

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة 8 ماي 1945 قالمة  
Université 8 Mai 1945 Guelma  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



## **Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master**

**Domaine: Sciences Biologiques.**

**Spécialité/Option: Biologie Santé et hygiène hospitalière.**

**Département: Biologie.**

---

## **Thème**

# **Étude de la résistance de certaines bactéries d'importance clinique aux agents antibactériens : antibiotiques et cuivre.**

---

**Présenté par :**

- Brahimi Hayet.
- Mellaoui Wissame.

**Devant la commission composée de :**

**Mme Abdaoui W.  
Dr. Benhalima L.  
Dr. Boussadia M.I.  
Mme Amri S.  
Mme Braik A.  
Mme Merabet R.**

**Présidente  
Encadreur  
Examinatrice  
Membre  
Membre  
Membre**

**Université de Guelma  
Université de Guelma  
Université de Guelma  
Université de Guelma  
Université de Guelma  
Université de Guelma**

**Juin 2017**



## *Remerciements*

*Nous remercions ALLAH, le tout puissant, qui nous a donné la santé, le courage la patience et la volonté et de nous avoir bénie pour la réalisation de ce travail.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à madame Abdaoui W. pour l'honneur qu'elle nous a fait en présidant ce jury.*

*Nous remercions madame Boussadia M.I. pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nos remerciements et gratitude à tous les membres de la commission, chacun a son nom, d'accepter de juger notre travail et de donner à nous leurs conseils et leurs valeurs de l'information scientifique au cours de notre période d'étude, nous sommes vraiment très honorés de vous voir avec nous pour évaluer ce modeste travail.*

*Nous tenons particulièrement à remercier notre promotrice et directrice de mémoire madame Benhalima L. pour avoir fait l'honneur d'accepter de diriger ce travail, nous la remercions de tout cœur pour sa patience et confiance, pour sa disponibilité sans faille et de son grand aide durant la réalisation de ce travail. Merci pour le partage de connaissances et des encouragements qui nous ont indiscutablement permis d'évoluer.*

*Nous remercions également tout le personnel de la direction de santé, du laboratoire de microbiologie de l'hôpital Ibn Zohr, et du laboratoire privé des analyses médicales Dr. kariche karima à Guelma pour leur accueil et leur sympathie au cours de la collecte des souches bactériennes.*

*À ceux et celles qui nous ont aidé d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin dans notre travail, nous les remercions du fond du cœur.*

*«Dans la vie, il y a trois facteurs : le talent, la chance, le travail. Avec deux de ces facteurs, on peut réussir. Mais l'idéal est de disposer de trois ». (De Bernard Werber)*

***Hayet et Wissame.***

# *Dédicace*

*Je dédie ce mémoire*

*En avant, à Dieu qui m'a réconcilié à accomplir ce travail.*

*À ma chère mère*

*Ce travail est le fruit de tes efforts, des longues années de sacrifices auxquels tu as consentis.  
Aucun mot, aussi expressif qu'il soit, ne saurait remercier ta juste valeur.*

*À mon cher père*

*Les mots ne suffisent pas pour exprimer toute l'affection que j'éprouve pour toi, je te dois ma réussite, mon éducation, ma fierté le sens de l'honneur, de la dignité, de la probité morale et le respect de soi.*

*Que Dieu le tout puissant, vous comble de santé, de prospérité et vous accorde une longue vie auprès de nous à fin que je puisse vous combler à mon tour.*

*À mes chères sœurs et frère*

*« Mouna, Zinou et Hanene »*

*Merci pour vos encouragements et conseils, pour votre optimisme, votre dynamisme, vos aides et soutiens précieux,  
Je vous souhaite tout le bonheur et la réussite du monde.  
Que ce travail les rend fière de leur petite sœur.*

*À mon neveu « Ayssem »*

*Que Dieu fasse que vous suiviez mes traces et que vous fassiez plus que moi.*

*À mes amies « Amina, Iméne, Ines, Sahra et Wissame. »*

*À mes cousines « Amina, Amira, Iméne, Sara, Soumiya, Yassmine et Zina »*

*À toute ma famille.*

*À tous mes camarades de promotion.*

*Aucun mot, aucun dédicace ne serait exprimer l'amour, le respect et la reconnaissance que J'éprouve pour vous.*

*Je vous aime.*

*« Hayet »*



# *Dédicace*

*Je remercie DIEU le tout puissant de m'avoir donnée la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce  
mémoire.*

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...*

*Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude,*

*L'amour, le respect, la reconnaissance...*

*Aussi, c'est tout simplement que*

*Je dédie ce mémoire....*

*A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui  
s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, Mon Père.*

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

*A ma grande mère que dieu le garde dans son vaste paradis,*

*Que Dieu fasse que vous suiviez mes traces et que vous fassiez plus que moi. Que Dieu tout puissant vous  
donne longue vie, beaucoup de santé et vous préserve du mal. A ma chère sœur Amel*

*A ceux et celles qui m'ont toujours aidée, écoutée, soutenue et encouragée tout au long de mon parcours ;  
Mon cher oncle « Mourad » et mes très chères tantes « Boukia et Lilia».*

*À mes très chères amies « Hayet, Sara, Yousra».*

*À ceux qui ont particulièrement assuré le soutien affectif de ce travail : ma famille Mellaoui ainsi que la  
famille Karfef.*

*« Wissame »*



Résumé en français	
Résumé en anglais	
Résumé en arabe	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des planches	
Liste des schémas	
Symboles et abréviations	
Introduction	1

## *Première partie : Étude bibliographique*

<b>Chapitre I : Caractères généraux de certaines bactéries d'importance clinique</b>	
I. Entérobactéries	3
I.1. Classification	3
I.2. Habitat	3
I.3. Caractères bactériologiques	3
I.3.1. Caractères morphologiques	3
I.3.2. Caractères cultureux	4
I.3.3. Caractères biochimiques	4
I.3.4. Caractères antigéniques	5
I.3.5. Infections nosocomiales dues aux entérobactéries	6
I.4. Principaux entérobactéries d'intérêt médical	6
I.4.1. <i>Escherichia coli</i>	6
I.4.2. <i>Citrobacter</i>	6
I.4.3. <i>Yersinia</i>	8
I.4.4. <i>Klebsiella</i>	8
I.4.5. <i>Edwardsiella</i>	9
I.4.6. <i>Proteus</i>	9
I.4.7. <i>Salmonella</i>	10
II. <i>Pseudomonas</i>	11
II.1. Classification	11
II.2. Habitat	11
II.3. Caractères bactériologiques	12
II.3.1. Caractères morphologiques	12
II.3.2. Caractères cultureux	12
II.3.3. Caractères biochimiques	13
II.3.4. Caractères antigéniques	13
II.3.5. Infections nosocomiales dues à <i>Pseudomonas</i>	14
II.4. Principaux <i>Pseudomonas</i> d'intérêt médical	14
II.4.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
II.4.2. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	15
III. <i>Staphylococcus</i>	15
III.1. Classification	15
III.2. Habitat	16
III.3. Caractères bactériologiques	16
III.3.1. Caractères morphologiques	16
III.3.2. Caractères cultureux	17
III.3.3. Caractères biochimiques	17

III.3.4. Caractères antigéniques	18
III.3.5. Infections nosocomiales dues aux staphylocoques	18
III.4. Principaux staphylocoques d'intérêt médical	19
III.4.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	19
III.4.2. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	20
III.4.3. <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	20
III.4.4. <i>Staphylococcus xylosus</i>	21
 <b>Chapitre II. Agents antibactériens et mécanismes de résistance</b> 	
I. Antibiotiques	22
I.1. Définition	22
I.2. Classification	22
I.2.1. Critères de classification	22
I.2.2. Classes des antibiotiques	23
I.3. Mécanismes d'action des antibiotiques	24
I.4. Résistance bactérienne aux antibiotiques	26
I.4.1. Définition	26
I.4.2. Mécanismes de résistance aux antibiotiques	27
I.4.2.1. Résistance des entérobactéries aux antibiotiques	27
I.4.2.2. Résistance des <i>Pseudomonas</i> aux antibiotiques	30
I.4.2.3. Résistance des staphylocoques aux antibiotiques	32
II. Cuivre	34
II.1. Définition	34
II.2. Propriétés antibactériennes du cuivre	35
II.3. Mécanismes d'action du cuivre	35
II.3.1. Stress oxydatif	35
II.3.2. dépolérisation des membranes cytoplasmiques	36
II.3.3. désintégration de l'ADN	36
II.4. Mécanismes de résistance au cuivre	37

## *Deuxième partie : Étude expérimentale*

### **Chapitre III : Matériel et méthodes**

I. Souches bactériennes d'intérêt clinique	38
I.1. Collecte des bactéries	38
I.2. Purification des souches bactériennes collectées	41
I.2.1. Revivification des bactéries	41
I.2.2. Isolement des bactéries	41
I.2.3. Identification des bactéries	43
I.2.3.1. Identification morphologique	43
I.2.3.2. Identification biochimique	45
I.3. Conservation des souches bactériennes	48
II. Étude de la résistance des bactéries aux antibiotiques	50
II.1. Technique de l'antibiogramme	50
II.2. Antibiotiques testés	51

III. Étude de la résistance des bactéries au cuivre	53
III.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	53
III.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)	55
III.3. Détermination du rapport CMB/CMI	55
<b>Chapitre IV: Résultats et discussion</b>	
<b>I. Résultats</b>	<b>56</b>
I.1. Purification des souches collectées	56
I.1.1. Revivification	56
I.1.2. Isolement et identification	57
I.1.2.1. Aspect macroscopique des colonies	57
I.1.2.2. Aspect microscopique des souches étudiées	59
I.1.2.3. Identification biochimique des souches étudiées	61
I.2. Etude de la résistance des bactéries aux agents antibactériens	68
I.2.1. Résistance aux antibiotiques	68
I.2.1.1. Entérobactéries	68
I.2.1.2. <i>Pseudomonas</i>	71
I.2.1.3. Staphylocoques	72
I.2.2. Résistance au cuivre	74
I.2.2.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	74
I.2.2.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)	78
I.2.2.3. Rapport CMB/CMI	78
<b>II. Discussion</b>	<b>80</b>
II.1. Collecte et identification des souches bactériennes	80
II.2. Résistance des bactéries aux antibiotiques	82
II.3. Résistance des bactéries au cuivre	85
<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>88</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>89</b>
<b>Annexes</b>	<b>97</b>

---

# Résumés

---



## Résumé

Vingt-cinq souches bactériennes (16 Entérobactéries, 4 *Pseudomonas* et 5 Staphylocoques) d'importance médicale isolées de différents prélèvements biologiques, ont été collectées durant le mois de Février des années 2016 et 2017 dans le laboratoire de microbiologie de l'hôpital IBN ZOHR, la direction de la santé (DDS) et le laboratoire privé des analyses médicales Kariche Karima à Guelma, afin d'étudier leur résistance à certains agents antibactériens.

Notre étude a porté en premier lieu sur la vérification de la pureté des souches bactériennes collectées en se basant sur leurs caractères cultureux et biochimiques. L'identification biochimique a été effectuée par la galerie biochimique classique et les galeries miniaturisées API. En second lieu, nous avons étudié la résistance des bactéries collectées aux antibiotiques par méthode de diffusion d'antibiotique sur gélose et au cuivre en déterminant les concentrations critiques de ce dernier.

Les résultats obtenus ont montré que la majorité des entérobactéries étudiées sont résistantes à plus de trois classes d'antibiotique et que toutes les souches de *Pseudomonas* sont multi-résistantes. Concernant les staphylocoques, des résistances élevées ont été enregistrées vis-à-vis de la pénicilline, la vancomycine et la triméthoprime.

L'étude de la résistance bactérienne au cuivre a révélé que 48 % des bactéries testées sont résistantes. Une souche de *Staphylococcus aureus* et une souche de *Klebsiella oxytoca* semblent être les plus résistantes (CMI = 800 µg de cuivre/ml).

Les résultats obtenus incitent la mise en œuvre de politique de surveillance de la résistance bactérienne aux agents antibactériens.

**Mots-clés :** Entérobactéries, *Pseudomonas*, Staphylocoques, résistance aux antibiotiques, résistance au cuivre.

## Abstract

Twenty-five bacterial strains (16 Enterobacteria, 4 *Pseudomonas* and 5 Staphylococci) of medical importance isolated from different biological samples were collected during the month of February of the years 2016 and 2017 in the microbiology laboratory of the IBN ZOHR hospital, Health Direction and the private laboratory Kariche Karima in Guelma, to study their resistance to some antibacterial agents.

Firstly our study focused on the verification of the purity of the collected bacterial strains based on their cultural and biochemical characteristics. Biochemical identification was performed by the classical biochemical gallery and miniature API galleries. Secondly, we studied the resistance of bacteria collected to antibiotics by antibiotic diffusion method on agar and copper resistance by determining of the critical concentrations.

The results obtained showed that the majority of enterobacteria studied are resistant to more than three classes of antibiotic and that all *Pseudomonas* strains are multi resistant. Concerning the staphylococci, high resistance was recorded against penicillin, vancomycin and trimethoprim.

The study of bacterial resistance to copper revealed that 48 % of the bacteria tested are resistant. A strain of *Staphylococcus aureus* and a strain of *Klebsiella oxytoca* appear to be the most resistant (MIC = 800 µg copper / ml).

The results obtained encourage the implementation of a policy to monitor bacterial resistance to antibacterial agents.

**Keywords:** Enterobacteria, *Pseudomonas*, Staphylococci, antibiotic resistance, copper resistance.

## ملخص

تم جمع خمسة وعشرون سلالة بكتيرية (16 معويات "Entérobactéries"، 4 زائفات "Pseudomonas" و 5 مكورات عنقودية "Staphylocoques") ذات أهمية طبية معزولة من عينات بيولوجية مختلفة، خلال شهر فبراير من سنة 2016 و 2017 من مختبر علم الأحياء الدقيقة في مستشفى ابن زهر، مديرية الصحة (DDS) والمختبر الخاص بالتحاليل الطبية كاريش كريمة في قالمة، و ذلك لدراسة مقاومتها لبعض المضادات البكتيرية.

ركزت دراستنا أولاً على التحقق من نقاء السلالات البكتيرية التي تم جمعها بالإعتماد على خصائصها الزراعية و البيوكيميائية.

تحديد الهوية الكيميائية تم إجراؤها بالطرق الكيميائية الكلاسيكية ثانياً قمنا بدراسة مقاومة البكتيريا التي جمعت للمضادات الحيوية عن طريق انتشار المضادات الحيوية في وسط الزرع و مقاومتها للنحاس من خلال تحديد تركيزات هذه الأخيرة .

وأظهرت النتائج أن غالبية المعويات المدروسة مقاومة لأكثر من ثلاث فئات من المضادات الحيوية، وأن سلالات الزائفة متعددة المقاومة . وفيما يتعلق بالمكورات العنقودية ، سجلت مقاومات عالية للبينيسيلين، الفانكوميسين والميثوبريم.

دراسة مقاومة البكتيريا للنحاس كشفت أن 48% من البكتيريا المختبرة مقاومة. سلالة من المكورات العنقودية الذهبية وسلالة من كليبسيلا اوكسيتوكا تبدوان أكثر مقاومة (MIC = 800 ميكروغرام النحاس / مل).

النتائج المتحصل عليها تشجع على تنفيذ سياسة مراقبة مقاومة البكتيريا للمضادات البكتيرية.

**الكلمات المفتاحية :** المعويات ، الزائفات، المكورات العنقودية ، مقاومة المضادات الحيوية، مقاومة النحاس.

---

## Liste des figures

Figure	Titre	Page
Figure 1	Aspect des entérobactéries au microscope électronique (X15 000) (source : <a href="http://www.octaveuzanne.com">http://www.octaveuzanne.com</a> ).	4
Figure 2	<i>Pseudomonas</i> vue au microscope électronique (X 15 000) (Galloway, 1991).	12
Figure 3	Aspect des staphylocoques au microscope électronique (X 20000). (Source : <a href="http://www.futura-sciences.com">http://www.futura-sciences.com</a> )	17
Figure 4	Différents modes d'action des antibiotiques (Favet, 2013).	26
Figure 5	Profil biochimique de la souche E1.	63
Figure 6	Profil biochimique de la souche E2.	63
Figure 7	Profil biochimique de la souche E3.	64
Figure 8	Profil biochimique de la souche E5.	64
Figure 9	Profil biochimique de la souche E6.	64
Figure10	Profil biochimique de la souche E7.	64
Figure11	Profil biochimique de la souche E9.	64
Figure12	Profil biochimique de la souche E10.	64
Figure13	Profil biochimique de la souche E11.	65
Figure14	Profil biochimique de la souche E12.	65
Figure 15	Profil biochimique de la souche E14.	65
Figure16	Profil biochimique de la souche E15.	65
Figure 17	Profil biochimique de la souche E16.	65
Figure 18	Profil biochimique de la souche P1.	65
Figure 19	Profil biochimique de la souche P3.	66
Figure 20	Profil biochimique de la souche S1.	66

Figure 21	Profil biochimique de la souche S2.	66
Figure 22	Profil biochimique de la souche S3.	66
Figure 23	Résistance aux antibiotiques d'entérobactéries étudiées.	68
Figure 24	Antibio-résistance multiple d'entérobactéries étudiées.	69
Figure 25	Résistance aux antibiotiques de <i>Pseudomonas</i> étudiés.	71
Figure 26	Antibio-résistance multiple de <i>Pseudomonas</i> étudiés.	71
Figure 27	Résistance aux antibiotiques des staphylocoques étudiés.	72
Figure 28	Antibio-résistance multiple des staphylocoques étudiés.	73
Figure 29	Distribution des CMI du cuivre pour toutes les souches bactériennes étudiées.	74
Figure 30	Valeurs des CMI du cuivre vis-à-vis des entérobactéries étudiées.	75
Figure 31	Valeurs des CMI du cuivre vis-à-vis des <i>Pseudomonas</i> étudiés.	75
Figure 32	Valeurs des CMI du cuivre vis-à-vis des staphylocoques étudiés.	76

---

## Liste des Tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau 1	Caractères biochimiques des principaux genres de la famille des <i>enterobacteriaceae</i> (Avril <i>et al.</i> , 1992).	5
Tableau 2	Classification des principaux antibiotiques (Rahal, 2013).	23
Tableau 3	Origine des souches bactériennes collectées.	39
Tableau 4	Aspects macroscopique des bactéries étudiées sur les milieux de culture sélective (Guiraud, 2003 ; Rodier <i>et al.</i> , 2005 ; Delarras, 2007).	44
Tableau 5	Recherche des enzymes respiratoires.	46
Tableau 6	Tests biochimiques utilisés pour l'identification des bactéries collectées (Delarras, 2000 ; Guiraud, 2003).	47
Tableau 7	Préparation et inoculation de galeries biochimiques miniaturisés API (source: <a href="http://www.biomerieux.com">http://www.biomerieux.com</a> ).	49
Tableau 8	Critères des antibiotiques testés sur les entérobactéries (CA-SFM, 2016).	52
Tableau 9	Critères des antibiotiques testés sur les <i>Pseudomonas</i> (CA-SFM, 2016).	52
Tableau 10	Critères des antibiotiques testés sur les staphylocoques (CA-SFM, 2016).	53
Tableau 11	Aspects macroscopiques des colonies des différentes souches bactériennes étudiées.	57
Tableau 12	Aspect microscopique des bactéries étudiées après coloration de Gram.	59
Tableau 13	Recherche des enzymes respiratoires des souches bactériennes étudiées.	62
Tableau 14	Tests biochimiques classiques des souches bactériennes étudiées.	63
Tableau 15	Profils biochimiques de certaines bactéries étudiées sur les galeries miniaturisées API.	67
Tableau 16	Profils antibiotypiques associés aux entérobactéries étudiées.	69

Tableau 17	Profils antibiotypiques associés aux <i>Pseudomonas</i> étudiés.	72
Tableau 18	Profils antibiotypiques associés aux staphylocoques étudiés.	73
Tableau 19	Valeurs des CMB du cuivre vis-à-vis des souches étudiées.	78
Tableau 20	Récapitulatif des activités antibactériennes observées avec le cuivre.	79
Tableau 21	Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 E (source : <a href="http://www.biomerieux.com">http://www.biomerieux.com</a> ).	104
Tableau 22	Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 NE (source : <a href="http://www.biomerieux.com">http://www.biomerieux.com</a> ).	105
Tableau 23	Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api Staph (source : <a href="http://www.biomerieux.com">http://www.biomerieux.com</a> ).	106
Tableau 24	Limites acceptables des diamètres d'inhibition (mm) obtenus par diffusion en gélose pour les souches de référence utilisées pour le contrôle de qualité (CA-SFM, 2016).	107

---

## Liste des planches

<b>Planche</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
Planche 1	Résultats de la revivification des souches bactériennes collectées.	56
Planche 2	Aspect macroscopique des colonies des entérobactéries étudiées.	58
Planche 3	Aspect macroscopique des colonies de <i>Pseudomonas</i> étudiés.	59
Planche 4	Aspect macroscopique des colonies des staphylocoques sur la gélose Chapman.	59
Planche 5	Résultats de la recherche des enzymes respiratoires.	62
Planche 6	Antibiogramme des différentes souches d'entérobactéries étudiées.	70
Planche 7	Antibiogramme des différentes souches de <i>Pseudomonas</i> étudiées.	72
Planche 8	Antibiogramme des différentes souches de staphylocoques étudiées.	73
Planche 9	Détermination de CMI du cuivre vis-à-vis des souches de références et de certaines souches d'importance clinique étudiées.	77

## Liste des schémas

<b>Schéma</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
Schéma 1	Purification des souches bactériennes collectées.	42



---

## Symboles et abréviations

**AAC** : Aminoglycoside *N-acetyltransferase*.

**ADI** : Acide Adipique.

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**AmpC** : Adénosine monophosphate cyclique.

**AMY** : Amygdaline.

**ANT** : Aminoside *O-nucléotidyltransférase*.

**APH** : Aminoglycoside *3'-phosphotransférase*.

**API** : Appareillage et Procédé d'Identification.

**ARN-AA** : Acide ribonucléique-Acide aminé.

**ARNm** : Acide ribonucléique message.

**ARNr** : Acide ribonucléique ribosomique.

**ARNt** : Acides ribonucléiques de transfert.

**ATP** : Adénosine-triphosphate.

**BLSE** : Bêta-lactamases à spectre élargi.

**C°** : Degré Celsius.

**CAT** : Chloramphénicol acétyltransférase.

**CMB** : Concentration Minimale Bactéricide.

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice.

**DHFR** : Dihydrofolate réductase.

**GES**: Guyana extended spectrum (une bêtalactamase à spectre étendu).

**g.L<sup>-1</sup>** : Gramme par litre.

**g/l** : Gramme par litre.

**GLU**: Glucose.

**g/mol** : Gramme par mole.

**H<sub>2</sub>S**: Sodium thiosulfate.

**LPS**: Lipopolysaccharides.

**MLSB** : Macrolides, lincosamides et streptogramines B.

**N-cétyl-N-tri**: Trimethyl ammonium bromide.

**OmpC** : Outer membrane protein C.

**OmpD** : Outer membrane protein D.

**OmpF** : Outer membrane protein F.

**OmpK** : Outer membrane protein K.

**OXA**: Oxacillinase.

**PAC** : Phényl-acétate.

**PAL** : Phosphatase alcaline.

**PER**: Pseudomonas extended resistance (une bêtalactamase à spectre étendu).

**pH** : Potentielle Hydrogène.

**PLP** : Protéines de Liaison aux Pénicillines.

**PM** : Masse moléculaire.

**R** : Résistance.

**S** : Sensible.

**SCN** : Staphylocoques à coagulase négative.

**SHV**: Sulfhydryl variable.

**SS** : *Salmonella-Shigella*.

**TEM** : Temoniera : nom du malade chez qui la première souche a été isolée.

**µg/ml** : Microgramme par millilitre.

**VEB** : Vietnam extended spectrum (une bêtalactamase à spectre étendu).

---

# Introduction

---

Lorsque notre corps est débordé par l'attaque des bactéries, l'organisme ne peut pas toujours se défendre seul, il a besoin d'aide par des agents antibactériens (Houchi, 2014).

Depuis leur découverte au début du vingtième siècle, les antibiotiques ont permis de grandes avancées en thérapeutique et contribuer à l'essor de la médecine moderne (Weber et Rutala, 2013). L'efficacité de l'antibiothérapie dans le contrôle et la limitation de la dissémination des agents pathogènes a ainsi fait naître l'espoir de pouvoir éradiquer l'ensemble des maladies infectieuses. 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. Malheureusement, l'émergence des bactéries résistantes aux antibiotiques (à cause de leur prescription intensive) a mis un terme à cette vague d'optimisme (Mathur et Singh, 2005).

Ces dernières années, un accroissement de cas de résistance aux antibiotiques est toujours observé, environ 5 % de la population mondiale, estime à 23000 le nombre de décès de personnes infectées par des micro-organismes résistants aux antibiotiques, parmi lesquelles : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* (Harmouche, 2016).

L'éradication des microorganismes pathogènes est devenue un enjeu important de santé publique. Au vu de l'augmentation des résistances aux antibiotiques, la simple utilisation de ceux-ci n'est plus suffisante. Il faut donc jouer sur la prévention et diminuer les risques d'exposition aux pathogènes.

Depuis l'Antiquité, des métaux lourds sont utilisés pour leur propriété anti-infectieuse. Plus de 30 d'entre eux sont potentiellement capables à une haute concentration de diminuer la charge des microorganismes, parmi les utilisations des métaux lourds pour prévenir ou traiter des proliférations de microorganismes, nous pouvons citer le cuivre, utilisés dans le domaine médicale pour lutter contre la syphilis (Weber et Rutala, 2013).

Bien que les antibiotiques modernes aient largement remplacés les thérapeutiques à base de métaux lourds dans le traitement des infections, des recherches intenses ont été menées pour l'utilisation des complexes contenant des métaux lourds (Platine, cuivre, zinc et argent) dans le traitement des cancers, mais aussi pour l'utilisation de médicaments à base de

métaux dans le traitement de la malaria, de la trypanosomiase, et de la leishmaniose (Navarro *et al.*, 2010).

En Algérie comme dans le monde entier, les infections nosocomiales dues aux nombres importants des bactéries multi-résistantes occupent une place importante au sein des infections nosocomiales avec une fréquence estimée entre 20 et 30 % et possèdent un pronostic sévère, ces bactéries appartiennent principalement au genre *Pseudomonas* et *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Citrobacter* ... et d'autres causent des problèmes préoccupants dans les hôpitaux (Alioua, 2015).

Cette situation nous a amené à étudier l'état actuel des microorganismes présentant un problème de santé publique dans la région de Guelma (Est Algérien). Nous allons nous poser aussi la question à savoir si l'utilisation du cuivre comme un inhibiteur de croissance pourrait être une solution efficace pour compléter les autres stratégies mises en œuvre contre la prolifération d'infections.

Nous nous sommes fixés trois objectifs majeurs :

- Étude de la résistance aux antibiotiques de certaines souches bactériennes cliniques collectées de la région de Guelma à partir de divers prélèvements pathologiques ;
- Détermination des concentrations critiques du cuivre afin de différencier entre bactéries sensibles et résistantes à ce dernier ;
- Vérification des activités antibactériennes observées avec le cuivre.

En effet nous rapportons dans cette étude deux grandes parties :

- La 1<sup>ère</sup> est attribuée aux données bibliographiques comportant deux chapitres : l'un est consacré à l'étude des caractères généraux des principales bactéries d'importance clinique et l'autre aux notions et aux mécanismes génétiques de la résistance aux agents antibactériens (antibiotiques et cuivre).
- La 2<sup>ème</sup> relate notre travail expérimental, commençant par la présentation des méthodes utilisées, suivie des résultats obtenues et des discussions engendrées par ces résultats, et enfin nous terminerons cette étude par une conclusion.

---

---

**Première partie :**

*Étude*

*bibliographique*

---

---

---

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

---

## I. Entérobactéries

### I.1. Classification

La génétique moléculaire (hybridation ADN-ADN, gènes des ARN ribosomiaux, séquençage complet) est la base actuelle de la classification des entérobactéries. De nouveaux genres tels *Hafnia* et *Pantoea* sont apparus (issues du genre *Enterobacter*). A l'opposé, des genres et des espèces ont été réduits à l'état de sous-espèces ou de sérovars (Denis *et al.*, 2007).

La taxonomie des entérobactéries est la suivante :

- Règne : *Bacteria*.
- Phylum XII : *Proteobacteraia*.
- Classe : *Gammaproteobacteria*.
- Ordre : *Enterobacteriales*.
- Famille : *Enterobacteriaceae*.
- Genre : Les genres de cette famille sont regroupés en cinq tribus, d'après leurs propriétés fermentatives : *Escherichiae*, *Klebsielleae*, *Salmonelleae*, *Proteae*, *Yersinia*, *Erwiniae*.
- Espèce : 130 espèces sont actuellement répertoriées. Les espèces les plus communément isolées en bactériologie clinique appartiennent aux genres : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* et *Yersinia* (Delarras, 2007).

### I.2. Habitat

Les entérobactéries sont retrouvées partout, dans le sol, l'eau, et surtout dans l'intestin de l'homme et des animaux. Leur abondance dans l'intestin, leur mobilité, la rapidité de leur multiplication, l'acquisition fréquente des mécanismes de résistance aux antibiotiques expliquent qu'elles soient les bactéries les plus souvent impliquées en pathologie infectieuse humaine surtout en milieu hospitalier (Prescott *et al.*, 2010).

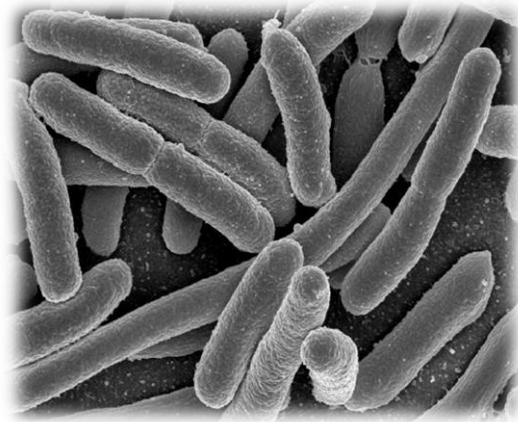
### I.3. Caractères bactériologiques

#### I.3.1. Caractères morphologiques

Ce sont des bacilles à Gram négatif, de 2 à 3 micromètres de long sur 0,6 de large (Figure 1). Les *Proteus* sont très polymorphes : formes longues et filamenteuses ou petits bacilles droits.

La majorité des espèces sont mobiles grâce à une ciliature péritriche et ne possèdent pas de spore. Certaines sont immobiles comme : *Klebsiella*, *Shigella*, et *Yersinia pestis*. La présence d'une capsule visible au microscope est habituelle chez *Klebsiella*.

La plupart des espèces pathogènes pour l'homme possèdent des fimbriae ou pili communs qui sont des facteurs d'adhésion (Freney, 2007).



**Figure 1:** Aspect des entérobactéries au microscope électronique (grossissement  $\times 15\ 000$ )

(source : <http://www.octaveuzanne.com>)

### I.3.2. Caractères cultureux

L'ensemble de ces bactéries poussent habituellement très aisément sur milieux ordinaires et milieux sélectif (gélose nutritive ou Mac Conkey) en 24 heures à 37°C en aérobie et en anaérobie, certains sont thermo-dépendants et ne poussent pas à 37 °C tels que *Hafnia alvei*, *Yersinia enterocolitica*...

Les colonies sont lisses et régulières et atteignent 2 millimètres de large sauf celles des *Yersinia* qui sont plus petites. Les *Proteus* ont tendance à envahir la gélose et à y former un tapis uniforme. Leur croissance est favorisée à un pH optimum entre 3,5 et 6,5 et une concentration en NaCl inférieure à 0,2 M (Denis *et al.*, 2007).

### I.3.3. Caractères biochimiques

Les caractères d'identification des entérobactéries sont essentiellement "biochimiques" et utilisent des tests qui étudient le métabolisme protéique (présence d'uréase, production d'indole, dégradation du tryptophane) ou la fermentation des sucres (glucose, lactose, saccharose etc..), la capacité d'utiliser le citrate, la présence d'enzymes (décarboxylases, désaminases), la production d'hydrogène sulfuré ou la formation de gaz (Avril *et al.*, 1992).

Le tableau 1 représente les principaux caractères biochimiques des entérobactéries.



**Tableau 1** : Caractères biochimiques des principaux genres de la famille des *enterobacteriaceae* (Avril *et al.*, 1992).

	<i>Escherichia</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Edwardsiella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Salmonella</i>
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	-	+	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	+	-	-
Indole	+	-	+/-	+/-	+	+/-	-
VP	-	-	+/-	+	-	-	-
Citrate	-	+	-	+	-	+/-	+/-
Mobilité	+	+	+/-	-	+	+	+
Urée	-	-	+	+	-	+	-
H <sub>2</sub> S	-	+/-	-	-	+	+/-	+

(+): test positif, (-): test négatif, ONPG: orthonitrophenyl B-D-galactopyranoside, VP: Voges-Proskauer, H<sub>2</sub>S : Hydrogène sulfuré.

### I.3.4. Caractères antigéniques

Les entérobactéries possèdent différents antigènes (Freney, 2007):

- Un antigène commun dénommé ECA (Enterobacterial Common Antigen) ou antigène de Kunitz. Cet antigène n'existe que chez les entérobactéries et, de ce fait, a un intérêt taxonomique.
- Les antigènes O ou somatiques, correspondent aux polysaccharides fixés sur les lipopolysaccharides (LPS). Ils sont thermostables et résistent à l'alcool. Les bactéries portant des antigènes O sont agglutinées par les anticorps correspondants.
- L'antigène R correspond au polysaccharide du core central. La disparition de l'antigène O le démasque et rend les souches "rough" (colonies rugueuses) auto-agglutinables dans l'eau physiologique, plus sensibles aux substances bactéricides du sérum, facilement phagocytées et moins pathogènes.
- Les antigènes H ou flagellaires n'existent que chez les souches mobiles. Constitués des protéines spécifiques dénommées « flagelline », ils sont thermolabiles et inactivés par l'alcool.

- Les antigènes de surface comprenant :
  - Les antigènes K, capsulaires, de nature polysaccharidique. ils masquent l'agglutination par les anticorps anti O qui peut être restituée après chauffage de la souche car ils sont détruits par ébullition.
  - Les antigènes d'adhérence ou adhésines de nature protéique, portés par des pilis communs (encore appelés fimbriae).

### I.3.5. Infections nosocomiales dues aux entérobactéries

Les entérobactéries constituent une part importante des bactéries isolées lors du diagnostic bactériologique des infections humaines : infections urinaires, intestinales, pulmonaires et des septicémies en milieu hospitalier et communautaire.

L'importance médicale des entérobactéries, et leur grand intérêt comme matériel de recherche, font de ce groupe bactérien l'un des mieux connus et des plus étudiés (Figarella, 2004).

### I.4. Principaux entérobactéries d'intérêt médical

#### I.4.1. *Escherichia coli*

Bactérie isolée en 1885 par Theodor Von Escherich et couramment appelée "colibacille". *Escherichia coli* (*E. coli*) est un hôte normal de l'intestin de l'homme et des animaux, c'est l'espèce aérobie la plus représentée dans le tube digestif (Denis *et al.*, 2007).

L'étude des facteurs de pathogénicité des colibacilles a montré, qu'il existe de nombreuses souches exprimant des potentialités pathogènes diverses : les pathovars. Ces facteurs sont (Delarras, 2014) :

- **Des adhésines:** conférant aux souches qui les possèdent la propriété de se fixer aux cellules épithéliales. De nature protéique, elles sont portées le plus souvent par des pili communs. L'adhérence constitue une étape essentielle de la pathogénèse des infections dues aux bactéries entériques.
- **Autres facteurs:** capsule, des protéines de la membrane externe et le LPS, les sidérophores.

*E. coli* est responsable d'infections diverses (Avril *et al.*, 1992) :

- **Infections extra-intestinales**

- **Infections urinaires:** la majorité des infections urinaires est due à *E. coli*. De plus, certaines souches d'*E. coli* sont dotées à leurs surface de structures « les adhésines », qui leur permettent d'adhérer spécifiquement aux épithéliums de l'appareil urinaire.
- **Infections abdominales:** ce sont des cholécystites, péritonites ou salpingites.
- **Infections méningées:** les méningites néonatales sont souvent graves (80 % des souches possèdent l'antigène capsulaire K1).
- **Bactériémies :** consécutives à une infection localisée peuvent évoluer vers un choc septique gravissime dû à l'action du LPS ou endotoxine (Fauchere, 2002).

- **Infections intestinales :** L'existence des diarrhées à *E. coli* est connue depuis 1940. Ces diarrhées sont dues à des souches de sérotypes particuliers qui provoquent soit des cas sporadiques, soit des petites épidémies. Les différents syndromes cliniques sont dus à des *E. coli* différents (Nauciel et Vildé, 2005).

- ***E. coli* Entéropathogènes (EPEC) :** elles étaient responsables, de diarrhées infantiles graves ou toxiques survenant par épidémies dans des crèches ou des maternités.
- ***E. coli* Entérotoxigènes (ETEC) :** elles sont responsables des diarrhées très liquides survenant dans les pays en développement. Ces diarrhées s'observent principalement chez les voyageurs. Elles sont souvent épidémiques chez les enfants de ces pays *E.coli* Entéro-invasives (EIEC). Elles sont isolées des syndromes dysentériques tant chez l'adulte que chez l'enfant. La présence des leucocytes dans les selles est le témoignage du processus invasif.
- ***E. coli* Entéro-hémorragiques (EHEC) :** ces souches ont été décrites en Amérique du Nord où elles ont été responsables d'épidémies de diarrhée aqueuse puis hémorragique. Ces souches sont aussi responsables du syndrome hémolytique-urémique.
- ***E.coli* Entéro-Invasifs (EIEC) :** ce sont des souches très proches de *Shigella dysenteriae*. Elles ont la capacité d'envahir les cellules du côlon, grâce à leur caractère invasif (pénétration suivi d'une multiplication). Elles provoquent le plus souvent une diarrhée liquide d'allure banale.

- ***E. coli* à adhésion diffuse (EDAC)** : des souches adhérant de manière diffuse aux cellules intestinales, par l'intermédiaire de fimbriae. Elles pourraient provoquer des diarrhées.
- ***E. coli* Entéro-aggrégatif (EAggEC)** : ces souches sont responsables des diarrhées persistantes (> 14 jours) chez des enfants dans les pays sous-développés.

#### I.4.2. *Citrobacter*

Le genre *Citrobacter* était à l'origine distingué des autres membres de la famille des *Enterobacteriaceae* par sa capacité à utiliser le citrate comme source de carbone (Prescott, 2009).

Les *Citrobacter* sont isolées de l'eau, les eaux usées, les sols et la nourriture, ainsi que des excréments de l'homme et d'autres animaux, et les intestins où ils peuvent être habitants réguliers. Ce pathogène peut également produire une toxine Shiga-like et produire un syndrome hémolytique urémique.

Diverses espèces de *Citrobacter* peuvent provoquer des infections chez les enfants, les néonataux et chez les immunodéprimés. *Citrobacter koseri* (anciennement appelé *Citrobacter diversus*) est la plus connue comme étant la cause de septicémie et de méningite chez les nouveau-nés et les jeunes enfants (Freney, 2007).

#### I.4.3. *Yersinia*

Toutes les bactéries appartenant au genre *Yersinia* sont des bacilles ou coccobacilles de 0,5 à 0,8 µm de largeur et de 1 à 3 µm de longueur, non sporulant et catalase positive (Denis *et al.*, 2007).

*Yersinia* ne fait pas partie de la flore bactérienne de l'homme, il réside dans le tractus gastro-intestinal de son hôte infecté (Freney *et al.*, 2000).

Ce genre est actuellement composé de 11 espèces, dont 3 sont pathogènes pour l'homme et l'animal : *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. pestis* (Denis *et al.*, 2007).

Ces trois espèces pathogènes ont une capacité commune de résister aux réponses immunitaires non spécifiques, elles sont toutes invasives mais diffèrent considérablement dans leur pouvoir invasif (Berthelot et Péan, 2009).

*Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* peuvent traverser la muqueuse gastro-intestinale pour infecter les tissus sous-jacents. *Y. pestis* pénètre dans le corps par piqûre d'insecte et ainsi, n'a traversé aucune surface du corps d'elle-même (Berthelot et Péan, 2009).

#### I.4.4. *Klebsiella*

Les *Klebsiella* sont des bactéries immobiles, en diplobacilles, généralement capsulées, poussant sur milieu ordinaire en atmosphère aéro-anaérobie. Elles expriment des antigènes K, capsulaires utilisables comme marqueurs épidémiologiques (Fauchere, 2002).

Le genre *Klebsiella* comprend deux espèces principales *k. pneumoniae* et *k. oxytoca* (Fauchere, 2002).

*K. pneumoniae* est fréquemment isolée de l'environnement, et notamment des eaux usées, du sol, et aussi chez des animaux. C'est un germe commensal du tube digestif et des voies aériennes supérieures. Elle peut devenir pathogène dans certaines conditions : chez les personnes immunodéprimées, les personnes alcooliques ou encore diabétiques. Son pouvoir pathogène et sa virulence seraient liés à plusieurs facteurs (Avril *et al.*, 1992):

- Une capsule de polysaccharide qui confère à *K. pneumoniae* un fort pouvoir invasif en protégeant les bactéries de la phagocytose.
- une production de sidérophores, lipopolysaccharide (LPS) et un complexe extracellulaire (toxique pour les tissus pulmonaires notamment).

Cette bactérie est à l'origine de nombreuses affections, et notamment : des angines, des infections pulmonaires comme la pneumonie, des abcès pulmonaires d'origine communautaire ou nosocomiale, des infections urinaires, intestinales et des septicémies (Le Minor et Véron, 1984).

*K. oxytoca* est une espèce ubiquitaire. Elle peut être isolée de l'environnement (sols, eaux de surface, eaux usées, végétaux) ainsi que des flores commensales de l'homme et des animaux. Elle colonise jusqu'à 30% des individus au niveau des muqueuses digestives et nasopharyngées. La colonisation augmente de façon très importante chez les patients hospitalisés. *K. oxytoca* est un agent pathogène opportuniste qui peut se propager extrêmement rapidement, ce qui conduit à des infections nosocomiales grâce à une capsule polysaccharidique qui protège les bactéries de la phagocytose, et parmi ces infections : les infections des voies urinaires et des septicémies (Couture, 1990).

#### I.4.5. *Edwardsiella*

Ce sont des bactéries en forme de bâtonnet mesurant 1 µm de diamètre pour 2 à 3 µm de long, à Gram négatif, ces bactéries vivent plutôt en condition aérobie mais supportant les conditions anaérobies, sont capables de fermenter le glucose avec ou sans production de gaz

et disposent des systèmes enzymatiques adaptés à leur milieu (oxydase négative, catalase positive, nitrate réductase positive). Les espèces d'*Edwardsiella* sont mobiles à certaines températures grâce à une ciliature de flagelles péritriches. Elle est répondeuse fréquemment dans l'environnement aquatique et animal (poissons, reptiles) (Freney *et al.*, 2000).

*Edwardsiella tarda* est un pathogène opportuniste causant des infections intestinales et extra-intestinales chez les humains, principalement chez les personnes immunodéprimées. Les infections à *Edwardsiella tarda* se manifestent souvent par une gastro-entérite, mais peuvent devenir systémiques et potentiellement mortelles (Avril *et al.*, 1992).

Elle utilise des facteurs de virulence qui incluent un système de sécrétion de type III qui met en jeu une vingtaine des protéines, dont beaucoup sont des homologues des composants de la biosynthèse des flagelles. Ce système permet la sécrétion de protéines responsables de l'adhérence de la bactérie à la surface cellulaire, de l'entrée de la bactérie dans des cellules non phagocytaires ou au contraire de la résistance à la phagocytose par les macrophages, et un système de sécrétion de type VI qui permet la sécrétion des complexes nucléoprotéiques ou protéiques à travers la membrane des bactéries, et jouent un rôle majeur dans l'échange des plasmides au cours de la conjugaison bactérienne (Spencer *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2005).

#### I.4.6. *Proteus*

Ce genre est largement répondeuse dans la nature. C'est un hôte normal du tube digestif de l'homme et des animaux (Delarras, 2014).

Les espèces les plus courantes sont: *P.mirabilis*, *P.vulgaris* et *P.penneri*. Ce sont des agents d'infections diverses (entérites, cystites, méningites...) (Delarras, 2014).

Ces espèces sont capables d'évoquer les événements pathologiques dans les différentes régions du corps humain. Elles ont de nombreux facteurs : fimbriaes, flagelles, les protéines de la membrane externe, lipopolysaccharide, antigène de capsule, protéases immunoglobuline A, hémolysines, qui leur permet d'être responsable de nombreuses infections.

En bactériologie médicale, ces espèces sont isolées au cours d'infections urinaires, respiratoires ou autres. En raison de leur pouvoir alcalinisant dû à l'uréase, les *Proteus* sont parfois cause de lithiases urinaires (Freney, 2007).

### **I.4.7. *Salmonella***

Les Salmonelles possèdent les caractères généraux de la famille des *Enterobacteriaceae*. Le réservoir des salmonelles ubiquistes est très large et de nombreux animaux sont susceptibles d'héberger ces bactéries (mammifères, oiseaux, reptiles, poissons, insectes) (Bertrand, 2003).

Les salmonelles ont un pouvoir entéro-invasif et elles sont responsables de salmonelloses. Les salmonelloses peuvent donner lieu à trois types de manifestations cliniques, notamment des formes septicémiques, des toxi-infections alimentaires et des manifestations extra-digestives dans lesquelles divers sérovars sont en cause et qui sont plus fréquentes chez les sujets fragilisés et parmi eux figure les infections urinaires (Bertrand, 2003).

## **II. *Pseudomonas***

### **II.1. Classification**

La classification phylogénétique du genre *Pseudomonas* est la suivante Delarras (2014) :

- Règne : *Bacteria*.
- Phylum XII : *Proteobacteria*.
- Classe : *Gammaproteobacteria*.
- Ordre : *Pseudomonadales*.
- Famille : *Pseudomonadaceae*.
- Genre : *Pseudomonas*.

Le genre *Pseudomonas* est un grand groupe bactérien particulièrement important comprend plus d'une centaines d'espèces ubiquitaires (Braun *et al.*, 2001). Cependant, depuis la découverte du genre *Pseudomonas*, beaucoup des noms d'espèces lui ont été assignés. Le nombre d'espèces a subi de nombreuses variations principalement dues à la description des nouvelles espèces et à divers changements de la définition du genre (Galloway, 1991).

### **II.2. Habitat**

Les *Pseudomonas* sont des bactéries ubiquitaires et vivent en saprophyte dans les eaux douces, l'air et dans les sols humides, ces bactéries se rencontrent dans l'environnement

hospitalier au niveau du matériel médical ou chirurgical et dans les solutions d'antiseptiques (Delarras, 2014).

### II.3. Caractères bactériologiques

#### II.3.1. Caractères morphologiques

Ce sont des bactéries à Gram négatif, se présente sous forme des bacilles fins, de forme droite ou légèrement courbée, mesure de 1 à 5  $\mu\text{m}$  de long et de 0,5 à 1  $\mu\text{m}$  de large (Figure 2). Ce sont très mobiles grâce à un flagelle polaire (ciliature monotriche), dépourvus de spores et de capsule. Ils apparaissent la plupart du temps isolés ou en diplobacilles (Galloway, 1991).



**Figure 2** : *Pseudomonas* vue au microscope électronique (grossissement  $\times 15\ 000$ ) (Galloway, 1991).

#### II.3.2. Caractères culturaux

Sa culture est facile sur milieux ordinaires ou sur milieux sélectifs (gélose ou cétrimide) qui permet la recherche et l'isolement à partir des produits biologiques (selles, urines, pus, liquide céphalo-rachidien...) en bactériologie médicale, elle pousse facilement en 24 heures à 37°C. Elle peut croître entre 5 et 42°C avec un optimum de 30°C. Par contre, elle supporte des moindres variations de pH (6.5 à 7.5) avec un pH optimal de 7.2 (Delarras, 2014).

Selon Denis (2007), trois types de colonies peuvent être observés simultanément ou de manière isolée sur milieux solides:

- Colonies larges «L» de 2 à 3 mm de diamètre à bord irrégulier.
- Colonies plus petites lisses «S» bombées à bord régulier.
- Colonies muqueuses «M» bombées.



### II.3.3. Caractères biochimiques

*Pseudomonas* est une bactérie, mobile, aérobie certaines souches peuvent cependant utiliser les nitrates comme accepteur d'électrons en croissance anaérobie, fermentant le glucose mais pas le lactose, oxydase positive, catalase négative, citrate de simmons positive, et hydrolysant la gélatine (gélatinase très active) (Walsh *et al.*, 2001).

### II.3.4. Caractères antigéniques

*Pseudomonas* possède de nombreux facteurs de virulence de surface, cette classe de facteurs joue principalement un rôle dans l'adhésion des bactéries aux surfaces et plus particulièrement aux tissus infectés. Ces facteurs sont (Prescott, 2009) :

- **Les flagelles** : elles sont le moteur principal de la bactérie qui lui confère sa capacité à déplacer. Les flagelles ont un rôle important dans la pathogénie car ils permettent l'adhésion aux cellules épithéliales.
- **Les pilis** : elles sont responsables de la mobilité des bactéries qui est due à la capacité de ces structures à adhérer sur une surface puis à se rétracter à l'intérieur de la cellule.
- **Lipopolysaccharide (LPS)** : la surface de la membrane externe des *Pseudomonas* est principalement composée de lipopolysaccharide (LPS).
- **Les exoenzymes** : elles sont produites par le système de sécrétion de type III. Elles sont au nombre de quatre chez les *Pseudomonas* :
  - **Exo S** : provoque l'inhibition des processus cellulaires comme la mobilité ou la phagocytose.
  - **Exo T** : porte les mêmes activités des « Exo S » mais cible des protéines différentes.
  - **Exo U** : elles permettent de dégrader les composants de la membrane cellulaire mais aussi des membranes des compartiments internes entraînant la lyse des cellules et une mort par nécrose.
  - **Exo Y** : conduit à la formation d'espaces entre les cellules augmentant la perméabilité et fragilisant les tissus.

## II.4. Infections nosocomiales dues à *Pseudomonas*

Plusieurs études révèlent que les *Pseudomonas* sont des bactéries pathogènes opportunistes responsables essentiellement d'infections parfois incurables et mortelles. Cette espèce possède des facteurs de virulences et manifeste vis-à-vis des antibiotiques un pouvoir d'adaptation de plus en plus grand qui aboutit à des problèmes thérapeutiques souvent aigus. Dont les espèces les plus fréquentes dans les infections nosocomiales sont *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* (Fauchere, 2002).

## II.5. Principaux *Pseudomonas* d'intérêt médical

### II.5.1. *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* (ou bacilles pyocyanique) se caractérise par la production de la pyocyanine, un pigment bleu-vert diffusible dans le milieu extracellulaire, d'où le nom de bacille pyocyanique. En fonction de la nature des antigènes O (porté par le lipopolysaccharide) différents sérotypes sont distingués (Galloway, 1991).

La virulence de *P.aeruginosa* dépend des facteurs dits cellulaires, c'est-à-dire associés à la bactérie et principalement impliqués dans l'adhérence et la mobilité et ceux dits extracellulaires, correspondant aux toxines et protéases sécrétées. *P. aeruginosa* utilise ainsi plusieurs systèmes de sécrétion pour mettre en contact les toxines produites et les cellules (Prescott, 2009).

Elle possède des fimbriaes qui permettent l'adhésion aux muqueuses. Les souches qui colonisent les bronches des enfants atteints de mucoviscidose sont entourées d'une pseudo-capsule polysaccharidique qui donne un aspect muqueux aux colonies bactériennes ce constituant augmente l'adhésion des bactéries et exerce une action anti-phagocytaire. La bactérie produit plusieurs toxines cytotoxiques : deux hémolysines et l'exotoxine A dont le mode d'action est similaire à celui de la toxine diphtérique (Prescott, 2009).

Cette espèce n'est pas pathogène pour le sujet normal, mais elle peut provoquer des infections parfois sévères chez les patients dont les défenses sont amoindries. Elle peut provoquer des infections urinaires, bronchiques, pulmonaires, oculaires, ostéo-articulaires, elle peut aussi surinfecter des lésions cutanées (brulures), des plaies traumatiques ou postopératoires, des otites externes, des septicémies et des endocardites (Figarella, 2004).

### II.5.2. *Pseudomonas fluorescens*

Cette espèce se caractérise par une fluorescence due à la production d'un pigment fluorescent jaune-vert appelé pyoverdine soluble dans l'eau et insoluble dans le chloroforme (Paulsen *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2012; Trögl *et al.*, 2012). Elle est connue pour son aptitude à réduire l'incidence des maladies racinaires des plantes, ainsi qu'à inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes (Denis *et al.*, 2007).

Cependant, actuellement peu d'études permettent de déterminer le potentiel réel de virulence de cette bactérie, qui présente pourtant de nombreux traits relatifs à un pathogène opportuniste. Le potentiel d'adaptation et de virulence de *P. fluorescens* est favorisé par des mécanismes de variations de phénotypes (Le Minor et Véron, 1984). Généralement, il infecte les patients immunodéprimés, tels que les patients atteints de cancer et ceux souffrant des maladies immunodéficiences (Avril *et al.*, 1992).

## III. *Staphylococcus*

Les Staphylocoques ont été découverts dans un pus par Pasteur en 1880. En 1883, Ogston a créé le nom de « Staphylocoque ». En 1884, Rosenbach a obtenu des cultures pures de ces bactéries. Il a scindé le genre *Staphylococcus* en deux groupes selon que les colonies étaient blanches ou dorées (Avril *et al.*, 1992).

### III.1. Classification

Selon la deuxième édition de Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology, la classification phylogénétique du genre *Staphylococcus* est (Holt *et al.*, 1994) :

- Règne : *Bacteria*
- Phylum XIII : Firmicutes
- Classe : *Bacilli*
- Ordre : *Bacillales*
- Famille : *Micrococcaceae*
- Genre : *Staphylococcus* avec trente-huit espèces et des sous-espèces.

Dix-sept de ces espèces sont commensaux des épithéliums des hommes. D'autres sont présentes chez les animaux ou dans les aliments (Delarras, 2007).

Parmi celles retrouvées chez l'Homme, trois espèces occupent une place privilégiée essentiellement dans la pathologie humaine:

- *Staphylococcus aureus* est moins fréquemment retrouvé mais il est généralement pathogène.
- *Staphylococcus epidermidis* se retrouve sur la peau de nombreuses personnes et qui provoque rarement des maladies.
- *Staphylococcus saprophyticus* est unique en ce sens qu'elle n'est responsable que d'infections urinaires.
- Les autres sont rarement impliquées (Prescott, 2009).

### III.2. Habitat

Les staphylocoques sont des germes ubiquistes qui peuvent vivre :

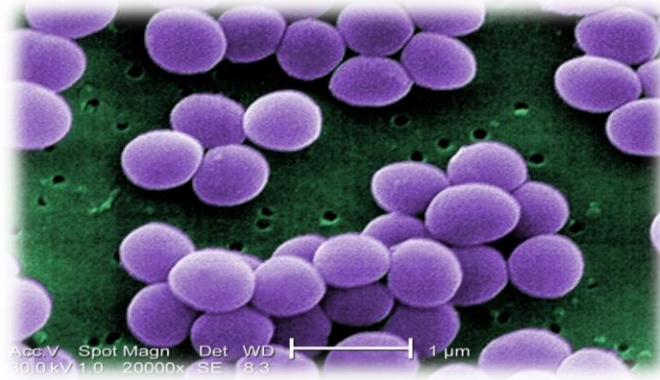
- En bactéries saprophytes dans la nature (sols, air, eaux, aliments) ;
- En bactéries commensales sur la peau et les muqueuses de l'homme et des animaux (mammifère) ;
- En bactéries pathogènes, agents d'infection humaines ou animales qui peuvent être redoutables (Delarras, 2014).

### III.3. Caractères bactériologiques

La coloration de Gram, la morphologie des colonies sur milieux gélosés et différents tests biochimiques permettent d'identifier le genre *Staphylococcus* et les espèces qui correspondent (Nauciel et Vildé, 2005).

#### III.3.1. Caractères morphologiques

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif isolés en amas, en diplocoques ou en très courtes chaînettes (3 à 5 éléments) mesurant de 0,8 à 1 µm (Figure 3). Ils sont immobiles non sporulés, parfois encapsulés, la grande majorité des souches sont capsulées, d'autres souches forment des colonies monoïdes sont entourées d'une pseudocapsule (Prescott *et al.*, 2010).



**Figure 3 :** Aspect des staphylocoques au microscope électronique (X 20000).

(Source : <http://www.futura-sciences.com>)

### III.3.2. Caractères cultureux

Comme tous les germes très répandus dans la nature, les staphylocoques sont peu exigeants sur milieu ordinaire, ils sont aérobies ou anaérobies facultatifs (quelques souches exigent le CO<sub>2</sub> pour croître) et elles donnent des colonies de 1 à 2 mm en 18 H à 37°C (Avril *et al.*, 1992).

Elles peuvent aussi croissent bien sur les milieux usuels simples à des conditions de pH et de température variables, de même que sur la plupart des milieux qui favorisent la croissance des bactéries à Gram positif. Certains facteurs de croissance sont indispensables (Vitamine B1, acide nicotinique) mais ils n'exigent pas de biotine ni de tryptophane, ils poussent en milieu synthétique contenant des sels, du glucose et un de quatorze acides aminés dont la cystéine, la thiamine et l'acide nicotinique. Elle est même capable de pousser dans des conditions hostiles, par exemple en présence de 7 % de NaCl. Ce caractère est mis à profit dans le milieu de culture sélectif hypersalé de Chapman pour isoler le staphylocoque d'un prélèvement polymicrobien (Fauchere, 2002).

### III.3.3. Caractère biochimiques

Les staphylocoques sont tous des catalase et oxydase positive, possèdent un métabolisme aérobie prédominant et anaérobie facultatif. Toutefois sont capables de fermenter des divers sucres. D'autres caractères peuvent être recherchés : indole (+), acétoïne (+), uréase(+), réduction de tellurite de potassium, des nitrates en nitrite, production d'ammoniaque à partir de l'arginine, sont habituellement capable de fermenter le mannitol.

Ce caractère est souvent, mais pas obligatoirement, associé à la pathogénicité (Figarella, 2004).

La production d'une coagulase, d'un pigment caroténoïde jaune doré et la présence d'une protéine A de paroi caractérisent *Staphylococcus aureus*. Par contre les autres espèces sont regroupées sous le terme de staphylocoques à coagulas négative (SCN), dont le représentant principal est *S. epidermidis* (El Kouir, 2003).

### III.3.4. Caractère antigénique

La paroi des staphylocoques contient (Freney *et al.*, 2000):

- Des antigènes capsulaires, de nature polysaccharidique.
- Des antigènes pariétaux constitués par le peptidoglycane.
- Les acides teichoïques, à base de polyribitol chez *S. aureus* et de polyglycérol chez *S. albus*. Cet acide est très résistant au lysozyme et aux enzymes des globules blancs.

### III.4. Infections nosocomiales dues aux *Staphylocoques*

Les staphylocoques sont responsables de la plupart des infections nosocomiales dont l'incidence élevée est expliquée par (Avril *et al.*, 1992) :

- L'emploi intensif d'antibiotiques qui sélectionnent, dans l'écosystème hospitalier, des souches résistantes.
- La fragilité des malades.
- Les soins ou traitements de plus en plus hardis mais de plus en plus agressifs qu'ils subissent.

Les voies d'entrée sont iatrogènes (aiguilles, sondes, canules, cathéters, perfuseurs, drains ...), ils sont aussi pathogènes à cause des toxines qu'ils fabriquent. Parmi ces infections:

- **Infections cutané-muqueuses**

Les principales staphylococcies cutanées focales sont dues à la pénétration des germes au niveau des annexes de la peau (follicules pilo-sébacés, glandes sudoripares) ou dans les muqueuses à l'occasion d'une plaie, même minime (Avril *et al.*, 1992) .

Les infections cutanéomuqueuses sont parfois le point de départ de suppurations profondes (pleuro-pulmonaires, génito-urinaires...) ou d'infections générales (septicémie) (Freney *et al.*, 2000).

- **Syndrome de Ritter ou SSSS (staphylococcal scalded skin syndrom)**

Improprement appelé syndrome de Lyell plus fréquent chez l'enfant, est caractérisé par une érythrodermie bulleuse avec fièvre évoquant une brûlure du second degré (Fauchere, 2002).

- **Manifestations intestinales**

Ces infections sont provoquées par les staphylocoques entérotoxinogènes, elles se présentent sous deux formes (Fauchere, 2002):

- **Toxi-infections alimentaires** : sont les plus fréquentes, ce sont des troubles digestifs provoqués par l'ingestion d'aliments contenant l'entérotoxine préformée, d'incubation très courte (une heure à six heures après le repas) et évoluant sans fièvre.
- **Entérocolite aiguë pseudomembraneuse** : plus rare, survenant chez des sujets ayant reçu une antibiothérapie qui a sélectionné une souche intestinale de *S. aureus* résistante au traitement et sécrétrice d'entérotoxine.

### III.5. Principaux staphylocoques d'intérêt médical

#### III.5.1. *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* est l'espèce majeure, d'origine humaine, animale, environnementale. Cette bactérie non productrice des spores mais résistante, peut survivre longtemps sur des objets inanimés et secs, elle résiste aussi relativement bien à la chaleur (Avril *et al.*, 1992).

*S. aureus* exprime de nombreux facteurs de virulence (Courvalin *et al.*, 2006) :

- Protéine de surface qui initialise la colonisation des tissus de l'hôte.
- Facteurs inhibant la phagocytose.
- Toxine qui provoque des syndromes pathologiques.

*S. aureus* provoque deux types de syndromes (Freney *et al.*, 2000) :

- Les toxi-infections ou toxémies staphylococciques qui sont dues à des toxines produites par la souche *in vivo* (toxine du choc toxique staphylococcique) ou introduites préformées dans l'organisme (entérostomies dans les aliments). L'ingestion de toxine en dehors de toute cellule bactérienne suffit à reproduire la maladie.
- Les infections suppuratives impliquent la prolifération bactérienne, l'invasion, la destruction des tissus de l'hôte et la réponse inflammatoire locale et systémique (infections de la peau et des tissus mous, infections de tractus respiratoire, infections du système nerveux central, infections urinaires, infections endovasculaires et valvulaires cardiaques, infections musculaires et osseuses).

### III.5.2. *Staphylococcus epidermidis*

*S. epidermidis* est appelée aussi « staphylocoque blanc », c'est une bactérie non pathogène, néanmoins, lorsque les défenses immunitaires baissent, elle a un pouvoir pathogène lié à l'expression des facteurs de virulence (Avril *et al.*, 1992).

C'est l'un des agents les plus importants des infections acquises dans les hôpitaux en rapport avec leur capacité d'adhésion aux matériels étrangers car ils élaborent une substance polysaccharidique dénommée "slime" qui facilite cette adhérence. Parmi ces infections : les infections dermatologiques et les infections nasales (sinusites) ou encore les infections urinaires chez la femme et plus rarement chez l'homme (Vuong et Otto, 2002).

*Staphylococcus epidermidis* se rencontre parfois dans des septicémies chez des individus débilisés (surtout porteurs des prothèses cardiaques) et aussi d'endocardites et d'infections localisées chez les patients immunodéprimés (Nauciel et vildé, 2005).

### III.5.3. *Staphylococcus saprophyticus*

*S. saprophyticus* est un *Staphylococcus* à coagulase négatif, connu comme responsable d'infection urinaire dès 1962 (Nauciel et vildé, 2005).

La faculté d'adhérer aux cellules uro-épithéliales de cette bactérie joue un grand rôle dans sa pathogénicité. Ces infections urinaires surviennent chez la femme jeune (15-25 ans), non hospitalisée, enceinte ou non (18-50 ans), Il a également été rapporté chez l'homme de tout âge et dans des infections plus sévères, comme : des pyélonéphrites aiguës, des



prostatites, des péritonites ou des endocardites. La symptomatologie clinique des infections urinaires à *S. saprophyticus* est similaire à celle dues à *Escherichia coli* (Nauciel et vildé, 2005).

#### III.5.4. *Staphylococcus xylosus*

*S. xylosus* possède peu d'exigences nutritionnelles et elle est capable de s'adapter à des environnements variés ce qui lui permet de coloniser plusieurs objets et aliments (Nauciel et vildé, 2005).

C'est une bactérie commensale de la peau des petits mammifères et des animaux de ferme, où elle constitue la flore majoritaire. Cette espèce se trouve également sur la peau de l'homme mais son occurrence reste peu importante (Nauciel et vildé, 2005).

Tselenis-Kotsowilis *et al.* (1982) ont montré, pour la première fois, une infection humaine associée à une souche de *S. xylosus*. Cette espèce a été associée à : dermatite nasale chez les gerbilles, pyélonéphrite chez l'homme, staphylococcose aviaire, infection inter mammaire bovine (Thornton *et al.*, 2003).

*S. xylosus* est capable de produire une entérotoxine qui agit comme un super antigène sur les lymphocytes et induisent la production de diverses cytokines inflammatoires (Vernozy-Rozand *et al.*, 1996; Balaban et Rasooly, 2000).

Planchon *et al.* (2006) ont montré que la grande majorité des souches de l'espèce *S. xylosus* avait la capacité à former des biofilms sur des supports abiotiques. Cette formation est effectuée grâce à une diversité des propriétés de surface qui a été observée par ces auteurs, ils ont observés par microscopie environnementale que les cellules sessiles de *S. xylosus* étaient adhérentes sur le support abiotique, agrégées et entourées dans une matrice amorphe avec la présence d'espaces entre les amas cellulaires.

---

**Chapitre II :**  
*Agents antibactériens  
et mécanismes de  
résistance*

---

## I. Antibiotiques

### I.1. Définition

La médecine moderne dépend des agents chimio-thérapeutiques, qui sont des agents chimiques employés pour le traitement des maladies, la plupart de ces agents sont des antibiotiques (Weiss, 2002).

Les antibiotiques sont des produits utilisés pour la première fois en 1889, synthétisés par un organisme pour en détruire un autre (Guardabassi et Courvalin, 2006).

Chaque antibiotique à une spécificité d'action, ils agissent à faible doses et doivent présenter certains caractères pour être actifs sur les micro-organismes, à savoir (Boulahbal, 2002):

- Activité antibactérienne.
- Toxicité sélective.
- Activité en milieu organique.
- Bonne absorption et diffusion dans l'organisme.

### I.2. Classification

#### I.2.1. Critères de classification

Les antibiotiques sont classés en fonction de certains critères (Talbert *et al.*, 2009):

- **Origine**

Les antibiotiques naturels sont élaborés par des micro-organismes. Ceux dites synthétiques, sont obtenus en recréant des substances primitivement extraites des microorganismes. Les antibiotiques semi-synthétiques, sont obtenus en modifiant au laboratoire la structure produite par un micro-organisme (Yala *et al.*, 2001).

- **Spectre d'activité**

Il est destiné à caractériser l'activité microbiologique d'un antibiotique sur une espèce bactérienne (Merens et Cavallo, 2008). Pour un antibiotique donné l'activité antibactérienne ne s'exerce que vis-à-vis de certaines espèces bactériennes, ce qui définit son spectre d'activité (Nauciel et Vildé, 2005). Qui est soit :

- Étroit (efficacité des antibiotiques sur une variété restreinte des bactéries).
- Large (les antibiotiques attaquent de nombreux types des bactéries) (Delery, 1999).

- **Nature chimique**

Très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex : cycle  $\beta$  lactame) sur laquelle il y a hémi synthèse (Yala *et al.*, 2001). Ce caractère classe les antibiotiques en différentes familles au sein desquelles peuvent exister des groupes ou sous-groupes. En général, une parenté structurale s'associera un même mode d'action (sur une même cible) et un même mécanisme de résistance (Courvalin, 2008).

- **Mode et modalité d'action**

En fonction de la concentration d'antibiotique et du temps de contact entre celui-ci et la bactérie, l'effet peut être simplement (Gaudy, 2005):

- Une action bactériostatique, qui inhibe la croissance bactérienne en ralentissant puis arrêtant la multiplication.
- Une action bactéricide, qui détruit ou lysent les bactéries définitivement.

### I.2.2. Classes des antibiotiques

La classification la plus courante des antibiotiques est motionnée dans le tableau 2.

**Tableau 2 :** Classification des principaux antibiotiques (Rahal, 2013).

Mode d'action	Famille	Principaux sous-groupes ou antibiotiques	Spécificité d'activité (général)
Inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane	$\beta$ -lactamines	- Pénicilline G. - Pénicillines M. - Amidino-pénicillines. - Céphalosporines de 1 <sup>ère</sup> génération. - Monobactams.	Étroit
		- Aminopénicillines (Amoxicilline). - Carboxy-pénicillines. - Uréido-pénicillines. - Céphalosporines de 2 <sup>ème</sup> et 3 <sup>ème</sup> génération (Céfotaxime). - Céphalosporines de 4 <sup>ème</sup> génération. - Carbapénèmes (Imipénème).	Large
	<b>Fosfomycine</b>	- Fosfomycine.	
	<b>Glycopeptides</b>	- Vancomycine.	Étroit

Tableau 2 (Suite) :

Mode d'action	Famille	Principaux sous groupe ou antibiotiques	Spectre d'activité (général)
Action sur la membrane cytoplasmique	<b>Polymixines</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Polymixine B.</li> <li>- Colistine.</li> <li>- Bacitracine.</li> <li>- Tyrocidine.</li> </ul>	Étroit
Inhibiteurs de la synthèse des protéines	<b>Aminosides ou Aminoglycoside</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Streptomycine.</li> <li>- Amikacine.</li> <li>- Gentamicine.</li> </ul>	Large
	<b>Tétracyclines</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Oxytétracycline.</li> <li>- Chlortétracycline.</li> </ul>	
	<b>Acide fusidique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acide fusidique.</li> </ul>	
	<b>Macrolides-Lincosamides-Streptogramines (MLS)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Macrolides : (Erythromycine).</li> <li>- Lincosamides : (Lincomycine).</li> <li>- Streptogramines : (Pristinamycine).</li> </ul>	Étroit
	<b>Phénicolés</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Chloramphénicol.</li> </ul>	
Inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques	<b>Quinolones et Fluoroquinolones</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Quinolones : (Acide nalidixique).</li> <li>- Fluoroquinolones : (Ciprofloxacine).</li> </ul>	Étroit
	<b>Rifamycines</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rifaximine.</li> <li>- Rifamycine SV.</li> </ul>	
	<b>Novobiocines et Nitro-imidazoles</b>	Pas de sous-groupe.	
	<b>Nitrofuranes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nitrofurantoïne.</li> <li>- Furazolidone.</li> </ul>	Large
Inhibiteurs de la synthèse des folates	<b>Sulfamides</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sulfapyridine.</li> <li>- Sulfaméthoxydiazine.</li> <li>- Sulfaguanidine.</li> </ul>	
	<b>2-4 diaminoptéridine</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Trimethoprime.</li> </ul>	
	<b>Association Sulfamides+ Trimethoprime</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sulfaméthoxazole + Trimethoprime (Cotrimoxazole).</li> </ul>	

### I.3. Mécanismes d'action des antibiotiques

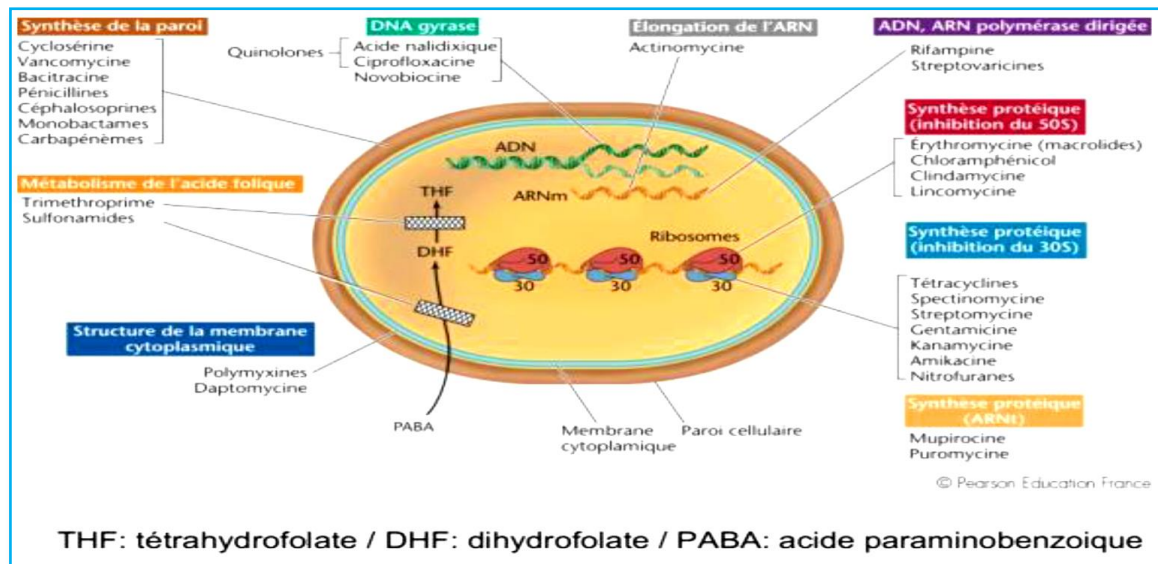
Les antibiotiques exercent leurs effets au niveau moléculaire de certaines structures des bactéries en un point précis dénommé site d'action ou cible moléculaire, selon ces cibles l'antibiotiques peuvent agir sur quatre parties différentes de la structure bactérienne par différentes modalités d'action (Figure 4) (Rahal, 2013):

- Antibiotiques qui inhibent la synthèse de la paroi bactérienne : ils bloquent la synthèse du peptidoglycane, la cellule s'allonge sans faire de paroi (cloison) et elle explose sous l'effet de la pression osmotique interne (Yala *et al.*, 2001).
- Antibiotiques qui altèrent la perméabilité de la membrane plasmique : ils s'insèrent parmi les phospholipides de la membrane externe ce qui perturbe la perméabilité membranaire (augmentation anormale) et permet la diffusion de substances hydrosolubles hors de la bactérie ce qui entraîne sa destruction (Avril *et al.*, 2002).
- Antibiotiques qui inhibent la synthèse protéique : en se fixant préférentiellement sur le ribosome procaryote soit sur la sous-unité 30S et/ou la sous unité 50S des ribosomes et cela au niveau de l'une des étapes de la traduction. Ces molécules 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).
- Antibiotiques actifs sur le métabolisme des acides nucléiques et de leurs précurseurs : ces antibiotiques agissent en inhibant la synthèse des acides nucléiques à différents niveaux du métabolisme, en inhibant l'ADN polymérase, et l'ADN hélicase ou l'ARN polymérase, en bloquant de ce fait respectivement la réplication ou la transcription (Gaudy, 2005 ; Prescott *et al.*, 2010).

Pour qu'un antibiotique fonctionne correctement, il est nécessaire de savoir les conditions d'action suivantes :

- Une cible bactérienne spécifique.
- Forme active.
- Accéder à la cible.
- Interagir efficacement avec la cible, en l'inactivant.

Si une de ces conditions est absente, la bactérie est nommée résistante (Rahal, 2013).



**Figure 4 :** Différents modes d'action des antibiotiques (Favet, 2013).

## I.4. Résistance bactérienne aux antibiotiques

### I.4.1. Définition

Il existe plusieurs approches et définition de la résistance, l'organisation mondiale de la santé a défini la résistance bactérienne aux antibiotiques dès 1961 comme suite : « Une bactérie est dite résistante quand elle échappe à l'action de l'antibiotique supposé actif, prescrit au malade, c'est ce qui se manifeste par un échec clinique relatif ou absolu de l'antibiothérapie. » (Weiss, 2002).

Il existe deux grands types de résistance aux antibiotiques, la résistance intrinsèque et la résistance acquise :

- **Résistance naturelle :**

Cette résistance, généralement chromosomique, est présente chez toutes les souches d'une même espèce ou d'un même genre bactérien. Elle délimite le spectre d'action des antibiotiques et elle est due soit à une absence de cible pour l'antibiotique soit à une imperméabilité de la paroi à cet antibiotique (Freney *et al.*, 2000). Cette résistance n'est pas transférable horizontalement et elle ne présente donc aucun risque chez les bactéries pathogènes (Normark et Normar, 2002).

- **Résistance acquise :**

Cette résistance ne concerne que quelques souches d'une même espèce ou d'un même genre, normalement sensible à un antibiotique donné, elle est due à :

- Des modifications génétiques chromosomiques ou extra chromosomiques : mutation sur des gènes existants (gènes codant à des mécanismes, gènes régulateurs...).
- Ou par incorporation de nouveaux gènes codant à des mécanismes de résistances. Cette résistance peut être disséminée par transfert horizontal entre bactéries (Muylaert et Mainil, 2012).

#### I.4.2. Mécanismes de résistance aux antibiotiques

Plusieurs mécanismes soient souvent impliqués simultanément dans la résistance aux antibiotiques, dans la présente étude, nous nous limitons à décrire les mécanismes de résistances des trois groupes bactériens : entérobactéries, *Pseudomonas* et staphylocoques.

##### I.4.2.1. Résistance des entérobactéries aux antibiotiques

- **Résistance aux  $\beta$ -lactamines**

Les entérobactéries utilisent différents mécanismes pour développer une résistance aux  $\beta$ -lactamines il peut s'agir d'une:

- **Diminution de la perméabilité**

La membrane externe des entérobactéries est formée de lipopolysaccharide (LPS) dont la structure est hydrophile grâce à ses charges électriques de surface et très compacte en profondeur grâce à ses acides gras insaturés. Cette organisation explique une résistance naturelle aux antibiotiques hydrophobes comme les  $\beta$ -lactamines (Kumar et Schweizer, 2005).

Les  $\beta$ -lactamines hydrophiles peuvent également traverser la membrane externe en empruntant cette voie (porines OmpF et OmpC chez *Escherichia coli* et leur équivalent OmpK36, OmpD et Omp36 chez *Klebsiella spp*, *Salmonella typhimurium*). Cependant, des résistances acquises par diminution de la perméabilité de paroi ont été rapportées chez *E. coli*, *Proteus*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter* et *Serratia* suite à une altération quantitative ou qualitative des porines (Courvalin *et al.*, 2006).

- **Excrétion par des systèmes d'efflux**

Le système d'efflux actif est efficace grâce aux protéines transmembranaires ancrées dans la membrane plasmique mais également dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif (Walsh, 2003). Ces protéines sont (Courvalin *et al.*, 2006):

- Une, insérée dans la membrane cytoplasmique jouant le rôle de pompe.
- Une seconde, insérée dans la membrane externe assurant le passage au travers de la membrane externe.



- Une troisième, péri plasmique qui formerait un lien entre la pompe et la protéine de membrane externe.

Des mutations dans les régions régulatrices des opérons des systèmes d'efflux multi-drogues peuvent conduire à une surexpression des systèmes d'efflux constitutifs, associée ou non à une perte des porines, et conférer une multi-résistance aux antibiotiques.

- **Modification des PLP**

La résistance aux  $\beta$ -lactamines, conférée par les PLPs, chez les entérobactéries reste très rare comparativement aux bactéries à Gram positif. Cette résistance peut avoir lieu par des mutations dans les gènes chromosomiques codant pour les PLPs ou par l'acquisition de gènes étrangers codant pour des nouveaux PLPs ayant une affinité différente aux  $\beta$ -lactamines (Courvalin *et al.*, 2006).

- **Production de  $\beta$ -lactamases**

Chez les entérobactéries, la production de  $\beta$ -lactamases est le mécanisme prédominant de résistance aux  $\beta$ -lactamines (Livermore, 2003). Le processus enzymatique repose sur un résidu sérine actif chez les enzymes les plus fréquentes ou sur un ion métallique  $Zn^{2+}$ . Dans les deux cas l'inactivation des  $\beta$ -lactamines est due à l'ouverture du cycle  $\beta$ -lactame au niveau de la liaison amide, selon une réaction d'hydrolyse suite à l'activation d'une molécule d'eau (Freney *et al.*, 2000).

Certaines entérobactéries (*Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *E.coli*...) sont productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE) qui engendrent une résistance à la majorité des  $\beta$ -lactamines. Leur apparition dans les bactéries à Gram négatif et leur dissémination coïncidente avec l'utilisation d'antibiotiques à large spectre tels que les céphalosporines et les quinolones. La majorité des BLSE sont le résultat de mutations génétiques de  $\beta$ -lactamases naturelles. 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 (aztréoname). Les bactéries produisant une BLSE n'hydrolysent pas les céphamycines (céfoxitine) ni les carbapénèmes (Paterson et Bonomo, 2005).

- **Résistance aux aminosides**
  - **Modification 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 résistance. 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 (Freney *et al.*, 2000).

- **Modification du transport de l'antibiotique (Imperméabilité)**

Le transport des aminosides à l'intérieur des bactéries comporte deux étapes qui peuvent être l'objectif de mutations (Freney *et al.*, 2000) :

- Diffusion passive à travers les porines de la membrane externe. La pénétration des aminosides à travers la membrane externe suscite encore des interrogations mais il est clair qu'ils n'empruntent pas exclusivement la voie conventionnelle des porines.
- Transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

- **Modification de l'antibiotique**

La modification enzymatique des aminosides méditée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontrés en clinique. Trois classes d'enzymes modificatrices des aminosides ont été définies en fonction de la réaction qu'elles catalysent (Freney *et al.*, 2000):

- acétylation d'un groupement aminé (Acétylarnsférase AAC).
- Phosphorylation ou nucléotidylation d'un groupement hydroxyle (phosphotransférase APH), (Nucléotidyltransférase ANT).

- **Résistance aux phénicoles et diaminopyrimidines**

- La résistance au chloramphénicol chez certaines entérobactéries est une résistance plasmidique due à la production d'enzyme *CAT* "chloramphénicol acétyltransférase". Chez *Salmonella typhi*, de véritables épidémies de résistance au chloramphénicol par production d'enzyme ont modifié le schéma classique du traitement de la fièvre typhoïde (Freney *et al.*, 2000).
- La résistance à la triméthoprime, antibiotique appartient à la classe de diaminopyrimidine s'effectue soit par modification quantitative de l'acide dihydrofolique due à une mutation chromosomique ou par diminution de la perméabilité membranaire due à une diminution de la production des porines, ce mécanisme est le plus souvent chez deux genres *Salmonella* et *Klebsiella* (Freney *et al.*, 2000).

#### I.4.2.2. Résistance de *Pseudomonas* aux antibiotiques

- **Résistance aux  $\beta$ -lactamines**

- **Résistance naturelle**

*Pseudomonas* est naturellement résistant à un grand nombre d'antibiotiques en raison de la production d'une  $\beta$ -lactamase chromosomique inductible de classe C qui n'est pas inhibée par le clavulanate et qui hydrolyse préférentiellement les céphalosporines de première génération. Cette résistance naturelle est due aussi à une mauvaise perméabilité membranaire à laquelle s'ajoute le système d'efflux actif (Cattoir, 2004).

- **Résistance acquise**

Les *Pseudomonas* peuvent également acquérir une 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 du matériel génétique étranger (Courvalin *et al.*, 2006)

- **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 (Philippon et Arlet, 2006). Cinq types de BLSE de classe A (TEM, SHV, PER, VEB et GES) ont été détectés chez *P. aeruginosa*. Ces BLSE ont un spectre d'activité équivalent à celui des TEM isolées chez les entérobactéries (Wang et al., 2006).

- La  $\beta$ -lactamase chromosomique de type AmpC a été décrite chez une large variété des bacilles à Gram négatifs tel que *P. aeruginosa* (Parveen et al., 2010). 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 (Poirel, 2006). La régulation de l'expression de la  $\beta$ -lactamase AmpC fait intervenir les gènes *ampR*, *ampD*, *ampG* (Gautier, 2007).
- Des BLSE dérivées d'oxacillinase de classe 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). Elles hydrolysent la plus part des  $\beta$ -lactamines y compris les céphalosporines, l'imipénème et le méropénème. Leur activité n'est pas inhibée par l'acide clavulanique ou le tazobactam (Pechère et Köhler., 2008). L'OXA-18 est la seule  $\beta$ -lactamase de classe D inhibée par l'acide clavulanique identifiée chez *P.aeruginosa*, *blaOXA-18* est localisé au niveau du chromosome (Naas et al., 1999).
- La carbapénémases de classe B est la cause de la résistance acquise aux carbapénèmes (imipénème) initialement rapportée comme liée à un déficit de la porine OprD2 (Philippon et Arlet., 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 (Pechère et Köhler., 2008).

- Perte de la porine OprD2 : 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 (Barbier et Wolff., 2010).

- **Résistance aux aminosides.**

Les antibiotiques aminoglycosides ont été utilisés pendant de nombreuses années contre les *Pseudomonas*.

Le mécanisme majeur de résistance à ces antibiotiques repose sur la modification enzymatique de certains groupements chimiques de ces antibiotiques. Trois classes d'enzymes ont été décrits chez *P. aeruginosa* : les N-amino-acétyltransférases (AAC) qui catalysent l'acétylation des fonctions  $-NH_2$ , les O-phosphotransférases (APH) et les Onucléotidyltransférase (ANT) qui permettent respectivement la phosphorylation et la nucléotidylation des fonctions  $-OH$  (Courvalin *et al.*, 2006).

Considérant que, chez les *Pseudomonas* le mécanisme d'efflux est décrit comme le premier choix de la résistance aux aminosides, la modification de la cible (ARNr 16S) a également représenté plusieurs cas de résistance aux aminosides (Kettner *et al.*, 1995).

- **Résistance aux phénicoles et diaminopyrimidines**

Les *Pseudomonas* ont des mécanismes de résistances au chloramphénicol et au triméthoprime équivalentes à celles observées chez les entérobactéries (Freney *et al.*, 2000).

#### I.4.2.3. Résistance des staphylocoques aux antibiotiques

- **Résistance aux  $\beta$ -lactamines**

Deux mécanismes expliquent la résistance des staphylocoques aux  $\beta$ -lactamines : la production de  $\beta$ -lactamase et la modification de cible, pour ce dernier mécanisme, deux possibilités existent : l'acquisition d'une PLP exogène et /ou la modification des PLP endogènes (Courvalin *et al.* 2006).

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 (Courvalin *et al.*, 2006).

Le mécanisme de résistance à la pénicilline repose sur la synthèse par les bactéries d'une pénicillinase. Cette enzyme plasmidique inductible hydrolyse le cycle  $\beta$ -lactame des pénicillines A et G les rendent inactifs (Courvalin *et al.*, 2006).

- **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, gentamycine, nétilmicine) est surtout dû à la production par les staphylocoques d'enzyme modifiant la cible ribosomale. Il existe trois enzymes de résistance, chacune d'entre elles conférant un phénotype de résistance spécifique aux aminosides. Ces enzymes (acétyltransférase, nucléotidyl-tracférase et phosphotransférases) sont codées par des gènes plasmidiques ou transposables (Bismith et Leclercq, 2000).

- **Résistance aux glycopeptides**

Les glycopeptides (teicoplanine et vancomycines), sont utilisés en alternative aux  $\beta$ -lactamines dans le traitement des infections à staphylocoques dorés méthicillino-résistance.

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. Cette résistance est due à des mutations obtenues après transfert conjugatif de l'opéron de gènes *vanA* codant pour la résistance à la vancomycine chez les entérocoques résistants aux glycopeptides (Avril et fauchère, 2002).

- **Résistance aux Macrolides, Lincosamide, Streptogramine (MLS)**

Les MLS sont des inhibiteurs de la synthèse protéique en stimulant la dissociation entre ribosome et ARN de transfert. La résistance aux MLS est due à trois mécanismes:

- La modification de la cible des antibiotiques 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 (Quincampoix et Mainardi, 2001).
- Les mécanismes d'efflux actif ne touchent que les antibiotiques de structure apparentée (Leclercq, 2002).
- L'inactivation enzymatique est due à diverses enzymatiques spécifiques. Les lincosamides peuvent être inactivées 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 (Leclercq, 2002).
- **Résistance aux phénicoles et diaminopyrimidines**
  - La résistance au chloramphénicol est principalement due à la présence d'un gène *Cat* codant pour une enzyme, le chloramphénicol acétyltransférase (CAT), ou par le mécanisme de l'efflux actif (Courvalin *et al.*, 2006).
  - La résistance des souches de staphylococques principalement *Staphylococcus aureus* à la triméthoprime est due à une modification qualitative des séquences nucléotidiques des gènes codés pour la cible du triméthoprime (Courvalin *et al.*, 2006).

## II. Cuivre

### II.1. Définition

Élément chimique de symbole Cu et de numéro atomique  $Z = 29$  ; de masse atomique 63.546, le cuivre est un métal rougeâtre, malléable et ductile, qui conduit bien la chaleur et l'électricité. Il résiste à l'air et à l'eau mais se patine lentement en présence de carbonate. Il est présent dans la nature sous forme de minerais de cuivre natif, de minerais oxydés ou sulfurés. En métallurgie, il entre dans de nombreux alliages comme le laiton (cuivre et zinc), le bronze (cuivre et étain), le maillechort (cuivre, nickel et zinc) ; c'est un métal indispensable dans un grand nombre d'applications domestiques et industrielles (Cooksey, 1994).

Les sels de cuivre (sulfate, acétate, dérivés organiques) sont utilisés comme fongicides ou algicides en agriculture, pour les traitements chimiques de surface, la fabrication de peintures et de céramiques (O'Gorman et Humphreys, 2012).

## II.2. Propriétés antibactériennes du cuivre

L'homme a exploité les propriétés naturellement antibactériennes du cuivre depuis les tous premiers âges. Il a été clairement démontré par de nombreuses études scientifiques menées depuis des décennies que le cuivre est capable d'éradiquer les bactéries les plus résistantes, les moisissures et les virus (O'Gorman et Humphreys, 2012).

La littérature scientifique cite l'efficacité du cuivre pour tuer et inactiver plusieurs types de bactéries pathogènes, moisissures et virus dont : *Acinetobacter baumannii*, Adénovirus, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Helicobacter pylori*, virus de la Grippe A (H1N1), *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, Poliovirus, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, entérocoque résistant, staphylocoque doré résistant à la Vancomycine et à la méthicilline (Warnes et Keevil, 2011).

## II.3. Mécanismes d'action du cuivre

La destruction des microorganismes en contact du cuivre ne résulte pas d'un simple mécanisme mais d'une multitude de facteurs (O'Gorman et Humphreys, 2012).

### II.3.1. Stress oxydatif

Le cuivre a comme capacité de donner ou de recevoir des électrons. Grâce à cela, il peut se changer en différents états d'oxydation entre  $\text{Cu}^+$  et  $\text{Cu}^{2+}$ . Ceci permet au cuivre d'agir en catalyseur dans la production d'espèces réactives de l'oxygène comme les radicaux hydroxyles ( $\text{OH}^\cdot$ ) et les anions superoxydes ( $\text{O}_2^\cdot-$ ) (O'Gorman et Humphreys, 2012).

Des différentes recherches montrent que les radicaux hydroxyles ne sont pas principalement responsables des destructions cellulaires par le mécanisme du cuivre, alors que ce sont les ions super oxydes  $\text{Cu}^+$  qui interviennent en premier lieu contre les bactéries, puis les ions  $\text{Cu}^{2+}$  qui continuent sur le long terme (Weaver et al., 2009).



### II.3.2. Dépolarisation des membranes cytoplasmiques

Les ions cuivre peuvent rentrer en concurrence avec les ions Zn ou autres ions sur d'importants sites de liaison aux protéines, ceci menant à des changements conformationnels et à la perte des fonctions des protéines (O'Gorman et Humphreys, 2012), il peut ainsi inactiver les enzymes cytoplasmiques servant à la fabrication de chaînes ramifiées d'acides-aminés surtout du glutamate et de potassium, ce qui suggère des lésions sélectives sur la membrane plasmique (Esperito-santo *et al.*, 2011).

Certaines études montrent que la dépolarisation des membranes cytoplasmiques est le mécanisme principal de l'effet antimicrobien du cuivre car le contact des cellules bactériennes avec le cuivre ne les brisent pas et ne provoque pas de fuite de matériel, mais les rendent plutôt perméables et les déstabilisent, ce qui les rend plus susceptibles d'être victimes de ruptures par forces physiques (Esperito santo *et al.*, 2011).

### II.3.3. Désintégration de l'ADN

Le mécanisme de destruction cellulaire après exposition au cuivre n'était pas connu en 2007. Cependant les résultats de tests faits avec des *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline suggèrent que c'est le matériel génétique qui est dégradé. Ils ont été aussi démontré que les ions cuivre ont la capacité de changer l'arrangement de l'ADN en s'y attachant et en changeant sa conformation (Noyce *et al.*, 2007).

Des études faites par Warnes et Keevil (2011) suggèrent que la dégradation de l'ADN est une part active du mécanisme de mort cellulaire par le cuivre. Ils avancent que l'ADN est la cible principale de la toxicité du cuivre, ce qui mène à une fragmentation rapide de l'ADN immédiatement lors du contact aux ions cuivreux et qui apparaît au premier stade de la mort cellulaire.

D'autres auteurs suggèrent que la désintégration de l'ADN n'est qu'un phénomène secondaire (Esperito Santo *et al.*, 2011).

A ce point des connaissances, il apparaît que la destruction des microorganismes par contact avec le cuivre arrive successivement par (Esperito santo *et al.*, 2011):

- Des dommages au niveau de la membrane.
- L'influx de cuivre à l'intérieur de la cellule.
- Des dommages d'oxydation qui en découlent.

A ce moment-là, la cellule est morte. Puis, arrive ensuite la dégradation de l'ADN

#### II.4. Mécanismes de résistance au cuivre

Les micro-organismes (en excluant les virus), (Borkow et Gabbay, 2004) ont développés des systèmes complexes pour maintenir des taux précis d'ions cuivre au niveau intracellulaire. Quatre mécanismes de résistance bactérienne au cuivre sont apparus

(Hasman et Aarestrup, 2002 ; Espirito Santo *et al.*, 2008 ; O'Gorman et Humphreys, 2012) :

- Exclusion du métal par la barrière de la perméabilité ou maintien de l'ion toxique hors de la cellule (réduction de l'absorption).
- Pompage par efflux très spécifique (élimination des ions toxiques qui sont entrés dans la cellule au moyen de systèmes impliqués dans le transport de cations ou d'anions). Ces pompes efflux peuvent être des ATPases ou des canaux chimiosmotiques.
- Séquestration intracellulaire ou extracellulaire par des composants fixateurs d'ions métalliques spécifiques et/ou ségrégation en composés complexes.
- Détoxification enzymatique (oxydoréduction) qui convertit un ion très toxique en un ion moins toxique.

Les deux premiers mécanismes peuvent être groupés sous le terme éloignement (maintenir à distance) alors que les deux derniers sont connus comme des mécanismes de séquestration.

Les pressions sélectives exercées par les environnements chargés de métaux ont entraîné le développement de systèmes de résistance pour la plupart des métaux. Ces systèmes sont surtout de type plasmidique, très spécifiques et sont présents virtuellement chez tous les groupes bactériens. Les modifications dans la paroi cellulaire, la membrane, ou l'enveloppe d'un microorganisme sont des exemples d'exclusion du métal par la barrière de la perméabilité membranaire. Ce mécanisme est une tentative effectuée par l'organisme pour protéger les composants cellulaires essentiels sensibles aux métaux, un exemple frappant est l'exclusion de  $\text{Cu}^{2+}$  résultant de l'altération de la production de la protéine porine au niveau du canal membranaire chez *E. coli* (Rouch *et al.*, 1995).

---

**Deuxième partie :**  
*Étude expérimentale*

---

---

# **Chapitre III :**

## ***Matériel et méthodes***

---

Durant notre étude, les travaux expérimentaux ont été réalisés au niveau du Laboratoire de Microbiologie de Département de Biologie à l'Université 8 Mai 1945 de Guelma.

## I. Souches bactériennes d'intérêt clinique

### I.1. Collecte des bactéries

Pendant le mois de Février (2016 et 2017), 25 souches bactériennes ont été collectées du laboratoire de microbiologie de l'hôpital IBN ZOHR à Guelma, la direction de la santé de Guelma (DDS) et le laboratoire privé des analyses médicales Kariche Karima à Guelma.

Un totale de 16 entérobactéries (E1 – E16), 4 *Pseudomonas* (P1 – P4) et 5 staphylocoques (S1 – S5) ont été collectés et étudiés (Tableau 3).

Le choix de ces bactéries est basé sur leurs importances médicales :

- Les entérobactéries sont considérés la principale étiologie des infections du tractus digestif et urinaire, à la fois en milieu communautaire et hospitalier (Figarella, 2004).
- Les *Pseudomonas* sont parmi les souches les plus fréquentes après les *Staphylococcus* responsables d'infection nosocomiale dans les unités de soins intensifs (Denis *et al.*, 2007).

Tableau 3 : Origine des souches bactériennes collectées.

	Souches bactérienne	Lieu	Date	Nature du prélèvement	Sexe	Age (ans)	Méthode de conservation
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia coli</i> (E1)	Hôpital IBN ZOHR	05.02.2016	Urine	F	36	GN inclinée en tube
	<i>Escherichia coli</i> (E2)	Hôpital IBN ZOHR	12.02.2016	Urine	M	12	GN inclinée en tube
	<i>Escherichia coli</i> (E3)	Hôpital IBN ZOHR	23.02.2016	Urine	F	21	GN inclinée en tube
	<i>Escherichia coli</i> (E4)	Laboratoire privé (analyses médicales)	18.02.2017	Urine	F	6	GN en boîte de Pétri
	<i>Escherichia coli</i> (E5)	Hôpital IBN ZOHR	22.02.2017	Pus	F	39	MH en boîte de Pétri
	<i>Escherichia coli</i> (E6)	Laboratoire privé (analyses médicales)	25.02.2017	Urine	M	68	MC en boîte de Pétri
	<i>Escherichia coli</i> (E7)	DDS	26.02.2017	Urine	F	46	GN inclinée en tube
	<i>Citrobacter freundii</i> (E8)	Hôpital IBN ZOHR	05.02.2016	Matière fécale	M	8	GN inclinée en tube
	<i>Citrobacter freundii</i> (E9)	Hôpital IBN ZOHR	23.02.2016	Matière fécale	M	12	GN inclinée en tube
	<i>Citrobacter diversus</i> (E10)	Hôpital IBN ZOHR	23.02.2016	Matière fécale	F	14	GN inclinée en tube
	<i>Yersinia enterocolitica</i> (E11)	Hôpital IBN ZOHR	23.02.2016	Matière fécale	F	45	GN inclinée en tube
	<i>Klebsiella oxytoca</i> (E12)	Hôpital IBN ZOHR	12.02.2016	Matière fécale	M	7	GN inclinée en tube
	<i>Klebsiella oxytoca</i> (E13)	DDS	26.02.2017	Urine	M	32	TSI incliné en tube
	<i>Edwardsiella tarda</i> (E14)	Hôpital IBN ZOHR	05.02.2016	Matière fécale	F	60	GN inclinée en tube
	<i>Proteus vulgaris</i> (E15)	Hôpital IBN ZOHR	23.02.2016	Plaie	M	21	GN inclinée en tube

F : féminin, M : masculin, GN : gélose nutritive, MH : Muller Hinton, MC : Mac Conkey

Tableau 3 (Suite) :

Souches bactérienne		Lieu	Date	Nature du prélèvement	Sexe	Age (ans)	Méthode de conservation
	<i>Salmonella typhimurium</i> (E16)	Hôpital IBN ZOHR	05.02.2016	Matière fécale	F	55	GN inclinée en tube
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (P1)	Hôpital IBN ZOHR	12.02.2016	Plaie	M	29	GN inclinée en tube
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (P2)	Hôpital IBN ZOHR	05.02.2016	Plaie	M	21	GN inclinée en tube
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P3)	Laboratoire privé (analyses médicales)	15-02-2017	Urine	M	69	GN en boîte de Pétri
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P4)	Laboratoire privé (analyses médicales)	15-02-2017	Urine	M	69	GN en boîte de Pétri
<i>Micrococcaceae</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i> (S1)	Hôpital IBN ZOHR	05.02.2016	Pus	F	43	Chapman inclinée en tube
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (S2)	Hôpital IBN ZOHR	12.02.2016	Pus	F	37	Chapman inclinée en tube
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (S3)	Laboratoire privé (analyses médicales)	14.02.2017	Urine	F	60	GN en boîte de Pétri
	<i>Staphylococcus aureus</i> (S4)	Hôpital IBN ZOHR	20.02.2017	Pus	F	80	MH en boîte de Pétri
	<i>Staphylococcus aureus</i> (S5)	Laboratoire privé (analyses médicales)	23.02.2017	Pus	M	6	Chapman en boîte de Pétri

F : féminin, M : masculin, GN : gélose nutritive, MH : Muller Hinton.

## I.2. Purification des souches bactériennes collectées

La purification est une étape très importante, elle conduira à la souche pure ce qui facilitera l'étude de la sensibilité aux agents antibactériens (Delarras, 2007).

Afin de vérifier la pureté des souches bactériennes collectées, nous avons suivi les étapes suivantes (Schéma 1).

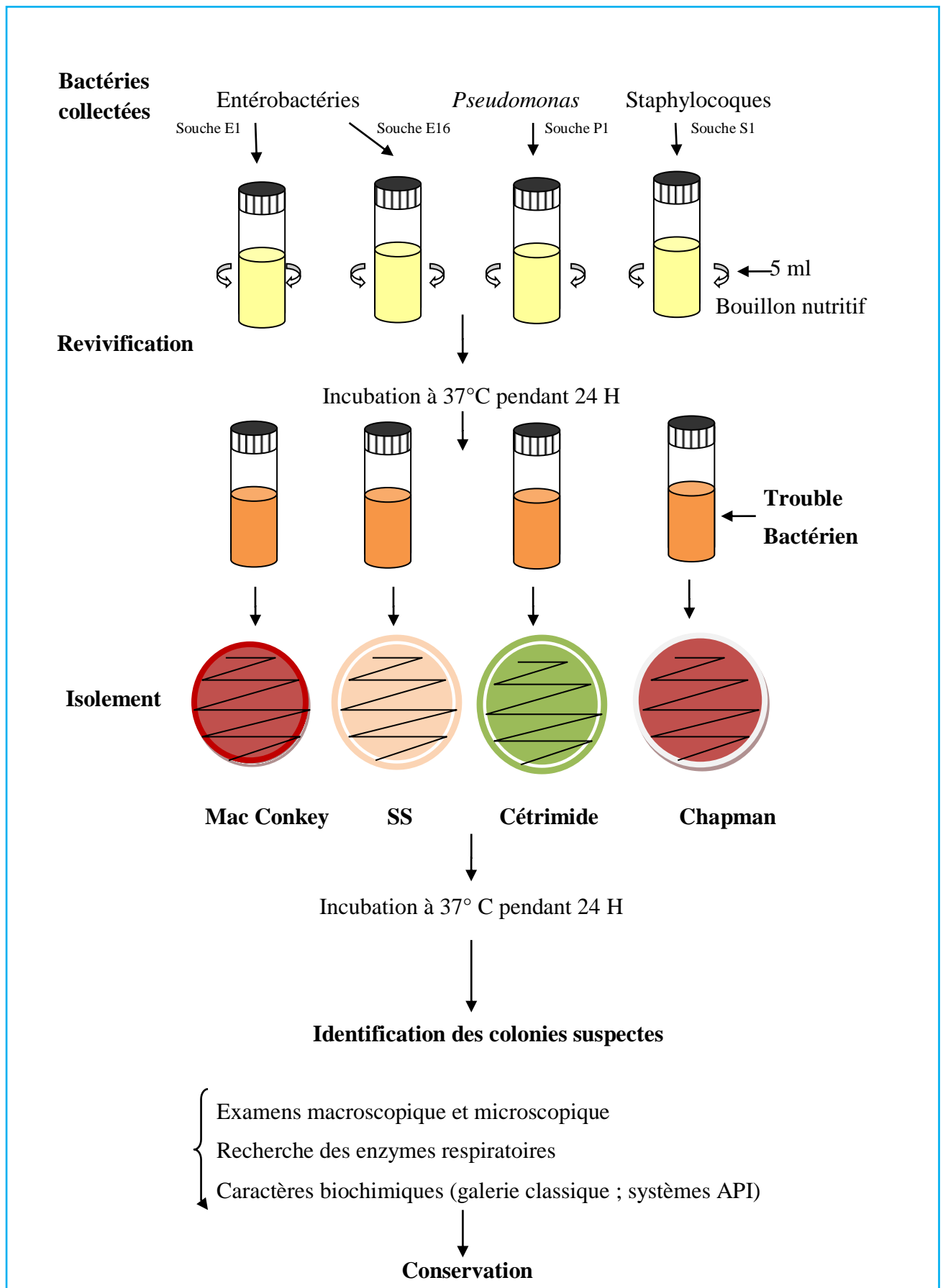
### I.2.1. Revivification des bactéries

Pour chaque bactérie, des colonies suspectes 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 (Guiraud, 2003).

Cette étape permet la croissance des bactéries, ce qui facilitera leurs cultures dans les milieux d'isolement (Guiraud, 2003).

**Remarque :** La composition des milieux de culture, réactifs et colorants utilisés est rapportée en annexe I.





**Schéma 1:** Purification des souches bactériennes collectées.

## I.2.2. Isolement des bactéries

A partir des milieux d'enrichissements présentant une croissance bactérienne, nous avonsensemencé 4 milieux de culture :

- La gélose Mac Conkey pour l'isolement des souches E1 à E15. C'est un milieu sélectif pour les entérobactéries en général, il permet l'élimination de la flore secondaire grâce à l'action de deux inhibiteurs : le cristal violet (inhibiteur de la flore Gram positive) et les sels biliaries (sélection des Entérobactéries) (Larpent, 1997).
- La gélose *Salmonella-Shigella* (SS) pour la souche E16. c'est le milieu sélectif des salmonelles et des shigelles. Il contient du vert brillant, sels biliaries et de fortes concentrations en thiosulfates et en citrate inhibent totalement la croissance de la microflore secondaire Gram positive ainsi que celle de nombreux coliformes et *Proteus* (Larpent, 1997).
- La gélose au cétrimide pour les souches P1 à P4. C'est un milieu sélectif, qui permet l'isolement des *Pseudomonas* et notamment de *P.aeruginosa*. Sur ce milieu de très nombreuses bactéries sont inhibées de par la présence de l'antiseptique cétrimide (bromure de N-cétyl-N-tri méthylammonium) ainsi que par la présence de l'antibiotique acide nalidixique (inhibiteur de nombreuses bactéries à Gram négatif) (Larpent, 1997).
- La gélose Chapman pour les souches S1 à S5. C'est un milieu qui contient un inhibiteur de fortes concentrations en chlorure de sodium ( $75\text{g.L}^{-1}$ ), ce qui permet un isolement sélectif de Staphylocoques tolérant les fortes concentrations en NaCl (Rodier *et al.*, 2005).

Tous les milieuxensemencés sont incubés à 37°C pendant 24 à 48 heures.

## I.2.3. Identification des bactéries

### I.2.3.1. 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) (Delarras, 2007).

L'aspect des colonies suspectes des bactéries étudiées sur chaque milieu de culture utilisé est représenté dans le tableau 4.

**Tableau 4 :** Aspects macroscopique des bactéries étudiées sur les milieux de culture sélectifs (Guiraud, 2003 ; Rodier *et al.*, 2005 ; Delarras, 2007).

Milieu d'isolement	Aspects des colonies	Bactéries suspectes
<b>Mac Conkey</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Grandes, rouges.</li> <li>- Incolores, transparentes.</li> <li>- Grandes, roses, visqueuses.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Escherichia coli</i>.</li> <li>- <i>Salmonella</i>, <i>Shigella</i> et autres.</li> <li>- <i>Enterobacter</i>, <i>Klebsiella</i>.</li> </ul>
<b>Salmonella-Shigella</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colonies rouges.</li> <li>- Colonies rouges à centre noir.</li> <li>- Colonies incolores.</li> <li>- Colonies incolores à centre noir</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Enterobacter</i>, <i>Klebsiella</i>, autres coliformes (<i>E.coli</i>).</li> <li>- <i>Citrobacter freundii</i>, <i>Arizona</i>.</li> <li>- <i>Salmonella</i> H<sub>2</sub>S (-), <i>Shigella</i>, <i>Serratia</i>, <i>Alkalescens</i>, <i>Enterobacter hafniae</i>, <i>Proteus morganii</i></li> <li>- <i>Salmonella</i> H<sub>2</sub>S (+), <i>Proteus vulgaris</i>, <i>Proteus mirabilis</i>.</li> </ul>
<b>Cétrimide</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colonies en vert pâle présentant une fluorescence.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Pseudomonas aeruginosa</i></li> <li>- <i>Pseudomonas fluorescence</i></li> <li>- <i>Pseudomonas putida</i>,</li> <li>- <i>Pseudomonas stutzeri</i></li> <li>- <i>Pseudomonas maltophilia</i></li> </ul>
<b>Chapman</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colonies jaunes entourés d'une zone jaune, mannitol(+).</li> <li>- Colonies roses - rouges ou pourpres, mannitol(-).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Staphylococcus aureus</i></li> <li>- <i>Staphylococcus saprophyticus</i></li> <li>- <i>Staphylococcus epidermidis</i></li> <li>- <i>Staphylococcus xylosus</i></li> <li>- <i>Staphylococcus hominis</i></li> </ul>

- **Examen microscopique**

Afin d'observer l'aspect microscopique des bactéries isolées nous avons effectué une coloration de Gram.

### ▪ Coloration de Gram

Cette coloration aide à déterminer deux grands groupes appelés Gram positif et Gram négatif. Elle nous permet aussi de connaître la morphologie et le mode de regroupement de bactérie (Degrement, 1998).

#### Technique

La coloration de Gram ou coloration différentielle s'effectue de la manière suivante :

- Préparation d'un frottis bactérien : prélever la colonie bactérienne à identifier, et l'étaler sur une goutte d'eau physiologique déposée sur une lame propre puis la fixer par simple passage sur la flamme du bec bunsen.
- Coloration par le violet : chaque frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au violet de Gentiane, il est ensuite lavé rapidement par l'eau courante.
- Mordantage : traiter durant une minute par la solution de Lugol et laver à l'eau.
- Décoloration : en traitant avec l'alcool, couler le solvant sur frottis pendant une à trois secondes puis laver immédiatement à l'eau courante. A ce stade, les cellules Gram négatives seront incolores, les cellules Gram positives restent violettes.
- Recoloration : soumettre le frottis durant trente secondes à une courte coloration par la fuchsine pour recolorer les cellules Gram négatives présentes puis rincer et sécher entre deux feuilles de papier buvard propre .
- Examiner le frottis, à immersion à l'objectif  $\times 100$ .

**Lecture :** Les bactéries Gram positif sont bien colorées en violet alors que les bactéries Gram négatif sont bien colorées en rose (Prescott *et al.*, 1999).

#### I.2.3.2. Identification biochimique

- **Recherche des enzymes respiratoires**

Trois enzymes respiratoire sont recherchées : oxydase, catalase et nitrate réductase (Tableau 5)

**Tableau 5 : Recherche des enzymes respiratoires.**

Enzyme	Propriété	Technique	Lecture	Référence
<b>Catalase</b>	Dégrade le peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) à l'aide d'une pipette Pasteur.</li> <li>• Prélever une colonie à l'aide d'une anse de platine.</li> <li>• Dissocier la colonie dans la goutte.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Catalase positive :</b> Apparition des bulles de gaz, la bactérie possède la catalase.</li> <li>• <b>Catalase négative :</b> Absence des bulles de gaz, la bactérie ne possède pas la catalase.</li> </ul>	Guiraud (2003)
<b>Oxydase</b>	Catalyse les réactions d'oxydo-réduction	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Déposer le disque d'oxydase sur une lame propre, l'humidifier avec deux gouttes d'eau distillée stérile</li> <li>• Ecraser la colonie testée sur le disque.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Oxydase positif :</b> Colonie prend une couleur violette.</li> <li>• <b>Oxydase négatif :</b> La colonie reste incolore, donc absence d'enzyme recherché.</li> </ul>	Prescott <i>et al.</i> (1999)
<b>Nitrate réductase</b>	Réduire le nitrate en nitrite	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La recherche s'effectue : soit à partir de bouillon nitraté, soit à partir de la cupule Glu (galerie API 20E).</li> <li>• Après culture des milieux, ajouter à la surface du milieu 3 gouttes d'acide sulfanilique (NITI) puis 3 gouttes d'alpha naphtylamine (NIT II).</li> <li>• Mélanger et observer.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Le milieu devient rouge, présence de nitrite. Donc la bactérie possède la nitrate réductase : test (+)</li> <li>• Pas de coloration, on ajoute la poudre du zinc : <ul style="list-style-type: none"> <li>- milieu incolore : test (+)</li> <li>- Coloration rouge : test(-)</li> </ul> </li> </ul>	Guiraud (2003)

### • Caractères biochimiques

L'étude des caractères biochimiques des différentes bactéries collectées a été réalisée grâce à la galerie biochimique classique pour certaines souches (18 souches : E1, E2, E3, E5, E6, E7, E9, E10, E11, E12, E14, E15, E16, P1, P3, S1, S2 et S3) et par les galeries biochimiques miniaturisées API (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) pour d'autres souches (7 souches : E4, E8, E13, P2, P4, S4 et S5).

▪ **Galerie biochimique classique**

Les tests biochimiques qui ont été effectués dans notre étude sont résumés dans le tableau 6.

**Tableau 6:** Tests biochimiques utilisés pour l'identification des bactéries collectées.

Test	But	Technique/ Lecture	Référence
<b>Fermentation des sucres avec ou sans gaz + Production d'H<sub>2</sub>S</b>	-Utilisation du glucose, saccharose et lactose. -production d'H <sub>2</sub> S. -production de gaz	Ensemencement de la pente du milieu TSI par stries et le culot par simple pique. Après 24H à 37°C, la pente jaune = fermentation du lactose/saccharose ; culot jaune = fermentation du glucose ; noircissement= H <sub>2</sub> S+, bulles gazeuses = production du gaz.	Delarras (2003)
<b>RM</b>	Mise en évidence de la voie des fermentations des acides mixte	- Ensemencer largement le milieu Clark et Lubs. - Incuber à 37°C pendant -Ajouter 2 à 3 gouttes de rouge de méthyle. -La lecture est immédiate : Milieu rouge : RM (+) .Milieu jaune : RM(-).	Guiraud (2003)
<b>VP (voges Proskauer)</b>	Production de l'acétoïne.	-Ensemencer largement le milieu Clark et Lubs. -Incuber à 37°C pendant 24h. Après culture : -Ajouter 2 à 3 gouttes de VPI et attendre 10 min puis ajouter 2 à 3 gouttes de VPII : • Milieu rouge : VP(+) • Milieu jaune : VP(-)	Delarras (2003)
<b>Citrate de Simmons</b>	utilisation du citrate comme seule source de carbone	-Ensemencer la pente du milieu Citrate de Simmons est par une strie longitudinale. -Incuber 24 heures à 37°C. -Virage de la couleur du milieu vers le bleu (alcalinisation de milieu) : résultat positive, la bactérie utilise le citrate.	Delarras (2003)
<b>Urée Indole TDA</b>	-Uréase -Formation d'indole - Tryptophane désaminase	-Faire une suspension en milieu Urée-indole. - Incuber à 37° C pendant 24h. -Uréase (+) : Apparition de couleur rose - Indole(+): Après l'ajout du réactif de Kowacs, apparition d'un anneau rouge à la surface. -TDA (+) : Après l'ajout du réactif TDA, apparition d'un précipité brun foncé.	Delarras (2003)

Tableau 6 (suite) :

Test	But	Technique/ Lecture	Référence
<b>Mannitol Mobilité</b>	-Fermentation du Mannitol  -Mobilité	-Ensemencer le milieu Mannitol-Mobilité par piqûre centrale à l'aide d'un fil droit. -Incuber à 37° C pendant 24 H. - Mannitol (+): Apparition de couleur jaune. -La mobilité : Les bactéries très mobiles. peuvent se déplacer dans la gélose molle (formation d'un voile autour de la pique).	Guiraud (2003)
<b>ONPG</b> (ortho-nitrophényl- $\beta$ -galactopyranoside)	Présence de $\beta$ -galactosidase qui a la capacité d'hydrolyser la liaison osidique de $\beta$ -galactoside 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. - ONPG (+) : milieu de couleur jaune. - ONPG (-) : milieu sans couleur.	Delarras (2003)

#### ▪ Galerie biochimique miniaturisée API

Le système API (Appareillage et Procédé d'Identification) est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries (Freney *et al.*, 2000).

Trois galeries API ont été utilisées : l'API 20 E pour l'identification des entérobactéries (3 souches : E4, E8 et E13), l'API 20 NE pour les *Pseudomonas* (2 souches : P2 et P4) et l'API Staph pour les staphylocoques (2 souches : S4 et S5).

La préparation et l'inoculation des galeries citées-ci-dessus sont résumées dans le tableau 7.

### I.3. Conservation des souches bactériennes

Les 25 souches bactériennes ont été purifiées par des repiquages successifs et conservées jusqu'à l'étude de la résistance aux agents antibactériens. La conservation des souches a été réalisée à la température ambiante, par ensemencement par stries sur la gélose nutritive (Chapman pour les staphylocoques) inclinées en tubes à essai (Guiraud, 2003).

**Tableau 7** : Préparation et inoculation de galeries biochimiques miniaturisés API (source : <http://www.biomerieux.com>).

Type de l'API	Caractéristiques	Préparation Galerie/inoculum	Inoculation de la galerie	Lecture	Identification
<b>API 20 E</b>	-Comporte 20 tests -Destinée aux bacilles à Gram négatif dont les entérobactéries.	-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, -Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation, Faire une suspension bactérienne : cultures jeune dans un tube contenant 5 ml d'eau distillée stérile.	-Remplir les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne, - Remplir uniquement les tubes des autres tests, - Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H <sub>2</sub> S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine, -Refermer la boîte d'incubation et la placer à 35-37°C pendant 18 à 24 heures.	-Lecture directe ou après addition de réactifs : se référer au tableau de lecture spécifique à chaque API*. -Les tests sont regroupés 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 à 7 chiffres qui servent de code d'identification.	L'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification <b>apiweb TM**</b> . Enter manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres.
<b>API 20 NE</b>	- Comporte 20 tests - Destinée aux bacilles à Gram négatif non Entérobactéries et non Fastidieux.		-Remplir uniquement les tubes des tests NO <sub>3</sub> à PNPG, -Créer une anaérobiose (par l'huile de paraffine) dans les tests : GLU, ADH, URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine, -Remplir les tubes et les cupules des tests : GLU à PAC avec la suspension bactérienne, Refermer la boîte d'incubation et la placer à 35-37°C pendant 18 à 24 heures.		
<b>API Staph</b>	-Comporte 20 tests -Destinée aux genres : <i>Staphylococcus</i> <i>Micrococcus</i> <i>Kocuria</i>		-Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide d'une pipette Pasteur en évitant la formation de bulles. -Pour les caractères ADH, URE, remplir les cupules d'huile de paraffine pour créer une anaérobiose. Incuber 24 heures à 37°C.		

\*voir annexe II, \*\* Consulter : <http://www.biomerieux.com>.



## II. Etude de la résistance des bactéries aux antibiotiques

L'étude de la résistance aux antibiotiques 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, 2016).

### II.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 de bouillon Mueller Hinton.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Ferland ( $\sim 10^8$  UFC/ml).

#### • Ensemencement de la gélose Mueller Hinton (MH)

- Couler la gélose MH en boîtes de Pétri ; Laisser sécher et solidifier sur pailleasse avant utilisation.
- Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum préparé ( $\sim 10^7$  UFC/ml),
- 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.
- Laisser les boîtes ensemencer 15 à 20 min sur pailleasse ou dans l'étuve à 37°C avant l'application des antibiotiques.

#### • Application des disques d'antibiotiques

- Déposer les disques d'antibiotique sur la gélose à l'aide d'une pince flambée, en appuyant doucement sur chaque disque pour assurer un contact uniforme avec le milieu.
- Laisser les boîtes à une température ambiante pendant 30 minutes sur la pailleasse pour permettre la diffusion de l'antibiotique dans la gélose.
- Incuber (sans dépasser les 30 minutes) à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures.

- **Lecture interprétative**

Les diamètres des zones d'inhibition autour des disques sont mesurés à l'aide d'une règle ou d'un pied à coulisse en millimètre, puis ils sont comparés aux diamètres critiques conformément aux indications du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2016). Il convient de noter toutefois, qu'une souche dont la sensibilité aux antibiotiques est ainsi évaluée peut être déclarée " sensible, intermédiaire ou résistante".

## **II.2. Antibiotiques testés**

Les antibiotiques qui ont été testés sur les différentes espèces bactériennes sont représentés, dans les tableaux 8 - 10.

Le choix des antibiotiques testés repose sur l'identification du genre et son profil habituel vis-à-vis des antibiotiques (résistances naturelles et résistances acquises possibles).

- **Contrôle de qualité interne**

Un contrôle de qualité interne a été réalisé pour s'assurer de la validité des résultats obtenus. Les souches de référence utilisées sont les suivantes :

*Escherichia coli* CIP 7624 (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* CIP 76110 (ATCC 27853), et *Staphylococcus aureus* CIP 7625 (ATCC 25923) (CA-SFM, 2016).

Les limites acceptables des diamètres d'inhibition (mm) obtenus par diffusion en gélose pour les souches de références utilisées sont rapportées en annexe II.

**Tableau 8 :** Critères des antibiotiques testés sur les entérobactéries (CA-SFM, 2016).

Antibiotique	Famille D'antibiotique	Classe	Code	Charge Du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)	
					S ≤	R >
Amoxicilline	Bêta -lactamine	Pénicilline	AMX	20	19	19
Céfotaxime	Bêta -lactamine	Céphalosporines	CTX	5	20	17
Imipénème	Bêta-lactamine	Carbapénèmes	CTX	10	22	16
Gentamicine	Aminoglycoside	Aminosides	GM	30	17	14
Chloramphénicol	Phénicole	Divers	C	30	17	17
Triméthoprim	Diaminopyrimidines	Divers	SXT	5	18	15

**Tableau 9 :** Critères des antibiotiques testés sur les *Pseudomonas* (CA-SFM, 2016).

Antibiotique	Famille D'antibiotique	Classe	Code	Charge Du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)	
					S ≤	R >
Amoxicilline	Bêta -lactamine	Pénicilline	AMX	20	19	19
Céfotaxime	Bêta-lactamine	Céphalosporines	CTX	5	20	17
Imipénème	Bêta-lactamine	Carbapénème	IPM	10	20	17
Gentamicine	Aminoglycoside	Aminoside	GM	10	15	15
Chloramphénicol	Phénicole	Divers	C	30	17	17
Triméthoprim	Diaminopyrimidine	Divers	STX	5	18	15

**Tableau 10:** Critères des antibiotiques testés sur les staphylocoques (CA-SFM, 2016).

Antibiotique	Famille D'antibiotique	Classe	Code	Charge Du disque ( $\mu\text{g}$ )	Diamètres critiques (mm)	
					S $\leq$	R $>$
Pénicilline G	Bêta-lactamine	Pénicilline	P	1 unité	26	26
Gentamicine	Aminoglycoside	Aminoside	GM	10	18	18
Vancomycine	Glycopeptide	Glycopeptide	VA	30	$\geq 17$	-
Erythromycine	Macrolide	Macrolide	E	15	21	18
Chloramphénicol	Phénicole	Divers	C	30	18	18
Triméthoprim	Diaminopyrimidine	Divers	STX	5	17	14

### III. Etude de la résistance des bactéries au cuivre

#### III.1. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) du cuivre a été évaluée pour toutes les souches bactériennes collectées par la méthode de dilution en milieu liquide (Lennette *et al.*, 1985). Le milieu liquide utilisé est le bouillon Muller-Hinton (MH) qui est le milieu de référence pour les tests de sensibilité des germes aux agents antibactériens (CA-SFM, 2016).

Le cuivre testé est sous forme de cuivre sulfate pentahydraté ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ),  $\text{PM} = 249.68 \text{ g/mol}$ .

- **Préparation de la solution mère et des solutions filles**

Une solution mère de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  contenant 50 g/l a été préparée dans de l'eau distillée, puis stérilisée par filtration sur membrane (0.2  $\mu\text{m}$ ).

Huit solutions filles sont obtenues par dilution successive au demi de la solution mère dans des tubes d'eau distillée stérile.

Après dilution de la solution mère métallique, les concentrations du cuivre se répartissent dans les solutions filles entre 12.5 et 1600  $\mu\text{g/ml}$ .

- **Préparation de l'inoculum**

Les bactéries issues d'une culture de 18 heures incubée à 37°C ont été suspendues dans le bouillon Mueller Hinton à une turbidité correspondante à 0.5 Mac Farland.

Dans un tube à hémolyse, nous avons mélangé 1ml de chaque concentration du métal avec 1ml de l'inoculum bactérien à raison de  $10^6$  bactéries/ml pour les entérobactéries  $10^7$  pour les *Pseudomonas* et les staphylocoques (Lennette *et al.*, 1985).

Les tubes sont incubés à 37°C pendant 24 heures.

- **Lecture de la CMI**

La CMI entraîne un ralentissement de la croissance de la population bactérienne tel qu'il atteint une absence de croissance, donc elle est définie comme la plus faible concentration d'un agent antibactérien donné capable d'interrompre, dans un milieu et à des conditions parfaitement définis, toute croissance visible d'une souche bactérienne donnée (CA-SFM, 2016).

Après incubation, un examen à l'œil nu est réalisé pour chaque tube afin de déterminer la CMI qui sera la plus petite concentration ne montrant aucune croissance visible.

### Remarque

- Les souches bactériennes sont considérées résistantes si leurs CMI sont supérieures à celle de la souche de référence correspondante (un excellent modèle de contrôle de l'effet antibactérien des métaux lourds) (Akinbowale *et al.*, 2007).
  - Les résultats de CMI du cuivre vis-à-vis des entérobactéries sont comparés avec ceux de la souche *Escherichia coli* K12 ATCC 10798.
  - Les résultats de CMI du cuivre vis-à-vis des *Pseudomonas* sont comparés avec ceux de la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
  - Les résultats de CMI du cuivre vis-à-vis des staphylocoques sont comparés avec ceux de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25932.
- Des témoins de croissance pour chaque souche bactérienne sont préparés également dans le bouillon MH sans métaux lourds.

### III.2. Détermination de la Concentrations Minimales Bactéricides (CMB)

La CMB est définie comme étant la concentration minimale qui tue 99.99 % de l'inoculum de départ (CA-SFM, 2016).

La CMB a été déterminée suivant la méthode décrite par le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM, 2016).

- Préparer tout d'abord un témoin bactéricide par ensemencement en stries de 10 µl de l'inoculum de départ et ces dilutions ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$ ) sur la gélose nutritive. Cette suspension mère et ses dilutions correspondent respectivement à 100 %, 10 %, 1 %, 0.1 % et 0.01 % de survivants.
- A partir des tubes sans croissance visible de la détermination de la CMI, repiquer en stries sur la gélose Mueller Hinton comme précédemment décrit.
- Incuber à 37°C pendant 48 heures.
- Comparer les cultures au témoin bactéricide : la CMB sera la plus petite concentration dont le repiquage montre une croissance de germe inférieur ou égale à 0.01 % de survivants.

### III.3. Détermination du rapport CMB/CMI

Ce rapport est utilisé pour distinguer les agents bactéricides ( $CMB/CMI \leq 2$ ) des agents bactériostatiques (CMB très éloignée de la CMI).

Il permet de définir également la tolérance d'une souche bactérienne à un agent bactéricide ( $CMB/CMI \geq 32$ ) (CA-SFM, 2016).

---

# Chapitre IV :

## *Résultats et discussion*

---

## I. Résultats

### I.1. Purification des souches collectées

#### I.1.1 Revivification

Après une durée d'incubation de 24 heures à une température de 37 °C, nous avons remarquées l'apparition de trouble au niveau de tous les tubes du bouillon nutritif ensemencés par les différentes souches collectées, ce changement signifie la présence d'une croissance bactérienne (Planche 1).



**Planche 1:** Résultats de la revivification des souches bactériennes collectées.



## I.1.2. Isolement et identification

### I.1.2.1. Aspect macroscopique des colonies

Après une durée d'incubation de 24 à 48 heures à 37 °C, l'aspect macroscopique des colonies poussées sur les différents milieux de culture utilisés (Mac conkey, SS, Cétrimide et Chapman) est représenté dans le tableau 11.

**Tableau 11:** Aspects macroscopiques des colonies des différentes souches bactériennes étudiées.

Famille bactérienne	Milieu de culture	Souches	Aspect macroscopique
<i>Enterobacteriaceae</i>	Mac Conkey	<i>Escherichia coli</i> (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7)	Grosses colonies sèches, bombées, de couleur rose à rouge brique et à contour régulier.
		<i>Citrobacter freundii</i> (E8, E9)	Colonies moyennes de couleur rose, crémeuses, bombées et à contour régulier.
		<i>Citrobacter diversus</i> (E10)	
		<i>Yersinia enterocolitica</i> (E11)	Petites colonies crémeuses de couleur bleu verte, bombées et à contour régulier.
		<i>Klebsiella oxytoca</i> (E12, E13)	Colonies moyennes crémeuses de couleur rose, bombées et à contour régulier.
		<i>Edwardsiella tarda</i> (E14)	Colonies moyennes crémeuses de couleur bleu-verte, bombées et à contours réguliers.
		<i>Proteus vulgaris</i> (E15)	Colonies moyennes crémeuses de couleur blanchâtre, aplaties et à contour régulier.
	SS	<i>Salmonella typhimurium</i> (E16)	Colonies moyennes crémeuses de couleur noir, bombées et à contour régulier.

Tableau 11 (suite) :

Famille bactérienne	Milieu de culture	Souches	Aspect macroscopique
<i>Pseudomonadaceae</i>	Cétrimide	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (P1, P2)	Colonies moyennes crémeuses blanchâtre, bombées, à contour régulier. La gélose prend une couleur verte.
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P3, P4)	Colonies moyennes crémeuses blanchâtres, aplaties, à contours réguliers avec virage de couleur du milieu vers le bleu-vert.
<i>Micrococcaceae</i>	Chapman	<i>Staphylococcus xylosus</i> (S1)	Petites colonies crémeuses de couleur roses, rondes, bombées, à contour régulier.
		<i>Staphylococcus epidermidis</i> (S2)	
		<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (S3)	Petites colonies crémeuses de couleur jaune (doré), rondes, bombées, à contour régulier, avec un virage de couleur du milieu vers le jaune.
		<i>Staphylococcus aureus</i> (S4 ; S5)	

Les aspects macroscopiques des colonies des entérobactéries, de *Pseudomonas* et des staphylocoques étudiés sont illustrés dans les Planches 2 - 4.

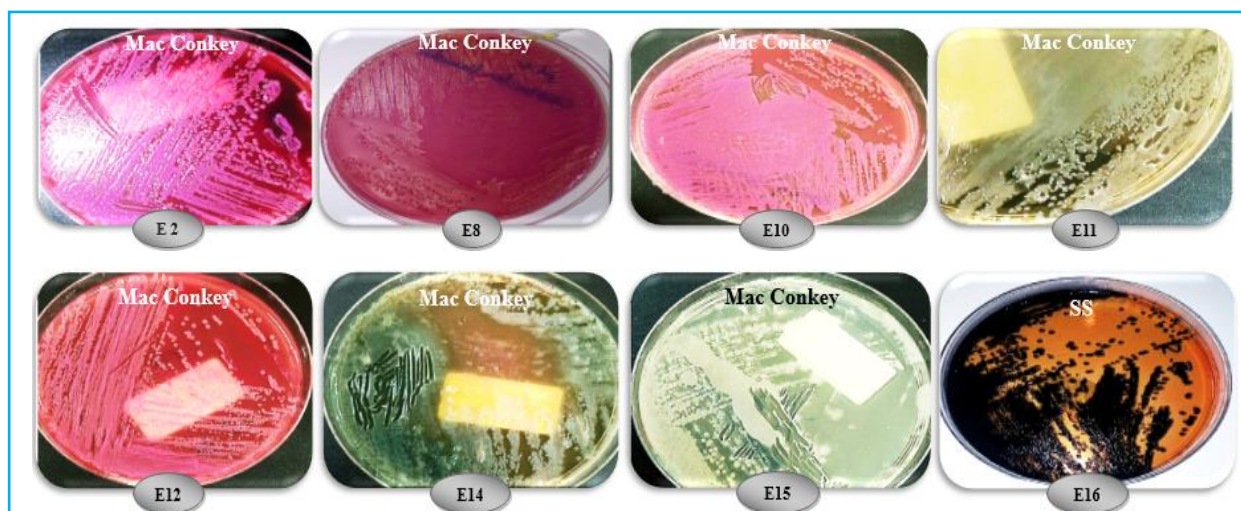
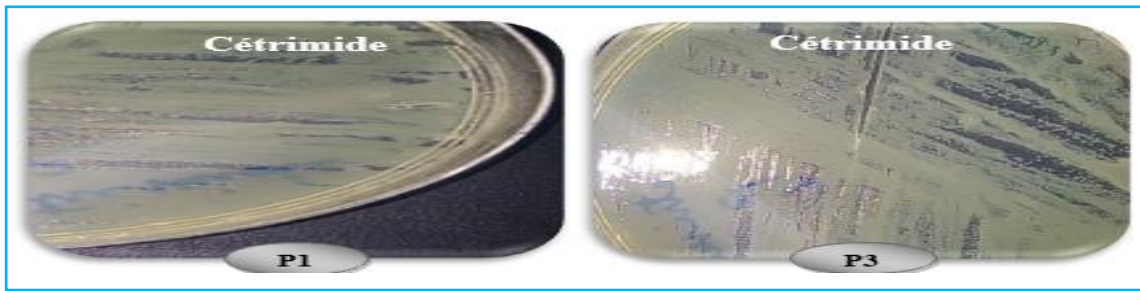
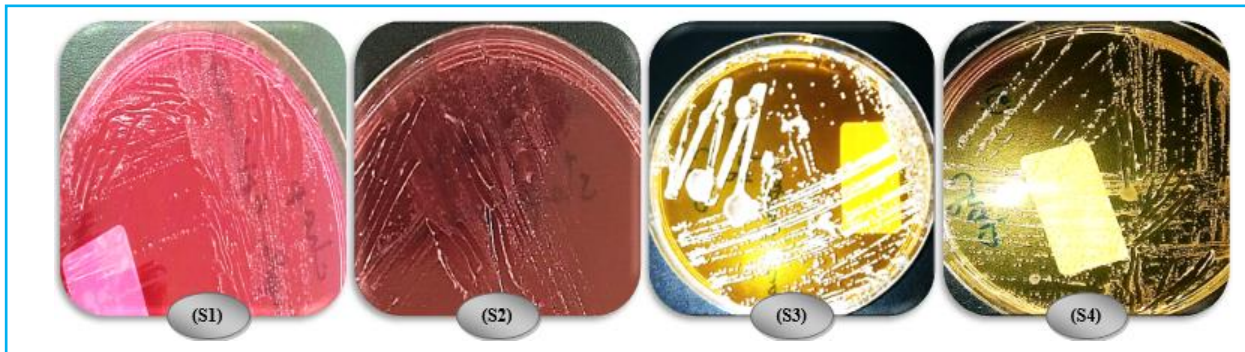


Planche 2 : Aspect macroscopique des colonies des entérobactéries étudiées.



**Planche 3 :** Aspect macroscopique des colonies de *Pseudomonas* étudiés.



**Planche 4 :** Aspect macroscopique des colonies des staphylocoques sur la gélose Chapman.

### I.1.2.2. Aspect microscopique des souches étudiées

L'examen microscopique (coloration de Gram) a été fait pour toutes les cultures, les résultats sont représentés dans le tableau 12.

**Tableau 12:** Aspect microscopique des bactéries étudiées après coloration de Gram.


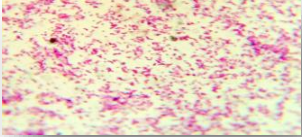
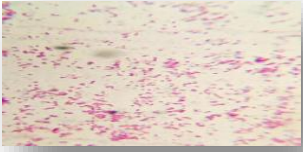




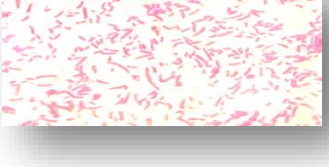


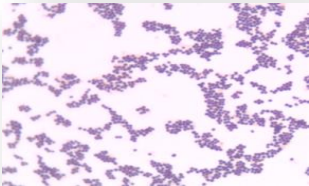
Souches étudiées	Aspect microscopique (Microscope optique ; Objectif (X100)).	
E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7.	Bacilles isolés à Gram négatif.	
E8, E9, E10.	Courts bacilles à Gram négatif.	

Tableau 12 (Suite) :

Souches étudiées	Aspect microscopique (Microscope optique ; Objectif (X100)).	
E11.	Bacilles isolés à Gram négatif.	
E12, E13.	Bacilles à Gram négatif.	
E14.	Bacilles à Gram négatif.	
E15.	Bacilles à Gram négatif.	
E16.	Bacilles à Gram négatif.	
P1, P2.	Courts bacilles isolés à Gram négatif.	

**Tableau 12 (Suite) :**

Souches étudiées	Aspect microscopique (Microscope optique ; Objectif (X100).	
P3, P4.	Bacilles à Gram négatif.	
S1, S2, S3.	Cocci isolés et en courtes chaînettes à Gram positif.	
S4, S5.	Cocci à Gram positif regroupées en grappes de raisins.	

### I.1.2.3. Identification biochimique des souches étudiée

- **Enzymes respiratoire**

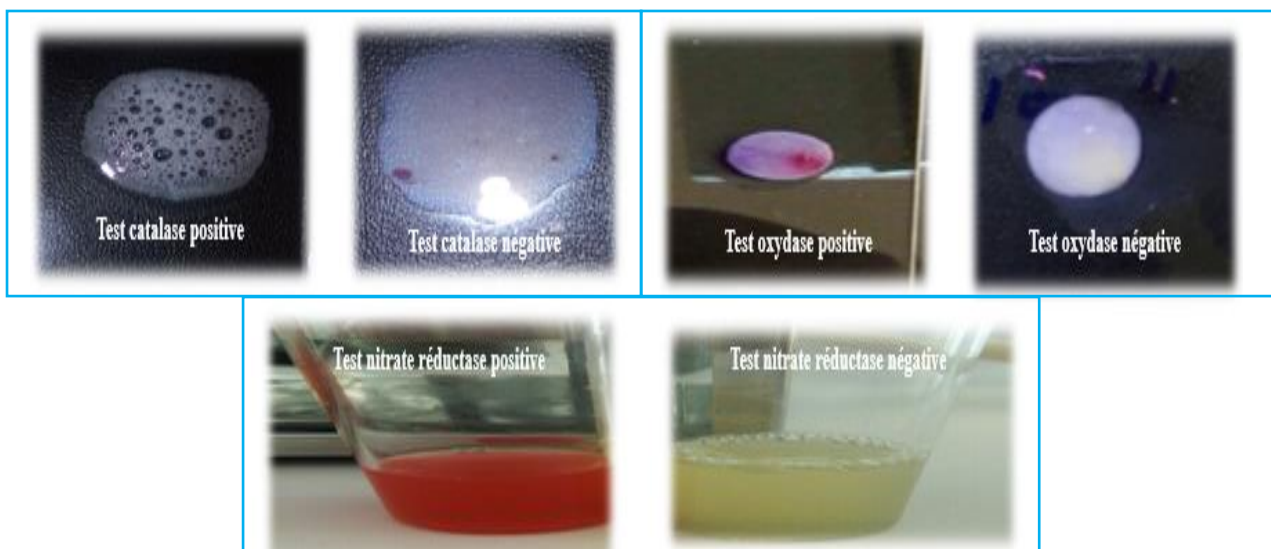
Les résultats obtenus de la recherche des enzymes respiratoires sont représentés dans le tableau 13.

**Tableau 13 :** Recherche des enzymes respiratoires des souches bactériennes étudiées.

Souches	Catalase	Oxydase	Nitrate réductase
E1			+
E2			+
E3			+
E4			/
E5			+
E6			+
E7			+
E8	+	-	+
E9			
E10			
E11			-
E12			-
E13			/
E14			-
E15			
E16		+	
P1	-	+	+
P2			/
P3			+
P4			/
S1	+	+	+
S2			+
S3			+
S4			/
S5			/

(+) : test positif      (-) : test négatif      (/) : test non effectué

La Planche 5 illustre l'aspect des tests positifs et négatifs des enzymes respiratoires recherchées.



**Planche 5:** Résultats de la recherche des enzymes respiratoires.

• Tests biochimiques classiques

Dix huit souches collectées ont été identifiées par la galerie biochimique classique, les résultats sont mentionnés dans le tableau 14.

**Tableau 14 :** Tests biochimiques classiques des souches bactériennes étudiées.

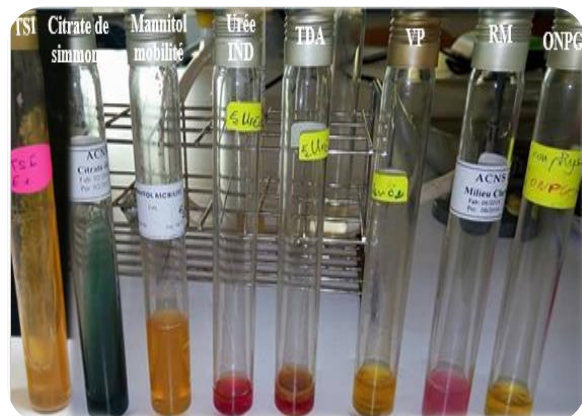
Souches	TSI					Citrate de Simmons	Mannitol mobilité		Urée indole			Clarck et Lubs		ONPG
	H <sub>2</sub> S	GAZ	GLU	SAC	LAC		MAN	MOB	URE	IND	TDA	VP	RM	
E1	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
E2	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
E3	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
E5	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
E6	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
E7	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
E9	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
E10	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
E11	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+
E12	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
E14	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+
E15	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-
E16	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-
P1	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-
P3	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
S1	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+
S2	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
S3	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+

(+) = test positif (-) = test négatif

Les profils biochimiques des bactéries étudiées obtenus par la galerie classique sont illustrés par les figures 5 - 22.



**Figure 5:** Profil biochimique de la souche E1.



**Figure 6:** Profil biochimique de la souche E2.



Figure 7: Profil biochimique de la souche E3.



Figure 8 : Profil biochimique de la souche E5.



Figure 9 : Profil biochimique de la souche E6.

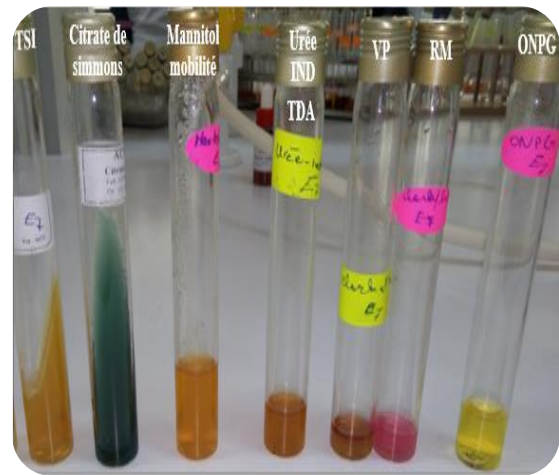


Figure 10 : Profil biochimique de la souche E7.

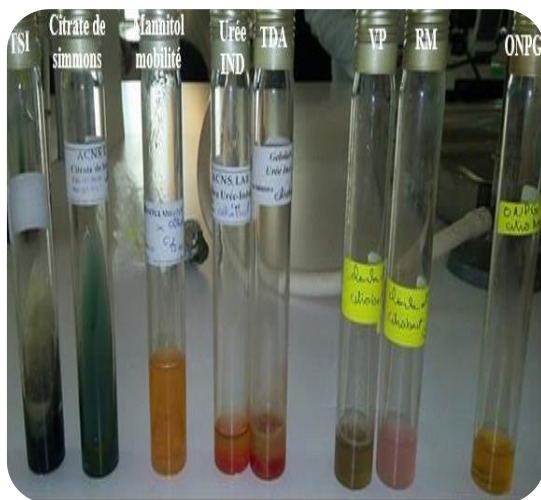


Figure 11: Profil biochimique de la souche E9.



Figure 12 : Profil biochimique de la souche E10.





Figure 13: Profil biochimique de la souche E11.

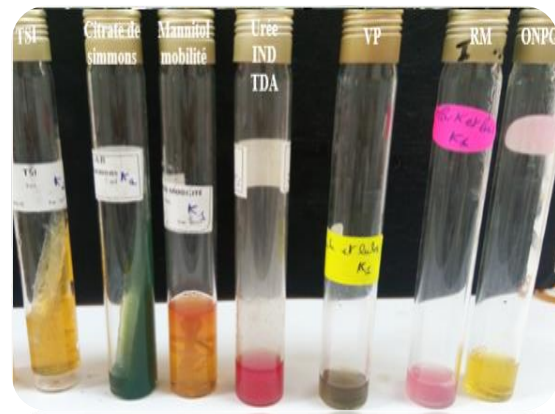


Figure 14: Profil biochimique de la souche E12.



Figure 15 : Profil biochimique de la souche E14.



Figure 16 : Profil biochimique de la souche E15.

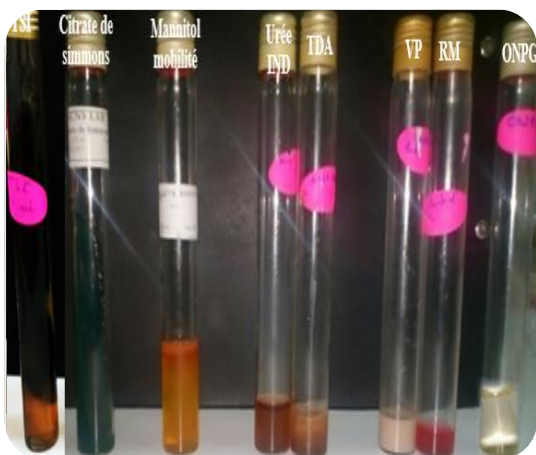


Figure 17: Profil biochimique de la souche E16.

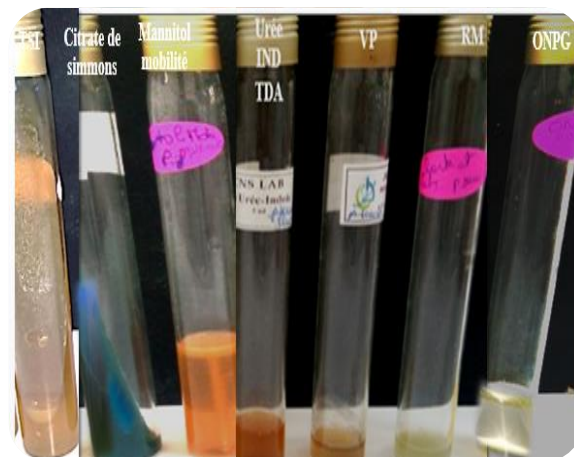


Figure 18: Profil biochimique de la souche P1.

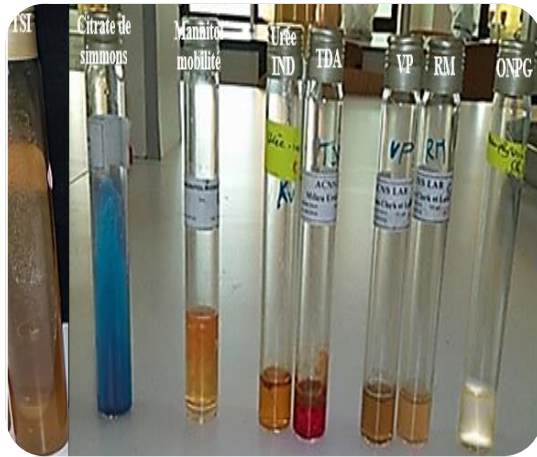


Figure 19: Profil biochimique de la souche P3.

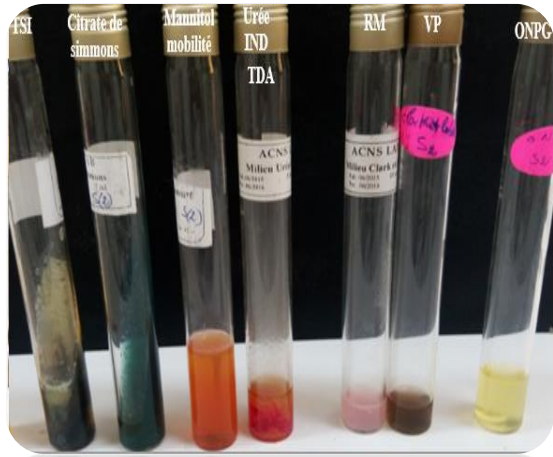


Figure 20: Profil biochimique de la souche S1.



Figure 21 : Profil biochimique de la souche S2.

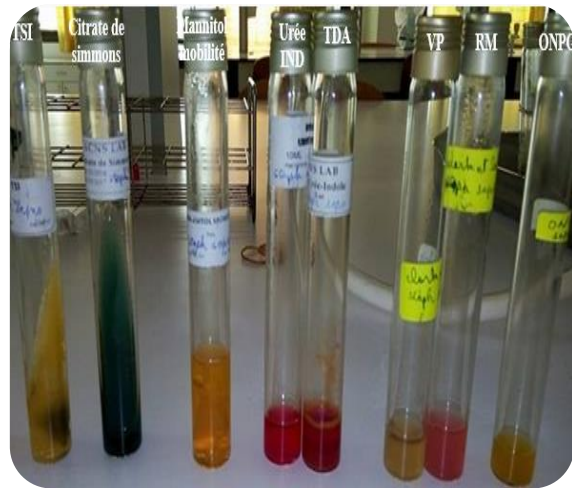









Figure 22: Profil biochimique de la souche S3.

- **Tests biochimiques de la galerie API**

Sept souches ont été identifiées par les API systèmes, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 15.

**Tableau 15:** Profils biochimiques de certaines bactéries étudiées sur les galeries miniaturisées API.

API système	Souche	Profil biochimique	Code de l'API	Degré de parenté (%)
API 20 E	E4		7164532	77.8
	E8		3646772	99.4
	E13		7045773	96.9
API 20 NE	P2		4757555	98.0
	P4		4754575	99.9
API Staph	S4		6734057	84.4
	S5		6734157	96.9

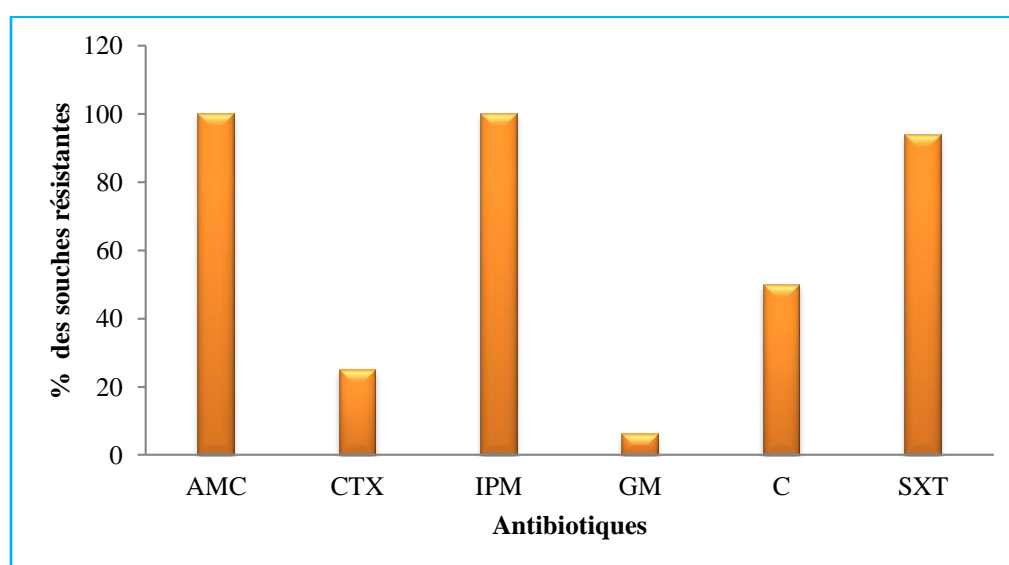
## I.2. Étude de la résistance des bactéries aux agents antibactériens

### I.2.1. Résistance aux antibiotiques

#### I.2.1.1. Entérobactéries

Toutes les souches des entérobactéries testées sont résistantes au moins à deux antibiotiques.

100 % des souches sont résistantes à l'amoxicilline et à l'imipinème ; un taux de résistance important est également enregistré pour la triméthoprine (93.75 %). Des taux significatifs de résistance sont enregistrés au chloramphénicol (50 %) et à la céfotaxime (25 %) (Figure 23).



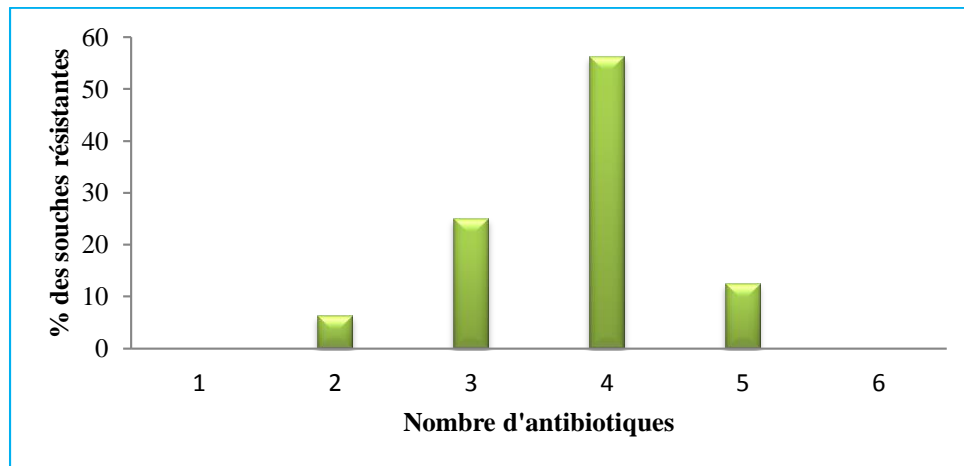
**Figure 23:** Résistance aux antibiotiques d'entérobactéries étudiées.

AMC : amoxicilline ; CTX : céfotaxime ; IPM : imipinème ;  
GM : gentamicine ; C : chloramphénicol ; SXT : triméthoprine

La majorité des entérobactéries étudiées est résistante à plus de trois classes d'antibiotique (68.75 %). 56.25 % des souches présentent une résistance à 4 antibiotiques, par ailleurs, 25 % et 12.5 % des souches résistent à 3 et 5 antibiotiques respectivement (Figure 24).

La majorité des souches d'*E.coli* (l'espèce représentant plus de 43 % des entérobactéries étudiées) présente une résistance à 4 antibiotiques. En revanche, les espèces *Edwardsiella tarda* et *Proteus vulgaris* résistent à 5 antibiotiques.

Cinq profils antibiologiques différents sont observés chez les entérobactéries étudiées avec une dominance de l'antibiotype à quatre antibiotiques AMC/IPM /C /SXT (Tableau 16).



**Figure 24 :** Antibio-résistance multiple d'entérobactéries étudiées.

**Tableau 16 :** Profils antibiotypiques associés aux entérobactéries étudiées.

Profils de résistance	Nombre d'antibiotiques	Nombre des souches	Souches résistantes
AMC/IPM	2	1	E7.
AMC/IPM/SXT	3	4	E6, E11, E13, E16.
AMC/ IPM /C / SXT	4	7	E1, E2, E5, E8, E9, E10, E12.
AMC/ CTX/IPM/SXT	4	2	E3, E4.
AMC/CTX/ IPM /C / SXT	5	2	E14, E15.

AMC : amoxiciline ; CTX : céfotaxime ; IPM : imipinème ; GM : gentamicine ; C : chloramphénicol ; SXT : triméthoprime.

Les résultats de l'antibiogramme des entérobactéries étudiées sont illustrés dans la planche 6.

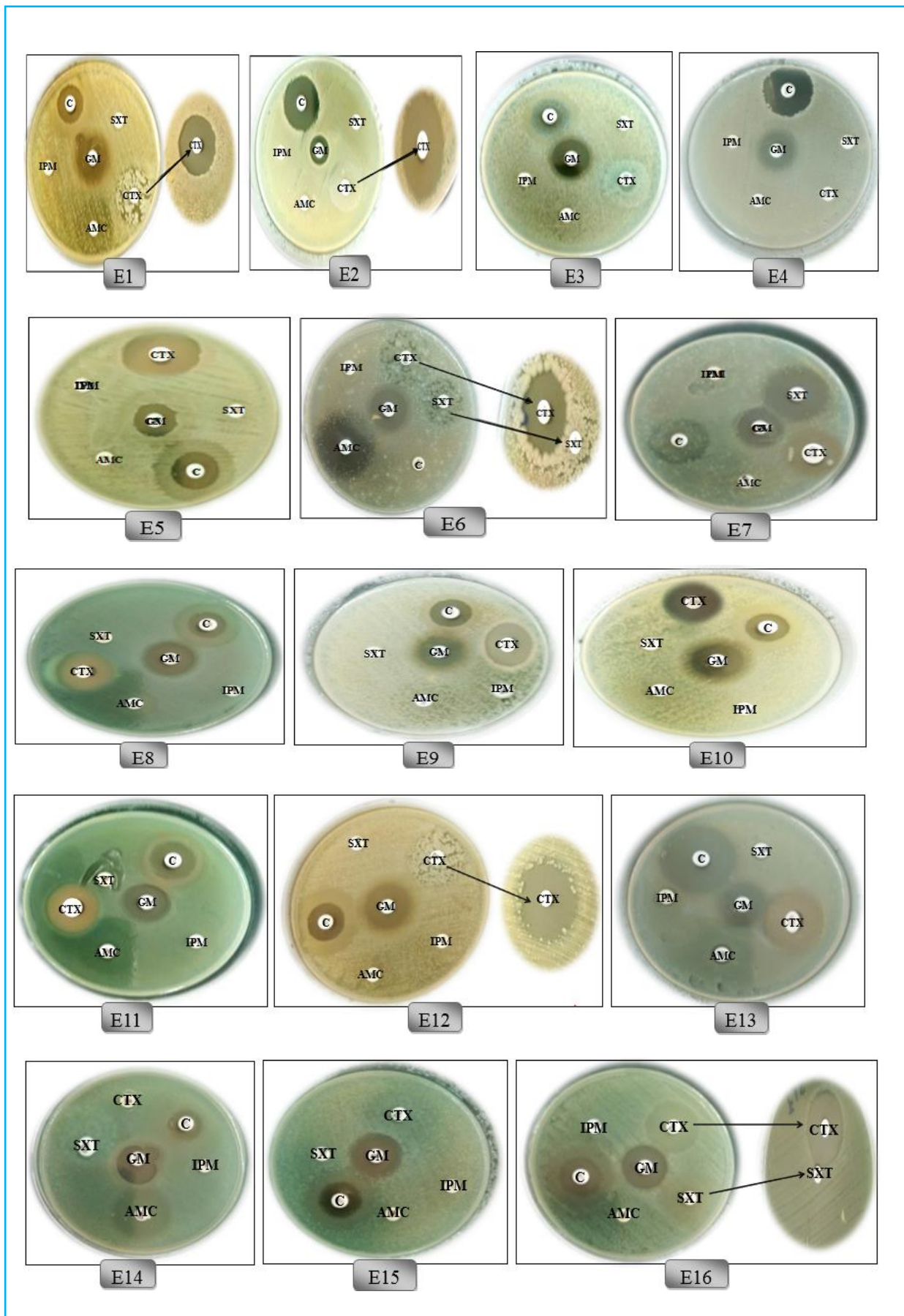
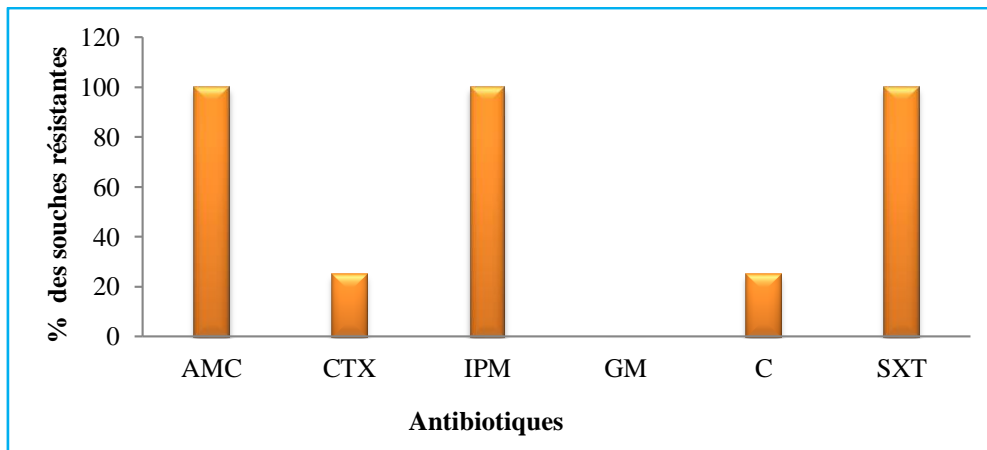


Planche 6 : Antibiogramme des différentes souches d'entérobactéries étudiées.

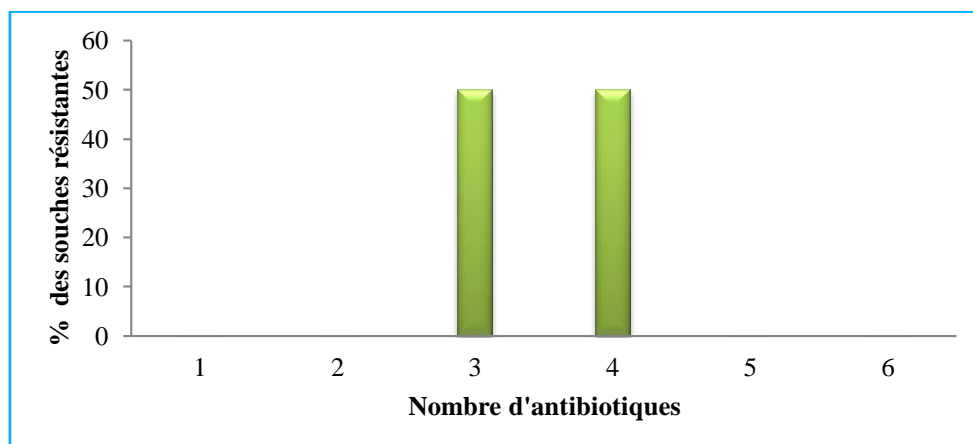
### I.2.1.2. *Pseudomonas*

Tous les *Pseudomonas* testés résistent à l'amoxicilline, à l'imipinème et à la triméthoprimine, cependant, aucune résistance n'est détectée à la gentamicine (Figure 25).



**Figure 25:** Résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas* étudiés.  
AMC : amoxicilline ; CTX : céfotaxime ; IPM : imipinème ; GM : gentamicine ; C : chloramphénicol ; SXT : triméthoprimine

Les résultats obtenus montrent que les souches de *Pseudomonas* résistent à 3 et/ou à 4 antibiotiques (Figure 26) en présentant 3 profils antibiotypiques (Tableau 17).



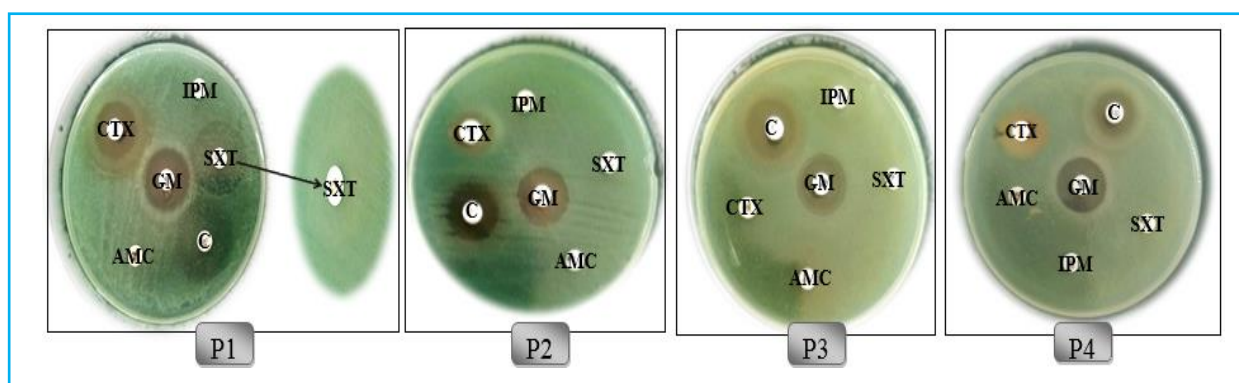
**Figure 26:** Antibio-résistance multiple de *Pseudomonas* étudiés.

**Tableau 17:** Profils antibiotypiques associés aux *Pseudomonas* étudiés.

Profils de résistance	Nombre d'antibiotiques	Nombre des souches	Souches résistantes
AMC/IPM/SXT	3	2	P1, P4
AMC/IPM/C/SXT	4	1	P2
AMC/ CTX/IPM/SXT	4	1	P3

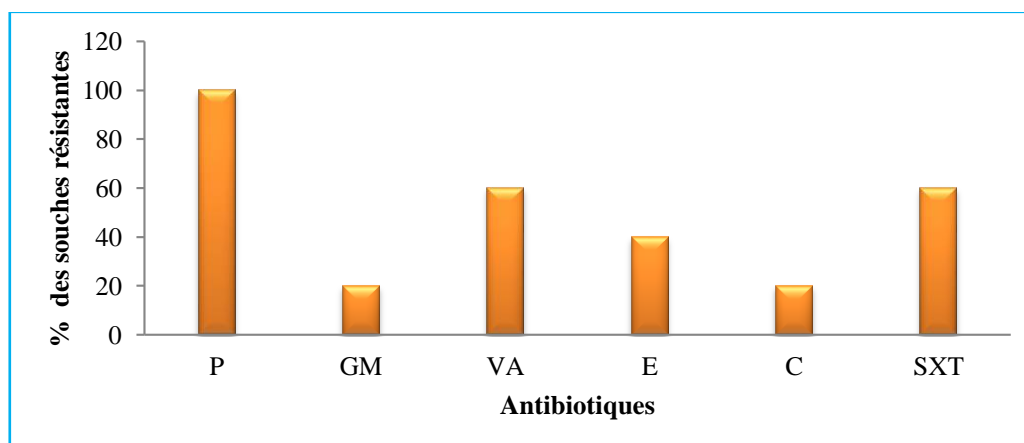
AMC : amoxiciline ; CTX : céfotaxime ; IPM : imipinème ; C : chloramphénicol ; SXT : triméthoprime.

Les résultats de l'antibiogramme des *Pseudomonas* étudiés sont illustrés dans la planche 7.

**Planche 7:** Antibiogramme des différentes souches de *Pseudomonas* étudiées.

### I.2.1.3. Staphylocoques

L'antibiogramme des staphylocoques montre une résistance totale à la pénicilline (100%), suivi par une résistance à la vancomycine et à la triméthoprime (60 %). Une résistance importante est également enregistrée à l'érythromycine (40 %) (Figure 27).

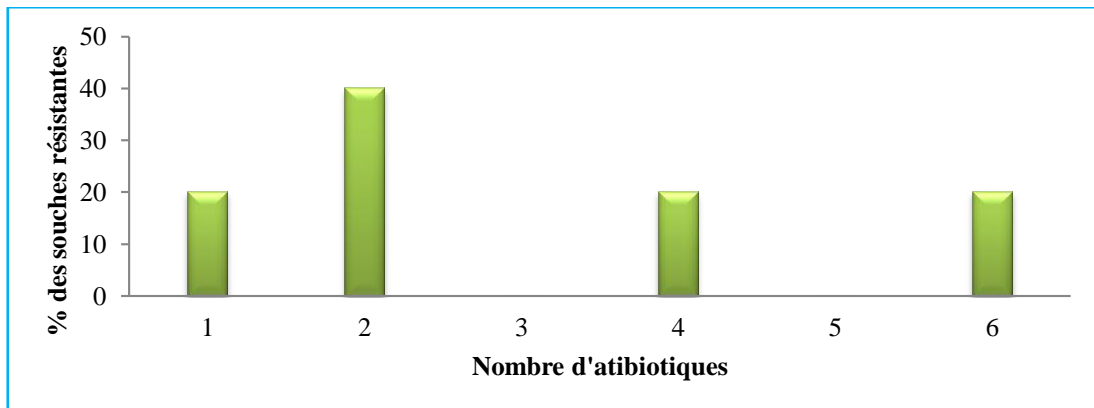
**Figure 27 :** Résistance aux antibiotiques des staphylocoques étudiés.

P : pénicilline ; GM : gentamicine ; VA : vancomycine ; E : érythromycine ; C : chloramphénicol ; SXT : triméthoprime.



Les staphylocoques étudiés présentent des résistances allant de 1 à 6 antibiotiques; c'est l'espèce *Staphylococcus xylosus* qui présente la multi-résistance la plus élevée (Figure 28).

Quatre profils antibiotypiques différents sont observés chez les staphylocoques étudiés (Tableau 18)



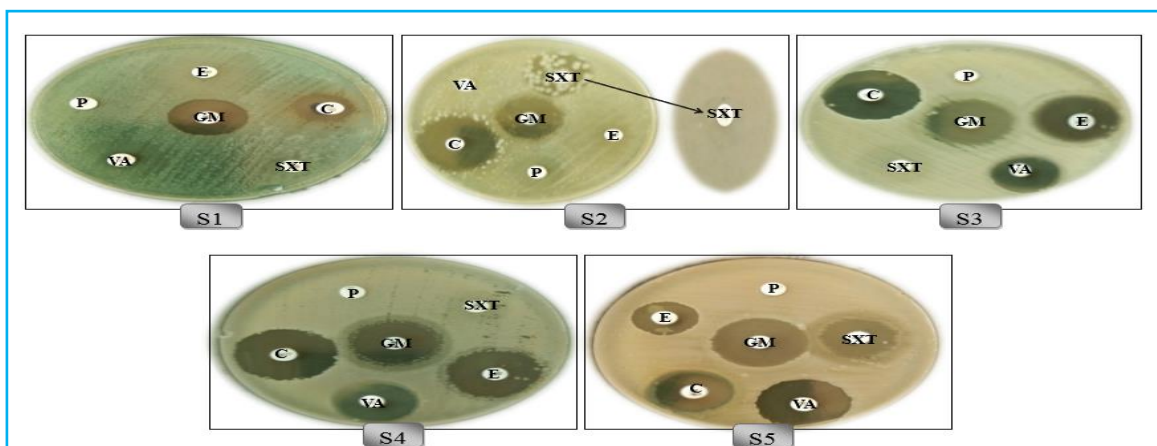
**Figure 28 :** Antibio-résistance multiple des staphylocoques étudiés.

**Tableau 18 :** Profils antibiotypiques associés aux staphylocoques étudiés.

Profils de résistance	Nombre d'antibiotiques	Nombre des souches	Souches résistantes
P	1	1	S5
P/SXT	2	2	S3, S4
P/VA/E/SXT	4	1	S2
P/GM/VA/E/C/SXT	6	1	S1

P : pénicilline ; GM : gentamicine ; VA : vancomycine ; E : érythromycine ; C : chloramphénicol ; SXT : triméthoprime.

Les résultats de l'antibiogramme des staphylocoques étudiés sont illustrés dans la planche 8.

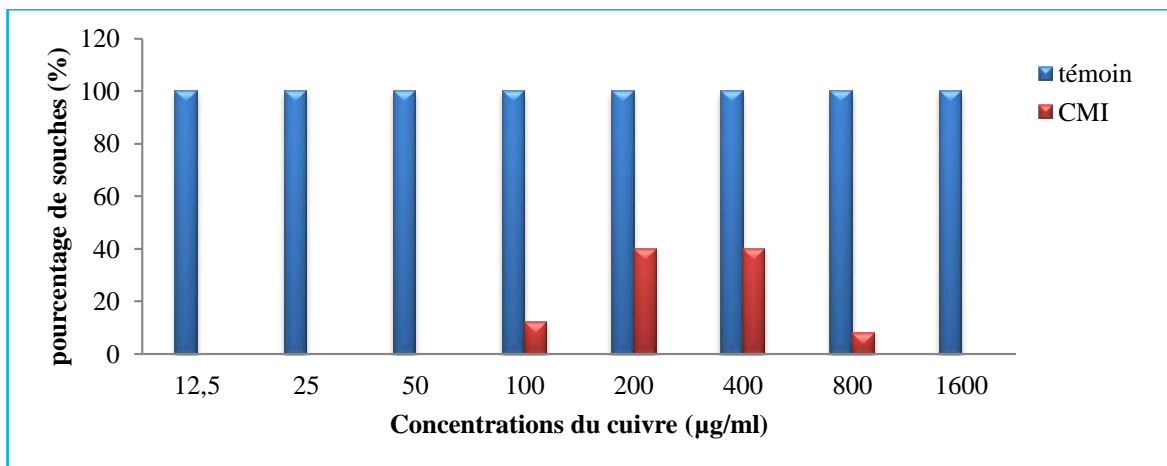


**Planche 8 :** Antibiogramme des différentes souches de staphylocoques étudiés.

## I.2.2. Résistance au cuivre

### I.2.2.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Les valeurs des CMI du cuivre obtenues se situent entre 100 et 800  $\mu\text{g/ml}$  pour la totalité des souches bactériennes étudiées. Les CMI de 200  $\mu\text{g/ml}$  et 400  $\mu\text{g/ml}$  sont les plus remarquées (40 % des souches) (Figure 29).



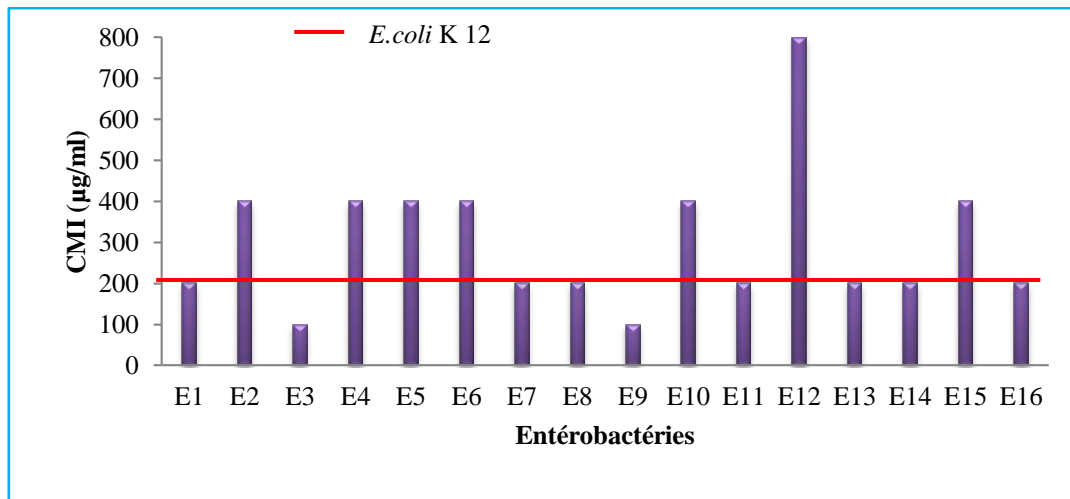
**Figure 29** : Distribution des CMI du cuivre pour toutes les souches bactériennes étudiées.

- **Entérobactéries**

Les CMI du cuivre vis-à-vis des entérobactéries étudiées se trouvent représentées sur l'histogramme ci-dessous (Figure 30).

Sur l'ensemble des souches des entérobactéries étudiées, une concentration de 200  $\mu\text{g/ml}$  du cuivre est efficace sur 43.75 % des souches, par ailleurs, une concentration de 400  $\mu\text{g/ml}$  du cuivre est efficace sur 37.5 % des souches. L'espèce *Klebsiella oxytoca* (E12) semble être la plus résistante (CMI = 800  $\mu\text{g/ml}$ ).

Selon la figure 30, les souches E2, E4, E5, E6, E10, E12 et E15 (soient 43.75 % des entérobactéries étudiées) sont considérées comme des souches résistantes puisque leurs CMI sont supérieures à celle de la souche de référence *Escherichia coli* K12 ATCC 10798.

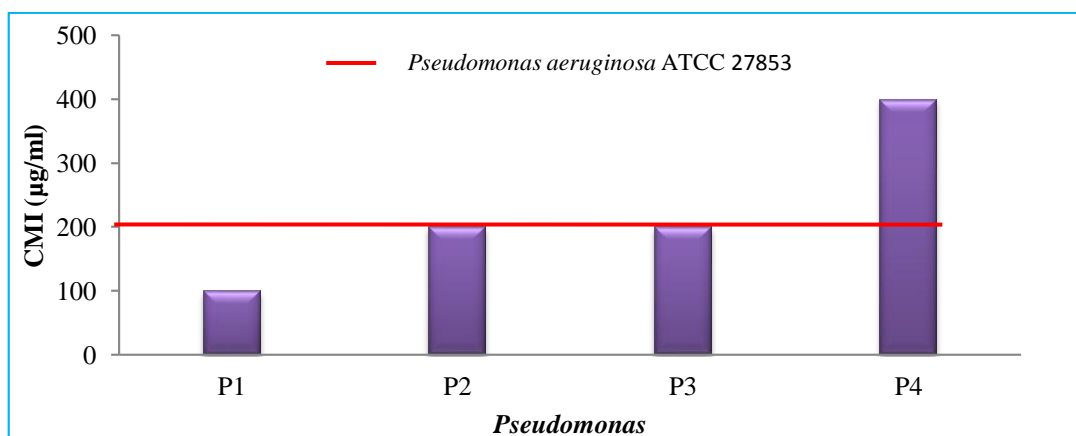


**Figure 30 :** Valeurs des CMI du cuivre vis-à-vis des entérobactéries étudiées.

- *Pseudomonas*

La Figure 31, représente les valeurs des CMI du cuivre vis-à-vis des souches de *Pseudomonas* étudiées.

Le cuivre est actif sur P1 à partir de 100 µg/ml et sur P2 et P3 à partir de 200 µg/ml. En revanche, une CMI de cuivre égale à 400 µg/ml est observée vis-à-vis d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* (P4) ce qui nous a permis de la classer comme une souche résistante (CMI P4 > CMI *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) (Figure 31).

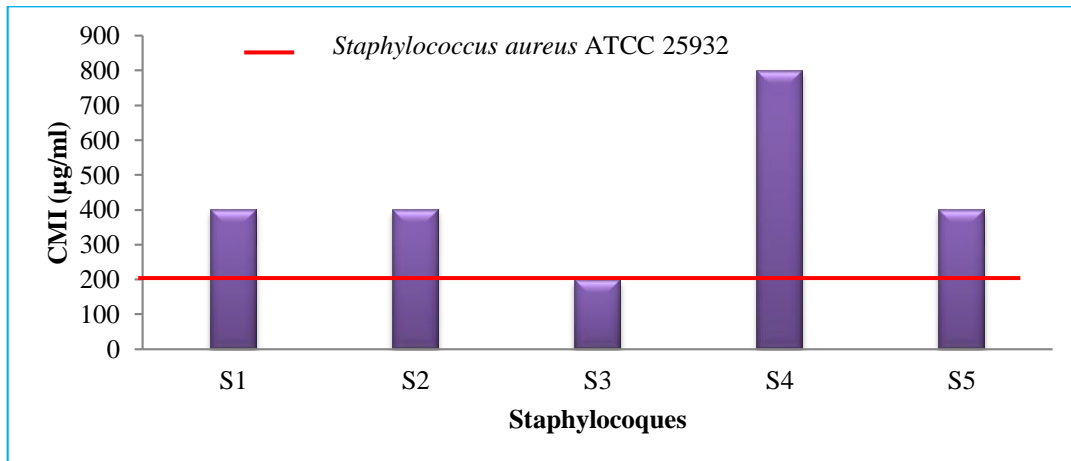


**Figure 31 :** Valeurs des CMI du cuivre vis-à-vis des *Pseudomonas* étudiés.

- **Staphylocoques**

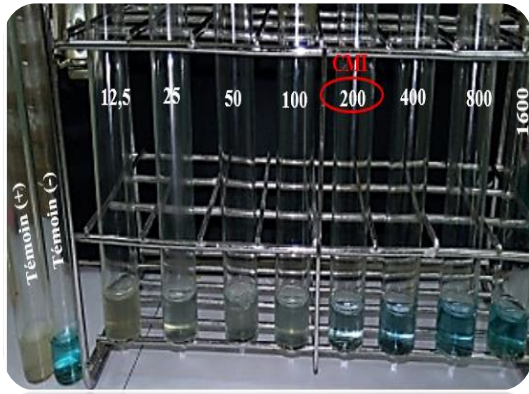
Les CMI du cuivre vis-à-vis des staphylocoques étudiés se trouvent représentées par la figure 32.

Le cuivre n'a pas un effet sur une souche de *Staphylococcus aureus* (S4) qu'à partir d'une concentration égale à 800 µg/ml. Cependant, nous avons noté que toutes les souches de staphylocoques étudiées (à l'exception de S3) sont résistantes au cuivre (leurs CMI > CMI *Staphylococcus aureus* ATCC 25932) (Figure 32).



**Figure 32 :** Valeurs des CMI du cuivre vis-à-vis des staphylocoques étudiés.

La planche 9 illustre les CMI du cuivre vis-à-vis des souches de références et de certaines souches d'importance clinique étudiées.



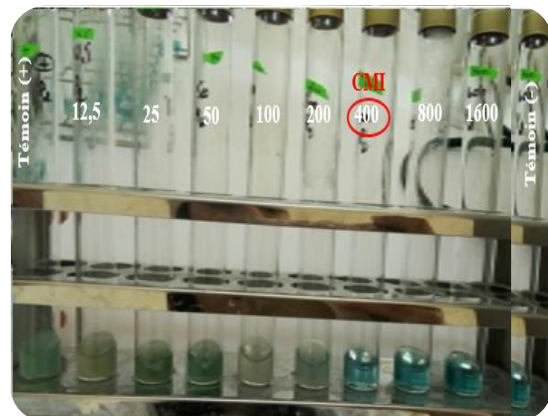
*Escherichia coli* K12 ATCC 10798.



*Klebsiella oxytoca* E12.



*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.



*Pseudomonas aeruginosa* P4.



*Staphylococcus aureus* ATCC 25932.



*Staphylococcus aureus* S4.

**Planche 9 :** Détermination de CMI du cuivre vis-à-vis des souches de références et de certaines souches d'importance clinique étudiées.

### I.2.2.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

En milieu solide, les CMB du cuivre enregistrées avec les entérobactéries vont de 200 à 1600 µg/ml, tandis que, les CMB du cuivre vis-à-vis des *Pseudomonas* vont de 800 à 1600 µg/ml (Tableau 19).

En ce qui concerne les staphylocoques, une concentration de 400 µg/ml est suffisante pour réduire le nombre de survivants de la population de la souche *Staphylococcus aureus* (S5) à au moins de  $10^{-4}$  bactéries/ml. En revanche, la CMB du cuivre vis-à-vis de la souche *Staphylococcus saprophyticus* (S3) est égale à 1600 µg/ml (Tableau 19).

**Tableau 19:** Valeurs des CMB du cuivre vis-à-vis des souches étudiées.

		<i>Enterobacteriaceae</i>																
		E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	K12
CMB (µg/ml)		1600	1600	1600	1600	800	1600	200	800	1600	1600	1600	800	1600	800	400	1600	400
		<i>Pseudomonadaceae</i>																
		P1			P2			P3			P4			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853				
		800			800			1600			1600			1600				
		<i>Micrococcaceae</i>																
		S1		S2		S3		S4		S5		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25932						
		800		800		1600		800		400		1600						

K12 : *Escherichia coli* K12 ATCC 10798.

### I.2.2.3. CMB/CMI

Dans le but de vérifier si les activités antibactériennes observées étaient bactéricides ou bactériostatiques, nous avons calculé le rapport CMB/ CMI.

Le récapitulatif de ces différentes activités se trouve consigné dans le tableau 20.

**Tableau 20** : Récapitulatif des activités antibactériennes observées avec le cuivre.

Souche bactérienne	Gram	CMB/CMI (moyenne±ecartype)	Effet
<i>Escherichia coli</i> K12 ATCC 10798	-	2±00	bactéricide
<i>Escherichia coli</i>	-	5.6±5.1	bactériostatique
<i>Citrobacter freundii</i>	-	10±8.4	bactériostatique
<i>Citrobacter diversus</i>	-	4±00	bactériostatique
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	8±00	bactériostatique
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	4.5±4.9	bactériostatique
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	4±00	bactériostatique
<i>Proteus vulgaris</i>	-	1±00	bactéricide
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	8±00	bactériostatique
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	8±00	bactériostatique
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	6±2.8	bactériostatique
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	6±2.8	bactériostatique
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25932	+	8±00	bactériostatique
<i>Staphylococcus xylosus</i>	+	2±00	bactéricide
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	2±00	bactéricide
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	+	8±00	bactériostatique
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	1±00	bactéricide

## II. Discussion

### II.1. Collecte et identification des souches bactériennes

L'utilisation massive des agents antibactériens dans la thérapie moderne et la prévention contre les infections nosocomiales devient non seulement une solution pour protéger notre santé contre les bactéries pathogènes mais aussi un problème de santé publique extrêmement sérieux dues à :

- La résistance et la multi-résistance des bactéries aux antibiotiques, les deux grandes causes impliquées dans cette augmentation proviennent en grande partie de l'abus des antibiotiques et le transfert plasmidique codant pour de différents mécanismes de résistance acquise (Prescott *et al.*, 2003).
- La contribution des surfaces environnementales contaminées à la transmission d'agents pathogènes dans les hôpitaux (Boyce, 2007).

Dans la présente étude, la résistance à deux agents bactériens (antibiotiques et cuivre) très utilisés dans les établissements de santé a concerné 25 souches bactériennes isolées de différents prélèvements biologiques (urines, pus, matières fécales et plaies) : 16 entérobactéries (43 % *Escherichia coli*, 18 % *Citrobacter*, 12 % *Klebsiella oxytoca*, et 6.25 % pour chacun de 4 espèces différentes), 4 *Pseudomonas* (2 *Pseudomonas fluorescences* et 2 *Pseudomonas aeruginosa*) et 5 staphylocoques (2 *Staphylococcus aureus*, 1 *Staphylococcus xylosus*, 1 *Staphylococcus epidermidis* et 1 *Staphylococcus saprophyticus*).

Le choix de ces bactéries est basé sur leurs fréquences et leurs importances dans l'apparition des infections hospitalières :

Les entérobactéries sont considérées la principale étiologie des infections du tractus digestif et urinaire, à la fois en milieu communautaire et hospitalier, encore *Escherichia coli* est de loin le germe le plus fréquemment isolé suivi de *Klebsiella* spp. et de *Citrobacter* spp. (Freney *et al.*, 2000).

La prédominance d'*Escherichia coli* a été mentionnée dans plusieurs études africaines, Hounton (2002) a rapporté un taux de 42.2 % d'*Escherichia coli*, et 4.4 % de *Klebsiella oxytoca*, Bakiri et Amamra (2009) ont rapportés une prédominance de 25.6 % d'*Escherichia coli* suivie de 20.8% de *Klebsiella* spp.



En effet, le genre *Pseudomonas* est l'un des principaux agents pathogènes responsables d'infections nosocomiales, avec un réservoir essentiellement hospitalier et une capacité d'acquérir et de cumuler facilement plusieurs mécanismes de résistance (Lister *et al.*, 2009). Les infections à *Pseudomonas* sont très favorisées par la mise en place de matériels invasifs comme les sondes vésicales pour les infections urinaires, les cathéters intra vasculaires pour les bactériémies et les sondes d'intubation pour les pneumopathies nosocomiales chez les patients ventilés mécaniquement (Flamm *et al.*, 2004).

Les espèces de staphylocoques diffusées en milieu hospitalier ou communautaire pose un problème de santé publique, nécessitant la détermination et la compréhension des caractères de résistances aux antibiotiques, qui représentent un des buts essentiels de la bactériologie médicale, pouvant faire évoluer les stratégies thérapeutiques (Akoua-Koffi, 2004). Plusieurs recherches bactériologiques placent les staphylocoques à coagulase négative (SCN) avec l'espèce *Staphylococcus epidermidis* en tête des germes isolés en milieu hospitalier responsables d'infection nosocomiale dans les unités de soins intensifs (39 % à 82.5 %), suivi par *Staphylococcus aureus* (31 %) et *Staphylococcus xylosus* (7 %) (Otto, 2012). Ces espèces ont la capacité d'adhérer à la surface des dispositifs médicaux et à former un biofilm (Otto, 2008).

La purification et l'identification des souches bactériennes ont permis de caractérisés les 25 souches collectées :

L'examen macroscopique montre que toutes les souches qui appartiennent au même type d'espèce ont le même aspect sur ses milieux de cultures spécifiques, En outre la coloration de Gram montre que toutes les souches appartiennent à la famille d'*Enterobacteriaceae* et de *Pseudomonadaceae* sont des bacilles à Gram (-). Par contre les souches du genre *Staphylococcus* sont toutes des Cocci à Gram (+) isolés, en courtes chaînettes ou regroupées en grappe de raisin. Ces résultats sont identiques aux caractéristiques morphologiques des bactéries cités ci-dessous décrites par (Avril *et al.*, 1992).

La recherche des enzymes respiratoires chez les souches collectées, révèle que toutes les souches d'entérobactéries et de staphylocoques possèdent l'enzyme catalase, par contre, les espèces du genre *Pseudomonas* ne le possèdent pas. Toutes les entérobactéries ne possède pas l'enzyme oxydase, en revanche, le genre *Pseudomonas* a toujours une oxydase positive. Les espèces du genre *Staphylococcus* possèdent un test oxydase variable. En outre toutes les

souches étudiées possèdent le nitrate réductase. Ces résultats sont en accord avec la littérature (Khan *et al.*, 2011 ; Dhayanithi *et al.*, 2010 ; Delarras, 2014).

L'identification biochimique des bactéries a été effectuée par la galerie biochimique classique et les galeries miniaturisées API. Les résultats obtenus ont montrés que les caractères biochimiques de chaque espèce bactérienne étudiée sont comparables à ceux rapportés par Holt *et al.* (1994), Prescott *et al.* (2003) et Joffin et Layral (2006).

## II.2. Résistance des bactéries aux antibiotiques

Les résultats de l'antibiogramme montrent que toutes les entérobactéries et les *Pseudomonas* étudiés résistent à l'amoxicilline et l'imipénème. Ces résultats pourrait s'expliquer d'une part, par des résistances naturelles chez certaines espèces (*Citrobacter freundii*, *Yersinia enterocolitica*) (CA-SFM, 2016), et par des résistances acquises suite au large usage de ces antibiotiques d'autre part (Courvalin *et al.*, 2006).

L'amoxicilline est la molécule la plus utilisée dans le traitement des infections causées par *Escherichia coli*, de ce fait, la sensibilité de cette bactérie à cet antibiotique à beaucoup diminuée Courvalin *et al.* (2006). Notre étude confirme cette observation, les sept souches d'*Escherichia coli* étudiées sont résistantes à l'amoxicilline. Ce résultat est comparable à ceux de (Ben Redjebi et Boutiba, 2007). Généralement, la résistance des entérobactéries et des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines s'expliquerait par l'utilisation massive de ces antibiotiques en médecine humaine (Moulin *et al.*, 2008).

L'imipinème est connues comme un agent responsable a l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane de la paroi et provoque une forte sensibilité chez les bacilles à Gram (-) (Courvalin *et al.*, 2006). La résistance des souches étudiées à l'imipinème (carbapénème) s'explique essentiellement par deux mécanismes (Courvalin, 2008).

- le premier résulte d'un défaut de perméabilité membranaire par altération qualitative ou quantitative des porines membranaires, voie de pénétration des carbapénèmes dans la bactérie ;
- le second correspond à l'inactivation de l'antibiotique par la production de carbapénémases.

L'émergence de ces enzymes est décrite de façon croissante dans le monde entier et constitue un réel problème pour la santé publique, les carbapénèmes représentant très souvent les dernières molécules actives de l'arsenal thérapeutique pour combattre les bactéries multirésistantes (Courvalin et al., 2006).

Les entérobactéries et les deux espèces du genre *Pseudomonas* étudiés ont montré une forte résistance vis-à-vis de la triméthoprime, cette résistance est due à la propagation horizontale des gènes de résistance, exprimant des variantes insensibles à la triméthoprime (koumaré et Bougoudogo 1993).

La résistance à la céfotaxime pour les souches *Escherichia coli* (E3), *Edwardsiella tarda* (E14), *Proteus vulgaris* (E15), *Pseudomonas aeruginosa* (P3) pourrait s'expliquer par la production des céphalosporinases à spectre étendu, il s'agit donc d'une résistance acquise qui peut être due à une mutagénèse ou à un transfert de gènes (Freny et al., 2000).

En outre la résistance au chloramphénicol pourrait s'expliquer par une réduction de la perméabilité membranaire de l'antibiotique, une mutation sur la sous-unité 50S du ribosome bactérien et la présence d'une enzyme appelée chloramphénicol acétyltransférase (Courvalin et al., 2006).

Les résultats obtenus dans la présente étude sont très inquiétants parce que le chloramphénicol est un antibiotique qui peut provoquer une aplasie médullaire irréversible et il est interdit d'utilisation (Courvalin, 2008). Nos résultats signifient que cet antibiotique est encore utilisé. Selon le 3<sup>ème</sup> rapport du réseau algérien de la surveillance de la résistance aux antibiotiques : 10.24 % des *Escherichia coli* sont résistantes au chloramphénicol (Rahal, 2013).

Notre étude a révélé que seulement 6.25 % des entérobactéries sont résistantes à la gentamycine. Cependant, tous les *Pseudomonas* sont sensibles à cet antibiotique.

La gentamycine garde une excellente activité et reste très actifs sur les entérobactéries et principalement sur *E. coli*, la résistance détectée pourrait s'expliquer par la présence d'enzyme de modification de la gentamycine (Courvalin et al., 2006). Ces résultats sont très proches à ceux rapportés par Baker et al. (2006) qui ont confirmés la résistance des souches d'entérobactéries (*Escherichia coli* et *Klebsiella* spp.) à la gentamycine.

La sensibilité des *Pseudomonas* à la gentamicine pourrait s'expliquer par l'utilisation limitée de cet antibiotique contre les infections à *Pseudomonas*. La gentamicine agit par perturbation de la synthèse protéique au niveau des ribosomes bactériens (Freney *et al.*, 2000).

En ce qui concerne les staphylocoques, nos études ont montrées que les cinq espèces étudiées présentent des résistances variables à tous les antibiotiques testés.

La résistance la plus marquée est celle à la pénicilline G (100 %). Les staphylocoques résistent à la pénicilline G grâce à l'enzyme pénicillinase plasmidique (Freney *et al.*, 2000).

Nos résultats montrent également une résistance importante à la vancomycine (60 % des staphylocoques), Noble *et al.* (1992) ont montré que les souches de *Staphylococcus* résistantes à la vancomycine auraient acquis ce caractère suite au transfert plasmidique de l'opéron *vanA*, réalisé par conjugaison avec *Enterococcus faecalis*.

L'émergence des souches résistantes à la vancomycine a été déjà décrite en milieu hospitaliers dans plusieurs pays particulièrement en Algérie (Aouati, 2009 ; Rebiahi, 2012).

Les profils de résistances les plus importants obtenus dans la présente étude sont ceux des espèces *Edwardsiella tarda*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus xylosus*. Ces espèces représentent les multi-résistances les plus élevées. Ces multi-résistances vont continuer à se développer et provoquer des impasses thérapeutiques dans un proche avenir, si des mesures énergiques ne se sont pas entreprises.

L'étude de l'antibio-résistance nous a permis de conclure que la plupart des bactéries collectées du milieu hospitalier sont multi-résistantes. L'émergence de ces bactéries est un phénomène complexe qui ne repose pas uniquement sur la diffusion d'un clone bactérien résistant mais également sur la diffusion d'éléments génétiques mobiles et de gènes de résistance qui constituent un véritable pool de résistance accessible à une grande variété de souches bactériennes (Wellington *et al.*, 2013).

### II.3. Résistance au cuivre

La surveillance microbiologique de l'environnement dans nos établissements de santé représente un des axes de la politique de lutte contre les infections nosocomiales (Barbut et Neyme, 2006).

Le remplacement des matériaux utilisés communément sur les surfaces à haut taux de contact dans les établissements de santé par du cuivre semblerait être un complément nécessaire, car ce métal montre un fort pouvoir antifongique, antivirale et antibactérien (Noyce *et al.*, 2007 ; Esperito-Santo *et al.*, 2011 ; Solioz, 2011).

Dans la présente étude, en comparant les valeurs de CMI du cuivre des bactéries étudiées à celle des souches de référence correspondantes, nous avons constaté que 52 % des souches bactériennes étudiées sont sensibles au cuivre. En revanche, 48 % des souches sont résistante au cuivre.

Les souches sensibles au cuivre sont : *E. coli* (E1, E3, E7), *Citrobacter freundii* (E8, E9), *Yersinia enterocolitica* (E11), *Edwardsiella tarda* (E14) et *Salmonella typhimurium* (E16) avec la majorité des souches étudiées du genre *Pseudomonas* (P1, P2 et P3) et du genre *Staphylococcus* (S1, S2, S3 et S5). Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature scientifique qui cite l'efficacité intrinsèque du cuivre pour détruire rapidement plusieurs types de bactéries pathogènes dont *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* et même les staphylocoques dorés résistants à la Vancomycine (Bleichert *et al.*, 2014).

Le mécanisme exact, par lequel le cuivre tue les bactéries, est aujourd'hui encore inconnu. Cependant, plusieurs théories sont développées et étudiées (Hobman *et al.*, 2007):

- ✓ La fuite de potassium ou de glutamate à travers la membrane cellulaire.
- ✓ La perturbation de la balance osmotique.
- ✓ La chélation à des protéines qui n'ont pas besoin de cuivre.
- ✓ Le stress oxydant par génération de peroxyde d'hydrogène.

Les espèces qui montrent une résistance au cuivre sont: *Escherichia coli* (E2, E4, E5, E6), *Citrobacter diversus* (E10), *Proteus vulgaris* (E15), *Pseudomonas aeruginosa* (P4), *Staphylococcus aureus* (S4) avec une CMI du cuivre égale à 400 µg/ml, et *Klebsiella oxytoca* (E12) avec une valeur de CMI égale à 800 µg/ml.

Cette forte capacité bactérienne de résistance au cuivre pourrait s'expliquer par le fait que les microorganismes (en excluant les virus) [Borkow et Gabbay \(2004\)](#) ont développé des systèmes complexes pour maintenir des taux précis d'ions cuivre au niveau intracellulaire. En plus de pompes ioniques à flux entrant/sortant spécifiques, d'autres mécanismes de tolérance existent comme :

- Une barrière perméable,
- La séquestration intra-extracellulaire,
- La détoxification enzymatique,
- La réduction de sensibilité aux ions cuivre de ses cibles ([O'Gorman et Humphreys, 2012](#)).

La détermination du rapport CMB/CMI a montré que l'action du cuivre sur les bactéries testées est bactériostatique exceptées la souche de référence *E. coli* K12 ATCC 10798 et les souches hospitalières de *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus aureus*.

Le mode d'action proprement dit du cuivre sur les microorganismes est encore discuté. A ce sujet, [Esperito Santo et al. \(2011\)](#) ont montré que le stress oxydatif du cuivre n'a pas inhibé la mort cellulaire d'*E. coli*, mais ceci a doublé le temps requis pour une mort complète des  $10^9$  cellules de 1 à 2 minutes. [O'Gorman et Humphreys \(2012\)](#) ont confirmé que le cuivre peut ainsi inactiver les enzymes cytoplasmiques servant à la fabrication de chaînes ramifiées d'acides-aminés. Le mécanisme de destruction cellulaire après exposition au cuivre n'était pas connu en 2007. Cependant les résultats de tests faits avec des *Staphylococcus aureus* méthicilline résistants suggèrent que c'est le matériel génétique qui est dégradé. Il a été démontré que les ions cuivre ont la capacité de changer l'arrangement de l'ADN en s'y attachant et en changeant sa conformation ([Noyce et al., 2007](#)). L'étude de Warnes et Keevil avance que l'ADN est la cible principale de la toxicité du cuivre, ce qui mène à une fragmentation rapide de l'ADN et à la mort cellulaire ([Grass et al., 2011](#)).

En conclusion, nous pouvons dire que la multi-résistance de différentes souches bactériennes étudiées aux doigts conduit à renforcer les mesures d'hygiène dans les différents établissements de santé concernés, puisque le contrôle de ce type de souche n'est pas 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.

Une efficacité partielle du cuivre a été prouvée, par contre, ce qui pourrait sembler plus vraisemblable est le fait que ce métal peut avoir un rôle important dans le maintien et la prolifération de la résistance aux antibiotiques ([Baker et al., 2006](#)).

---

# **Conclusion et perspectives**

---



---

## Conclusion

Les entérobactéries, les *Pseudomonas* et les staphylocoques sont des microorganismes responsables des pathologies variées, fréquentes et parfois redoutables. Ce caractère redoutable des infections est dû en grande partie à leur pouvoir toxique et à leur grande capacité de résistance aux agents antibactériens.

Les résultats de l'étude de la résistance de certaines souches d'entérobactéries, *Pseudomonas* et staphylocoques (désignés comme des agents cliniques et épidémiologiques) aux antibiotiques et au cuivre, permettent de tirer les conclusions suivantes :

- En plus de leur résistance naturelle, toutes les souches bactériennes étudiées présentent une résistance acquise au moins à un antibiotique testé ;
- La majorité des bactéries étudiées sont multi-résistantes ;
- Un nombre important de staphylocoques et d'entérobactéries sont résistantes au cuivre ;
- Le cuivre possède une action antibactérienne importantes, plus de 50 % des bactéries étudiées sont sensibles à ce métal ;
- Le mécanisme antibactérien du cuivre vis-à-vis des bactéries étudiées est globalement bactériostatique.

## Perspectives

Il serait judicieux :

- De déterminer les supports génétiques de la résistance aux antibiotiques ;
- De mettre en œuvre dans les laboratoires de microbiologie clinique des méthodes phénotypiques pour détecter les gènes de résistances afin de surveillance l'antibio-résistance ;
- D'instaurer un système de veille nationale, pour superviser l'émergence et la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques ;
- De comparer la résistance aux antibiotiques et au cuivre des bactéries d'intérêt clinique ;
- D'installer des équipements en cuivre dans les hôpitaux (surfaces et objets en cuivre) et de surveiller la prévalence des infections nosocomiales afin de prouver l'efficacité de ce métal.

---

# **Références bibliographiques**

---

## A

Akinbowale O.L., Peng H., Grant P., et Barton M.D. (2007). Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 30: 77-82.

Akoua-Koffi C., Guessennd N., Gbonon V., Faye-Ketté H. et Dosso M. (2004). La méthicillino-résistance de *Staphylococcus aureus* isolés à Abidjan (1998-2001): un nouveau problème en milieu hospitalier. *Med. Mal. Infect.* 34: 132-136.

Alioua M. (2015). Les staphylocoques: sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire de *staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar Annaba. p: 18.

Aouati H. (2009). "Isolement des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicillines : étude de leur sensibilité aux autres familles d'antibiotiques". Mémoire de Magistère, Université Mentouri Costantine. p: 8,9.

Avril J., Dabernat H., Denis F., Monteil H. (1992). Bactériologie clinique 2ème Ed. Ellipses, p: 149-153.

Avril J., Fauchère J. (2002). Bactériologie générale et médicale. Ed Ellipses, p: 141-250.

## B

Baker C., Wright M., Stepanauskas R., et McArthur J. (2006). Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiol.*14: 176-182.

Bakiri N., Amamra I. (2009). Etude de l'antibio-résistance de souche d'entérobactéries isolées des eaux polluées et en milieu hospitalier. Thèse de Doctorat, Université des frères Mentouri Costontine. p:1.

Balaban N., Rasooly A. (2000). Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology.* 61: 1-10.

Barbier F., Wolff M. (2010). Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa* vers l'impasse thérapeutique. *Med. Sci.*26: 960 - 968.

Barbut F., Neyme D. (2006). Les difficultés d'interprétation des contrôles microbiologiques environnementaux. *Revue Francophone des Laboratoires.* p: 27-32.

Ben. redjebI S., Boutiba B. (2007). L'antibio-résistance en Tunisie. LART, p: 7.

Bertrand R. (2003). "Étude de la contamination des milieux internes de l'œuf par *salmonella* sérotype enteritidis". Thèse de Doctorat, Faculté de médecine de Créteil .p :110.

Bismith R., et Leclercq R. (2000). *Staphylococcus aureus* et antibiotiques. In: Précis de bactériologie clinique. ESKA, p: 611-918.

Bleichert P., Espérito-Santo C., Hanczaruk M., Meyer H., et Grass G. (2014). Inactivation of bacterial and viral biothreat agents on metallic copper surfaces. *Inactivation of bacterial and viral biothreat agents on metallic copper surfaces*. p: 22,110, 230.

Borkow G., Gabbay J. (2004). Putting copper into action: copper-impregnated products with potent biocidal activities. *FASEB J*. p: 123.

Boulahbal F. (2002). Microbiologie S<sub>1</sub> clinique. Office des publications universitaires, p: 126,167-173.

Boyce J.M. (2007). Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection. *J. Hosp. Infect.* p: 50-54.

Braun C., Ockhuijsen E., Eppens M., Koster W. (2001). Maturation of *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J. Biol. Chem.* 276: 26030-26035.

## C

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

CA-SFM, COMITE DE L'ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIETE FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE. (2016). Recommandation .p: 12-15, 18,23-25, 27,39-48,56-63.

Cooksey D. (1994). Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. *FEMS. Microbiol. Rev.*14:6; 381.

Courvalin P. (2008). La résistance des bactéries aux antibiotiques : combinaisons de mécanismes biochimiques et génétiques .*Bull .Acad .Vét.* 161.

Courvalin P., Leclercq R., Bingen E. (2006).Antibiogramme 2<sup>ème</sup> édition. ESKA, p: 117, 141, 163, 279, 299, 341,349.

Couture B. (1990). Bactériologie médicale : Etude et méthode d'identification des bactéries aérobies et facultatives d'intérêt médical. Vigot, p: 15-32.

## D

Degremont. (1998). Mémento technique de l'eau, tome I. Degremont, Paris. 592 p.

Dellarras C. (2003). Microbiologie de l'environnement avec législation. Travaux pratiques commentés. Gaetan Morin éditeur. P : 223-230.

Delarras C. (2007). Microbiologie pratique pour laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Tec & DOC, p: 289- 476.

Delarras C. (2014). Pratique en microbiologie de laboratoire, recherche des bactéries et de levures-moisissures. TEC & DOC, p: 269-411.

Denis F., Ploy M., Martin C., Bingen E., Quentin R. (2007). Bactériologie médicale techniques usuelle. Ed Elsevier Masson SAS, p: 295-298.

Dhayanithi N., Ajith Kumar T., Kathiresan K. (2010). Effect of neem extract against the bacteria isolated from marine fish. *Journal of Environmental Biology*. 31: 409-412.

## *F*

El Kouir D., (2003). Infections à staphylocoques : aspects cliniques et bactériologiques *EMC. Maladies infectieuses*. [8-007-A-10].

Espirito Santo C., Taudte N., Nies D.H., et Grass G. (2008). Contribution of copper ion resistance to survival of *Escherichia coli* on metallic copper surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* p: 977-986.

Espirito Santo C., Wen Lam E., Elowsky C.G., Quaranta D., Domaille D.W., Chang C.J., Grass G. (2011). Bacterial killing by dry metallic copper surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* p: 794-802.

## *F*

Fauchere J. (2002). Bactériologie générale et médicale. Ellipses, p: 200-202.

Favet S. (2013). "Antibiotiques et résistance bactérienne : offensives et contre-offensives" Thèse de Doctorat, Université 3 Genève. p: 1, 7-8.

Figarella J. (2004). Microbiologie générale et appliquée. DELAGRAVE édition, p: 104.

Flamm K., Weaver K., et al. (2004). Factors associated with relative rates of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates tested in clinical laboratories in the United States from 1999 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother.*48: 2431-2436.

Freney J., Reanaud F., Hansen W., Bollet C. (2000). Précis de bactériologie clinique. ESKA, p: 557,583, 597,611.

Freney J. (2007). Précis de bactériologie clinique. Éd. ESKA, p: 783.

## *G*

Galloway D. R. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: recent developments. *Mol. Microbiol.* 5: 2315-21.

Gao G., Yin D., Chen D., Xia Y., Yang J., et al. (2012). Effect of biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2P24 on soil fungal community in cucumber rhizosphere Using T-RFLP and DGGE. *Soil Fungal Com. Cucum. Rhizos.* 7: 1-9.

Gaudy C. (2005). Antibiotiques : pharmacologie et thérapeutiques. Elsevier, p: 269.

Gautier V. (2007). "Caractérisation et expression des gènes codant pour les  $\beta$ - lactamases chromosomiques au sein des entérobactéries de l'environnement". Mémoire de Magister, Université de Lyon. p: 13.

Grass G., Rensing C., Solioz M. (2011). Metallic copper as an antimicrobial surface. *Appl. Environ. Microbiol.* p: 1541-1547.

Guardabassi L., Courvalin P. (2006). Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin.* p: 1,18.

Guiraud J. (2003). Microbiologie alimentaire. Dunod, p : 185-265.

## *H*

Harmouch A. (2016). Etude de l'antibio-résistance chez 83 souches autochtones des bactéries lactiques. Mémoire de Magister, Université d'Oran. p:2,8, 9-13.

Hasman H., Aarestrup F.M. (2002). TcrB, a gene conferring transferable copper resistance in *Enterococcus faecium*: occurrence, transferability, and linkage to macrolide and glycopeptides resistance. *Antimicrob Agent Chemother.* p: 1410-1416.

Hobman J., Yamamoto K., Oshima T. (2007). Transcriptomic responses of bacterial cells to sublethal metal ion stress. *Molecular Microbiology of Heavy Metals.* p: 200.

Holt G., Krieg N., Sneath P., *et al.* (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology. *Williams & Wilkins*, p: 532 ; 787.

Hounton N. (2002). Sensibilité des germes aux antibiotiques dans les infections urinaires de l'enfant à Cotonou (à propos de 213 souches bactériennes) .Thèse de Med, p:30.

Houchi S. (2014). "Métallo-Bêta-lactamases-recherche de souches bactériennes productrices-essais d'inhibition de l'activité enzymatique relative par trois *flavonoïdes commerciaux* et deux extraits de *Terminalia chebula*". Mémoire de Magister, Université Ferhat Abbas 1 Sétif. p: 1.

## *J*

Joffin J. et Leyral. (2006). Microbiologie technique, Tome1 dictionnaire des techniques 4<sup>ème</sup> Ed. scérén. Crdp. aquiraine, p: 22-23.

## *K*

Kettner M., Milosevic P., et Hletkova M. (1995). Incidence and mechanisms of aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* serotype 011 isolates. *Infection.*23: 380-3.

Khan F., Rizvi M., Shukla I., et Malik A. (2011). A novel approach for identification of members of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical samples. *Biology and Medicine.*3: 313-319.

Koumaré B., et Bougoudogo F. (1993). Résistance aux antibiotiques de 2187 souches bactériennes isolées au Mali entre 1980 et 1991. *Med. Mal. Infect.*23: 367-369.

Kumar A., et Schweizer H. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Adv. Drug. Delivery. Rev.* 57: 1486-1513.

### L

Larpent J. (1997). *Microbiologie des eaux d'alimentaire* : Technique de labo. Edition Tec et Doc, p: 294-300.

Leclercq R. (2002). Résistance des staphylocoques aux antibiotiques. *Ann. Fr. Anesth. Réanim.* 21: 375-383.

Le Minor et Véron. (1984). Bactériologie médicale. Flammarion médecine-sciences, p:214-525.

Lennette E.H., Balows A., Hausler W.J., et Shadomy H.J. (1985). Manual of Clinical Microbiology. Fourth Edition: American Society for Microbiology. Washington, D. ZC.

Lister P., Wolter D., et Hanson N. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology.*22: 582-610.

Livermore D. (2003). Bacterial resistance: Origins, Epidemiology, and Impact, An official publication of the infectious diseases society of America. *Clin. Infect. Dis.* 36: 11–23.

### M

Mathur S., Singh R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acide bacteria. *Int J.Food.Microbiol.*105:281-295.

Merens A., Cavallo J. (2008). Spectre d'activité antibactérien d'un antibiotique et catégorisation clinique. *Ed. Elsevier.* p: 302.

Moulin G., Cavalie P., Pellanne I., Chevance A., Laval A., Millemann Y., Colin P., et Chauvin C. (2008). A comparison of antimicrobial usage in human and veterinary medicine in France from 1999 to 2005. *J. Antimicrob. Chemother.*16: 29-30.

Muylaert A., Mainil J. (2012). Résistances bactériennes aux antibiotiques: les mécanismes et leur contagiosité. *Ann. Méd. Vét.* 156: 109-123.

### N

Naas T., Laurence P., Laurent P., Ronco E., et Nordmann P. (1999). An SHV-Derived Extended-Spectrum-Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*43: 1281-1284.

Nauciel C., Vildé J. (2005). Bactériologie médicale 2<sup>ème</sup> édition. Masson, p: 46, 77-80.

Navarro M., Gabbiani C., Messori I., Gambino D. (2010). Metal-based drugs for malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis: recent achievements and perspectives. *Drug. Discov. Today*. p: 1070-1078.

Noble W., Virani Z., Cree R. (1992). Co-transfer of vancomycin and other resistant genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 93: 95-98.

Normark B., et Normar S. (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance .*J. Intern. Med.* 252: 91-106.

Noyce J.O., Michels H., Keevil C.W. (2007). Inactivation of influenza a virus on copper versus stainless steel surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* p: 2748-2750.

## O

O'Gorman J., Humphreys H. (2012). Application of copper to prevent and control infection. *J. Hosp. Infect.* p: 217-223.

Otto M. (2008). Staphylococcal biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322: 207- 228.

Otto M. (2012). Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinant of pathogenicity. *Review of Medicine.*64: 1-14.

## P

Parveen M., Harish B., et Parija S. (2010). AmpC beta-lactamases among Gram negative clinical isolates from a tertiary hospital, South India. *Brazilian Journal of Microbiology.*41: 1517-8382.

Paterson D.L., Bonomo R.A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: A clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* 18:657-86.

Paulsen I., Press C., Ravel J., et Kobayashi D., et al., (2005). Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nat. Biotechnol.* 23: 873-885.

Pechère J., Köhler T. (2008). Patterns and modes of  $\beta$ -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Infection.*5: 15- 18.

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

Planchon S., Gaillard-Martinie B., Dordet-Frisoni E., Bellon-Fontaine M., Leroy S., Labadie J., Hebraud M., et Talon R. (2006). Formation of biofilm by *Staphylococcus xylosus*. *International Journal of Food Microbiology.*109: 88-96.

Poirel L. (2006). Nouveaux mécanismes de résistance chez *Pseudomonas aeruginosa* : quelles perspectives. *XVII<sup>e</sup> Congrès nationale de la SFHH-Nantes.* p: 25.



Prescott M., Harley P., et Klein A. (1999). Microbiologie. De Boeck. Université, 981  
Prescott M. (2009). Microbiologie 2<sup>ème</sup> éd. De Boeck, p: 600-603.

Prescott M., Harely P., et Klein A. (2003). Microbiologie 2<sup>ème</sup>Ed. De Boeck, p: 506.

Prescott M., Harley P., et Klein A. (2010). Microbiologie 2ème édition. De Boeck, p: 800-845.

## Q

Quincampoix J., Mainardi J. (2001). Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. *Réanimation*. 10: 267-275.

## R

Rahal K. (2013). Les antibiotiques. Office des publications universitaires, p: 15-133.

Rebiahi A. (2012). Caractérisation des souches de *Staphylococcus aureus* et étude de leur antibio-résistance au niveau du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen. Thèse de Doctorat, Université de Tlemcen. p:1-32.

Rodier J., Bazin C., Broutin J.P., Chambon P., Champsaur H., et Rodi L. (2005). L'analyse de l'eau: Eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer. Chimie, physico-chimie, microbiologie, biologie, interprétation des résultats. Ed. Dunod. 8ème Edition. Paris.

Rouch D. A., Lee B., et Morby P. (1995). Understanding cellular responses to toxic agents: A model for mechanism choice in bacterial Metal Resistance. *J. Ind. Microbiol.* 14: 32-141.

## S

Solioz M. (2011). Copper kills bacteria: end of hospital-acquired infections. *Scienceonthenet*. 18 avril. <http://www.scienceonthenet.eu/content/article/copper-kills-bacteria-endhospital-acquired-infections> (consulté le 24 mai 2017).

Spencer J. D., Hastings M. C., Rye A. K., English B. K., et Ault B. H. (2008). Gastroenteritis caused by *Edwardsiella tarda* in a pediatric renal transplant recipient. *Pediatric Transplantation*. 12: 238-241.

## T

Talbert M., Willoquet G., et Gervais R. (2009). Pharmaco clinique. *Wolters Kluwer*. p: 641-655.

Thornton V., Davis J., Clair M., et Cole M. (2003). Inoculation of *Staphylococcus xylosus* in SJL/J mice to determine pathogenicity. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*. 42: 49-52.

Trögl J., Chauhan A., Ripp S., Layton C., Kuncová G., et Sayler G. (2012). *Pseudomonas fluorescens* HK44: lessons learned from a model whole-cell Bioreporter with a broad application history. *Sensors*. 12: 1544-1571.

Tselenis-Kotsowilis A., Koliomichalis M., et Papavassiliou J. (1982). Acute pyelonephritis caused by *Staphylococcus xylosum*. *Journal of Clinical Microbiology*.16: 593- 594.

## V

Vernozy-Rozand C., Mazuy C., Prevost G., Lapeyre C., Bes M., Brun Y., et Fleurette J. (1996). Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. *International Journal of Food Microbiology*.30: 271-280.

Vuong C., Otto M. (2002). *Staphylococcus epidermidis* infections. *Review of Medicine*.4: 481.

## W

Walsh C. (2003). Antibiotics: actions, origins, resistance. *American Society for Microbiology press*. p: 21.

Walsh F., Morrissey J., O'Gara F. (2001). *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Cur.Opin. Biotechnol*.12: 289-295.

Wang C., Cai P., Chang D., et Mi Z. (2006). A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum  $\beta$ - lactamase. *J. Antimicrob.Chemother*.57: 1261-1262.

Wang I., Kuo H., Chen Y., Lin C., Chang H., Chuang F., et Lee M., (2005). Extra intestinal manifestations of *Edwardsiella tarda* infection. *International Journal of Clinical Practice*.59: 917-921.

Warnes S., Keevil C. (2011). Mechanism of copper surface toxicity in vancomycin-resistant *Enterococci* following Wet or Dry Surface Contact. *Appl. Environ. Microbiol*. p: 6049-6059.

Weaver L., Michels H., Keevil C. (2009). Potential for preventing spread of fungi in airconditioning systems constructed using copper instead of aluminium. *Lett. Appl. Microbiol*. p: 1-6.

Weber D., Rutala W. (2013). Use of metals as microbicides in the prevention of noscomial infections. *Association for Professionals In Infection Control and Epidemiology*. p: 271-285.

Weiss K. (2002). La résistance bactérienne la nouvelle guerre froide. *Le médecin du québec*.37: 41-49.

Wellington E.M.H., Boxall A.B., & Cross P., et al. (2013). The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. *Lancet. Infect. Dis*. 13:155-65.

Wong, W., Levi K., Baddal B., Turton J., et Boswell T. (2011). Spread of *Pseudomonas fluorescens* due to contaminated drinking water in a Bone Marrow Transplant Unit. *J.Clin. Microbiol*. 49: 2093-2096.

## Y

Yala M., Mered A., Mohamedi D., et Ouar M. (2001). Classification et modes d'action des antibiotiques. *Méd.Maghreb*. 91:13-14.

---

# Annexes

---

## Annexe I

- **Composition des milieux de culture** (Guiraud, 2003 ; Rodier *et al.*, 2005 ; Delarras, 2014).

### 1. Gélose Mac Conkey (g/ litre d'eau distillée)

Peptone pancréatique de gélatine	17.0
Tryptone	1.5
Peptone pepsique de viande	1.5
Lactose	10.0
Sels biliaires	1.5
Chlorure de sodium	5.0
Rouge neutre	30.0
Cristal violet	1.0
Agar agar	13.5
pH= 7.0	

### 2. Gélose SS, *Salmonella-Shigella* (g/ litre d'eau distillée)

Peptone	5
Extrait de viande	5
Lactose	10
Citrate de sodium	10
Citrate de fer (III)	1
Désoxycholate	8.5
Vert brillant	0.3
Rouge neutre	25
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	8.5
Agar-agar	15
pH = 7.2 / autoclavage à 120°C pendant 15 minutes.	

### 3. Gélose au cétrimide (g/ litre d'eau distillée)

Peptone	20
Chlorure de sodium	3
Sulfate de potassium	10
Monohydrogénophosphate de potassium	0.3
Cétrimide (bromure de tétradonium)	0.2
Acide nalidixique	0.015
Agar-agar	12
pH = 7.1 / autoclavage 20 min à 121°C.	

**4. Chapman (g/ litre d'eau distillée)**

Peptone trypsique de caséine	10
Extrait de viande	1
Chlorure de sodium	75
Mannitol	10
Rouge de phénol	0.025
Agar-agar	15
pH = 7.6 / autoclavage 20 min à 121°C.	

**5. Gélose Mueller-Hinton (g/ litre d'eau distillée)**

Infusion de viande de bœuf	3.0
Peptone de caséine	17.0
Amidon de maïs	1.5
Agar-agar	17.0
pH= 6.7/ autoclavage 15 min à 121°C.	

**6. Gélose nutritive (G.N) (g/ litre d'eau distillée)**

Peptone pepsique de viande	5
Extrait de viande	1
Extrait de levure	2
Chlorure de sodium	5
Agar-agar	15
pH: 7.4±0.2/ autoclavage 15 min à 121°C. Pour les vibrions ajuster le pH à 8.	

**7. Bouillon Mueller-Hinton (g/ litre d'eau distillée)**

Hydrolysât acide de caséine	17.5
Infusion de viande	2.0
Amidon soluble	1.5
Peptone	1.5
pH= 6.7/ autoclavage 15 min à 121°C.	

**8. Bouillon Nutritif (g/ litre d'eau distillée)**

Peptone	5.0
Extrait de viande	1.0
Extrait de levure	2.0
Chlorure de sodium	5.0
pH=7.4 ± 0.2 à 25 °C / autoclavage à 121° C pendant 15 min	

**9. Bouillon Nitrate (g/ litre d'eau distillée)**

Peptone	5.0
Extrait de viande	3.0
Nitrate de potassium	1.0
pH = 7.0 ±0.2 / stérilisation à l'autoclave 15 min à 121°C	

**10. Milieu TSI (g/ litre d'eau distillée)**

Extrait de l'œuf	3
Agar	12
Extrait de levure	3
Peptone	20
Lactose	10
Saccharose	10
NaCl	5
Glucose	1
Citrate ferrique	3
Thiosulfate de sodium	3
Rouge de phénol	0.025
pH = 7.4	

**11. Clark et Lubs (g/ litre d'eau distillée)**

Peptone tryptique de caséine	5
Phosphate bi potassique	5
Glucose	5
pH = 7.5 /autoclavage 15 min à 121°C	

**12. Citrate de Simmons (g/ litre d'eau distillée)**

Citrate de sodium	1.0
Bleu de bromothymol	0.08
Chlorure de sodium	5.0
Sulfate de magnésium	0.2
Hydrogénophosphate de potassium	1.0
Dihydrogénophosphate d'ammonium	1.0
Agar-agar	15.0
pH = 7 / autoclavage 15 min à 121°C	

**13. Urée-Idole (g/ litre d'eau distillée)**

L-tryptophane	3
Phosphate monopotassique	1
Phosphate di potassique	1
Chlorure de sodium	5
Urée	20
Solution rouge de phénol à 1%	2.5
Alcool à 95°	10
pH = 7 /autoclavage 15 min à 121°C	

**14. Mannitol-Mobilité (g/ litre d'eau distillée)**

Peptone pancréatique de viande	20.0
Mannitol	2.0
Nitrate de potassium	1.0
Rouge de phénol solution à 1%	4.0
Agar agar	4.0
pH=7.2 /autoclavage 15 min à 121°C	

**15. API Staph medium (g/ litre d'eau distillée)**

Extrait de levure	0.5
Bactopeptone (origine bovine/porcine)	10.0
NaCl	5.0
Oligo-éléments	10.0
pH de 7 à 7.4 (ce milieu est disponible en ampoules de 6 ml)	

- **Composition des réactifs et des colorants** (Guiraud, 2003 ; Rodier *et al.*, 2005).

**1. Violet de Gentiane**

Violet de gentiane	1g
Ethanol à 90%	1ml
Phénol	2g
Eau distillée	100ml

**2. Lugol**

Iode	1g
Iodure de potassium	2g
Eau distillée	100ml

**3. Fuchshine**

Fuchsine basique	1g
Alcool éthylique	100ml
Phéno	15g
Eau distillée	100ml

**4. Réactif du rouge de méthyle**

Rouge de méthyle	0.5 g
Alcool à 80°	100ml

**5. Réactif TDA (pour la recherche de tryptophane désaminase)**

Perchlorure de fer	3.4g
Eau distillée	100ml

**6. Réactif Kovacs (pour la recherche de l'indole)**

Paradiméthylaminobenzaldéhyde	5.0 g
Alcool isoamylique	75.0 ml
HCL 37%	25.0 ml

**7. Réactif VPI (pour la recherche de l'acétoïne)**

Hydroxyde de potassium	40g
Eau distillée	100ml

**8. Réactif VP II (pour la recherche de l'acétoïne)**

Alpha naphthol	6g
Ethanol	100ml

**9. Réactif NIT I (pour la recherche du nitrate réductase)**

Acide sulfamilique	0.8 g
Acide acétique 5N	100 ml

**10. Réactif NIT II (pour la recherche du nitrate réductase)**

Naphtylamine	0.5 g
Acide acétique 5N	100 ml



**11. Réactif ZYM A**

Tris-hydroxyméthyl-aminométhane	25 g
Acide chlorhydrique à 37 %	11 ml
Laurylsulfate Na	10 g
H <sub>2</sub> O	100 ml

**12. Réactif ZYM B**

Fast Blue BB	0.35 g
2-méthoxy éthanol	100 ml

## Annexe II

**Tableau 21:** Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 E  
(Source : <http://www.biomerieux.com>).

Test	Groupements active	Réactions / Enzymes	Résultats	
<b>ONPG</b>	Ortho-nitro-phényle-B-D-Galactopyranoside	Beta-galactosidase	Negative incolore	Positive jaune
			<b>ADH</b>	L-Arginine
<b>LDC</b>	L-Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Rouge-Orangé
<b>ODC</b>	L-Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge-Orangé
<b> CIT </b>	TriSodium citrate	Utilisation de citrate	Vert	Bleu-vert/orange
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Thiosulfate de sodium	Production de H <sub>2</sub> S	Incolore	Noir
<b>URE</b>	Urée	Uréase	Jaune	Rouge-Orangé
<b>TDA</b>	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Jaune	Marron
<b>IND</b>	Tryptophane	Production d'indole	Incolore	Rose
<b> VP </b>	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	<b>VP1+ VP2</b>	
			Incolore	Rose/rouge
<b> GEL </b>	Gélatine (origine bovine)	Gélatinase	Pas de diffusion de pigment noir	Diffusion de pigment noir
<b>GLU</b>	Glucose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune/jaune-gris
<b>MAN</b>	D-Mannitol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>INO</b>	Inositol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>SOR</b>	D-Sorbitol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>RHA</b>	L-Rhamnose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>SAC</b>	D-Saccharose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>MEL</b>	D- Melibiose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>AMY</b>	Amygdaline	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>ARA</b>	L-arabinose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>Réduction des nitrates (GLU tube)</b>	Potassium nitrate	Production de NO <sub>2</sub>	<b>NIT 1+NIT 2, 2-3 min</b>	
			Jaune	Rouge
		Réduction au N <sub>2</sub>	<b>Zn / 5 min</b>	
			Orange-rouge	jaune
<b>OF-O</b>	glucose	Oxydation du glucose	vert	jaune
<b>OF-F</b>	glucose	Fermentation du glucose sous l'huile	vert	jaune

**Tableau 22:** Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 NE  
(Source : <http://www.biomerieux.com>).

Tests	Substrat	Enzymes/Réactions	Résultats				
			Négatif	Positif			
<b>NO3</b>	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrites	<b>NIT 1 + NIT 2 / 5 mn</b>				
			Incolore	Rose/rouge			
		Réduction des nitrates en azote	<b>ZN / 5 mn</b>				
			Incolore	Rose			
<b>TRP</b>	Tryptophane	Formation d'indole	<b>TRP / 3-5 mn</b>				
			Incolore	Rose / rouge			
<b>GLU</b>	Glucose	Fermentation	Bleu à vert	Jaune			
<b>ADH</b>	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange/rose/rouge			
<b>URE</b>	Urée	Uréase	Jaune	Orange/rose/rouge			
<b>ESC</b>	Esculine	Hydrolyse ( $\beta$ -glucosidase)	Jaune	Gris/marron/noir			
<b>GEL</b>	Gélatine	Hydrolyse (protéase)	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment noir			
<b>PNPG</b>	p-Nitro-phényle- $\beta$ D-Galactopyranoside	B-galactosidase	Incolore	Jaune			
<b>GLU</b>	Glucose	Assimilation	Transparence	Trouble			
<b>ARA</b>	Arabinose						
<b>MNE</b>	Mannose						
<b>MAN</b>	Mannitol						
<b>NAG</b>	N-acétyl-glucosamine						
<b>MAL</b>	Maltose						
<b>GNT</b>	Potassium Gluconate						
<b>CAP</b>	Acide Caprique						
<b>ADI</b>	Acide Adipique						
<b>MLT</b>	Acide Malique						
<b>CIT</b>	Trisodium Citrate						
<b>PAC</b>	Phényl-acétate						
<b>OX</b>	Tetraméthyl-p-phenylène diamine				Cytochrome oxydase	Incolore	Violet

**Tableau 23:** Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api Staph  
(Source : <http://www.biomerieux.com>).

Tests	Substrats	Caractère recherché	Résultats	
			Négative	Positive
<b>0</b>	Aucun	Témoin négatif	Rouge	-
<b>GLU</b>	D-glucose	Témoin négatif	Rouge	Jaune
<b>FRU</b>	D-fructose	Acidification à partir du carbohydate		
<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 des nitrates en nitrites	<b>NIT 1 + NIT 2 / 10 mn</b>
		Incolore/Rose		Rouge
<b>PAL</b>	$\beta$ -naphtyl. Phosphate	Phosphatase alcaline	<b>ZYM A + ZYM B / 10 mn</b>	
			Jaune	Violet
<b>VP</b>	Pyruvate de sodium	Production d'acétyl méthyl-carbonyl	<b>VP 1 + VP 2 / 10 mn</b>	
			Incolore/rose	Violet/rose
<b>RAF</b>	Raffinose	Acidification à partir du carbohydate	Rouge	Jaune
<b>XYL</b>	Xylose			
<b>SAC</b>	Saccharose			
<b>MDG</b>	$\alpha$ -méthyle-D-glucopyranoside			
<b>NAG</b>	N-acétyl-glucosamine			
<b>ADH</b>	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange/rouge
<b>URE</b>	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/violet

**Tableau 24:** Limites acceptables des diamètres d'inhibition (mm) obtenus par diffusion en gélose pour les souches de référence utilisées pour le contrôle de qualité (CA-SFM, 2016).

Antibiotiques	Charge du disque	<i>Escherichia coli</i> CIP 7624	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP 76110	<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 7625
<b>Pénicilline G</b>	1 unité	-	-	0.25-2
<b>Amoxicilline</b>	20	2-8	4-32	-
<b>Céfotaxime</b>	5	0.03-0.12	0.03-0.12	-
<b>Imipénème</b>	10	0.06-0.25	1-4	-
<b>Gentamicine</b>	10	0.25-1	0.5-2	0.12-1
<b>Vancomycine</b>	30	-	-	0.5-2
<b>Erythromycine</b>	15	-	-	0.25-1
<b>Chloramphénicol</b>	30	2-8	2-8	2-16
<b>Triméthoprime</b>	5	0.5-2	0.5-2	1-4

