

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid
Ibn Badis Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس مستغانم
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT D'AGRONOMIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par :

BENHIBA Abdelillah

Pour l'obtention du diplôme de :

MASTER EN AGRONOMIE

Spécialité :

Génétique et reproduction animal

THEME

L'impact génétique sur L'antibiogramme

Devant le jury

Président	Mc	YAHIAOUI Hassiba	Université de Mostaganem
Encadreur	Pr	FASSIH Aicha	Université de Mostaganem
Examineur	Mc	BENMEHDI Faiza	Université de Mostaganem

Année universitaire : 2020-2021

Dédicace

Je dédie ce mémoire

Puisse Dieu vous donne santé, bonheur, courage et surtout réussite.

A mes chers parents ma mère et mon père pour leur patience, leur amour, leur soutien et leur encouragements.

A mes frères..

A ma chère sœur

A mes amies et mes camarades

Sans oublier tous les professeurs que ce soit du primaire, moyen, du secondaire ou de l'enseignement supérieur.

Remerciement :

A madame FASSIH

Merci Pour avoir accepté d'encadrer ma thèse et m'avoir guidé tout au long de sa rédaction,

Pour votre disponibilité et votre patience, que vos conseils précis et avisés soient récompensés dans l'aboutissement de ce travail,

Sincères remerciement.

A ma famille :Ceux qui sont à mes côtés toujours, et ceux qui le seront toujours dans mon cœur, merci Pour le soutien inconditionnel et l'amour qu'ils m'ont apportés.

A tous ceux qui ont traversé ma vie pour plus ou moins longtemps mais qui ont contribué à faire de moi ce que je suis et qui continueront à me faire avancer

Table des matières

Introduction :	8
Chapitre 1 : Partie bibliographique.....	9
I– Structure et organisation du matériel génétique :	10
1-1-2-Hybridation des nucléotides	11
1-2-Acides nucléiques :	11
1-3- Organisation du Matériel génétique bactérien :	12
1-3-1- Le chromosome bactérien.....	12
1-3-2- Les plasmides	16
II-Structure et physiologie de la bactérie : Anatomie – Structure :	17
2. Caractéristiques des procaryotes :	17
3. Méthode d'étude :	17
4. Les enveloppes :	18
4.2. La membrane cytoplasmique.....	21
5. Contenu bactérien :	22
5.2. Nucléotide ou appareil nucléaire :	22
5.3. ADN extra-chromosomique :	22
5.4. Ribosomes :	22
6. Structures inconstantes :	23
6.2. Glycocalyx :	23
6.3. Flagelles :	24
6.4. Pili ou fimbriae :	24
6.5. Spore bactérienne :	25
III-Les antibiotiques :	25
1-Un antibiotique.....	25
2-Spectre d'activité :	26
2-1 Mode d'action des ATB	26
3- Naturelle ou constitutionnelle – Acquis Règles classiques de l'antibiothérapie :	26
3-3. Associations thérapeutiques :	27
4-Classification des ATB :	27
IV-L 'antibiogramme :	28
1-Le but de l'antibiogramme	28
Quelques définitions :	28
-La CMI ou Concentration Minimale Inhibitrice :	28
-La CMB ou Concentration Minimale Bactéricide :	28

-la souche est dite SENSIBLE :.....	28
-La souche est dite INTERMEDIARE :	28
2-Interaction entre antibiotiques :.....	29
3-Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) :	29
3-1- les méthodes en milieu liquide :	29
3-2 La méthode en milieu gélosé :.....	31
4-L'antibiogramme.....	32
4-1- <i>L'antibiogramme standard en milieu gélosé</i>	32
4.2 Antibiogramme en milieu liquide :	33
4.3 Transposition pour le praticien :.....	33
Chapitre2 : Partie expérimental	34
Matériel et méthode :.....	35
I-Cadre et objectifs :	35
II-prélèvement d'échantillons dans l'd'élevage avicole atteint de la maladie :.....	35
III- travaux d'autopsie sur les échantillons prélevés :	36
1-L'Antibiogramme par diffusion des disques :.....	38
Principe :.....	38
Milieux pour Antibiogramme :.....	38
Les disques d'antibiotiques :	38
La technique d'ensemencement de l'antibiogramme:.....	39
Application des disques:.....	39
Incubation de l'antibiogramme:	40
Lecture de l'antibiogramme:	40
L'interprétation et choisir l'antibiotique de choix :	41
Conclusion:.....	42
Bibliographie :	45
Resumé :	45
ANNEXES.....	47

Liste Figures

Figure 1 : composants des acides nucleique	10
Figure2 : Hybridation des nucleotides	11
Figure 3 : association des nucleotides formant un brin d'ADN .	12
Figure 4 : anroulement des brins d'ADN	13
figure 5a : electrophorese d'ADN bacterien sur gel d'Agrose	13
Figure 5b : profils plasmidiques de cellules traitées et de type sauvage	14
Figure 6 : ADN bacterien : GC%	15
Figure 7 : representation shematique d'un chromosome super-enroulé avec les protéines associés au nucléoide (NAP)	18
Figure 8 : la paroi bacterienne	19
Figure 9 : Peptidoglycane	22
Figure 10 : Cytoplasme	23
Figure11 : capsule	24
Figure 12 : glycocalyx.	24
Figure12 : croissance des filaments flagellaires	24
Figure 13 : spore bacterienne	25
Figure 14 : interaction entre ATB	29
Figure 14 :macromethode	30
Figure 15 : micromethode	31
Figure16 : Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice en milieu gélosé	32
Figure 17 : methode en disque	33
Figure 18 : les plaques de lecture	35
Figure19 : echantillonage pour faire l'autopsie	36
Figure 20 : ouvrir le cadavre et l'autopsie e système digestif	36
Figure 21 : dépôt jaunâtre sur les fibres	37
Figure 22 : ouvrir le cadavre	37
Figure 23 : trachée ouverte	37
Figure24 : rougeur des tissus	37
Figure25 : préparation de gélose nutritif et l'ensemencement des colonies bactériennes	38
Figure 26 : Application des disques d'antibiogramme	39
Figure27 : L'incubation de l'antibiogramme	40
Figure28 : Lecture de diamètre de chaque réaction	41

Introduction

Introduction :

L'antibiothérapie a pour but de soigner ou, dans une moindre mesure, de prévenir les infections bactériennes. Elle occupe une place majeure en médecine vétérinaire et constitue aujourd'hui un enjeu de première importance en matière de santé publique, tant par rapport à la sécurité du consommateur que par rapport au développement des résistances bactériennes. La résistance aux antibiotiques est une préoccupation majeure en termes de santé humaine et animale.

La résistance aux antibiotiques a désormais obtenu le statut de zoonose. Homme et Animal échangent non seulement des bactéries avec, lorsque ces bactéries sont pathogènes, un risque infectieux, mais aussi des facteurs de résistance qui sont susceptibles de compromettre l'efficacité d'un traitement antibiotique. Praticiens vétérinaires, spécialistes de l'infectiologie bactérienne, et autorités sanitaires se sont associés pour lutter contre ce fléau redoutable qu'est l'antibiorésistance.

Dans cette optique, nous nous sommes orientés vers l'étude génétique des bactéries et de l'effet des antibiotiques sur elles, puis nous nous sommes tournés vers l'antibiogramme pour connaître précisément la sensibilité de chaque bactérie à l'antibiotique, pour ce la nous avons réparti notre travail en deux parties :

*la première partie est une étude bibliographique qui comprend :

- structure et organisation du matériel génétique
- structure et physiologie de la bactérie : anatomie - structure
- les antibiotiques
- l'antibiogramme

*et la deuxième partie, ou partie expérimentale appréhende :

Un chapitre explicatif du matériel et méthodes ; les résultats et leur interprétation

CHAPITRE I

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I– Structure et organisation du matériel génétique :

1-1-Structure des acides nucléiques :

1-1-1-Composants des acides nucléiques :

Les molécules biologiques qui contiennent l'information génétique sont les acides nucléiques. Qui sont composés de molécules simples comme l'acide phosphorique (PO_4H_3 , fig.1a), des oses à 5 carbones (pentoses, fig.1b) et des bases azotées (purines ou pyrimidines, fig.1c).

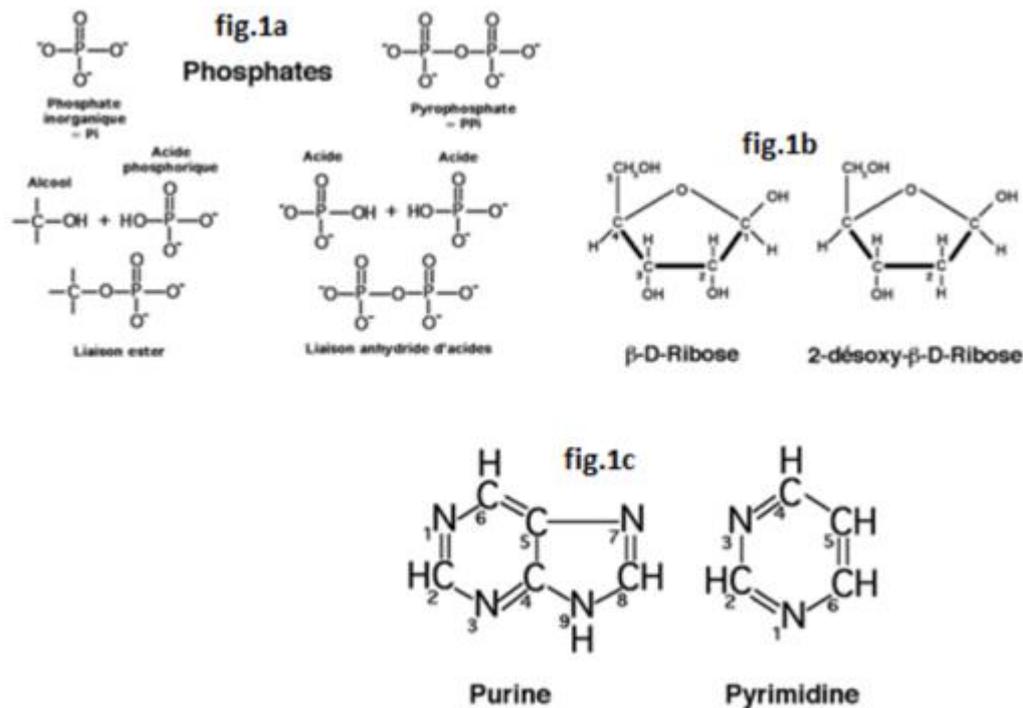


Figure 1 : composants des acides nucléiques

La liaison d'une base azotée avec un des sucres donne un nucléoside. Un nucléoside est donc formé d'une base et d'un sucre liés par une liaison N-osidique. La liaison d'un nucléoside avec un phosphate se fait par une estérification de la fonction alcool primaire (carbone n°5') du sucre et une des trois fonctions acides du phosphate. L'ester obtenu est un nucléotide. **Un nucléotide est donc formé d'une base azotée, liée par une liaison osidique avec un sucre, lui-même lié par une liaison ester avec un phosphate.**

Les acides nucléiques sont formés par une polycondensation de nucléotides AMP, CMP, GMP et UMP pour les acides ribonucléiques, dAMP, dCMP, dGMP et dTMP pour les acides désoxyribonucléiques.

1-1-2-Hybridation des nucléotides :

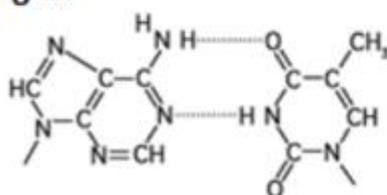
Lorsqu'un acide nucléique est en solution les molécules forment des liaisons hydrogènes associant les nucléotides deux par deux, de sorte qu'un nucléotide à adénine se lie avec un nucléotide à thymine (ou à uracile dans un RNA, fig.2a) et un nucléotide à guanine avec un nucléotide à cytosine .

Tableau 1 : Nucléotides et nucléosides

Bases	Nucléosides	Nucléosides 5'-mono, di, triphosphates	Unités nucléotidiques des acides nucléiques
A = Adénine	(désoxy-) adénosine	AMP, ADP, ATP dAMP, dADP, dATP	(d-) adénylate
G = Guanine	(désoxy-) guanosine	GMP, GDP, GTP dGMP, dGDP, dGTP	(d-) guanylate
C = Cytosine	(désoxy-) cytidine	CMP, CDP, CTP dCMP, dCDP, dCTP	(d-) cytidylate
U = Uracile	uridine	UMP, UDP, UTP	uridylate
T = Thymine	désoxy-thymidine	dTMP, dTDP, dTTP	d-thymidylate

fig.2a

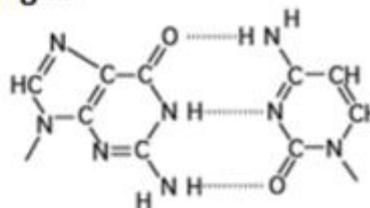
- 21 kJ



Hybridation A - T

fig.2b

- 63 kJ



Hybridation G - C

Figure2 : Hybridation des nucleotides

1-2-Acides nucléiques :

Pour former un acide désoxyribonucléique les nucléotides (GMP, AMP, TMP, CMP), sont condensés les uns sur les autres avec des liaisons phospho-diester entre le carbone 3' d'un premier nucléotide et le carbone 5' du nucléotide suivant. De sorte que ces liaisons définissent un sens à la molécule : le début étant le nucléotide dont le phosphate en 5' ne serait lié à aucun autre nucléotide et la fin correspond au nucléotide dont la fonction alcool en 3' n'est pas estérifiée (fig.3). La structure secondaire du DNA est telle que les deux brins sont enroulés l'un autour de l'autre (fig.4). Chacun des deux brins est orienté (5'→3') dans le sens opposé à celui de l'autre brin (3'→5'). On dit qu'ils sont antiparallèles. Les bases azotées sont tournées vers l'intérieur de la double hélice de façon à ce que chacune s'hybride avec une base de l'autre brin (A avec T, C avec G, etc..). On dit que les bases successives de chacun des brins sont complémentaires. La double hélice a un « pas » de 3,4 nm c'est à dire qu'il y a environ 10 paires de nucléotides pour chaque tour d'hélice.

1-3- Organisation du Matériel génétique bactérien :

La composition génomique de nombreuses bactéries peut consister en deux composantes, à savoir un chromosome qui porte des gènes pour toutes les fonctions essentielles et leur régulation, et une composante extra- chromosomique mais « autonome » : plasmide initialement identifié pour réaliser les fonctions requises pour sa propre réplication, son maintien et sa distribution.

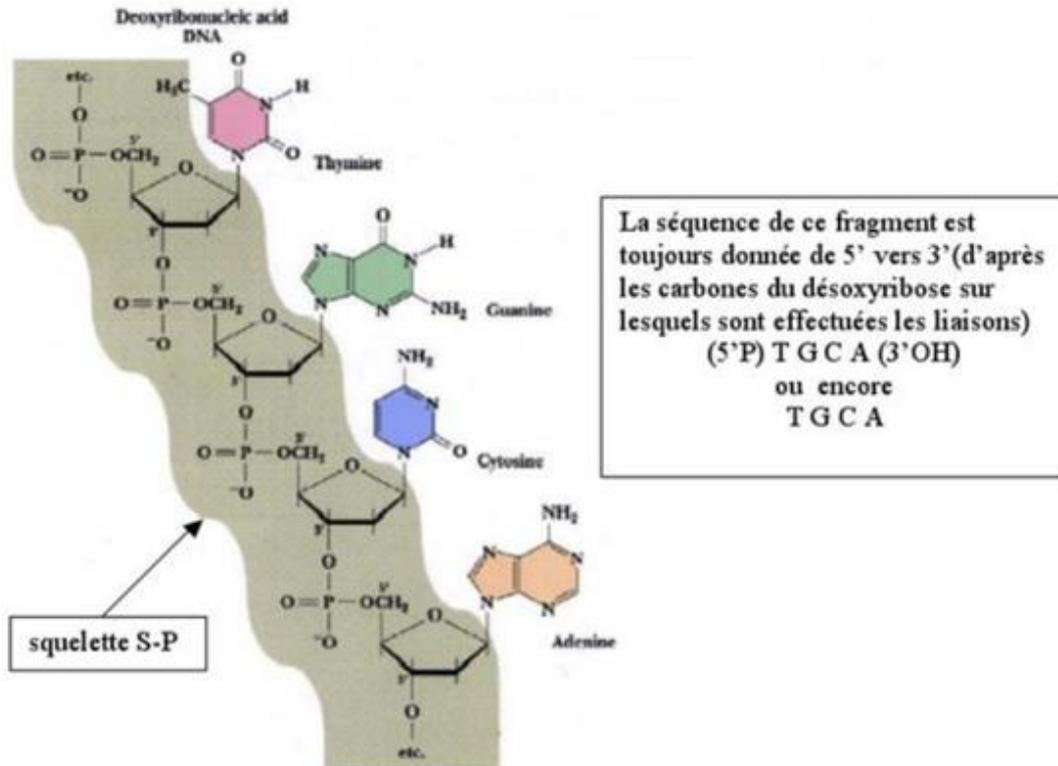


Figure 3 : association des nucleotides formant un brin d'ADN .

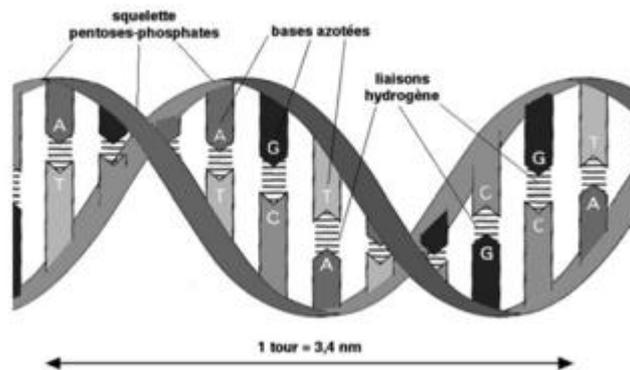
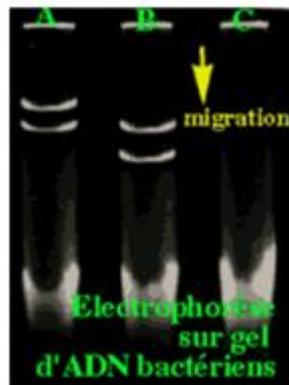


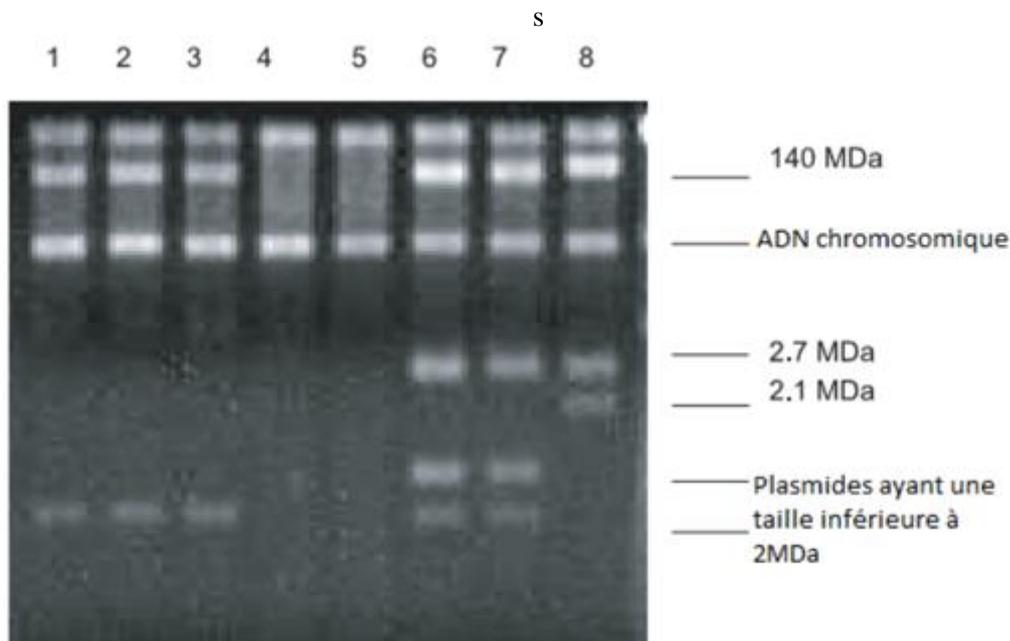
Figure 4 : anroulement des brins d'ADN

1-3-1- Le chromosome bactérien : est constitué d'acide désoxyribonucléique (ADN) dont les caractéristiques structurales sont bien connues. L'ADN bactérien est circulaire (nucléotide) Contient entre 1 000 000 et 4 500 000 paires de bases, 800 et 4300 gènes 0.1% du génome humain ; il peut

exister sous trois formes (super-enroulée, relâchée, linéaire) objectivées par plusieurs techniques telle l'ultracentrifugation, la microscopie électronique ou tout simplement l'électrophorèse en gel d'agarose (fig.5). Les deux chaînes ou alpha hélices sont maintenues entre elles (A-T, C-G) par les deux ou trois liaisons "hydrogène". Le chauffage permet leur séparation en brins monocaténaire = fusion ou dénaturation. Cette séparation est réversible (renaturation ou hybridation) selon le principe de la complémentarité des bases (A-T, C-G). Lors de la séparation, il y a augmentation de la DO à 260 nm (effet hyper-chromique), et celle-ci est fonction du nombre de paires GC. Il est possible de calculer un paramètre quantitatif (T_m). Ainsi la détermination du GC% est un critère taxonomique ou de classification des bactéries qui peut être calculé selon l'espèce bactérienne (fig.6). Il peut varier largement selon les groupes bactériens.



[figure 5a](#) : électrophorèse d'ADN bactérien sur gel d'Agrose



Piste 1, 2, 3 - E. coli 212587 traitée par l'acridine orange (75µg / ml), **piste 4, 5** - E. Coli 208366 traitée par le bromure d'éthidium (125 pg / ml), **Piste 6** - E. coli 212587, **piste 7** E. coli 208366 et **piste 8** E. coli PDK-9 marqueur de taille.

[Figure 5b](#) : profils plasmidiques de cellules traitées et de type sauvage

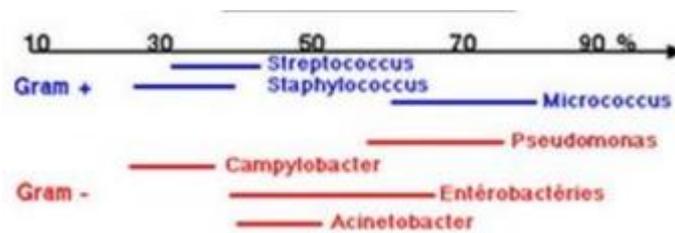


Figure 6 : ADN bactérien : GC%

Le nucléoïde très condensé se trouve dans un pseudo compartiment qui se caractérise par l'absence de ribosomes. Certains brins d'ADN s'étendent vers l'extérieur dans le cytoplasme comme une «boule de fils serrés». Ces extensions contiennent la majeure partie de l'ADN transcriptionnellement actif. Le chromosome est apparu comme une structure fortement repliée contenant presque tout l'ADN cellulaire, certaines protéines et ARN naissant.

Les images de microscopie Electronique du chromosome d'*E. coli* a révélé un noyau central à partir duquel 12400 boucles indépendantes (domaines de surenroulement, fig.7) ont été observées. La structure entière est apparue comme une rosette ininterrompue. Cette organisation est sensible à la RNase, suggérant que l'ARN est impliqué dans le maintien de l'intégrité de la structure de base (Tous les domaines possèdent le même niveau de surenroulement).

Toutefois l'entaille de l'un des brins abolit le surenroulement dans ce domaine particulier uniquement, en laissant le reste du chromosome non affecté. Le chromosome est logé dans un petit espace à l'intérieur de la cellule ce qui nécessite son repliement. Un nuage d'ADN enroulé est généré au hasard avec un diamètre de 10 μm * dans une bactérie, tel qu'*E. coli*. Sa subdivision en plusieurs boucles indépendantes de * 10 kb donne un autre niveau de compactage. C'est le surenroulement négatif des boucles par l'ADN topoisomérase qui réduit encore le diamètre du chromosome replié. Celle-ci empêche les brins de s'entremêler.

Le DNA a besoin d'être protégé par des protéines lorsqu'il n'est pas utilisé comme modèle pour l'expression des gènes ou la réplication. Cette protection se fait chez **les eucaryotes** par enroulement autour de protéines basiques (cationiques) capables de se lier avec le DNA qui est un polyanion. Des octamères d'histones sont au centre de particules qu'on trouve tous les 200 nucléotides et autour desquels le DNA s'enroule. La structure évoque un « collier de perles ». Des études récentes ont montré que les différentes régions de l'ADN bactérien ne sont pas seulement interconnectés mais aussi organisés dans l'espace par un complexe de maintenance de la structure (SMC). Ce SMC serre et maintient le chromosome dans un état compatible avec la réplication et la ségrégation de l'ADN.

Cependant, un des plus importants composants pour la condensation de l'ADN bactérien est un groupe de protéines, qui peuvent modifier sa forme (compactage) et influencent ainsi sa transcription.

1-3-1-1- Les NAP " protéines associées au nucléoïde " :

sont nombreuses et possèdent une activité de liaison à l'ADN et une capacité à modifier la trajectoire de la molécule d'ADN dans la cellule par pliage, emballage, ou pontage; mais aussi influent positivement ou négativement sur la transcription.

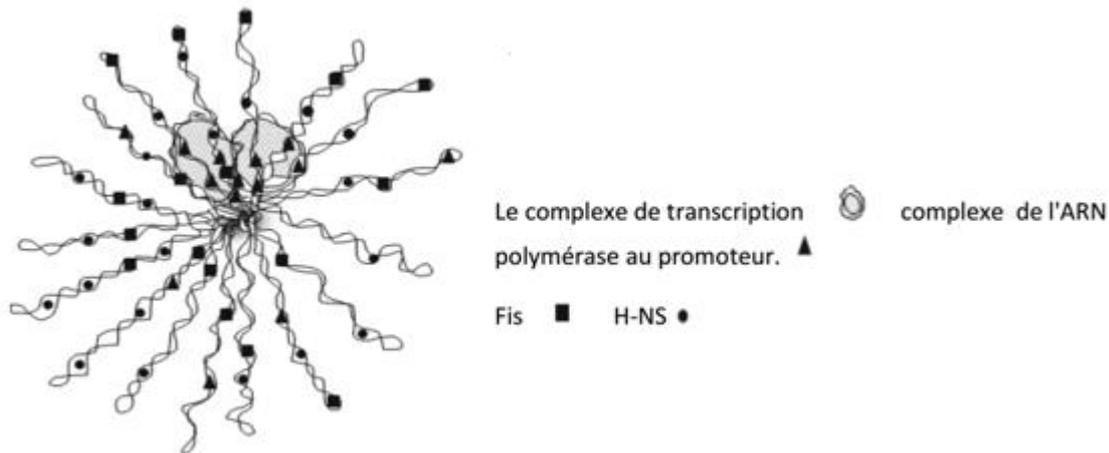


Figure 7 : représentation schématique d'un chromosome super-enroulé avec les protéines associées au nucléoïde (NAP)

-Certaines ont une propriété de marquage du début et de la fin d'un domaine chromosomique. Les protéines dotées d'activité de pontage d'ADN sont les plus aptes à la réalisation d'une telle fonction. C'est le cas de la **H-NS** (histone-like-nucleoid) protéine qui se lie à des régions riches en A-T dans le génome de *E. coli* et *Salmonella enterica*, sur des sites coïncidant avec les extrémités d'un domaine donné.

-Fis: " facteur de stimulation de l'inversion, est une protéine abondante au début de la phase exponentielle de croissance, pour former des ponts ADN-protéine-ADN. Les sites de liaison potentiels pour Fis, sont constitués d'une séquence consensus, de 17 pb riches en AT.

Fis se lie à ces sites en tant qu'homodimère et (introduit) des coudes dans l'ADN. Ces protéines contribuent à de nombreuses activités cellulaires, tels que la transcription, la réplication et la recombinaison.

-HU, une autre classe de NAP, constituée de deux sous-unités HU α et HU β . Les interactions HU-DNA ne sont pas spécifiques, mais la protéine a une préférence pour les régions déformées de l'ADN, tels: les repliements ou les jonctions à quatre voies. HU joue un rôle important dans la recombinaison, la topologie de l'ADN et la gestion de l'expression génique.

Cette protéine interagit avec la topoisomérase I qui peut conduire à une altération dans de superhelicité de l'ADN, et peut être impliqué à la fois dans la structure du nucléoïde et l'expression des gènes. Elle forme des multimères octamérique ayant le potentiel de former des filaments en spirale autour desquels L'ADN est surenroulé négativement. Enfin, HU contribue aussi à la flexibilité de l'ADN en courbant le duplex, pour faciliter la formation de la boucle d'ADN.

(iv) Le facteur d'intégration de l'hôte (IHF), initialement identifié comme cofacteur dans la

recombinaison à site spécifique du phage λ . Cette protéine est étroitement liée à HU du point de vue séquence d'acides aminés, mais se lie à une séquence nucléotidique bien conservée. Sa liaison au site introduit un demi-tour dans l'ADN, et aide dans le remodelage de l'ADN à un niveau local. IHF influence la transcription globale, la réplication du chromosome, et sert en tant qu'élément du site- spécifique du système de recombinaison, affectant ainsi la transposition. Le nucléoïde compact occupe le centre de la cellule procaryote, avec les ARN polymérase (RNAPs) sur sa périphérie, et les ribosomes refoulés vers les bords où ils interagissent avec la membrane plasmique intérieure. Le degré de condensation dépend également de la phase de croissance, avec le plus haut niveau de compactage pendant une croissance rapide, par rapport à une croissance sous des conditions limitantes. A l'état primaire, RNAP sont concentrés dans les foyers de la transcription, alors que sous croissance réduite elles sont réparties dans le chromosome. Ceci suggère qu'une corrélation étroite existe entre la structure du nucléoïde et l'organisation du génome. Cela se produit par l'intermédiaire de la distribution de gènes hautement exprimés et dont la transcription affecterait le surenroulement.

1-3-2- Les plasmides :

Les bactéries contiennent souvent un ou plusieurs plasmides, qui sont des molécules d'ADN extrachromosomique. Ces plasmides peuvent conférer certains avantages aux bactéries, comme la résistance à des antibiotiques ou des métaux, ou pour la production d'antibiotiques, de pigments, ou peut fournir des capacités cataboliques inhabituelles comme des facteurs de virulence (toxines), fertilité, etc. Ils peuvent également induire des tumeurs végétales, et d'autres réponses symbiotiques pathogènes chez les plantes et les animaux.

Parfois, les bactéries peuvent partager les plasmides avec différentes espèces bactériennes (transfert horizontal de gènes). Ces plasmides sont dits conjugatifs (permettent la conjugaison), sont généralement grands et ont en plus des gènes nécessaires pour la réplication autonome des gènes de transfert d'ADN au receveur (ex : gènes du pilus sexuel : F). Mais peuvent être non-conjugatifs (ne peuvent pas médier la conjugaison), sont généralement plus petits et il leur manque un ou plusieurs gènes nécessaires au transfert d'ADN.

Les Plasmides ont souvent été assimilés avec des organismes. Ainsi, un organisme " est l'élément unitaire d'une lignée continue avec histoire de l'évolution individuelle ". Cette définition s'applique aussi pour les virus, et certains transposons, qui appartiennent tous à une famille d'organismes primitifs. La caractéristique commune entre ces unités est leur réplication, leur maintenance et leur diffusion. Les plasmides se répliquent indépendamment du chromosome.

Les Plasmides ont ainsi joué un rôle significatif dans l'évolution bactérienne ; en effet une cellule contenant le plasmide peut avoir un avantage adaptatif sur celles sans plasmide. Au cours des dernières années, leur signification a considérablement augmenté en raison de leur application dans la recherche en génie- génétique en tant que porteur de la molécule étrangère (recombinant ADN). Une cellule bactérienne peut ou non comporter un ou plusieurs copies d'un même type de plasmide ou des plasmides différents.

La plupart des plasmides sont des fragments d'ADN fermés de manière covalente circulaire (ccc), dont la taille varie de quelques milliers à des centaines de milliers de paires de bases. Ceux-ci se trouvent dans une cellule surenroulé négativement. Sont appelés épisomes. Le caractère distinctif, la nature de réplication autonome suggère qu'un plasmide peut être essentiellement assimilé à un réplicon et doit coder pour une partie ou plusieurs fonctions requises pour sa réplication. Pour être autonome, ils doivent avoir au moins une origine de réplication (Ori), un site en *cis*, et code également pour des protéines spécifiques nécessaires à la reconnaissance du site *ori* et l'initiation de la

réplication. Le gène *rep* porté par le plasmide, code une protéine (Rep) spécifique de l'initiation de la réplication agissant en *trans*. Dans certains plasmides linéaires, comme chez *Borrelia burgdorferi*, les extrémités peuvent porter des séquences de télomères-like, ces extrémités de l'ADN peuvent être répétées et peut même être jointe de manière covalente les unes aux autres. De même, chez *Streptomyces*, les extrémités plasmidiques peuvent être liées à une protéine.

II-Structure et physiologie de la bactérie : Anatomie – Structure :

1. Définition d'une bactérie :

Une bactérie est un être unicellulaire (procaryote) de petite taille, de morphologie variable qui présente des caractéristiques propres.

La taille d'une bactérie varie entre 1 à 10 μm . Le poids d'une bactérie est d'environ 10-12 g. Elle contient 70% d'eau. Rapporté au poids sec, une bactérie est constituée de protéines (55%), de lipides (10%), de lipopolysaccharides (3%), de peptidoglycane (3%), de ribosomes (40%), d'ARN (20%) et d'ADN (3%).

2. Caractéristiques des procaryotes :

caractéristiques	procaryotes	eucaryotes
Taille habituelle	0,3 – 2,5 μm	2 – 20 μm
Noyau avec membrane	non	oui
Nombre de chromosome	1	> 1
Réplication par mitose	non	oui
Position de l'ADN	nucléoïde ou plasmide	noyau et organites IC
Organites intra-cellulaires	non	mitochondries, Golgi
Membranes avec stérols	non	souvent
Enveloppes cellulaires	hétéropolymère glucido-peptidique	cellulose et polysaccharides chez les plantes
Flagelles, cils	pas de cils	agencement typique

Tableau : principaux caractères distinctifs des procaryotes et eucaryotes

3. Méthode d'étude :

Compte tenu de leur taille (de l'ordre du micron), les bactéries sont visualisées au microscope optique sans coloration (état frais) ou après coloration.

Diverses techniques de coloration existent, mettant en évidence des affinités tinctoriales différentes telle la coloration de Gram, très utilisée en pratique courante, l'imprégnation argentique pour révéler les spirochètes ou celle révélant le caractère acido-alcool-résistant de certains bacilles (BAAR ou mycobactéries).

Coloration de Gram :

Elle est fondée sur l'action successive d'un colorant, le cristal violet, d'iode puis d'un mélange d'alcool et d'acétone. Christian Gram (1853-1938) a été l'inventeur de la coloration en 1884. Son intérêt est de donner une information rapide et médicalement importante, car le pouvoir pathogène et la sensibilité aux antibiotiques sont radicalement différents.

Elle permet de distinguer la paroi des bactéries ayant + du peptidoglycane. Coloration en 4 étapes :

1. coloration par le violet de gentiane ;
2. mordantage avec du lugol (solution d'iode iodo-iodurée) ;
3. décoloration par l'alcool
4. coloration par la safranine

Etapes 1 et 2 = coloration en violet du contenu de la bactérie et fixation par le lugol des structures internes.

Etape 3 = décoloration du cytoplasme des bactéries ayant une paroi pauvre en peptidoglycane qui laisse passer l'alcool pour éliminer le violet de gentiane = bactérie à Gram négatif

Etape 4 = contre-coloration par la safranine teintant en rose les bactéries précédemment décolorées.

Les bactéries à Gram positif restent colorées en violet (pas de passage à travers la couche de peptidoglycane. Le nucléoïde ou chromosome est visible grâce à la coloration de Feulgen.

4. Les enveloppes :

4.1. La paroi :

C'est une **enveloppe rigide** assurant l'intégrité de la bactérie, donc responsable de la forme des cellules. Elle protège des variations de pression osmotique (5-20 atmosphères). Elle est absente chez les Mollicutes (*Mycoplasma*). En dehors des bactéries halophiles et thermophiles, la partie commune à toutes les parois bactériennes est le **peptidoglycane** (ou **muréine**), enveloppe la plus interne.

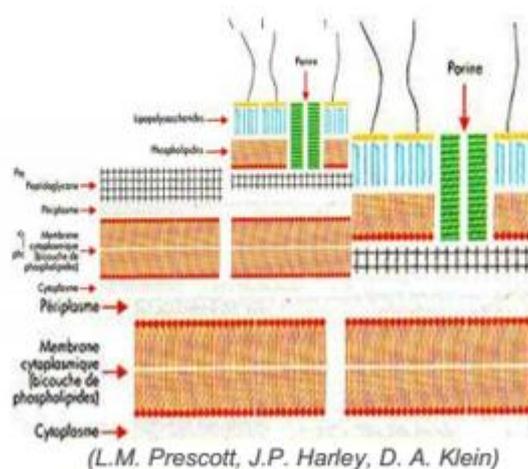


Figure 8 : la paroi bactérienne

4.1.1. Peptidoglycane :

C'est un hétéropolymère formé de 3 éléments :

- une épine dorsale alternant des chaînons N-Acétyl Glucosamine - Acide N-Acétyl Muramique.
- des chaînes latérales peptidiques formées au minimum de quatre aminoacides (par exemple LA-

lanine - D-Glycine - L-Lysine - D-Alanine) toujours fixées sur l'acide muramique. L'enchaînement des aminoacides des séries D et L est une constante.

- des ponts inter-peptidiques.

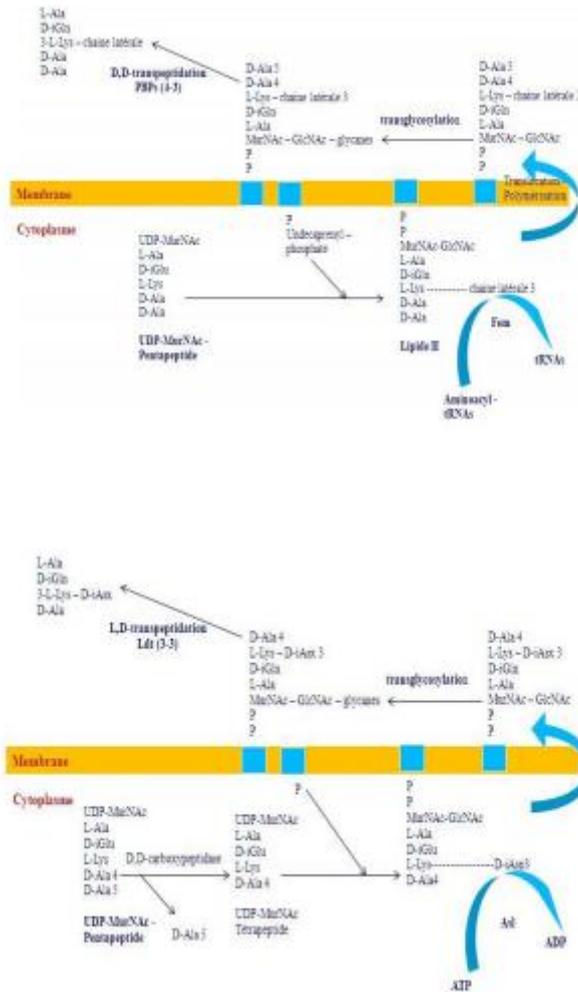


Figure 9 : Peptidoglycane

Le peptidoglycane est un hétéropolymère composé de chaînes glucidiques reliées les unes aux autres par des chaînons pentapeptidique. La macromolécule réticulée tridimensionnelle est ainsi constituée et sa solidité dépend de l'importance des interconnexions. La paroi de la bactérie est ainsi une unique macromolécule.

La biosynthèse du peptidoglycane s'effectue par sous-unités dans le cytoplasme jusqu'à l'assemblage du disaccharide-pentapeptide (N-Acétyle Glucosamine-Acide N-Acétyle Muramique- L-Alanine-D-Glycine-LLysine-D-Alanine-D-Alanine) qui traverse la membrane cytoplasmique fixé sur un transporteur phospholipidique puis est attaché à la chaîne glucidique de la paroi pré-existante (réaction de transglycosylation). Les chaînes peuvent être reliées pour former la molécule réticulée finale par liaison covalente entre les peptides (réaction de transpeptidation). D'autres enzymes sont nécessaires comme l' hydrolases permettant de couper les chaînes glucidiques du peptidoglycane (rôle essentiel lors de la division), D-carboxypeptidases coupant le dipeptide D-Alanine-D-Alanine et réduisant le nombre des interconnexions.

Certaines étapes peuvent être entravées par certains antibiotiques: β -lactamines, glycopeptides ou encore enzyme (lysozyme).

La composition variant selon l'espèce ou le groupe bactérien, il a été possible de distinguer des affinités tinctoriales différentes par la coloration: Gram + et Gram -.

4.1.2. Paroi des bactéries à Gram positif :

Le peptidoglycane est le constituant majeur (90% des constituants de la paroi). Le peptidoglycane est très solide, les liaisons croisées entre chaînes glucidiques sont nombreuses.

Présence d'acides teichoïques (A.T.) sont des polymères de glycérol et de ribitol reliés à des groupes PO 4 et dépassent la paroi ; les acides lipoteichoïques s'enchâssent dans la membrane cytoplasmique.

Les A.T. sont connectés au peptidoglycane ou aux lipides de la membrane plasmique (lipoteichoïques). Ils sont chargés négativement. Leur fonction est inconnue mais maintiennent la structure de la paroi.

Les acides LT retiennent le violet lors de la coloration de Gram.

Peu ou pas de protéines, sauf exceptions comme la protéine A de *S. aureus*.

4.1.3. Paroi des bactéries à Gram négatif :

Elle est beaucoup plus complexe.

Le peptidoglycane est une couche mince, peu dense (< 15% du poids sec).

L'autre constituant essentiel est le lipide complexe (lipide A) couplé à la glucosamine et à des résidus phosphore qui est amphiphile, possédant une partie hydrophobe et une partie hydrophile. Il y a analogie entre les appellations « endotoxine », « lipide A », « antigène O » et « membrane externe ».

Sur les résidus glucosamine, des polysaccharides complexes sont fixés et forment la partie la plus externe de la paroi. Ils sont essentiels pour la physiologie bactérienne dans les processus de pénétration de nutriments ou de toxiques, ils sont spécifiques de sous-espèces ou de types et comportent des sucres originaux : antigènes O.

On trouve, à l'intérieur, des phospholipides. La membrane est successivement hydrophile (polysaccharide complexe), hydrophobe (lipide A et lipides des phospholipides), hydrophile (têtes hydrophiles des phospholipides).

Des protéines se trouvent enchâssées assurant la cohésion de la membrane, une liaison avec le peptidoglycane et des fonctions diverses de perméabilité sélective ou non. Ces porines, seules structures de transport des composés hydrophiles, sont essentielles à la vie de la bactérie mais aussi à l'action de certains antibiotiques. Enfin d'autres protéines servent à la captation d'ions (fer), ou de vitamines (facteurs de croissance). A noter les antigènes protéiques M des streptocoques.

La membrane externe empêche ou diminue l'entrée des sels biliaires, des antibiotiques, etc. Elle a de nombreux sites de contact avec la membrane plasmique.

La lipoprotéine de Braun est la protéine la plus abondante. Elle est attachée au peptidoglycane ou elle est fortement liée.

Le LPS est constitué du lipide A, du polysaccharide central et de la chaîne latérale O. Les chaînes latérales O peuvent changer rapidement pour échapper à la détection.

Le lipide A est enfoui dans la membrane externe, le reste est projeté à l'extérieur.

4.1.4. Autres propriétés de la paroi bactérienne :

COLORATION DE GRAM : Les morphologies bactériennes sont variées. Les cellules peuvent être courtes, pratiquement sphériques (cocci ou coques) ou allongées (bacilles).

Les bacilles sont essentiellement des cylindres à extrémités hémisphériques mais on en connaît aussi à extrémités fines, pointues (formes en fuseau) ou au contraire planes (bacilles dits « à bouts carrés »).

Certains corps bacillaires sont incurvés (*Vibrio*, *Campylobacter*) ou spiralés (*Leptospira*, *Treponema*).

Dans un environnement adapté, les cellules des bactéries peuvent être associées en groupements qui sont caractéristiques de l'espèce.

L'absence de paroi est habituellement létale pour les bactéries (Mollicutes exceptés). Les bactéries dépourvues d'enveloppes extérieures sont les « formes L » et les protoplastes, suite à l'action des antibiotiques (β -lactamines) ne semblent pas avoir un intérêt médical.

Les protoplastes sont observés chez les bactéries à Gram positif. L'action du lysozyme entraîne leur formation. Ils ne peuvent se diviser.

Les sphéropastes sont observés chez les bactéries à Gram négatif. Ils sont dus à l'action des antibiotiques. Une partie de la paroi cellulaire est toujours présente après traitement par une pénicilline. Ils peuvent se diviser et revenir à l'état ante au contact de substances hypertoniques. Ce sont les formes L.

La paroi est le site d'action d'enzymes exogènes (lysozyme) ou endogènes (autolysines) ou d'antibiotiques qui inhibent la synthèse du peptidoglycane.

Le LPS et le peptidoglycane ont un rôle non spécifique contre l'infection en activant le complément par la voie alterne libérant les fractions C3a et C5a (effet chimiotactique) et C3b (effet opsonisant).

4.2. La membrane cytoplasmique :

4.2.1. Structure :

C'est une structure interne à l'interface entre le cytoplasme et les structures externes.

C'est une membrane trilamellaire formée d'une double couche de phospholipides dont les pôles hydrophobes sont face à face, associée à des protéines.

Certaines protéines, les perméases, ont un rôle important dans les échanges.

D'autres ont un rôle dans la synthèse du peptidoglycane et sont des protéines de liaison aux pénicillines (PLP ou PBP).

D'autres protéines sont des enzymes respiratoires ou impliquées dans la production d'énergie (ATPase).

La membrane cytoplasmique ne possède pas de stérols (différent des eucaryotes).

4.2.2. Fonctions principales :

La membrane a un rôle métabolique majeur: on y trouve la plupart des activités associées aux mitochondries dans la cellule supérieure :

- Perméabilité sélective et transport des substances solubles vers l'intérieur de la bactérie ; rôle de barrière osmotique et de transport grâce aux perméases.
- Fonction respiratoire par transport d'électrons et de phosphorylation oxydative pour les bactéries aérobies.
- Excrétion d'enzymes hydrolytiques

Les flagelles bactériens y sont fixés. C'est là que se génère leur mouvement tournant. Elle est détruite par certains antibiotiques (polypeptides, antiseptiques).

5. Contenu bactérien :

5.1. Cytoplasme :

Présence d'ARN solubles (ARN messenger et ARN de transfert), et ARN ribosomal.

Présence d'environ 15.000 ribosomes (40% du poids de la bactérie, 90% de l'ARN) constitués de protéines ribosomales et d'ARN (16S, 23S, 5S) divisés en sous-unités : sous-unité 30S contient de l'ARN16S, sous-unité 50S constitué d'ARN23S.

Une variété importante d'inclusions existe dans le cytoplasme. Elles servent à emmagasiner des réserves organiques (glycogène, poly-B-hydroxybutyrate) ou inorganiques (granules de polyphosphate ou métachromatique, magnétosomes).

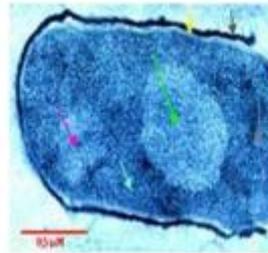


Figure 10 : Cytoplasme

5.2. Nucléotide ou appareil nucléaire :

Le chromosome de la cellule procaryote est situé dans une région de forme irrégulière appelée nucléotide.

Le chromosome est le plus souvent unique (*V. cholerae* en possède plusieurs)

C'est le support de l'information génétique. Il s'agit d'une formation en double hélice circulaire (parfois linéaire), surenroulée grâce aux topo-isomérases. Longueur 1 mm.

Il est composé d'ADN (60%), d'ARN (30%) et de protéines (10%).

5.3. ADN extra-chromosomique :

Non indispensable à la vie de la bactérie.

5.3.1. Plasmides :

Ce sont des molécules d'ADN double brin qui se répliquent indépendamment du chromosome, qui peuvent s'intégrer à celui-ci et qui sont transmissibles.

Ils sont porteurs de caractères de fertilité (Facteur F), de résistance aux antibiotiques (Facteur R), de bactériocines (plasmides Col), de virulence, de résistance aux antiseptiques, de caractères métaboliques, entre autres. Les plasmides peuvent donner un avantage sélectif à la bactérie. Les plasmides peuvent être éliminés spontanément de la cellule hôte.

5.3.2. Eléments transposables :

Ce sont des fragments d'ADN qui se déplacent dans le génome de la bactérie par transposition, d'où le nom de transposon. Le transposon est incapable de se répliquer.

Les éléments transposables les plus simples sont les séquences d'insertion (IS) ayant une courte séquence d'ADN.

5.4. Ribosomes :

Ils sont constitués d'ARN et de protéines. Les ribosomes bactériens comprennent deux sous-unités (30S, 50S).

Fonctionnellement, il y a deux sites essentiels pour la synthèse des protéines : le site aminoacyl qui accueille l'acyl-tARN et le site peptidyl qui accueille la chaîne d'acides aminés en cours de constitution.

Ils sont particulièrement présents à proximité de la membrane cytoplasmique, site de synthèse de la paroi et des protéines exportées. Ils n'ont pas la structure des ribosomes des eucaryotes expliquant la spécificité propre au monde bactérien. Des antibiotiques perturbent la synthèse des protéines à leur niveau (tétracyclines).

6. Structures inconstantes :

6.1. Capsules :

Ce constituant inconstant est le plus superficiel. Sa mise en évidence s'effectue par coloration négative (le colorant, encre de Chine ou Nigrosine est repoussé par la capsule et apparaît en clair sur fond noir).

Constitué de polysaccharides acides (sucres sous forme d'acides uroniques tel l'acide galacturonique, l'acide glucuronique, mais aussi sous forme de sucres phosphorés), ce composant est lié à certains pouvoirs pathogènes, car il empêche la phagocytose. La capsule de *Bacillus anthracis* est constituée d'un polypeptide d'acide D-glutamique.

Elle peut se trouver à l'état soluble dans les liquides de l'organisme (emploi dans le diagnostic = recherche d'antigène soluble).

Elle intervient dans l'identification infra-spécifique. Ce typage est une des méthodes de reconnaissance des épidémies.

Les polymères capsulaires purifiés sont la base de certains vaccins (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*).



Figure 11 : capsule

6.2. Glycocalyx :

Ce sont des polymères de nature polysaccharidique extrêmement fréquents entourant la bactérie et difficiles à visualiser, sauf en microscopie électronique. Le feutrage des fibres de glycocalyx est constant dans le cas de bactéries vivant en biofilm dans les conditions naturelles.

Le glycocalyx est aussi appelé *slime* car il engue les cellules.

Il est responsable de l'attachement des bactéries aux cellules (cellules buccales, respiratoires, par exemple), à des supports inertes (plaque dentaire sur l'émail dentaire, biofilms sur les cathéters, ou les prothèses dans le cas de bactéries d'intérêt médical). Il protège les bactéries du biofilm de la dessiccation, sert à concentrer ou à modifier les éléments nutritifs exogènes et rend les bactéries résistantes: antiseptiques, désinfectants, antibiotiques.

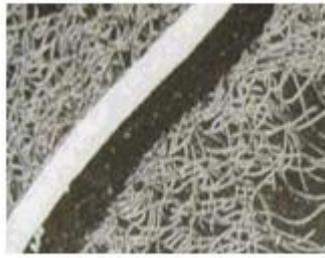


Figure 12 : glycoalyx.

6.3. Flagelles :

Ce sont des structures inconstantes. Ils sont de nature protéique (flagelline), long de 6-15 μm . Ils sont ancrés dans le cytoplasme par une structure complexe. La synthèse des flagelles nécessite 20 à 30 gènes. Le mécanisme est très compliqué. 1 gène pour la flagelline, 10 gènes ou plus pour les protéines du crochet et du corps basal. D'autres gènes existent pour le contrôle de la synthèse et la fonction du flagelle. Les unités de flagelline seraient transportées au travers du tube creux du filament. A l'extrémité, elles s'assemblent spontanément.

Ils ont un rôle :
 ● dans la mobilité de la bactérie (implantation monotriche/polaire ou péritriche)
 ● antigénique utilisé (sérodagnostic) pour la différenciation des espèces bactériennes.

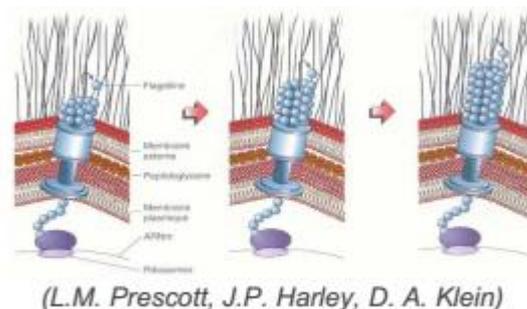


Figure12 : croissance des filaments flagellaires

6.4. Pili ou fimbriae :

Chez les bactéries à Gram négatif (exceptionnellement à Gram positif) peuvent exister des structures fibrillaire et rigide situées à la surface, plus fines que des flagelles : les pili ou fimbriae. Il s'agit de la polymérisation d'une sous-unité polypeptidique (piline) assemblée à des polypeptides mineurs comme l'adhésine.

6.4.1. Pili communs :

Ils peuvent attacher spécifiquement des bactéries à la surface de cellules eucaryotes, phase essentielle dans certains pouvoirs pathogènes (*Escherichia coli* au cours de certaines infections urinaires, *Vibrio cholerae* sur les entérocytes).

6.4.2. Pili sexuels :

Ils sont plus longs et sont codés par des plasmides (facteur F).

Ils ont un rôle dans l'attachement des bactéries entre elles (conjugaison) et sont le récepteur de virus bactériens ou bactériophages spécifiques

Chez les bactéries à Gram positif, des protéines de surface assimilées aux fimbriae jouent un rôle dans l'adhérence bactérienne. C'est le cas de la protéine M de *S. pyogenes* et de la protéine A de *S. aureus*.

6.5. Spore bactérienne :

Certaines bactéries, entre autres d'intérêt médical (genre *Clostridium* et *Bacillus*), ont la propriété de se différencier en formes de survie appelées spores. Elles se présentent sous une forme végétative métaboliquement active et potentiellement pathogène ou métaboliquement inactive et non pathogène (forme sporulée). La transformation de la forme végétative en spore est la sporulation:

- Temps : 6 à 8 heures à 37°C pour *Bacillus subtilis*.
- Conditions : déclenchée par des modifications de l'environnement tel épuisement en matières nutritives.
- Etapes : déshydratation progressive du cytoplasme, par l'apparition de composés (dipicolinate de calcium), une densification des structures nucléaires et enfin la synthèse d'une paroi sporale épaisse et imperméable, donc hautement résistante (chaleur). La spore intra-bactérienne est libérée dans le milieu extérieur et y survit des années. Dans des conditions favorables (nutritives, thermiques et chimiques), elle redonne une cellule végétative (germination).

Intérêt médical :

- conserves familiales (Botulisme) (*Clostridium botulinum*).
- plaies souillées par de la terre (Tétanos) (*Clostridium tetani*).
- chez l'animal : mange des chardons (Charbon) (*Bacillus anthracis*).

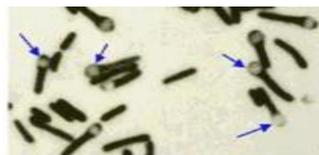


Figure 13 : spore bacterienne

III-Les antibiotiques :

1-Un antibiotique

est une molécule naturelle ou synthétique qui détruit ou bloque la croissance des bactéries. C'est une substance, utilisable par voie générale dans le traitement des maladies infectieuses La fabrication des ATB se caractérise par trois conditions qui doivent être respectées pour une production à grande échelle :

- L'ATB doit couvrir un large spectre d'action,
- S'assurer de sa pharmacocinétique ; absence d'effets secondaires sur l'organisme ou que le rapport bénéfice / risque soit positif,
- S'assurer que la fabrication de l'ATB sera rentable.

2-Spectre d'activité :

Le spectre d'activité antimicrobienne d'un ATB correspond à l'ensemble des germes sensibles à ce dernier. Il répartit les espèces bactériennes en trois classes en fonction de leur comportement vis à vis de l'ATB

2-1 Mode d'action des ATB :

Pour pouvoir être utilisable en pratique clinique, un antibiotique doit :

- se caractériser par une action spécifique sur les germes visés sans perturber le fonctionnement des cellules eucaryotes.
 - Un antibiotique devra donc idéalement affecter une voie métabolique absente ou peu active chez les eucaryotes mais essentielle aux procaryotes, ou atteindre une cible spécifique aux procaryotes
- Les antibiotiques possèdent des modes d'actions variés et à divers niveaux structurels et métaboliques des micro-organismes.

Ces actions peuvent être classées comme suit :

Action sur la paroi bactérienne

Action sur la membrane cytoplasmique

Action sur les acides nucléiques et la synthèse protéique

Action sur la synthèse de l'acide folique

En règle générale, les ATB agissant sur la paroi ou la membrane cytoplasmique sont bactéricides car ils détruisent les structures des bactéries, et les ATB agissant sur la synthèse protéique sont bactériostatiques car ils bloquent le métabolisme des bactéries, à l'exception des aminosides bactéricides.

2-2 Antibiorésistance :

La résistance aux antibiotiques apparaît comme un événement normal de l'évolution des microorganismes. La résistance aux antibiotiques peut être définie selon différents points de vue :

- Pour le clinicien ; la non efficacité du traitement
- Pour le pharmacologue ; faible concentration d'inhibitrice.
- Pour le microbiologiste ; la disposition d'un mécanisme de résistance
- Pour l'épidémiologiste, une différente concentration spécifique Mécanismes biochimiques de résistance des bactéries Pour échapper à l'action létale des antibiotiques :

3- Naturelle ou constitutionnelle – Acquisée Règles classiques de l'antibiothérapie :

3-1. Usages des ATB : Thérapeutique curatif Métaphylaxie Antibioprévention Additifs alimentaires.

3-2. Efficacité du traitement ATB : Un traitement ATB efficace est basé sur les objectifs suivant: a. La nécessité d'agent antimicrobien b. Identifier et caractériser le pathogène c. concentrations efficaces de l'ATB indiqué pendant une période suffisante au niveau du site de l'infection, d. la dose, la fréquence, la voie d'administration de l'ATB et, la durée de traitement.

3-3. Associations thérapeutiques :

Elle se justifie par une série d'avantages :

- Traiter les infections Polymicrobiennes dont les organismes ne sont pas sensibles un agent commun, Une synergie entre les antibiotiques administrés surtout contre les souches de résistance particulière, Surmonter la tolérance bactérienne, Minimiser les risques de voir émerger des souches résistantes, De façon accessoire, elle s'accompagne parfois d'une réduction de toxicité, Prévenir l'inactivation d'un ATB par des enzymes produites par d'autres bactéries présentes (ex : association des β -lactamines et un inhibiteur des β -lactamases tel que l'acide clavulanique ou le sulbactam).
Remarque : Généralement, les ATB bactériostatique agissent de manière additive, alors que les agents bactéricides sont souvent synergiques. Cependant, les effets de plusieurs ATB bactéricides sont très altérés par l'utilisation simultanée d'un agent bactériostatique.

4-Classification des ATB :

La classification chimique qui est le plus souvent en usage. En fonction de leur structure chimique, les ATB sont regroupés en plusieurs grandes familles caractérisées par :

- Une structure chimique voisine, plus ou moins homogènes,
- Des caractères physiques et chimiques voisins, déterminant un devenir dans l'organisme assez proche
- Une activité bactérienne du même ordre.

IV-L 'antibiogramme :

1-Le but de l'antibiogramme :

Le choix de l'antibiotique est réalisé de manière très empirique dans la plupart des infections banales débutantes : le médecin prescrit, en fonction de l'examen clinique, la molécule dont l'efficacité lui paraît la plus probable (antibiothérapie dite probabiliste). Ce n'est que dans les infections graves, récidivantes ou les échecs thérapeutiques que l'on fait appel au laboratoire qui réalisera une culture et un antibiogramme.

Un antibiogramme permet de tester sur milieu de culture, l'action de molécules antibiotiques sur une souche bactérienne.

Il donnera donc des indications sur l'efficacité *IN VITRO* de ces antibiotiques.

Quelques définitions :

Deux notions sont à connaître avant de faire un antibiogramme :

-La CMI ou Concentration Minimale Inhibitrice :

Il s'agit de la concentration de l'antibiotique la plus faible pour laquelle la croissance bactérienne est inhibée (pas de croissance de la population ; 100% de survivants)

-La CMB ou Concentration Minimale Bactéricide :

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

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

La mesure de la CMI permet de déterminer si une souche est sensible ou résistante à l'antibiotique testé. Pour chaque antibiotique, on a pu mesurer les concentrations sériques obtenues chez le patient (humain) dans le cadre d'une posologie normale. on distingue alors :

-la souche est dite RESISTANTE :

La CMI ne peut être atteinte par un traitement réalisé à l'aide de cet antibiotique sans être toxique pour l'animal.

-la souche est dite SENSIBLE :La CMI peut être atteinte par un traitement usuel réalisé à l'aide de cet antibiotique.

-La souche est dite INTERMEDIARE : la CMI ne peut être atteinte qu'en augmentant les doses.

Remarque : Dans le cas d'une souche intermédiaire, augmenter la posologie n'est réalisable en pratique que dans les cas où l'antibiotique est peu ou pas toxique, de traitement local (plaie, otite) ou d'excrétion sous forme active dans l'organe infecté (par exemple pour soigner une infection du tractus urinaire si excrétion rénale)

2-Interaction entre antibiotiques :

Outre le fait que certaines molécules inhibent ou au contraire exacerbent l'effet des antibiotiques (acide, sucre, thymine, etc...), les différents antibiotiques peuvent interagir entre eux. Trois grands types d'interactions peuvent être définis :

- **La synergie** : chaque antibiotique voit son action augmentée par l'autre.
- **L'antagonisme** : les effets des deux antibiotiques se contrarient
- **L'indifférence** : que l'on utilise chaque antibiotique séparément ou en association, le résultat est le même.



Figure 14 : interaction entre ATB

3-Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) :

Afin de pouvoir conclure sur la sensibilité d'une souche à un antibiotique donné, il faut déterminer sa CMI vis à vis de cette molécule. Plusieurs méthodes sont à la disposition du laboratoire. On différencie :

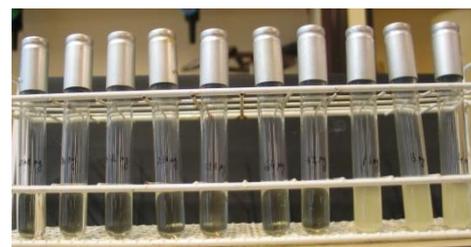
- les techniques en milieu liquide (en tube, en microplaque)
- la technique en milieu solide gélosé (Etest)

3-1- les méthodes en milieu liquide :

Une solution mère d'antibiotique est diluée de 2 en 2. Le diluant est le bouillon de Mueller-Hinton. L'inoculum est préparé à partir d'une culture de 24 heures en milieu liquide

3-1-1 Macrométhode

Reporter dans une série de tubes stériles 1 ml de chaque dilution de l'antibiotique. Ajouter dans tous les tubes le même volume d'inoculum. Incuber 24 heures à la température optimale de la souche à tester. Observer les tubes après incubation : la CMI sera la concentration en antibiotique la plus faible pour laquelle il n'y a pas de croissance visible. En fait, elle est comprise entre le tube



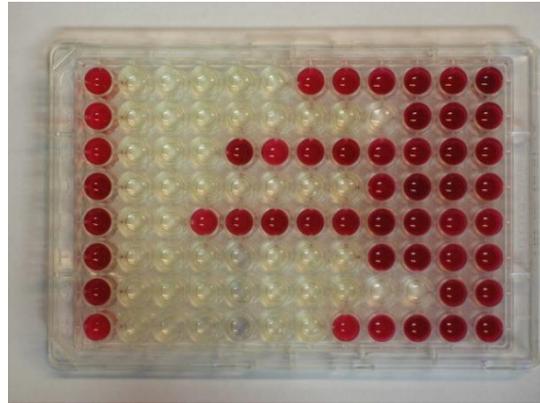
Correspondant à cette définition et le premier tube dans lequel une croissance est observée.

Figure 14 : macromethode

3-1-2 Microméthode

Des microplaques à fond en U (plaque à microtitration) sont utilisables pour la détermination des CMI. Une plaque 96 puits permet la détermination de la CMI de 8 antibiotiques vis-à-vis de la même souche. Dans les cupules d'une même ligne, les dilutions de l'antibiotique et la souche sont introduit à l'aide d'une pipette automatique. Incuber 24 h à la température optimale de la souche. Observer la plaque est une éventuelle pousse dans chaque cupule (ou un dépôt au fond de la cupule). La CMI correspond à la concentration de la cupule ne présentant pas de croissance.

Figure 15 : micromethode



3-2 La méthode en milieu gélosé :

C'est la méthode la plus précise car donnant une valeur vraie de la CMI et non un encadrement de celle-ci. Elle est connue sous le nom commercial de Etest®. Elle est cependant rarement utilisée en routine à cause de son coût élevé.

Une bandelette est imprégnée de quantités croissantes d'antibiotiques. Elle est placée sur une gélose pour antibiogrammeensemencée classiquement ; l'antibiotique diffuse en formant un gradient important : la zone d'inhibition à la forme d'une ellipse et la lecture est alors directe sur la bandelette là où celle-ci rencontre la zone d'inhibition.



Figure16 : Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice en milieu gélosé

Cependant connaître précisément la CMI d'une souche vis-à-vis des antibiotiques n'est pas essentiel pour le praticien. En effet, il lui suffit de situer cette valeur par rapport aux deux concentrations critiques. On réalise pour cela l'antibiogramme qui permet de positionner la CMI par rapport à CC et Cc.

4-L'antibiogramme

4-1- L'antibiogramme standard en milieu gélosé : méthode des disques

4-1-1 Principe général :

Pour réaliser l'antibiogramme par le méthode des disques, la culture bactérienne est ensemencée à la surface d'une gélose spécialement étudiée, la gélose de Mueller-Hinton, éventuellement additionnée de sang. Des disques pré-imprégnés d'une dose connue d'antibiotique sont déposés à la surface de la gélose. L'antibiotique diffuse à partir du disque en créant un gradient de concentration. La détermination du diamètre de la zone d'inhibition permet une estimation de la concentration minimale inhibitrice. Les caractères de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne en seront déduits.

4-1-2 Technique :

En pratique, on réalise à partir de l'isolement (souche pure) un ensemencement en tapis sur le milieu. On dispose ensuite les disques d'antibiotiques et on place à l'incubateur. Au bout de 24 h, on lit les différents diamètres d'inhibition et on peut conclure en comparant ceux-ci aux abaques de lecture.

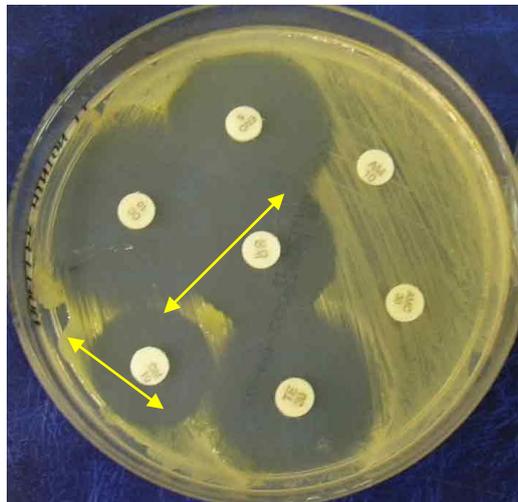


Figure 17 : methode en disque

4-1-3 Interprétation :

Les abaques de lecture se présentent sous forme de bandes présentant deux données qui délimitent les zones SENSIBLE, INTERMEDIAIRE et RESISTANTE. Un report du diamètre mesuré sur la boîte permet de conclure rapidement.

Exemple : 3 souches bactériennes sont testées vis à vis de l'ampicilline. On mesure les diamètres d'inhibition suivants : souche A 8 mm, souche B 25 mm et souche C 15 mm.

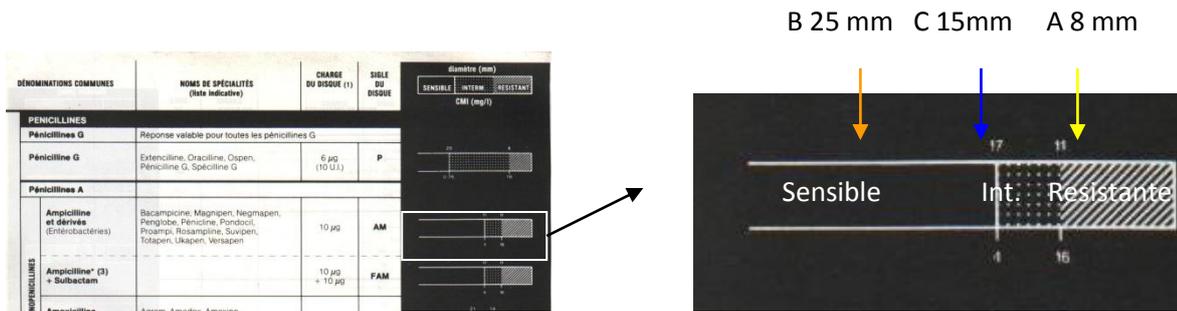


Figure 18 : les plaques de lecture

La souche A est donc RESISTANTE, la souche B SENSIBLE et la souche C est déclarée INTERMEDIAIRE.

4.2 Antibiogramme en milieu liquide :

Comme il existe des galeries d'identifications miniatures, il existe une galerie antibiogramme. Chaque antibiotique est testé à deux concentrations différentes (délimitant les zones « sensible » et « résistant ») en milieu liquide.

4.3 Transposition pour le praticien :

En se souvenant que les concentrations utilisées pour lire l'antibiogramme sont les concentrations sériques obtenues chez l'humain en bonne santé après injection parentérale de la dose appropriée, les messages découlant des résultats de l'antibiogramme pour le praticien sont :

- souche résistante** : la probabilité d'obtenir une concentration suffisamment élevée *in vivo* pour contrer la bactérie est nulle ;
- souche sensible** : la probabilité d'obtenir une concentration suffisamment élevée *in vivo* pour contrer la bactérie est excellente (cela ne signifie pas que l'animal guérira d'office, car un ensemble d'autres paramètres interviennent) ;
- souche intermédiaire : la probabilité d'obtenir une concentration suffisamment élevée pour contrer la bactérie est faible si on ne peut augmenter de manière significative la dose administrée.

CHAPITRE II

PARTIE EXPÉRIMENTAL

Matériel et méthode :

I-Cadre et objectifs :

L'étude réalisée durant notre travail s'est intéressée aux profils de l'ensemble différent d'échantillons reçus dans la clinique vétérinaire " le soleil " a Oran .

Les échantillons sont des poulets prélevés dans des fermes avicoles qui présentent un problèmes pathologiques

Nous disséquons les échantillons et les examinons histologiquement

Ensuite, nous passons à l'examen bactérien par l'antibiogramme

II-prélèvement d'échantillons dans l'd'élevage avicole atteint de la maladie :



Figure19 : echantillonage pour faire l'autopsie

III- travaux d'autopsie sur les échantillons prélevés :



Figure 20 : ouvrir le cadavre et l'autopsie e système digestif



Figure 21 : dépôt jaunâtre sur les fibres



Figure 22 : ouvrir le cadavre



Figure 23 : trachée ouverte

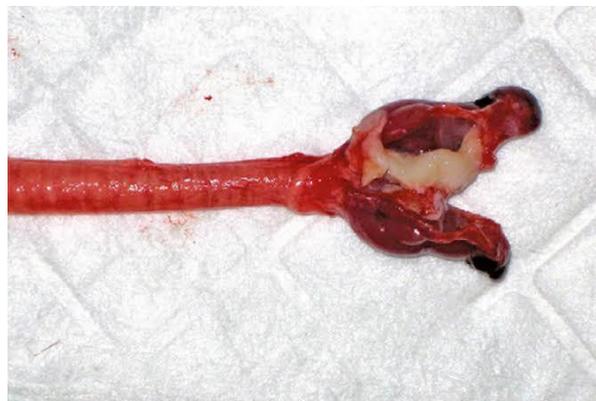


Figure24 : rougeur des tissus

1-L'Antibiogramme par diffusion des disques :

Principe : Un inoculum standardisé de bactéries (le plus souvent 0.5Mcf) est tamponné sur la surface d'une boîte de gélose Mueller-Hinton (MH). Des disques de papier filtre imprégnés d'agents antimicrobiens sont placés sur la gélose. Après une nuit d'incubation, le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré autour de chaque disque. En se référant aux tableaux de la norme CLSI (la même que la standardisation algérienne) / EUCAST, on obtient un rapport qualitatif de sensible, intermédiaire ou résistant.

Milieux pour Antibiogramme :

≡ Le milieu retenu pour la majorité des espèces bactériennes est celui de Mueller-Hinton (plus 5% de sang pour les germes exigeants).

≡ Il doit être coulé en boîtes de Petri sur une épaisseur de 4 mm et les géloses doivent être séchées avant l'emploi.

≡ Si, juste avant l'utilisation, un excès d'humidité de surface est présent sur les plaques, placez-les dans un incubateur (35 ° C) ou une hotte à flux laminaire à température ambiante avec les couvercles entrouverts jusqu'à ce que l'excès d'humidité de surface soit éliminé par évaporation (généralement 10 à 30 minutes).



Figure25 : préparation de gélose nutritif et l'ensemencement des colonies bactériennes

Les disques d'antibiotiques :

≡ Sont fabriqués à partir de papier absorbant de qualité supérieure imprégnés d'agents antimicrobiens à des concentrations précises. Ils sont clairement identifiés par un sigle, comportant 1 à 3 lettres, imprimé de chaque côté du disque

≡ Les cartouches de disques doivent être conservées dans leur container entre +2 et +8°C au sec. Les disques doivent être amenés à température ambiante. Toute cartouche ouverte doit être utilisée dans les cinq jours.

≡ L'antibiotique contenu dans le disque se solubilise dans l'eau de la gélose. Sa diffusion peut-être schématiquement présentée en deux étapes:

- une diffusion verticale (en profondeur) dans le milieu contenu dans le cylindre délimité par le disque pré-imprégné
- une diffusion horizontale (latéralement) qui répartit l'antibiotique selon un gradient de concentrations dont le maximum est situé au niveau du disque.

La technique d'ensemencement de l'antibiogramme:

≡ l'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum. Il est réalisé par écouvillonnage ou par inondation de telle façon à avoir après incubation des colonies distinctes mais jointives.

1. Plonger l'écouvillon dans la suspension et éliminer l'excès de liquide en tournant l'écouvillon sur les parois du tube.
2. Frotter la surface entière de la boîte d'agar trois fois, en faisant tourner la boîte d'environ 60°C entre les stries pour assurer une distribution uniforme. Pour minimiser les aérosols, évitez de heurter les côtés de la plaque. Enfin, passez un tampon sur le bord de la gélose pour éliminer tout excès d'humidité.

Application des disques:

1. Appliquer des disques sur la surface d'agar avec un distributeur ou manuellement avec une pince stérile.
2. Appliquer une légère pression avec une pince ou une aiguille stérile pour assurer un contact complet du disque avec la gélose (certains distributeurs le font automatiquement).
3. Déposer les disques d'antibiotique sur la gélose (maximum 6 disques sur boîte de pétri de 9 cm de diamètre)
4. Incubation rapide dans les 15 minutes qui suivent le dépôt des disques (au delà de 30 minutes les zones d'inhibition seront faussement agrandies). Incubation 16-24 heures à $35 \pm 2^\circ \text{C}$ en aérobiose (sauf cas cités plus haut sous atmosphère enrichie en Co_2 ou micro-aérobiose).

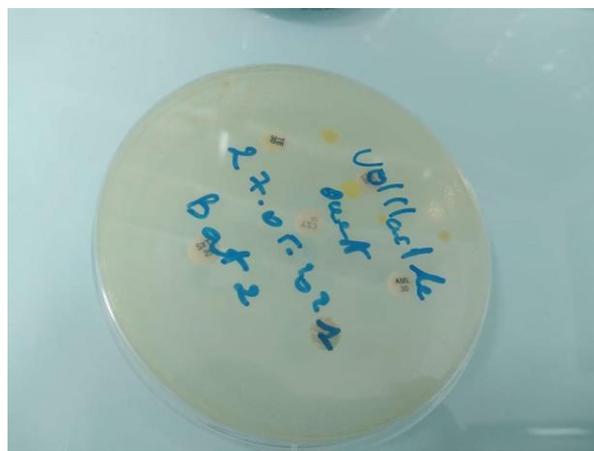


Figure 26 : Application des disques d'antibiogramme

Incubation de l'antibiogramme:

- Retourner les boîtes et les incuber idéalement dans les 15 min. qui suivent le dépôt des disques, sans dépasser 30 min. Si elles sont abandonnées à température ambiante après dépôt des disques, la pré-diffusion des antibiotiques engendrera des zones d'inhibition faussement agrandies



Figure27 : L'incubation de l'antibiogramme

Lecture de l'antibiogramme:

1- Après 16 à 18 heures d'incubation, examinez chaque plaque. Si la plaque a été striée de manière satisfaisante et que la concentration d'inoculum est correcte, les zones d'inhibition résultantes seront uniformément circulaires et il y aura une pelouse de croissance confluyente.

- Si des colonies individuelles sont apparentes, la concentration de l'inoculum était trop légère et le test doit être répété.

≡ Mesurer les diamètres des zones d'inhibition complète (comme jugé à l'œil nu), y compris le diamètre du disque. Mesurez les zones au millimètre entier le plus proche, à l'aide d'étriers coulissants ou d'une règle, qui est maintenue à l'arrière de la plaque de Pétri inversée.

≡ Mesurer les diamètres des zones d'inhibition complète (comme jugé à l'œil nu), y compris le diamètre du disque. Mesurez les zones au millimètre entier le plus proche, à l'aide d'étriers coulissants ou d'une règle, qui est maintenue à l'arrière de la plaque de Pétri inversée.



Figure 28 : Lecture de diamètre de chaque réaction

L'interprétation et choisir l'antibiotique de choix :

Interprétation boîtes : $col \ominus$

F = 1/5 → lat ⊕ → DR c.

S = 4/4 → lat ⊕ → ER c.

Antibiogramme :

SPT	36	20-22
CN	20	20-22
PHX	0	44-21
PPc	38	19-22
ENT	16	17-22
DA	0	17-20
SXT	6	12-16
DO	16	17-19
CST	22	15

Staphylococcus aureus

multiresistance pour Doxycycline et Colistiméthate

Interprétation boîtes : $col \ominus$ lat ⊕ (suat)

F/5/5

Antibiogramme :

SPT	20	20-22
CN	31	20-22
PHX	20	44-21
PPc	✓	19-22
ENT	25	17-22
DA	✓	17-20
SXT	31	12-16
DO	21	17-19
CST	27	15

diagnostique

Conclusion:

En conclusion, nous devouer que rétrospectivement nous sommes satisfaits de cette mémoire puisque nous avons atteint des nouveaux objectifs

En effet, ce mini Project nous 'a permis comprendre et apprendre à maîtrises l'antibiogramme avec l'aide de techniques et de moyens spécieux avec l'application d'acquisition de l'information et connaissances

L'utilisation de l'antibiogramme nous guide généralement à choisir l'antibiotique de choix, pour cela il faut toujours les comparer avec les résultats obtenus et comparer les diamètres des cercles avec les résultats standard

Ensuite, nous choisissons l'antibiotique efficace pour tues les bactéries responsables de la maladie

En effet ce stage m'a offert des expériences énormes dans les mesures ou ils m'ont été intéressants, enrichissants bénéfiques.

Conclusion

In conclusion, we dedicate that in retrospect we are satisfied with this memory since we have reached new objectives

Indeed, this mini Project has allowed us to understand and learn to master the antibiogram with the help of techniques and specious means with the application of the acquisition of information and knowledge

The use of the antibiogram generally guides us in choosing the antibiotic of choice, for this we must always compare them with the results obtained and compare the diameters of the circles with the standard results

Then we choose the effective antibiotic to kill the bacteria that cause the disease

Indeed this internship offered me tremendous experiences to the extent that they were interesting, enriching and beneficial.

Références Bibliographiques:

Carter, J. B. and Saunders, V. A. 2007. **Virology principles and applications**. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England.

Chen J. and Novick, R. P. 2009. **Phage-Mediated Intergeneric Transfer of Toxin Genes**. *Science*. 323 : 139-141.

Dale J. W. and Park S. F. 2010. **Molecular Genetics of Bacteria**. 5th edition. A John Wiley & Sons, Ltd., Publication.

Garrett, R. H. and Grisham, C. M. 2010. **Biochemistry**. Fourth edition, Brooks/Cole, Cengage Learning. ISBN-13: 978-0-495-10935-8.

Griffiths A. J.F., Wessler S. R., Lewontin R. C., Gelbart W. M., Suzuki D. T., Miller J. H. 2004. **An Introduction to Genetic Analysis**, Eighth Edition.

Lang, A. S., Zhaxybayeva, O. and Beatty, J. T. 2012. **Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange**. *Nature Reviews Microbiology* , 10: 472-482. doi:10.1038/nrmicro2802.
Lang, A.S., Beatty, J. T. *Microbiol*. 2007. **Importance of wide spread gene transfer agent genes in alphaproteobacteria**; 15(2):54-62.

Madigan, M.T. , Martinko, J. M., Stahl, D.A. and Clark D. P. 2012. **Brock-Biology of Microorganisms** Thirteenth Edition. ISBN-13: 978-0-321-64963-8.

Prescott L. M. 2002. **Microbiology**. 5th Edition . The McGraw–Hill Companies, ISBN: 0-07-282905-2

Primrose, S.B. and Twyman R.M. 2006. **Principles of Gene Manipulation and Genomics**. Seventh edition. Blackwell Publishing.

Sakaguchi, K. and Okanishi, M. 1980. **Molecular Breeding and Genetics of Applied Microorganisms**. Kodansha Ltd. ISBN 0-12-615050-8.

Tortora, G. J., Funke, B. R. and Case, C.L. 2010. **Microbiology: an introduction** / - 10th ed. Publishing as Pearson Benjamin Cummings.

Résumé :

L'antibiogramme est une technique de laboratoire mesurant *in vitro* la sensibilité d'une souche bactérienne à un antibiotique et permettant de prédire avec un risque faible d'erreur un succès ou un échec thérapeutique. L'antibiogramme est toujours réalisé sur une souche bactérienne isolée par mise en culture d'un prélèvement clinique, identifiée et dont le rôle dans le processus infectieux est fortement suspecté. L'antibiogramme est inutile sur un germe commensal ou contaminant.

L'antibiogramme a pour but de caractériser l'acquisition de résistances acquises aux antibiotiques. Seuls les antibiotiques réputés naturellement actifs sur l'espèce bactérienne en cause sont testés. Ses résultats permettent de modifier la prescription de première intention. Il est aussi réalisé dans le cadre de la surveillance épidémiologique de la résistance aux antibiotiques.

Il permet alors de définir le statut d'une espèce bactérienne vis-à-vis d'une molécule. Les spectres actualisés permettent de mettre en place un traitement probabiliste de première intention. L'antibiogramme n'est pas nécessaire lorsque l'espèce bactérienne responsable de l'infection est habituellement sensible au traitement de référence.

Dans ce travail, nous avons pu trouver des antibiotiques qui ciblent et tuent les bactéries causant des maladies graves dans les poulaillers.

Grâce à la technologie AntibioGram, nous avons pu cibler les bactéries et réduire diverses maladies qui ont causé la mort d'un nombre important de volailles.

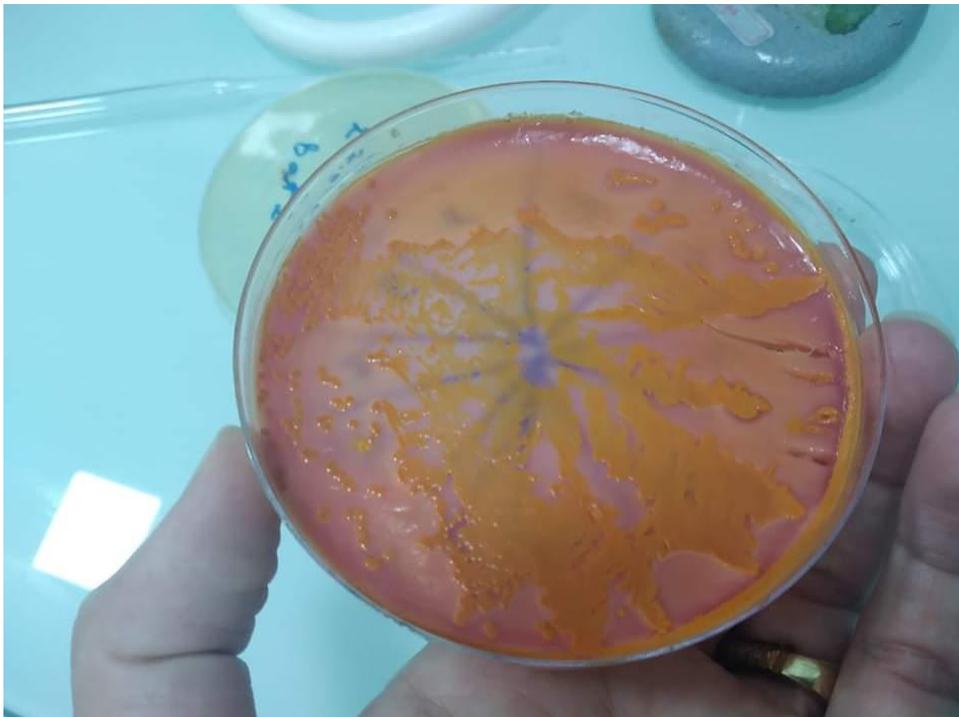
Abstract

The antibiogram is a laboratory technique measuring in vitro the sensitivity of a bacterial strain to an antibiotic and making it possible to predict with a low risk of error a success or therapeutic failure. The antibiogram is always carried out on a bacterial strain isolated by culturing a clinical sample, identified and whose role in the infectious process is strongly suspected. The antibiogram is useless on a commensal or contaminating germ.

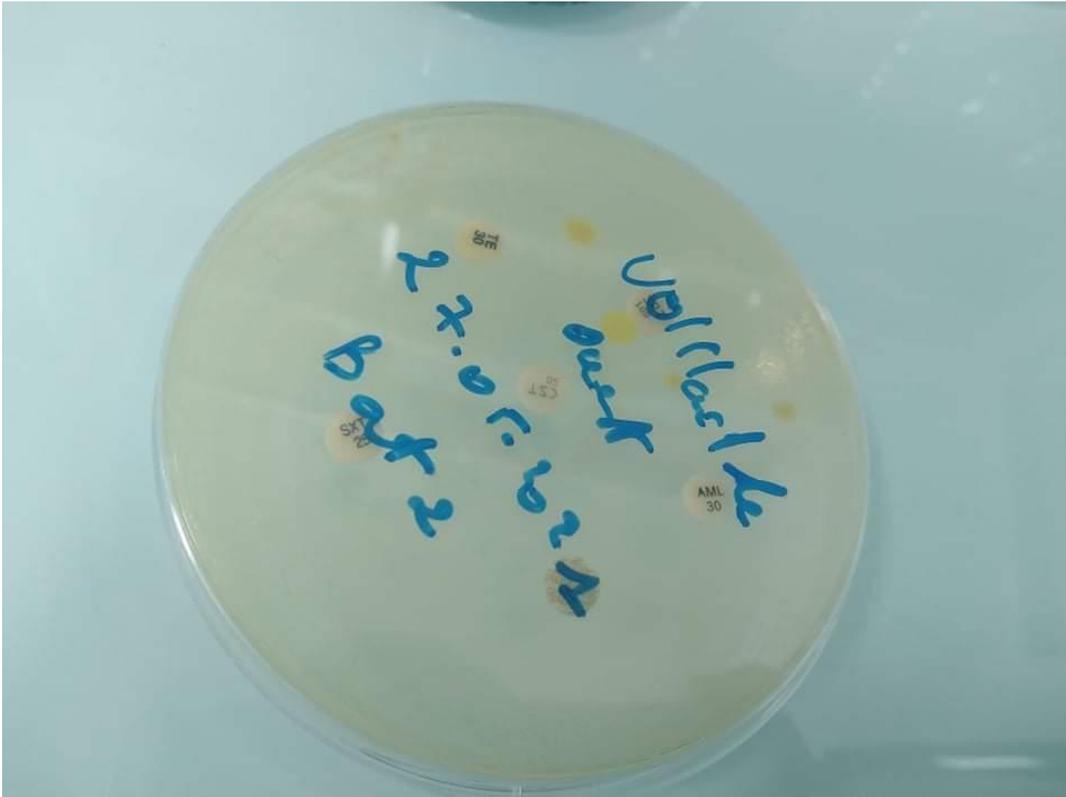
The purpose of the antibiogram is to characterize the acquisition of acquired resistance to antibiotics. Only antibiotics known to be naturally active on the bacterial species in question are tested. Its results make it possible to modify the first-line prescription. It is also carried out as part of the epidemiological surveillance of antibiotic resistance.

It then makes it possible to define the status of a bacterial species with respect to a molecule. The updated spectra make it possible to set up a first-line probabilistic treatment. The antibiogram is not necessary when the bacterial species responsible for the infection is usually sensitive to the standard treatment. In this work, we were able to find antibiotics that target and kill bacteria causing serious disease in poultry houses.

Using Antibiogram technology, we have been able to target bacteria and reduce various diseases that have caused the death of significant numbers of poultry.



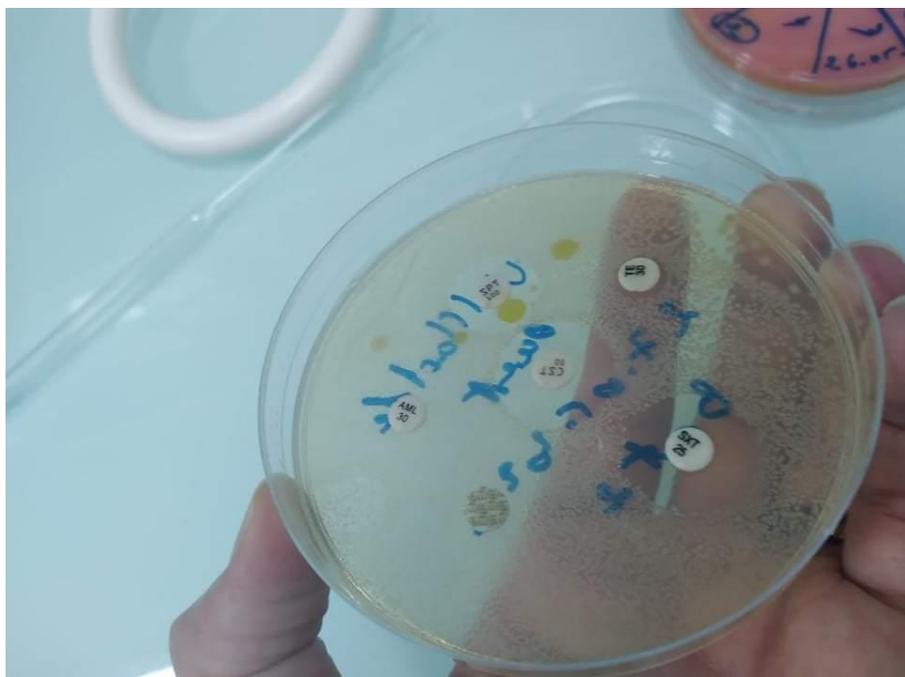
Préparation de gélose nutritif



l'emplacement des disques d'antibiotiques



la réaction après l'incubation



lecture des diamètres après l'incubation

ANNEXS

Duodénum	
Jéjunum	
Caéca	
Autres	
Appreil uro-génital :	
Oviducte	
Ovules	
Tractus génital	
Testicules	
Reins	
Cavité thoracique	
Cavité abdominale	

Interprétation boîtes : $ul \oplus$

F = 1/5 → lacte → B.c.

S = 4/4 → lacte → B.c.

standard diamètre.

Antibiogramme :

SPT	36	-	20-22	
CN	30	-	20-22	
AMX	0		14-21	
FPC	32		19-22	
EMK	16		17-20	
DA	0		17-20	
SXT	6		12-16	<i>ouja fuinto pinto</i>
DO	16		17-19	<i>Doxyacine</i>
CST	22	-	15	<i>Colistin</i>

*Spectinogin
Gentamicine
Amoxic
Fluoroal
avofloxa
policlinolij
naltinaturo
pino*

Duodénum	
Jéjunum	
Caéca	
Autres	
Appreil uro-génital :	
Oviducte	
Ovules	
Tractus génital	
Testicules	
Reins	
Cavité thoracique	
Cavité abdominale	

Interprétation boîtes :

$ul \oplus$ lacte (sall)

F/5/5

Antibiogramme : *diamètre*

SPT	29		20-22	
CN	31		20-22	
AMX	20		14-21	
FPC	/		19-22	
EMK	25		17-22	
DA	/		17-20	
SXT	31		12-16	
DO	21		17-19	
CST	27		15	