

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ 8 MAI 1945 GUELMA  
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET  
DE L'UNIVERS  
DÉPARTEMENT D'ÉCOLOGIE ET GÉNIE DE L'ENVIRONNEMENT



## Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Microbiologie - Écologie

Spécialité/Option : Microbiologie de l'environnement: Santé, Eau et Environnement

---

**Thème : Étude de la résistance aux antibiotiques de certaines bactéries  
d'importance clinique : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*,  
et *Staphylococcus aureus*.**

---

**Présenté par :** Khalfoune Asma

**Devant le jury composé de :**

**Présidente :** Mme. AYED H.  
Guelma)

(M.A.A. Université de

**Examineur :** Mr. ADRAR N.  
Guelma)

(M.A.A. Université de

**Encadreur:** Mme. BENHALIMA L.  
Guelma)

(M.A.A. Université de

**Juin 2014**



## Remerciements

*En préambule à ce mémoire, je veux exprimer mes remerciements et ma profonde gratitude, avant tout à **ALLAH** qui m'a donné le courage, l'aide, la patience et la force pour mener à bout ce modeste travail et durant ces longues années d'étude.*

*J'exprime mes profonds remerciements à **Mme Ayed H.**, d'avoir bien accepté présider ce jury.*

*Je tiens à remercier **Mr Adrar N.**, pour avoir exprimé son entière disponibilité à participer à ce jury et examiner ce mémoire.*

*Mes sincères remerciements et mes respects vont à mon encadreur **Mme Benhalima L.**, Maître assistant au Département de d'écologie et génie de l'environnement, Pour j'avoir fait l'honneur d'accepter de diriger ce travail, Je la remercie de tout cœur pour sa patience et confiance qu'elle m'a toujours accordée durant ces mois. Je la remercie également pour sa disponibilité sans faille, ses précieux conseils scientifiques et ses encouragements qui m'ont indiscutablement permis d'évaluer.*

*Je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui ont accepté de jurer ce travail.*

*Mes reconnaissances, mes vives gratitude et mes sincères remerciements vont aussi aux personnels de l'hôpital d'Ibn Zohr de Guelma : **Mr. Bouchareb**, **Dr. Yakflef Y** et **Mme Jaballa A**, qui m'ont aidé pendant la période de collecte des souches bactériennes.*

*Mes remerciements vont également à tous les professeurs et les enseignants qui ma beaucoup encourager et soutenu depuis début de mon premier cycle d'étude jusqu'à la fin de cinquième année universitaire.*

*Enfin, J'exprime mes vives et profondes reconnaissances à tous ceux qui de près ou de loin se sont associés pour l'élaboration de ce modeste travail.*



# Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction

## Partie bibliographique

### Chapitre I : Caractères généraux de certaines bactéries d'importance clinique

I.	<i>Escherichia coli</i> .....	1
1.	Taxonomie .....	1
2.	Habitat .....	1
3.	Caractères bactériologiques .....	1
3.1.	Caractères morphologiques .....	1
3.2.	Caractères culturels .....	2
3.3.	Caractères biochimiques .....	2
4.	Pouvoir pathogène .....	3
4.1.	Infections intestinales.....	3
4.2.	Infections extra-intestinales .....	4
5.	Facteurs de virulence .....	4
6.	Traitement .....	6
II.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	7
1.	Taxonomie .....	7
2.	Habitat .....	7
3.	Caractères bactériologiques .....	8
3.1.	Caractères morphologiques .....	8
3.2.	Caractères culturels .....	8
3.3.	Caractères physiologiques et biochimiques.....	9
4.	Pouvoir pathogène .....	9
5.	Facteurs de virulence.....	10
6.	Traitement .....	13
7.	Prophylaxie .....	13

III.	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	14
1.	Taxonomie .....	14
2.	Habitat .....	14
3.	Caractères bactériologiques .....	14
3.1.	Caractères morphologiques .....	14
3.2.	Caractères culturels .....	15
3.3.	Caractères physiologiques et biochimiques .....	16
4.	Pouvoir pathogène .....	16
5.	Facteurs de virulence.....	17
6.	Traitement .....	17
7.	Prophylaxie .....	19

## Chapitre II : Antibiotiques et mécanismes de résistance

I.	Généralités sur les antibiotiques .....	20
1.	Définition.....	20
2.	Classification.....	20
2.1.	Critère de classification .....	20
2.2.	Classe des antibiotiques .....	21
3.	Mode d'action des antibiotiques .....	23
3.1.	Action sur la paroi .....	24
3.2.	Action sur la membrane plasmique .....	24
3.3.	Action sur la synthèse des protéines .....	25
3.4.	Action sur les acides nucléiques .....	25
II.	<b>La résistance aux antibiotiques</b> .....	25
1.	Définition .....	25
2.	Mode de résistance aux antibiotiques .....	26
3.	Mécanisme de l'antibiorésistance .....	26
3.1.	Résistance d' <i>Escherichia.coli</i> aux antibiotiques .....	26
3.2.	Résistance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux antibiotiques.....	29
3.3.	La résistance de <i>Staphylococcus aureus</i> aux antibiotiques .....	32

## Partie expérimentale

### Chapitre III : Matériel et méthodes

I.	Matériel .....	37
II.	Méthodes .....	37
1.	Cadre d'étude .....	37
2.	Collecte des bactéries d'intérêt clinique .....	37
3.	Méthode d'analyse .....	38
3.1.	Purification des souches collectées .....	40
3.1.1.	Revivification .....	40
3.1.2.	Isolement des bactéries .....	40
3.1.3.	Identification morphologique .....	41
3.1.4.	Étude des caractères biochimiques .....	43
3.2.	Conservation des souches .....	53
3.3.	Étude de la sensibilité aux Antibiotiques .....	54

### Chapitre IV : Résultats et discussion

I.	Résultats de vérification de la pureté des souches collectées.....	58
1.	Résultats de la revivification .....	58
2.	Résultats d'isolement .....	58
3.	Résultats de l'identification .....	61
3.1.	Résultats de la recherche des enzymes respiratoires .....	61
3.2.	Résultats de l'identification biochimique .....	62
3.2.1.	Résultats des tests biochimiques des souches d' <i>E.coli</i> .....	62
3.2.2.	Résultats des tests d'identification des souches de <i>P.aeruginosa</i> .....	65
3.2.3.	Résultats des tests d'identification de <i>S.aureus</i> .....	66
4.	Résultats de l'antibiogramme .....	67
II.	Discussion .....	70

Conclusion

Résumé

Références bibliographiques

Annexe

## Liste des abréviations

**NaCl** : Chlorure de sodium

**pH** : Potentielle Hydrogène

**TSI** : Tri-Sugar-Iron

**RM** : Rouge de méthylène

**ADH** : Arginine déshydrogénase

**ONPG**: Ortho-nitrophényl- galactopyranoside

**CC** : Citrate de Christensen

**CS** : Citrate de Simmons

**Gel** : Gélatinase

**H<sub>2</sub>S** : Hydrogène sulfuré

**IND** : Indole

**MAL** : Malonate

**PDA** : Phényl alanine désaminase

**LDC** : Lysine décarboxylase

**ODC** : Ornithine décarboxylase

**URE** : Uréase

**NIT** : Nitrate réductase

**VP** : Réaction de Voges Proskauer

**TDA** : Tryptophane désaminase

**GLU** : Glucose

**LAC** : Lactose

**ESC** : Esculine

**PAL** : phosphatase alcaline

**MH** : Mueller Hinton

**GN** : gélose nutritive

**GNO** : gélose nutritive ordinaire

**EPEC** : *Escherichia coli* Entéro-pathogène

**ETEC** : *Escherichia coli* Entéro-toxinogène

**EIEC** : *Escherichia coli* Entéro- invasive

**EHEC** : *Escherichia coli* Entéro-hémorragique

**SHU** : syndrome hémolytique et urémique

**LPS** : LipoPolySaccharides

**ORL** : Oto-Rhino-Laryngologie

**TIAC** : intoxication alimentaires individuelles ou collectives

**MHC** : complexe majeur d'histocompatibilité

**TSS** : Transcription Start Site

**MLS** : Macrolides-Lincosamides-Streptogramines

**TRI** : TEM résistantes aux inhibiteurs

**TEM** : du nom du malade chez qui on a isolé la première souche porteuse de ce type d'enzyme

**MLSB** : Macrolides, Lincosamides et la Streptogramine de typeB

**BLSE** : bêta-lactamase à spectre élargi

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

**ATCC**: American Type Culture Collection

**SARM** : *S.aureus* résistant à la méthicilline

**PLP** : Protéines Liant la Pénicilline

## Liste des tableaux

Tableau	Titre du tableau	Page
01	Caractères biochimiques d' <i>Escherichia coli</i>	03
02	La physiopathologie d' <i>Escherichia coli</i>	05
03	Classification de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	07
04	Caractères biochimiques de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	09
05	Facteurs de virulence de <i>Staphylococcus aureus</i>	17
06	les différentes familles des antibiotiques	22
07	Informations sur l'origine des bactéries collectées	38
08	Recherche des enzymes respiratoire	44
09	Tests biochimiques utilisés pour l'identification d' <i>Escherichia coli</i>	45
10	Résultats du test Staphylocoagulase	52
11	Concentrations, diamètres critiques pour l'appréciation de la sensibilité/Résistance des antibiotiques à tester pour <i>Escherichia coli</i>	56
12	Concentrations, diamètres critiques pour l'appréciation de la sensibilité/Résistance des antibiotiques à tester pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	56
13	Concentrations, diamètres critiques pour l'appréciation de la sensibilité/Résistance des antibiotiques à tester pour <i>Staphylococcus aureus</i>	57
14	Résultats de l'aspect macroscopique des colonies des différentes souches bactériennes étudiées	59
15	Résultats de l'état frais et la coloration de Gram	60
16	les résultats obtenus à partir des tests des enzymes respiratoires	61
17	Résultats des tests biochimiques classiques	63
18	Résultats des tests d'identification des <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	65
19	Résultats de l'antibiogramme	67



## Liste des figures

figure	Titre	Page
01	<i>Escherichia coli</i> observés au microscope électronique (Gx10000)	02
02	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> : (a) coloration de Gram (x100) , (b) Observation au microscope électronique à balayage d'un biofilm à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> après 72 heures de formation	08
03	Facteurs de virulence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
04	Aspect de <i>Staphylococcus aureus</i> (a) : microscope optique ×100 ; (b) : microscopie électronique X 20000)	15
05	Mode d'action des antibiotiques	24
06	La plaque de la galerie API 20 E	48
07	Résultats de la revivification des souches bactériennes étudiées	58
08	Aspect macroscopique des colonies d' <i>Escherichia coli</i> sur la gélose Hektoen	59
09	Aspect macroscopique des colonies de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur GN	60
10	Aspect macroscopique des colonies de <i>Staphylococcus aureus</i> sur le milieu Chapman	60
11	Observation microscopique après coloration de Gram des souches bactériennes étudiées (X100).	61
12	Résultat de la recherche des enzymes respiratoires	62
13	Résultats des tests biochimiques classiques de la souche E1	63
14	Résultats des tests biochimiques classiques de la souche E2	63
15	Résultats des tests biochimiques classiques de la souche E3	64
16	Profil biochimique de la souche E4	64
17	Profil biochimique de la souche E5	64
18	Profil biochimique de la souche E6	64
19	Profil biochimique de la souche E7	65
20	Résultat des tests d'identification des <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63
21	Résultat du test staphylocoagulase	66
22	Profil biochimique de <i>Staphylococcus aureus</i>	67
23	Résultat de l'antibiogramme des différentes souches d' <i>Escherichia coli</i>	68
24	Résultat de l'antibiogramme des différentes souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	69
25	Résultat de l'antibiogramme d'une souche de <i>Staphylococcus aureus</i>	69

## Liste des schémas

Schéma	Titre de schéma	Page
<b>01</b>	Le protocole expérimental de l'étude de la résistance aux antibiotiques des bactéries d'importance clinique	39



***Introduction***

## Introduction :

Les antibiotiques appartiennent à une classe de médicaments très importante pour l'ensemble de la société. Sans ces médicaments il y aurait beaucoup plus de morts et de nombreuses chirurgies seraient impossibles à effectuer, à cause du risque d'infection postopératoire [9].

Malheureusement ces dernières années on observe toujours plus de cas de résistance aux antibiotiques. La consommation d'antibiotiques croissante a induit, dans le monde, au développement de résistances des bactéries à ces médicaments, rendant difficile le traitement des patients. Autrement dit, dans le passé certains antibiotiques permettaient de soigner de nombreuses maladies infectieuses, maintenant on voit certaines personnes mourir pour de simples infections (souvent contractées en milieu hospitalier), car l'antibiotique n'a plus d'efficacité [9].

Seulement aux Etats-Unis (environ 5% de la population mondiale), la CDC (organisme étatique de santé) estime à 23 000 le nombre de décès de personnes infectées par des microorganismes résistants aux antibiotiques [9]. Parmi ces microorganismes, les germes les plus fréquemment identifiés lors d'une infection nosocomiale qui sont *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* (staphylocoque doré) [12].

En Algérie, comme dans le monde entier, les infections à *P.aeruginosa* occupent une place importante au sein des infections nosocomiales avec une fréquence estimée entre 20 et 30 % et possèdent un pronostic sévère. Ces bactéries causent des problèmes préoccupants dans les hôpitaux, en raison des sources de contamination multiples et ses capacités d'adaptation à son environnement naturel ce qui lui confèrent une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques [10]. Ainsi un pourcentage élevé d'infections nosocomiales sont dues à des bactéries hautement résistantes telles que le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) qui a aggravé le pronostic et compliquer de manière sérieuse la prise en charge des infections staphylococciques [22]. *E. coli* est également une bactérie d'intérêt médicale, c'est le germe le plus fréquemment isolé au cours des infections urinaires. Une augmentation progressive de la résistance d'*E.coli* aux antibiotiques, notamment à l'amoxicilline et cotrimoxazole a été remarqué dans plusieurs régions dans le monde [11].

Cette situation nous a amené à étudier l'état actuel de ces microorganismes présentant un problème majeur de santé publique dans la région de Guelma (Est Algérien), précisément au sein de l'hôpital Ibn Zohr (hôpital de la commune de Guelma).

L'objectif de notre travail consiste donc à:

- l'identification des souches d'*E.coli*, *P.aeruginosa* et *S. aureus* collectées du milieu hospitalier (divers prélèvements pathologiques).
- l'étude de la sensibilité des souches d'*E.coli*, *P.aeruginosa* et *S. aureus* aux antibiotiques.
- L'évaluation et l'optimisation de la thérapeutique antibactérienne vis-à-vis de ces microorganismes.

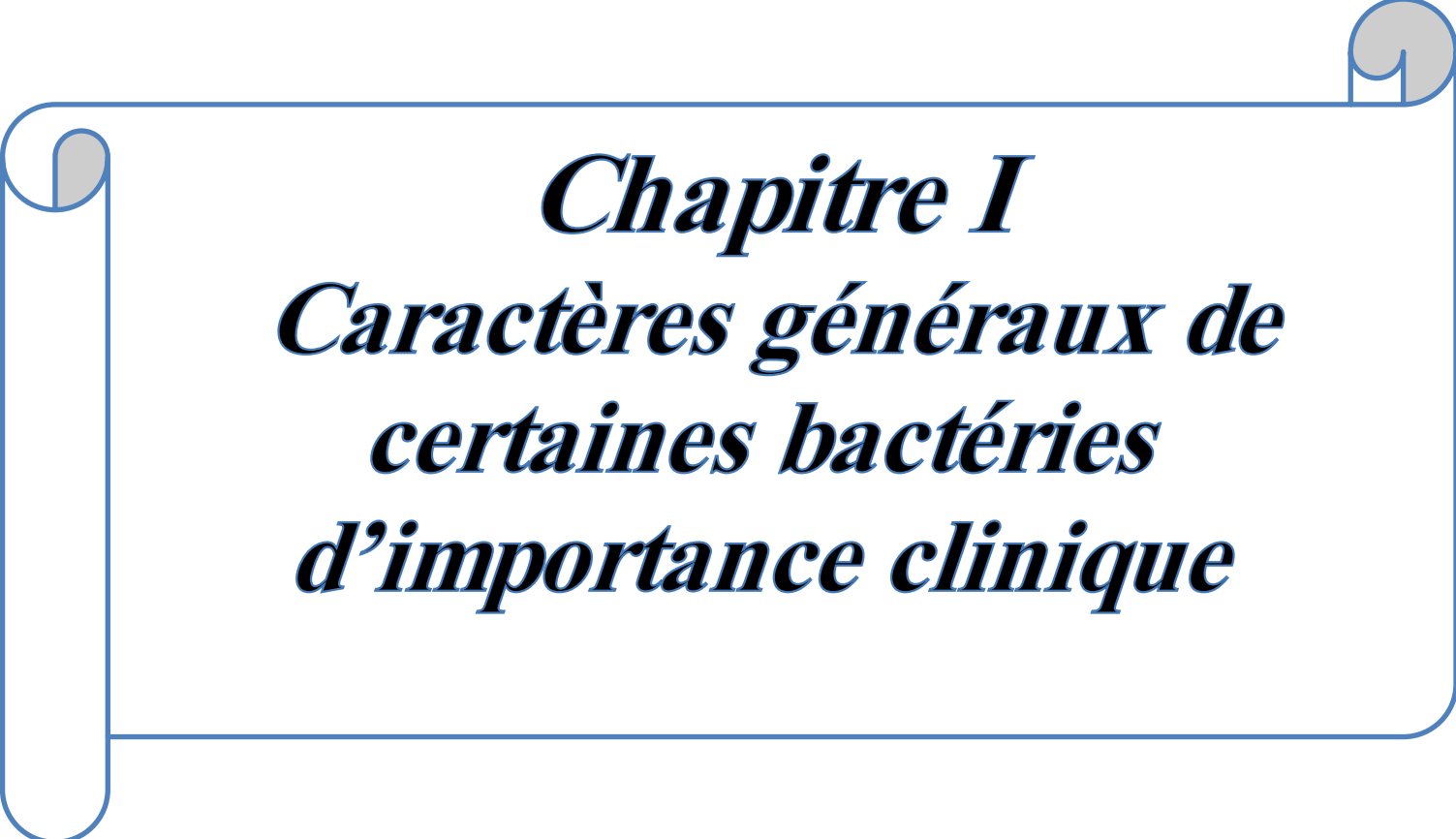
En effet, nous rapportons dans cette étude deux grandes parties :

- La première est attribuée aux données bibliographiques comportant deux chapitres : L'un est consacré à l'étude des caractères généraux des bactéries étudiées et l'autre aux notions et aux mécanismes génétiques de la résistance aux antibiotiques.
- La deuxième relate notre travail expérimental, commençant par la présentation du matériel et les méthodes utilisées dans le cadre de ce travail, suivie des résultats obtenus et des discussions engendrées par ces résultats et enfin nous terminerons cette étude par une conclusion.





***Partie  
Bibliographique***



***Chapitre I***  
***Caractères généraux de***  
***certaines bactéries***  
***d'importance clinique***



**I. *Escherichia coli* :**

*Escherichia coli* est actuellement la seule espèce homologuée du genre *Escherichia*. D'autres espèces d'incidence exceptionnelle ont été décrites mais ne sont pas homologuées : *E.ewing*, *E.fergusonii*, *E.blattae*, *E.hermannii*, *E.vulneris*, *E.adecarboxylata* (Le Minor et Véron., 1984).

**1. Taxonomie** (Djelouat ., 2011) :

- Règne : *Procaryotae*
- Domaine : *Bacteria*
- Phylum : *Proteobacteria*
- Classe : *Gammaproteobacteria*
- Ordre : *Enterobacteriales*
- Famille : *Enterobacteriaceae*
- Genre : *Escherichia*
- Espèce : *Escherichia coli*

**2. Habitat :**

Les *E. coli* sont des hôtes normaux du tube digestif. Ils constituent l'espèce dominante de la flore aérobie (1000 fois moins importante que la flore anaérobie). Une dizaine de sérotypes coexistent normalement chez un même individu. Il est admis que ce sont des bactéries commensales qui peuvent causer, en particulier lors de circonstances favorisantes anatomiques ou humorales, les infections urinaires et les cholécystites (Le Minor et Véron., 1984).

*E. coli* est un indicateur d'une contamination fécale car sa présence dans l'eau et le sol n'est pas considérée normale (Chouder., 2006).

**3. Caractères bactériologiques :****3.1. Caractère morphologiques :**

*Escherichia coli* ou colibacille est une bactérie; Gram négatif ; asporulée mesurant 2 à 4 $\mu$  de long sur 0,4 à 0,6  $\mu$  de large.

C'est un bacille fin et allongée à extrémités arrondies, mobile grâce à une ciliature péritriche (Fig. 01) (Oulymata ., 2007).



**Figure 01 :** *Escherichia coli* observée au microscope électronique (Gx10000) (Mami ., 2013).

### 3.2. Caractères cultureux :

- Aéro-anaérobies facultatifs.
- Culture facile sur milieux ordinaires lactosés.
- Sur milieux solides après 18-24h les colonies sont arrondies, lisses, à bords réguliers, de 2 à 3 mm de diamètre.
- Pousse sur milieux sélectifs pour entérobactéries type Mac Conkey et Hectoen (Clave ., 2012).
- Ce germe non exigeant, sur gélose ordinaire donne des colonies lisses, brillantes et homogènes (Oulymata ., 2007).
- *E.coli* est une bactérie mésophile, sa température de croissance proche de celle du corps humain (37°C), et neutrophiles qui se développent à un pH compris entre 5,5 et 8,5 avec un optimum voisin de 7. *E.coli* est non halophile (elle pousse en milieu de concentration en NaCl inférieure à 0,2 M) (Oulymata ., 2007).

### 3.3. Caractères biochimiques :

*E.coli* possède une catalase mais elle est dépourvue d'oxydase.

Les caractères biochimiques les plus caractéristiques d'*E.coli* sont :

Fermentation du glucose avec production du gaz, en général, lactose (+), indole (+) (Le Minor et Véron., 1984).

D'autres caractères biochimiques d'*E.coli* sont représentés dans le tableau 01.

L'étude d'activités enzymatiques et de la fermentation des sucres est réalisée à l'aide de micro-méthodes validées disponibles dans le commerce sous forme de galerie.

Ces dernières permettent l'identification de cette bactérie ainsi que le diagnostic différentiel avec les autres bactéries de la même famille (Oulymata ., 2007).

**Tableau 01:** Caractères biochimiques d'*E.coli* (Oulymata ., 2007; Avril et al.,2000 ; Lobril.,1998).

TESTS	ADH	ONPG	CC	CS	GEL	H2S	IND	MAL	PDA	LDC	ODC	TDA	URE	NIT	GLU	LAC	VP	ESC
RESULTATS	(+)/-	(+)	(+)	-	-	(+)	(+)	-	+/-	(+)	(+)	(+)	+/-	-	(+)	(+)	-	-

**Légende :** (+) : Caractère positif (-): Caractère négatif (+/-): caractère inconstant

**ADH** : Arginine déshydrogénase ; **ONPG**: Ortho-nitro phényl- galactopyranoside) ; **CC** : Citrate de Christensen ; **CS** : citrate de Simmons ; **Gel**: Gélatinase ; **H<sub>2</sub>S** : Hydrogène sulfuré ; **IND** : Indole ; **MAL** : Malonate ; **PDA** : Phényle alanine désaminase ; **LDC** : Lysine décarboxylase ; **ODC** :Ornithine décarboxylase ; **URE** :Uréase ; **NIT** : Nitrate réductase ; **VP** : Réaction de VogesProskauer pour la mise en évidence de la production d'acétoïne ;**TDA** : Tryptophane désaminase ; **GLU** : Glucose ; **LAC** : Lactose ; **ESC** : esculine.

#### 4. Pouvoir pathogène :

Certaines souches d'*Escherichia coli* sont responsables des infections intestinales et extra-intestinales :

**4.1. Infections intestinales** : Quatre groupes d'*E.coli* responsables de diarrhées (Scheftel., 2010).

- ✓ *Escherichia coli* Entéro-pathogène (EPEC) : responsables de gastro-entérites infantiles.
- ✓ *Escherichia coli* Entéro-toxinogène (ETEC) : responsables de diarrhées liquidiennes cholériformes (diarrhées du voyageur ou turista).
- ✓ *Escherichia coli* Entéro- invasive (EIEC) encore appelé *Escherichia coli Shigella-like*, responsable de syndromes dysentériques (diarrhées mucopurulentes et sanglantes) avec invasion de la muqueuse intestinale.
- ✓ *Escherichia coli* Entéro-hémorragique (EHEC) responsable de syndrome entéro-hémorragique (diarrhées sanglantes liées à la production de toxines), Responsable chez les enfants (1mois à 3 ans) du syndrome hémolytique et urémique (SHU).

#### 4.2. Infections extra-intestinales :

- ✓ **Infections urinaires** : la majorité des infections urinaires de la femme jeune est due à *E.coli*, Les souches uro-pathogènes appartiennent plus fréquemment aux sérotypes O 1, 2, 4, 6, 7, 16, 18, 75 et K 1, 2, 3, 12, 13 qui possèdent des adhésines.
- ✓ **Bactériémies** : Les pathovars incriminés dans les bactériémies sont caractérisés par un fort pouvoir invasif. Ils possèdent des systèmes de captation du fer, des cytotoxines qui, occasionnant des dégâts tissulaires, facilitent leur diffusion et des facteurs de résistance à la phagocytose (par la capsule) et à l'action bactéricide du complément (par les chaînes latérales du LPS).
- ✓ **méningites néonatales**: due au sérotype K1 (Ag capsulaire est un Ag polysaccharidique proche de l'Ag capsulaire du méningocoque de type B) (Scheftel ., 2010 ; Djelouat ., 2011).

#### 5. Facteurs de virulence :

Les facteurs de virulence des souches *d'E.coli* responsables de certaines infections sont représentés dans le tableau 02 :

**Tableau 02** : La physiopathologie d'*Escherichia coli* (Scheftel ., 2010 ; Djelouat ., 2011).

Souche	Syndrome	Facteur de virulence	Rôle du facteur de virulence
EPEC (O26, O55, O86, O111, O119, O125, O126, O127, O128, O142)	Gastro-entérites infantiles aiguës ou chroniques	Entérotoxine Shiga-like	Adhésion étroite et destruction des microvillosités des entérocytes de l'intestin grêle
ETEC (O6, O8, O15, O20, O25, O63, O78, O80, O85, O115, O128, O139)	Diarrhées très liquidiennes	Entérotoxine thermolabile Entérotoxine thermostable	Adhésion aux entérocytes de l'intestin grêle.
EIEC (O28, O112, O124, O136, O143, 144, O147, O152)	Diarrhées dysentériques	Entérotoxine Shiga-like	Invasion et multiplication dans les entérocytes du côlon.
EHEC (O157 mais aussi O26 et O111)	Diarrhées sanglantes, Colites hémorragiques	Vérotoxine	Adhésion étroite et destruction des microvillosités des entérocytes du côlon
<i>E.coli</i> K1	-Méningite néonatales	-L'antigène k1 capsulé.	-l'opposition à la phagocytose.

**Suite du tableau 02 :**

<b>Souche</b>	<b>Syndrome</b>	<b>Facteur de virulence</b>	<b>Rôle du facteur de virulence</b>
- <i>E.coli</i> O 1, 2, 4, 6, 7, 16, 18, 75. - <i>E.coli</i> K 1, 2, 3, 12, 13.	Infections urinaires	Adhésines	-conférant aux souches qui les possèdent la propriété de se fixer aux cellules épithéliales. L'adhérence constitue une étape essentielle de la pathogenèse des infections dues aux bactéries entériques.
<i>E. coli</i> k1	Bactériémie	-des systèmes de captation du fer - des cytotoxines.  -la capsule - les chaînes latérales du lipopolysaccharide (LPS).	-fournissant aux bactéries le fer indispensable à leur multiplication -occasionnant des dégâts tissulaires, facilitent leur diffusion - résistance à la phagocytose -Action bactéricide du complément (résistance au système immunitaire).

**6. Traitement :**

**6.1. Traitement curatif:**

Celui des infections urinaires et biliaires repose sur l'antibiothérapie et la correction des facteurs favorisants. Le traitement curatif des diarrhées aiguës à colibacilles repose surtout sur la réhydratation. Le traitement des infections péritonéales repose sur le drainage et l'antibiothérapie.

**6.2. Traitement préventif:**

Le traitement préventif fait surtout appel aux mesures d'hygiène générale notamment alimentaire et aux mesures d'hygiène individuelle [1].

## II. *Pseudomonas aeruginosa* :

*Pseudomonas aeruginosa* est connue depuis longtemps sous le nom de bacille pyocyanique ou agent du pus bleu des plaies surinfectées (Chaker., 2006), le mot issu du grec pseudo (= s'imili ou imitation) et monas (= unité) désignait les (germes) du début de la microbiologie. Le mot *aeruginosa*, qui signifie vert-de-gris en latin, fait référence au pigment contenu par la bactérie, qui donne à la colonie sa couleur caractéristique (Yétérián ., 2010).

### 1. Taxonomie :

*Pseudomonas aeruginosa* est l'espèce type du genre *Pseudomonas* et la famille des *Pseudomonadaceae*. Sa taxinomie est présentée dans le tableau suivant:

**Tableau 03** : Classification de *Pseudomonas aeruginosa* (Chaker., 2006).

Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Prokaryota</i>
Division	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Pseudomonadales</i>
Famille	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genre	<i>Pseudomonas</i>
Espèce	<i>Aeruginosa</i>

### 2. Habitat :

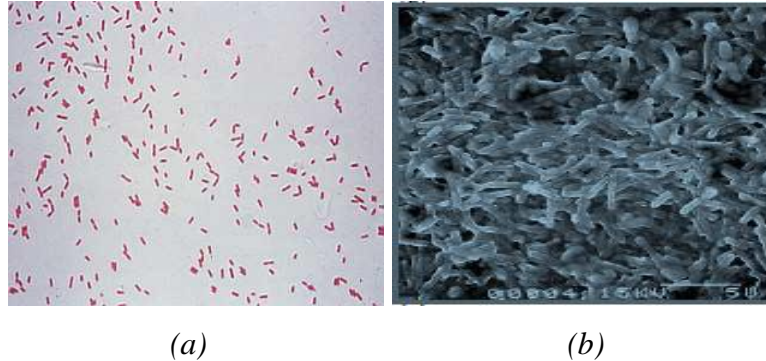
L'habitat du *Pseudomonas aeruginosa* est naturel ; ce sont des bactéries **ubiquitaire de l'environnement humide**: sol, lacs, rivières, eaux polluées, piscines, jacuzzis... cette bactérie est caractérisée par une vitalité et résistance importantes dans l'eau y compris l'eau distillée [2].

### 3. Caractères bactériologiques :

#### 3.1. Caractère morphologiques :

*Pseudomonas aeruginosa*, bactérie à Gram négatif, se présente sous forme de bacilles fins droits (Khalilzadah., 2009), de 0,5 à 0,8  $\mu\text{m}$  de diamètre et d'une longueur de 1,5 à 3  $\mu\text{m}$

(Yétérien., 2010), très mobiles grâce à un flagelle polaire (ciliature monotriche), dépourvus despores et de capsule. Ils apparaissent la plupart du temps isolés ou en diplobacilles (Fig. 2) (Khalilzadah .,2009).



**Figure 02:** *Pseudomonas aeruginosa*: (a) coloration de Gram (x100), (b) Observation au microscope électronique à balayage d'un biofilm à *Pseudomonas aeruginosa* Après 72 heures de formation (Khalilzadah .,2009).

### 3.2. Caractères cultureux :

*P.aeruginosa* est une Bactérie **aérobie stricte** (cytochrome oxydase) à métabolisme oxydatif (non fermentant), elle peut utiliser les nitrates comme accepteurs d'électrons en conditions anaérobies. Sa **culture est facile** sur milieux ordinaires ou sur milieux sélectifs (gélose au cétrimide) ; dégage une odeur caractéristique d'acacia par production d'orthoamino-acétophénone [2].

La température optimale de croissance est comprise entre 30°C et 37 C°. Une croissance à 41-42°C est possible, mais aucune culture n'est obtenue à 4°C ou à 46°C (Khalilzadah., 2009), croissance généralement limitée à pH < 4,5, non halophile (elle pousse en milieu de concentration en NaCl inférieure à 0,2 M) (Khalilzadah .,2009).

Comme d'autres *Pseudomonas*, *P.aeruginosa* sécrète un certain nombre de pigments, entre autres la pyocyanine (bleu-vert), la Pyoverdine (jaune vert fluorescent) et la pyorubine (brun-rouge) (Khalilzadah ., 2009).

### 3.3. Caractères physiologique et biochimique :

-*Pseudomonas aeruginosa* est un germe catalase négative mais oxydase positive.

-Les caractères biochimiques de *P.aeruginosa* sont résumés dans le tableau 04.

**Tableau04:** Caractères biochimiques de *Pseudomonas aeruginosa* (Oulymata ., 2007).



TESTS	ADH	ONPG	CC	CS	GEL	H <sub>2</sub> S	IND	MAL	PDA	LDC	ODC	URE	NIT	GLU	LAC	VP	ESC
RESULTATS	(+)	-	(+)	(+)	(+)	-	-	-	+/-	-	-	(+)	(+)	-	-	-	-

**Légende :** (+) : Caractère positif (-): Caractère négatif (+/-): caractère inconstant  
**ADH :** Arginine déshydrogénase ; **ONPG:** Bêta galacto-D pyranoside ; **CC :** Citrate de Christensen ;  
**CS :** citrate de Simmons ; **Gel :**Gélatinase ; **H<sub>2</sub>S :** Hydrogène sulfuré ; **IND :** Indole ; **MAL :**Malonate ;  
**PDA :** Phényle alanine désaminase ; **LDC :** Lysine décarboxylase ; **ODC :**Ornithine décarboxylase ;  
**URE :**Uréase ; **NIT :** Nitrate réductase ; **VP :** Réaction de VogesProskauer pour la mise en évidence de la production d'acétoïne ; **TDA :** Tryptophane désaminase ; **GLU :** Glucose ; **LAC :** Lactose ; **ESC :** esculine.

#### 4. Pouvoir pathogène :

*P. aeruginosa* est une espèce classée dans les pathogènes opportunistes. Elle provoque de nombreuses infections parmi ceux-ci :

##### ✓ Infections pulmonaires :

- **Patients de réanimation** souvent colonisés par *P. aeruginosa* au niveau bronchique ; évolution rare mais grave vers une pneumopathie mono ou bilatérale nécrosante et une septicémie avec choc septique (>30% de mortalité) [2].
- **Patients atteints de mucoviscidose** colonisés à plus de 80% par la bactérie au niveau bronchique ; facteur d'inflammation locale et de détérioration de la fonction pulmonaire [2].

##### ✓ Septicémies :

- Elles représentent 10 à 20 % des septicémies à bacilles à Gram négatif.
- L'immunosuppression favorise leur survenue et elles sont décrites avec une fréquence élevée au cours du sida. Elles ne présentent pas de caractères cliniques particuliers si ce n'est la présence exceptionnelle de manifestations cutanées, faites de vésicules riches en bacilles, entourées d'un halo violacé, évoluant vers l'ulcération nécrotique, traduisant la dissémination par voie artérielle. La leucopénie et l'hypothermie sont inconstantes.
- Le pronostic est grave (mortalité voisine de 50 %) lié à la maladie sous-jacente, à la localisation primitive, à l'accessibilité ou non du foyer à un geste chirurgical [3].

✓ **Infections superficielles :**

- **Surinfections** de plaies, d'escarres, de brûlures...
- **Folliculites et otites externes** bénignes après baignade (jacuzzis).
- **Conjonctivites** et kératites chez les porteurs de lentilles.
- Fonte purulente de l'œil après chirurgie (exceptionnelle) [2].

✓ **Infections diverses :**

- Infections urinaires chez les personnes porteuses d'une sonde [2].

**5. Facteurs de virulence :** (figure 03)

❖ **Exotoxine A :**

La plus toxique des protéines de *Pseudomonas aeruginosa* possède plusieurs effets : diminution de la production d'interleukine 1 avec inhibition de l'immunité à médiation cellulaire (lymphocytes T), inhibition directe de la phagocytose, effet cytotoxique induisant une augmentation de la perméabilité membranaire et libération des enzymes lysosomiaux. Sa production dépend de la teneur en fer de l'environnement, dont l'excès peut en inhiber la synthèse [3].

❖ **Exoenzyme S :**

Elle joue un grand rôle dans la pathogénicité pulmonaire. Elle possède une action directe cytotoxique et indirecte, par formation d'anticorps et d'immuns complexes. Elle stimule aussi l'immunité, permettant chez le sujet sain, d'aboutir à une élimination par opsonisation [3].

❖ **Phospholipase C :**

Composée de deux types d'enzymes, elle est cytotoxique et détruit les lécithines ; ce phénomène est particulièrement important au niveau du surfactant pulmonaire, favorisant la survenue d'atélectasies ; elle provoque aussi une hémolyse par destruction de la membrane du globule rouge [3].

**❖ Protéases :**

Il existe quatre protéases: collagénase, fibrinolyse, élastase et protéase alcaline, les deux dernières étant prédominantes. La protéase alcaline active la phospholipase C et l'élastase. Ces deux enzymes, outre leur effet sur le collagène, compromettent la réponse immunitaire par inhibition du système du complément, des lymphocytes T et par clivage, des IgA et des IgG. L'élastase et la protéase alcaline diminuent la réponse des polynucléaires. Cela se traduit en clinique par une colonisation plus facile par *Pseudomonas aeruginosa*, une réaction inflammatoire importante et des lésions du tissu pulmonaire [3].

**❖ Pyoverdine et pyocyanine :**

Ces pigments, essentiels à la virulence, transportent le fer indispensable à la croissance et la prolifération bactérienne. En même temps, le fer stimule la production par les polynucléaires neutrophiles de radicaux oxygénés qui possèdent une action bactéricide sur les autres espèces bactériennes, favorisant l'émergence de *Pseudomonas aeruginosa*. La pyocyanine, spécifique de *P. aeruginosa*, possède plusieurs propriétés : inhibition de l'interleukine 2 et immunité cellulaire, libération d'élastase, inhibition des antagonistes des protéases et diminution de la clairance bactérienne par action sur le battement ciliaire. En bloquant la libération de prostacyclines, à partir des cellules endothéliales, elle rend compte de la vascularité observée lors de pneumopathies à *P.aeruginosa*. Les macrolides possèdent in vitro un effet d'inhibition des exoenzymes [2].

**❖ Rhamnolipides et leucocidines :**

Ils interviennent surtout dans la colonisation et l'infection de l'expectoration des malades atteints de mucoviscidose. Ces enzymes inactivent le système ciliaire bronchique et augmentent la libération de mucus [3].

**❖ Adhésine :**

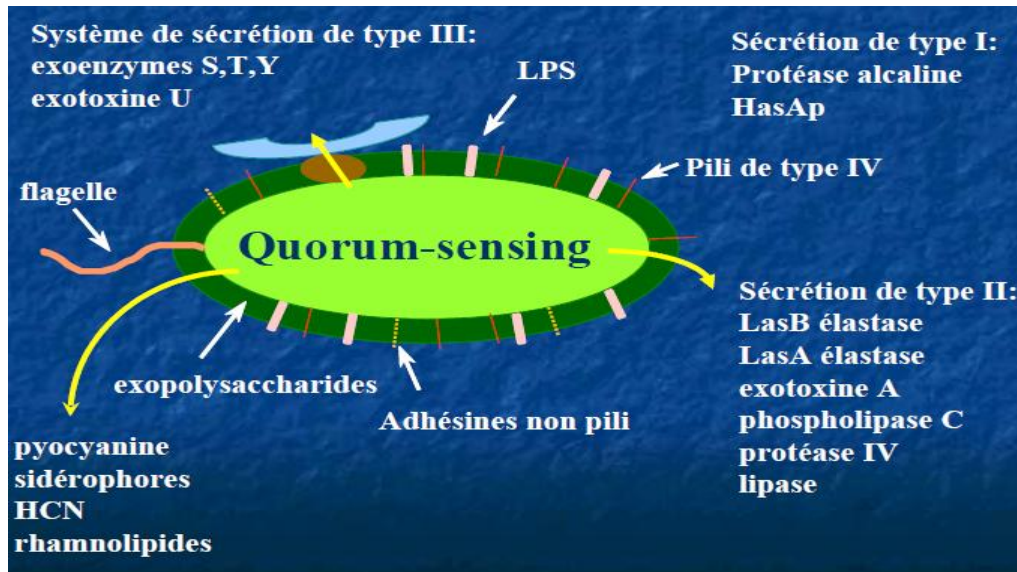
Il s'agit d'une propriété essentielle dans les différentes étapes conduisant au processus infectieux. On l'observe au cours des infections chroniques (mucoviscidose, dilatation des bronches), quand les colonies de *Pseudomonas aeruginosa* acquièrent des

caractères mucoïdes. La bactérie produit un exopolysaccharide, l'alginate, composé d'acides polyuroniques. La biosynthèse de l'alginate est soumise à une régulation extrêmement complexe sous la dépendance de l'environnement. Il confère à la bactérie des propriétés d'adhésion au support (cellules bronchiques, cathéter) mais la rend aussi très virulente par la formation de microcolonies, inhibition de la phagocytose, suppression de la réponse immunitaire et résistance aux antibiotiques.

À côté de l'alginate, deux éléments interviennent pour faciliter l'adhésion du bacille : les pili (fimbriae) sont des filaments responsables de l'adhésion des souches non mucoïdes de *P.aeruginosa* dans le tractus respiratoire ; les flagelles, en libérant une protéine de nature encore inconnue, facilitent l'adhésion aux mucines trachéobronchiques. Expérimentalement, le dextran inhibe l'adhésion de la bactérie aux cellules épithéliales [3].

#### ❖ Exotoxines :

De nature lipopolysaccharidique, elles proviennent de la paroi bactérienne et portent l'antigène O (somatique) au niveau de la partie polysaccharidique. Cet antigène est spécifique permettant le sérotypage de la bactérie. L'exotoxine est peu toxique, mais elle contribue à la réaction inflammatoire et à la formation d'anticorps permettant d'envisager la fabrication de vaccins [3].



**Figure 03 :** Facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* (Van Delden., 2006).

## 6. Traitement :

*P.aeruginosa* est une bactérie robuste, naturellement très résistante aux antibiotiques et s'adaptant rapidement aux attaques médicamenteuses, elle ne sera souvent sensible qu'à quelques antibiotiques : ticarcilline avec acide clavulanique, gentamicine, ciprofloxacine, ceftazidime, et pipéracilline seule ou avec ajout de tazobactam et acide borique. En 2008, les fluoroquinolones, la gentamicine ou l'imipénem sont encore efficaces, mais uniquement sur quelques souches bactériennes.

Si le patient a récemment reçu plusieurs antibiotiques, la bactérie sera vraisemblablement encore plus résistante et d'autant plus dangereuse [4].

## 7. Prophylaxie :

### ✓ Collective :

- Mesures générales d'**hygiène hospitalière** (lavage des mains...).
- Désinfection des lieux humides à l'eau de javel (lavabos, douches...).
- Suppression des sources potentielles de contamination (systèmes clos de sondage urinaire, interdiction des pots de fleurs et des vases, des légumes et fruits crus, désinfection des endoscopes...) [4].

### ✓ Individuelle :

- **Dépistage systématique** des patients porteurs de *P. aeruginosa* à l'admission en

réanimation.

- Vaccin à l'essai chez les patients atteints de mucoviscidose et non encore colonisés par le bacille pyocyanique [4].

### III. *Staphylococcus aureus* :

#### 1. Taxonomie :

Selon la neuvième édition du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, les staphylocoques sont classés parmi les bactéries à Gram positif, dans le phylum des Firmicutes ;

Classe : *Bacilli*

Ordre : *Bacillales*

Famille : *Staphylococcaceae*

Genre : *Staphylococcus*

Espèce : *Staphylococcus aureus* (Prescott et al., 2010 ; Rebiahi., 2012 ; Dolarras., 2007)

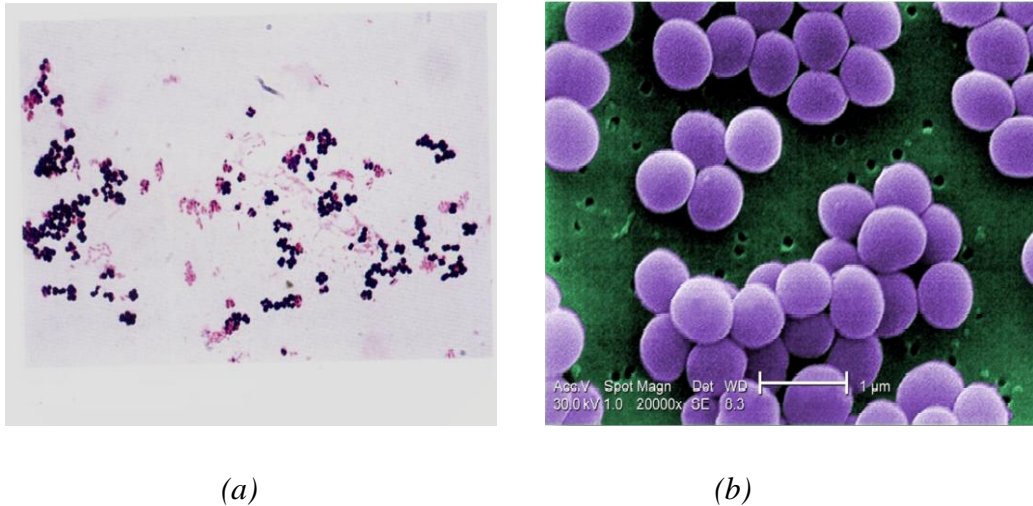
#### 2. Habitat :

Les staphylocoques sont des bactéries commensales de la peau et des muqueuses de l'homme et de l'animal. L'habitat préférentiel de *S. aureus* chez l'homme est la muqueuse nasale avec 10 à 40% d'individus porteurs de façon permanente (environ 60% qui hébergent *S. aureus* de façon intermittente) à une densité de  $10^3$  à  $10^4$  CFU/cm<sup>2</sup> (Gras., 2006).

#### 3. Caractères bactériologiques :

##### 3.1. Caractères morphologiques :

*S. aureus* se présente sous l'aspect de cocci en petits amas, en diplocoques ou en très courtes chainettes (3 à 5 éléments), mesurant de 0,8 à 1 µm, et Gram positif (Fig.04) (Le Minor et Véron., 1984). La division cellulaire peut se faire sur plusieurs plans, ce qui donne lieu à des arrangements cellulaires variés: la division n'aboutit pas à la séparation complète des cellules filles (Aouati., 2009). Il est immobile, non sporulé et ne possède pas de capsule visible au microscope optique sauf de très rares souches (souche Smith) ; d'autres souches formant des colonies mucoïdes sont entourées d'une pseudocapsule (Le Minor et Véron., 1984).



**Figure 04 :** Aspect de *Staphylococcus aureus* (a) : microscope optique  $\times 100$  ; (b) : microscopie électronique X 20000) (Aouati., 2009 ; Rebiahi., 2012).

### 3.2. Caractères cultureux :

*S. aureus* est aérobie, anaérobie facultatif et cultive facilement sur milieu ordinaire ; certains facteurs de croissance sont indispensables (vitamine B1, acide nicotinique) ; Il pousse en milieu synthétique contenant des sels, du glucose et quatorze amino-acides dont la cystéine, la thiamine et l'acide nicotinique (Le Minor et Véron., 1984). La température de croissance optimale est de  $37^{\circ}\text{C}$  (mésophile), il peut croître aussi à  $6-12^{\circ}\text{C}$  (psychrophile). Le pH optimal est de 7,5 (neutrophile) mais de grandes variations sont tolérées (Rebiahi., 2012). En bouillon ordinaire, la culture est rapide, en quelques heures un trouble homogène puis un dépôt sont observés, il n'y a pas de production de pigment en milieu liquide.

Sur gélose ordinaire, les colonies sont lisses, rondes, bombées et leur diamètre est de 1 mm ; la plupart des souches produisent un pigment doré non diffusible dans le milieu (Le Minor et Véron., 1984).

Après culture de 24 heures sur gélose au sang, les colonies qu'ils produisent sont de plus grand diamètre que celles produites sur gélose nutritif. Ainsi, une pigmentation peut être observée où la couleur varie selon l'espèce, le caractère pigmentaire n'est donc pas propre à l'espèce (Aouati., 2009).

Le pigment non diffusible produit par cette bactérie, soluble dans les solvants des graisses, est de nature caroténoïde et comporte un mélange d'au moins sept constituants, son



rôle physiologique n'est pas bien connu. Les souches productrices ont, en général, un métabolisme très actif et une diffusibilité épidémique grande, l'absence de production est souvent associée à d'autres caractères (groupes phagiques et antigéniques) (Le Minor et Véron., 1984).

*S.aureus* tolère le sel et pousse dans un milieu contenant 75% de NaCl (milieu de Chapman) qui est utilisé comme milieu sélectif (Le Minor et Véron., 1984); Sur ce milieu, les colonies sont souvent pigmentées et entourées d'une auréole jaune, la plupart des souches de *S. aureus* fermentent le mannitol et font virer le milieu du rouge au jaune orangé (Aouati., 2009).

Par contre, en bactériologie alimentaire pour isoler et caractériser le staphylocoque, le milieu de Baird Parker est utilisé. Il est à base de tellurite comme agent sélecteur, enrichi en glycine, en pyruvate et en jaune d'œuf (Dolarras., 2007).

### 3.3.Caractères physiologiques et biochimiques :

*Staphylococcus aureus* possède une catalase mais pas d'oxydase. Ils sont actifs sur les hydrates de carbone : le glucose est utilisé en anaérobiose et aérobie ainsi que le mannitol. L'utilisation de ces deux sucres caractérise l'espèce *S. aureus*. D'autres caractères peuvent être recherchés : indole(-), acétoïne(+), uréase(+), réduction du tellurite de potassium, des nitrates en nitrites, production d'ammoniaque à partir de l'arginine (Rebiahi., 2012).

### 4. Pouvoir pathogène :

*Staphylococcus aureus* comporte deux sous espèces :

- *S.aureus subsp.anaerobius*, bactérie à catalase (-) et pathogène pour l'animal.
- *S.aureus subsp.aureus*, bactérie pathogène par virulence (elle fabrique des protéines de surface et des enzymes dont la coagulase libre et la thermonucléase) et par toxinogénèse (elle produit diverses toxines, dont des entérotoxines de différents types antigéniques : A à F) (Dolarras., 2007). *Staphylococcus aureus*, espèce de *Staphylococcus* à coagulase positive, est fréquemment rencontré chez l'homme. Il peut être responsable d'infections cutanées (impétigo, furoncles...), d'infections de la sphère ORL (sinusites, otites...), d'infections diverses et d'infections septicémiques redoutables, d'infections nosocomiales, et d'intoxication alimentaires individuelles ou collectives (TIAC) (Dolarras., 2007).



## 5. Facteurs de virulences :

La pathogénicité de *S. aureus* est surtout reliée à l'expression de facteurs de virulence. En plus de facteurs structuraux, il a en effet la capacité de sécréter, après invasion, des facteurs d'adhésion, des toxines ou encore des enzymes. Quelques exemples de ces facteurs sont résumés dans le tableau 05.

**Tableau 05 :** Facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus* (Rebiahi., 2012).

	Facteurs	Gènes	fonctions
Constituants de la paroi cellulaire	Clumping factor A	<i>clfA</i>	Adhésion au fibrinogène
	Clumping factor B	<i>clfB</i>	Adhésion au fibrinogène
	Coagulase	<i>coa</i>	Liaison au fibrinogène
	Protéine Fib A	<i>fibA</i>	Liaison au fibrinogène
	Fibronéctine liée à la protéine A	<i>fnbA</i>	Attachement à la fibronéctine
	Fibronéctine liée à la protéine B	<i>fnbB</i>	Attachement à la fibronéctine
	Collagène lié à la protéine	<i>cna</i>	Adhésion au collagène

Suite de tableau 2 :

Elastine liée à la protéine	<i>ebps</i>	Liaison à l'élastine	
Protéine analogue MHC	<i>map ou eap</i>	Liaison à la protéine de la matrice extracellulaire (incluant fibronectine, fibrinogène vitronectine, sialoprotéine osseuse et thrombospondine)	
Adhésine intracellulaire Polysaccharidique	<i>pia</i>	adhésion intracellulaire et formation de biofilm	
Protéine A	<i>spa</i>	invasion possible des défenses de l'hôte	
Polysaccharides capsulaires (types 1, 5 et 8)	<i>cap</i>	Molécule Anti-phagocytose	
Entérotoxines A-E, H	<i>sea-e, h</i>	Invasion des défenses de l'hôte avec des superantigènes, responsables des diarrhées associées à la nourriture	
Syndrome du choc Toxique toxine-1	<i>tst</i>	Invasion des défenses de l'hôte avec des superantigènes responsables de TSS	
Toxine exfoliative A, B	<i>eta, etb</i>	Invasion des défenses de l'hôte, agents responsables du syndrome de la peau ébouillantée	
Lipase	<i>geh</i>	Invasion des défenses de l'hôte	
Protease V8	<i>Sas P ou ssp</i>	Invasion des tissus et modification des protéines de surface	
Leucocidine de Panton-Valentine	<i>lukF, lukS</i>	Invasion des défenses de l'hôte, lyse des phagocytes de l'hôte	
Staphylokinase	<i>sak</i>	Invasion des défenses de l'hôte	
Hemolysine -a	<i>hla</i>	Invasion des Tissus, à partir des pores dans les membranes des cellules de l'hôte	
β-hemolysine	<i>hlb</i>	Tissue invasion, sphingomyelinase	
Toxines et enzymes extracellulaires	δ-hemolysine	<i>hld</i>	Potentialisation de la β-hemolysine
	γ-hemolysine	<i>Hla A, B, C</i>	Potentialisation de la lyse des cellules de l'hôte
	Phospholipase C	<i>plc</i>	Lyse cellulaire
	Elastase	<i>sepA</i>	Invasion des tissus
	Hyaluronidase	<i>hysA</i>	Invasion des tissus

## 6. Traitement :

En milieu hospitalier, des mesures draconiennes d'hygiène et d'isolement des patients sont requises pour limiter la dissémination de ces bactéries. Aujourd'hui, l'antibiothérapie reste le traitement de choix, surtout dans les phases précoces de l'infection. Cependant, l'émergence récente de souches résistantes à la vancomycine laisse entrevoir une impasse thérapeutique, mais des approches vaccinales sont actuellement à l'étude (Le Minor et Véron., 1984).

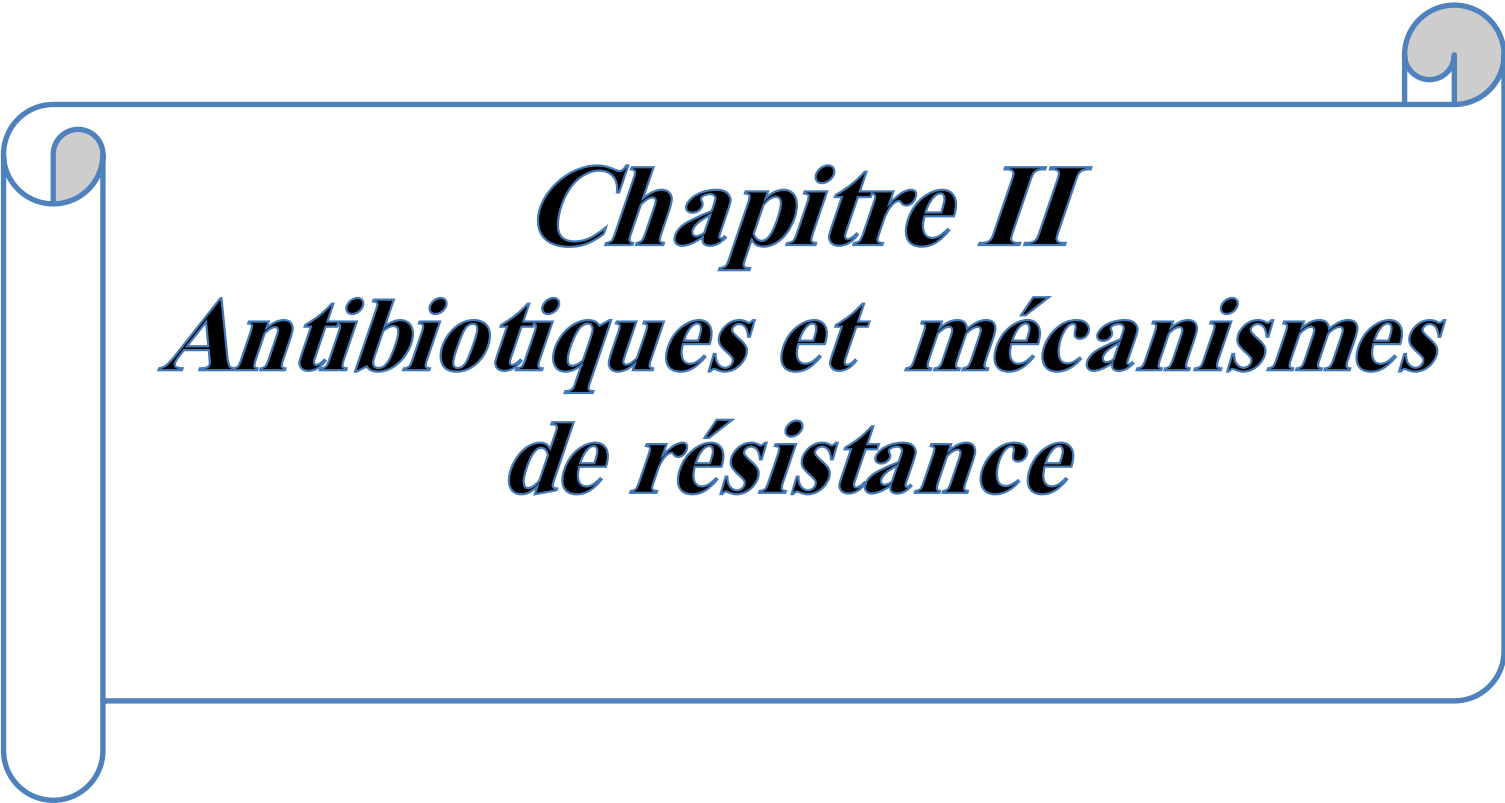
## 7. Prophylaxie :

### ➤ Prophylaxie individuelle :

Le portage sein ne constitue pas un danger sérieux pour le sujet ; en revanche un sujet atteint de furonculose chronique doit être traité et le portage nasal pris en considération. La prophylaxie de la septicémie chez un sujet porteur de lésion staphylococcique évolutive est essentielle. L'utilisation de vaccins cellulaires inactivés et d'anatoxine a été préconisée, mais les résultats sont incertains (Le Minor et Véron., 1984).

### ➤ Prophylaxie collective :

La surveillance et le contrôle de ces infections sont basés sur les mesures principales suivantes : suppression des infections croisées, éducation du personnel, retour au respect absolu des règles relatives à l'asepsie et à l'antisepsie, rationalisation de l'emploi des antibiotiques à titre curatif et préventif (Le Minor et Véron., 1984).

A decorative graphic of a scroll with a blue outline and grey shading at the top and bottom edges, framing the text.

***Chapitre II***  
***Antibiotiques et mécanismes***  
***de résistance***

## I. Généralités sur les antibiotiques :

### 1. Définition :

Un antibiotique est une substance antimicrobienne d'origine biologique, c'est-à-dire produite par un microorganisme (champignon microscopique et bactérie) ou de synthèse chimique et qui est capable d'inhiber la multiplication ou de détruire d'autres microorganismes.

Qu'ils soit d'origine biologique ou de synthèse chimique, ces agents antimicrobiens doivent posséder les mêmes propriétés, à savoir :

- avoir une activité antibactérienne,
- être de toxicité sélective (contre les cellules bactériennes et non les cellules de l'hôte).
- être actifs en milieu organique puisqu'ils doivent atteindre les microorganismes dans les tissus de l'hôte (sang, poumons, os etc...).
- être de bonne absorption et de bonne diffusion.
- Il existe deux catégories d'antibiotiques :
- Les antibiotiques à effet bactériostatique qui inhibent la croissance bactérienne en ralentissant puis arrêtant la multiplication,
- les antibiotiques bactéricides qui lysent les bactéries (Boulaïbal., 2002).

La notion de bactériostase est actuellement remise en cause à la suite de diverses expériences ayant démontré qu'en augmentant la dose, un antibiotique bactériostatique peut avoir des effets bactéricides. Mais pour ces antibiotiques, *in vitro*, la dose efficace et la dose toxique sont peu éloignée, leur utilisation en médecine humaine ne peut se contenter que de leur effet bactériostatique (Boulaïbal., 2002).

### 2. Classification :

#### 2.1. Critère de classification :

Les antibiotiques peuvent être classés selon leur:

- ❖ **Origine** : élaboré par un organisme (naturel) ou produit par synthèse (synthétique ou semi synthétique) (François et *al.*, 2003 ; Yala et *al.*, 2001)

❖ **Mode d'action** : Les antibiotiques agissent au niveau moléculaire de certaines structures de la bactérie, en un point précis dénommé site d'action ou cible moléculaire, propre à chaque famille d'antibiotique (Boulahbal., 2002).

Les principales structures bactériennes peuvent être le site d'action d'un ou de plusieurs antibiotiques de la même famille : la synthèse de la paroi bactérienne, les fonctions du membre cytoplasmique, la synthèse protéique, la synthèse des acides nucléiques et le transfert de l'information génétique du chromosome vers les ribosomes (mRNA) (Boulahbal., 2002).

❖ **Spectre d'activité** : liste des espèces sur lesquelles les antibiotiques sont actifs (spectre étroit ou large)

❖ **Nature chimique** : très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex : cycle  $\beta$  lactame) sur laquelle il y a hémi synthèse. Elle permet de classer les antibiotiques en familles ( $\beta$  lactamines, aminosides, tétracyclines.....etc.) (François et *al.*, 2003 ; Yala et *al.*, 2001)

## 2.2. Classe des antibiotiques : (Tableau 06)

Les antibiotiques sont classés par famille selon la composition chimique. On distingue 17 familles d'antibiotiques et plusieurs sous-familles qui sont classées en fonction des groupements chimiques. Les plus courantes sont:

- a) Beta-lactames qui ont un spectre d'activité assez large.
- b) Macrolides qui ont un spectre d'activité étroit.
- c) Tétracyclines qui ont un spectre très large (Boulahbal., 2002).
- d) Aminoglycosides ou aminosides, antibiotiques d'action rapide et puissante et Ils ont un large spectre (Boulahbal., 2002).
- e) Quinolones, antibiotiques à large spectre.
- f) Sulfamides antibactériens qui ont un large spectre (Prescott et *al.*, 2010 ; Meziani., 2012).

**Tableau 06** : les différentes familles des antibiotiques (Véronique., 2003).

<b>Famille</b>	<b>Mode d'action</b>	<b>Principaux groupes ou antibiotiques</b>	<b>Spectre (général)</b>
<b>Acide fusidique</b>	Inhibition de la synthèse des protéines	Acide fusidique	Étroit
<b>Aminosides</b>	Inhibition de la synthèse des protéines	Amikacine, Apramycine, Isépanicine, Streptomycine Nétilmicine, Tobramicine Gentamicine	Large
<b>Bêta-lactamines</b>	Inhibition de la synthèse du peptidoglycane	Groupe de la pénicilline G, Pénicillines anti-staphylococciques (méthicilline, oxacilline), Amidinopénicillines, Monobactams Céphalosporines de 1 <sup>re</sup> génération (cephalothin)	Étroit
		Aminopénicillines (ampicilline, amoxicilline), Carboxypénicillines, Uréido-pénicillines, Penems et Carbapenems, Céphems et oxacéphems Céphalosporines de 2 <sup>e</sup> (cefamandole, cefuroxime, cefoxitin) 3 <sup>e</sup> (cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime) et 4 <sup>e</sup> (cefipime) génération	Large
		Pénicillines-sulfones, Clavams ou oxapenamams	Utilisés en association avec une autre bêta-lactamine
<b>Fosfomycine</b>	Inhibition de la synthèse du peptidoglycane	Fosfomycine	Large
<b>Glycopeptides</b>	Inhibition de la synthèse du peptidoglycane	Teicoplanine, Vancomycine	Étroit
<b>Lincosamides</b>	Inhibition de la synthèse des protéines	Clindamycine, Lincomycine	Étroit
<b>Macrolides et kétolides</b>	Inhibition de la synthèse des protéines	Érythromycine, Azithromycine, Dirithromycine, Clarithromycine Telithromycine	Étroit
<b>Nitrofuranes</b>	Inhibition de la synthèse de l'ADN	Furaltadone, Furazolidone	Large

**Suite du tableau 06:**

<b>Phénicolés</b>	Inhibition de la synthèse des protéines	Chloramphénicol	Large
<b>Polypeptides</b>	Action sur la membrane externe des Gram-	Polymyxine B, Colistine, Bacitracine, Tyrocidine	Étroit
<b>Quinolones et fluoroquinolones</b>	Inhibition de la synthèse de l'ADN	Acide calidixique, Acide oxolinique, Acide piromidique	Étroit
		Ciprofloxacine, Enoxacine, Ofloxacine, Sparfloxacine	Large
<b>Sulfamides</b>	Blocage de la synthèse de l'acide dihydrofolique	Sulfadiazine, Sulfadoxine, Sulfaméthoxydiazine, Sulfaméthoxazole	Large
<b>Tétracyclines</b>	Inhibition de la synthèse des protéines	Chlortétracycline, Doxycycline, Minocycline	Large
<b>Fifamycines</b>	Blocage de la synthèse des ARN messagers	Rifamycine SV, Rifaximine	Étroit
		Ripampicine	Large

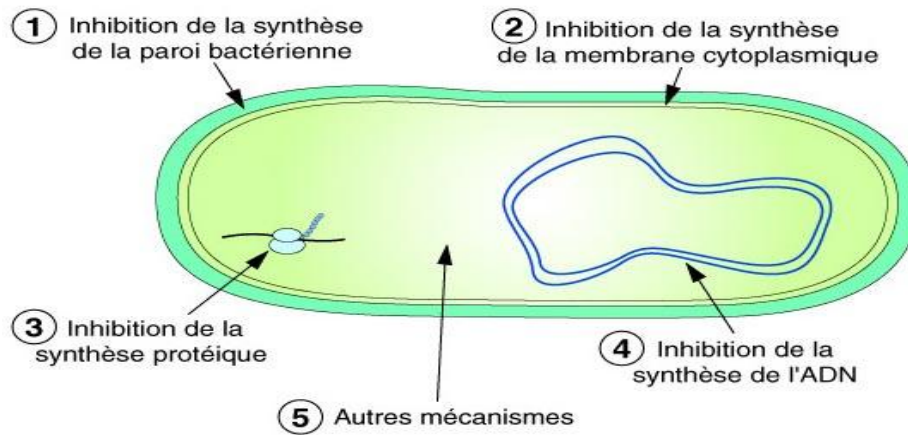
**3. Mode d'action des antibiotiques :**

Les antibiotiques bloquent de manière spécifique les processus métaboliques vitaux des bactéries sensibles et arrêtent ainsi leur développement, le plus souvent seulement temporairement (effet bactériostatique) mais parfois définitivement (effet bactéricide).

Il existe différents types d'antibiotiques capables d'agir sur les bactéries selon différents mécanismes (fig. 05) :

- a) Antibiotiques qui inhibent la synthèse de la paroi bactérienne.
- b) Antibiotiques qui altèrent la perméabilité de la membrane plasmique.
- c) Antibiotiques qui inhibent la synthèse protéique.
- d) Antibiotiques actifs sur le métabolisme des acides nucléiques et de leurs précurseurs (Meziani., 2012 ; Mammeri.,2013).





**Figure 05 :** mode d'action des antibiotiques (François et *al.*, 2003).

### 3.1. Action sur la paroi :

Ces antibiotiques agissent sur des cibles extracellulaires et ne sont actifs que sur les germes en croissance. Les cellules au repos ne sont pas perturbées par l'action de ces molécules. Les antibiotiques bloquent la synthèse de la paroi, la cellule s'allonge sans faire de paroi (cloison) et elle explose sous l'effet de la pression osmotique interne. Si on ajoute un stabilisant osmotique, on obtient un protoplaste [6].

Exemple :

- les  $\beta$ -lactamines, qui inhibent la transpeptidase intervenant dans la synthèse de la paroi
- les glycopeptides, qui se lient à un intermédiaire de synthèse du peptidoglycane.
- la fosfomycine Inhibe la synthèse de précurseurs de la paroi [5].

### 3.2. Action sur la membrane plasmique :

L'antibiotique a des propriétés de surfactant qui lui permettent de s'insérer parmi les phospholipides de la membrane externe. Cela perturbe la perméabilité membranaire (augmentation anormale) et permet la diffusion de substances hydrosolubles hors de la bactérie ce qui entraîne sa destruction [4].

Exemple :

- les polymyxines : agissent comme des détergents cationiques : grâce à leur caractère amphipathique, elles pénètrent dans la cellule bactérienne et s'insèrent parmi les phospholipides de la paroi, perturbant ainsi la perméabilité membranaire [6].

### 3.3. Action sur la synthèse des protéines :

De nombreux antibiotiques inhibent la synthèse protéique en se fixant sur le ribosome procaryote. Comme ces agents distinguent les ribosomes procaryotes des ribosomes eucaryotes, leur indice thérapeutique est relativement élevé mais moins favorable que celui des inhibiteurs de la synthèse de la paroi. Certains agents se fixent sur la petite sous-unité 30S, alors que d'autres s'attachent à la grande sous-unité 50S du ribosome. Plusieurs étapes différentes du mécanisme de la synthèse protéique peuvent être affectées ; la fixation de l'aminoacyl-ARNt, la formation de la liaison peptidique, la lecture de l'ARNm et la translocation (Prescott et *al.*, 2010).

Exemple :

- macrolides, lincosamides, streptogramines, phénicolés, oxazolidinones: inhibent la sous-unité 50S.
- tétracyclines, aminoglycosides : inhibent la sous-unité 30S [5].

### 3.4. Action sur les acides nucléiques :

Les antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques agissent en inhibant l'ADN polymérase et l'ADN hélicase ou l'ARN polymérase, en bloquant de ce fait respectivement la réplication ou la transcription (Prescott et *al.*, 2010).

Exemple :

- ansamycines : Inhibe l'ARN polymérase.
- quinolones et fluoroquinolones : Inhibent l'ADN-gyrase et de la topoisomérase IV [5].

## II. La résistance aux antibiotiques :

### 1. Définition :

La **résistance aux antibiotiques** est la capacité d'un microorganisme de résister aux effets des antibiotiques. Elle se développe via sélection naturelle par une mutation aléatoire ou échanges de gènes de résistances (transfert horizontal) entre les bactéries. Si une bactérie est porteuse de plusieurs gènes de résistance pour différents antibiotiques, elle est appelée multirésistante [6].

## 2. Mode de résistance aux antibiotiques :

La résistance aux antibiotiques peut se manifester de deux manières distinctes :

- ✓ **Résistance naturelle** : On parle de la résistance naturelle lorsque toutes les souches de la même espèce sont résistantes à un antibiotique donné (Meziani., 2012).
- ✓ **Résistance acquise** : La résistance acquise survient lorsque quelques souches d'une même espèce normalement sensibles deviennent résistantes. Cette résistance peut être acquise par mutagenèse : c'est une résistance chromosomique [6].

### Remarque:

Les bactéries ont la capacité de transférer l'information génétique. La plupart de ces cas de résistances se rencontrent à l'hôpital. C'est une information génétique exogène qui est récupérée par la bactérie [6].

## 3. Mécanisme de l'antibiorésistance :

- ✓ **Inactivation enzymatique de l'antibiotique** : il existe de nombreuses enzymes qui détruisent l'antibiotique par divers mécanismes chimiques (hydrolyse, acétylation, phosphorylation...)
- ✓ **Modification de la cible** : les cibles subissent des mutations entraînant l'apparition d'une nouvelle cible non reconnue par l'antibiotique.
- ✓ **Imperméabilité membranaire** : par diminution quantitative ou modification des porines (cavaux de pénétration des antibiotiques à travers la membrane externe de la bactérie) provoquant la résistance par défaut de pénétration passive de l'antibiotique.
- ✓ **Efflux actif** : ce sont des protéines qui agissent comme des pompes, insérées dans la membrane cytoplasmique et externe, elles expulsent les antibiotiques dans le milieu extérieur en utilisant l'énergie produite par la membrane cytoplasmique (Rahal.,2013).

### 3.1. Résistance d'*Escherichia.coli* aux antibiotiques :

#### 3.1.1. Résistances aux $\beta$ lactamines :

Dans le cas d'*Escherichia coli*, la résistance aux  $\beta$  lactamines est due à une inactivation de l'antibiotique par l'acquisition d'enzymes. 3 principaux types d'enzymes doivent être connus :

- a) Les pénicillinases qui sont plasmidiques. Elles peuvent être de bas niveau et donc responsables d'une résistance aux aminopénicillines ,aux carboxypénicillines et aux

uréidopénicillines, ou de haut niveau et donc responsables d'une résistance non seulement aux 3 antibiotiques cités mais aussi aux molécules possédant des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases ainsi qu'au céphalosporines de première et deuxième génération.

- b) Une enzyme dite TRI (TEM Bêta-lactamase, résistantes aux inhibiteur) qui hydrolyse non seulement le cycle  $\beta$ -lactames mais aussi l'inhibiteur des  $\beta$ -lactamases et qui sera donc responsable d'une résistance aux aminopénicillines, aux uréidopénicillines, aux carboxypénicillines et aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.
- c) Les céphalosporinases : *Escherichia coli* possède une céphalosporinase chromosomique qui contrairement aux *Enterobacter* est rarement déréprimée. Toutefois comme toutes les entérobactéries *Escherichia coli* peut acquérir une céphalosporinaseplamidique appelée  $\beta$  les ( $\beta$ lactamase à spectre étendu) qui est responsable d'une résistance à toutes les  $\beta$  lactamines à l'exception de l'imipenème. Toutefois concernant le céfepim et la cefpirome, une activité de ces deux antibiotiques reste possible mais le microbiologiste dans son interprétation rendra ces deux molécules comme inactives (Zahar et Moumile., 2013).

### 3.1.2. Mécanisme de résistance aux aminosides :

#### ➤ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistante. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement de site de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille (Seck., 2005).

#### ➤ Modification du transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides dans les bactéries est un phénomène de :

- Diffusion passive à travers les porines de la membrane externe.
- Transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.
- Les CMI sont faiblement augmentés et ce type de résistance et de détection délicate.
- Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule (Seck., 2005).

➤ **Détoxification enzymatique des antibiotiques :**

La modification enzymatique des aminosides méditée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontrés en clinique. Ce troisième mécanisme d'origine plasmidique prédominant chez l'entérocoque qui est responsable de l'apparition de souches hautement résistantes aux aminosides (Seck., 2005).

### 3.1.3. Mécanisme de résistance aux macrolides et apparentés :

#### a. Résistance intrinsèque ou naturelle :

Une des caractéristiques des bacilles à Gram négatif est d'être résistant spontanément aux macrolides et aux substances apparentées (Seck.,2005). Les entérobactéries, en particulier, sont intrinsèquement résistantes aux macrolides. En effet, leur membrane cellulaire externe est imperméable aux composés hydrophobes tel que les macrolides, en plus elles ont un phénomène d'efflux physiologique. Toutefois, les ribosomes des germes à Gram négatif demeurent sensibles à hautes concentrations, les macrolides pénètrent les parois bactériennes et exercent leur effet inhibiteur.

#### b. Résistance acquise :

Il existe 3 mécanismes de résistance acquise aux macrolides : la modification de la cible, l'inactivation et l'efflux [8].

➤ **Résistance par modification de la cible (gènes *erm*):**

Le mécanisme le plus fréquent à ce niveau est une méthylation de l'adénine au niveau de l'ARN 23 S de la sous-unité ribosomale 50 S. La production de l'enzyme responsable de cette méthylation (méthylase) se fait sous le contrôle des gènes *erm* (erythromycin ribosome methylation). Cette méthylation confère une résistance croisée vis-à-vis non seulement de tous les macrolides mais aussi de 2 autres classes d'antibiotiques qui agissent en se liant en partie à ce même site, à savoir les Lincosamides (clindamycine et lincomycine) et la Streptogramine de type B, d'où le nom de résistance MLSB [8].

➤ **Résistance par inactivation de l'antibiotique :**

Ce mécanisme, assez rare (décrit chez les entérobactéries, *P. aeruginosa* et exceptionnellement chez *S. aureus*), implique la production d'enzymes (estérases et phosphotransférases) modifiant les macrolides au point de réduire fortement leur

affinité pour le ribosome. Ce type de résistance est également transmis par des plasmides [8].

➤ **Résistance par efflux de l'antibiotique :**

Ce mécanisme confère la résistance aux macrolides à 14 et 15 atomes et repose sur l'acquisition d'un gène *mef(A)* porté par un transposon. Les macrolides à 16 atomes et les Lincosamides restent donc actifs sur les souches possédant un mécanisme d'efflux actif [8].

### **3.1.4. Mécanisme de résistance aux sulfamides et aux triméthoprimes :**

Le mécanisme le plus décrit ici concerne la cible de l'antibiotique. Celle-ci est substituée et donc n'est plus reconnue par l'antibiotique.

L'autre mécanisme mis en évidence aux cours de la résistance aux sulfamides et aux triméthoprimes concerne lui, la perméabilité de la bactérie à ces molécules (Seck., 2005).

### **3.1.5. Mécanisme de résistances aux fluoroquinolones :**

Les mécanismes de résistance d'*E.coli* aux fluoroquinolones sont de deux types :

- a) altération de la cible des fluoroquinolones ;
- b) efflux avec diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique. C'est l'expression d'une protéine *acrR* par mutation du gène qui entraîne cet effet.

Les taux de résistance aux fluoroquinolones sont de plus en plus élevés en Europe et plus particulièrement en Espagne. Les fluoroquinolones sont largement actives *in vitro* sur plus de 80 % des souches d'entérobactéries, sauf pour *Enterobacteraerogenes* et *Providenciastuartii* où le taux de sensibilité est faible. Ces modifications de sensibilité sont parallèles à une augmentation de 2,5 fois de l'utilisation des quinolones (ciprofloxacine, lévofloxacine, ofloxacine) dans les traitements des pneumopathies aiguës communautaires, des infections urinaires et des tissus mous [7].

## **3.1. Résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques:**

### **3.2.1. Mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines:**

Le développement de la résistance aux  $\beta$ -lactamines chez *Pseudomonas aeruginosaa* été associé à la production de  $\beta$ -lactamases acquises, la surproduction constitutive de la céphalosporinase AmpC ou mécanismes non enzymatiques tels que l'efflux ou l'imperméabilité de la membrane externe (Cavallo et al., 2002).

### 3.2.1.1. Résistance naturelle :

*P. aeruginosa* possède une membrane externe faiblement perméable, ce qui lui confère une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques, dont la plupart des 26 bêta-lactamines hydrophiles, la bactérie produit d'une bêta-lactamase chromosomique inductible de classe C qui n'est pas inhibée par le clavulanate et qui hydrolyse préférentiellement les céphalosporines de première génération et en fin l'existence des systèmes d'efflux sont souvent des complexes protéiques ternaires avec une pompe transmembranaire, une protéine périplasmique de jonction et une porine de la membrane externe (Cattoir, 2004).

### 3.2.1.2. Résistance acquise :

Les bactéries peuvent également acquérir la résistance à un antibiotique. Dans ce cas, la résistance acquise est présente seulement dans certaines souches de l'espèce. Cette résistance résulte d'une modification génétique par mutation ou d'une acquisition de matériel génétique étranger. (Liazid., 2012).

#### ✓ Résistance enzymatique :

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation de type sérine (classes A, C et D) ou métalloenzymes (classe B) dont les substrats sont des  $\beta$ -lactamines. L'inactivation enzymatique (perte de l'activité antibiotique) survient lors de l'ouverture du cycle  $\beta$ -lactame (Liazid., 2012).

#### • $\beta$ -lactamase à spectre étendu ou élargi :

Les bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) sont des enzymes récemment apparues à la suite de mutations des pénicillinases. Elles sont plasmidiques donc transférables et sensibles à l'action des inhibiteurs enzymatiques. Elles sont très actives contre les pénicillines et moyennement actives contre les céphalosporines de première génération. Les mutations génétiques à l'origine des BLSE élargissent le spectre de ces enzymes et touchent également les céphalosporines de troisième génération (ceftazidime et céfotaxime) et les monobactames (aztréonam) (Liazid., 2012).

Cinq types de BLSE de classe A (TEM, SHV, PER, VEB et GES) ont été détectés chez *P. aeruginosa*. Il existe actuellement neuf types connus de BLSE GES, jusqu'à présent quatre de ces types de GES (GES-1, -2, -8 et -9) ont été trouvés dans *P. aeruginosa* (Liazid., 2012).

#### • Hyperproduction de céphalosporinase chromosomique de classe C :

La  $\beta$ -lactamase chromosomique de type AmpC a été décrite chez une large variété de bacilles à Gram négatifs tel que *P. aeruginosa*. Des mutations dans le système

de régulation de la production entraînent une production stable à haut niveau d'AmpC affectant l'activité de l'ensemble des  $\beta$ -lactamines à l'exception de celle des carbapénèmes (Liaqid., 2012).

- **Oxacillinace de classe D :**

Chez *P.aeruginosa* des BLSE dérivées d'OXA-10 et OXA-2 ont été isolées (OXA-10, 11, 14, 15,16, 19) ainsi que la  $\beta$ -lactamase OXA-18. Ces enzymes sont localisées sur des plasmides (sauf OXA-18) (Pourriat et al., 2005). Ils hydrolysent la plus part des  $\beta$ -lactamines y compris les céphalosporines, l'imipénème et le méropénème. L'aztréonam et la pipéracilline sont moins touchés, mais leur activité n'est pas inhibée par l'acide clavulanique ou le tazobactam. L'OXA-18 est la seule  $\beta$ -lactamase de classe D inhibée par l'acide clavulanique identifiée chez *P.aeruginosa*, *bla*OXA-18 est localisé au niveau de chromosome (Liaqid., 2012).

- **Carbapénémases de classe B :**

La résistance acquise aux carbapénèmes (imipénème), initialement rapportée comme liée à un déficit de la porine OprD2, peut être maintenant en relation avec la synthèse de  $\beta$ -lactamases de type carbapénémase (classe B). Ce sont des métallo-enzymes (MBL) qui sont dépendantes de la présence d'ions  $Zn^{+2}$ , donc inhibables par des chélateurs d'ions tel l'EDTA (Philippon et al., 2006).

- ✓ **Résistance non enzymatique :**

- **Surexpression de système d'efflux :**

Le système MexAB-OprM, produit constitutivement, cause une résistance naturelle à la plupart des  $\beta$ -lactamines; par dépression génétique, il occasionne une résistance acquise à ces molécules. Les systèmes MexCD-OprJ et MexEF-OprN ne se manifestent pas normalement, mais, suite à des mutations, peuvent être responsables de résistances acquises multiples, dont le spectre est légèrement différent (Liaqid., 2012).

- **Perte de la porine OprD2 :**

Dans les bactéries à Gram négatif, les porines bactériennes sont une des voies principales d'entrée pour les antibiotiques usuels comme les  $\beta$ -lactamines et les fluoroquinolones. Cette protéine canalaire de la membrane externe possède un site spécifique de liaison aux carbapénèmes, et permet la pénétration sélective de



l'imipénème. Des modifications de la quantité absolue ou de l'état fonctionnel de ces porines ont pour conséquence une diminution de la diffusion des antibiotiques empruntant cette voie de pénétration. Ce mécanisme par diminution de perméabilité peut entraîner une résistance croisée à plusieurs familles d'antibiotiques. Chez *P. aeruginosa*, la modification de la protéine de membrane externe OprD reste le mécanisme le plus fréquent de résistance à l'imipénème (Liazid., 2012).

### 3.2.2. Résistance aux fluoroquinolones :

Chez *P. aeruginosa*, la résistance de haut niveau est principalement liée à des mutations au niveau de *gyrA*. Cependant, chez cette espèce, les systèmes d'efflux actif MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ et MexEF-OprN jouent un rôle important dans la résistance intrinsèque aux fluoroquinolones (Mérens et al., 2010).

### 3.2.3. Résistance aux aminosides :

*Pseudomonas aeruginosa* contient des enzymes de modification des aminoglycosides AAC (6'), APH (2'), APH (3')-VI et AAC (3')-II (Kettner et al., 1995). Considérant que, chez *P. aeruginosa* la pompe d'efflux MexXY est décrite comme la principale manifestation de la résistance aux aminosides, la modification de la cible (ARNr 16S) a également représenté plusieurs cas de résistance aux aminosides (Sohidul., 2008).

## 3.3. La résistance de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques :

### 3.3.1. Résistance à la pénicilline :

La pénicilline était le premier antibiotique découvert en 1929 par Alexander Fleming. Introduit dans le début des années 1940, pratiquement toutes les souches de *S.aureus* étaient sensibles à la pénicilline G, mais en 1944, la première preuve de résistance de *S.aureus* à la pénicilline avait déjà paru. Aujourd'hui presque toutes les souches de *S.aureus* sont résistantes aux pénicillines naturelles, celle-ci implique aussi une résistance à l'ampicilline, l'amoxicilline, la ticracilline, la pipéracilline, et à l'aminopénicilline.

Le mécanisme de résistance à la pénicilline repose sur la synthèse par la bactérie d'une enzyme appelée  $\beta$ -lactamase ou pénicillinase. Cette enzyme plasmidique inductible hydrolyse le cycle  $\beta$ -lactame des pénicillines A et G les rend inactive. La production de cette enzyme est inactivée par les inhibiteurs de pénicillinase (acide clavulanique, sulbactam, tazobactam) (Chaalal., 2013).

### 3.3.2. Résistance à la méticilline :

La méticilline, l'oxacilline et d'autres pénicillines résistantes à l'action de la pénicillase sont introduites dès les débuts des années 1960 pour le traitement des infections causées par les *Staphylococcus aureus* résistants à la pénicilline. Cependant, au fil du temps des souches de *S.aureus* résistant à la méticilline (SARM) commencent à apparaître et à se répandre au sein du milieu hospitalier et plus récemment au sein de la communauté. La résistance à la méticilline est croisée vis-à-vis des autres bêta-lactamines, ce qui implique que les souches méticillino-résistantes doivent toujours être considérées comme résistantes à toutes les  $\beta$ -lactamines y compris aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération. La résistance des *S.aureus* à la méticilline est principalement due à la modification de la cible des  $\beta$ -lactamines, enzymes appelées aussi protéines liant la pénicilline (PLP). Les PLP interviennent dans la synthèse de la paroi bactérienne en catalysant la formation des ponts peptidiques entre les chaînes glycaniques. Les  $\beta$ -lactamines se fixent à ces enzymes et bloquent la polymérisation de la paroi bactérienne, altérant ainsi sa structure et provoquent la lyse de la bactérie.

*S.aureus* produit naturellement 4 PLP, les  $\beta$ -lactamines doivent en inhiber plus d'une pour obtenir une activité anti bactérienne efficace. Les SARM synthétisent une 5<sup>ème</sup> PLP modifiée appelée PLP2a, qui a une faible affinité pour les  $\beta$ -lactamines (Chaalal., 2013).

### 3.3.3. Résistance aux aminosides :

La résistance aux aminosides est rarement due à des mutations affectant les cibles ribosomales des antibiotiques. Le principal mécanisme de résistance aux aminosides (kanamycine, amikacine, tobramycine, gentamicine, nétilmicine) est surtout dû à la production par les staphylocoques d'enzymes modifiant la cible ribosomale. Il existe trois enzymes de résistance, chacune d'entre elles conférant un phénotype de résistance spécifique aux aminosides. Ces enzymes (acétyltransférases, nucléotidyl-transférases et phosphotransférases) sont codées par des gènes plasmidiques ou transposables. Les trois phénotypes de résistance sont:

- Aminoglycoside phosphotransférase (3')-III : cette enzyme confère la résistance à la kanamycine et l'amikacine (phénotype K). Cette enzyme est présente chez moins de 10% des souches méticillino- sensibles.
- Aminoglycoside nucléotidyl transférase (4'-4'') : cette enzyme confère la résistance à la kanamycine, à l'amikacine et à la tobramycine (phénotype KT).

Cette résistance est présente chez environ 1/3 des souches résistantes à la méticilline.

- Aminoglycosideacétyltransférase (6') - aminoglycosidephosphotransférase (2'') : cette enzyme bifonctionnelle confère la résistance à la kanamycine, L'amikacine, la tobramycine, la nétilmicine et à la gentamicine (phénotype KTG). Cette enzyme est détectée chez 2/3 ou plus des souches méticillino-résistantes (Chaalal., 2013).

### 3.3.4. Résistance aux glycopeptides :

Les glycopeptides (teicoplanine et vancomycine), sont utilisés en alternative aux bêta-lactamines dans le traitement des infections à staphylocoques dorés méticillino-résistants.

Le mécanisme de résistance à la vancomycine est lié à un épaissement de la paroi bactérienne qui piège les glycopeptides dans les couches superficielles en les empêchant d'atteindre la membrane cytoplasmique où le peptidoglycane est synthétisé. Cette résistance est due à des mutations de *S. aureus*, obtenues après transfert conjucatif de l'opéron de gène *vanA* codant pour la résistance à la vancomycine chez les entérocoques résistants aux glycopeptides (Chaalal., 2013).

### 3.3.5. Résistance aux Macrolides, Lincosamides, Streptogramine (MLS) :

Les MLS sont des inhibiteurs de la synthèse protéique en stimulant la dissociation entre ribosome et ARN de transfert. Les macrolides (érythromicine, josamycine, sipramycine) et les lincosamides (clindamycine) exercent une activité bactériostatique vis-vis des staphylocoques et ont de ce fait un usage thérapeutique limité aux infections peu sévères, dues à ces germes.

La résistance aux MLS est due à trois mécanismes :

- La modification de la cible des antibiotiques qui est le mécanisme le plus répandu et confère un spectre de résistance croisé entre macrolides, lincosamides et streptogramines B. d'où son nom de MLSB, car ces antibiotiques ont des sites de fixation communs.
- Les mécanismes d'efflux actif ne touchent que les antibiotiques de structure apparentée. Les macrolides à noyau de 14 et 15 atomes (érythromycine, roxithromycine, clarithromycine, dirithromycine, azithromycine) codés par le *msr* et les streptogramines A codés par le gène *vga*, peuvent subir un efflux actif par mécanismes ATP dépendant alors que les macrolides à noyau de 16 atomes (josamycine et spiramycine), les lincosamides (clindamycine et lincomycine) et les

streptogramines B (pristinamycine I et quinupristine) restent actifs car sont non inducteurs (Rebiahi., 2012).

- L'inactivation enzymatique est due à diverses enzymes spécifiques. Les lincosamides peuvent être inactivée par une acétylase codée par un gène plasmidique *linA*.

- Les streptogramines sont touchées par une hydrolase codée par le gène *vgb*.

Le gène *vat* est responsable d'acétylation des streptogramines A. Ce gène est très souvent associé au gène *vgb* sur le même plasmide (Rebiahi., 2012).

### 3.3.6. Résistance aux fluoroquinolones :

Les fluoroquinolones (ofloxacin, pefloxacin, ciprofloxacine) inhibent la croissance bactérienne par arrêt de la synthèse de l'ADN. La résistance aux fluoroquinolones est due à une modification de la cible, soit la topo-isomérase IV par mutation des gènes chromosomiques *grlA* ou *grlB* soit les sous-unités de la gyrase par une mutation au sein des gènes *gyrA* ou *gyrB*. Cette résistance touche essentiellement les staphylocoques hospitaliers, en particulier le staphylocoque doré résistant à la méthicilline (Chaalal., 2013).

#### Autres résistances :

- La résistance aux sulfamides est de nature chromosomique, liée à une hyperproduction d'acide paraaminobenzoïque.
- La résistance aux tétracyclines est due soit à un mécanisme d'efflux par une protéine membranaire codée par les gènes *tetK* ou *tetL* d'origine plasmidique soit une protection de la cible par une protéine codée par le gène transposable *tetM* (Chaalal., 2013).
- La résistance à la rifampicine est liée à la sélection de mutants résistants au niveau de la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase ADN dépendant (Rebiahi., 2012).
- La résistance à la fosfomycine est due à la sélection de mutants au niveau du système de transport de la molécule dans la bactérie (gènes *glgT* et *uhp*) (Rebiahi., 2012).
- La résistance à l'acide fusidique est secondaire soit à la sélection de mutants résistants au niveau du facteur d'élongation intervenant dans la synthèse protidique soit à une modification de la perméabilité d'origine plasmidique (Chaalal., 2013).



***Partie Expérimentale***

A decorative border resembling a scroll, with a blue outline and grey shading on the top and bottom edges, framing the central text.

***Chapitre III***  
***Matériel et Méthodes***

## I. Matériel :

Le matériel utilisé dans la partie expérimentale est cité au fur et à mesure lors de notre manipulation.

## II. Méthodes :

### 1. Cadre d'étude :

Notre travail dont l'objectif a porté sur l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries d'importance clinique a été effectué au niveau de laboratoire de Microbiologie de département de Biologie à l'Université 08 Mai 1945 de Guelma.

### 2. Collecte des bactéries d'intérêt clinique :

Du 02 Février à 06 Mars 2014, nous avons collecté 12 souches bactériennes de laboratoire de microbiologie de l'hôpital Ibn Zohr (wilaya de Guelma): 07 souches d'*E. coli* (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7), 04 *Pseudomonas aeruginosa* (P1, P2, P3, P4), et 01 *Staphylococcus aureus* (S1).

Le choix de ces bactéries a été basé sur leur importance dans le domaine médical :

- *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie pathogène opportuniste fréquemment impliquée dans les infections nosocomiales (Singleton., 2008).
- *Escherichia coli* est une bactérie communément trouvée dans les intestins de Mammifères, humains compris. Il en existe différentes formes dont certaines sont pathogènes, provoquant des infections intestinales, infections urinaires ou génitales (Singleton., 2008).
- *S. aureus* est une bactérie pyogène et toxigène, responsable de nombreuses infections nosocomiales et communautaires qui représentent un problème de santé publique. Elle provoque de nombreuses infections suppuratives dues à la multiplication de la bactérie et des infections toxiques liées à la diffusion de toxines spécifiques (Singleton., 2008).

L'origine des bactéries étudiées est représentée dans le tableau suivant :

**Tableau 07** : Informations sur l'origine des bactéries collectées.

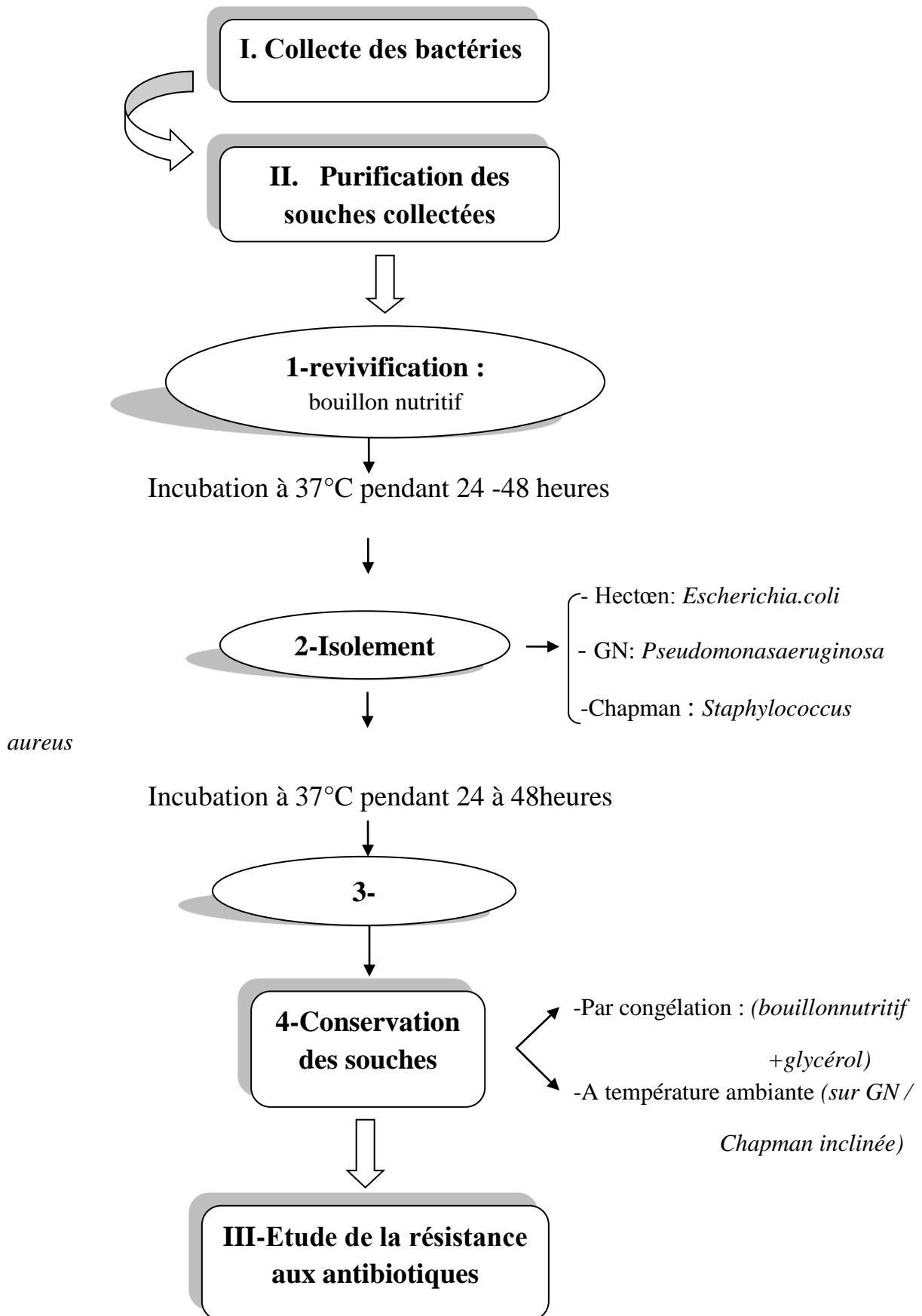
Souches		Date d'isolement	Nature de Prélèvement	Sexe	âge	Méthode de conservation
<i>E. coli</i>	<i>E1</i>	31-05-2011	Matière fécale	Masculin	40 ans	milieu de conservation en Petit tube
	<i>E2</i>	19-02-2014	Crachat	Masculin	82 ans	MH en boite de Pétri
	<i>E3</i>	19-02-2014	Matière fécale	Masculin	42 ans	GN en boite de Pétri
	<i>E4</i>	03-03-2014	Matière fécale	Féminin	70 ans	MH en boite de Pétri
	<i>E5</i>	02-03-2014	Matière fécale	Féminin	28 ans	MH en boite de Pétri
	<i>E6</i>	03-03-2014	Matière fécale	Féminin	03 ans	MH en boite de Pétri
	<i>E7</i>	03-03-2014	Matière fécale	Féminin	35 ans	MH en boite de Pétri
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>P1</i>	17-02-2014	Crachat	Masculin	32 ans	GN en boite de Pétri
	<i>P2</i>	12-02-2014	Crachat	Féminin	41 ans	MH en boite de Pétri
	<i>P3</i>	11-03-2014	Matière fécale	Masculin	71 ans	GN en boite de Pétri
	<i>P4</i>	13-03-2014	Matière fécale	Féminin	37 ans	GN en boite de Pétri
<i>Staphylococcus Aureus</i>	<i>S1</i>	24-02-2014	Pus	Féminin	81 ans	MH en boite de Pétri

*MH* : Mueller Hinton, *GN* : gélose nutritive

### 3. Méthode d'analyse :

Le protocole expérimental suivi pour étudier la résistance aux antibiotiques des bactéries qui ont été collectées est représenté dans le schéma 01 :





**Schéma 01** : Le protocole expérimental de l'étude de la résistance aux antibiotiques des bactéries d'importance clinique.

### 3.1. Purification des souches collectées :

L'étape de purification est très importante puisqu'elle conduira à la souche pure ce qui facilitera l'étude de la sensibilité aux antibiotiques (Meziani.,2012).

Afin d'obtenir des souches pures (et/ou de vérifier la pureté des souches collectées) nous avons suivi les étapes suivantes :

#### 3.1.1. Revivification :

Pour chaque bactérie, des colonies suspectées ont été introduites dans un tube contenant 5 ml de bouillon nutritif à l'aide d'une anse de platine stérile. Les tubes sont ensuite incubés à 37 C° pendant 24 à 48 heures (Boudraa et *al.*, 2011).

Cette étape permet la croissance (multiplication en abondance) des bactéries soumises à un stress ou endommagées, ce qui facilitera leurs cultures dans les milieux d'isolement (Boudraa et *al.*, 2011).

#### 3.1.2. Isolement des bactéries:

A partir des milieux d'enrichissements présentant une croissance bactérienne, nous avonsensemencé la gélose Hektoen pour cultiver les souches d'*Escherichia coli*, la gélose nutritive pour *Pseudomonas aeruginosa*, et Chapman pour *Staphylococcus aureus*. Tous les milieuxensemencés sont incubés à 37°C pendant 24 à 48 heures (Boudraa., 2011).

##### La gélose Hectoen :

Est un milieu sélectif permettant l'isolement et la différenciation des entérobactéries pathogène, utilisée dans les analyses d'hygiène alimentaire et analyses médicales [09], (Dolarras., 2007).

##### La gélose nutritive :

Ou gélose nutritive ordinaire (GNO) ou encore *gélose ordinaire* est un milieu d'isolement non-sélectif. Elle constitue un excellent milieu de culture, utilisée en bactériologie médicale, elle permet le développement de la plupart des microorganismes. parmi ces microorganismes : *Pseudomonas aeruginosa*(bactérie non exigeante) qui conduit à un virage de couleur du milieu vers le bleu-vert (Dolarras., 2007).

### ✚ Chapman :

Est un milieu de culture destiné à l'isolement et à la différenciation des staphylocoques à partir de prélèvement biologique en bactériologie médicale. La croissance sur ce milieu permet d'étudier la fermentation du mannitol par virage de l'indicateur coloré (Dolarras., 2007).

### ❖ Technique d'ensemencement des milieux d'isolement:

La technique d'ensemencement pratiquée sur les différents milieux de culture est celle des stries transversales :

- Diviser le fond des boîtes de Pétri en quatre cadrant et les numéroter de I à IV.
- Couler les différents milieux de culture utilisés dans ces boîtes (milieu en surfusion : fondue et refroidie à 45°C) et laisser solidifier sur paillasse.
- Préparer des cultures bactériennes denses (suspension de chaque espèce).
- Déposer une goutte de la suspension bactérienne à étudier sur le milieu de culture approprié, près du bord de la boîte dans le cadrant I.
- Effectuer à l'aide d'une anse de platine des stries serrées sur les cadrants I et II. Recommencer des stries perpendiculairement aux précédentes sur les cadrants II et III, puis encore perpendiculairement aux dernière sur les cadrants III et IV (Dolarras., 2007).

### 3.1.3. Identification morphologique:

#### ➤ Examen macroscopique :

L'identification des germes est basée sur l'observation de l'aspect macroscopique des colonies obtenues à partir des différents milieux d'isolement (la taille, la forme, la couleur, la consistance, l'opacité, l'allure du contour) (Dolarras., 2007).

- *E.coli* donne des colonies saumonées, arrondies, lisses, bombées, à bords réguliers, très solubles dans le liquide, de 2 à 3 mm de diamètre sur Hektoen [9], (Clave., 2012).
- *Pseudomonas aeruginosa* donne des colonies transparentes arrondies, lisses, avec virage du couleur du milieu GN vers le bleu-vert (Khalilzadah.,2009).
- *Staphylococcus aureus* donne des colonies petites, lisses, légèrement bombées à contours réguliers, souvent pigmentées et entourées d'une auréole jaune sur Chapman ; la plupart des souches de *S. aureus* fermentent le mannitol et font virer le milieu du rouge au jaune orangé (Dolarras., 2007).

➤ **Examen microscopique :**

Il est basé sur l'observation microscopique qui permet de faire une étude morphologique des cellules d'une espèce microbienne.

À partir des colonies suspectes sur les différents milieux gélosés on réalise :

• **Examen à l'état frais :**

✓ **Intérêt :**

-Il permet l'observation des bactéries vivantes et la détermination de leur morphologie, de leur mode de regroupement, et de leur mobilité (Aouissi., 2010).

✓ **Technique :**

- Déposer aseptiquement sur une lame porte objet propre une goutte d'eau physiologique.
- Prélever à l'aide d'une anse de platine stérile une colonie à partir du milieu gélosé, la dissocier dans la goutte d'eau, puis recouvrir d'une lamelle en évitant la formation des bulles d'air.
- Observer à l'objectif x10 puis x40 (Aouissi.,2010) .

• **Coloration de Gram :**

❖ **Intérêt :**

Cette technique permet non seulement d'observer la forme des cellules mais aussi de différencier entre deux grands groupes taxonomiques différents : les bactéries Gram positives qui retiennent le colorant basique utilisé (cristal-violet) après lavage à l'alcool (la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool et le cytoplasme demeure coloré en violet) et les bactéries Gram négatives qui ne le retiennent pas (la paroi riche en lipides laisse passer l'alcool qui décolore le cytoplasme) (Amira., 2008).

❖ **Technique :**

✓ **Préparation du frottis bactérien :**

- Préparer la lame et l'échantillon comme pour un état frais.
- Étaler la suspension bactérienne en un film mince et régulier sur la lame avec une anse de platine par un mouvement circulaire (étalement de 2 à 3 cm de diamètre).
- Laisser évaporer à sec soit à l'air libre, soit en tenant la lame bien au-dessus de la flamme, le frottis doit devenir terne mais ne doit ni brunir, ni brûler.

- ✓ **Coloration simple** : Recouvrir le frottis par le violet de Gentiane ; laisser agir une minute.
- ✓ **Fixation et mordantage** : Verser le lugol et le laisser agir pendant une minute.
- ✓ **Décoloration** : Laver la lame avec l'alcool éthylique jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis puis rincer à l'eau distillée.
- ✓ **Recoloration** : verser quelques gouttes de Fuchsine basique et laisser agir pendant 30 secondes, Rincer à l'eau distillée.
- ✓ **Séchage** : laisser la lame sécher puis ajouter une petite goutte d'huile de cèdre et examiner avec un microscope optique à l'objectif à immersion ( grossissement x 100) (Amira., 2008).

#### 3.1.4.Étude des caractères biochimiques :

##### a. *Escherichia coli* :

###### ➤ **Les enzymes respiratoires** : (Tableau 8)

###### ❖ **Test Oxydase** :

Ce test est la base de l'identification des bactéries Gram (-) et permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N diméthyle paraphénylènediamine [13].

###### ❖ **Test nitrate réductase** :

En l'absence d'oxygène, certaines bactéries peuvent obtenir leur énergie par respiration anaérobie. Cette respiration anaérobie est liée à l'activité d'enzymes localisées dans la membrane plasmique bactérienne [13].

**Tableau 08:** Recherche des enzymes respiratoire.

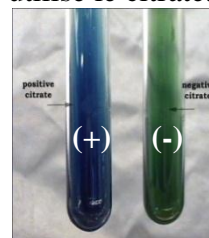
Tests	Caractères recherchés	Techniques	Résultats et aspect des tests	Références
<b>Test Oxydase</b>	<b>Enzyme :</b> -La phénylène diamine oxydase	-déposer le disque d'oxydase sur une lame propre, l'humidifier avec deux gouttes d'eau distilléestérile et écraser la colonie testée sur le disque.	<b>Résultat positif:</b> colonie prend une couleur violette. <b>Résultat négatif :</b> la colonie reste incolore, donc absence d'enzyme recherché.	[13], (Boudraa et <i>al.</i> , 2011).
<b>Test nitrate réductase</b>	<b>Enzyme :</b> nitrate réductase	- La recherche va s'effectuer : soit à partir de bouillon nitraté, soit à partir de la cupule Glu (galerie API 20E).  - Après culture des milieux, ajouter à la surface du milieu 3 gouttes d'acidesulfanilique puis 3 gouttes d'alpha naphtylamine.  -Mélanger et observer.	Le milieu devient rouge : présence de nitrites. Donc la bactérie possède un nitrate réductase ; Résultat : NR(+)  Pas de coloration : La bactérie ne possède pas cette enzyme ; Résultat : NR(-).	[13], (Boudraa et <i>al.</i> , 2011).

➤ **Études des caractères biochimiques :**


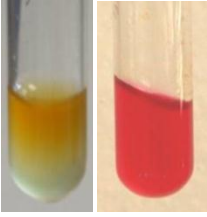
Certaines souches d'*E.coli* (*E1*, *E2*, *E3*) ont été identifiées par la réalisation des tests biochimiques classiques ; ces tests sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau 09** : Tests biochimiques utilisés pour l'identification d'*Escherichia coli*

Tests	Caractères recherchés	Techniques	Lecture/Résultats	Références
Fermentation des sucres avec ou sans gaz + Production d'H <sub>2</sub> S.	-Utilisation du glucose, du saccharose, et du lactose.  -Production d'H <sub>2</sub> S.  - Production du gaz.	-Ensemencer abondamment la surface de la gélose TSI par des stries serrées, puis le culot par simple pique. -Mettre à l'étuve à 37°C pendant 24h	-Virage de la couleur vers le jaune : <i>pente</i> : glucose et saccharose positif ; <i>culot</i> : lactose(+) -Formation des taches noires : production d'H <sub>2</sub> S. -La présence des bulles de gaz dans le culot, parfois même une surélévation de la gélose signifie la production de gaz.	(Guiraud., 2005), [14]
Citrate de Simmons	-Utilisation de citrate comme unique source de carbone	-L'ensemencement de la pente du milieu Citrate de Simmons se fait par une strie longitudinal au fil droit, à partir d'une suspension bactérienne.  -Incuber à 37°C pendant 24h voire 3 à 4 j.	-Virage de la couleur du milieu vers le bleu (alcalinisation de milieu) ; résultat positif : la bactérie utilise le citrate.	[14], (Arlet et Champs., 2009; Boudraa et al., 2011).



## Suite de tableau 09 :

Tests	Caractères recherchés	Techniques	Lecture/Résultats	Références
<b>VP (Voges-Proskauer)</b>	- la production de l'acétoïne = acétylméthylcarbinol : est un produit intermédiaire de la fermentation butanediolique synthétisé par <u>décarboxylation</u> de l'acétoacétate puis réduit grâce au NADH en 2,3-butanediol.	-Ensemencer largement le milieu Clark et Lubs. -Incuber à 37°C pendant 24h. <b>Après culture :</b> -Ajouter 2 à 3 gouttes de VPI (Alpha-naphtol) et attendre 10 min puis ajouter 2 à 3 gouttes de VPII (Hydroxyde de potassium).	-Milieu rouge : VP(+) -Milieu jaune : VP(-) 	[13, 15], (Boudraa et al., 2011 ; (Meziani., 2012),
<b>RM (rouge de méthyle)</b>	- Mise en évidence de la voie de fermentation des acides mixtes.	-Ensemencer largement le milieu Clark et Lubs. -Incuber à 37°C pendant 24h. <b>Après culture :</b> -Ajouter 2 à 3 gouttes de rouge de méthyle. La lecture est immédiate.	-Milieu rouge : RM(+) -Milieu jaune : RM(-) 	[13]
<b>Mannitol mobilité</b>	-fermentation du Mannitol. -Mobilité.	-Ensemencer le milieu Mannitol-Mobilité par piqure centrale à l'aide d'un fil droit. -Incuber à 37°C 24h.	- <b>Caractère mannitol :</b> Apparition de couleur jaune : fermentation du mannitol - <b>La mobilité :</b> Les bactéries très mobiles peuvent se déplacer dans la gélose molle (formation d'un voile autour de la piqure).	(Boudraa et al., 2011)



Suite tableau 09:

Tests	Caractères recherchés	Techniques	Lecture/Résultats	Références
<p><b>Dégradation de l'urée</b></p> <p><b>Formation d'Indole</b></p> <p><b>TDA (désamination)</b></p>	<p><b>- Uréase:</b> -Enzyme hydrolysant l'urée, activité directement détectable par le suivi de l'alcalinisation.</p> <p><b>-Indole :</b> est le métabolite terminal de la dégradation du tryptophane présent dans le milieu grâce à l'activité de la tryptophanase de la bactérie</p> <p><b>TDA :</b> -Le tryptophane désaminase.</p>	<p>-Ensemencer largement le milieu Urée-indole.</p> <p>-Incuber à 37°C pendant 24h.</p> <p>-Après incubation on ajoute à la culture le réactif de Kovacs pour la lecture du test indole.</p> <p>-Ajouter 2 ou 3 gouttes du réactif de TDA pour la recherche de TDA.</p>	<p><b>-Uréase(+):</b> Apparition de couleur rose.</p> <p><b>-Indole(+):</b> Apparition d'un anneau rouge à la surface (le diméthyle amino-4-benzaldéhyde contenu dans le réactif de Kovacs réagit avec l'indole produit par l'activité de la tryptophanase et forme un composé coloré en rouge).</p> <p><b>TDA(+):</b> Obtention d'un précipité brun foncé (production de l'acide indole-3-pyruvique qui donne une couleur brune en présence de perchlorure de fer)</p> <p><b>TDA (-):</b> Absence de précipité.</p>	<p>[13], (Meziani., 2012 ; Boudraa et al., 2011).</p>

Suite du tableau 09 :

Tests	Caractères recherchés	Techniques	Lecture/Résultats	Références
<b>ONPG</b> (orthonitroph-énylgalactopyranoside)	<b>β -galactosidase :</b> une Hydrolase capable d'hydrolyser la liaison osidique en donnant le galactose et le glucose.	-réaliser une suspension épaisse des bactéries testées en eau distillée. - Ajouter avec une pince flambée et refroidie un disque d'ONPG. - incuber à 37°C Pendant 30 min.	<b>-ONPG (+) :</b> Milieu de couleur jaune <b>- ONPG (-) :</b> Milieu sans couleur	[13], (Meziani., 2012).

❖ Les souches : *E4, E5, E6, E7* ont été identifiées par la galerie API 20 E.

➤ **La galerie miniaturisée API 20 E :**

La galerie AP 20E (Fig.06) est une version miniaturisée des tests biochimiques classiques destinée à l'identification des *Enterobacteriaceae*, comprenant 20 tests biochimiques miniaturisés [16].



Cupule      Microtube contenant le milieu déshydraté

**Figure 06 :** La plaque de la galerie API 20 E [16].

❖ **Principe :**

La galerie API 20E comporte 20 micro- tubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture, et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

**❖ Mode opératoire :**

L'opération s'effectue selon les étapes suivantes :

- ✓ Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- ✓ Remplir tubes et cupules des tests : CIT, VP, GEL, avec la suspension bactérienne.
- ✓ Remplir uniquement les tubes et non les cupules des autres tests.
- ✓ Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H<sub>2</sub>S en remplissant leurs cupules avec l'huile de paraffine.
- ✓ Refermer la boîte d'incubation, coder et placer à 37°C pendant 18-24 h (Djebbari et *al.*, 2009).

**❖ Lecture :**

Noter sur la fiche de résultat toutes réactions spontanées. Si le glucose est positif et/ou si trois tests ou plus sont positifs, révéler les tests nécessitant l'addition de réactif :

- ✓ **Test VP :** ajouter une goutte de réactif VP1 et VP2. Attendre au minimum 10 min. une couleur rose franche ou rouge indique une réaction positive.
- ✓ **Test TDA :** ajouter une goutte de réactif TDA. Une couleur marron foncée indique une réaction positive.
- ✓ **Test IND :** ajouter une goutte de réactif de Kowacs. Un anneau rouge obtenue en 2 min indique une réaction positive (Dolarras., 2007).

Comparer les réactions obtenues avec celle du tableau de lecture (Annexe 02)

**❖ Identification :**

- ✓ Sur la fiche de résultats, les tests sont en groupe de 3, et une valeur (1,2 ou 4) est indiquée pour chacun. Additionner à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondants aux tests positifs. On obtient un nombre de 7 chiffres qui sert de code d'identification.
- ✓ Chercher le code numérique obtenu dans le catalogue analytique de l'API 20 E ou avec le logiciel d'identification afin de connaître le nom de l'espèce identifiée (Djebbari et *al.*, 2009).

**b. *Pseudomonas aeruginosa* :**

L'identification biochimique des *Pseudomonas aeruginosa* a été réalisée par la galerie classique dont les tests d'identifications sont réalisés comme ceux déjà effectués pour *E.coli*. D'autres tests ont été effectués dans le but d'identifier précisément les souches de *P.aeruginosa* :

**+ Recherche des pigments spécifiques (pyocyanine et pyoverdine):****• Principe :**

- la production de la pyocyanine, due spécifiquement à *Pseudomonas aeruginosa*, est favorisée par la présence d'ions inorganiques. La recherche de la production de la pyocyanine est effectuée sur le milieu King A.
- la production de pyoverdine, est favorisée par une teneur élevée en phosphate. La recherche de la production de ce pigment est effectuée sur le milieu King B [17].

**• Technique :**

- A l'aide d'une anse de platine, ensemençer les deux milieux King A et King B avec une suspension bactérienne, en faisant une strie médiane à la surface de la gélose.
- Fermer les tubes sans sérer et incuber à 37°C pendant 24 à 48h (Benslim et Mouhoub., 2007).

**• Lecture :**

- Couleur bleue sur le milieu King A : présence de pyocyanine.
- Couleur jaune-vert fluorescent sur le milieu King B sous UV : présence de pyoverdine (Dolarras., 2007 ; Benslim et Mouhoub., 2007), [13].

**Remarque :** En cas de doute pour la production de la pyocyanine, verser 0.5 ml de chloroforme à la surface de la culture sur le King A et laisser les tubes inclinés pendant 10 à 15 minutes. La pyocyanine est soluble dans le chloroforme coloré celui-ci en bleu (Guiraud., 2005).

**+ L'étude du type respiratoire :****• Technique :**

Ensemencer le milieu viande-foie par piqure centrale à l'aide d'un fil droit, puis incuber à 30°C pendant 24h [13].

- **Lecture :**

Présence d'une culture se forme d'anneau à la surface du milieu indique que la bactérie est aérobie stricte [17].

- ✚ **Test d'halophilie :**

- **Technique :**

Ensemencer une gélose nutritive à 10% NaCl par piqure centrale à l'aide d'un fil droit, puis incubé à 30°C pendant 24h (Guiraud., 2005).

- **Lecture :**

La présence d'une culture sur le long de la piqure indique que la bactérie est halophile (Guiraud., 2005).

- ✚ **Culture à différentes température (4°C et à 41°C):**

- **Technique :**

- Ensemencer des tubes contenant 5 ml de bouillon nutritif par la suspension bactérienne de la souche étudiée.

Les tubes sont ensuite incubés à 4 C° et à 41 C° pendant 24 heures à 48h (Guiraud, 2005).

- **Lecture :**

*Pseudomonas aeruginosa* est capable de se développer à 41°C et incapable à 4°C (Le Minor et Véron.,1984).

**c. *Staphylococcus aureus* :**

- ❖ **Test Catalase :**

La catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée en eau et oxygène libre qui se dégage sous forme gazeux selon la réaction suivante :  $2 \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ .

Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram (+) [13].

- **Technique :**

Sur une lame propre et sèche déposer une goutte d'eau oxygénée, à l'aide d'une pipette Pasteur ; ajouter l'inoculum, observer immédiatement.

➤ **Lecture :**

Résultat positive : apparition des bulles, dégagement gazeux d'O<sub>2</sub>.

Résultat négatif : absence des bulles de gaz [13].

✚ **La recherche de la Staphylocoagulase :**• **Principe :**

La coagulase libre est une enzyme libérée dans le milieu au cours de la culture par *Staphylococcus aureus*. Cette enzyme est capable in vitro de coaguler le plasma de lapin. Sa mise en évidence permet seule, d'affirmer la présence de *S. aureus* [13].



• **Technique :**

Dans un tube à hémolyse stérile, introduire 0,5 ml de plasma oxalaté + 0,5 ml d'une culture de 18 heures de la souche à étudier. Placer le mélange à 37°C. Des lectures doivent être effectuées toutes les heures au moins pendant les cinq premières heures [13].

• **Lecture :**

La lecture de ce test est représentée dans le tableau suivant :

**Tableau 10 :** Résultats du test Staphylocoagulase [13].

	
Coagulation du plasma → Coagulase (+) → <i>Staphylococcus aureus</i>	Pas de coagulation du plasma → Coagulase (-) → autres espèces de Staphylocoques.

✚ **Étude des caractères biochimiques :**

Afin d'étudier les caractères biochimiques de la souche S1, nous avons utilisé la galerie miniaturisée API Staph.

❖ **Utilisation de l'API Staph :**

- ✓ **La préparation de la galerie** est identique à celle de l'API 20E.
- ✓ **La préparation de l'inoculum :**

- Prélever à l'aide d'une anse de platine une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé (Chapman).
- ✓ Faire une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans une ampoule API Staph Medium (Djebbari et *al.*, 2009).
- ✓ **Inoculation de la galerie :**
  - Introduire la suspension dans les tubes de la galerie en évitant la formation des bulles.
  - Pour les caractères ADH, URE, remplir les cupules d'huile de paraffine.
- ✓ Refermer la boîte et incuber à 37°C pendant 24 heures (Djebbari et *al.*, 2009).
- ✓ **Lecture de la galerie API Staph :**
  - Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture (Annexe 02) après addition de réactifs aux tests suivants :
    - Test VP :** ajouter une goutte de réactif VP1 et VP2. Attendre au minimum 10 min. Une couleur violette ou rose indique une réaction positive.
    - Test NIT :** ajouter une goutte de réactif NIT1 et NIT2. Attendre au minimum 10 min. une couleur rouge indique une réaction positive.
    - Test PAL (phosphatase alcaline) :** ajouter une goutte de réactif ZIM A et ZIM B. Attendre au minimum 10 min. Une couleur violet indique une réaction positive (Dolarras., 2007).
- ❖ **Identification :**
  - La détermination du code numérique sur la fiche de résultats est obtenue par la même méthode décrite pour l'API 20 E.
  - Chercher le code numérique obtenu dans le catalogue analytique de l'API Staph ou avec le logiciel d'identification afin de connaître le nom de l'espèce identifiée.

### 3.2. Conservation des souches:

Après identification précise des souches, elles ont été conservées en utilisant deux méthodes (Guiraud, 2005) :

- A la température ambiante, par ensemencement par stries sur la gélose nutritive (pour *E.coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) et la gélose Chapman (pour *S.aureus*) inclinées en tubes ; en faisant des repiquages chaque mois.
- Au congélateur, après culture dans un bouillon nutritif contenant 10 % de glycérol.

### 3.3. Étude de la sensibilité aux Antibiotiques :

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques (Antibiogramme) a été réalisée par la méthode classique de diffusion des disques d'antibiotiques en milieu Mueller-Hinton selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2013).

#### 3.3.1. Technique de l'antibiogramme:

- **Préparation de l'inoculum :**

- A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'un écouvillon quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Bien décharger l'écouvillon dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Ferland (Meziani., 2012),

- **Ensemencement de la gélose de l'antibiogramme:**

La gélose utilisée est la gélose Mueller Hinton (MH), son ensemencement a été effectué dans les 15 minutes qui ont suivi la préparation de l'inoculum selon les étapes suivantes :

- Couler la gélose MH en boîtes de Pétri ; Laisser sécher et solidifier avant utilisation.
- Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum préparé.
- L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la gélose de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération 2 fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon par la périphérie de la gélose (Courvalin et Leclercq., 2012), (Meziani., 2012).

- **Les antibiotiques testés :**

Les antibiotiques qui ont été testés pour chaque souche bactérienne étudiée sont représentés, dans les tableaux 11,12, 13.

- **Application des disques d'antibiotiques :**

les disques sont déposés sur la gélose à l'aide d'une pince flambée, en appuyant doucement sur chaque disque pour assurer un contact uniforme avec le milieu.



- Les boîtes sont ensuite laissées à la température ambiante pendant 30 minutes sur la paillasse pour permettre la diffusion de l'antibiotique dans la gélose (Courvalin et Leclerq., 2012 ; Meziani., 2012).
- **Incubation :**  
L'incubation s'est faite à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures (Courvalin et Leclerq., 2012 ; Meziani., 2012).
- **Lecture interprétative :**  
Les diamètres d'inhibition autour des disques sont mesurés puis ils sont comparés aux diamètres critiques conformément aux normes CASFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société française de Microbiologie). Il convient de noter toutefois, qu'une souche dont la sensibilité aux antibiotiques est ainsi évaluée peut être déclarée sensible, intermédiaire ou résistante (Courvalin et Leclerq., 2012 ; Meziani., 2012).

**Remarque :** afin de vérifier la qualité de la gélose MH et des disques d'antibiotiques, des souches de références ont été utilisées (CA-SFM, 2013):

- Pour les souches d'*E.coli* : la souche de référence utilisée est *E.coli* ATCC 25922 ;
- Pour *Pseudomonas aeruginosa* : la souche de référence utilisée est *P.aeruginosa* ATCC 27853,
- Pour *Staphylococcus aureus* : la souche de référence utilisée est *S.aureus* ATCC 25923 (Annexe 02).

**Tableau 11:** Concentrations, diamètres critiques pour l'appréciation de la sensibilité/Résistance des antibiotiques à tester pour *Escherichia coli* (CA-SFM, 2013).

Antibiotique	Classe	Famille	Code	Charge Du disque	Diamètres critiques (mm)	
					S	R
Ticarcilline	Penicilline	β-lactamine	TI	75 µg	≥ 24	< 22
Imipenème	Carbapenemes		IPM	10 µg	≥ 24	< 17
Tétracycline	Tétracycline	Tétracycline	TE	30 UI	≥ 19	< 17
Chloramphénicol	Phénicoles	Phénicoles	C	30 µg	≥ 23	< 23
Nitrofurane	Nitrofuranes	Nitrofurane	NIT	300 µg	≥ 15	< 15
Ciprofloxacine	Fluoroquinolone	Quinolones	CIP	5 µg	≥ 25	< 22

**Tableau 12:** Concentrations, diamètres critiques pour l'appréciation de la sensibilité/Résistance des antibiotiques à tester pour *Pseudomonas aeruginosa* (CA-SFM, 2013).

Antibiotique	Classe	Famille	Code	Charge Du disque	Diamètres critiques (mm)	
					S	R
Ticarcilline	Penicilline	β-lactamine	TI	75 µg	≥ 22	< 22
Imipénème	Carbapenemes		IPM	10 µg	≥ 22	< 17
Ciprofloxacine	Fluoroquinolone	Quinolones	CIP	5 µg	≥ 25	< 22
Rifampicine	Divers	Divers	Rif	30 µg	≥ 19	< 14

**Tableau13:** Concentrations, diamètres critiques pour l'appréciation de la sensibilité/Résistance des antibiotiques à tester pour *Staphylococcus aureus* (CA-SFM, 2013).

Antibiotique	Classe	Famille	Code	Charge Du disque	Diamètres critiques (mm)	
					S	R
Pénicilline G	Pénicilline	β-lactame	P	6 µg (10 UI)	≥ 29	< 29
Chloramphénicol	Phénicoles	Phénicoles	C	30 µg	≥ 23	< 23
Tétracycline	Tétracycline	Tétracycline	TE	30 UI	≥ 23	< 21
Rifampicine	Divers	Divers	Rif	30 µg	≥ 29	< 24
Acide fusidique			FC	10 µg	≥ 24	< 24
Vancomycine	Glycopeptide	Glycopeptides	Va	30 µg	≥ 17	-

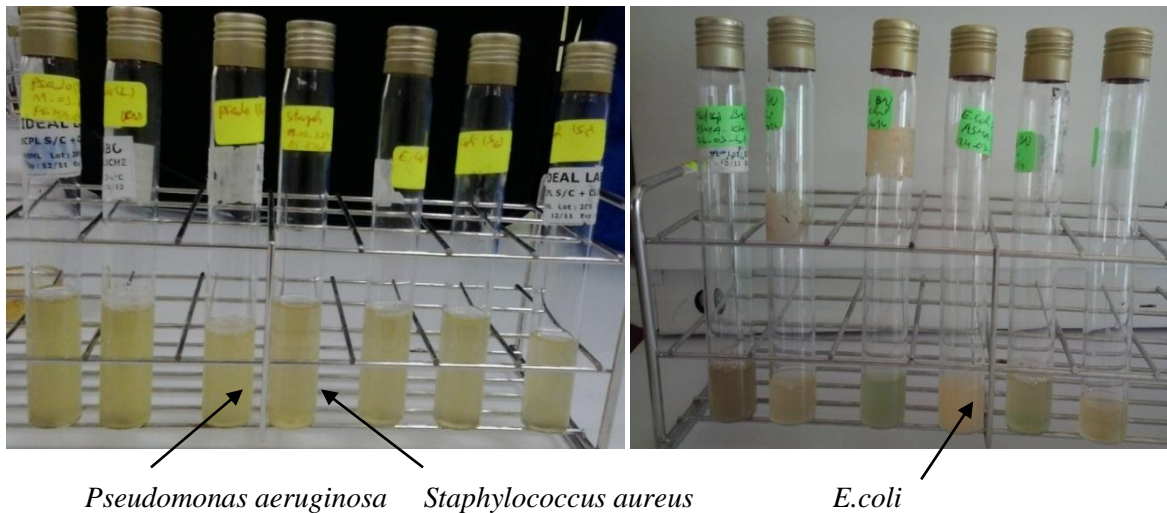
A decorative border resembling a scroll, with a blue outline and grey shading on the top and bottom edges, framing the text.

***Chapitre IV***  
***Résultats et discussion***

## I. Résultats de vérification de la pureté des souches collectées:

### 1. Résultats de la revivification :

Après une durée d'incubation de 48 heures à une température de 37°C, nous avons remarqué l'apparition de trouble au niveau de tous les tubes contenant les milieux de revivification ensemencés par les différentes souches collectées, ce qui signifie la présence d'une croissance bactérienne (fig. 07)



**Figure 07:** Résultats de la revivification des souches bactériennes étudiées.

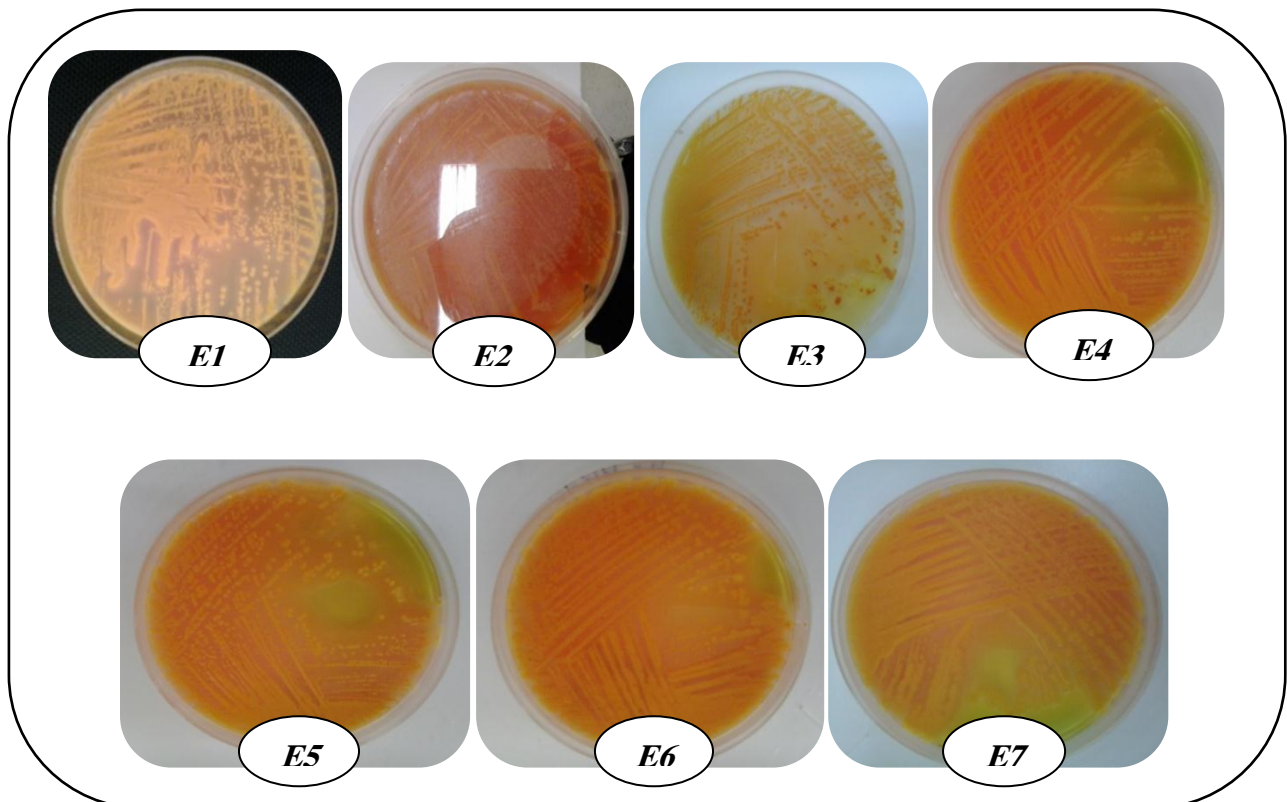
### 2. Résultats d'isolement :

#### 2.1. Aspect macroscopique des colonies :

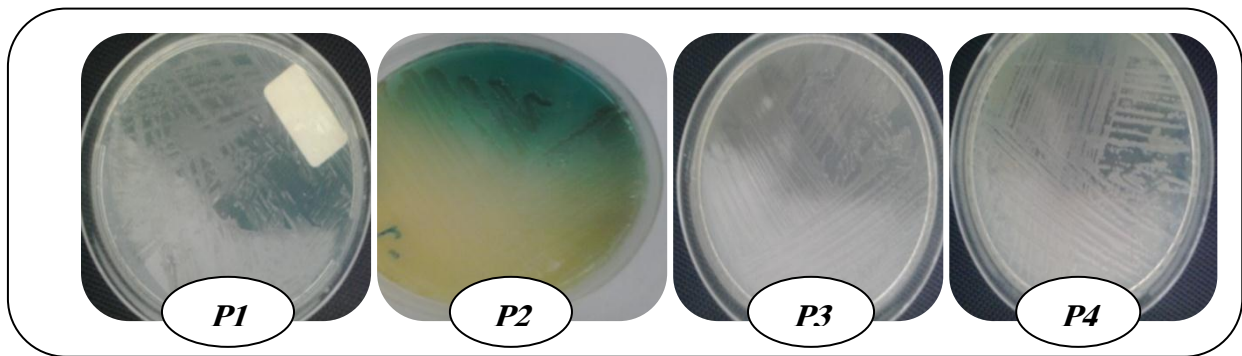
Après un temps d'incubation de 24 à 48 heures à 37°C, l'aspect macroscopique des colonies poussées sur les milieux gélosés utilisés (gélose nutritive, Hektoen et Chapman) est résumé dans le tableau 14.

**Tableau 14 :** Résultats de l'aspect macroscopique des colonies des différentes souches bactériennes étudiées.

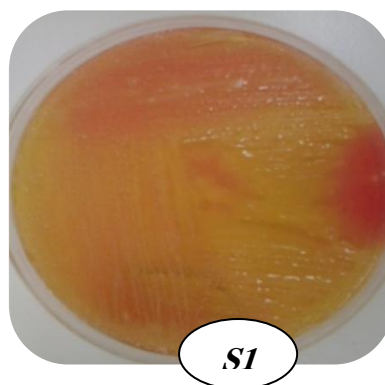
Milieu	Souches	L'aspect des colonies
Hektoen	<i>E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7</i>	Colonies moyennes, saumonées, arrondie, bombées à contours régulier (Fig. 08).
GN	<i>P1, P2, P3, P4</i>	Colonies moyennes, transparentes, arrondies, aplaties et lisses à contours réguliers avec virage de couleur du milieu vers le vert (Fig.09).
Chapman	<i>S1</i>	Petites colonies de couleur jaune (doré), rondes, bombées et lisses à contour régulier, filantes sous l'anse avec un virage de couleur du milieu vers le jaune (Fig.10).



**Figure 08 :** Aspect macroscopique des colonies d'*Escherichia coli* sur la gélose Hektoen.



**Figure 09 :** Aspect macroscopique des colonies de *Pseudomonas aeruginosa* sur GN.



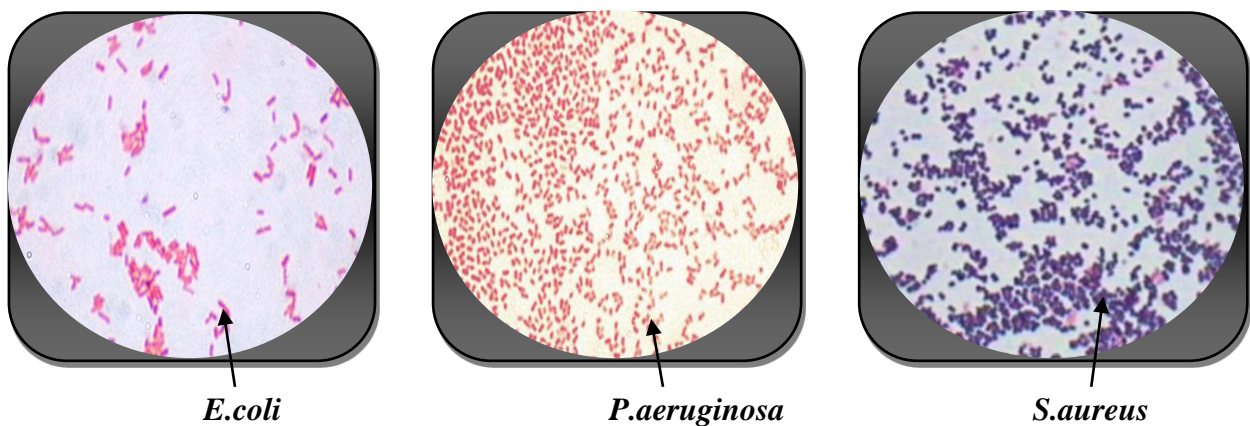
**Figure 10 :** Aspect macroscopique des colonies de *Staphylococcus aureus* sur le milieu Chapman.

### 2.2.Aspect microscopique des colonies :(Fig. 11).

L'examen microscopique (état frais et coloration de Gram) a été fait pour toutes les cultures, les résultats sont représentés dans le tableau 15 :

**Tableau 15 :** Résultats de l'état frais et la coloration de Gram

Milieu	Souches	Aspect microscopique	
		l'état frais	coloration de Gram
Hektoen	<i>E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7</i>	Bacilles fins et allongés, mobiles	Bacilles de couleur rose (Gram négatif).
GN	<i>P1, P2, P3, P4</i>	Bacilles fins, très mobiles	Bacilles de couleur rose (Gram négatif).
Chapman	<i>S1</i>	Cocci en petits amas, en diplocoques ou en très courtes chainettes, immobile.	Cocci de couleur violette (Gram+) regroupés en amas en grappes de raisin.



**Figure 11:** Observation microscopique après coloration de Gram des souches bactériennes étudiées (X100).

### 3. Résultats de l'identification :

#### 3.1. Résultats de la recherche des enzymes respiratoires :(Fig.12).

Les résultats des tests des enzymes respiratoires sont mentionnés dans le tableau 16.

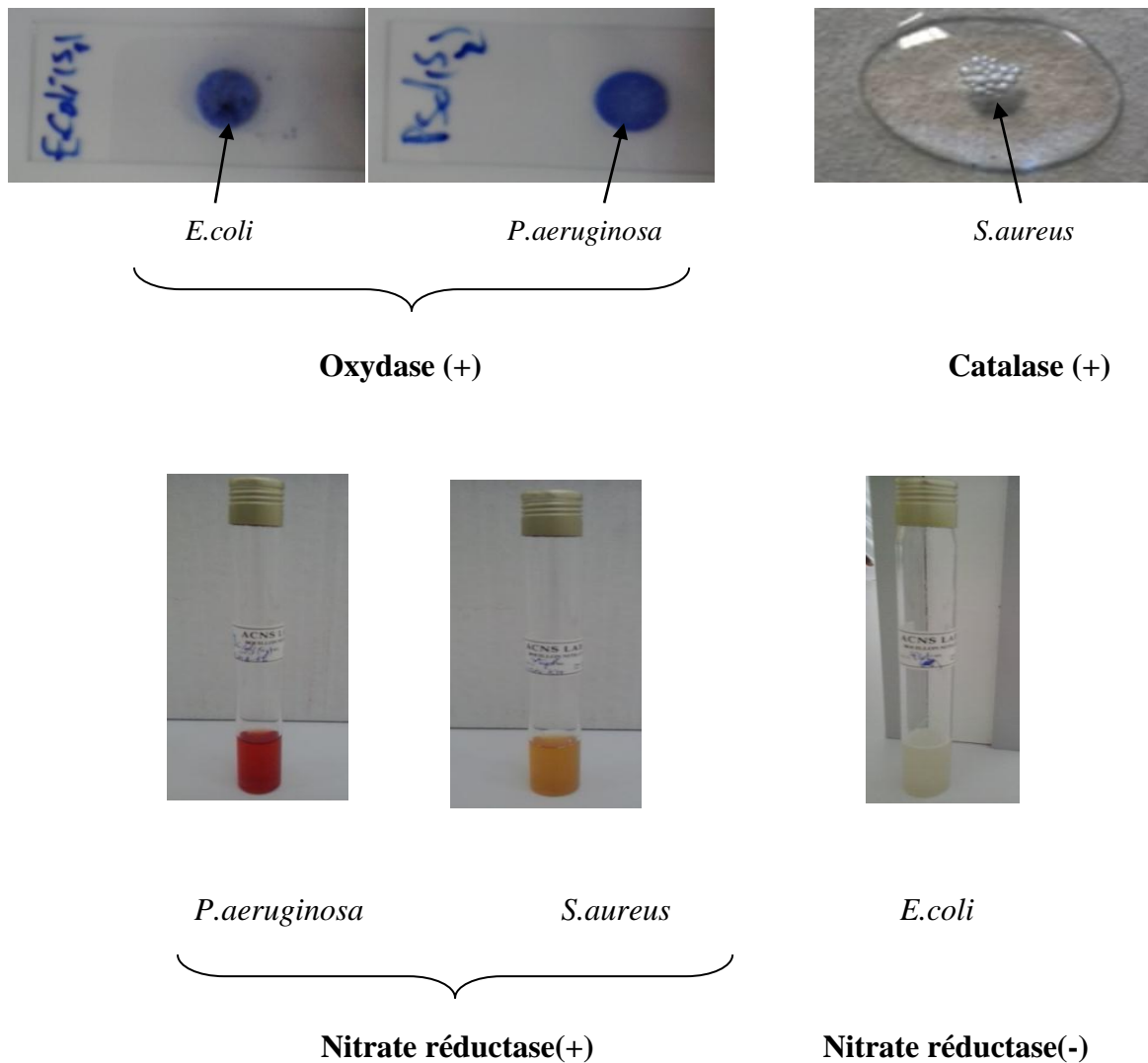
**Tableau 16:** les résultats obtenus à partir des tests des enzymes respiratoires.

Souche	Catalase	Oxydase	Nitrate réductase
<i>E1</i>			
<i>E2</i>			
<i>E3</i>	-	+	-
<i>E4</i>			
<i>E5</i>			
<i>E6</i>			
<i>E7</i>			
<i>P1</i>			
<i>P2</i>	-	+	+
<i>P3</i>			
<i>P4</i>			
<i>S1</i>	+	-	+

(+) : Résultat positive

(-) : Résultat négative





**Figure 12:** Résultat de la recherche des enzymes respiratoires.

### 3.2. Résultats de l'identification biochimique :

#### 3.2.1. Résultats des tests biochimiques des souches d'*Escherichia coli*:

- ❖ Nous avons identifiés trois souches d'*E. coli* (*E1*, *E2* et *E3*) par la galerie biochimique classique, les résultats sont regroupés dans le tableau 17:

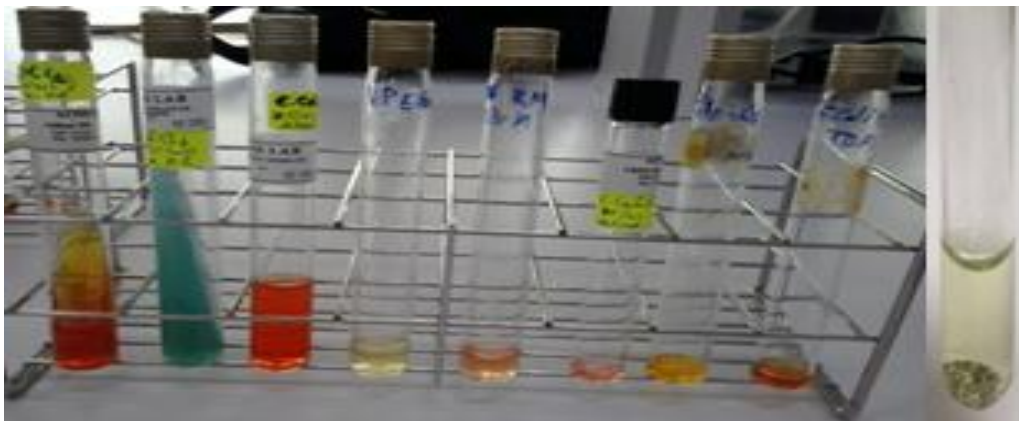


**Tableau 17:** Résultats des tests biochimiques classiques.

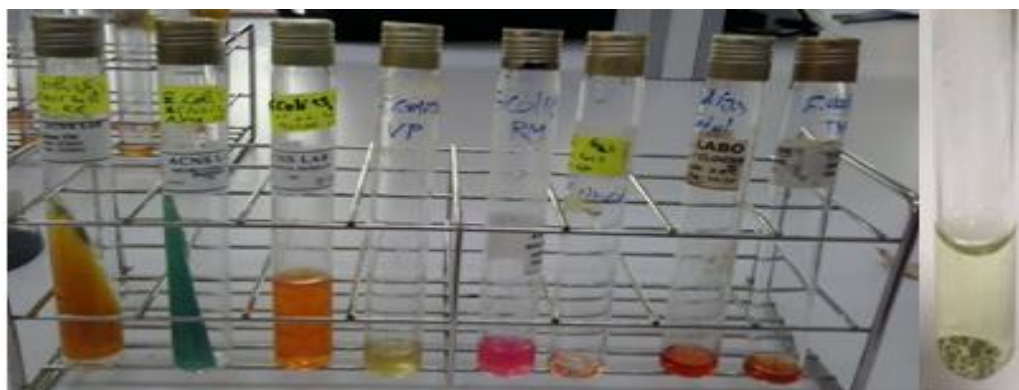
	TSI					Citrates de Simmons	Mannitol mobilité		Urée indole			Clark et Lubs		ONPG
	H <sub>2</sub> S	Gaz	GLU	Sac	Lac		MAN	MOB	URE	IND	TDA	VP	RM	
<b>E1</b> (Fig.13).	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
<b>E2</b> (Fig.14).	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
<b>E3</b> (Fig.15).	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+

(+) : Résultat positive

(-) : Résultat négative



**Figure 13:** Résultats des tests biochimiques classiques de la souche *E1*.



**Figure 14 :** Résultats des tests biochimiques classiques de la souche *E2*



**Figure 15:** Résultats des tests biochimiques classiques de la souche *E3*

❖ Les souches *E4*, *E5*, *E6* et *E7* ont été identifiés par l'API 20E.



**Figure 16 :** Profil biochimique de la souche *E4*.



**Figure 17 :** Profil biochimique de la souche *E5*.



**Figure 18 :** Profil biochimique de la souche *E6*.



Figure 19 : Profil biochimique de la souche E7.

**3.2.2. Résultats des tests d'identification des souches de *Pseudomonas aeruginosa* :**

Les résultats des différents tests effectués sur les *P.aeruginosa* (Fig.20) sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 18 : Résultats des tests d'identification des *Pseudomonas aeruginosa*.

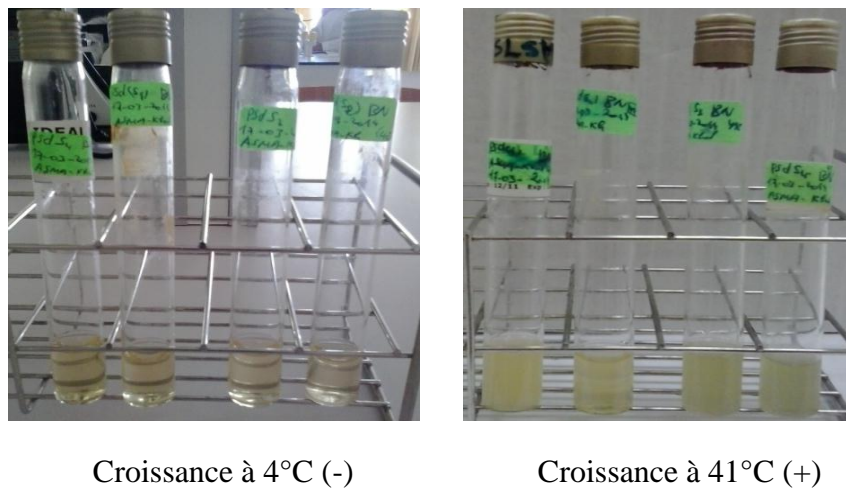
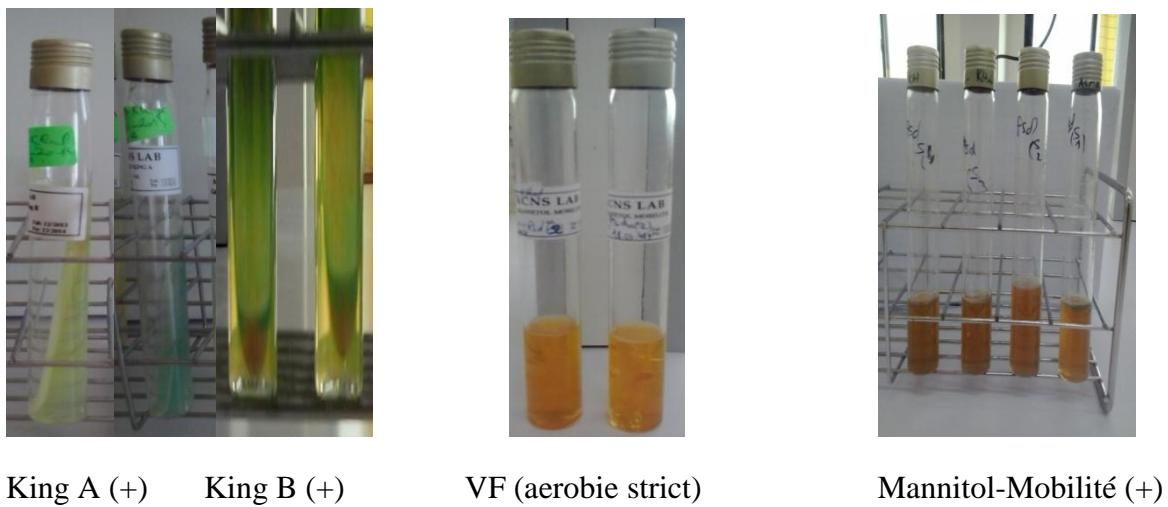
test S	Pigments		Type respiratoire	Halophilie	Mannitol	Mobilité	T°	
	King A	King B	Viande-Foie	GN à 10%NaCl	Mannitol	Mobilité	4°C	41°C
<b>P1</b>	Culture avec diffusion d'une couleur bleue (pyocyanine)	Culture avec diffusion d'une couleur verte (pyoverdine)	aérobie stricte	-	+	+	-	+
<b>P2</b>	Culture avec diffusion d'une couleur bleue (pyocyanine)	Culture avec diffusion d'une couleur verte (pyoverdine)	aérobie stricte	-	+	+	-	+
<b>P3</b>	Culture avec diffusion d'une couleur bleue(pyocyanine)	Culture avec diffusion d'une couleur verte (pyoverdine)	aérobie stricte	-	+	+	-	+
<b>P4</b>	Culture avec diffusion d'une couleur bleue (pyocyanine)	Culture avec diffusion d'une couleur verte (pyoverdine)	aérobie stricte	-	+	+	-	+

S : souche

T° : température

(+) : Résultat positive

(-) : Résultat négative



**Figure 20 :** Résultat des tests d'identification des *Pseudomonas aeruginosa*

**3.2.3. Résultats des tests d'identification de *Staphylococcus aureus* :**

➤ **Résultat du test staphylocoagulase :**

Après un temps d'incubation de 05 heures à 37°C de la souche *S.aureus* nous avons remarqués l'apparition d'un caillot qui est observée en inclinant le tube à 90°C (fig. 21).



**Figure 21 :** Résultat du test staphylocoagulase.

➤ **Résultat de l'API Staph :**

La souche de *S.aureus* a été identifiée par l'API Staph, le résultat est illustré dans la figure ci-dessous :



**Figure 22 :** Profil biochimique de *Staphylococcus aureus*.

**4. Résultats de l'antibiogramme :**

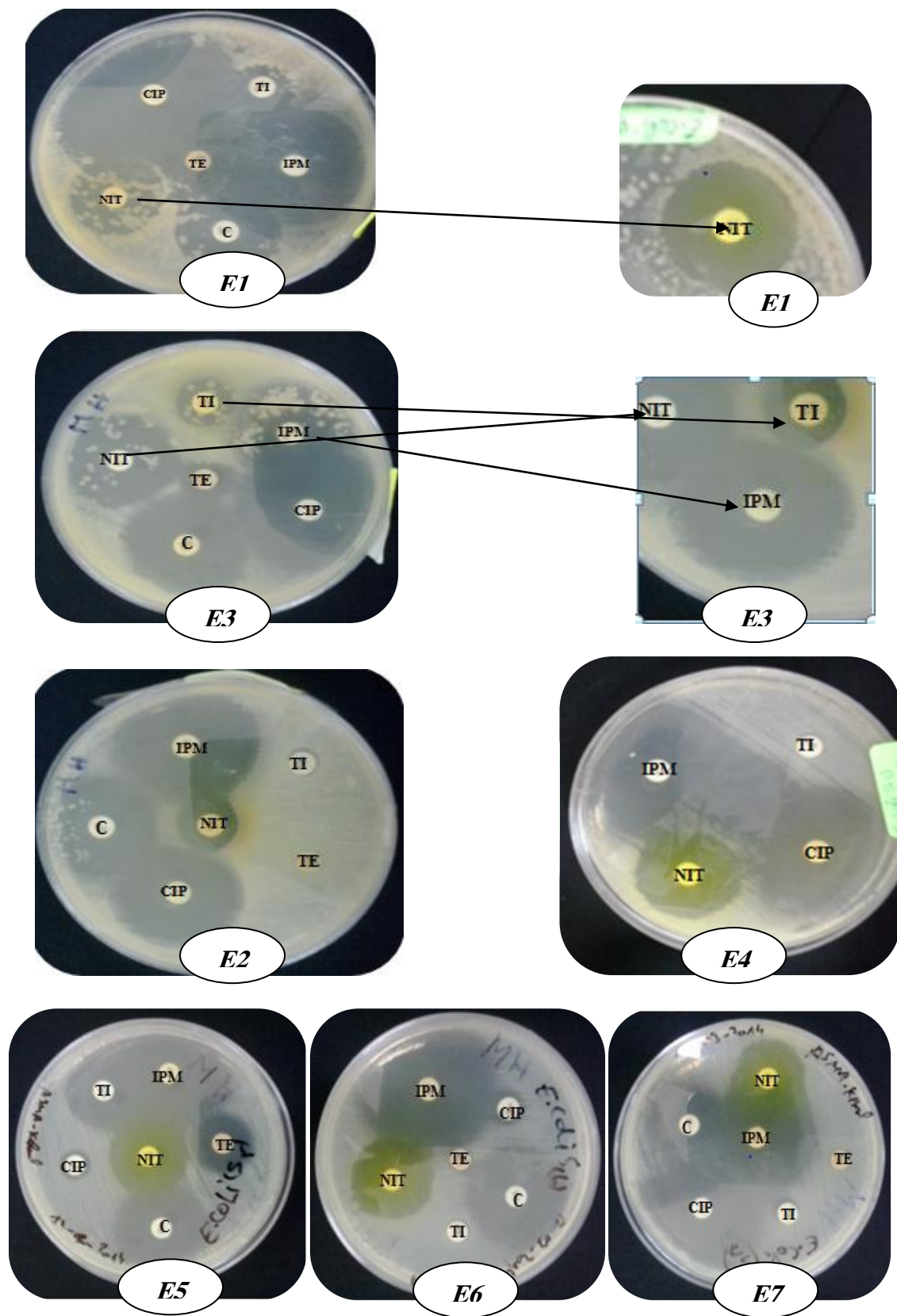
Les résultats de l'antibiogramme (Fig.23) réalisé pour les espèces étudiées sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau 19 :** Résultats de l'antibiogramme.

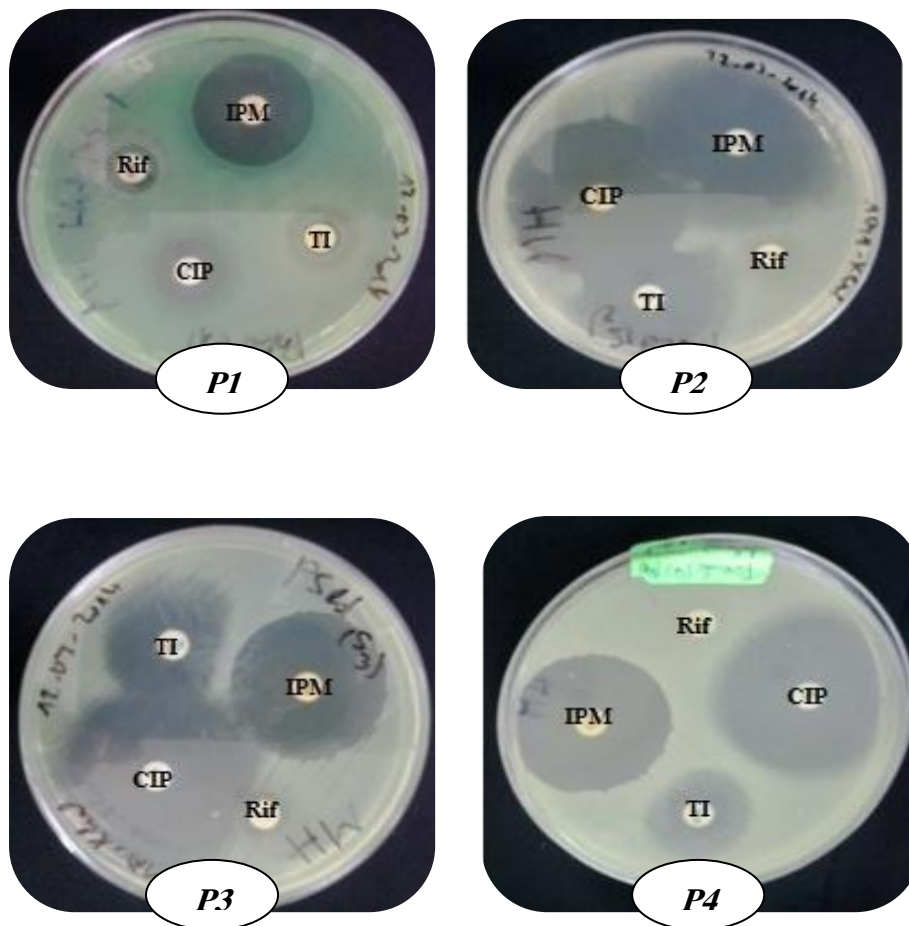
ATB (S)	Imipenème IPM <sub>10</sub>	Ticarcilline TI <sub>75</sub>	Pénicilline G P <sub>10</sub>	Tétracycline TE <sub>30</sub>	Chloramphénicol	Nitrofurane NIT <sub>300</sub>	Ciprofloxacine CIP <sub>5</sub>	Rifampicine Rif <sub>5</sub>	Acide fusidique FC <sub>10</sub>	Vancomycine Va <sub>30</sub>
E1	S	R	-	I	S	S	S	-	-	-
E2	S	R	-	R	S	S	S	-	-	-
E3	S	R	-	R	S	S	S	-	-	-
E4	S	R	-	-	-	S	S	-	-	-
E5	S	S	-	S	R	S	R	-	-	-
E6	S	R	-	R	R	S	R	-	-	-
E7	S	R	-	R	R	S	S	-	-	-
P1	I	R	-	-	-	-	R	R	-	-
P2	S	S	-	-	-	-	S	R	-	-
P3	S	S	-	-	-	-	S	R	-	-
P4	S	S	-	-	-	-	S	R	-	-
S1	I	-	R	R	R	-	-	S	S	S

(S) : souche effectuée    ATB : antibiotique    R : résistant    S : sensible    I : intermédiaire    (-) : non effectuée

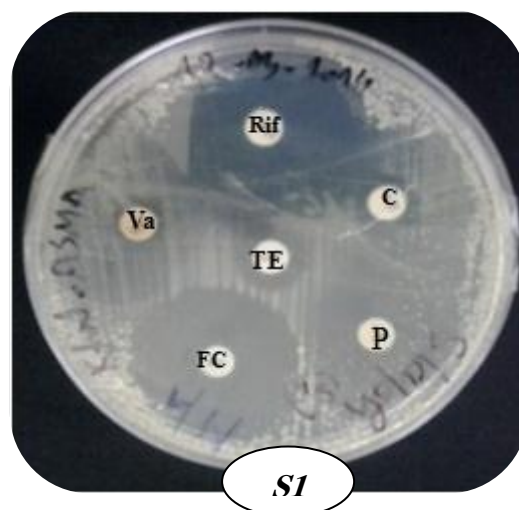




**Figure 23 :** Résultat de l'antibiogramme des différentes souches d'*Escherichia coli*.



**Figure 24 :** Résultat de l'antibiogramme des différentes souches de *Pseudomonas aeruginosa*.



**Figure 25:** Résultat de l'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*.

## II. Discussion :

L'étude de l'antibiorésistance des souches d'*E.coli*, *P.aeruginosa* et *S.aureus* provenant de l'Hôpital Ibn Zohr (Guelma) a été commencée par une revivification suivi d'une identification afin de vérifier la pureté des bactéries collectées et d'obtenir des cultures jeunes nécessaires pour la réalisation de l'antibiogramme.

Les résultats des examens macroscopiques obtenus ont montré que toutes les colonies qui appartiennent au même type d'espèce ont le même aspect sur ses milieux de cultures spécifiques.

La coloration de Gram montre que toutes les souches d'*E.coli* ont la même forme (bacille) et le même type de Gram (-), ainsi que toutes les *P.aeruginosa* sont des bacilles à Gram (-) par contre la souche de *S.aureus* est en forme de coques regroupés en grappe de raisin à Gram (+).

L'identification biochimique des souches étudiées a montré que toutes les souches d'*E.coli* sont mobiles, capable de former l'indole, de dégrader le mannitol et les sucres avec production de gaz. Cette identification nous a permis aussi de remarquer la symétrie des caractères biochimiques de toutes les souches de *P.aeruginosa* qui sont très mobiles, capable de pousser en aérobiose et à 41°C et incapable de croître à 4°C et ils ont leur caractère spécifiques de produire les pigments (pyocyanine et pioverdine). En ce qui concerne la souche de *S.aureus* : elle a deux enzymes principales : l'enzyme qui dégrade l'eau oxygénée (catalase) et la coagulase qui est capable de coaguler le plasma de lapin. Sa mise en évidence permet seule, d'affirmer la présence de *S. aureus* [13].

L'étude de l'antibiorésistance d'*E.coli* a montré que 85.71% des souches sont résistantes à la Ticarcilline, cette résistance est due à une inactivation de cet antibiotique par l'acquisition d'enzyme de bêta-lactamase (Zahar et Moumile., 2013), nous avons remarqué aussi que 80 % des souches sont résistantes à la tétracycline, ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Diallo en France (2013) qui a trouvé 75% des souches d'*E.coli* résistantes à la tétracycline (Diallo., 2013). La résistance des souches testées d'*E.coli* à la tétracycline est expliquée par le mécanisme d'efflux, cette résistance est due au gène *tet* qui génère la résistance de la tétracycline (Rahal., 2013).

Notre étude permet d'observer 50% des souches résistantes au chloramphénicol, ce pourcentage est très inquiétant parce que le Chloramphénicol est un antibiotique qui peut provoquer une aplasie médullaire irréversible (Rahal., 2013). Et il est interdit d'utilisation et



nos résultats signifient que cet antibiotique est encore utilisé. Selon le troisième rapport du réseau Algérien de la surveillance de la résistance aux antibiotiques : 10,24% des *Escherichia coli* sont résistantes au Chloramphénicol (Rahal., 2013).

Un faible pourcentage a été observé pour le Ciprofloxacine (28.57%), cette résistance est presque toujours de valeur chromosomique, il s'agit d'une mutation dont la traduction sera soit une diminution de la perméabilité à l'antibiotique, soit une modification de la cible par altération d'une sous unité de la gyrase (Seck., 2005).

Toutes les souches d'*E.coli* que nous avons étudié sont sensibles au Nitrofurane et l'imipénème. Le nitrofurane agit directement sur l'ADN provoquant diverses lésions (coupure et substitution de bases) (Rahal., 2013). et l'imipénème responsable de l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane de la paroi (Véronique., 2003). Cette sensibilité peut être expliquée par la faible utilisation de ces antibiotiques.

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* sont révélées moins multirésistantes aux  $\beta$ -lactamines que les souches d'*E.coli*. Elle présentent les taux de résistance suivantes : Ticarcilline (25%), Imipénème (25%) ; ces résultats sont similaires à ceux trouvés par Liazid (2012) qui a trouvée un faible taux (estimé par 3.75%) des souches qui ont résistées l'imipénème (Liazid., 2012), cette résistance a été associée à la production de  $\beta$ -lactamases acquises, la surproduction constitutive de la céphalosporinase AmpC ou mécanismes non enzymatiques tels que l'efflux ou l'imperméabilité de la membrane externe (Cavallo et al., 2002).

Nos résultats ont montré que toutes les souches de *P.aeruginosa* sont résistantes à la Rifampicine ceci peut être expliquée par sa forte consommation dans l'hôpital. Le taux de résistance à la ciprofloxacine (25%) a été un peu élevé à celui observé dans une étude réalisée dans le laboratoire « Antibiotiques, Antifongiques » de l'Université Abou Bekr Belkaïd à Tlemcen durant la période 2005-2006 qui était 4,7% (Drissi et al., 2011). Ainsi que les résultats de l'étude de RAHAL en 2013 en Algérie ont montré qu'il ya une augmentation de taux de souches de *P.aeruginosa* résistantes à Cip, ces taux passent de 2002 à 2011 de [1,1% à 10,86%]. Ceci s'explique sans doute par l'utilisation croissante ces dernières années de Ciprofloxacine (Rahal., 2013).

Dans le cas de *S.aureus*, à partir de nos résultats, on a trouvé que cette souche est sensible à la vancomycine cette sensibilité est corroboré par (Pesavento et al., 2007), (Normanno et al., 2007) en Italie et (Vasquez-Sanchez.,2012) en Espagne de ce fait, elle constitue la molécule de choix dans le traitement des infections grave causées par *S.aureus*.

Cette sensibilité due à l'inhibition de la paroi bactérienne en bloquant la polymérisation du peptidoglycane (arrêt de la synthèse de la paroi) (Rahal., 2013). En outre, l'émergence des souches résistantes à la vancomycine a été déjà décrite en milieu hospitalier dans plusieurs pays, particulièrement en Algérie par Rebiahi et *al.* (2011). Notre résultat nous a permis aussi d'observer la sensibilité de *S.aureus* à la rifampicine qui est expliquée par l'inhibition de la transcription de l'ADN en ARN messager (ARNm) par inhibition de l'ARN polymérase (Rahal., 2013). Une sensibilité à l'acide fusidique a été également mise en évidence, cet antibiotique est un inhibiteur de la synthèse protéique (Rahal., 2013).

Notre résultat nous a permis de remarquer la capacité de *S.aureus* de résister à la Tétracycline, la pénicilline G et le Chloramphénicol. La résistance à la tétracycline due au mécanisme d'efflux et la modification de ribosome ; la résistance à la pénicilline G se fait par l'enzyme Pénicillinase plasmidique et la résistance au Chloramphénicol est due à l'intervention d'acétyl-transférase plasmidique (Rahal., 2013).

La présence de différentes souches antibiorésistantes dans l'hôpital « Ibn Zohr » doit conduire à renforcer les mesures d'hygiène puisque le contrôle de ce type de souche n'est pas toujours facile à appliquer. Le renforcement du lavage des mains, le dépistage de la colonisation par les bactéries multi-résistantes, ainsi qu'une meilleure utilisation des antibiotiques sont également des mesures efficaces qui doivent être entreprises en urgence (Hammai et *al.*, 2009). Des mesures d'isolement géographique si la structure le permet, sinon des mesures d'isolement technique doivent être immédiatement mises en place (Abahar et *al.*, 2010).



***Conclusion***

## Conclusion :

Au cours de notre étude, nous avons évalué la résistance aux antibiotiques de 12 souches bactériennes: (*E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*) qui sont bien désignées comme des agents cliniques et épidémiologiques. L'identification de ces bactéries par les méthodes conventionnelles a permis de confirmer la pureté de ces souches et d'étudier leurs sensibilités aux antibiotiques par la méthode de diffusion sur la gélose MH.

La mise en évidence de l'antibiorésistance des souches étudiées a permis de révéler l'importance de la fréquence des souches multirésistantes à divers antibiotiques allant de  $\beta$ -lactamines, Tétracyclines, Phénicoles jusqu'au Quinolones. Un taux important (85.71%) des souches d'*E.coli* qui ont été résistantes à la Ticarcilline et 80 % de ces souches sont résistantes à la tétracycline ainsi que 100% des souches de *P.aeruginosa* ont été résistantes à la rifampicine, et la seule souche de staphylocoque étudiée était une souche multirésistante ce qui représente un résultat non négligeable

Il est donc primordial, de connaître les mécanismes et étudier le ou les moyens de propagation de ces résistances afin de mettre en place les moyens de lutte contre ces bactéries.

Actuellement, le respect des conditions d'hygiène et la surveillance de la propagation des souches multirésistantes surtout dans les services à forte prévalence ainsi que le contrôle régulier et la révision de toutes les prescriptions d'antibiotiques «tout en réduisant celles à large spectre», sont utiles et constituent un des facteurs qui va contribuer à l'amélioration de la qualité de la prise en charge des patients.

Ainsi, notre travail ouvre de nombreuses perspectives:

- étudier une population bactérienne plus importante, pendant une période plus longue;
- Surveiller les différentes pathologies survenues surtout chez les patients à risque dans les services à haute prévalence par une étude épidémiologique ;
- Effectuée le génotypage des souches à résistance acquise pour avoir une image plus exacte de la situation épidémiologique;
- mettre en place un réseau de surveillance des bactéries antibiorésistantes.

## **Résumé :**

Du 02 Février à 06 Mars, douze souches bactériennes d'importance clinique ont été collectées (à partir des prélèvements pathologiques cliniques) du laboratoire de bactériologie de l'hôpital « Ibn Zohr » à Guelma : sept souches d'*Escherichia coli*, quatre souches de *Pseudomonas aeruginosa* et une souche de *Staphylococcus aureus*, afin d'étudier leurs résistances à certains antibiotiques utilisés en médecine humaine.

Une vérification de la pureté des souches collectées a été effectuée grâce à des méthodes microbiologiques standardisées (caractères cultureux et biochimiques).

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société française de Microbiologie, 2013.

Les résultats obtenus montre que 85.71% des souches d'*E.coli* sont résistantes à la Ticarcilline, 80 % des souches sont résistantes à la Tétracycline, 50% sont résistantes au Chloramphénicol et un faible pourcentage a été observé pour le Ciprofloxacine (28.57%). Les *P.aeruginosa* sont résistantes à la Ticarcilline, Ciprofloxacine et l'Imipénème avec un taux estimé par 25% mais 100% des souches de *P.aeruginosa* sont résistantes à la Rifampicine.

La souche *S.aureus* est résistante à la tétracycline, la pénicilline G et le Chloramphénicol. Ces bactéries résistantes à plusieurs antibiotiques sont considérées comme l'un des problèmes d'aujourd'hui dans le domaine de la médecine et elles doivent être contrôlées continuellement par une détection rapide et une application stricte des règles d'hygiène.

## **Mots clés :**

*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, résistance aux antibiotiques, milieu hospitalier.

**Summary:**

From February 2 to March 6, twelve bacterial strains of clinical importance were collected (samples from clinical pathology) of the bacteriology laboratory of the "Ibn Zohr" hospital –Guelma- : seven strains of *Escherichia coli*, four strains *Pseudomonas aeruginosa* and one strain of *Staphylococcus aureus*, to study their resistance to some antibiotics used in human medicine.

Verification of the purity of the collected strains was carried out using standardized microbiological methods (cultural and biochemical characters).

The study of antibiotic susceptibility was performed according to the recommendations of the Committee on Antimicrobial Susceptibility of the French Society for Microbiology, 2013.

The results showed that 85.71% of the strains of *E. coli* are resistant to ticarcillin, 80% of strains were resistant to tetracycline, 50% were resistant to chloramphenicol and a weak percentage was observed for ciprofloxacin (28.57%). the *P. aeruginosa* are resistant to ticarcillin, ciprofloxacin and imipenem with an estimated 25%; 100% of the strains of *P. aeruginosa* are resistant to rifampicin.

The *S.aureus* strain is resistant to tetracycline, penicillin G and Chloramphenicol. These resistant to several antibiotics bacteria are considered one of today's problems in the field of medicine and must be continuously controlled by early detection and a strict application of the rules of hygiene.

**Keywords:**

*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, antibiotic resistance, hospital setting.

## ملخص:

من 2 فيفري إلى غاية 6 مارس، تم جمع أثنى عشر سلالة بكتيرية ذات أهمية طبية (عينات بيولوجية) من مختبر البكتيريولوجيا بمستشفى "ابن زهر" بقالمة: سبع سلالات من الايشيريشيا القولونية (*Escherichia coli*) ، أربع سلالات من الزائفة الزنجارية (*Pseudomonas aeruginosa*) وسلالة من المكورات العنقودية الذهبية (*Staphylococcus aureus*)، وذلك من اجل دراسة مقاومتها لبعض المضادات الحيوية المستخدمة في الطب البشري. تم التحقق من نقاء السلالات التي تم جمعها بطرق ميكروبيولوجية (الخصائص البيوكيميائية).

وقد أجريت دراسة الحساسية للمضادات الحيوية وفقا لتوصيات لجنة الحساسية لمضادات الميكروبات في الجمعية الفرنسية لعلم الأحياء المجهرية، 2013.

أظهرت النتائج أن 85.71% من سلالات ايشيريشيا القولونية (*Escherichia coli*) مقاومة للتيكارسيلين، 80% من السلالات مقاومة للتتراسيكلين، 50% مقاومة للكلورامفينيكول ولوحظ وجود نسبة ضئيلة من السلالات مقاومة للسيبروفلوكساسين (28.57%). الزائفة الزنجارية (*Pseudomonas aeruginosa*) تقاوم التيكارسيلين، السيبروفلوكساسين والإمبيبيديم بمعدل يقدر ب 25% ولكن 100% من سلالات الزائفة الزنجارية (*Pseudomonas aeruginosa*) مقاومة للريفامبيسين. سلالة البكتريا العنقودية الذهبية مقاومة للتتراسيكلين والبنسلين G و الكلورامفينيكول. وجود هذه البكتيريات المقاومة للعديد من المضادات الحيوية تعتبر واحدة من مشاكل اليوم في مجال الطب ويجب أن تكون الرقابة بشكل مستمر من خلال الكشف المبكر والتطبيق الصارم لقواعد النظافة الصحية.

## الكلمات المفتاحية :

ايشيريشيا القولونية، الزائفة الزنجارية، المكورات العنقودية الذهبية، المقاومة للمضادات الحيوية، الوسط الاستشفائي .



***Références  
Bibliographiques***



## Références bibliographiques

### Les livres :

**Abahar M., S. Jamali, et A.Samadikuchaksaraei. (2010).** Imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains carry metallo  $\beta$ -lactamase gene blaVIM in a level Iranian burn hospital. *Burns*. P: 36, 826-30.

**Amira W. (2008).** Degré de contamination de l'eau de la mare Redjla (Tahar) par les nitrates : Détermination de la qualité physicochimique et microbiologique de l'eau. Mémoire de Magister. Université de Jijel. P : 49

**Aouati H. (2009).** Isolement des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline. Etude de leur sensibilité aux autres familles d'antibiotiques. Mémoire de magister. Université Mentouri. Constantine. P : 8, 9

**Aouissi A. (2010).** Microbiologie et physico-chimie de l'eau des puits et des sources de la région de Guelma (Nord-Est de l'Algérie). Mémoire de Magister. Université 08 mai 1945. Guelma. P : 59

**Arlet G., et C. Champs. (2009).** Bactériologie. Annales du Contrôle National de Qualité des Analyses de Biologie Médicale. P : 4-6

**Avril J. L, Monteil. H, Dobernat.H, et Denis. F.(2000).** Bactériologie Clinique. Édition ELLIPSE. P: 171, 172, 175, 208 ,294 ,295

**Benslim W., et N.Mouhoub. (2007).** *Pseudomonas aeruginosa* transfert de résistance aux antibiotiques par l'ADN plasmidique. Mémoire de magister. Université de Guelma. P : 30-31

**Boudraa W., S.Bengati, et F.Djamaa. (2011).** Contribution à l'étude de la qualité bactériologique et physico-chimique de l'eau des de la veille d'annaba. Mémoire pour l'obtention du diplôme de master en microbiologie de l'environnement. Université de Guelme. P : 47,50

**Boulahbal F. (2002).** Microbiologie S<sub>1</sub> clinique. Office des publications universitaires. Alger. P : 126-145, 150-166, 167-173.

**Cattoir V. 2004.** Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathologie Biologie*. 52 (10) P: 607-616.

**Cavallo J.D., P.Plesiat, G. Couetdic, F.Leb Blanc, et R.Fabre. (2002).** Mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: prevalence of OprM-overproducing strains in a French multicentre study. J antimicrobchemother. P :1039.

**Chaalal W. (2013).** Occurrence de profil d'antibiorésistance. Des *Staphylococcus aureus* isolés de produits alimentaire. Mémoire de magister. Université d'Es-Senia d'Oran. P : 24

**Chaker H. (2006).**Régulation de l'adaptation de labactérie *Pseudomonas aeruginosa* à son hôte : implication desmétabolites du tryptophane. Thèse de doctorat. Grenoble. P : 3

**Chouder N. (2006).** Contribution à l'étude des flores intestinales des poulets conventionnels sains.Mémoire de magister. Université de Mentouri Constantine. P : 16

**Clave D. (2012).** *Escherichia coli*. Fiche technique bactériologie. Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique. P : 2

**COMITÉ DE L'ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE.** Recommandations 2013. P : 8, 25, 26, 30-32

**Courvalin P., et R. Leclerq. (2012).** Antibio gramme.3eme édition. ESKA. Paris. P : 48, 49

**Diallo A. A. (2013).** *Escherichia coli* pathogènes et résistantes aux antibiotiques dans les effluents d'origine humaine et animale : Prévalence et caractérisation avant et après traitement épuratoire.Thèse de Doctorat en microbiologie. Université de Toulouse.P : 157

**Djebbari N., Z.Boudjadi, et M .bensuilah. (2009).** l'infestation de l'anguille *Anguilla anguilla* par le parasite + *Anguillicolacrassus Kuwahara, Niimi et I tagaki*, dans le complexe de Zones humide d'El Kala (Nord-Est algérien). Université Badjimokhtar Annaba, Faculté des sciences, Laboratoire d'écologie des milieux marins et littoraux. Annaba. P : 45-50

**Djelouat S. (2011).** Les *Escherichia coli*. Blogspot. P : 1

**Dolarras C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Tec & Doc. Paris. P : 289, 476

**Drissi M., Z.Baba Ahmed., et R.Bakour.(2011).**Sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques au niveau du service de neurochirurgie du C.H.U. de Tlemcen Algérie. Phénotypes de résistance aux bêtalactamines. Médecine du Maghreb. Le kiosque. P : 23

**François J., M.Chomarar, M. Weber, et A. Gerard. (2003).**De l'antibiogramme à la prescription. 2éme édition.Biomerieux. P : 8-22

- Gras D. (2006).** Etude des interactions entre les cellules épithéliales respiratoires humaines normales et mucoviscidiques et *Staphylococcus aureus*. Thèse de doctorat. Université de Reims Champagne-Ardenne U.F.R. de médecine. P : 44
- Guiraud J., P. (2003).** Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris. P: 185-186, 258, 265
- Hammam S., R. Ghozzi, B. Burghoffer, G. Arlet, et S. Ben Redjeb.(2009).** Mechanisms of carbapenem resistance in non metallo-lactamase producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Tunisian hospital. *Pathol. Biol.* P: 57, 530-5
- Khalilzadah P. (2009).** Formation de Biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*: évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing. Thèse de doctorat. L'université Paul Sabatier (Toulouse III). P : 39
- Le Minor L., et M. Véron. (1984).** Bactériologie Médicale. Flammarion Médecine-sciences. Paris. P : 214, 215, 244, 246-253, 367, 371-383, 511, 513, 514, 525.
- Liaïd A. (2012).** Etude de la résistance aux antibiotiques des bactéries à Gram négatif non fermentantes au niveau du C.H.U de Tlemcen. Mémoire de magister. Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen. P : 12-17
- Lobril J. R. (1998).** Réévaluation du modèle de croissance de Monod : effets des antibiotiques sur l'énergie de maintenance. Thèse de Doctorat. Université de Lyon I, France. P: 42, 77.
- Mammeri H. (2013).** Mode d'action des antibiotiques. Service de Bactériologie, CHU Amiens. P : 2
- Mami A. (2013).** Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocine à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie. Thèse de doctorat. Université d'Oran. P : 19
- Mérens A., S. Aurélie. 2010.** Mécanismes et épidémiologie de la résistance aux fluoroquinolones en 2010. La résistance aux anti-infectieux. Revue francophone des laboratoires. 422 P : 33-41.
- Meziani M. (2012).** Contribution du diagnostic biochimique bactérien dans l'établissement des parentés phylogénétiques : Cas des Entérobactéries et *Pseudomonas*. Mémoire de Magister. Université Mentouri. Constantine P : 30, 32
- Oulymata G. (2007).** Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles à gram négatif. Thèse de doctorat. Université Cheikh Anta Diop de Dakar. P : 6, 7, 13

**Philippon A., et G.Arlet. (2006).**  $\beta$ -Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel. Annales de biologie clinique. 64 (1) P: 37-51.

**Prescott W., S.Harley, et W.Klein. (2010).** Microbiologie. 3em édition. deboeck. Bruxelles. P : 843, 845.

**Rahal K. (2013).** Les antibiotiques. Office des publications universitaires. Alger. P : 15, 47, 79, 80, 101, 133.

**Rebiahi S. (2012).** Caractérisation de souches de *Staphylococcus aureus* et étude de leur antibiorésistance au niveau du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen. Thèse de doctorat. Université de Tlemcen. P : 3, 4, 10, 11

**Scheftel J-M. (2010).** Entérobactéries. L'Alsace. P : 14-17

**Seck R. (2005).** Résistance des souches d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* isolées d'infections urinaires. Thèse de doctorat. Université Cheikh AntaDiop de Dakar. P : 22-27

**Singleton P. (2008).** Bactériologie de la médecine, la biologie et les biotechnologies. DUNOD. Belgique. P : 418.

**Sohidul I. 2008.** Mécanismes de résistance aux antibiotiques dans chromosomiques *Pseudomonas aeruginosa* et *Neisseria gonorrhoeae*. Thèse de doctorat. P : 5.

**Van Delden C. (2006).** Rôle du *quorum sensing* dans les pneumonies à *Pseudomonas aeruginosa* acquises sous ventilation mécanique. Service des Maladies Infectieuses. Hôpitaux Universitaires de Genève. Suisse. P : 5

**Véronique F. (2003).** La résistance bactérienne aux antibiotiques. Université Laval. P : 12-13

**Yala D., A.S Merad.,D. Mohamedi., et M.N.Ouar-Korichi. (2001).** Médecine du Maghreb n°91. P : 5-12

**Yétérian E. (2010).** Bases moléculaires de la maturation et de la sécrétion de la pyoverdine chez *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de doctorat. Starsbourg. P : 11

**Zahar JR., et K. Moumile. (2013).** *Escherichia coli*, définition, épidémiologie des résistances. Service de microbiologie hygiène, CHU Necker Enfants malades. P : 1

## **Les sites Web :**

[01] <http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/POLY.Chp.7.1.5.html> (Consulter le 10-4-2014)

[02] [http://bacterioweb.univ-fcomte.fr/cours\\_dcem1/pseudomonas.htm](http://bacterioweb.univ-fcomte.fr/cours_dcem1/pseudomonas.htm) (Consulter le 8-4-2014)

[03] [http://www.sfar.org/acta/dossier/archives/ca98/html/ca98\\_39/98\\_039.htm](http://www.sfar.org/acta/dossier/archives/ca98/html/ca98_39/98_039.htm) (Consulter le 2-4-2014)

[04] <http://lesantibiotiques-lapenicilline.e-monsite.com/pages/ii-le-fonctionnement.html> (Consulter le 28-4-2014)

[05] <http://www.123bio.net/cours/antibio/modedaction.html> (Consulter le 4-4-2014)

[06] <http://www.techno-science.net/?onglet=glossaire&definition=1039> (Consulter le 14-4-2014)

[07] [http://www.sfar.org/acta/dossier/archives/ca05/html/ca05\\_13/ca05\\_13.htm](http://www.sfar.org/acta/dossier/archives/ca05/html/ca05_13/ca05_13.htm) (Consulter le 14-5-2014)

[08] <http://www.pharmaetudes.com/ressources/cours%20internat/section5/25macrolides-et-apparentes.pdf> (Consulter le 14-5-2014)

[09] <http://www.creapharma.ch/antibiotique.htm> (Consulter le 01-04-2014)

[10] [http://www.sfar.org/acta/dossier/archives/ca98/html/ca98\\_39/98\\_039.htm](http://www.sfar.org/acta/dossier/archives/ca98/html/ca98_39/98_039.htm) (Consulter le 03-04-2014)

[11] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/fr/> (Consulter le 3-04-2014)

[12] <http://www.sante.gouv.fr/les-infections-nosocomiales-questions-reponses.html> (Consulté le 3-4-2014)

[13] [http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/microbio/tests\\_microbiologie2.htm](http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/microbio/tests_microbiologie2.htm) (Consulter le 21-02-2014)

[14] [http://www.solabia.com/solabia/produitsDiagnostic.nsf/0/D5D9F075857C0657C12574B4002A40BF/\\$file/FT\\_BK059\\_v7.pdf](http://www.solabia.com/solabia/produitsDiagnostic.nsf/0/D5D9F075857C0657C12574B4002A40BF/$file/FT_BK059_v7.pdf) (Consulter le 01-02-2014)

[15] <http://www.aquaportail.com/definition-10021-acetoine.html#ixzz30Nxxznrok> (Consulter le 30-4-2014)

[16] [dictionnaire.sensagent.com/Galerie%20API/fr-fr](http://dictionnaire.sensagent.com/Galerie%20API/fr-fr) (Consulter le 3-3-2014)

[17] <http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/microbio/milieux.html> (Consulter le 02-03-2014)



***Annexe***

## Annexe 01 :

### ➤ Les milieux de culture :

#### ❖ Milieu de Chapman :

##### ✓ Composition :

Peptone tryptique de caséine.....	10g
Extrait viande.....	1g
Chlorure de sodium.....	75g
Mannitol.....	10g
Rouge de phénol.....	0.025g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000g

##### ✓ Préparation :

Après dissolution de tous les ingrédients dans l'eau distillée ajuster le pH à 7.5 et stériliser à 121°C pendant 20mn.

#### ❖ Gélose nutritive :

##### ✓ Composition :

Extrait de viande de l'œuf.....	1g
Agar.....	15g
Peptone.....	5g
Chlorure de sodium.....	15g
Extrait de levure.....	2g

##### ✓ Préparation :

Verser 28g dans un litre d'eau distillée .Ajuster le pH à 7.4. Porter à ébullition jusqu' à dissolution complète. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

#### ❖ Gélose Hectoén :

##### ✓ Composition :

Protase peptone.....	2g
Extrait de levure.....	3g
Chlorure de sodium.....	5g
Thiosulfate de sodium.....	5g
Sels biliaires.....	9g
Citrate de ferammoniacale.....	1.5g
Salicine.....	2g

Saccharose.....	12g
Lactose.....	2g
Fuchsine acide.....	0.1g
Agar.....	1.4g
Eau distillée.....	1000ml

✓ **Préparation :**

Verser 75g dans un litre d'eau distillée .Ajuster le pH à 7.5. Porter à ébullition jusqu' à dissolution complète, ne pas autoclaver.

❖ **Gélose Mueller-Hinton**

✓ **Composition :**

Hydrolysate acide de caséine.....	17,5g
Infusion de viande.....	2,0g
Amidon soluble.....	1,5g
Agar agar bactériologique.....	17,0g
Eau distillée.....	1000 ml

✓ **Préparation :**

Mettre en suspension 38,0g de milieu déshydraté (BK048) dans 1 litre d'eau distillée.

Porter lentement le milieu à l'ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.

Stériliser à l'autoclave à 115°C pendant 15 minutes

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 7,3 ± 0,2

❖ **Milieu King A:**

✓ **Composition :**

Bacto -peptone .....	20g
Agar.....	15g
Glycérol C.P.....	10g
K <sub>2</sub> HSO <sub>4</sub> anhydre.....	15g
MgCl <sub>2</sub> anhydre.....	1.4g
Eau distillée.....	100ml

✓ **Préparation :**

Verser 45 g de poudre dans 1 litre d'eau distillée, Stérilisation classique, Ajouter 10 cm<sup>3</sup> de glycérol après autoclavage.

pH du milieu prêt à l'emploi : 7.2



❖ **Milieu King B:**

✓ **Composition :**

Protéose peptone (Difco).....	20g
Agar.....	15g
Glycérol C.P.....	10g
K <sub>2</sub> HSO <sub>4</sub> anhydre.....	15g
MgCl <sub>2</sub> anhydre.....	1.4g
Eau distillée.....	1000ml

✓ **Préparation :**

Mettre en suspension 37 g de poudre dans 1 litre d'eau distillée. Stérilisation classique.

Ajouter 10 mL de glycérol après autoclavage.

pH du milieu prêt à l'emploi : 7.2

❖ **Milieu TSI :**

✓ **Composition :**

Agar.....	12g/L
Extrait de l'œuf.....	3g/L
Extrait de levure.....	3g/L
peptone.....	20g/L
Lactose.....	10g/L
Saccharose.....	10g/L
NaCl.....	5g/L
Glucose.....	1g/L
Citrate ferrique.....	3g/L
Thiosulfate de sodium.....	3g/L
Rouge de phénol.....	0,025g/L
Eau distillée.....	1000ml

✓ **Préparation :**

Mettre en suspension 60,1 g de milieu déshydraté (BK059) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

pH du milieu prêt à l'emploi : 7.4

❖ **Milieu citrate de Simmons :**

✓ **Composition :**

Chlorure de sodium.....	5g
Sulfate de magnésium.....	0, 2g
Phosphate d'ammonium POH.....	1g
Phosphate di potassique POHK.....	2g
Citrate trisodique .....	2g
Solution de bleu bromothymol 1%.....	8ml
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000g

✓ **Préparation :**

Verser 23 g dans 1 litre d'eau distillée. Stérilisation classique par autoclavage.  
Conditionnement en tubes inclinés.  
Ajuster le pH à 7-7.2

❖ **Milieu mannitol-mobilité :**

✓ **Composition :**

Peptone pancréatique de viande.....	20g/L
Agar – agar.....	4g/L
Mannitol.....	2g/L
Nitrate e potassium.....	1g/L
Rouge de phénol solution à 1%.....	4ml
Eau distillée.....	1000ml

✓ **Préparation :**

Mettre en suspension 22 g dans 1 litre d'eau distillée. Stérilisation classique.  
Ajuster le pH à 7.2

❖ **Milieu Clark et Lubs :**

✓ **Composition :**

Peptone tryptique de casein.....	5g/L
Phosphate bi potassique.....	5g/L
Glucose.....	5g/L
Eau distillée.....	1000ml

✓ **Préparation :**

Mettre en suspension 15 g dans 1 litre d'eau distillée. Stérilisation classique ou par filtration.

pH du milieu prêt à l'emploi : 7.4

❖ **Milieu urée indole :**

✓ **Composition :**

L-tryptophane.....	3g
Phosphate monopotassique.....	1g
Phosphate di potassique.....	1g
Chlorure e sodium.....	5g
Urée.....	20g
Solution rouge de phénol à 1%.....	2,5ml
Alcool à 95°.....	10ml
Eau distillée.....	1000ml

✓ **Préparation :**

Stériliser par filtration (utiliser de l'eau stérile pour limiter la contamination initiale).

pH du milieu prêt à l'emploi : 6,7

➤ **Réactifs :**

❖ **Réactif TDA** :pour la recherche de tryptophane désaminase :

Perchlorure de fer.....	3.4g
Eau distillée.....	100ml

❖ **Réactif de VogesProskauer (VP) : pour la recherche de L'acétone :**

• **VP1 :**

Hydroxyde de potassium.....	40g
Eau distillée.....	100ml

• **VP2 :**

Alpha naphтол.....	6g
Ethanol.....	100ml

❖ **Réactif Kowacks : pour la recherche de l'indole :**

Paradeethyl-amino-benzaldéhyde.....	5g
Alcoolamylique.....	75ml
HCl pur.....	25ml

❖ **Rouge de méthyle :**

Rouge de méthyle.....	0,5g
Alcool éthylique à 60°.....	100ml

➤ **Colorants :**

❖ **Lugol :** Elle est utilisée sur la coloration de Gram pour fixer le colorant

Iode.....	1g
Loure de potassium.....	2g
Eau distillée.....	3g

❖ **Violet de Gentiane :** Elle est utilisée pour colorer les bactéries :

Violet de Gentiane.....	1g
Ethanol à 90°.....	1ml
Phénol.....	2g
Eau distillée.....	100ml

**Annexe 02 :**

**Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 E (Dolarras., 2007)**

Tests	Substrats	Réactions/Enzymes	Résultats	
			Négative	Positive
<b>ONPG</b>	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	Beta galactosidase	Incolore	Jaune
			Jaune	Rouge/ orangé
<b>ADH</b>	Arginine	Arginine Dihydrólase	Jaune	Rouge/ orangé
<b>LCD</b>	Lysine	Lysine Décarboxylase	Jaune	Rouge/ orangé
<b>ODC</b>	Ornithine	Ornithine Décarboxylase	Jaune	Rouge/ orangé
<b>CIT</b>	Citrate	Utilisation du citrate	Vert	Bleu-vert/bleu
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Thiosulfate de sodium	Production d'H <sub>2</sub> S	Incolore/grisâtre	Dépôt noire
<b>URE</b>	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orangé
<b>TDA</b>	Tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA/immédiat	
			Jaune	Marron-rougeâtre
<b>IND</b>	Tryptophane	Production d'indole	kowacs /immédiat	
			Incolore	Rose
<b>VP</b>	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VP1+VP2/10min	
			Incolore	Rose /rouge
<b>GEL</b>	Gélatine	Gélatinase	Pas de diffusion	Diffusion du pigment noire
<b>GLU</b>	Glucose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune/vert-jaune
<b>MAN</b>	Mannitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>INO</b>	Inositol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>SOR</b>	Sorbitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>RHA</b>	Rhamnose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>SAC</b>	Saccharose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>MEL</b>	Melibiose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>AMY</b>	Amygdaline	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>ARA</b>	Arabinose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>NO<sub>3</sub>/NO<sub>2</sub></b>	Tube GLU	Production de NO <sub>2</sub> Réduction au stade N <sub>2</sub> Nitrate réductase.	NIT1+NIT2, 2-3 min	
			Jaune	Rouge

**Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API Staph (Dolarras., 2007)**

Tests	Substrats	Réactions/Enzymes	Résultats	
			Négative	Positive
<b>0</b>	Aucun	Témoin négative	Négative	Positive
<b>GLU</b>	D-glucose		Rouge	-
<b>FRU</b>	D-fructose		Rouge	Jaune
<b>MNE</b>	D-mannose			
<b>MAL</b>	Maltose			
<b>LAC</b>	Lactose			
<b>TRE</b>	D-tréhalose			
<b>MAN</b>	D-mannitol			
<b>XLT</b>	Xylitol			
<b>MEL</b>	D-melibiose			
<b>NIT</b>	Nitrate de potassium		Réduction du nitrates en nitrites	<b>NIT1+NIT2 / 10min</b>
			Incolore/rose	Rouge
<b>PAL</b>	$\beta$ - naphtylac.phosphate	Phosphatase alcaline	<b>ZymA+ZymB /10min</b>	
			Jaune	Violet
<b>VP</b>	Pyruvate de sodium	Production d'acétyl méthyl-carbonyl	<b>VP1 + VP2 / 10min</b>	
			Incolore/rose	Violet/rose
<b>RAF</b>	Raffinose	Acidification à partir du carbohydrate	Rouge	Jaune
<b>XYL</b>	Xylose			
<b>SAC</b>	Saccharose			
<b>MDG</b>	$\alpha$ - méthyle-D- glucosamine			
<b>NAG</b>	N-acétyl-glucosamine			
<b>ADH</b>	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orangé/rouge
<b>URE</b>	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/violet

**Tableau 11 :** Limites acceptables des diamètres d'inhibition (mm) des souches de référence utilisées (CA-SFM, 2013).

<b>Antibiotiques</b>	<b>Charge du disque</b>	<b><i>E.coli</i> (ATCC 25922)</b>	<b><i>P.aeruginosa</i> (ATCC 27853)</b>	<b><i>S.aureus</i> (ATCC 25923)</b>
Pénicilline G	6 µg (10 UI)	–	–	31,0 – 38,5
Ticarcilline	75 µg	–	25,0 – 30,5	–
Imipénème	10 µg	–	24,5 – 29,5	–
Amikacine	30 µg	21,5 – 26,0	20,0 – 26,0	–
Ciprofloxacine	5 µg	31,0 – 38,0	29,0 – 36,5	–
Triméthoprim/sulfaméthoxazole (cotrimoxazole)	1,25/23,75 µg	25,5 – 30,5	–	28,0 – 32,5
Erythromycine	15 UI	–	–	26,5 – 31,5
Lincomycine	15 µg	–	–	24,5 – 29,5
Rifampicine	30 µg	–	–	34,0 – 39,0
Acide fusidique	10 µg	–	–	28,5 – 34,5
Vancomycine	30 µg	–	–	17,5 – 20,5