négatif comporte une couche compacte appelée la membrane externe, imperméable à certains antibiotique (Pénicilline Gn macrolides, acide fusidique, novobiocine).

2- Traverser l'espace péri plasmique sans être inactivées par les béta lactamines.

3-Se lier avec une certaine affinité aux P.L.P. Cette liaison entrainera un arrêt de la synthèse pariétale : c'est l'effet bactériostatique.

4- Faire intervenir des autolysines bactériennes pour compléter l'action antibiotique et aboutir à un effet bactéricide **(Moselio et al. 1999)**.

Tableau 4 : principaux mécanismes biochimiques de la résistance aux betalactamines **(Mainardi et al., 1996).**

Antibiotique	**Résistance chromosomique**	**Résistance extra chromosomique**
Bêta-lactamines	-Diminution de la perméabilité -Diminution d'affinité des PLP -Augmentation de la synthèse des PLP -Synthèse de différentes nouvelles PLP -Inactivation enzymatique par : céphalosporinases	- Inactivation enzymatique par diverses bêta-lactamines

5. Détermination de la catégorie S /I/R

Devant toute bactérie présumée pathogène, le laboratoire détermine son profil de sensibilité à différents antibiotiques. Elles résultent d'une détermination semi quantitative du pouvoir bactériostatique des antibiotiques.

Trois catégories cliniques ont été retenues pour l'interprétation des tests de sensibilité in vitro.

5.1 Souche sensibilité (S)

Est une souche dont la CMI est inférieure aux concentrations qui peuvent être atteintes dans l'organisme par un traitement à dose habituelle par voie générale **(CA-SFM 2006).**

5.2 Souche intermédiaire (I)

C'est une souche qui peut être atteinte par un traitement local, par une augmentation des doses par voie générale ou par une concentration physiologique particulière (bine, urine) (**CA-SFM 2006).**

5.3 Souche résistance (R)

C'est une souche qui ne reprendra pas à un type de traitement donne. La CMI dans ce cas, est supérieure à la concentration maximale que l'on puisse obtenir sans atteindre le seuil toxique (**CA-SFM 2006).**

Chapitre IV :
Partie expérimental

Matériel et méthodes

Matériel et Méthodes

Lieu d'étude

Notre étude a été effectuée au niveau du site antibiotical SAIDAL. De Médéa du mois de Mai jusqu'au mois de Juin 2022. Notre travail a été réalisé au niveau de laboratoire de microbiologie.

Objectifs d'étude

- Bonnes pratiques en antibiothérapie
- Interpréter un antibiogramme
- Détermination CMI
- Comprendre
    - Les mécanismes de résistance
    - Leurs impacts sur le spectre d'activité des antibiotiques.

1. Matériel

1.1 Matériel biologique

Notre étude a porté sur

- 4 souches de référence recommandées par la pharmacopée européenne, qui sont disponibles au niveau du complexe antibiotique (Tableau 6).

Tableau 7 : les souches de référence utilisées dans notre étude

Souche de référence	**ATCC (American type culture)**
Bacillus subtillus	ATCC 6633
Staphylococcus aureus	ATCC 6538
Escherichia coli	ATCC 8739
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 9027

1.2 Matériel non biologique

- **Antibiotiques**

    - Amoxypen® (Amoxicilline sodique), qui porte le numéro de lot 024/E1, est importé de chine, provienne de la société SUAN.

- Clamoxyen® (amoxicilline + acide clavulanique), qui porte le numéro de lot 227/2. Il nous a été délivré par le laboratoire de contrôle de SAIDAL.

2. Méthodes

2.1 Conformité et identification de l'antibiotique

But : C'est la vérification de la conformité des principes actifs, pour qu'ils soient utilisés dans notre étude microbiologique.

2.1.1 Aspect : l'amoxicilline et le mélange amoxicilline + acide clavulanique doivent avoir l'aspect d'une poudre blanche ou sensiblement blanche très hygroscopique.

2.1.2 Dosage par HPLC (Chromatographie liquide à haute performance)

- **Principe :** Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

- **Mode opératoire**

  Solution échantillon : Dissolvez 50,0 mg de la substance à examiner dans le diluent et complétez à 50,0 ml avec le même solvant

  Solution standard : Dissolvez 50,0 mg d'amoxicilline tri hydratée standard de référence et 50 mg de clavulanate de lithium standard de référence dans le diluent et complétez a 50,0 ml avec le même solvant.

- Préparer les solutions de la préparation de référence (standard) et les solutions de l'antibiotique à examiner (échantillon), en concentration présumée égales pour la courbe d'étalonnage.
- Utiliser 15 tubes pour les cinq points (concentration) de la courbe d'étalonnage, trois tubes pour chaque échantillon (employer 6 tube pour une meilleure précision) et 1à2 tube pour le blanc.
- Ajouter à chaque tube de blanc (1ml de diluant sans antibiotique et 9 ml de milieu), additionné immédiatement de 0.5 ml de formaldéhyde dilué. Ces tubes servent à étalonner l'appareil optique (spectrophotomètre).
- Ajouter dans chaque tube un volume égal de chaque solution et un même volume de milieu nutritif ensemencé (1ml de solution et 9 ml de milieu).

- Placer immédiatement dans un (bain marié) à la température 36,0 ˚C – 37,5 ˚C pour (4à5heures).
- Après l'incubation, retirer les tubes du bain marie, inhiber immédiatement la croissance de l'organisme en ajoutant 0.5 ml d'une solution de formaldéhyde dilué dans chaque tube.
- Mesurer l'opacité au moyen d'un appareil optique approprié.

- Spectrophotomètre : la mesure de l'absorbance ou de la transmittance dans une bande de fréquences très étroite nécessite un spectrophotomètre approprié dans lequel la longueur d'onde peut être modifiée ou redéfinie en utilisant des filtres de 580 nm ou 530 nm.
- Pour la lecture de l'absorbance, régler l'appareil à zéro absorbance avec le bouillon non inoculé (le blanc). Et mesurer l'opacité de chaque tube alternativement (standard et échantillon).
- Nettoyer soigneusement les tubes pour éliminer tous les résidus d'antibiotiques et les traces de solution de nettoyage. Stériliser les tubes avant utilisation.
- Calculer le dosage par HPLC de l'antibiotique à partir d'une courbe d'étalonnage (standard).

Lecture :

- L'identification se réalise par la comparaison des temps de rétention obtenus par rapport à un standard de référence qui doivent être identique (même temps de rétention.
- Le temps de référence des deux principes actifs sont respectivement similaires à ceux des étalons de référence.

Calculer la quantité en % l'amoxicilline et l'acide clavulanique par la formule suivante :

$$\mathbf{T\%} = \frac{A\text{ech}*P\text{estd}*Puiss\text{std}}{A\text{std}*Pe\text{std}}$$

T : Teneur en AMX et AMC en %

$\mathbf{A_{ech}}$ **:** aire du pic correspond à AMX ET AMC dans le solution échantillon.

$\mathbf{A_{std}}$ **:** aire du pic correspond à AMX et AMC dans le solution standard.

$\mathbf{Pe_{ech}}$ **:** posée d'échantillon en mg.

$\mathbf{Pe_{std}}$ **:** posée de standard en mg.

Puiss : puissance de standard en AMX et AMC en %.

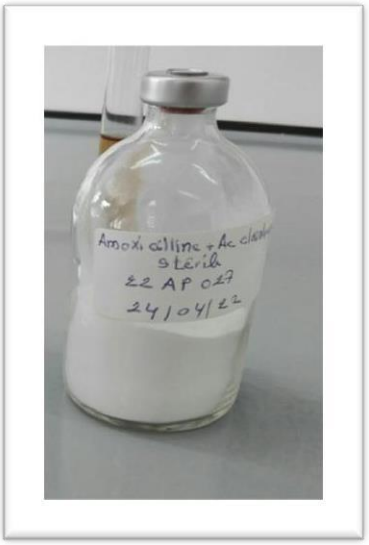




Figure 2 : Solution échantillon **Solution échantillon**

2.1.3 Effet synergique entre l'Amoxicilline sodique et l'acide clavulanique :

Pour réaliser ce test nous avons besoin de l'acide clavulanique, mais ce dernier n'a pas été à notre disposition alors nous avons procédé a hydrolyse de l 'AMX sodique contenu dans Clamxypen® (Amoxicilline+ Acide clavulanique) par la pénicillinase afin de libérer une quantité de l'acide clavulanique.

2.2 : Test de sensibilité des souches aux antibiotiques

L'antibiogramme est une sorte d'examen effectué en laboratoire pour tester la sensibilité d'une bactérie vis-à-vis d'un certain nombre d'antibiotiques.

Détermination de la CMI

But : Selon **Flandrois et Chomarat (1988),** différentes techniques sont possible pour la détermination de CMI :

- en milieu liquide différentes concentration d'antibiotique.
- En milieu gélosé par diffusion avec des disques chargés en antibiotiques dite l'antibiogramme.

A/ Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé.

But : Selon **Carbonnelle et Mamonner (1990).** C'est la technique la plus couramment utilisée, elle sert à une méthode quantitative a pour but de teste la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou de plusieurs antibiotiques supposés et d'évaluer le spectre d'action de ces derniers.

- **Mode opératoire :**

- Prendre un 50 mg d'Amoxypen® Et 50mg de Clamoxypen®
- Ajouter chaque produit dans un flacon de 5 ml d'eau physiologique.
- Faire des dilutions aux antibiotiques pour obtenir la concentration 1µg/ml, 2µg/ml 4µg/ml, 6µg/ml, 8µg/ml, 11µg/ml, 13µg/ml
- Préparer les suspensions des souches bactériennes.
- Faire l'ensemencement des suspensions sur milieu de culture (soja agar).
- Imbiber les disques Viège dans les solutions préparer et disposer dans les boites ensemencer
- Incubation 37°C pendant 24 heures.

Lecture :

Après 24 h d'incubation, présence des zones dans les boites Pétri contenant les disques de l'AMX et AMC.

- Mesurer le diamètre du cercle situé autour du disque avec antibiotique correspondant à la zone d'inhibition de croissance des bactéries.

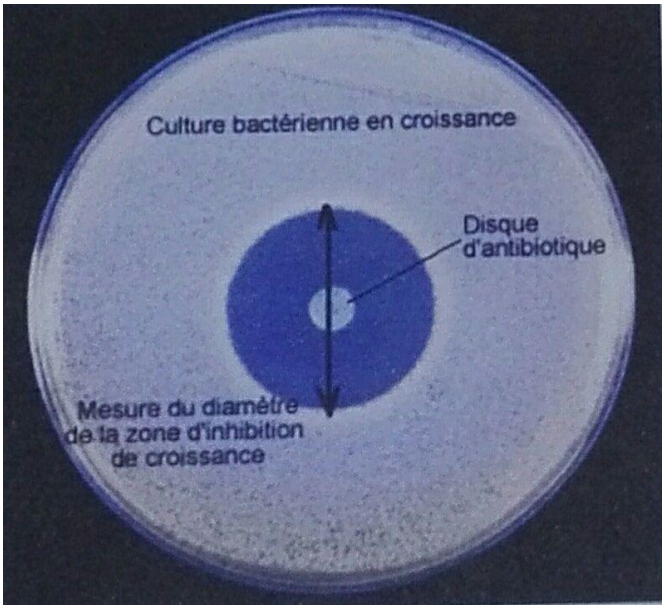


Figure 3 : Diffusion du disque sur gélose **(philippon et al,.1989)**

- Comparer ces résultats aux valeurs critiques d1 et d2
- Classer les bactéries dans l'une des souches Sensible (S) : Diamètre plus de 20mm.
- Classer les bactéries dans l'une des souches Résistance (R) : Diamètre moins de 8mm

Tableau 8 : Les concentrations et les critiques de référence pour les différents antibiotiques suivants (CASFM. 2006). COMITE DE L'ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIETE FRANCAISE DE MICROBIOLOGIE

ATB	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/l)		Diamètres critiques (mg/l)	
		S	R	S	R
Amoxicilline	25 µg	≤ 4	> 16	≥ 21	≤ 14
Amoxicilline + acide clavulanique	20/10 µg	≤ 4/2	>16/2	≥ 21	≤ 14

B/ CMI en milieu liquide

But : Selon **(Henry, 1998),** cette méthode quantitative a pour but de préciser la CMI d'un antibiotique donné.

Principe : Le principe consiste à la répartition dans une série de tubes à hémolyse, un volume constant de milieu de culture liquide (bouillon nutritif).

- **Mode opératoire :**
  - Préparer des tubes contient 9 ml de bouillon nutritif, puis faire stérilisation autoclave 121°c pendant 20 min.
  - Préparer la gamme de dilutions des antibiotiques à tester (et ajouter 1ml de chaque concentration à chaque tube à l'exception de tube témoin.
  - Préparer l'inoculum en suivant la méthode précédente.
  - Ajoutée 0,1ml de l'inoculum dans chaque tube.
  - Incuber tous les tubes à 37°C pendant 24 heures.

Lecture

- CMI est la plus petite concentration en antibiotique nécessaire pour inhiber la croissance d'une bactérie. **CMI** = mesure d'une concentration
- Un antibiogramme, c'est la détermination des CMI d'un groupe d'antibiotiques vis à vis d'un germe référence chez un patient. **Antibiogramme** = profil de sensibilité d'une bactéri

Pour déterminer la CMI d'un antibiotique, on teste des concentrations croissantes d'antibiotique vis à vis d'un germe.

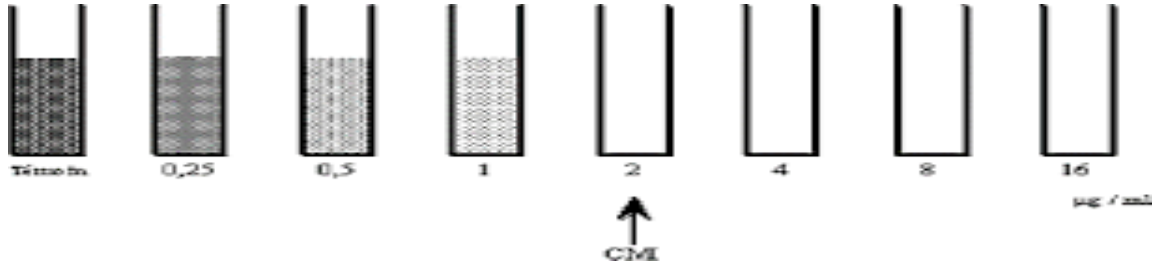


Figure 4 : CMI en milieu liquide

C/ Relation entre la méthode de diffusion sur gélose et la méthode en milieu liquide

A la limite des zones d'inhibition, il existe dans la gélose des concentrations d'antibiotiques égales aux CMI. Les méthodes de diffusion ne permettent pas de chiffrer directement ces valeurs.

Toutefois, selon **Henry(1998)** il existe une relation simple entre les diamètres des zones d'inhibition et les logs base2 des CMI mesurées par les techniques de dilution. Ces relations appelées droites de concordance ou droites de régression, ont été établies par les laboratoires spécialisées travaillant dans des conditions standardisées.

En théorie, les mesures des diamètres des zones d'inhibition et leurs reports sur les courbes de concordance donnent les valeurs de CMI en µg/ml.

Ces droites de concordance sont tracées expérimentalement à l'aide de nombreuses souches. Une droite de concordance n'est valable que pour un disque contenant quantité déterminée d'un antibiotique donné.

Résultats et discussion

Résultats et discussion

1. Conformité et l'identification de l'antibiotique :

1.1 Solubilité :

L'amoxicilline et son association avec l'acide clavulanique ont montré une solubilité physiologique (Facilement soluble dans l'eau) et dans les solvants organiques conforme aux normes de la pharmacopée européenne (Tableau). Ceci traduit la conformité et la pureté de matières premières analysée.

Tableau 9 : résultats de la solubilité des deux principes actifs

Principes actifs	**Solvant**	**Résultat**	**Normes (pharmacopée européenne)**
AMX **AMC**	L'eau physiologique	Très soluble	T.S
	L'éthanol	Assez soluble	A.S
	L'acétone	Très peu soluble	T.P.S
	L'éther	Insoluble	I

1.2 Dosage HPLC (chromatographie liquide à haute performance)

Les résultats traduisent pour chaque échantillon, par un chromatogramme représentant le temps de rétention, les réponses (surfaces).

Identification les principes actifs, Les résultats de l'analyse chromatographique (HPLC) ont donné des temps de rétention Amoxypen et Clamoxypen identiques aux standards aussi bien pour l'amoxicilline.

Quantification est utile se signaler que la réalisation de l'analyse demandée, en utilisant la technique HPLC, est conditionnée par la disponibilité du standard analytique adéquat au niveau du laboratoire physique au chimique. Le cas contraire, vous devriez prévoir ce standard.

Tableau 10 : résultats des analyses d'identification et de dosage par HPLC pour les deux échantillons.

	Temps de rétention (min)		Titre %	Normes
	Ech	STD		
AMX	7.906	7.752	74.79 %	67.5% à 82.5%
AMC	4.593	4.523	14.45 %	13.5% à 16.5 %

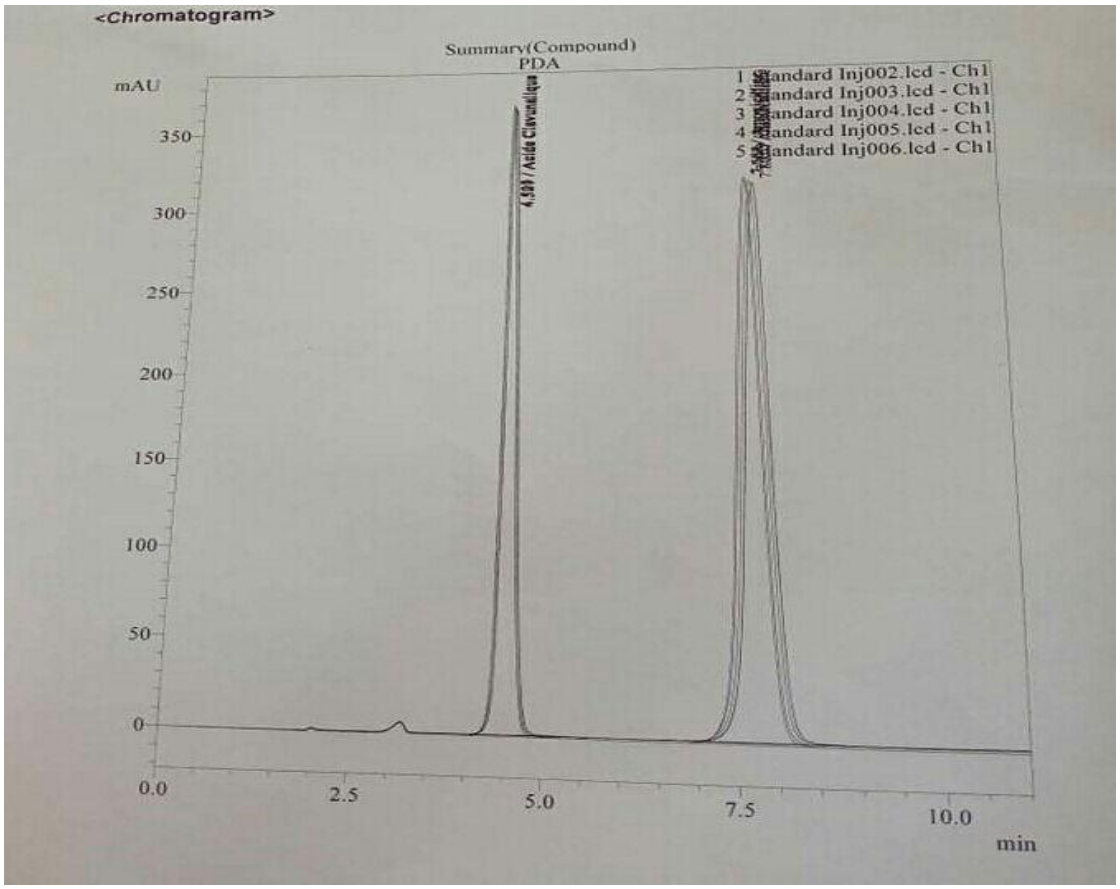


Figure 5 : Dosage par HPLC (Chromatographie)

1.3 Effet synergique entre l'Amoxicilline sodique et l'acide clavulanique

Après incubation on a obtenué des zones d'inhibition dans la boite pétri qui contient l'AMC qui signifie a arrivé à hydrolyser l'AMX contenue dans le mélange, donc notre solution continue que l'acide clavulanique.

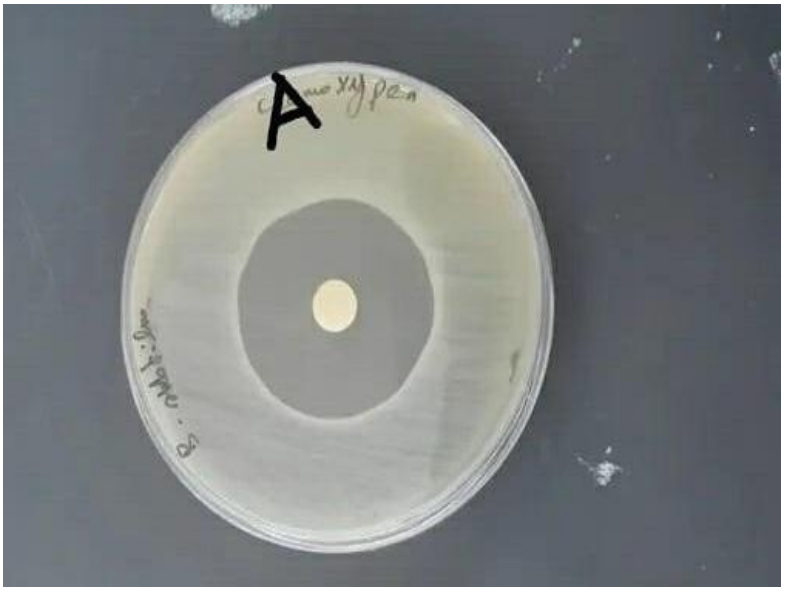


Figure 6: Résultat d'hydrolisation pour la souche *Bacillus subtillis* de principe actif Amoxypen.



Figure 7 : Résultat d' hydrolisation pour la souche *Bacillus subtilis* de principe actif Clamoxypen.

2. Test de sensibilité des souches aux antibiotiques

Nous avons d'abord procédé à l'étude de la sensibilité des 4 souches vis-à-vis des deux antibiotiques, par la méthode de diffusion sur gélose ou antibiogramme. Ensuite nous avons déterminé la CMI sur le milieu liquide.

2.1 Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé.

Les résultats obtenus a été interprète suivant les recommandations du comité antibiogramme de la société française de Microbiologie **(CASFM. 2006).**

- **Pour Amoxicilline**

L'étude de sensibilité des souches vis-à-vis à l'Amoxicilline par la méthode de diffusion en milieu gélose a montré, une résistance intermédiaire *Pseudomonas aeruginosa.*



Figure 8 : Résultat d'antibiogramme pour la souche *Pseudomonas aeruginosa.*

de principe actif Amoxypen.

- **Pour Amoxicilline + l'acide clavulanique**

L'étude de la sensibilité des souches vis-à-vis à l'Amoxicilline+ acide clavulanique par la méthode de diffusion en milieu gélosé a montré, une sensibilité totale des *Bacillus subtillis, Staphylococcus aureus, Escherichia coli et Pseudomonas aeruginosa* (figure).



Figure 9 : Résultat d'antibiogramme pour la souche *E coli* de principe actif Clamoxypen.

- **Les concentrations des dilutions**

Après avoir préparé une solution concentrée d'amoxicilline et d'amoxicilline + l'acide clavulanique 25 mg dans 5 ml comme concentration initiale et l'avoir déguisée pour plusieurs solutions afin d'obtenir une concentration plus faible et de savoir à quelle concentration des solutions pour voir la résistances des souches bactériennes, nous avons trouvé .

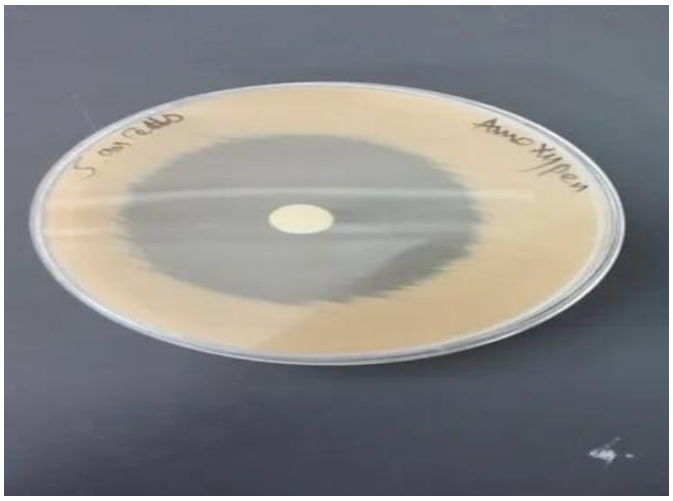


Figure 10 : Résultat d'antibiogramme pour la souche *S aureus* de principe actif Amoxypen.



Figure 11 : Résultat d'antibiogramme pour la souche *S aureus* de principe actif Clamoxypen.



Figure 12 : Résultat d'antibiogramme pour la souche *Pseudomonas areuginosa* de principe actif Amoxypen.

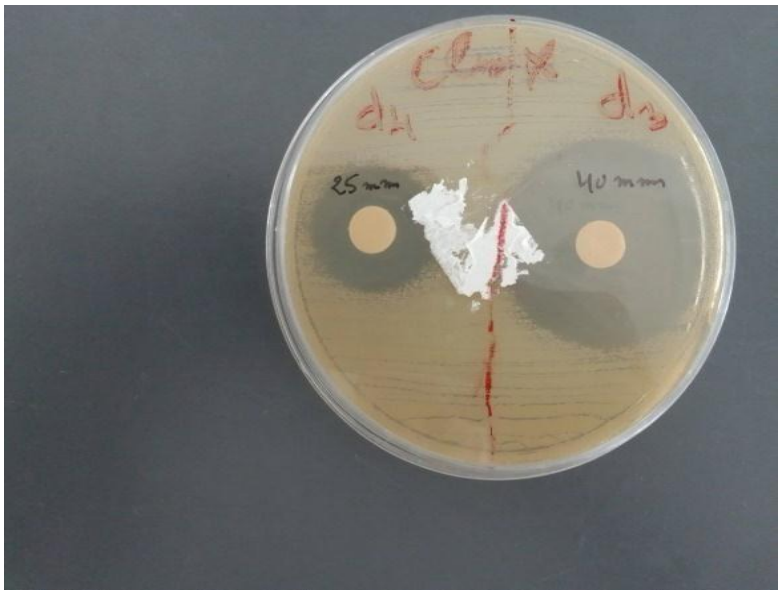


Figure 13 : Résultat d'antibiogramme pour la souche *Pseudomonas areuginosa* de principe actif Clamoxypen.

Tableau 11: Résultats de l'antibiogramme pour l'amoxicilline et l'amoxicilline + l'acide clavulanique.

Souches		**Diamètres des zones d'inhibition (mm)**	
		L'amoxicilline	Amoxicilline + acide clavulanique
Gram+	*Bacillus subtillis*	4.9	4
	Bacillus subtillis sous	8.5	3
	Staphylococcus aureus	6	54
Gram-	*Escherichia coli*	4.5	4.2
	Pseudomonas aeruginosa	7.3	7.1

Tableau 12 : Les zones d'inhibition des souches bactériennes après chaque dilution. Nous avons ajouté deux solutions supplémentaires d5 et d6 pour la souche bactériennes *Staphylococcus* parce que la concentration très élevé dans la 4 eme dilution, donc le diamètre de ses deux dernier d5=2 et d6=1.5.

Les souches bactériennes	**Amoxicilline**				Amoxiciline+acide clavulanique			
	D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4
Bacillus subtillis	31	27	25	19	35	3	22	16
Staphylococcus aureus	42	42	39	34	42	42	34	26
Escherichia coli	32	24	11	Aucune inhibition	37	27	16	Aucune inhibition
Pseudomonas aeruginosa	Contaminé	Contaminé	42	39	Aucune inhibition	Aucune inhibition	25	4

2.2 CMI en milieu liquide

Dans la plupart des cas, les résultats des CMI concordent avec ceux de l'antibiogramme, la détermination des CMI nous permet de confirmer les résultats de l'antibiogramme avec plus de précision.

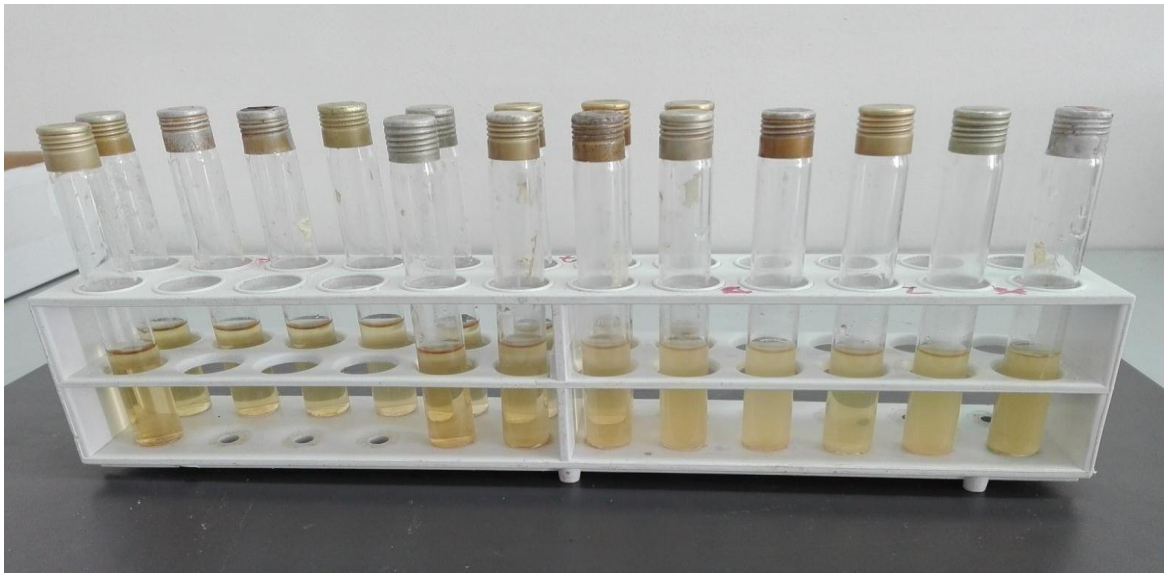


Figure 14 : Résultat de CMI pour la souche *S aureus* de principe actif Clamoxypen.

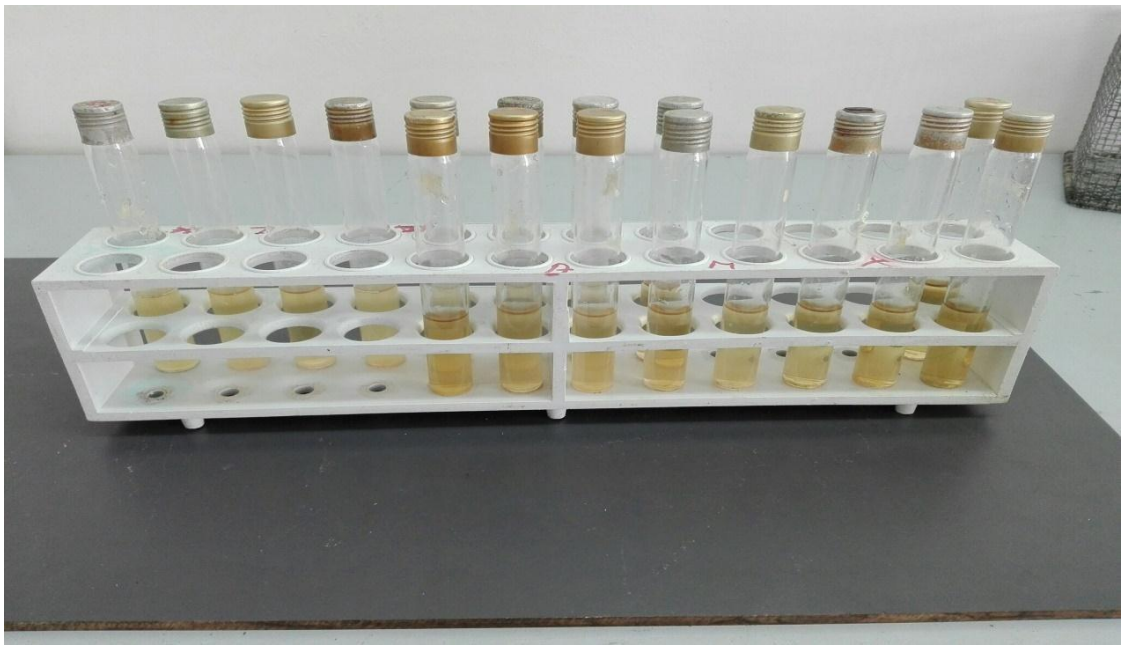


Figure 15 : Résultat de CMI pour la souche *S aureus* de principe actif Amoxypen.

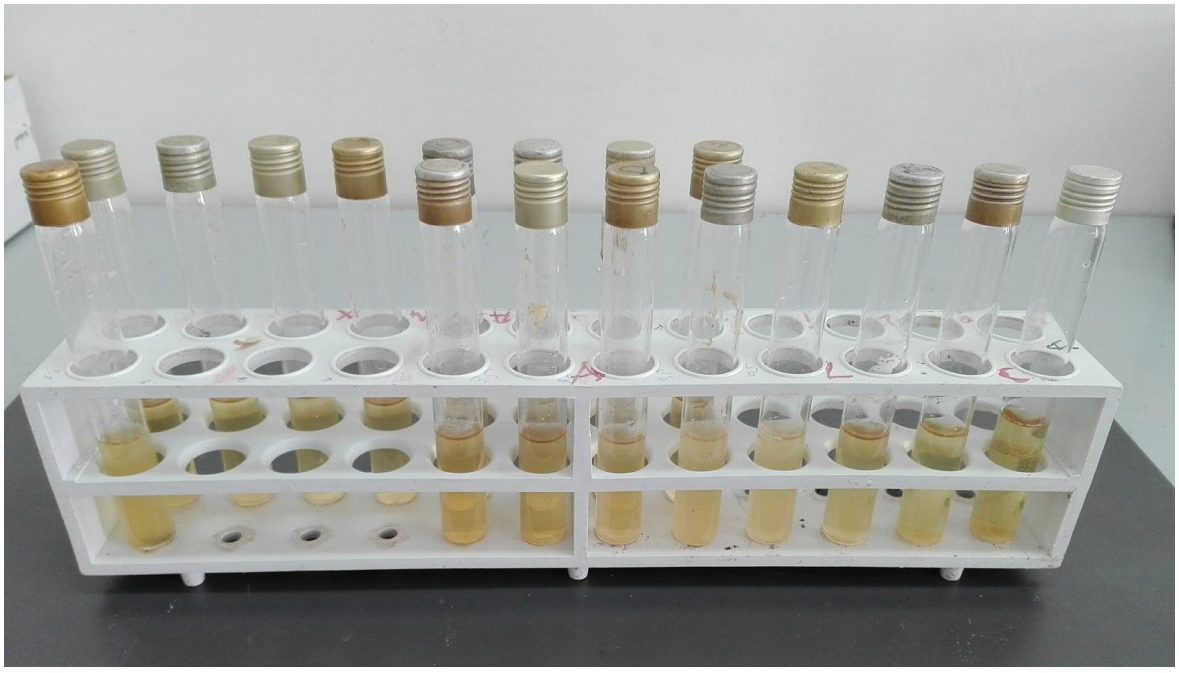


Figure 16 : Résultat de CMI pour la souche *E coli* de principe actif Clamoxypen.

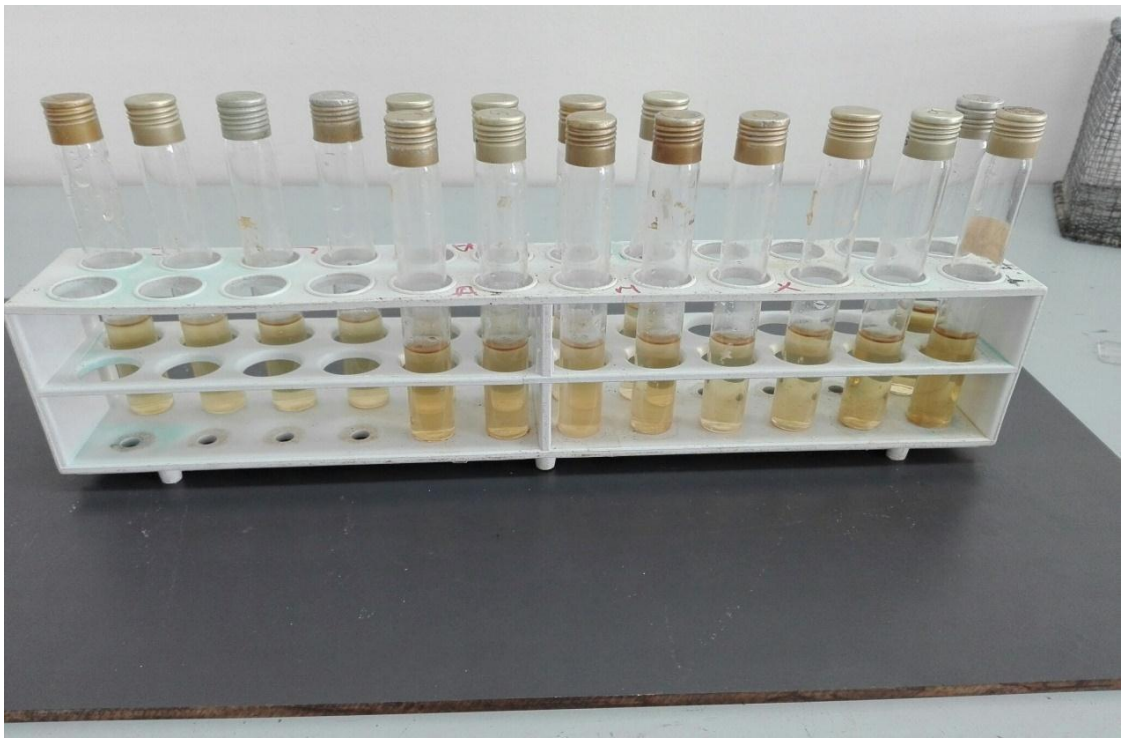


Figure 17 : Résultat de CMI pour la souche *E coli* de principe actif Amoxypen..

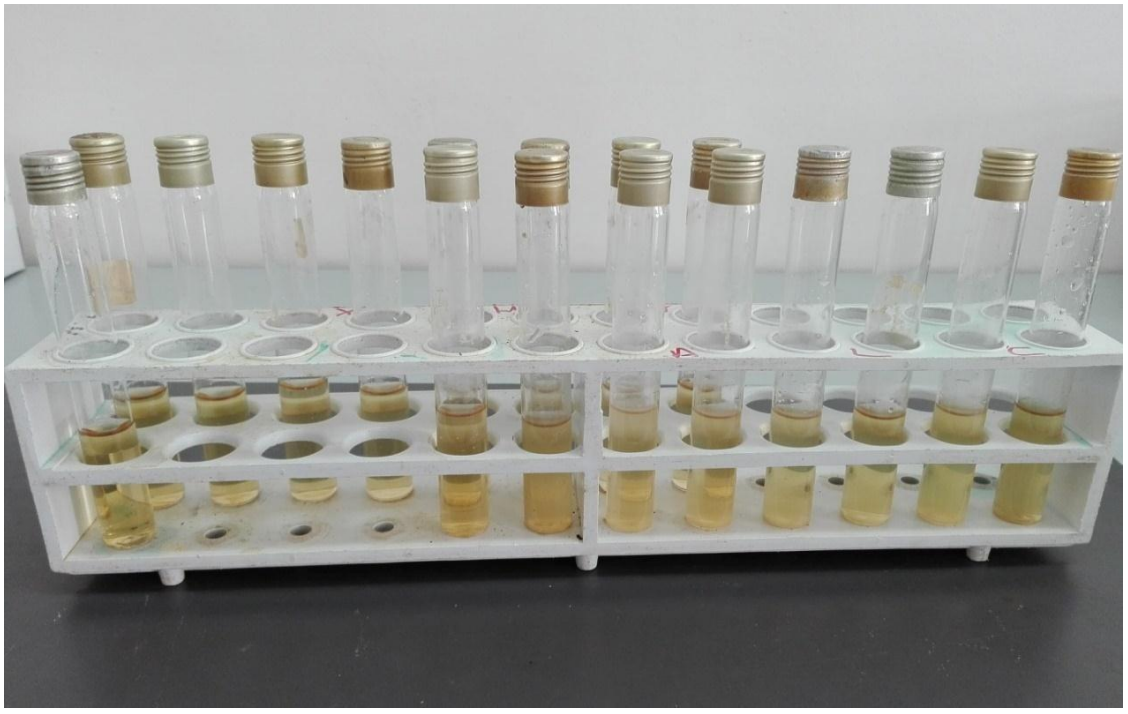


Figure 18 : Résultat de CMI pour la souche *Bacillus subtillis* de principe actif Clamoxypen.

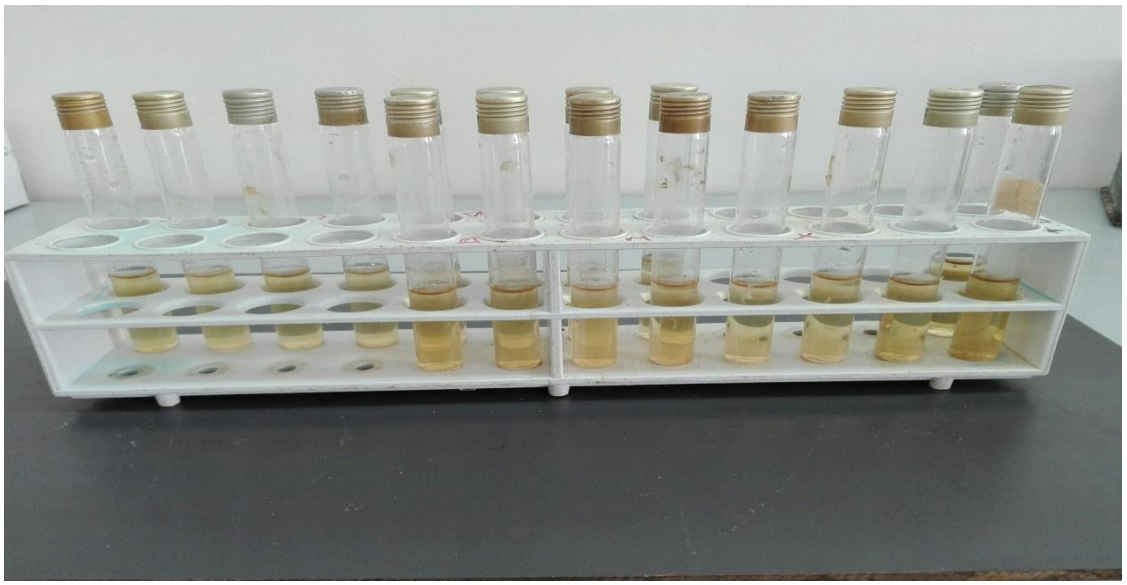


Figure 19 : Résultat de CMI pour la souche *Bacillus subtillis* de principe actif Amoxypen.

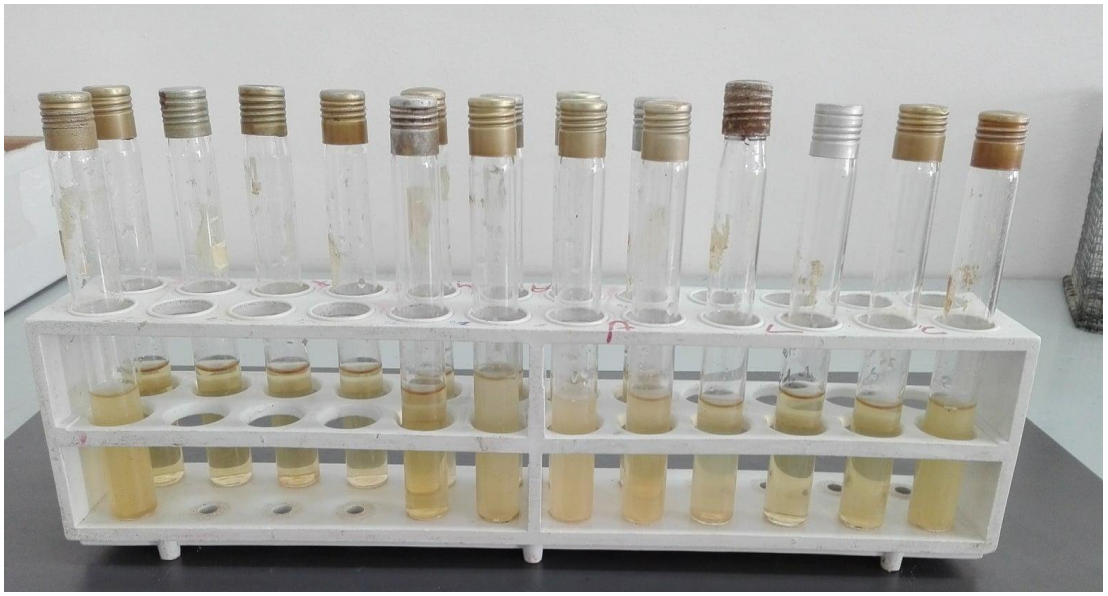


Figure 20 : Résultat de CMI pour la souche *pseudomonas areuginosa* de principe actif Clamoxypen.

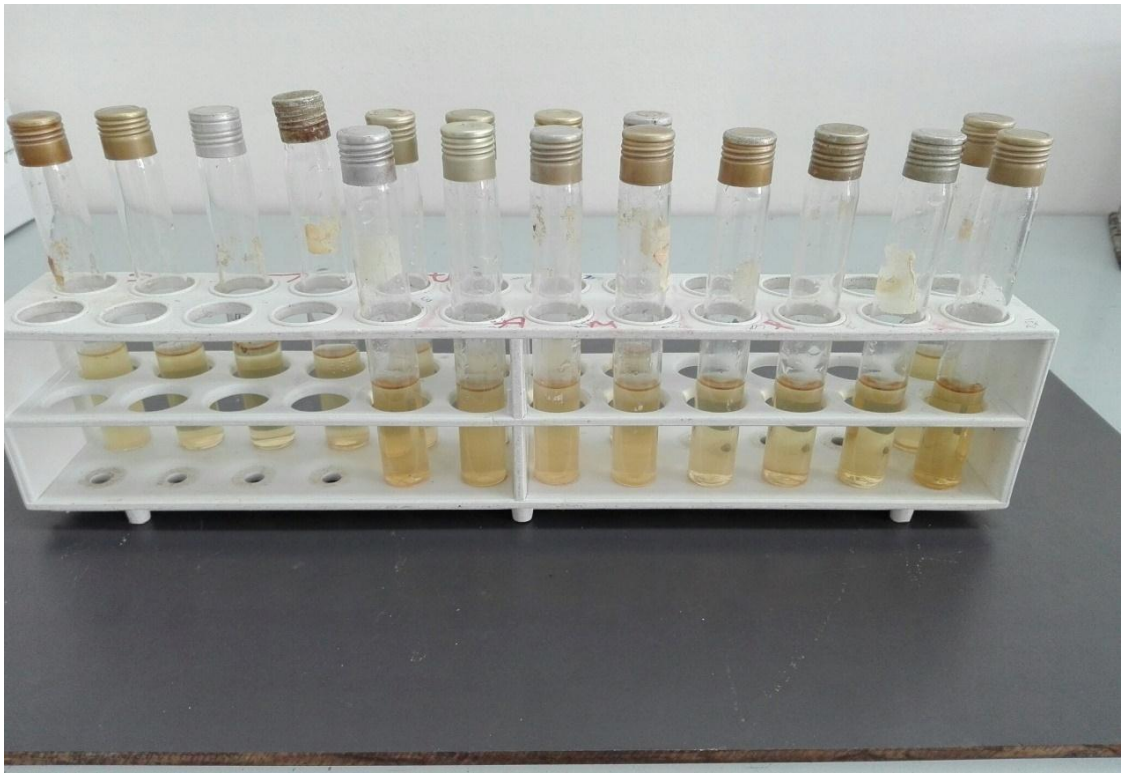


Figure 21 : Résultat de CMI pour la souche *pseudomonas areuginosa* de principe actif Amoxypen.

Tableau 13 : Résultats des CMI en milieu liquide déterminées pour Amoxicilline et avec Amoxicilline + acide clavulanique.

SOUCHES / ATB		*Bacillus subtillis*	*Staphylococcus aureus*	*Escherichia coli*	*Pseudomonas aeruginosa*
CMI (µg/ml)	**Amoxicilline**	8.8	4.4	6.6	6.6
	Amoxicilline +acide clavulanique	4.4	4.4	4.4	4.4
Concentration correspondante (µg/ml)	**Amoxicilline**	2	1	1.5	1.5
	Amoxicilline +acide clavulanique	1	1	1	1
Phénotypes R/S/I	**Amoxicilline**	R	S	R	R
	Amoxicilline +acide clavulanique	S	S	S	S

3. Relation entre la méthode de diffusion sur gélose et la méthode en milieu liquide.

Les droites de concordance tracées expérimentalement à l'aide des 4 souches étudiées. Les mesures des diamètres des zones d'inhibition et leurs reports sur les courbes concordances donnent les valeurs des CMI en µg/ml **(Henry., 1998).**

D'après les tests de sensibilité des souches vis-à-vis des deux antibiotique étudiés, on constante que certains souches qui ont été résistance ou intermédiaires pour l'amoxicilline deviennent sensibles pour l'amoxicilline + l'acide clavulanique, tel que *Bacillus subtillis*, *Staphylococcus aureus Escherichia coli.* Ce que confirme l'efficacité de l'acide clavulanique.

D'autres souches comme *Pseudomonas aeruginosa*, restent résistances aux deux antibiotiques, l'amoxicilline et l'amoxicilline + l'acide clavulanique.

Conclusion

Conclusion

Au cours de notre stage effectué au niveau des laboratoires de la filiale antibioticale de Médéa du groupe SAIDAL sur une période étalant du moins du Mai au Juin 2022.

L'objectif de notre étude était de montrer la tolérance et l'efficacité de l'Amoxicillines et son association avec l'Acide clavulanique (Augmentin®) sur des germes pathogènes et résistantes à l'Amoxicilline afin de traiter des infections bactériennes spécifiques. La conformité des deux antibiotiques a été assurée par le test antibiogramme de tous les germes pathogènes.

D'après le résultat de notre pratique au laboratoire, Les souches de référence ATCC qui sont *E coli, Pseudomonas aeruginosa, S aureus, Bacillus subtillis.* Puis l'étude de la sensibilité des souches de références aux deux antibiotiques utilisés par la méthode de diffusion des antibiotiques par disque sur milieux gélose en suite ont confirmé les concentrations minimales inhibitrices trouvées par la méthode sur milieux liquides.

Les résultats obtenus ont été interprétés suivant les recommandations des comités antibiogramme de la société française de microbiologie **(CASFM., 2006).**

Les résultats de l'antibiogramme des CMI sont :

-La souche de *Staphylococcus aureus* est caractérisé par une sensibilité a l'amoxicilline dont les valeurs de la CMI est 4.4µg/ml et les autres souches sont résistances.

Et pour l'amoxicilline + l'acide clavulanique, nous avons trouvé que toutes les souches sont sensibles.

On conclue que le rôle du laboratoire est d'évaluer les paramètres permettant de lier le dosage à l'efficacité sur la base : d'étude in vitro. Et en raison des phénomènes de résistances acquise il est aussi important de connaitre à tout moment l'état de résistance bactérienne aux antibiotiques afin d'orienter de clinicien vers une meilleur a visée curative.

Références bibliographiques

Abri O Schulz L, 1989 : Antibioprophylaxie péri-opératoire en chirurgie colique ; amoxycilline/acide clavulanique versus mezlocilline + métronidazole.

Achkour, 2012 : Emergence de la résistance aux carbapénemes chez les bacilles à Gram négatif. Thèse de doctorat en pharmacie. Université Mohammed V- Soussi, Rabat, p.7. Infectieuses ,8-006-N-IO, 1996, p8.

Adam D, 1982 : Pharmacocinétique de l'amoxicilline et de l'acide clavulanique administrés seuls et en association.

Adam D, 1983 : Pharmacocinétique de l'amoxicilline et de la flucloxacilline après administration intraveineuse simultanée de 4 g et 1 g, respectivement.

A El BOUJNOUNI., 2020 :

Afect, 1994 : Medicaments-antibiotiques traites de chimie thérapeutique, 2éme édition.
Aigner K, 1984 : Les maladies gastro-intestinales.

Agrawal SK, 1987 : Études stoechiométriques, structurales et thermiques sur les composés de coordination Cu(II), Ni(II) et CO(II) de certaines bases hydrazides acides.

Al Roomi LG, 1984: Amoxicilline et acide clavulanique dans le traitement des infections urinaires.

Allag, 2003 : Cours des bacilles à Gram négatif.

Alvarez S Jones M, 1985 : Activité in vitro de la fosfomycine, seule et en association, contre Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline.

Ambrose NS, 1988 : Septicémie anorectale comme présentation d'une maladie rectale et systémique occulte.

Andery D O, 2015 : Impact des régulateurs SigB, Rot, SarA et sarS sur le promoteur du choc toxique Tst et l'expression de TSST-1 chez Staphylococcus aureus.

Anonyme, 1984 : Etude biologique et propriété pharmaceutique sur lamoxicilline-acide clavulanique.

Anonyme, 1988 : Essai thérapeutique de lamoxicilline- acide clavulanique.

Anonyme, 2004 : Notice de laboratoire GlaxoSmithKline.

Anonyme, 2020 : www.Futira-sciences.com, article scientifique.

Anonyme d, 2021: Wekepedia.

Anonyme, 2021 : Site inconnu, article scientifique d'amoxicilline.

Anonyme, 2022 : Wikepidia, article scientifique. **Allag, 2003 :** Cours des bacilles à Gram négatif.

Avril et al .2000 : Bactériologie clinique.

Bakhoum I., 2004 : Contrôle de qualité et validation de différentes micros méthodes d'identification bactérienne. Thèse Pharmacie, 2004.

Bee LH, 1985 : Traitement de l'urétrite gonococcique non compliquée chez les hommes avec deux doses d'Augmentin, six heures.

Beeukes H, 1981 : Une association d'amoxicilline et d'acide clavulanique dans le traitement des infections des voies respiratoires causées par Haemophilus influenzas résistant à l'amoxicilline.

Bergogne- Berzin E, Brogar J.M, 1999 : Bases biologiques de l'antibiothérapie. Edition : Masson, paris- pp 4712, 7298.

Brigitte et al., 2007 : pharmacologie.

Benrdy et al., 1991 : Etude comparative du cefadroxil et de l'association Amoxicilline- acide clavulanique dans la traitement des surinfections aigues de broncho-pneumopathies chroniques de l'adulte. Med, Mal ; 21 -pp 8.

Cavallo et Mérnes., 2007 : Spectre d'activité antibactérien d'un antibiotique et catégorisation clinique Spectre antibactérien d'un antibiotique et catégorisation clinique.

CA-SFM 2006 : comite de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.

Carbonelle F et Mamonner., 1997 : Bactériologie clinique technique novelle

Courvalin et Mabillat., 1997 : Dévloppement of oligotyping for charactériztion and molecular Epidémiology of TEM betalactamase in member of the family Enterobactériaceae, Antimicrobial Agents and Chemothérapy,

Dellemee M., 2003-2004 : Les bactéries impliquées dans les infections des voies urinaires, microbiologie médicale.

Earls MR., 2019 : Un nouveau clone CC1-MRSA-IV PVL-négatif multirésistant émergeant en Irlande et en Allemagne est probablement originaire d'Europe du Sud-Est.

Fauchère et Avril., 2002 : Bactériologie générale et médicale.

Flandrois J.P et Chomarat M 1988 : Bactériologie médicale pratique.

François Davies., 2020 : Centre National de Référence des Staphylocoques, INSERM E0230, Faculté de Médecine Laennec.

Jarlier V., 1997 : Mécanismes de résistance aux antibiotiques Médecine thérapeutique.

Jarlier V et nordmann P., 2000 : Entérobactérie et betlactamines in précis bactériologie clinique : Edition ESKA- P 694 **.**

J Clin Microbial, 2015 : Types moléculaires de souches de Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline et de souches de S. aureus sensibles à la méthicilline causant des infections de la peau et des tissus mous et la colonisation nasale, identifiés dans les centres de santé communautaire de New York.

Jumpeau et al., 1994 : Evaluation de la résistance bactérienne aux antibiotiqueE.M.C maladies infectieuses.

Hans Christian Gram, 1884. W Hansen, 2002 : Histoire des sciences medicales.

Henry D, 1998 : Essential procédures for clinical microbiology.

Hirooka K, 2014 : Caractérisation structurale d'une forme liée à un ligand de Bacillus subtilis FadR impliquée dans la régulation de la dégradation des acides gras.

Isabelle Verdier, 2020 : Centre National de Référence des Staphylocoques, INSERM E0230, Faculté de Médecine Laennec.

Gaudy C, Buxeraud J, 2005 : Antibiotiques, pharmacologie et thérapeutique- pp 14, 16, 17.

Gerard Lina, 2020 : Centre National de Référence des Staphylocoques, INSERM E0230,

Gérald., 2008 : Mécanismes de résistances des microorganismes aux antibiotiques, la lutte contre les infections Nosocomiales 12 et 13 juin 2008

Gomez-Rios D Ramirez-Malule H- 2017/2018 : Analyse bibliométrique des recherches récentes sur la multirésistance et la résistance aux antibiotiques (2017-2018).

Liassine N, 2000 : Problème des pathogènes à Gram négatif résistants aux antibiotiques en milieu hospitalier.

Loup et al, 2000 : Bactériologie clinique, édition : Flammarion.

Mainardi et al., 1996 : Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques. E.M.C maladies infectieuses.

Martin C., 2011 : Bacilles à Gram négatif non fermentaires.

Medboua., 2011 : Caractérisation des phénotypes de résistance aux β-lactamines.

Merad et al., 2001 : Résistances bactérienne aux antibiotiques.

Matard B Donay JL., 2019 : La folliculite décalvane est caractérisée par un microbiote sous-épidermique persistant et anormal.

Moselio S et al. 1999 : Microbiologie et pathologie infectieuse

Micu et al, 2006 : Choc anaphylactique a l'augmentin® chez une patiente présentant des tests cutanés et un test de provocation négatifs a lamoxicilline, revue française d'allergologie et d'immunologie clinique 46 : 9-19.

Moselio S, 1999 : Microbiologie et pathologie infectieuse.

Muylaert et mainil, 2013 : Resistances bactériennes aux antibiotiques, les mécanismes et leurs contagiosité.

Nauciel et vilde JL, 2005 : Bacteriologie médicale.

N McCallum, B Berger-Bächi, 2010 : Régulation de la résistance aux antibiotiques chez Staphylococcus aureus.

Perbet, 2003 : Journal américain de médecine respiratoire et de soins intensif accueil.

Peyret M., 1994 : Mécanismes de résistances aux antibiotiques**,** manuel de bactériology clinique –P413-430.

Pillet J, 1977 : Analyse sérologique des staphylocoques à coagulase négative : étude des agglutinogènes caractéristiques dans les souches types des neuf espèces individualisées par Schleifer et Kloos.

Philippon A et al., 1989 : Classification de betalactamases.

Pogmore AR et al., 2018 : L'organisme modèle Gram positif Bacillus subtilis ne forme pas de domaines lipidiques spécifiques à la cardiolipine détectables au microscope.

Roussel-Delvalez., 2001 : bactériologie multi résistance doit en reste optimiste ? Feuillet de biologie.

Rozgonyi F Seltmann G, 1985 : Pathogénicité et virulence de Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline : production de couche visqueuse

Sadjida et sylia, 2017 : Groupe de travail Société Française de Psychiatrie Biologique et Neuropsychopharmacologie et Fondation FondaMental : Consensus formel pour la prise en charge de la dépression résistante aux traitements[article en français].

Schuster C, 2001 : Pseudomonas et apparentés. Syst. Microbiol

Serra CR Earl AM, 2014 : Sporulation pendant la croissance dans un isolat intestinal de Bacillus subtilis.

Soilleux, 2007 : Antibiotique poly réel. Med Mal – pp14.

Tarek.Msadek, 2019 : La transformation naturelle permet le transfert de la résistance à la méthicilline médiée par SCCmec dans les biofilms de Staphylococcus aureus.

Tankovic J., 2000 : Mécanisme d'action des antibiotiques médecines thérapeutiques.

Van Banbeke et Tulkens, 2007 : Pharmacodynamie des antibiotiques dans le LCR : principes et conséquences (facteurs prédictifs d'efficacité).

Weber et al., 1995 : Activité in vitro de l'amoxicilline et de l'association amoxicilline-acide clavulanique vis-à-vis d' Escherichia coli en médecine de ville. Med.

Yala et al, 2007 : Activité des antibiotiques bêta-lactamines et production de bêta-lactamases dans des bactéries isolées d'infections de plaies à Brazzaville.

Yves Gillet, 2020 : Centre National de Référence des Staphylocoques, INSERM E0230, Faculté de Médecine Laennec et service de pédiatre.

Zouhdi M, 2009 : Cours de bactériologie, 3ème année Pharmacie.

Annexes

Annexe 1 :

Appareillage et verrerie :

- Agitateur VORTEX.
- Anse de platine.
- Armoire thermostatique(ou incubateur) à 37˚C
- Autoclave.
- Balance analytique.
- Bec bunsen.
- Boite de pétri .
- Disques en papier.
- Etuve.
- Flacons de 500ml.
- Lames.
- Pinces de laboratoire.
- tubes.
- pipete pasteur.

Annexe 2 :

- **Solution et réactifs :**
  - NACL
  - L'eau distillée stérile
  - Soja agar
- **Milieux de culture :**

- Bouillon de soja agar

Préparation :

Suspendre les composants, poudre déshydratée, dans l'eau (40 grammes dans 1000 ml d'eau purifiée/distillée). Le milieu est bouilli pendant quelques secondes jusqu'à dissolution complète des ingrédients. Mélangez correctement et enfin stérilisez par autoclavage à 121 °C pendant 15 minutes.

Composition g/l

Digestion pancréatique de caséine	15g
Peptone de soja	5g
Chlorure de sodium	5g
Gélose	15g

Annexe 1 :

- **Gélose nutritive**

Préparation :

Dissoudre 39g de la gélose nutritive dans un litre d'eau distillée ; autoclave 20 min à 121 ˚C.

Composition :

Agar 18

- **Préparation de la solution physiologique à 0.09% de NACL :**

La solution est généralement composée d'eau distillée et de chlorure de sodium (NaCl) dilué à 9 pour 1 000 (c'est-à-dire une solution à 0,9 % de masse/volume de NaCl, soit 9 g/l).

Annexe 3 :

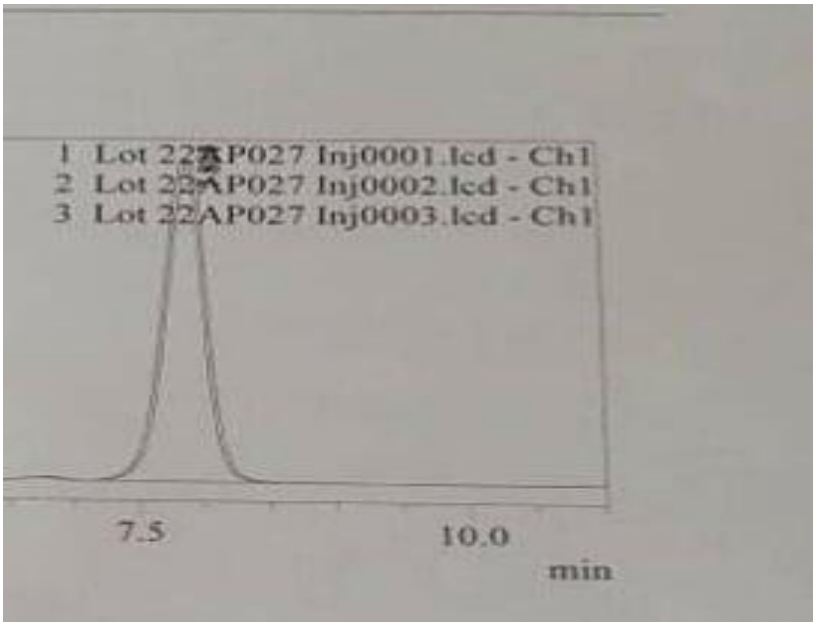
Tableau 1 : Proportion de l'acide clavulanique dans les concentrations par CMI de l'association amoxicilline + l'acide clavulanique

AMC	**Concentration µg/ml**							
	1.1	2.2	4.4	6.6	8.8	11	13	40
Rapport	0.25	0.5	1	1.5	2	2.5	3	1

Annexe 1 :

Annexe 4 : Les spectres des deux antibiotiques obtenus après dosage par HPLC

- **Spectre d'amoxicilline :**



- **Spectre Amoxicilline + d'acide clavulanique**

