

République Algérienne Démocratique et Populaire

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



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE ET BIOLOGIE VEGETALE

N°...../SNV/2017

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

LOUAFI Amina et TACHIBENT Fatiha

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité:

Génétique Moléculaire et Génomique des Micro-organismes

THÈME

**Isolement des mutants spontanés d'*Enterobacter sp.*
Résistants à l'antibiotique céfazoline**

Soutenue publiquement le 13/ 06/2017

DEVANT LE JURY

Président : Mme DALACH. F MCA U. Mostaganem

Encadreur : Mr CHIBANI. A MCA U. Mostaganem

Examineurs : Mr DJIBAOUI R. MCA U. Mostaganem

Thème réalisé au Laboratoire de microbiologie

Remerciements

Avant toute chose, nous remercions «

Dédicace

À ma mère, la lumière qui éclaire ma vie, qui m'a toujours encouragé, aidé, qui m'a guidé Dans le droit chemin, qui m'a appris que rien est impossible, que dieu te garde près de nous, merci
Maman.

À celui qui m'a toujours encouragé et soutenu durant toutes mes années d'études. Merci pour ton amour et ta confiance total. A toi très cher *papa.*

Ames chères sœurs (*Hassiba, wafa, farah*) et frères (*Habib, Abd AlKadar*) et toute ma famille.

A mes camarades , *Mariem, Hadia, Zahra, Samiha, Samia, Hanane, Yamina,* et *Tachibent fatiha* particulièrement pour tous les bons moment que nous avons prtagés.

Et à mon encadreur *Dr. CHIBANI,* *À* merci pour votre disponibilité et vos précieux conseils.

Ainsi qu'à toute la promotion de *GMGM 2016/2017.*

L AMINA

Dédicace

À ma mère, la lumière qui éclaire ma vie, qui m'a toujours encouragé, aidé, qui m'a guidé Dans le droit chemin, qui m'a appris que rien est impossible, que dieu te garde près de nous, merci
Maman.

À celui qui m'a toujours encouragé et soutenu durant toutes mes années d'études. Merci pour ton amour et ta confiance total. A toi très cher *papa.*

Ames chères sœurs et frères et toute ma famille.

A mes camarades , *Mariem, Hadia, Zahra, Samiha, Samia, Hanane, Khadija, Yamina, Houria, Karima,* et *louafi Amina* particulièrement pour tous les bons moment que nous avons prtagés.

Et à mon encadreur *Dr. CHIBANI,* *À* merci pour votre disponibilité et vos précieux conseils.

Ainsi qu' à toute la promotion de *GMGM 2016/2017.*

T. Fatiha

Liste des figures

Figure 01 : Différents modes d'action des antibiotiques.....	02
Figure 02 : Cycle ² -lactame	03
Figure 03 : Structures simplifiées des diverses ² -lactamines.....	04
Figure 04 : Emergence d'une résistance acquise aux antimicrobiens.....	14
Figure 05 : la composition chimiques d'ADN	20
Figure 06 : l'Adénine associée à la Thymine et la Guanine associée à la Cytosine.....	21
Figure 07 : Technique de préparation de délitons décimales	30
Figure 08 : d'antibiogramme des bactéries <i>Bacillus Cereus</i>	33
Figure 09 : d'antibiogramme des bactéries <i>staphylococcus aureus</i>	33
Figure 10 : d'antibiogramme des bactéries <i>Enterobacter SP</i>	34
Figure 11 : d'antibiogramme des bactéries <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
Figure 12 : résultats d'antibiogramme des souches bactériennes.....	35
Figure 13 : profils de résistance de souches testés.....	36
Figure 14 : représente la croissance d' <i>Enterobacter SP</i> après les différentes dilutions.....	37
Figure 15 : résultats de sélection de la résistance de différents concentration d' antibiotiques de <i>Enterobacter SP</i>	38
Figure 16 : résultats de sélection de la résistance de 2 ml d'antibiotique d' <i>Enteribacter SP</i>	38
Figure17 : Ensemencement des isolats résistants de la souche d' <i>Enterobacter SP</i>	40
Figure 18 : d'antibiogramme des isolats résistants de souches d' <i>Enterobacter SP</i>	41
Figure 19 : résultat d'antibiogramme des isolats résistants.....	42
Figure 20 :résultat de la bactérie dépendante à la cefazoline.....	43

Liste des tableaux

Tableau 01 : les dates d'introduction des grandes familles d'antibiotiques et les dates d'apparition des premières résistances.....	10
Tableau 02 : Les différents mécanismes de la résistance	15
Tableau 03 : Mode d'action de quelques agents chimiques.....	25
Tableau 04 : résultats d'antibiogramme pour les souches.....	35
Tableau 05 : nombre des colonies des différentes tailles.....	39
Tableau 06 : résultats d'antibiogramme des isolats résistants.....	41

Liste des abréviations

ADN:	Acide D ésoxyribonucléique
ARN:	Acide R ibonucléique
AM:	Ampiciline
BN:	B ouillon N utritif
BP:	B iopamox
CMI:	Concentration Minimale inhibitrice
C:	Concentration
CZ:	Cefazoline
G:	G rand
GN:	G élose N utritive
GM:	G entamycine
M:	M oyen
UV:	Ultra-Violet
RC:	R etarciline
VM:	V ibramycine
R:	R ésistante
RND:	R esistance N odulation cell D ivision
S:	S ensible
P:	P etite
µg :	m icro gramme
T:	T émoin
% :	P ourcentage

°C : Degré Celsius

UFC: Unité Format Colonie

BMR : Bactéries Multirésistantes

BHR : Bactéries Hautement Résistantes

BUR : Bactéries l'Ultra-Résistance

BPR : Bactéries Pan-Résistance

Liste des annexes

Annexe 01 : les milieux de culture.

Annexe 02 : les tableaux des résultats d'antibiogramme

Annexe 03 : diamètre et la charge des disques.

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Liste des annexes

Résumé

Abstract

المُلخَص

Introduction

Chapitre I : les'antibiotiques

1- Définition.....	01
2- Classification des antibiotiques.....	02
2.1- Les β lactamine.....	03
2.1.1-L'ampicilline.....	04
2.1.2- La pénicilline G.....	05
2.1.2.1-Retarciline.....	05
2.1.3-Biopamox.....	05
2.1.4-Les céphalosporines.....	05
2.1.4.1- Le céfazoline.....	05
2.1.5-les aminosides.....	05
2.1.5.1-Gentamicine.....	06
2.1.6-Les tétracyclines.....	06
2.1.6.1-Vibramycine.....	06
3- Mode d'action.....	06
3.1-Inhibition de la synthèse de la paroi des cellules bactériennes.....	07

3.2-Interaction avec la membrane plasmique.....	07
3.3-Perturbation de la synthèse protéique.....	07
3.4-Inhibition de la transcription et de la réplication de l'ADN.....	07
3.5-Perturbation du métabolisme cellulaire (folates).....	07
4-Efficacité antibiotique temps et concentration-dépendent.....	08
4.1-Activité concentration-dépendent.....	08
4.2-Activité temps-dépendent.....	08
5-Utilisations des antibiotiques.....	08
6-La résistance aux antibiotiques.....	08
6.1-Définition de la résistance.....	09
6.2-La résistance aux antibiotiques un problème de santé publique	09
6.3-Génétique de la résistance	11
6.3.1-Chromosomique.....	11
6.3.2-Extra-chromosomique.....	11
6.4-La nature de la résistance aux antibiotiques.....	12
6.4.1-Résistance non génétique.....	12
6.4.1.1- L'évasion.....	12
6.4.1.2- Arrêt de production de la majeure partie de paroi bactérie.....	12
6.4.1.3- Surproduction ou absence de la cible.....	12
6.4.2-Résistance génétique.....	12
6.4.2.1-La résistance naturelle ou résistance intrinsèque.....	12
6.4.2.2- La résistance acquise.....	13
7- Les principaux mécanismes de la résistance	14
7.1- Mécanisme de la résistance enzymatique.....	15
7.2- Mécanisme de la résistance non enzymatique.....	16
7.2.1- la résistance par imperméabilité.....	16
7.2.2- Mécanisme de résistance par système d'efflux.....	16

7.2.3- Mécanisme de résistance par modification de cible.....	16
8-les souches étudiées.....	18
8.1- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
8.2- <i>Staphylococcus aureus</i>	18
8.3- <i>Bacillus cereus</i>	18
8.4- <i>Enterobacter SP</i>	18

Chapitre II: les mutagenèses

1. Structure de l'ADN.....	19
2- les mutations.....	22
2.1-Caractères de la mutation bactérienne.....	22
3- la mutagenèse.....	23
3.1-Les agents mutagènes.....	23
3.1.1- Les agents chimiques.....	24
3.1.1.1- Les analogues de bases.....	24
3.1.1.2- Agents désaminant ou agents modifiant l'ADN.....	24
3.1.1.3- Agents intercalants.....	24
3.1.1.4- Agents alkylants.....	24
3.1.2- Les agents physiques.....	26
3.1.2.1- Les radiations ionisantes.....	26
3.1.2.2- Les radiations non ionisantes : la lumière ultraviolette.....	26
• Objectifs du travail	

Chapitre III : Matériel et Méthodes

1-Matériel.....	28
1.1-Matériels biologique.....	28
1.1.1-les souches étudiées.....	28

1.2- Milieux de cultures.....	28
1.2.1-Milieux de cultures solides.....	28
1.2.2-Milieux de cultures liquides.....	28
1.3- les Antibiotiques.....	28
1.4-Préparation des disques.....	29
1.5-préparation de milieu d'antibiotique.....	29
2-Méthodes.....	29
2.1- Etudes de la résistance aux antibiotiques.....	29
2.1.1-Antibiogramme.....	29
2.2- Préparation des dilutions décimales.....	30
2.3- Sélection de la résistance.....	31
2.3.1- Antibiogramme.....	32
2.3.2-Ensemencement.....	32
2.3.3-La dépendance a l'antibiotique.....	32

Résultats et Discussion

1-Résultats.....	33
1.1-Antibiogramme.....	33
1.2-Dénombrement des colonies.....	37
1.3-Sélection de la résistance.....	38
1.4-Purification des isolats résistants.....	39
1.5.-Antibiogramme des isolats résistants.....	41
1.6-La dépendance a l'antibiotique.....	43
2-Discussion.....	44

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Isolement des mutants spontanés d'*Enterobacter* sp. Résistants à l'antibiotique cefazoline

Résumé

Le but de ce travail étudie l'antibiogramme des quatre souches différents et sélection de quelques isolats résistants. Les résultats de notre travail ont révélés que la souche *Enterobacter* sp était sensible à tout l'antibiotiques testés, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* étaient résistantes à la retarciline et *pseudomonas aeruginosa* était sensible à l'ampiciline et gentamycine et résistante à Cefazoline, Retarciline, biopamox et vibramycin.

Le taux de la résistance du ces souches aux antibiotiques testés était de 25% à la cefazoline, vebramycine et biopamox et de 75% à la retarciline.

Ensuit la souche *Enterobacter* sp était choisie pour faire une sélection de la résistance a la cefazoline. Résultat obtenu 49 isolats résistants différente taille ont était obtenus et la fréquence de mutation de résistance est calculé ($3.06 \cdot 10^{-7}$). Ensuit l'antibiogramme de quelques isolats résistants représentative a révélé qu'ils sont résistants a tout les antibiotiques testés.

Le taux de la résistance des isolats résistants aux antibiotiques plus élevé (100%).

Mots clés : *Bailluss cereus*, *Enterobacter* sp. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* antibiotique, résistance, sélection de mutants.

Isolation of spontaneous cefazoline-resistant mutants of *Enterobacter sp*

Abstract

The aim of this work is to study the susceptibility of four different strains and to select some resistant isolates. The results revealed that the *Enterobacter sp* strain was sensitive to all antibiotics tested, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* were resistant to retarciline and *Pseudomonas aeruginosa* was sensitive to ampicillin and gentamycin and resistant to cefazoline, Retarciline, Biopamox and Vibramycin .

The resistance rate of these strains to the antibiotics tested was 25% with cefazolin, vebramycin and biopamox and 75% with retarcilin.

Then the *Enterobacter sp* strain was chosen to select resistance to cefazolin. 49 resistant isolates of different size were obtained and the resistance mutation frequency was calculated ($3.06 \cdot 10^{-7}$). Then the antibiogramme of some representative resistant isolates revealed that they are resistant to all antibiotics tested.

The resistance of the resistant isolates of these strains to the antibiotic tested was 100%.

Key words: *Bacillus cereus*, *Enterobacter sp*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, antibiotic, resistance, mutant selection.

عزل بعض الطفرات التلقائية المقاومة للمضاد الحيوي سيفازولين في اليكتيريا *Enterobacter sp*

الملخص

لقد كان الغرض من هذا العمل هو دراسة حساسية أربع سلالات مختلفة للمضادات الحيوية واصطفاء عدد من العزلات المقاومة. كشفت نتائج عملنا أن *Enterobacter sp* كانت حساسة لجميع المضادات الحيوية التي تم اختبارها، أما *Staphylococcus aureus* و *Bacillus cereus* فكانت مقاومة للمضاد retarciline و *Pseudomonas aeruginosa* كانت حساسة للأمبيسلين وجنتاميسين ومقاومة للسيفازولين، Retarciline، vibramycin و biopamox.

كان معدل مقاومة هذه السلالات للمضادات الحيوية المستعملة 25% بالنسبة لـ سيفازولين، و biopamox و 75% بالنسبة لـ retarciline.

تم اختيار السلالة *Enterobacter sp* لاصطفاء مجموعة من العزلات المقاومة للمضاد سيفازولين. وقد تم الحصول على 49 عزلة مقاومة ذات أحجام مختلفة ومنها تم حساب نسبة الطفرة المقاومة (3.06 x 10⁻⁷). بعد ذلك تمت دراسة حساسية مجموعة من هذه العزلات المقاومة للسيفازولين فتبين أنها أصبحت مقاومة لجميع المضادات الحيوية التي تم اختبارها. كان معدل مقاومة هذه العزلات للمضادات الحيوية 100%.

كلمات البحث: *Bacillus cereus* ، *Enterobacter sp* ، *Staphylococcus aureus* ، *Pseudomonas aeruginosa*، المقاومة للمضادات الحيوية، واختيار المقاومة

Introduction

Les antibiotiques sont d'un grand usage en santé humaine et animale ainsi que dans le contrôle des phytopathologies, mais leur efficacité est menacée par la capacité des bactéries, qui sont des organismes très adaptables, à développer une résistance à ces molécules. Par conséquent, la longue période d'utilisation de ces agents antimicrobiens ainsi que leur utilisation abusive ont abouti à la sélection de bactéries qui leur sont résistantes. L'ampleur du problème est sensiblement augmentée par l'aptitude des bactéries à transférer horizontalement les déterminants de la résistance (Levy, 1992). En effet, il a été démontré que l'exposition de bactéries hébergeant un gène de résistance à la tétracycline à de faibles concentrations de cet antibiotique abouti à une augmentation de 10 à 100 fois de la fréquence du transfert de l'élément porteur de ce gène et ceci, tant *in vivo* qu'*in vitro* dans le tube digestif de souris gnotobiotiques (Doucet- Populaire *et al*, 1992). De même, (Scott, 2002). A conclu que le transfert de gènes se produit largement *in vivo* entre les bactéries du tractus gastro- intestinal et entre ces mêmes bactéries et les bactéries pathogènes du tractus gastro- intestinal, comme des gènes de résistance identiques sont présents dans diverses espèces bactériennes à partir de différents hôtes.

Pendant plusieurs décennies, les études sur la sélection et la diffusion de la résistance aux antibiotiques ont porté principalement sur les espèces à intérêt clinique. Toutefois, de nombreux chercheurs ont émis l'hypothèse que les bactéries commensales présentes dans les aliments et dans le tractus gastro-intestinal pourraient servir de réservoirs pour les gènes de résistance aux antibiotiques et pourraient transférer ces gènes à des bactéries opportunistes et pathogènes de l'Homme, ce qui nuit à la réussite de l'antibiothérapie (Perreten *et al*, 1997a ; Mathur *et Singh*, 2005).

Notre étude s'inscrit dans cette optique et l'ensemble des travaux entrepris a été mené avec deux objectifs :

- ✓ Le premier chapitre portera sur les 'antibiotiques et les mécanismes de la résistance
- ✓ Le deuxième chapitre portera sur la définition la mutation et la mutagenèse

La deuxième partie, représente le travail pratique et qui indique les différentes techniques mises en œuvre l'antibiogramme de quatre souches et sélection de la résistance

d'Enterobacter SP. Les résultats obtenus avec ces différentes méthodes sont comparés et discutés dans la troisième partie. Enfin la dernière partie concernera la conclusion finale.

Les antibiotiques

1- Définition

Au sens strict, les antibiotiques sont des agents antibactériens naturels d'origine biologique; ils sont élaborés par des micro-organismes, champignons et diverses bactéries. Cependant quelques uns sont maintenant produits par synthèse, et beaucoup parmi les produits employés actuellement, sont des dérivés semi-synthétiques préparés par modification de produits de base naturels. D'autres médicaments antibactériens, tels les sulfamides, les quinolones ou les furanes sont des substances chimiques de synthèse mais leurs propriétés ne les distinguent pas des antibiotiques ; ce sont, d'un point de vue pratique, des antibiotiques à part entière, ce qui justifie leur étude conjointe.

Leurs propriétés communes sont les suivantes : les antibiotiques, bien que souvent non dépourvus d'effets secondaires pour les cellules eucaryotes, se distinguent essentiellement par leur toxicité sélectivement dirigée contre les bactéries. Ceci permet, pour la plupart d'entre eux, de les administrer par voie générale et fait d'eux les médicaments des infections systémiques. Cette toxicité sélective est directement liée à leur mécanisme d'action : la plupart des antibiotiques agissent par inhibition spécifique d'une étape précise de certaines chaînes métaboliques chez les bactéries qui constituent leur site d'action, ou cible moléculaire.

Les réactions inhibées sont essentiellement des réactions de synthèse : synthèse protéique, synthèse du peptidoglycane, des acides nucléiques, des folates.

L'effet antibactérien des antibiotiques s'exerce à de faibles concentrations, ce qui contribue aussi à leur tolérance par l'organisme, de l'ordre du mg par litre et parfois beaucoup moins ; il est relativement lent, demandant souvent quelques heures ; il peut être bactériostatique ou bactéricide selon la concentration et le temps de contact. **(Duval, 1989)**

Un antibiotique est donc une substance naturelle, semi-synthétique ou synthétique, douée d'une activité antibactérienne à l'échelon moléculaire, s'exerçant au niveau d'une ou de plusieurs étapes métaboliques ou d'un équilibre physicochimique **(Figure1)**. **(Meyer, et al, 1991)**.

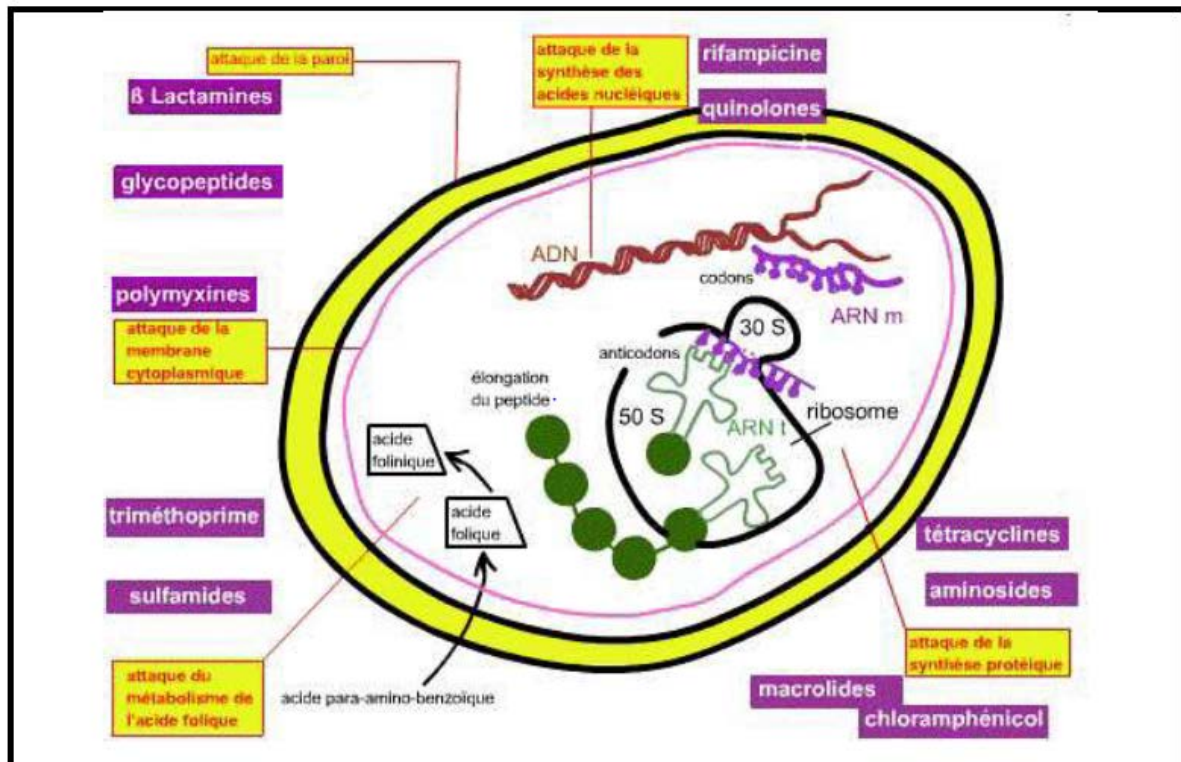


Figure 1 : Différents modes d'action des antibiotiques (Lavigne, 2007).

2- Classification des antibiotiques

La classification des antibiotiques repose sur leur structure chimique et leurs mécanismes d'action, lesquels conditionnent leur spectre d'activité.

1) Mode d'action : Les antibiotiques peuvent agir sur : la paroi, la membrane cytoplasmique, la synthèse des acides nucléiques et la synthèse des protéines.

2) Spectre d'activité : (spectre étroit ou large)

3) Origine: élaboré par un organisme naturel ou produit par synthèse

4) Nature chimique : très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex : cycle ²-lactamase) (Yala *et al*, 2001).

2.1- Les β -lactamines

Les β -lactamines constituent la famille d'antibiotique la plus vaste et la plus importante, aussi bien par le nombre que par la diversité des molécules utilisables par leurs indications en thérapeutique et en prophylaxie des infections bactériennes. Cette famille comprend un grand nombre de molécules, toutes caractérisées par une structure de base : le noyau de base est le cycle β -lactame (**Figure 2**). Les antibiotiques de cette famille sont bactéricides (**Cavallo *et al*, 2004**).

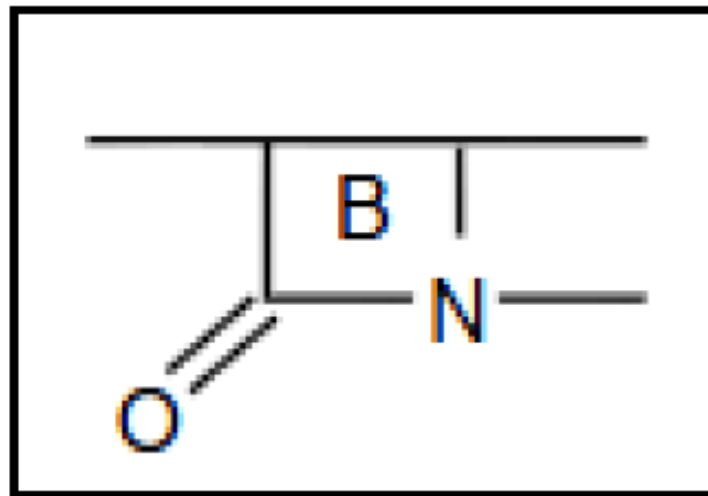


Figure 2 : Cycle β -lactame (**Cavallo *et al*, 2004**).

Le β -lactame partagent une structure commune qui comprend de façon constante un cycle β -lactame et, pour la plupart d'entre elles, un second cycle (**Figure 3**). Ainsi, en fonction des cycles et des chaînes latérales associées, on distingue (**Chaabane *et al*, 2009**) :

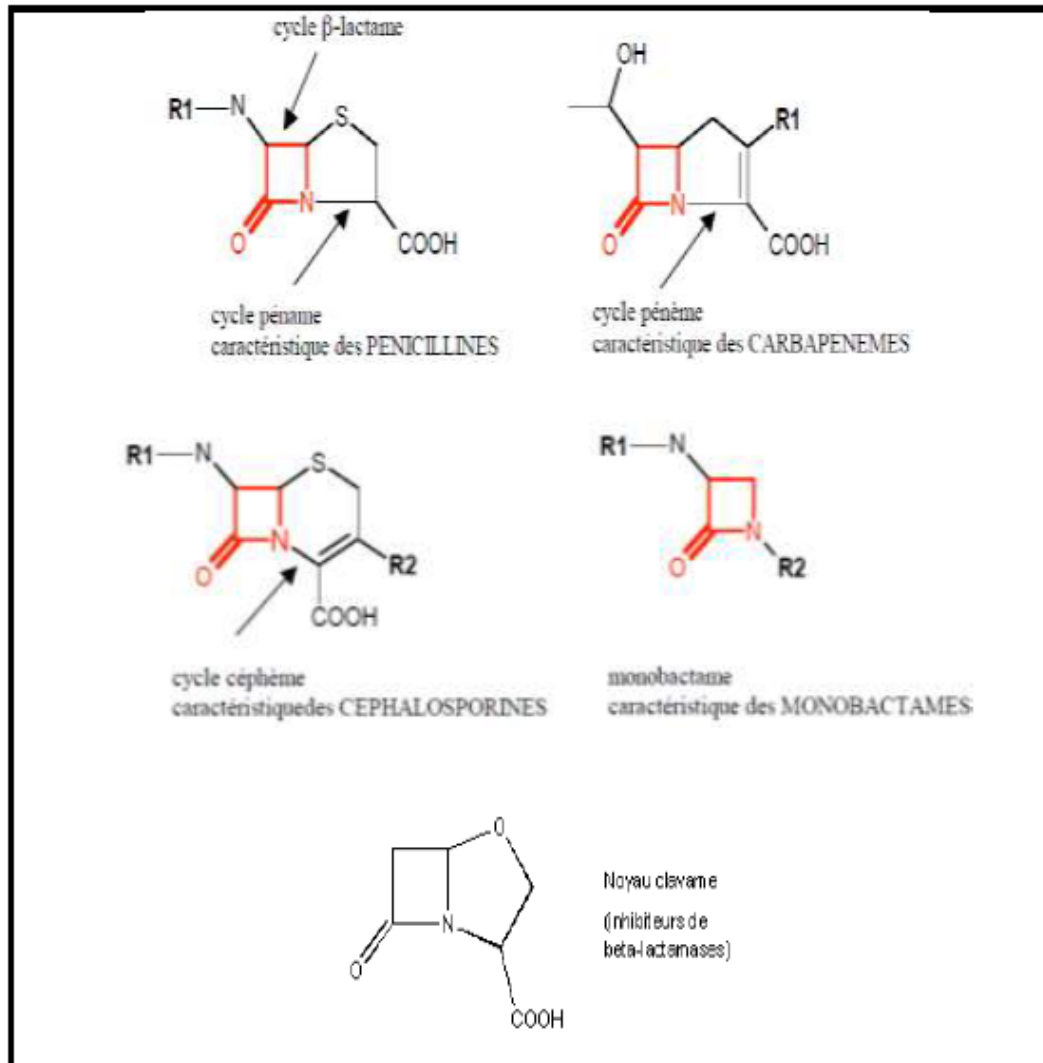


Figure 3 : Structures simplifiées des diverses β -lactamines (Charlier *et al*, 1998).

2.1.1-L'ampicilline

L'ampicilline est un antibiotique du type bêta-lactame: un médicament qui tue les bactéries. La substance active ampicilline assure que la bactérie ne peut plus construire une paroi cellulaire. En conséquence, les bactéries ne peuvent plus se reproduire. L'inflammation dans l'organisme qui sont provoquées par des bactéries, peuvent de cette façon être traitée. L'ampicilline est déjà utilisée depuis 1961 pour traiter les infections bactériennes.

2.1.2- La pénicilline G

la pénicilline G est utilisée dans le traitement des infections plus graves que celles pouvant être soignées par voie orale : septicémies, gangrène gazeuse, infections dues aux germes sensibles, qu'il s'agisse de manifestations respiratoires, stomatiques, cutanées, rénales, gynécologiques, digestives ou méningées.

2.1.2.1-Retarciline

La retarciline (benzathine, benzylpénicilline) est un antibiotique de la famille des bêtalactamines du groupe des pénicillines de type G. La retarciline injectable assure une pénicillinémie efficace et très prolongée après une administration unique.

2.1.3- Biopamox

Biopamox est un antibiotique antibactérien de la famille des bêtalactamines du groupe des amino-pénicillines

2.1.4-Les céphalosporines

Les céphalosporines : constituées d'un noyau β -lactame associé à un noyau dihydrothiazine (Yala *et al*, 2001).

2.1.4.1- Le céfazoline

C'est un antibiotique de la famille des bêta -lactamines du groupe des céphalosporines de 1^{re} génération.

2.1.5-Les aminosides

Sont des antibiotiques bactéricides de la famille des amino-glycosides, ils comprennent la kanamycine, l'amikacine, la gentamycine, la nétilmycine, la tobramycine (Bryskier, 1999). Ce sont des hétérosides naturels formés par un ou plusieurs glycosides liés à un aminocyclitol (Yala *et al*, 2001).

2.1.5.1-Gentamicine

La Gentalline est un antibiotique bactéricide de la famille des aminoglycosides ou aminosides (dont le chef de file est la streptomycine, apparue en 1944). Le principe actif est un complexe formé d'oligosaccharides, dont le noyau est la désoxystreptamine, obtenu par fermentation d'actinomycètes monosporés du genre *Micromonospora*. La gentamicine est un mélange formé de trois composants ayant sensiblement la même activité. L'activité bactéricide des aminosides repose sur l'inhibition de la synthèse des protéines bactériennes par liaison aux ribosomes. Les aminosides ont la particularité d'exercer un effet postantibiotique qui se traduit par une persistance de l'inhibition de la synthèse protéique de manière transitoire (plusieurs heures) après la disparition de l'antibiotique.

2.1.6-Les tétracyclines

Les principaux produits sont : la tétracycline, l'oxytétracycline, la déméthylchlorotétracycline, la rolitétracycline, la métacycline, la doxycycline et la minocycline. Les tétracyclines sont des antibiotiques à large spectre, seulement bactériostatiques. Leur activité s'étend aux rickettsies, chlamydiales et mycoplasmes.

2.1.6.1-Vibramycine

C'est un antibiotique de la famille des tétracyclines. Les médicaments agissent contre toutes sortes d'infections bactériennes. La substance active vibraysien freine la production de protéines dans la bactérie. Les bactéries ne se multiplient plus et meurent. Les symptômes de l'infection bactérienne – fièvre, douleurs – disparaissent ainsi après quelques jours.

3- Mode d'action des antibiotiques

Action sur la paroi bactérienne (peptidoglycane) ;

Action sur la structure de la membrane cytoplasmique bactérienne ;

Action sur la synthèse protéique bactérienne ;

Action sur la synthèse de l'ADN de la bactérie ;

Action sur la synthèse des folates (Yala *et al*, 2001).

3.1-Inhibition de la synthèse de la paroi des cellules bactériennes

Cette action aboutit finalement à la lyse (éclatement) de ces cellules exemple: Les Pénicilline, les Céphalosporines. Comme les cellules animales ne possèdent pas de paroi ces substances n'exercent aucune action sur elles.

3.2-Interaction avec la membrane plasmique

Ces substances interagissent avec la membrane plasmique des cellules bactériennes en modifiant leur perméabilité, ceci entraîne des conséquences fatales pour ces cellules exemple de ces substances : les Polymexines, Tyrothricines.

3.3-Perturbation de la synthèse protéique

Le fait d'entraver la synthèse protéique dans une bactérie signifie que les enzymes indispensables à la survie de cette cellule ne peuvent plus être fabriqués, exemple de ces substances ayant ce type d'action antibactérienne : Rifampicine, Tétracycline, Chloramphénicol.

3.4-Inhibition de la transcription et de la réplication de l'ADN

Le dérèglement du fonctionnement de l'ADN empêche la cellule de se diviser Et/ou la synthèse des indispensables enzymes, exemple de ces substances : Acide nalidixique, Proflavine.

3.5-Perturbation du métabolisme cellulaire (folates)

Ces composés inhibent le métabolisme du microorganisme ciblé mais pas celui de l'hôte, pour ce faire il bloque une réaction enzymatique catalysée qui doit se réaliser dans la cellule bactérienne mais non dans la cellule animale, exemple : les Sulfamides.

4-Efficacité antibiotique temps et concentration-dépendent

4.1-Activité concentration-dépendent

L'activité de l'antibiotique est dépendante de la concentration maximale obtenue après administration de l'antibiotique et du rapport entre cette concentration maximale et la CMI de la bactérie. ex : aminosides et fluoroquinolones sur les bactéries à Gram négatif

4.2-Activité temps-dépendent

L'activité de l'antibiotique est dépendante du temps passé avec une concentration supérieure à la CMI de la bactérie

-ex : pénicilline, céphalosporine, glucopeptides et fluoroquinolones (sur les staphylocoques)

5-Utilisations des antibiotiques

Les antibiotiques agissent sur les bactéries ; quelques virus, des champignons, et même sur certaines cellules cancéreuses (**Tammo, 1995**). L'usage extensif des antibiotiques est la cause majeure d'apparition des résistances. Au départ sont des molécules naturelles, cependant, des modifications chimiques sont souvent apportées pour améliorer l'activité et/ou modifier des paramètres pharmacocinétiques essentiels (**Righetti, 2007**). Aujourd'hui, la plupart des antibiotiques en usage clinique sont donc obtenus par semi-synthèse. Récemment, les progrès de la chimie ont permis de réaliser dans des conditions économiques satisfaisantes la synthèse totale de plusieurs d'entre eux. Une nouvelle famille d'antibiotiques dérivés de l'érythromycine telle que l'azithromycine et la josamycine ont été récemment développées dans le but d'améliorer le spectre antimicrobien et de chercher des nouveaux antibiotiques non familiers avec les bactéries usuelles pour éviter le phénomène qui a pris de l'ampleur récemment qui est la résistance des bactéries aux antibiotiques, l'azithromycine (*zithromax*) est parmi les antibiotiques issus de la synthèse totale et il a été considéré comme le plus efficace actuellement. (**Righetti, 2007**).

6-La résistance aux antibiotiques

Pour chaque antibiotique est défini un spectre d'activité c'est-à-dire l'éventail des espèces bactériennes "sensibles", susceptibles d'être inhibées par des concentrations de cet

antibiotique (surtout *in vivo* après utilisation d'une posologie standard). Par contre une espèce non sensible, qui n'entre pas dans le spectre d'activité d'un antibiotique, est dite résistante. Cette résistance est liée à un ou plusieurs mécanismes biochimiques, qui impliquent l'étude des interactions entre l'antibiotique et les voies métaboliques de la bactérie (**Duval et al, 1990**).

6.1-Définition de la résistance

Une souche est dite "résistante" lorsqu'elle supporte une concentration d'antibiotique, notamment plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce (**Faure, 2009**). Un micro-organisme est considéré « résistant » lorsque sa concentration minimale inhibitrice (CMI) est plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce (**Carie, 2009**).

6.2-La résistance aux antibiotiques un problème de santé publique

Les antibiorésistances ont été identifiées dès les années 1940 (**Randall et al, 2003**), mais comme de nouveaux antibiotiques étaient alors régulièrement découverts, à un rythme soutenu, l'antibiorésistance n'a pas, dans ce premier temps, attiré l'attention du public ou de l'industrie pharmaceutique. Le tableau suivant indique les dates d'introduction des grandes familles d'antibiotiques dans l'arsenal thérapeutique et les dates d'apparition des premières résistances sur des souches cliniques (**Palumbi, 2001**).

Tableau 01 : les dates d'introduction des grandes familles d'antibiotiques et les dates d'apparition des premières résistances.

Antibiotique	Année d'introduction	Apparition des premières résistances
Sulfamides	1936	1940
Pénicilline G	1943	1946
Streptomycine	1943	1959
Chloramphénicol	1947	1959
Tétracycline	1948	1953
Erythromycine	1952	1988
Ampicilline	1961	1973
Ciprofloxacine	1987	2006

La résistance aux antibiotiques atteint désormais des niveaux dangereusement élevés dans toutes les régions du monde. De nouveaux mécanismes de résistance apparaissent et se propagent dans le monde entier, compromettant notre capacité à traiter les maladies infectieuses courantes. Pour un nombre croissant d'infections, comme la pneumonie, la tuberculose, la septicémie et la gonorrhée, le traitement devient plus difficile, voire impossible parfois, du fait de la perte d'efficacité des antibiotiques (OMS, 2016).

Dans les pays où ils sont délivrés sans ordonnance pour l'homme ou l'animal, le problème de l'émergence et de la propagation des résistances est encore pire. De même, dans les pays dépourvus de guides thérapeutiques normalisés, les antibiotiques sont prescrits de manière excessive par les agents de santé et les vétérinaires et surconsommés

par le grand public. Si nous ne prenons pas des mesures d'urgence, nous entrerons bientôt dans une ère post antibiotique dans laquelle des infections courantes et de petites blessures seront à nouveau mortelles (OMS, 2016).

6.3-Génétique de la résistance

Pour la majorité des cas la résistance à un antibiotique est causée par une mutation dans un gène qui peut être :

6.3.1-Chromosomique : liée à une mutation sur le chromosome de la bactérie

- ne s'exerce que vis –à-vis d'un seul antibiotique ;
- en générale non transférable d'une espèce bactérienne à l'autre ;
- Concerne sur toutes les quinolones, les rifamycines, l'acide fusidique avec un taux de mutation élevé.

6.3.2-Extra-chromosomique : liée à une mutation d'un gène situé sur un élément génétique non chromosomique. Elle est :

- plus fréquent ;
- plus souvent plasmidique ;
- Pouvant porter plusieurs résistances à la fois ;
- Transmissible entre différentes bactéries de la même espèce, voire entre espèces différentes.

Les mutations adaptatives peuvent être spécifiques aux espèces. Par exemple, la cible directe des fluoroquinolones en gram-négatifs, y compris *Escherichia coli*, est l'ADN gyrase, tandis que dans les Gram positifs tels que *Staphylococcus aureus*, c'est la topoisomérase IV, ce qui peut expliquer pourquoi les mutations chez le gyrA telles que le S83L chez *E. coli* peuvent augmenter le MIC Aux fluoroquinolones tandis que la mutation équivalente dans gyrA à *S. aureus* n'a pas nécessairement un effet sur le MIC (Haenni et Moreillon 2007). En outre, certaines mutations de gyrA sont associées à un coût de remise en forme chez *E. coli* (Marcusson et al, 2009), alors qu'un effet de condition physique positif peut être observé chez *Campylobacter jejuni* et *Salmonella enterica* (Baker et al, 2013). Ces phénotypes contrastés suggèrent que la manière dont une bactérie subit un stress induit par les antibiotiques peut différer en fonction du contexte génomique et du réseau génomique sous-jacent. Bien que des informations détaillées sur ces facteurs puissent aider à concevoir de nouvelles stratégies antimicrobiennes, l'importance du fond génomique et dans quelle mesure la sensibilité et la résistance aux antibiotiques dépendent de l'architecture du réseau n'est actuellement pas claire.

6.4-La nature de la résistance aux antibiotiques

Il existe plusieurs niveaux de résistance aux antibiotiques : résistance naturelle (systématique), résistance habituelle ou courante, multirésistance (BMR : bactéries multirésistantes aux antibiotiques, porteuses de plusieurs gènes de résistance pour différents antibiotiques), haute résistance (BHR : bactéries hautement résistantes), l'ultra-résistance (BUR) et pan-résistance ou toto-résistance (BPR ou BTR).

6.4.1-Résistance non génétique

Elle n'est pas transmissible que ce soit verticalement ou horizontalement. Elle est souvent une conséquence du milieu ou d'un changement brusque dans le métabolisme d'une bactérie. (Tremblay, 2007).

6.4.1.1- L'évasion

Se produit lorsque la bactérie infectante est placée hors d'atteinte de l'antibiotique à cause d'une mauvaise distribution de ce dernier dans l'organisme. (Tremblay 2007).

6.4.1.2- Arrêt de production de la majeure partie de paroi bactérienne

Cela rend la bactérie insensible aux agents antimicrobiens qui agissent sur le système de la paroi (Tremblay 2007).

6.4.1.3- Surproduction ou absence de la cible

Dans l'éventualité où la résistance peut être obtenue par modification du ratio molaire entre la cible et l'antibiotique, une bactérie qui peut moduler les régulateurs d'expression de la cible et surproduire celle-ci aura un avantage. (Tremblay 2007).

6.4.2-Résistance génétique

6.4.2.1-La résistance naturelle ou résistance intrinsèque

C'est une insensibilité aux antibiotiques, existant naturellement chez tous les membres d'un genre ou d'une espèce bactérienne (Yala *et al*, 2001) et délimite le spectre d'activité de

l'antibiotique. Elle est liée aux caractéristiques physiologiques de l'espèce ou à la présence constitutive d'un gène de structure (**Croizé, 2012**).

La résistance naturelle se traduit par des CMI supérieures à la valeur critique basse de concentration (C) de l'antibiotique concerné (**Euzéby, 2006**). Elle peut être due à la présence d'un gène chromosomique commun à toutes les bactéries de l'espèce (**Faure, 2009**).

6.4.2.2- La résistance acquise

La résistance bactérienne acquise n'apparaît que chez quelques souches d'une espèce donnée normalement sensible. Elle résulte de l'emploi thérapeutique des antibiotiques et elle est due soit à une mutation chromosomique, soit à l'acquisition d'un (ou de plusieurs) gène qui rend la bactérie insensible à l'antibiotique (**Duval et Soussy, 1990**). La résistance se fait soit par :

-**Les résistances mutationnelles** sont chromosomiques, spontanées, rares (fréquence de 10^{-8} à 10^{-9}), stables et transmissibles uniquement de façon verticale. L'antibiotique n'est pas l'agent mutagène, il sélectionne seulement les mutants devenus résistants. Elles n'intéressent qu'un antibiotique ou qu'une famille d'antibiotique à la fois (**Faure, 2009**).

- **Les résistances par acquisition d'ADN** sont la conséquence d'un transfert horizontal compris entre espèces éloignées phylogénétiquement. Les gènes de résistance aux antibiotiques, pour la plupart chromosomiques, proviennent généralement de microorganismes producteurs d'antibiotiques pour lesquels ils sont immunisés. Le transfert de ces gènes sera rendu plus efficace après leur intégration sur des éléments mobiles tels que les plasmides, les transposons, les intégrons ou encore sur des phages (**Guerout et al, 2001**). Ces mécanismes de résistance peuvent alors diffuser très rapidement dans une population (**Figure 4**) (**Christensen et al, 1999**).

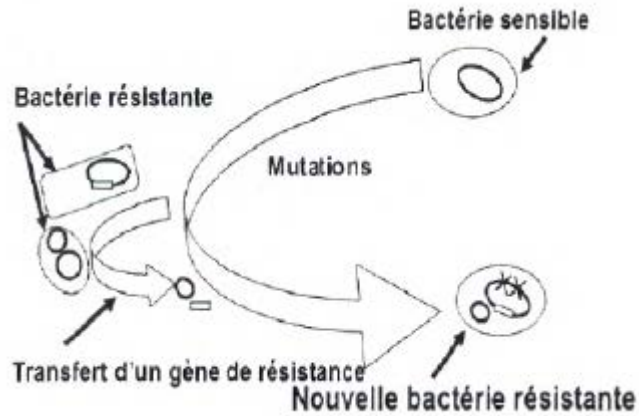


Figure 04: Emergence d'une résistance acquise aux agents antimicrobiens (Carle, 2010).

7- Les principaux mécanismes de la résistance

Il existe quatre mécanismes principaux par lesquels les micro-organismes développent de la résistance (**tableau 02**),

*L'inactivation enzymatique.

*La modification du site d'action

*La diminution de la perméabilité membranaire des bactéries à gram négatif.

*L'augmentation de l'efflux (**Label et Soussy, 2007**).

Ces mécanismes peuvent être classés en mécanisme enzymatique et mécanisme non enzymatique

Tableau 02 : Les différents mécanismes de la résistance aux antibiotiques (Carle, 2010).

Mécanisme de résistance	Conséquence
L'inhibition enzymatique	Production d'une enzyme qui inactive ou détruit l'antibiotique : Mécanisme de résistance le plus répandu.
Réduction de la perméabilité cellulaire	Changement de perméabilité de la paroi ou de la membrane bactérienne empêchant le médicament d'atteindre sa cible.
Altération des sites de liaison ciblés par l'antibiotique	Baisse de l'affinité de l'antibiotique pour son site d'action.
Pompes à efflux	Antibiotique éjecté de la cellule par transport actif et site d'action devenant inaccessible

7.1- Mécanisme de la résistance enzymatique

La bactérie produit une enzyme qui inactive ou détruit l'antibiotique c'est le mécanisme le plus répandu (Carie, 2009), Il existe une variété d'enzyme B-lactamase capables d'hydrolyser le cycle B-lactamase des B-lactamines, classées selon leur séquences d'acides aminées en 4 groupes (A, B, C et D) c'est classification d'Ambler (Mérens *et al*, 2011). Ainsi les enzymes des classes A, C et D possèdent une sérine au niveau de leur site actif tandis que les enzymes appartenant à la classe B requièrent un cation divalent, en général le zinc comme cofacteur, d'où leur nom de métallo-enzyme. (Mérens *et al*, 2011).

7.2- Mécanisme de la résistance non enzymatique

7.2.1- la résistance par imperméabilité

Ce mécanisme est utilisé par les bactéries pour empêcher l'antibiotique de pénétrer dans la cellule. (Tremblay 2007). Chez *Pseudomonas aeruginosa*, la diminution de l'expression de la porine OprD ou D2 ou son altération est responsable de la résistance à l'imipénème (Tremblay, 2007). Ainsi, la membrane externe en limitant la vitesse de pénétration intracellulaire des antibiotiques favorise l'action d'enzymes hydrolytiques ou modificatrices ou de systèmes d'efflux (Mérens *et al*, 2011). Cette bactérie résiste aux carbapénèmes en présence de zinc, cadmium ou de cobalt: elle enclenche un interrupteur qui permet d'activer l'expression d'un système d'efflux expulsant les métaux hors de la bactérie et ferme en même temps la porine OprD. (Perron *et al*, 2009).

7.2.2- La résistance par le système d'efflux

La bactérie peut utiliser une pompe spécifique pour sortir l'antibiotique de la cellule. *Pseudomonas aeruginosa* est capable de produire pas moins de douze systèmes d'efflux actifs différents appartenant à la famille RND (resistance nodulation cell division) mais seulement 2 systèmes appelés Mex (multiple efflux) contribuent à la résistance naturelle aux antibiotiques (Mérens *et al*, 2011). Ainsi, la pompe dénommée MexAB-OprM est responsable en grande partie de la résistance naturelle de cette bactérie aux aminosides, fluoroquinolones et tétracyclines. (Mérens *et al*, 2011). Il est important de mentionner que ces systèmes d'efflux fonctionnent grâce à l'énergie de la membrane cytoplasmique. (Mérens *et al*, 2011).

7.2.3- La résistance par modification de cible

Ce type de résistance se produit lorsqu'une bactérie contourne le mode d'action de l'antibiotique. Elle peut alors posséder une version modifiée de la cible d'un antibiotique, ou acquérir une voie métabolique complète pour contourner l'effet de l'antibiotique. (Tremblay, 2007).

8 Les souches utilisées dans ce travail

8.1-*Pseudomonas aeruginosa*

Elle a été isolée pour la première fois en 1882 par Gessard (**Avril, 2000**).

- bacille fin, Gram négatif, rarement immobile, non sporulé.
- bactérie chimio-organotrophe avec un métabolisme strictement respiratoire, elle est caractérisée par la pluralité des substrats hydrocarbonés utilisés comme source de carbone et d'énergie.
- Contenue en G+C compris entre 58-70 %. (**Avril, 1992 ; Pilet, 1987**)

Ces bactéries largement répandues dans l'environnement vivent en saprophytes dans le sol et l'eau. Elles se retrouvent sur les plantes et les denrées alimentaires entraînant parfois leur altération. Elles peuvent se rencontrer chez l'homme et l'animal au niveau des flores commensales. Certaines jouent un rôle pathogène chez l'homme, animaux et plantes (**Brossard, 1997 ; Prescott, 1995**)

-Classification : (Larpent, 2000 ; Leclerc, 1977)

Famille : *Pseudomonadaceae*

Genre: *Pseudomonas*

Espèce: *aeruginosa*

8.2- *Staphylococcus aureus*

Les *staphylocoques* ont été découverts dans un pus par Pasteur en 1880. 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, 2000**).

Il s'agit de germes très répandus dans la nature (air, eau, sol). Les *staphylocoques*, en particulier les espèces *S. aureus* et *S. Epidermidis*, font partie de la flore normale de nombreux individus qui sont des «porteurs asymptomatiques ». Cependant ces souches peuvent être à l'origine d'auto- infections ou contaminer d'autres individus. On peut estimer que 20 à 75% des sujets sont porteurs de *S.aureus*: porteurs persistants, porteurs occasionnels, ou transitoires à l'opposé, certains individus sont « non porteurs» (**Avril et al, 2000**).

- *Staphylococcus aureus* est retrouvé chez 20 à 30% des individus au niveau des fosses nasales et/ou de la gorge, il est également présent en faible quantité dans le tube digestif. A partir du rhinopharynx, la bactérie est disséminée sur la peau (en particulier les mains et le visage) et dans le milieu extérieur.

Classification

Famille : *Staphylococcaceae*

Genre: *Staphylococcus*

Espèce: *aureus*

8.3-*Bacillus cereus*

Bacillus cereus is a large, 1 x 3-4 μm , Gram-positive, rod-shaped, endospore forming, facultative aerobic bacterium (Vilain et al, 2006). It was first successfully isolated in 1969 from a case of fatal pneumonia in a male patient and was cultured from the blood and pleural fluid. 16s rRNA comparison reveals *Bacillus cereus* to be most related to *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*, (DeVecchio et al, 2005).

Classification

Famille : *Bacillaceae*

Genre: *Bacillus*

Espèce: *cereus*

8.4-*Enterobacter SP*

Enterobacter est un genre de bactérie appartenant à la classe des *Gammaproteobacteria* et à la famille des *Enterobacteriaceae*. Il s'agit d'un bacille à coloration de Gram négatif, chimio-hétérotrophe. L'habitat est l'intestin de l'Homme et des animaux, *Enterobacter* est aussi trouvé dans les selles, les eaux d'égouts, le sol, les produits laitiers. Certaines souches du genre *Enterobacter* peuvent être responsables d'infections nosocomiales.

1. Structure de l'ADN

L'acide désoxyribonucléique, ou ADN, est une macromolécule biologique présente dans toutes les cellules ainsi que chez de nombreux virus. L'ADN contient toute l'information génétique, appelée génome, permettant le développement, le fonctionnement et la reproduction des êtres vivants. C'est un acide nucléique, au même titre que l'acide ribonucléique (ARN). Les acides nucléiques sont, avec les peptides et les glucides, l'une des trois grandes familles de biopolymères essentiels à toutes les formes de vie connues.

Les molécules d'ADN des cellules vivantes sont formées de deux brins antiparallèles enroulés l'un autour de l'autre pour former une double hélice (**Watson et Crick, 1953**). On dit que l'ADN est bicaténaire, ou double brin. Chacun de ces brins est un polymère appelé polynucléotide. Chaque monomère qui le constitue est un nucléotide, lequel est formé d'une base nucléique, ou base azotée, adénine (A), cytosine (C), guanine (G) ou thymine (T), liée à un ose (le désoxyribose) et lui-même lié à un groupe phosphate (**Figure05**). Les nucléotides polymérisés sont unis les uns aux autres par des liaisons covalentes entre le désoxyribose d'un nucléotide et le groupe phosphate du nucléotide suivant, formant ainsi une chaîne où alternent oses et phosphates, avec des bases nucléiques liées chacune à un ose. L'ordre dans lequel se succèdent les nucléotides le long d'un brin d'ADN constitue la séquence de ce brin. C'est cette séquence qui porte l'information génétique. Celle-ci est structurée en gènes, qui sont exprimés à travers la transcription en ARN. Ces ARN peuvent être non codants — ARN de transfert et ARN ribosomique notamment — ou bien codants : il s'agit dans ce cas d'ARN messagers, qui sont traduits en protéines par des ribosomes. La succession des bases nucléiques sur l'ADN détermine la succession des acides aminés qui constituent les protéines issues de ces gènes. La correspondance entre bases nucléiques et acides aminés est le code génétique. L'ensemble des gènes d'un organisme constitue son génome.

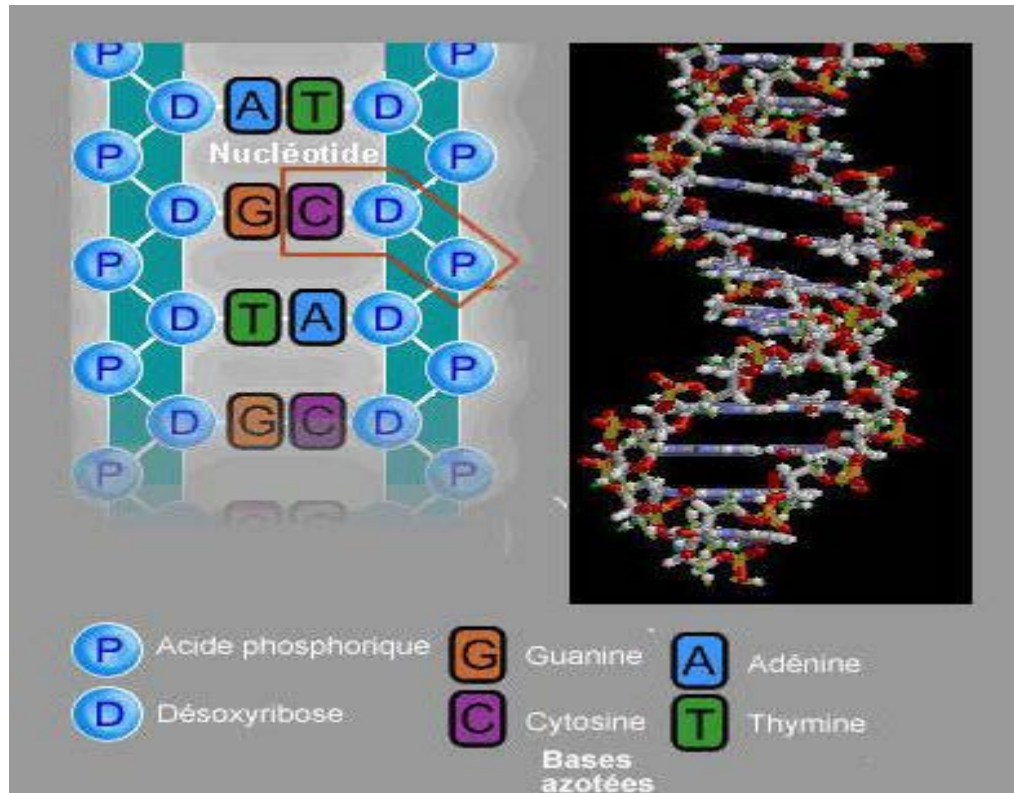


Figure 05 : structure chimique de l'ADN

(<http://www.geneticengineering.org/chemis/Chemis-NucleicAcid/ADN.htm>)

Les bases nucléiques d'un brin d'ADN peuvent interagir avec les bases nucléiques d'un autre brin d'ADN à travers des liaisons hydrogène, qui déterminent des règles d'appariement entre paires de bases : l'adénine et la thymine s'apparient au moyen de deux liaisons hydrogène, tandis que la guanine et la cytosine s'apparient au moyen de trois liaisons hydrogène (**Figure7**), les bases azotées adénine et guanine appartiennent au groupe de purines alors que les bases thymine et cytosine appartiennent au groupe des pyrimidines. Normalement, l'adénine et la cytosine ne s'apparient pas, tout comme la guanine et la thymine. Lorsque les séquences des deux brins sont complémentaires, ces brins peuvent s'apparier en formant une structure bicaténaire hélicoïdale caractéristique qu'on appelle double hélice d'ADN. Cette double hélice est bien adaptée au stockage de l'information génétique : la chaîne oses-phosphates est résistante aux réactions de clivage ; de plus, l'information est dupliquée sur les deux brins de la double hélice, ce qui permet de réparer un brin endommagé à partir de l'autre brin resté intact ; enfin, cette information peut être copiée à travers un mécanisme appelé réplication de l'ADN au cours duquel une double hélice d'ADN est recopiée fidèlement

en une autre double hélice portant la même information. C'est en particulier ce qu'il se passe lors de la division cellulaire : chaque molécule d'ADN de la cellule mère est répliquée en deux molécules d'ADN, chacune des deux cellules filles recevant ainsi un jeu complet de molécules d'ADN, chaque jeu étant identique à l'autre.

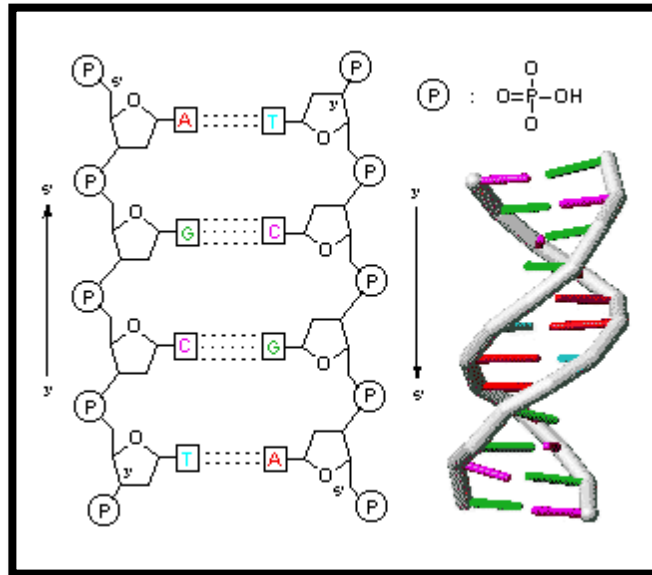


Figure 06 : l'Adénine associée à la Thyminine et la Guanine associée à la Cytosine.

(<http://www.geneticengineering.org/chemis/Chemis-NucleicAcid/ADN.htm>).

Dans les cellules, l'ADN est organisé en structures appelées chromosomes. Ces chromosomes ont pour fonction de rendre l'ADN plus compact à l'aide de protéines, notamment d'histones, qui forment, avec les acides nucléiques, une substance appelée chromatine. Les chromosomes participent également à la régulation de l'expression génétique en déterminant quels parts de l'ADN doivent être transcrites en ARN.

Chez les eucaryotes (animaux, plantes, champignons et protistes), l'ADN est essentiellement contenu dans le noyau des cellules, avec une fraction d'ADN présent également dans les mitochondries ainsi que, chez les plantes, dans les chloroplastes. Chez les procaryotes (bactéries et archées), l'ADN est contenu dans le cytoplasme. Chez les virus qui contiennent de l'ADN, celui-ci est stocké dans la capsid. Quel que soit l'organisme considéré, l'ADN est transmis au cours de la reproduction : il joue le rôle de

support de l'hérédité. La modification de la séquence des bases d'un gène peut conduire à une mutation génétique, laquelle peut, selon les cas, être sans conséquence pour l'organisme ou, au contraire, être incompatible avec sa survie. À titre d'exemple, la modification d'une seule base d'un seul gène, celui de la β -globine, une sous-unité protéique de l'hémoglobine A du génotype humain est responsable de la drépanocytose, une maladie génétique parmi les plus répandues dans le monde.

2- les mutations

La mutation est une modification héréditaire du matériel génétique d'un individu en absence de confrontation avec un matériel génétique étranger (**Guiraud, 1993**). Cette altération peut être induite par divers agents chimiques et physiques sur l'ADN et peut être due à des erreurs rares dans la réplication de l'ADN (**Winter, 2000**).

La position de la mutation sur les gènes est importante. Le changement se traduit par une variation phénotypique de la cellule, mais qui peut être inaperçue, si elle survient sur une partie non codante du génome (**Nicklin, 2000**).

On distingue : la mutation ponctuelle, la plus fréquente. Il s'agit de la plus simple mutation correspondant à la substitution d'un nucléotide par un autre, mettant en jeu l'altération d'une unique base, ce qui modifie un codon de telle sorte que l'acide aminé soit aussi modifié. Cette mutation est dite faux sens. Alors que, si le nouveau codon code pour un codon stop, la mutation est dite non sens (**Winter, 2000**).

La délétion, l'insertion, la duplication ou la translocation, concernent des modifications portant sur des chromosomes entiers par modification de leur nombre ou de leurs structures.

2.1- Caractères de la mutation bactérienne

Une mutation naturelle est un phénomène rare (**Guiraud, 1993**). Il n'affecte qu'une faible fraction de l'ensemble des cellules bactériennes d'une large population (10^{-6} à 10^{-9} par génération). La mutation est mesurable par le taux de mutations qui est la probabilité pour une bactérie de muter pendant une unité de temps défini souvent par le temps de génération (**Dupont, 2001**).

La mutation naturelle est spontanée, ne dépend pas des conditions du milieu, la présence par exemple d'un antibiotique dans le milieu ne favorise pas l'apparition des formes résistantes à tel antibiotique. La mutation n'affecte habituellement qu'un seul caractère en respectant les autres.

La mutation d'un caractère donné ne modifie pas la probabilité de mutation d'un autre caractère. La probabilité pour une bactérie de subir simultanément deux mutations distinctes est le produit des probabilités individuelles de ces deux mutations, ce qui indique que le caractère mutation est indépendant (**Guiraud, 1993**).

Les modifications apportées par la mutation sont rendues permanentes par la réplication de l'ADN et elles sont transmises aux cellules filles à l'issue de la division cellulaire. Le caractère acquis est alors transmissible à la descendance, la mutation est donc héréditaire (**Winter, 2000**).

3- la mutagenèse

L'utilisation d'agents mutagènes est une méthode classique et efficace pour générer une panoplie de mutants. Afin de mener à l'isolement d'une souche mutante désirée, le traitement mutagène doit induire des mutations qui seront exprimées, c'est-à-dire que les dommages à l'ADN doivent être soumis à un système de réparation enclin à l'erreur, afin de produire une mutation transmissible à la progéniture. Après quoi, la ségrégation est nécessaire pour convertir une mutation initialement établie en tant que changement de base sur un seul des brins d'ADN en une mutation double-brin (**Hopwood, 1970**).

Les mutations peuvent être induites de façon aléatoire, par l'utilisation de rayonnements ou d'agents ionisants, alkylants ou de désamination de bases. L'utilisation de rayons UV induit une variété de mutations, mais n'est pas suffisamment efficace pour être vraiment utile chez les actinomycètes à cause du faible rendement (**Baltz, 2001**). En revanche, la *N*-méthyle-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine est l'agent mutagène de choix, produisant, dans les conditions adéquates, un nombre extrêmement élevé de mutants, avec comparativement très peu de mortalité (**Hopwood, 1970**).

3.1-Les agents mutagènes

Un mutagène est un agent naturel ou résultant de l'activité humaine, physique ou chimique qui peut altérer la structure de l'ADN (**Dupont, 2001**).

3.1.1- Les agents chimiques

Une grande variété de produits chimiques est en mesure de causer des mutations de l'ADN (**Winter, 2000**). On distingue 4 groupes d'agents chimiques (**Boucher, 2002**) : les analogues de bases, agents désaminant (ou modifiant l'ADN), les agents alkylants et agents intercalants.

3.1.1.1- Les analogues de bases

Il s'agit des molécules qui ressemblent par leurs structures aux bases azotées ordinaires, mais qui affichent des propriétés légèrement différentes en ce qui concerne l'appariement des bases (**Tortora, 2003**). Ces produits exigent des conditions d'utilisation précises et ne sont bien efficaces que sur des cellules en multiplication (**Guiraud, 1993 et Dupont, 2001**). Lorsqu'ils sont incorporés, ils subissent des modifications tautomériques similaires aux bases normales mais à des fréquences plus élevées ce qui aboutit à une mutation (**Nicklin, 2000 et Griffiths, 2001**).

3.1.1.2- Agents désaminant ou agents modifiant l'ADN

Ces agents donnent des mutations ponctuelles mais également des mutations plus étendues et inactivantes (**Guiraud, 1993**). Son mode d'action est de modifier chimiquement des bases d'ADN (généralement au repos). Certaines sont à l'origine de l'addition de groupement alkyl ou oryl (**Winter, 2000**).

3.1.1.3- Agents intercalants

Ce sont des composants plats, à 3 anneaux, similaires en structure à une paire de bases. Ils peuvent s'insérer dans l'ADN provoquant une distorsion de l'hélice et donc un glissement durant la réplication, l'insertion et la délétion de bases (**Nicklin, 2000; Winter, 2000; Griffiths, 2001**).

3.1.1.4- Agents alkylants

Ce sont des réactifs capables d'entraîner des méthylations, éthylations ou alkylations supérieures au niveau des bases mais aussi à celui des groupements phosphate. Ils sont actifs sur l'ADN au repos. L'alkylation s'effectue en N ou O avec une efficacité variable selon la base, la position et le microorganisme utilisé (**Guiraud, 1993**). L'action de quelques agents chimiques sur l'ADN est résumée dans le (**tableau 3**).

Tableau 03 : quelques agents chimique mutagène (Guiraud, 1993 ; Galzy, 1993 ; Winter, 2000 ; Griffiths, 2001; Tortora, 2003).

Classe	Exemple	Mode d'action
Analogues de bases	5-bromouracile	Analogues de la thymine provoque des transitions de AT en GC.
	2-aminopurine	Analogues de l'acridine s'apparie avec la thymine ou avec la cytosine. engendre des transitions AT en GC et des transitions de GC en AT lorsqu'elle s'apparie avec l'adénine
Produits chimiques modifiant l'ADN	Acide nitreux	Agit sur l'ADN au repos. Désamine l'adémine en hypoxantine, la cytosine en uracile et la guanine en xanthine. Crée de transition d'AT en GC et probablement quelques transversions.
Agents intercalants	Bromure d'éthyle.	S'intercale dans la double hélice, et provoque un glissement de paires de bases adjacent, ce qui résulte des mutations de framshift.
	Acridine orange proflavine.	S'intercale entre les bases empilées de la double hélice de l'ADN. ce qui induit l'addition ou la délétion d'une paire de base et donc une mutation framshift.
Agents alkylants	Ethyle-méthane sulfonate	Ajout de groupes méthyles en différentes positions de bases. N'est pas incorporé dans l'ADN mais altère une base en une forme qui provoque le mauvais appariement.

3.1.2- Les agents physiques

3.1.2.1- Les radiations ionisantes

Les radiations ionisantes hautement énergétiques, comme les rayons X ou gamma provoquent dans la molécule d'ADN des altérations étendues qui provoquent des coupures dans les brins et la destruction de sucres et de bases (**Winter, 2000**). Ils induisent aussi la formation des radicaux libres.

3.1.2.2- Les radiations non ionisantes : la lumière ultraviolette

La lumière UV est fréquemment utilisée au laboratoire pour induire des mutations et son mécanisme d'action est le plus connu (**Nicklin, 2000**). Les conséquences les plus graves de l'exposition à la lumière UV, sont les modifications de l'ADN, molécule qui porte toutes les informations nécessaires à la vie des cellules et des individus (**Angulo, 2004**). Les rayons UV provoquent des transitions GC en AT, des mutations décalées et des délétions (**Guiraud, 1993**). L'exposition directe de l'ADN aux rayonnements UV, se traduit par la formation de liaisons covalentes indésirables entre certaines bases. Les Thymines adjacentes dans un brin d'ADN peuvent se lier deux à deux pour former des dimères de thymine. S'ils ne sont pas extirpés, ces dimères peuvent occasionner des dommages graves à la cellule, généralement létale. Parce qu'ils empêchent ces dimères de répliquer l'ADN touchée ou de se transcrire correctement (**Tatora, 2003 et Angulo, 2004**). Cette structure de dimérisation des bases pyrimidiques, appelée dimère cyclobutyle conduit à empiler les bases et peut mener à des délétions après réplication de l'ADN. Elle provoque aussi une distorsion de l'hélice de l'ADN (**Winter, 2000 et Nicklin, 2000**).

La lumière UV agit en induisant la formation des radicaux, qui provoquent la formation des dommages oxydatifs de l'ADN (**Borel et al, 1999**).

Les radiations ultraviolettes sont classées en trois groupes en fonction de la longueur d'onde : les UVC (190 à 280 nm), les UVB (280 à 320 nm) et les UVA (320 à 400 nm) (**Borel et al, 1999**).

Les radiations UV les plus efficaces sont celles de longueur d'onde comprise entre 200 et 300 nm, et qui correspondent au maximum d'absorption des acides nucléiques. Les lampes germicides à faible pression de mercure sont efficaces (» = 254 nm) (**Guiraud, 1993**).

En raison de la faible pénétration du rayonnement UV, le volume de la suspension microbienne traité doit être limité, exposé sous une faible épaisseur (pas plus de 1cm) et légèrement agité (**Guiraud, 1993**).

Les cellules sont étalées à la surface d'une boîte de Pétri et mises à l'action des rayons Ultra-violet, le temps d'irradiation est déterminé expérimentalement (**Galzy, 1993**).

Le but de notre travail est :

- Etude l'antibiogramme des quatre souches bactériennes (*Bacillus cereus*, *Enterobacter sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Staphylococcus aureus*).
- Sélection des colonies résistantes à l'antibiotique Cefazoline d'une façon spontanée d'*Enterobacter SP*.

Matériel et Méthodes

1-Matériel

Notre travail a été réalisé au niveau de laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Mostaganem, (Algérie).

1.1-Matériel biologique

1.1.1-les souches étudiées

Les quatre souches bactériennes utilisées dans ce travail ont été isolées du sol au niveau du laboratoire de microbiologie et biologie végétale :

- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylococcus aureus*
- *Bacillus cereus*
- *Enterobacter sp*

Les souches sont identifiées par les doctorantes CHIBANI (*Bacillus cereus* et *Enterobacter sp*) et BENCHOUK (*Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*)

1.2- Milieux de cultures (Annex 01)

1.2.1-Milieux de cultures solides

- Gélose Nutritive (GN)

1.2.2-Milieux de cultures liquides

- Bouillon Nutritif (BN)

1.3- les Antibiotiques

Les antibiotiques utilisés ont été achetés de la pharmacie sous formes injectable et comprimés.

A-Ampicilline (200mg/ml) (AM) (injectable), **B**-Cefazoline (200mg /ml) (CZ) (injectable)

C-Retarciline (2000UI/ml) (RC) (injectable), **D**-Biopamox (300 mg/ml) (BP) (injectable)

E-Gentamycine (40 mg/ml) (GM) (injectable), **F**-Vibramycine (100mg/ml) (VM) (comprimés)

1.4-Préparation des disques

Les disques ont été préparés à partir du papier filtre, des diamètre 4.5mm et une épaisseur de 0.25mm, sont d'abord stérilisés par l'autoclavage à 120°C pendant 20min, puis imprégnés pendant une heure dans les solutions d'antibiotiques avant l'application du test (**Annexe3**).

1.5-Préparation de milieu d'antibiotique

La solution de l'antibiotique (Cefazoline 200 mg ml⁻¹) été diluée jusqu'à 10⁻² (2mg ml⁻¹). Pour préparer trois milieux à trois concentrations différentes ; 0.5 ml, 1ml, 2 ml de Cefazoline (2 mg /ml) ont été ajouté à chaque flacon de 200 ml de gélose nutritive pour avoir une concentration finale de Cefazoline 5.0 µg/ml, 10.0 µg /ml et 20.0 µg /ml respectivement puis les boites ont été coulées et laissées solidifier.

2-Méthodes

2.1- Etudes de la résistance aux antibiotiques

2.1.1-Antibiogramme (Vedel, 2005)

Principe

L'antibiogramme permet de catégoriser une souche bactérienne en classe semi-quantitatives (sensible S, ou résistante R) et d'orienter l'antibiothérapie. Il est basé sur l'observation de la croissance bactérienne en présence d'un 'antibiotique, obtenu par diffusion à partir de disques dans un milieu gélosé.

Le diamètre de la zone d'inhibition varie selon la sensibilité de la souche.

Technique

- La gélose nutritive doit être coulée en boites sur une épaisseur de 4 mm laissé solidifier avant l'emploi.
- Une suspension bactérienne a été préparée à partir d'une colonie dans 9 ml de bouillon nutritif sous agitation à l'aide d'un vortex et incubé à 37 °C pendant 24 h.
- 1ml de la suspension a été prélevé puis et versé dans la boite de pétri contenant la gélose nutritive.
- L'excès de la suspension a été jeté, après 5 min les disques d'antibiotique ont été déposés à la surface de la gélose en les appliquant délicatement à l'aide d'une pince stérile.
- Les boites de pétri ont été incubées à 37 °C pendant 24 h.

Matériel et Méthodes

- Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés et comparés aux valeurs figurant dans le tableau de lecture, puis les bactéries ont été classées dans l'une des catégories ; sensible ou résistance. (Annexe 2).

2.2- Préparation des dilutions décimales

La dilution diminue la charge microbienne de l'échantillon et a pour avoir une lecture plus aisée des colonies bien séparées obtenues sur la surface de milieu de culture (Guiraud, 1998).

La technique des dilutions décimales est représentée dans la figure 08. 1 ml de la suspension mère est mis dans un tube contenant 9ml d'eau physiologique stérile (c'est la dilution 10^{-1}) et ainsi de suite jusqu'à réduire la concentration microbienne voulue (Guiraud, 1998).

La dilution de chaque suspension bactérienne a été effectué jusqu'à 10^{-6} . Puis 0.5ml de chaque dilution a été versé et étalé sur les boites de gélose nutritive et incubée à 37°C pendant 24 heures, pour le dénombrement des colonies bactériennes.

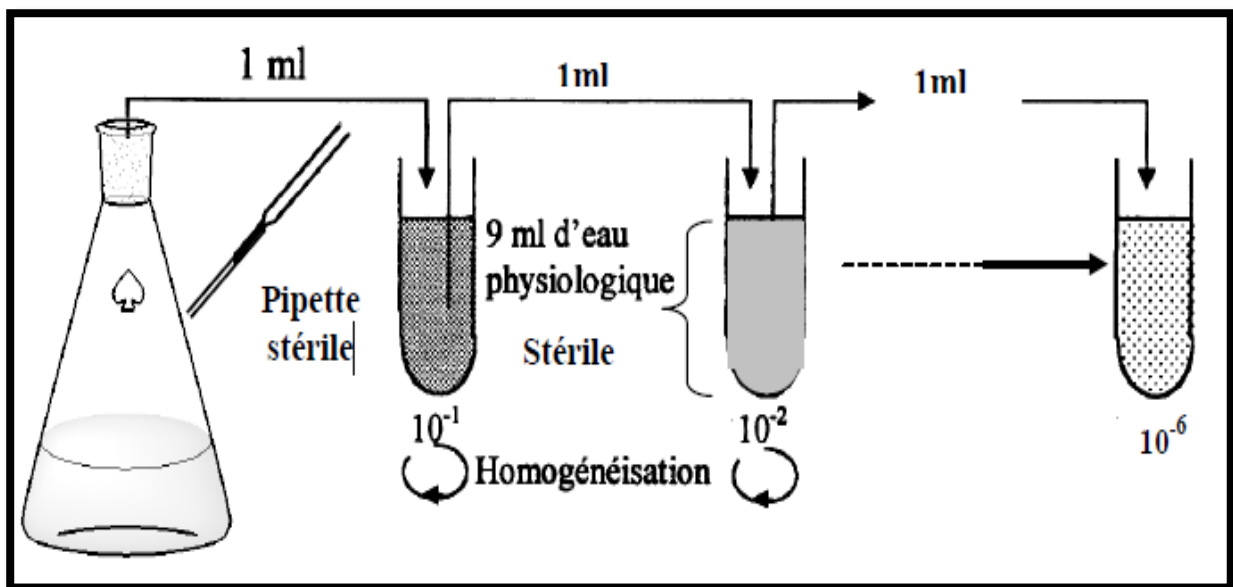


Figure 07 : Technique de préparation de délitons décimales.

2.3- Sélection de la résistance

Technique

Le pourcentage de souches résistantes à un antibiotique donné a souvent tendance à augmenter en fonction du temps d'utilisation de cet antibiotique. C'est le résultat de la pression de sélection des antibiotiques. En effet l'administration d'un antibiotique chez un individu entraîne la disparition, ou la diminution, des bactéries sensibles à cet antibiotique et favorise de ce fait la prolifération des bactéries ayant acquis des gènes de résistance, et des espèces possédant une résistance naturelle. La résistance sélectionnée par un antibiotique peut toucher, à des degrés divers, l'ensemble de la famille d'antibiotiques correspondante (**Quintiliani et al, 1999**).

1)

- Préparer une suspension bactérienne d'une colonie dans 9 ml de bouillon nutritif sous agitation à l'aide d'un vortex et incubé à 37° C pendant 18 à 24 h.
- préparer trois flacons de gélose nutritive, chaque flacon contient une concentration de l'antibiotique (Cefazoline) 5, 10 et 20 µg / ml, coulée les boites et laisser solidifier.
- 0,5ml de la suspension bactérienne était ajouté sur la surface de milieu contenant la Cefazoline, incuber à 37 °C pendant 24 à 48 h.

2)

- Prendre dans le flacon GN qui contient concentration 2 ml d'antibiotique et coulée les boites.
- prélever 1ml de la suspension puis verser sur les boite de pétri, étuver à 37°C pendant 24 à 48 h.

Les colonies formaient sur le milieu contenant l'antibiotique sont des colonies résistantes. Ces dernières sont contés et la fréquence de la résistance est calculer.

2.3.1- AntibioGramme

- Préparer les solutions des antibiotiques à une concentration de 20 µg /ml.
- La gélose nutritive doit être coulée en boîtes et solidifiée avant l'emploi.
- Préparer des suspensions bactériennes à partir des colonies de différentes tailles dans 9ml de bouillon nutritif sous agitation à l'aide d'un vortex et incubé à 37 °C pendant 18 à 24 h.
- Prélever 1ml de la suspension puis verser sur la boîte de pétri et laisser pendant 10 min.
- Jeter l'excès et laisser reposer 5 min puis déposer les disques d'antibiotique dilués à la surface de la gélose en les appliquant délicatement à l'aide d'une pince stérile.
- Étuver à 37 °C pendant 18 à 24 h.

2.3.2- Ensemencement

- En prend avec la lince de platine 6 colonies des bactéries de différentes tailles et une colonie de la suspension mère comme témoin et en fait des stries sur la gélose nutritive couler sur les boîtes pétri et étuver à 24 à 48 h à 37 °C.

2.3.3-La dépendance à l'antibiotique

- une suspension bactérienne était préparée à partir d'une seule colonie de l'isolat résistant G1. 0.5 ml de cette suspension a été étalé sur un milieu GN sans antibiotique. Etuver à 48 heures à 37°C.
- Après 48h en ajoute 0.1 ml d'antibiotique dans 10 ml d'eau distillée et sous agitation à l'aide d'un vortex puis prend 0.5 ml de mélange est versé sur la moitié de boîte pétri et incubé à 37 °C pendant 24 à 48 h.

1-Résultats

1.1-Antibiogramme

C'est une l'interprétation de la sensibilité des bactéries à l'antibiotique en terme d'efficacité clinique. Il permet catégoriser une souche bactérienne en classes semi-quantitatives (sensible, résistante). Les résultats obtenus des antibiogrammes des quatre souches étudiées ont montrés qu'*Enterobacter SP* sensible à tout antibiotique testé. *Bacillus cereus*, et *Staphylococcus aureus* résistance à la retraciline et *Pseudomonas aeruginosa* résistance à Cefasoline, biopamox, vebramycine et Retraciline. Les résultats de l'antibiogramme des souches bactériennes sont présentés dans le **tableau 4** et les **figure 08,09, 10 et 11**.

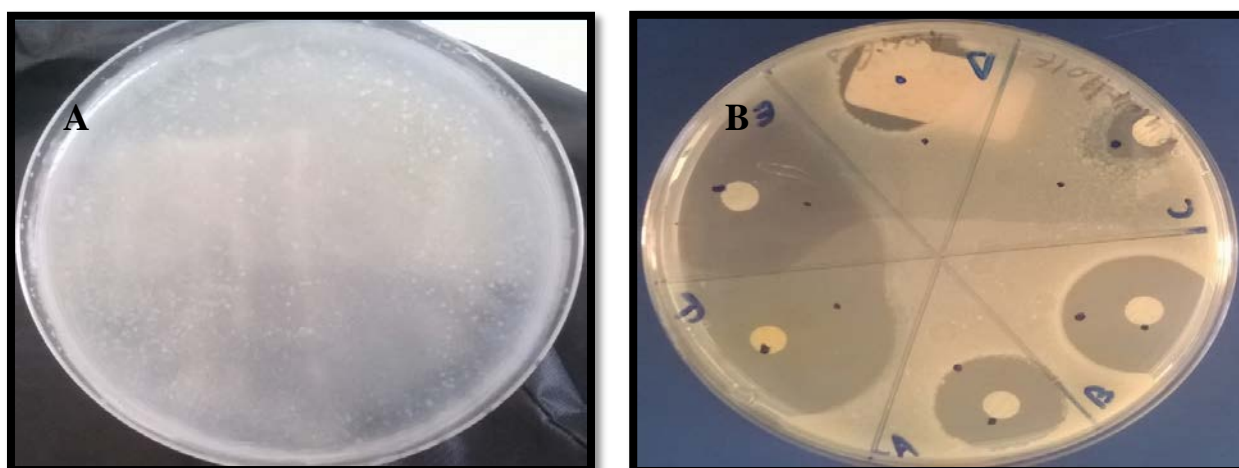


Figure 08 : Antibiogramme de la souche *Bacillus cereus*

A : suspension bactérienne sur gélose nutritif B : les disques déposés sur un tapi bactérien

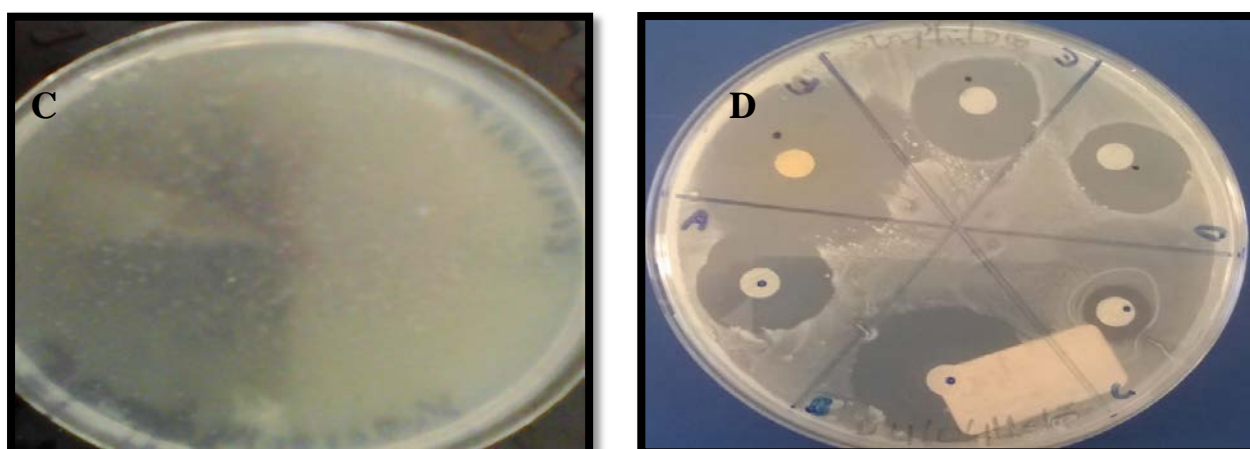


Figure 09 :Antibiogramme de la souche *Staphylococcus aureus*

Résultats et discussion

C : la suspension bactérienne sur gélose nutritif D : les disques déposés sur la suspension bactérienne



Figure 10 : Antibiogramme de la souche *Enterobacter sp.*

E : la suspension bactérienne sur gélose nutritif

F: les disques déposés sur la suspension bactérienne

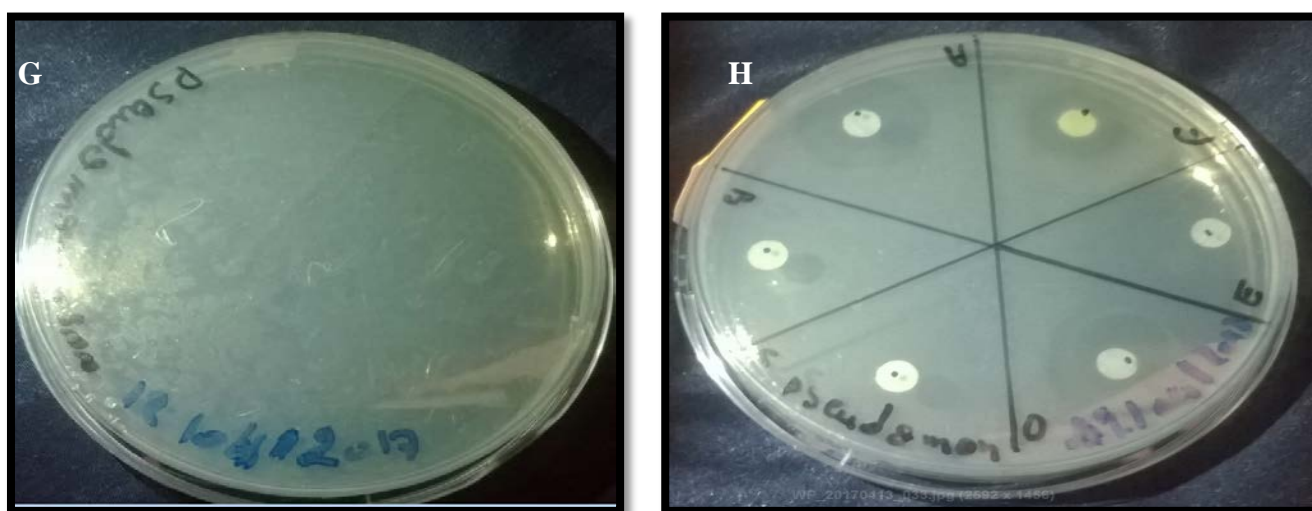


Figure 11 : Antibiogramme de la souche *Pseudomonas aeruginosa*

G : la suspension bactérienne sur gélose nutritif

F : les disques déposés sur la suspension bactérienne

Résultats et discussion

Les résultats des antibiogrammes des souches est représenté en histogrammes dans la **Figure 12**.

Tableau 04 : Résultats d'antibiogramme pour les souches bactériennes.

Antibiotique Souches	Ampiciline	Cefasoline	Retarciline	Biopamox	Gentamycine	Vibramycine
<i>Bacillus Cereus</i>	S	S	R	S	S	S
<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	S	S	S
<i>Enterobacter SP</i>	S	S	S	S	S	S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	R	R	R	S	R

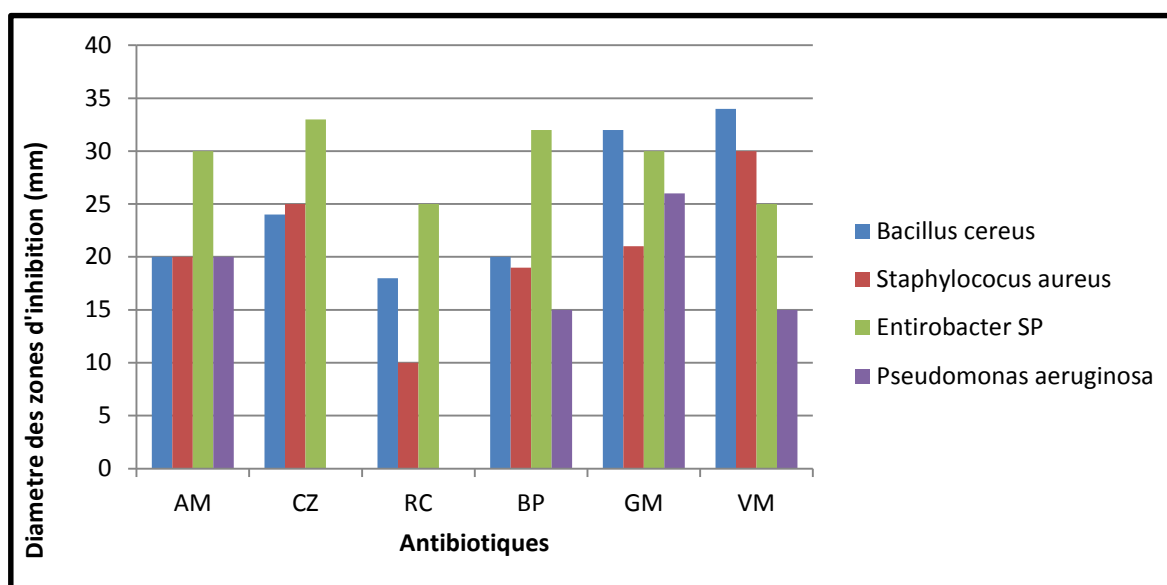


Figure 12 : Résultats d'antibiogramme des souches bactériennes (diamètre de la zone d'inhibition en mm).

La souche *Enterobacter sp.* Est sensible à tous antibiotiques testés. Les deux souches *Bacillus cereus*, et *Staphylococcus aureus* ont montrés une résistance à la retarciline, mais la souche *Pseudomonas aeruginosa* était la seul résistante aux quatre antibiotiques Cefazoline, biopamox, vebramycine et Retraciline.

Résultats et discussion

Le taux de résistance aux antibiotiques

Le taux de résistance aux antibiotiques est calculé comme suite :

$$\text{Le taux de résistance (\%)} = \frac{\text{Nombre des souches résistance}}{\text{Nombre total des souches}} \times 100$$

Dans cette étude 75% des souches ont exprimé une forte résistance à la retarciline. Seulement 25% des souches ont exprimé une résistance à la cefazoline, biopamox et vibramycine. (Figure 13)

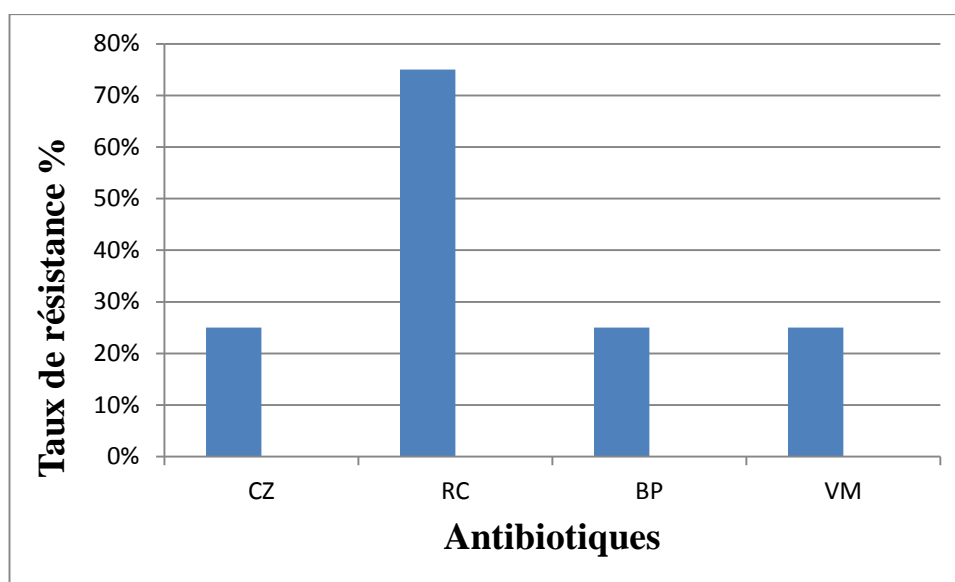


Figure 13 : profils de résistance des quatre souches testés sur 04 antibiotiques.

Résultats et discussion

1.2-Dénombrement des colonies

Des déluitions ont été préparé pour le but d'avoir une lecture plus aisée des colonies bien séparées obtenues en culture mixte. Les résultats sont représenté dans la (Figure 14).

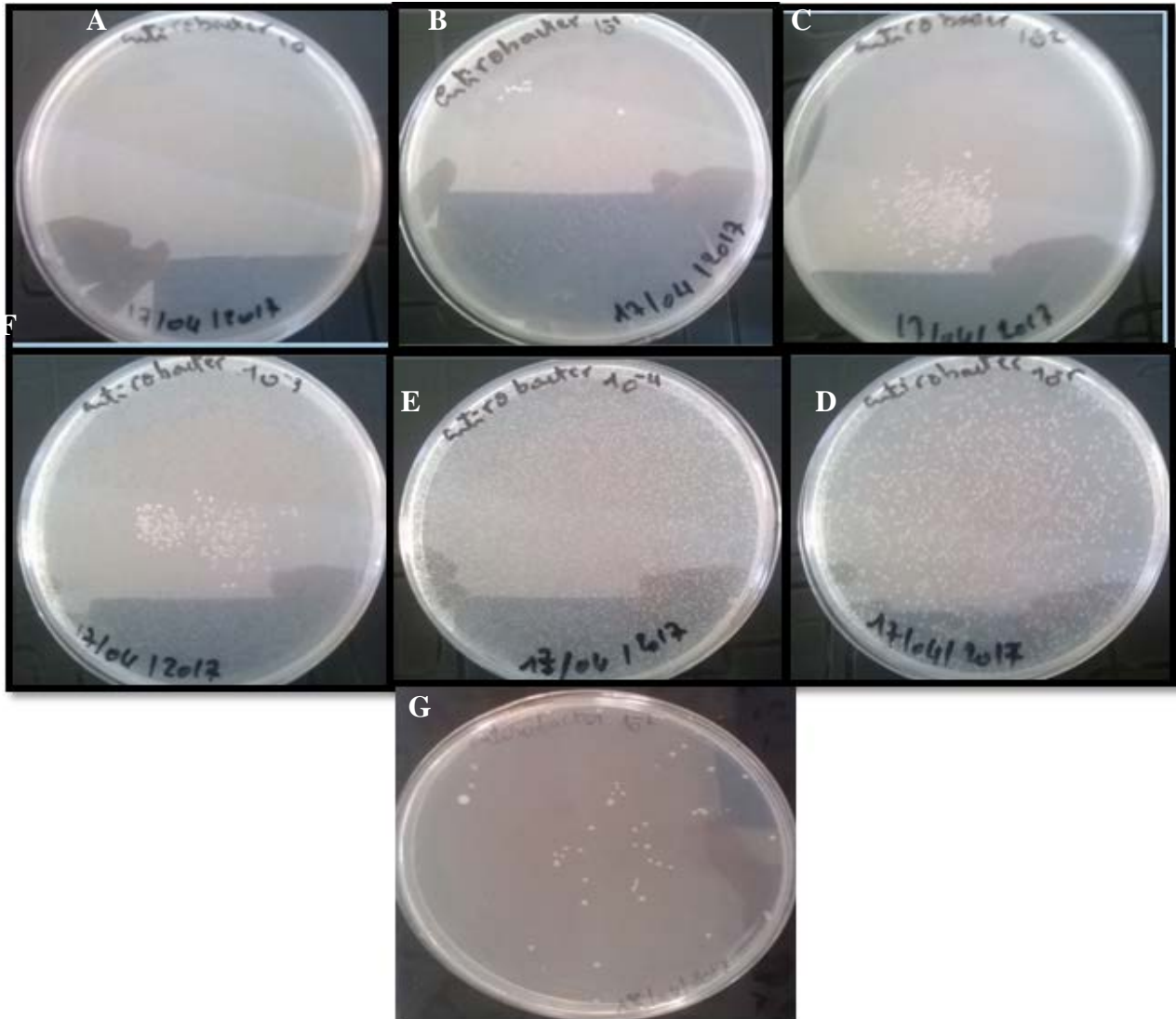


Figure 14: représente la croissance de la souche *Enterobacter SP* après les différentes dilutions.

A : suspension mère B : 10^{-1} , C : 10^{-2} , D : 10^{-3} , E : 10^{-4} , F : 10^{-5} , G : 10^{-6}

N = $80 \times 10^6 \times 2 = 16 \times 10^7$ UFC/ml.

Résultats et discussion

1.3-Sélection de la résistance

Résultats représentés dans la (Figure 15,16).

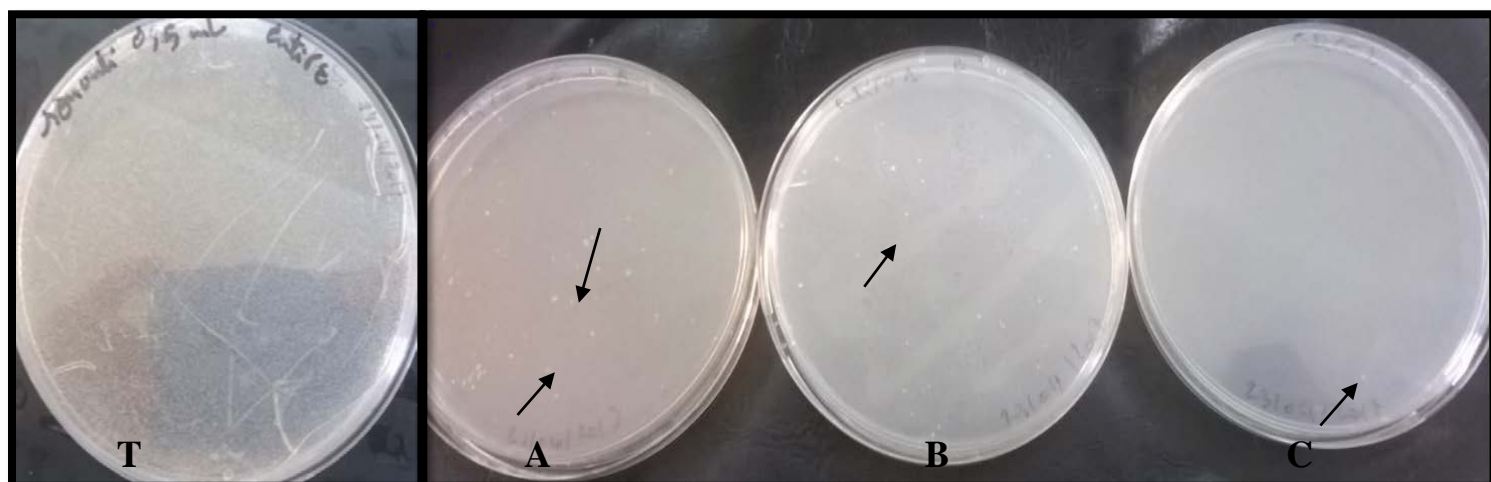


Figure 15 : sélection des colonies de *Enterobacter sp* résistantes (fleches) sur de différents concentrations d'antibiotiques

T :suspension bactérienne sur le gélose sans antibiotique **A** : 5 µg/ml d'antibiotique

B : 10 µg/ml d'antibiotique **C** : 20 µg/ml d'antibiotique

-On observe dans laboite de 5 µg/ml et 10 µg/ml d'antibiotique quelque colonies résistantes et dans la boîte de 20 µg/ml d'antibiotique aucune colonie. Dans la boîte T (temoin) un tapi bactérien a été formé

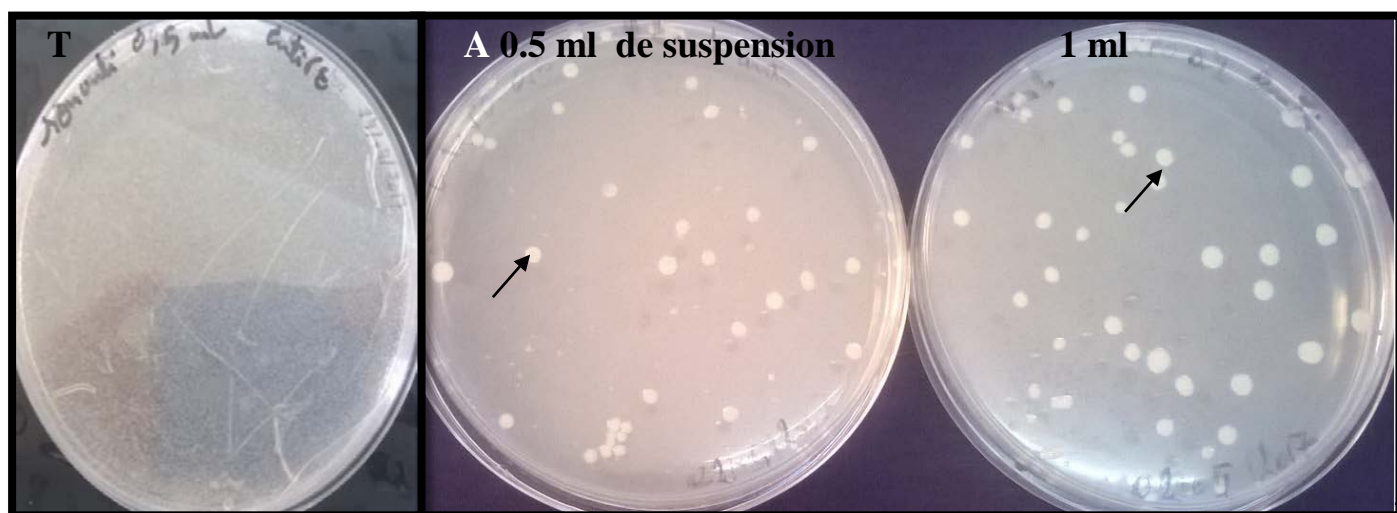


Figure 16 : Sélection des colonies de *Enterobacter sp* résistantes (fleches) sur de différents concentrations d'antibiotiques

A : 2ml d'antibiotique (cefazoline) dans une gélose nutritive.

Résultats et discussion

49 colonies de différent taille ont été recensés représente dans le **Tableau 05**.

Cette colonie résistante aux antibiotiques donc c'est une mutation spontanée

Tableau 05 : Nombre des colonies des différentes tailles.

Fréquence de mutation = le nombre des mutations / le nombre totale

$$= 49 / 160 \cdot 10^6 = \mathbf{3.06}$$

Résultats et discussion

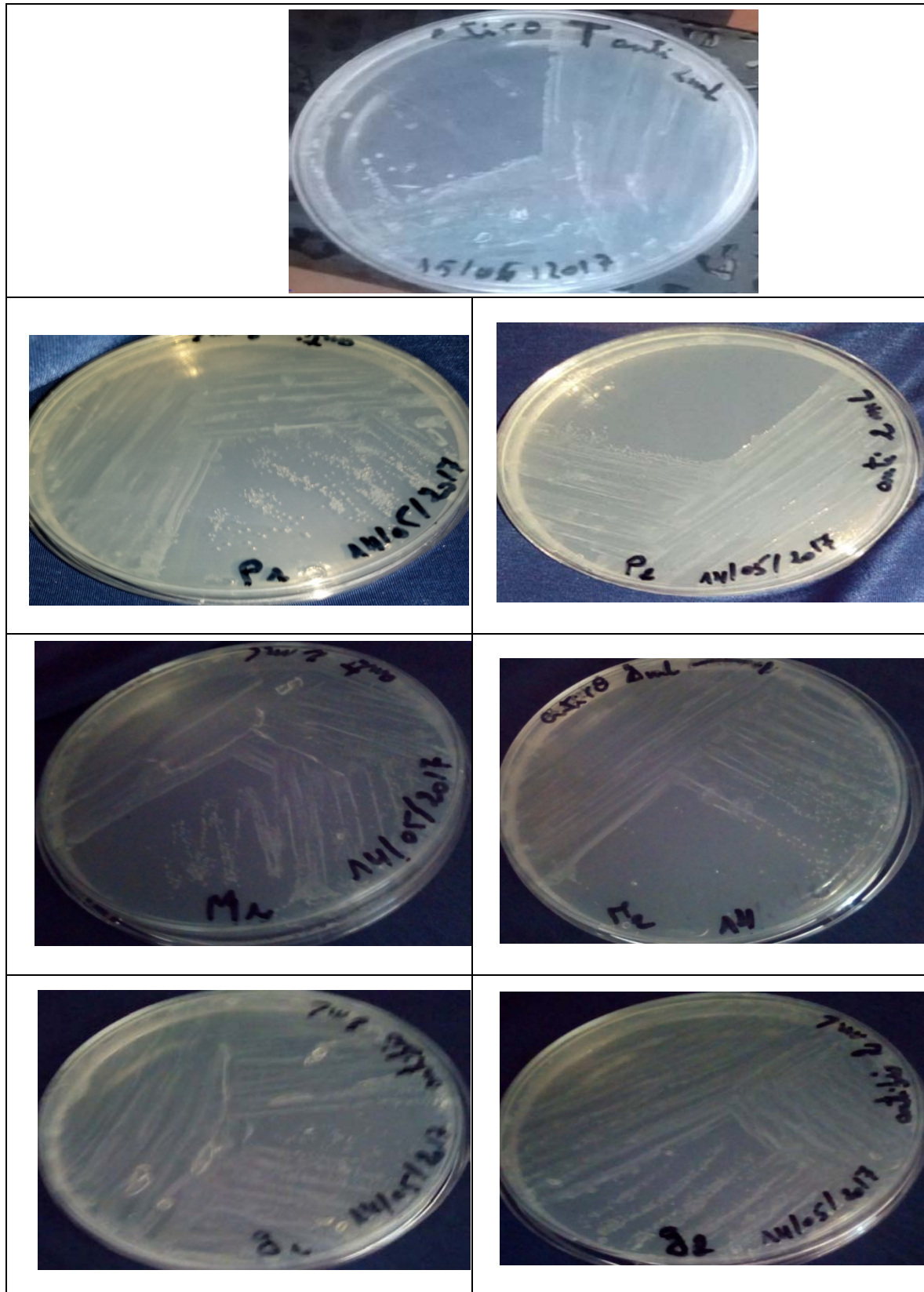


Figure 17 : Purification des isolats résistants des souches *Enterobacter sp.* sur GN.

Résultats et discussion

1.5.-Antibiogramme des isolats résistants

Les isolats sélectionnés sont tous résistants à tout les antibiotiques testé Ampiciline , Cefazoline, Retarciline, Biopamox, Gentamycine, et Vibramycine. Les isolats résistants donnent un taux plus élevé (100%) à tout les ‘antibiotiques. Les résultats d’antibiogramme sont représentés dans le **Tableau 6** et la **Figure 18 et 19**.

Tableau 06 : résultats d’antibiogramme des isolats résistants

antibiotique Souches	Antibiotiques					
	Ampiciline	Cefazoline	Retarciline	Biopamox	Gentamycine	Vibramycine
P1	R	R	R	R	R	R
P2	R	R	R	R	R	R
M1	R	R	R	R	R	R
M2	R	R	R	R	R	R
G1	R	R	R	R	R	R
G2	R	R	R	R	R	R

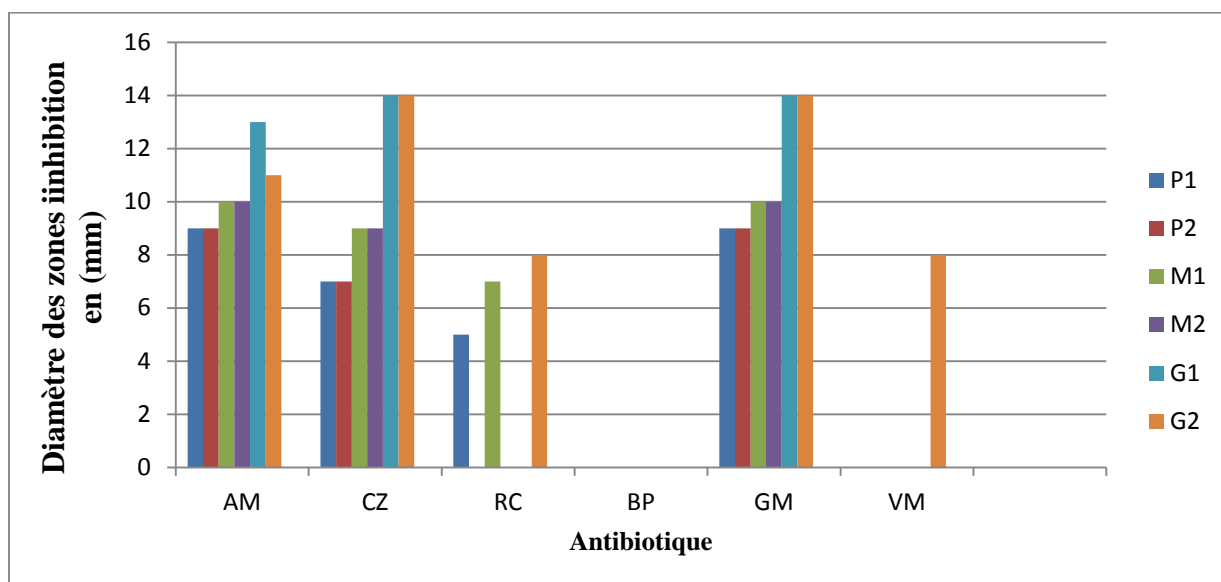


Figure 18 : Résultats d’antibiogramme des isolats résistants

Les isolats résistants donnent un taux plus élevé (100%) à tout les ‘antibiotiques.

Résultats et discussion

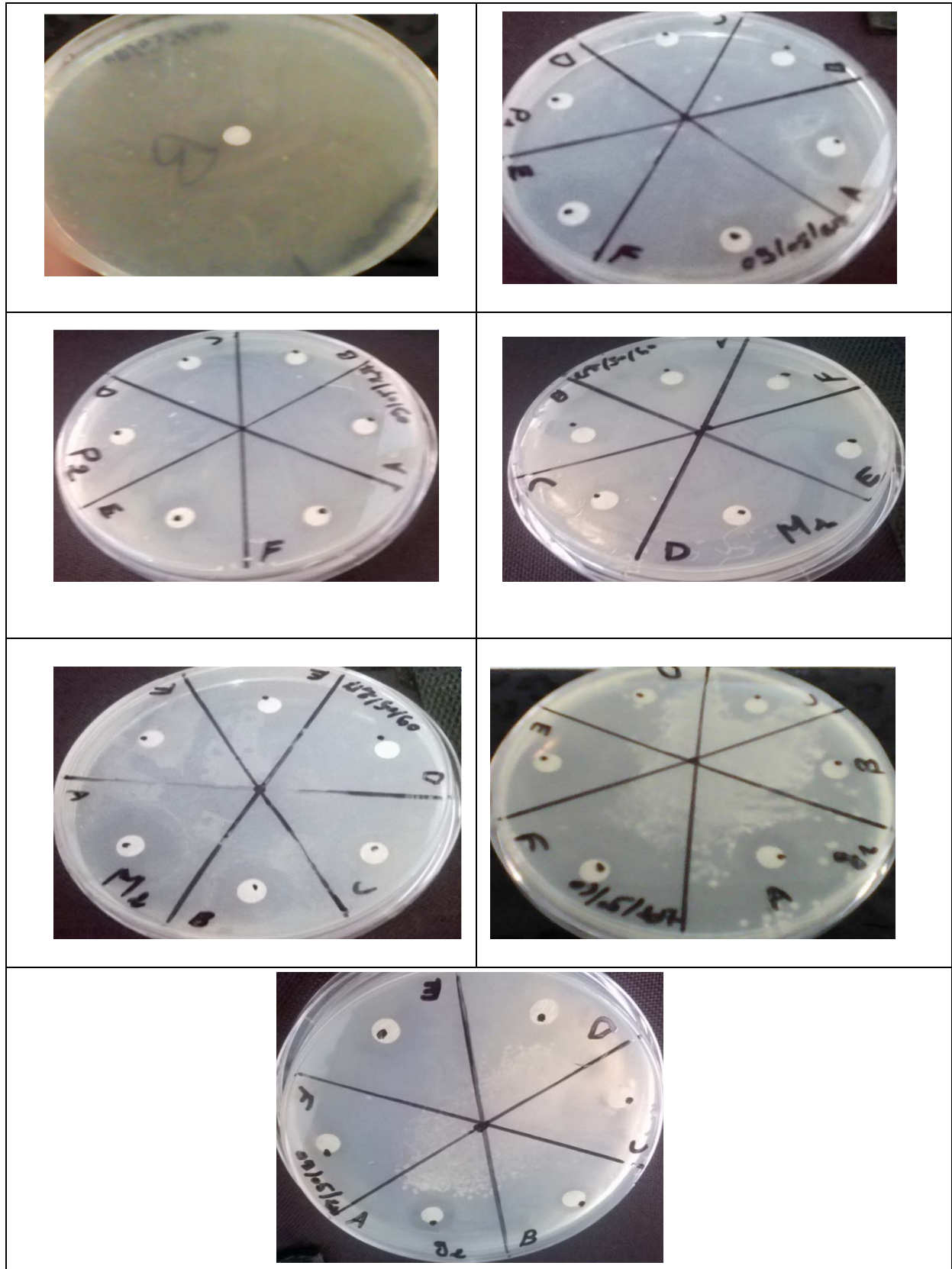


Figure 19 : Antibiogrammes des isolats résistants de souches d'*Enterobacter SP.*

Résultats et discussion

1.6-La dépendance a l'antibiotique

Un isolat (G1) résistant ne pouvait pas pousser sur un milieu sans l'antibiotique cefazoline. Mais lorsque 0,5 ml de solution de cefazoline était étalé sur la surface du même milieu, les colonies sont apparues et sont devenues normales. Cet isolât semblait être cefazoline-dépendant (**Figure 20**)

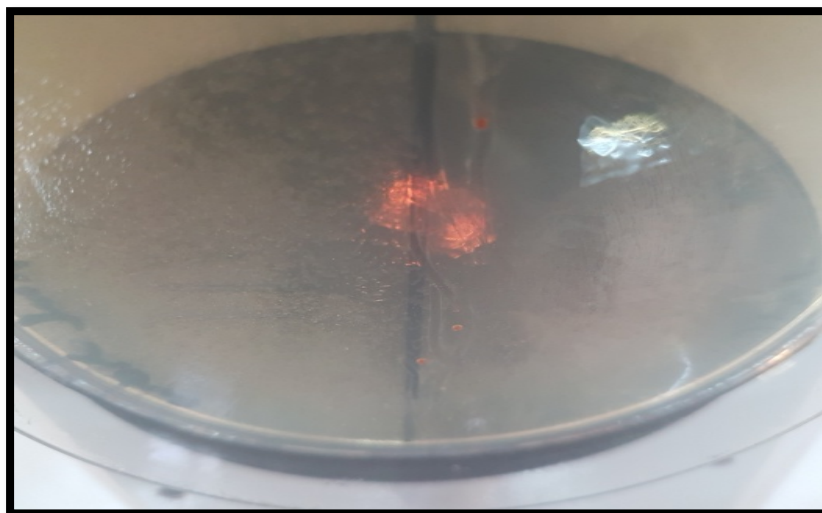


Figure 21: bactéries dépendante à l'antibiotique cefazoline.

Une suspension bactérienne était préparée à partir d'une seule colonie de l'isolat résistant G1. 0.5 ml de cette suspension a été étalé sur un milieu GN sans antibiotique. Après 48 heures d'incubation à 37 ° C, aucune colonie n'est apparue sur le milieu. Sur une moitié de la boîte de Petri, on a ajouté 0,5 ml de solution de cefazoline et la boîte est incubée pendant 24 heures supplémentaires. La partie de la boîte qui a été mise en contact avec l'antibiotique que les colonies poussent.

Résultats et discussion

2-Discussion

Les résultats d'antibiogramme montrent que les souches étudiées *Entiobacter SP* sensible à tout antibiotique testé (Ampiciline, Cefazoline, Retarciline , Biopamox, Gentamycine et Vebramycine), *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* résistance à la retarciline et *pseudomonas aerruginosa* résistance à Cefazoline, Retarciline, biopamox et vebramycine par contre *Escherichia coli* ZATCCZ sensible à 10 antibiotique et résistance aux ampiciline et *pseudomonas aeruginosa* sensible à tout les' antibiotiques. Ces résultats concordent avec les travaux de **(Loucif. 2006)**.

Dans cette étude le taux de la résistance des souches à la retarciline (75%), ses souches donnent un taux de la résistance (25%) à la cefazoline, biopamox et vebramycine.

Les isolats résistants donnent un taux plus élevé (100%) à tout les'antibiotiques par contre le travaeau de **(Djoher, 2013)** les souches isolés (*Salmonella spp*, *Entiobacter cloacae*, *Klebseilla oxytoca*, *Enterobacter aeruginosa*, *E.coli*, *Raoultella ornithinolytica*, *Serratia fonticola*, *Moraxella spp*, *Serratia marcescens*) ont exprime une forte résistance de 100% à cefazidine suivi par 85% de ticarciline.

Ses souches donnent même taux de résistance (75%) à l'amoxiciline et cefuraxine, ainsi ses souches on exprime un niveau moyen de (55%) à la gentamycine et (50%) à tobramycine suivi par un seuil faible de l'ofloxacine.

La dépendance de bactéries résistantes aux antibiotiques est de loin le plus grand et le plus fort mode de résistance bactérienne que nous pouvons espérer rencontrer. Les souches dépendantes aux antibiotiques sont appelées «bactéries à base d'antibiotiques». Dans une étude, **Rosato et al (1995)**, **Fraimow et al (1994)** ont constaté qu'après l'échec initial du traitement clinique, la bactérie *Enterococcus faecalis* était résistante à la vancomycine, mais elle en avait besoin pour sa croissance. Eltringham, un microbiologiste clinicien, a déclaré: "Il s'agit de la première instance d'isolement [enterococci dépendant de la drogue] chez les patients malades,

Une fois que l'organisme développe une dépendance, l'implication de la culture en laboratoire est grave. La souche risque de croître et ne sera identifiée que si l'on observe une croissance accrue dans les zones proches de la drogue. Ceci est beaucoup plus difficile en ce qui concerne la tuberculose multirésistante, qui est souvent difficile à développer. Comme le souligne **Zhong et al, (2010)** ; **Vilain et al (2006)**, «la tuberculose dépendante de la rifampine est un problème de traitement non reconnu et potentiellement grave. La résistance à la rifampicine est inquiétante. Les études soulignent les dangers potentiels du traitement continu

Résultats et discussion

de la TB-MR avec des rifamycines qui surviennent souvent en raison d'un test de sensibilité aux médicaments retardé ou absent. D'autres études sont nécessaires pour déterminer dans quelle mesure la TB-MR dépendante de la rifampicine est en conditions de terrain et si elle contribue à l'aggravation de la maladie chez les patients atteints de MDR et aux échecs de traitement.

Conclusion

Conclusion

Au cours des cinquante dernières années, les antibiotiques ont joué un rôle crucial dans la lutte contre de nombreuses maladies et leur développement a révolutionné le traitement des maladies infectieuses. Leur découverte a été l'une des principales causes de l'augmentation spectaculaire de l'espérance de vie moyenne durant le XXI^{ème} siècle.

Leur importance est d'une grande utilité pour une meilleure prise en charge de la santé publique (**Grace Yim, 2011**). Cependant, avec l'utilisation croissante et parfois injustifiée de ces molécules, les bactéries ont appris à se défendre et à s'adapter et certaines sont devenues résistantes aux antibiotiques. Cette situation apparaît particulièrement préoccupante en milieu hospitalier. La pression de sélection exercée par l'utilisation importante de l'antibiothérapie et la diffusion épidémique des souches résistantes sont les deux facteurs principaux conditionnant cette évolution (**Soussy, 2007**).

Le but de ce travail l'antibiogramme des quatre souches et sélection de la résistance.

Les résultats obtenus des antibiogrammes des quatre souches étudiées ont montrés, *Enterobacter SP* sensibles à tous antibiotiques utilisés, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* résistance à la retarciline et *pseudomonas aerruginosa* résistante à Cefazoline, Retarciline, biopamox et vebramycine et les isolats résistants résistante à tout antibiotiques. Dans cette étude le taux de la résistance des souches à la retarciline (75%), ses souches donnent un taux de la résistance (25%) à la cefazoline, biopamox et vebramycine.

Le taux de la résistance des isolats résistants aux antibiotiques plus élevé (100%).

Entirobacter SP on présente une fréquence de résistance à la cefazoline est $3.06 \cdot 10^{-7}$.

Références bibliographiques

- 1- **Angulo, J.F. (2004).** Le Soleil, indispensable mais dangereux ami. CLEFS CEA - N°49.
- 2- **Avril J- L., Dabernat H., Denis F., Monteil H. (1992).** Bactériologie clinique. 2eme édition. p 596.
- 3- **Avril J.L., François D., Henry M. & Henry D., (2000).** Bactériologie clinique. p585. Bactériologie médicale et vétérinaire systématique bactérienne. p 597.
- 4- **Baltz, R.H. (2001).** Strain improvement in actinomycetes in the postgenomic era. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 38 : 657–666. Doi: 10.1007/s10295-010-0934-z.
- 5- **Borel, C. C. Goupillon ; T. Pilorge (1999).** Les effets des rayonnements sur la cellule vivante. CEA, Institut Curie, CNRS. France.
- 6- **Boucher, I. (2002).** Les modifications génétiques chez les microorganismes. Québec.
- 7- **Brossard H., Guyleyrat. Et Terry O., (1997).** Activité technologiques en microbiologie 2 bactériologies systématiques., p 157.
- 8- **Bryskier A. (1999).** Antibiotiques. Agent antibactériens et antifongiques. Ellipses ; Paris.p : 54- 436-445
- 9- **Carie S. (2009).** La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important. Le parrainage des antimicrobiens : vision 2010 ; 42 : 6-21.
- 10- **Cavallo J-D, Fabre R, Jehl F, Rapp C, Garrabé E. (2004).** Bêtalactamines. EMC Maladies infectieuses. 1 : 129-202.
- 11- **Chaabane A, Aouama K, Boughattas NA, Chakroun M. (2009).** Allergie aux bêtalactamines: mythe et réélités. Ed Elsevier Masson. Médecine et maladies infectieuses 39 :278-287.
- 12- **Charlier P, Coyette J, Dehareng D, Dive G, Galleni C, Joris B. (1998).** Résistance Bactérienne aux bêta-lactamines. Médecine science 14 :544-555.
- 13- **Christensen B, Licht T, Krogfelt A, Molin S. (1999).** Plasmid transfer in the animal intestine and other dynamic bacterial population: the role of community structure and environment. Microbial 145 (Pt): 2615-22.
- 14- **Croizé J (2012).** La résistance aux antibiotiques des bactéries à gram négatif. UFR Médecine-CHU Grenoble.
- 15- **DelVecchio, V., et al (2006)** “Proteomic Profiling and Identification of Immuno-dominant Spore Antigens of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*.” Applied Environmental Microbiology. 72(9) 6355–6363.
- 16- **Djoher, S. (2013).** Etude l’écologie bactérienne chez nouveau-né à l’unité de néonatalogie dans l’établissement hospitalisé E.H.S.Mère et enfant de TLEMEN. Mémoire p.38-39
- 17- **Doucet- Populaire, F., Trieu-Cout, P., Dosbaa, I., Andremont, A. et Courvalin, P. (1992).** Inducible transfer of conjugative transposon Tn 1545 from *Enterococcus Faecalis* to *Listeria MonocytogeneS* in the digestive tract of gnotobiotic mice. Antimicrob agents chemother. 35: 185-187.

Références

- 18- **Dupont, J.Y. (2001)**. Mutation, mutagenèse et réparation de l'ADN. A partir d'un article de Beth Montelone, Division of Biology, Kansas State University.
- 19- **Duval & C. J, Soussy J. (1990)**. Antibiothérapie, 4e éd., Masson, Paris.
- 20- **Duval J. (1989)**. Classification et mécanisme d'action des agents antibactériens. In: Le Minor L, Veron M, eds. Bactériologie médicale 2ème éd, Paris : Flammarion, 1 : 273-96.
- 21- **Euzéby J-P. (2006)**. Résistance bactérienne aux antibiotiques Abrégés de bactériologie générale et médicale.
- 22- **Farrag N, Eltringham I, & Liddy H (1996)**. Vancomycin-dependent Enterococcus faecalis. *Lancet*, 348(9041), 1581-2 PMID
- 23- **Faure S. (2009)**. Les aminosides. Actualités pharmaceutiques. 480 : 49-53.
- 24- **Fraimow, H. S., D. L. Jungkind, D. W. Landers, D. R. Delso, and J. L. Dean. 1994**. Urinary tract infection with an Enterococcus faecalis isolate that requires vancomycin for growth. *Ann. Intern. Med.* 121:22–26.
- 25- **Galzy, P. (1993)**. Le génie génétique: obtention et sélection des mutants. In Biotechnologie par René Scriban. 4eme édition. Technique et documentation, Lavoisier. p : 451-456.
- 26- **Grace Yim. (2011)**. L'attaque des superbactéries: Résistance aux antibiotiques. The Science Creative Quarterly. Issue Six. Lapsus Nivium.
- 27- **Griffiths, A. J. F. ; W. M. Gelbart; J. H. Miller; R. C. Lewontin. (2001)**. Analyse Génétique moderne. Edition : De Boeck université. p : 197-228.
- 28- **Guerout A. M, Rowe-Magnus, Ploncard P, Dychinco B, Davies J. (2001)**. The evolutionary history of chromosomal super-intégrons provides an ancestry for multiresistant intégrons. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:652-7.
- 29- **Guiraud JP. (1998)**. Microbiologie alimentaire. Dunod édition. p615.
- 30- **Guiraud, J. P. (1993)**. Génétique microbienne : Bases théoriques et introduction aux applications pratiques. Techniques et documentation – Lavoisier. p : 89-111.
- 31- **Hopwood, D.A. (1970)**. The isolation of mutants. In Norris, J.R., and Ribbons, D.W. (Eds.). *Methods in Microbiology*, Vol. 3 A, Academic press, London, pp. 363-433.
- 32- **Label B, Soussy C.J. (2007)**. Résistance bactérienne aux antibiotiques, Ed : Springer.
- 33- **Larpen J- P. (2000)**. Introduction a la nouvelle classification : les principaux groupes bactériens, p267.
- 34- **Lavigne J-P. (2007)**. Effet des antibiotiques et mécanismes de résistance. Cours de Bactériologie. Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes.
- 35- **Leclerc. H. (1977)**. Microbiologie appliquée. Doin édition., p187.
- 36- **Levy, S. B. (1992)**. The Antibiotic paradox: how Miracle Drugs are Destroying the Miracle. Plenum Press, New York.
- 37- **Loucif, I. (2006)**. Recherche des souches d'actinomycètes productrices de molécules antibactériennes. Mémoire P. 103-104.
- 38- **Mathur, S. et Singh, R. (2003-2010)**. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria- a review. *Int J. food Microbiol.* 105:281-295
- 39- **Mérens A, Delacour H, Plésiat P, Cavallo J-D, Jeannot K. (2001)** Pseudomonas aeruginosa et résistance aux antibiotiques. *Fl- Revue francophone des laboratoires* ; 435 : 49-62.

Références

- 40- **Meyer A, Deiana J, Leclerc H. (1991).** Les agents antimicrobiens. In : Cours de microbiologie générale 3ème ed. Paris : Doin, 201-40.
- 41- **Nicklin, J; K. Graeme-Cook; T. Paget; R. Killington. (2000).** L'essentiel en Microbiologie. 37-N. -Port Royal livres. BERTI editions. P: 113-121.
- 42- **Perreten, V., Scharz, F., Creasta, L., Boeglin, M., Dasen, G., Teuber, M. (1997a).** Antibiotic resistance spread in food. *Nature*. 389:801-802.
- 43- **Perron A, Marie C, Ruimy R, Andremont A (2009).** Bactériologie- niveau DCEM1. Faculté de médecine.
- 44- **PILET C., Bourdon J.L., Toma B., Marchal N., Balbastre C., Person J.M., (1987)**
- 45- **Prescott., Harley & Klein., (1995).** Microbiologie. p887.
- 46- **Quintiliani R, Sahn DF, Courvalin P. (1999).** Mechanism of resistance to antimicrobiol agents. In: Manual of clinical microbiology, 7th ed. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH eds., ASM Press, Washington, 1505-1525.
- 47- **Righetti. S. (2007).** le pharmacien face aux infections bactériennes buccales, université Henri Poincaré. Nancy 1.
- 48- **Rosato,1 J. Pierre,2 D. Billot-Klein,1 A. Buu-Hoi,1 and L. Gutmann1 (1995)** Inducible and Constitutive Expression of Resistance to Glycopeptides and Vancomycin Dependence in Glycopeptide-Resistant *Enterococcus avium*. *ANTIMICROBIAL AGENTS And Chemotherapy*, Vol. 39, No. 4830–833
- 49- **Scott, K. P. (2002).** The role of conjugative transposons in spreading antibiotic resistance between bacteria that inhabit the gastrointestinal tract. *Cell. Mol. Life.Sci.* 59: 2071-202.45-
- 50- **Soussy C-J. (2007).** Résistance bactérienne aux antibiotiques. Monographies en urologie. P : 21- 46.
- 51- **Tambyah PA, Marx JA, & Maki DG (2004).** Nosocomial infection with vancomycin-dependent enterococci. *Emerging infectious diseases*, 10 (7), 1277-81
- 52- **Tammo (1995).**Theoretical Analysis of Molecular Membrane Organization. Edition CRC Press: Boca Raton, Florida, USA.
- 53- **Tortora. G..J; B.R. Funk; C.L. Case. (2003).** Introduction à la microbiologie. Edition du Renouveau Pédagogique Inc. Nb de p.945.
- 54- **Tremblay, S. (2007).** Etude moléculaire du recrutement des gènes de résistance aux antibiotiques Mémoire de maitre es sciences (M. Se.). Université de Laval, Québec.
- 55- **Vedel G (2005).** Simple method to determine ²-lactame resistance phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* using the disc agar diffusion test. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*. 56(4): 657-664.
- 56- **Vilain, S., Luo, Y., Hildreth, M., and Brozel, V. 2006** “Analysis of the Life Cycle of the Soil Saprophyte *Bacillus cereus* in Liquid Soil Extract and in Soil.” *Applied Environmental Microbiology*. 72(7); 4970–4977.
- 57- **Watson J. D. et F. H. C. Crick,** « Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid », *Nature*, vol. 171, no 4356, 25 Avril 1953, p. 737 738
- 58- **Wendpagnagdé. (2005).** P. Rachel, thèse doctorat, université de Bamako. p ; 37 -39.
- 59- **Winter, P. C; G. I. Hickey; H. L. Fletcher (2000).** L'essentiel en génétique. Port Royal livres. BERTI editions. P: 101-115.

Références

- 60- **Yala D, Merad A-S, Mohameddi D, Ooar Korich M-N. (2001).** Classification et mode des antibiotiques. Ed Médecine du Maghreb. 91 :1.
- 61- **Zhong M, Zhang X, Wang Y, Zhang C, Chen G, Hu P, Li M, Zhu B, Zhang W, & Zhang Y (2010).** An interesting case of rifampicin-dependent/-enhanced multidrug-resistant tuberculosis. *The international journal of tuberculosis and lung disease.* 14 (1), 40-4

Liste des annexes

Annexe 01 : les milieux de culture

Gélose nutritive (GN) :

Pour 1 litre de milieu :

Peptone :..... 6g

Extrait de Viande :..... 1g

Extrait de Levure :..... 2g

NaCL :..... 5g

Agar :..... 15g

pH :..... 7

Bouillon nutritive (BN) :

Pour 1 litre de milieu :

Peptone :.....6g

Extrait de Viande :.....1g

Extrait de Levure :.....2g

NaCL :.....5g

pH :.....7

L'eau physiologie :

NaCL :..... 9g

Eau distillée :.....1000ml

Annexe 02 : les tableaux des résultats d'antibiogramme.

Tableau 07 : les diamètres des zones inhibitions des souches bactériennes.

Antibiotique Souches	Diamètre en (mm)					
	Ampiciline	Cefazoline	Retarciline	Biopamox	Gentamycine	Vibramycine
Bacillus	20	24	18	20	32	34
Staphylococcus	20	25	10	19	21	30
Entirobacter	30	33	25	32	30	25
Pseudomonas	20	0	0	15	26	15

Tableau 08 : les diamètres des zones inhibitions du Entirobacter SP de isolats résists de différent taille.

antibiotique Souches	Diamètres en (mm)					
	Ampiciline	Cefazoline	Retarciline	Biopamox	Gentamycine	Vibramycine
P1	9	7	5	0	09	0
P2	9	7	0	0	09	0
M1	10	9	7	0	10	0
M2	10	9	0	0	10	0
G1	13	15	0	0	15	0
G2	11	15	8	0	15	08

Annexe 03 : diamètre et la charge des disques.

Tableau 09 : diamètre et la charge des disques.

Antibiotique	ampiciline		cefazoline		retarciline		biopamox		gentamycine		vebramycine	
Diamètre (mm)	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
	e21	<16	e18	<14	e29	<18	e16	<16	e15	<13	e19	<17
La charge des disques	2 mg		2 mg		20 UI		3 mg		0.4 mg		1 mg	