



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques
Sciences Biologiques Appliquées et Santé
(LST - SBAS)

**La résistance aux bêtalactamines par production de bêta-lactamase à spectre élargi chez les entérobactéries :
caractérisation phénotypique et génotypique**

Présenté par : Fatima Ghallab

Encadré par : Pr OUMOKHTAR Bouchra (FMPF)

Pr HARKI El Houssaine (FST Fès)

Soutenu le : 04/07/2022

Devant le jury composé de :

- **Pr HARKI El Houssaine**
- **Pr El ABIDA Kaouakib**
- **Pr OUMOKHTAR Bouchra**

Stage effectué au Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire à la FMP de Fès

Année universitaire 2021-2022

Dédicace :

Je dédie ce mémoire....

A mes chers parents pour leur soutien et leurs encouragements.

A mes amis et mes camarades.

Remerciement :

A Madame le Professeur OUMOKHTAR Bouchra, de m'avoir donné l'occasion de faire un stage au sein de l'laboratoire de Microbiologie et Biologie moléculaire à la Faculté de Médecine et de pharmacie de Fès, pour m'avoir encadré, conseillé durant cette période de stage.

A Pr. El Houssaine Harki mon encadrant de stage au sein de la Faculté des sciences et techniques Fès pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant d'encadrer ce projet de fin d'études.

A Pr. EL ABIIDA Kaouakib professeur à la FST de Fès d'avoir accepté de juger ce travail.

A Monsieur Benboubker Moussa et Monsieur Belchkar Salim des Doctorants au sein du laboratoire de microbiologie et biologie moléculaire pour vos conseils et l'intérêt que vous avez porté à ce travail.

MERCI

Liste des abréviations

AB	Antibiotique
ADN	acide désoxyribonucléique
Ag	Antigène
AK	Amikacine
AMC	Amoxicilline + acide clavulanique
AMP	Ampicilline
ATM	Aztréonam
BLSE	Les bêtalactamases à spectre élargi.
CAZ	Ceftazidime
CFM	Céfixime
CTX	Céfotaxime
CTXM	Cefotaximase
dNTP	désoxyribonucléotide triphosphate
ETP	Etrapénèmes
FEP	Péfloxacine
FOX	Céfoxitine
IPM	Imipenème
KP	Klebsiella pneumoniae

NA	Acide nalidixique
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLP	Protéines liant les Pénicillines.
PRL	Pipéracilline
R	Résistante
S	Sensible
SHV	sulf-hydryl variable
TCC	Ticarcilline+Acide clavulanique
TEM	Temoneira
TIC	Ticarcilline
TPZ	Pipéracilline + tazobactam
C3G	Céphalosporine de 3ème génération
TSA	Tyramide Signal Amplification

Liste des figures

Figures	Titre	Page
Figure 1	Mode d'action des antibiotiques	7
Figure 2	Mode d'action des bêtalactamines	10
Figure 3	Cycle bêta-lactame	11
Figure 4	Les différents groupes des bêtalactamines	11
Figure 5	Classification des bêtalactamases selon Ambler	14
Figure 6	L'hydrolyse du cycle beta-lactame par bêtalactamases	15
Figure 7	Répartition géographique et circulation des différents sous-types de bêtalactamases à spectre élargi	16
Figure 8	La prévalence des entérobactéries productrices des bêtalactamases dans le monde	17
Figures 9,10	Préparation du MIX	22
Figure 11	Photo réel de la migration électrophorétique au niveau de laboratoire de microbiologie à FMPF	24
Figure 12	La souche Kp₂	25
Figure 13	La souche Kp₁	25

Liste des tableaux

Tableaux	Titre	Page
Tableau 1	Les principales espèces d'entérobactéries d'intérêt clinique	5
Tableau 2	les différents types d'antigènes	34
Tableau 3	Antibiotiques inhiber la biosynthèse de la paroi bactérienne	8
Tableau 4	Antibiotiques agissant au niveau des membranes	8
Tableau 5	antibiotiques inhibant la synthèse protéique	9
Tableau 6	Antibiotiques agissant sur la synthèse des acides nucléiques	9
Tableau 7	Classification des bêtalactamines	12
Tableau 8	liste des amorces utilisées pour l'amplification	21
Tableau 9	Résultats de la lecture de l'antibiogramme	26

Sommaire

INTRODUCTION	1
Présentation du lieu de stage.....	2
CHAPITRE 1 : Partie bibliographique	3
I. Les entérobactéries :	3
II. ANTIBIOTIQUES	6
III. BETA-LACTAMINES.....	10
V. Epidémiologie.....	16
CHAPITRE 2: Partie pratique	18
Discussion.....	28
Conclusion	29
Références Bibliographiques.....	30
Annexe 1	34
Annexe 2	35

INTRODUCTION

Dans le cadre du projet de fin d'étude pour l'obtention d'une licence science technique en biologie et santé, j'ai effectué un stage d'observation au sein du laboratoire de microbiologie et biologie moléculaire de la Faculté de Médecine de Fès. Le stage s'est déroulé du 27 avril au 25 juin 2022. Pendant cette période, je me suis familiarisée avec certaines techniques de la microbiologie comme la préparation des milieux de cultures, réalisation et lecture des antibiogrammes, l'identification biochimique ...etc. Je me suis également initiée à la biologie moléculaire avec des tests d'identification moléculaires par la Polymerase Chain Reaction (PCR) des bactéries gram négatif en général et en particulier les entérobactéries.

En effet les entérobactéries ont développé certains mécanismes de résistance aux antibiotiques ce qui pose un problème à l'échelle mondiale. Nous avons opté pour la technique de la réaction PCR comme méthode génotypique et l'antibiogramme comme méthode phénotypique pour détecter les gènes codants pour cette résistance et tester la sensibilité de la bactérie vis-à-vis les antibiotiques en particulier les bêtalactamines. Et puisque les entérobactéries comprennent une vaste famille, nous avons choisi l'espèce *Klebsiella pneumoniae* dans cette étude.

Ainsi notre stage, mené au laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire sur les entérobactéries notamment les souches de *Klebsiella pneumoniae* productrices de BLSE isolées au laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire de la Faculté de Médecine Fès, a pour objectifs principaux :

1. Etablir leur profil de résistance vis-à-vis les différentes familles d'antibiotiques selon les recommandations de la Société Française de Microbiologie.
2. Réaliser une caractérisation phénotypique et génotypique des isolats.
3. Déterminer les différents profils génotypiques de classe A codant pour les bêta-lactamases à spectre élargi.

Présentation du lieu de stage

Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire de la FMPF



Le laboratoire de recherche de Microbiologie et Biologie Moléculaire de la Faculté de Médecine et de pharmacie de Fès qui est chargé d'effectuer des recherches microbiologiques et génétiques, il reçoit des stagiaires et des doctorants chercheurs marocains ou étrangers. Notre stage, mené dans l'équipe de Microbiologie et Maladies Infectieuses du laboratoire sous la direction de professeur OUMOKHTAR Bouchra.

CHAPITRE 1 : Partie bibliographique

I. Les entérobactéries :

Les entérobactéries constituent un vaste groupe de bactéries de type bacille à gram négatif largement rencontrées dans la nature et au niveau du tube digestif de l'Homme, d'où le nom « entérobactérie ». Il s'agit d'un groupe hétérogène de bactéries qui peuvent être soit pathogènes (*Shigella*, *Yersinia pestis*), soit commensales (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella*), soit encore saprophytes (*Serratia*, *Enterobacter*). Elles sont généralement représentées par *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* qui sont responsables de nombreuses infections (urinaires, pulmonaires, septicémies ...) de gravité variable (**Odoro-Mensah et al., 2016**).

Les bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) est l'une des familles d'enzymes les plus fréquentes, découverte dans les années 80 en France, puis en Allemagne (**Samir Vora, 2009**), largement propagées et qui restent une préoccupation mondiale. Leur fréquence croissante, ainsi que leur évolution continuent, sont directement liées à la sélection par l'utilisation de différents β lactamines (**Peirano et al., 2019**). Il s'agit d'enzymes capables de dégrader et d'inactiver la majorité des β lactamines sauf les Carbapénèmes et les Céphamycines (**Sobhan Ghafourian., 2015**). Par conséquent, le clinicien se trouve obligé de choisir des antibiotiques plus puissants tel que les Carbapénèmes pour traiter les infections aux bactéries productrices des BLSE, ce qui pose un autre problème de l'émergence de carbapénémase qui sont des enzymes qui dégradent les Carbapénèmes provoquant une résistance des bactéries aux antibiotiques (**Sobhan Ghafourian., 2015**).

1. Définition

La famille des entérobactéries regroupe plusieurs genres et espèces. Ce sont en général retrouvés sous forme pathogène, soit sous forme commensal. L'appellation 'entérobactéries' a été donnée car tous ces germes sont en général des hôtes normaux ou pathologiques du système digestif de l'homme et des animaux. Les entérobactéries suivent en générale la définition suivante :

- Bacilles à GRAM négatif.
- Immobiles ou mobiles par la présence des flagelles.
- Température d'incubation est de 37°C, *Yersinia pestis* fait exception car elle peut pousser à une température de 25-30 °C jusqu'à 35 °C. **(Sbiti et al, 2017)**
- Aérobie-anaérobie facultatif.
- Fermentent le glucose avec ou sans production de gaz.
- Nitrate réductase positive.
- Oxydase négative.
- Catalase positive.
- Absence des spores. **(Tidrarine S, 2019)**

2. Taxonomie

Les entérobactéries appartiennent au règne des Bacteria, à l'embranchement des Protéobacteria, à la classe des Gamma-protéobacteria à l'ordre des Enterobacteriales et à la famille des Enterobacteriaceae. Actuellement plus de 100 espèces et 30 genres sont classés dans cette famille. Les espèces d'intérêt médical appartiennent à 12 genres : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, et *Yersinia*. Elles sont classées selon le tableau 1. **(Cattoir et al, 2016).**

Tableau 1 : les principales espèces d'entérobactéries d'intérêt clinique

Genre bactérien	Espèce bactérienne
Escherichia	E. coli, E. fergusonii, E. hermanii et E. vulneris
Klebsilla	K. pneumoniae, K. oxytoca, K. ozaenae
Enterobacter	E. cloacae, E. aerogens,....
Citobacter	C. freundii, C. koseri,.....
Proteus	P. mirabilis, P. vulgaris, P. penneri,..
Providencia	P. rettgerii, P. stuartii, P. alcalifaciens,...
Morganella	M. morganii
Serratia	S. marcescens
Salmonella	S. enterica, S. bongorii

3. Caractères microbiologiques

Caractères morphologiques

Toutes les espèces des entérobactéries sont des Bacilles à Gram négatif de 2 à 3 µm de long sur 0,6 µm de large. la majorité des espèces pathogènes pour l'homme possèdent des facteurs d'adhésion (fimbriae ou pili). la plupart de ces espèces sont mobiles par la ciliature péritriche. **(EL Mahi F, 2013)**

Caractères cultureux

Les entérobactéries poussent en général dans une température ambiante varie entre 35°C et 37°C en aérobie et en anaérobie, ils peuvent aussi croître dans une température de 20°C à 40°C pendant 24h d'incubation dans un bouillon ou sur une gélose ordinaire. **(Tidrarine S, 2019)**

Caractères biochimiques

L'identification des entérobactéries se fait grâce aux enzymes qu'elles possèdent en utilisant les galeries d'identification de type API 20E, après avoir fait le diagnostic de famille par l'étude des caractéristiques macroscopiques et microscopiques.

Caractères antigéniques

Les antigènes permettent de classer en sérotype les bactéries de même espèce ou genre. Les entérobactéries ont en général trois types d'antigènes: Ag **O** pour la paroi, Ag **H** pour le flagelle et Ag **K** pour la capsule. Tableau 2 annexe 1. (Cattoir et al, 2016).

II. ANTIBIOTIQUES

1. Généralités

Les antibiotiques sont des produits élaborés par des micro-organismes vivantes, peut y inclure les substances synthétiques ou semi-synthétiques obtenues par modification chimiques d'une molécule de base naturelle ayant les propriétés suivantes :

- Activité antibactérienne.
- Activité en milieu organique.
- Une bonne absorption et bonne diffusion dans l'organisme.

En formant une barrière contre les infections bactériennes les antibiotiques agissent par inhibition spécifique de certaines voies métaboliques de la bactérie. L'antibiotique possède une activité antibactérienne à faible concentration et n'ayant pas de toxicité pour l'hôte. (Nauciel et Vildé., 2005).

1.2 Mode d'action

Les antibiotiques agissent à l'échelon moléculaire au niveau d'une ou de plusieurs étapes métaboliques indispensables à la vie de la bactérie. Chaque famille d'antibiotique possède son site d'action propre :

-  Action sur la paroi bactérienne.
-  Action sur la structure de la membrane.
-  Action sur la synthèse protéique.
-  Action sur la synthèse de l'ADN.

🚦 Action sur le métabolisme de l'acide folique. (Laafifi et al, 2021).

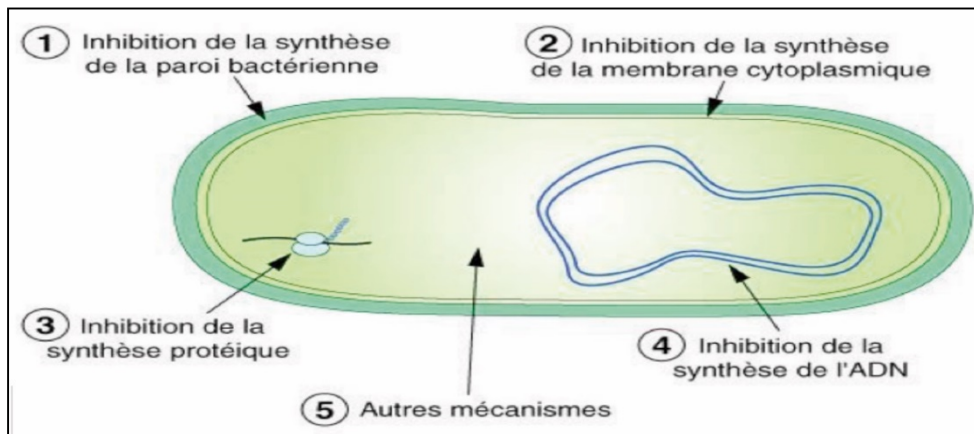


Figure 1 : mode d'action des antibiotiques. (Développement et Santé.net)

1.3 critères de classification

La classification des antibiotiques peut se faire selon :

- 🚦 Origine : élaboré par un organisme (naturel) ou produit par synthèse (synthétique ou semi synthétique)
- 🚦 Mode d'action : paroi, membrane cytoplasmique, synthèse des protéines, synthèse des acides nucléiques
- 🚦 Spectre d'activité : liste des espèces sur lesquelles les antibiotiques sont actifs (spectre étroit ou large)
- 🚦 Nature chimique : très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex : cycle β lactame) sur laquelle il y a hémi synthèse. (Mehamdia, et Mouassa., 2014).

2. Classification des antibiotiques selon le mode d'action. (Maulana Azad. 2019), (B. Demoré)

🌈 Antibiotiques inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi bactérienne.

Le tableau 3 ci- dessous résume les antibiotiques inhibant la biosynthèse de la paroi bactérienne.

Tableau 3: Antibiotiques qui inhibent la biosynthèse de la paroi bactérienne

Classe	Mécanisme d'action
Bêtalactamines	Ils se fixent sur les PLP et inhibent la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane
Glycopeptides	Ils se fixent sur le dipeptide DAla-DAla, et inhibe la synthèse du peptidoglycane à la dernière étape
Fosfomycine	Agit dans la phase cytoplasmique et inhibe la synthèse du peptidoglycane au début

🌈 Antibiotiques agissant au niveau des membranes (externe et cytoplasmique).

Le tableau 4 regroupe les antibiotiques qui attaquent la membrane de la bactérie.

Tableau 4: Antibiotiques agissant au niveau des membranes (externe et cytoplasmique)

Classe	Mécanisme d'action
Polymyxines	Agissent comme des détergents cationiques en utilisant leur caractère amphipathique, elles pénètrent dans la bactérie et s'insèrent parmi les phospholipides, ce qui perturbe la perméabilité membranaire

🌈 Antibiotiques inhibiteurs des synthèses protéiques.

Le tableau 5 montre les antibiotiques qui inhibent la synthèse des protéines

Tableau 5: antibiotiques inhibant la synthèse protéique

Classe	Mécanisme d'action
Aminosides	une altération de toutes les étapes de la synthèse des protéines en agissant par fixation sur l'ARN 16S, au niveau de la sous-unité 30S du ribosome bactérien
MLSK	une inhibition de l'élongation de la chaîne peptidique car Les macrolides se fixent sur la sous-unité 50S de l'ARN 23S des ribosomes bactériens
Acide fusidique	en se fixant au facteur EF-G d'élongation de la traduction il inhibe la synthèse protéique

🌈 Antibiotiques inhibiteurs des acides nucléiques.

Le tableau 6 regroupe les antibiotiques qui inhibent la synthèse des acides nucléique.

Tableau 6: Antibiotiques agissant sur la synthèse des acides nucléiques

Classe	Mécanisme d'action
Fluoroquinolones	Entraîne la mort rapide de la bactérie par l'inhibition de la transcription et la réplication de l'ADN par formation d'un complexe ADN-gyrase-quinolone indissociable, entraînant la mort rapide de la bactérie
Rifamycines	Ils ont un effet bactéricide en bloquant l'initiation de la transcription de l'ADN
Sulfamides	Les sulfamides inhibent la Dihydroptéroate synthétase

III. BETA-LACTAMINES

1. Définition

Les bêta lactamines constituent une famille d'antibiotiques très homogène au niveau structural, toutes caractérisées par la présence d'un cycle bêta-lactame indispensable à l'activité antibiotique, d'où le nom bêtalactamines. Ils sont aujourd'hui très nécessaires et fréquemment prescrits à cause de leur large spectre d'action, leur faible toxicité, leur efficacité et le faible coût de certaines molécules. (BUXERAUD et FAURE, 2016).

2. Mode d'action

Tous les antibiotiques de types bêta-lactamines réagissent en inhibant la croissance bactérienne par inactivation des enzymes (PLP ou Protéines liant la pénicilline en particulier les Trans peptidases) impliqués dans la fabrication du peptidoglycane. Lorsque l'antibiotique bêta lactame se soit fixé à la PLP, la réaction transpeptidation est inhibée, et par conséquent la synthèse du peptidoglycane est bloquée ce qui entraîne la mort cellulaire. (Nicolas et al, 2002).

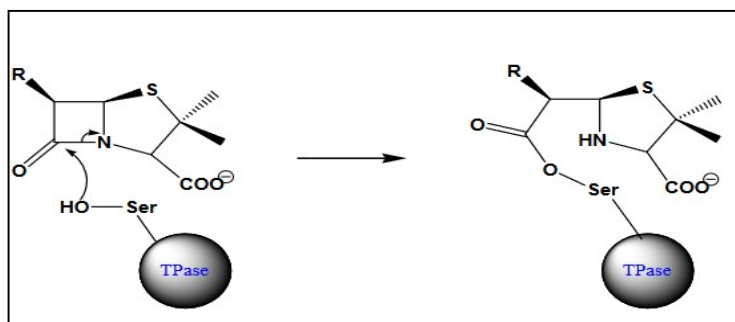


Figure 2: mode d'action des bêtalactamines

3. classification des bêta-lactamines

Dans les années 1975 à 1980 la production chimique des bêta-lactamines a augmenté avec la conservation du cycle bêta lactame qui est commun entre tous les composés de cette famille d'antibiotique. (Hutchings. 2019)

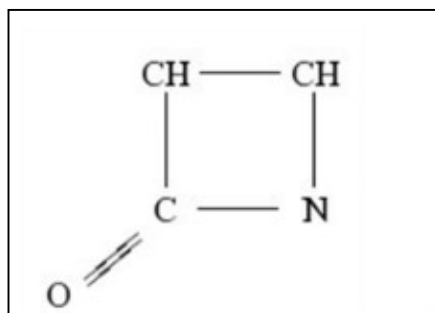


Figure 3: Cycle beta lactame

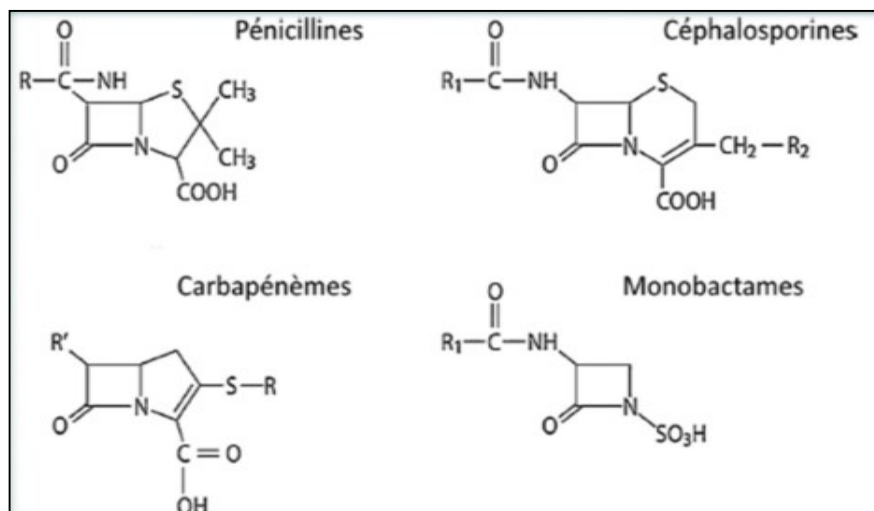


Figure 4: les différents groupes des bêta-lactamines

La famille des bêtalactamines regroupe les pénicillines, les céphalosporines, les Carbapénèmes et les Monobactames. Cette classification est fait selon la nature de l'hétérocycle accolé au cycle beta lactame. (**Tableau 7) (Cavallo et al, 2004)**

Tableau 7: Classification des bêtalactamines

Pénames	A partir de pénicilline G la synthèse chimique des autres sous classes a effectué
Dérivés de l'acide pénicillanique sulfone	Ce sont des inhibiteurs des BLSE de classe A, mais ne sont pas des antibactériens
Carbapénèmes	Sont des antibiotiques à large spectre ils comprennent, Doripénème, Etrapénèmes, Imipenème et Méropénème
Clavâmes	Sont des inhibiteurs5 acide clavulanique) des BLSE de classe A
Céphalosporines	Les céphalosporines sont divisés en 3 générations, avec une action à large spectre
Monobactames	Ne réagit que sur les bactéries gram négatif aérobie, exemple de l'Aztréonam qui est un AB à spectre étroit

IV. La résistance des bactéries aux antibiotiques

1. définition

La bactérie est dite résistante à un antibiotique donné quand elle est capable de se développer en présence d'une concentration élevée de cet antibiotique.

2. Mécanismes de résistances aux antibiotiques

Les bactéries résistent aux antibiotiques grâce aux trois mécanismes principaux:

Modification de la cible des antibiotiques et pompes à efflux :

Les cibles de l'antibiotique peuvent être modifiées ou remplacées de telle manière que l'antibiotique ne puisse plus les reconnaître, donc ne s'y fixe plus ou la cellule excrète l'antibiotique à l'extérieur en utilisant des pompes à efflux.

Synthèse d'enzymes inactivant les antibiotiques :

Des enzymes qui modifient le noyau actif de l'antibiotique, ce qui rends l'antibiotique incapable de se fixer sur sa cible.

Diminution de la perméabilité bactérienne aux antibiotiques :

En réduisant le nombre des porines, l'antibiotique n'arrive pas à pénétrer la cellule. (Roy, 1997)

3. Résistance naturelle

La résistance ou l'insensibilité intrinsèque existe chez toutes les bactéries de la même espèce ou du même genre de bactéries. Elle est stable, transmise à la descendance. Elle est programmée sur le génome bactérien. Les bactéries naturellement sensibles définissent le champ d'action des antibiotiques. (Courvalin, 2008)

4. Résistance acquise

La résistance acquise est un caractère qui ne concerne que quelques souches d'une espèce donnée. Elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérien, par l'acquisition des nouveaux gènes capables de rendre la bactérie résistante à un antibiotique ou à un groupe d'antibiotique. Ce nouveau gène peut être obtenu soit par mutation au niveau du chromosome donc on parle de **la résistance chromosomique**, soit par transfert d'ADN de plasmide ou de transposons dans ce cas on parle de **la résistance extra-chromosomique** ou **plasmidique** par plasmide dite "plasmide R" le plus fréquemment. Ce type de résistance procède de l'acquisition de gènes de résistance par l'intermédiaire d'un plasmide ou de transposons en appliquant 3 mécanismes d'échange possibles : conjugaison, transformation ou transposition.

Plasmides

L'information génétique est portée par des plasmides, transférables à d'autres bactéries par conjugaison, transduction ou transformation.

Transposons

Ce sont des fragments d'ADN "sauteurs" qui peuvent s'intégrer soit dans le chromosome soit dans des plasmides, en allant de l'un à l'autre. (Yala et al, 2001).

5. Résistance des entérobactéries aux bêta-lactamines

Les entérobactéries sont soit naturellement sensibles aux bêta-lactamines, soit elles possèdent une résistance intrinsèque, soit elles ont une résistance acquise. Celle-ci peut être introduite par une mutation chromosomique rarement ou par l'acquisition de matériel génétique, par exemple sous forme d'un plasmide le plus souvent. (Dr Samir Vora et Dr Raymond Auckenthaler, 2009)

5.1 Définition de BLSE

Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) sont une grande famille hétérogène d'enzymes bactériennes découvertes en France dans les années 1980, puis en Allemagne. Ils sont induits par des plasmides (fréquemment) ou par des mutations dans le génome natif de Klebsiella, codant pour la bêta-lactamase SHV. Les deux mécanismes donnent aux bactéries affectées la capacité d'hydrolyser une grande variété de bêta lactamine. La plupart des BLSE est le résultat de mutations des gènes codants pour les β -lactamases naturelles, en particulier les gènes TEM-1, TEM-2 et SHV-1. (Paterson et Bonomo, 2005)

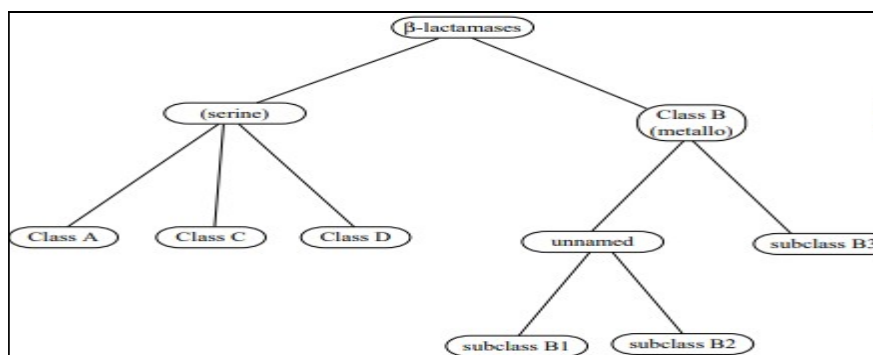


Figure 5: classification des bêtalactamases selon Ambler. (Revised Ambler)

La classification d'Ambler est fondée sur la séquence primaire en acides aminés d'éléments conservés du site actif. Elle divise ces enzymes d'inactivation en quatre groupes (A, B, C et D). Les enzymes des classes **A, C et D** sont dites à **sérine active** (type sérine). La classe **B** regroupe les **métallo- β -lactamases** (type métallo-enzymes), qui ont besoin d'ions Zn^{2+} .

5.2 Mécanismes de résistance aux bêta-lactamines

🌈 Modification de la cible

La modification des protéines cible liants la pénicillines (PLP) à cause des mutations au niveau des gènes chromosomiques codants pour d'autre PLP, ce qui change l'affinité des bêtalactamines aux PLP. ce mécanisme est rare chez les entérobactéries. (Neuwirth et al, 1995)

🌈 Mécanisme de l'imperméabilité

Les bêtalactamines se diffusent grâce à des canaux 'porines' pour rejoindre leur cible située à la surface de la membrane cytoplasmique, la diffusion est en fonction de la charge, le poids moléculaire et de la polarité des molécules. la modification ou bien la perte de ces porines empêche l'action des bêtalactamines. (Robin et al, 2012)

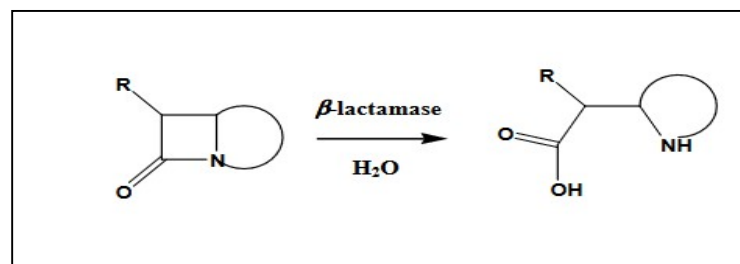


Figure 6 : l'hydrolyse du cycle beta-lactame par bêta-lactamase. (Oefner et al, 1990)

V. Epidémiologie

🚦 Prévalence

La prévalence des BLSE varie selon les régions et les établissements. Elles sont les plus élevées en Europe méditerranéenne plus de 20% et en Amérique du Sud en comparaison à l'Europe du Nord et aux Etats-Unis plus de 5%. En 2008, en Suisse, on constate 3,3% le taux de prévalence de souches de *E. coli* BLSE communautaires et à 4,6 % le taux des *E. coli* BLSE hospitalier. (Acoby GA, 2019).

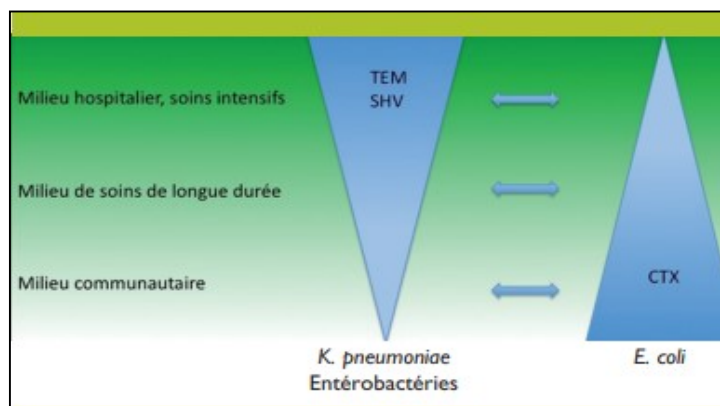


Figure 7: Répartition géographique ET circulation des différents sous-types de bêtalactamases à spectre élargi

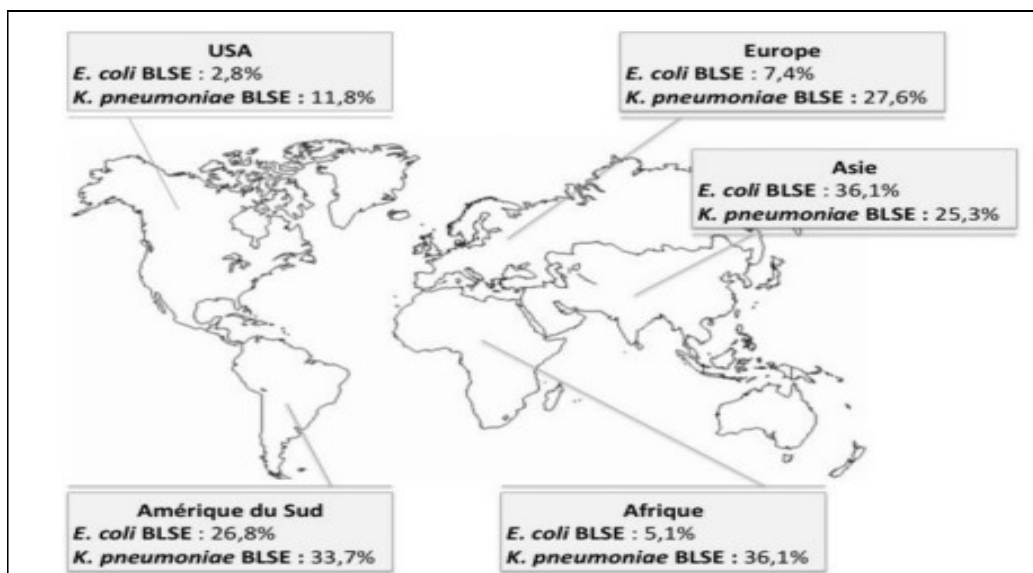


Figure 8: La prévalence des entérobactéries productrices des bêta-lactamases dans le monde (Vodovar et al., 2013)

Les données présentées sur la Figure 8 sont issues des réseaux internationaux de surveillance collectant des souches de bactéries provenant de prélèvements à visée diagnostique. Ces réseaux ne donnent pas de cartes précises de prévalence dans différentes parties du monde mais ont le mérite d'en donner un aperçu à grande échelle. Ces données montrent que les BLSE sont inégalement réparties dans le monde, par ordre décroissant Prévalence, Amérique du Sud, Asie-Pacifique, Europe et États-Unis. Il n'y a pas de données globales pour le continent africain, bien que des études régionales suggèrent une prévalence élevée. Ces chiffres seront également modulés au sein même de ces régions. Ainsi, en Europe, la prévalence des BLSE est significativement plus élevée dans les pays du Sud, avec un gradient croissant nord-sud. Au-delà de ces aspects descriptifs, ces réseaux confirment l'isolement constamment croissant de souches d'BLSE dans les prélèvements.

CHAPITRE 2: Partie pratique

I. Matériel et Méthodes

L'identification des isolats bactériens a été basée sur les caractères culturels, morphologiques et biochimiques. L'identification biochimique a été réalisée à l'aide de galeries prêtes à l'emploi API20E (bio-Mérieux SA, Marcy-l'Étoile / France). La sensibilité aux antibiotiques a été étudiée à l'aide de la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller Hinton en utilisant des disques antibiotiques et interprétée selon les recommandations du EUCAST / CA-SFM. Les souches bactériennes ont été classées en trois catégories cliniques : sensible (S), intermédiaire (I) et résistante (R). Les souches (I) ont été groupées avec les souches (R) pour l'ensemble des analyses. La détection phénotypique des entérobactéries BLSE a été réalisée par la méthode de test synergique à double disque sur milieu gélosé, utilisant l'association amoxicilline - acide clavulanique et différentes C3G (Céphalosporines de 3^{ème} génération). Le test est interprété positif si présence de phénotype de bouchon de champagne. Un échantillon de souches d'entérobactérie BLSE résistantes aux C3G et ayant un phénotype de bouchon de champagne sur milieu gélosé ont bénéficié d'une étude moléculaire à la recherche de gène de résistance.

1. METHODE PHENOTYPIQUE : Etude de la sensibilité aux antibiotiques

ANTIBIOGRAMME

- **Principe**

Le principe consiste à faire croître les bactéries en présence d'un ou plusieurs antibiotiques sur la gélose MH. Après incubation pendant 18h à 24h à une température de 37°C les zones d'inhibition sont mesurées et traduites selon leur diamètre par sensible (S), intermédiaire (I), résistante (R), selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de La Société Française de Microbiologie CASFM / EUCAST.

- **Culture des bactéries sur milieu TSA**

Par ensemencement simple sur le milieu TSA à partir des isolats, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

- **Préparation de l'inoculum**

A partir de notre culture on réalise une suspension bactérienne dans un tube contenant 1ml d'eau distillé pour atteindre une turbidité équivalente à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de McFarland ce qui correspond à un inoculum d'environ $1 \text{ à } 2 \times 10^8$ UFC/ML. Écouvillon en coton

- **Préparation de Gélose Mueller-Hinton**

Dilution de milieu MH lyophilisé dans l'eau distillé puis autoclavé à une température de 121°C. Répartition du milieu en boîtes de Pétri stériles de façon à obtenir une épaisseur de $4 \text{ mm} \pm 0.5 \text{ mm}$ La surface des boites doit être séché avant l'utilisation.

- **Inoculation des géloses**

Plonger un écouvillon en coton stérile dans la suspension bactérienne et éliminer l'excès de liquide en tournant l'écouvillon sur les parois du tube. Il est important de rejeter l'excès de liquide pour éviter une sur-inoculation des boîtes, en particulier pour les bactéries à Gram négatif. Ecouvillonner sur la totalité de la surface de la gélose dans trois directions ou en utilisant un ensemencer rotatif puis on dépose les disques d'antibiotiques. Tableau 9, annexe 3.

2. METHODE GENOTYPIQUE Préparation des matrices d'ADN à partir des isolats de KLEBSILLA pneumoniae (Kp) pour l'étude génotypique par PCR

Préparation de milieu de culture TSA

On additionne la poudre lyophilisée du milieu de culture dans l'eau stérile selon les recommandations du fabricant, la solution préparée est autoclavé dans l'autoclave à une température de 121°C, puis on l'écoule dans des boites de pétri et on attend à solidifier.

Culture des isolats sur milieu TSA

Ensemencement simple à partir des isolats Kp (milieu liquide : TSA broth+glycerol) sur milieu TSA (solide) dans des boîtes de pétri. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h.

Extraction d'ADN par choc thermique

La préparation des matrices d'ADN pour la PCR est une étape essentielle et délicate qui vient avant l'étude moléculaire proprement dite. Cette étape est très importante parce qu'elle conditionne la qualité de l'échantillon et donc affecte les résultats ; toutes contaminations (introduction d'autres fragments d'ADN) peuvent facilement fausser les résultats d'où la nécessité d'être prudent et de bien veiller à respecter les bonnes pratiques.

L'ADN a été extrait à partir de cultures fraîches par méthode de choc thermique en utilisant le protocole suivant :

On prélève des colonies (5 colonies) à partir des boîtes de culture qu'on a déjà réalisées dans des tubes contenant l'eau stérile, puis on vortex les tubes.

Le principe de l'extraction d'ADN par choc thermique consiste à mettre les tubes dans le bain-marie à 95 °C jusqu'à 100 °C pendant 10 min après vortex, puis on déplace les tubes sur la glace à une température inférieure à 0°C. on fait la centrifugation des tubes pendant 2min à 14000 rpm. Le surnageant est récupéré dans des tubes Eppendorf stériles et conservé à -20 °C.

Amorces utilisées pour la détection des BLSE

Seuls les trois types de BLSE, communément produits par les entérobactéries et identifiées en pratique médicale, étaient recherchés (CTX-M, SHV et TEM). Le Tableau 8 précise les séquences nucléotidiques des différentes amorces utilisées pour notre étude génotypique, ainsi la taille de l'amplicon (pb):

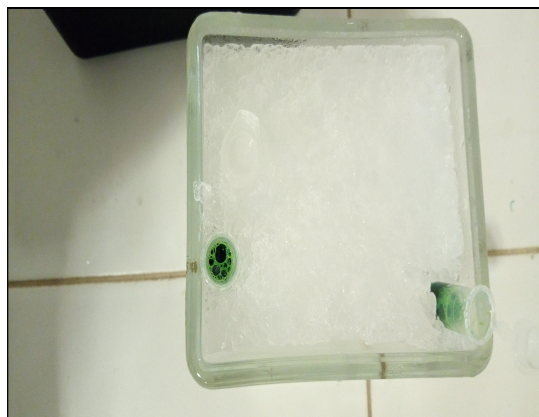
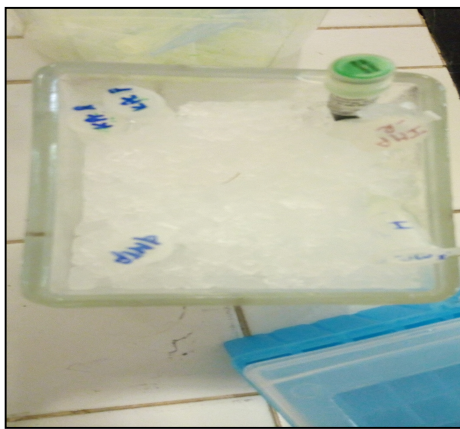
Tableau 8: liste des amorces utilisées pour l'amplification

Gene	Amorces	séquence d'amorce (5'-3')	Programme thermo-cyclage	TSA (pb)	Références
<i>Bla_{SHV}</i>	OS-5	CGCCGGGTTATTCTTATTTGTCGC	Dénaturation : à 95 °C pdt 5 min, suivi par 30 cycles à 95 °C pdt 1 min,	795	(Barguigua et al., 2011)
	OS-6	TCTTTCCGATGCCGCCGCCAGTCA		795	
<i>Bla_{TEM}</i>	A-216	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA		1079	(Barguigua et al., 2011)
	A-217	GACAGTTACCAATGCTTAATCA		1079	
<i>Bla_{CTX-M-1}</i>	Ctx M1(+)	GGTTAAAAAATCACTGCGTC	Hybridation : à 60 °C pdt 1 min pour les CTX-M et SHV ou à 52 °C pdt 1 min pour les TEM	863	(Barguigua et al., 2011)
	Ctx M1(-)	TTGGTGACGATTTTAGCCGC		863	
<i>Bla_{CTX-M-9}</i>	Ctx M9(+)	ATGGTGACAAAGAGAGTGCA	Extension : à 72 °C pdt 1 min, temps final d'extension à 72 °C pdt 7 min.	869	(Barguigua et al., 2011)
	Ctx M9(-)	CCCTTCGGCGATGATTCTC		869	

- **Réaction PCR**

- ✚ **Préparation du MIX PCR**

Pour un volume de 50 μl , dans le tube on ajoute 33.3 μl d'eau stérile, 7.5 μl de MgCl_2 , 1 μl de dNTP (Désoxynucleotides triphosphate), 2 μl amorce (sens), 2 μl amorce (anti-sens), 0.2 μl Taq ADN polymérase et 4 μl d'ADN bactérien. Tous ces volumes seront multipliés à l'ordre 4, car on a utilisé 4 souches de Kp. La préparation se fait sur la glace pour éviter la dégradation de la Taq polymérase.



Figures 9 et 10 préparation du MIX PCR

- ✚ **L'amplification dans le thermocycleur ou cycleur**

C'est un appareil qui permet d'automatiser la réaction PCR par la programmation des cycles consécutifs et régler la température pendant un temps de 2 heures pour notre réaction. Puis on fait la migration par électrophorèse.

- ✚ **Électrophorèse sur gel d'agarose**

- ✚ **Préparation de 1X TBE (Tris-Borate-EDTA) électrophorèses buffer**

Pour préparer 500ml de tampon TBE 1X, on a pesé 54 g de base Tris, 27.5 μl d'acide borique, 2.92 μl d'EDTA anhydre. Les transférer dans un bécher/fiole conique de 1L. et on ajoute 400ml d'eau distillé et dissolvé tous les ingrédients en les mélangeant vigoureusement à l'aide d'un agitateur magnétique. (Sanderson et al., 2014).

Préparation du gel d'agarose

En utilisant 100µl de 1X TBE pour dissoudre 1g d'agarose puis on chauffe la solution jusqu'à ébullition dans le four micro-ondes, On rajoute quelques microlitres de Bromure d'éthidium qui est un agent intercalant de l'ADN capable donc de se lier à l'ADN et qui va le rendre fluorescent sur lumière UV. Une fois le mélange préparé il a versé dans un plateau de support où il se solidifié lorsqu'il refroidit, Le gel est ensuite placé dans une cuve d'électrophorèse horizontal est équipé de deux électrodes est submergée dans le tampon de migration TBE.

La migration électrophorétique

On va utiliser une micro pipette pour prélever les cinq échantillons puis on va le déposer délicatement dans le gel en se plaçant à la verticale dans les puits.

Le principe de la migration électrophorétique repose sur la migration des acides nucléiques chargés négativement dans un courant électrique de 10 volts. La séparation se fait selon la taille et la charge des acides nucléiques.

II. Résultats et discussion

II-1 Résultat de la Réaction PCR

Après 20 min de migration électrophorétique, le gel d'agarose est visualisé sous la lumière UV. **Figure 11**

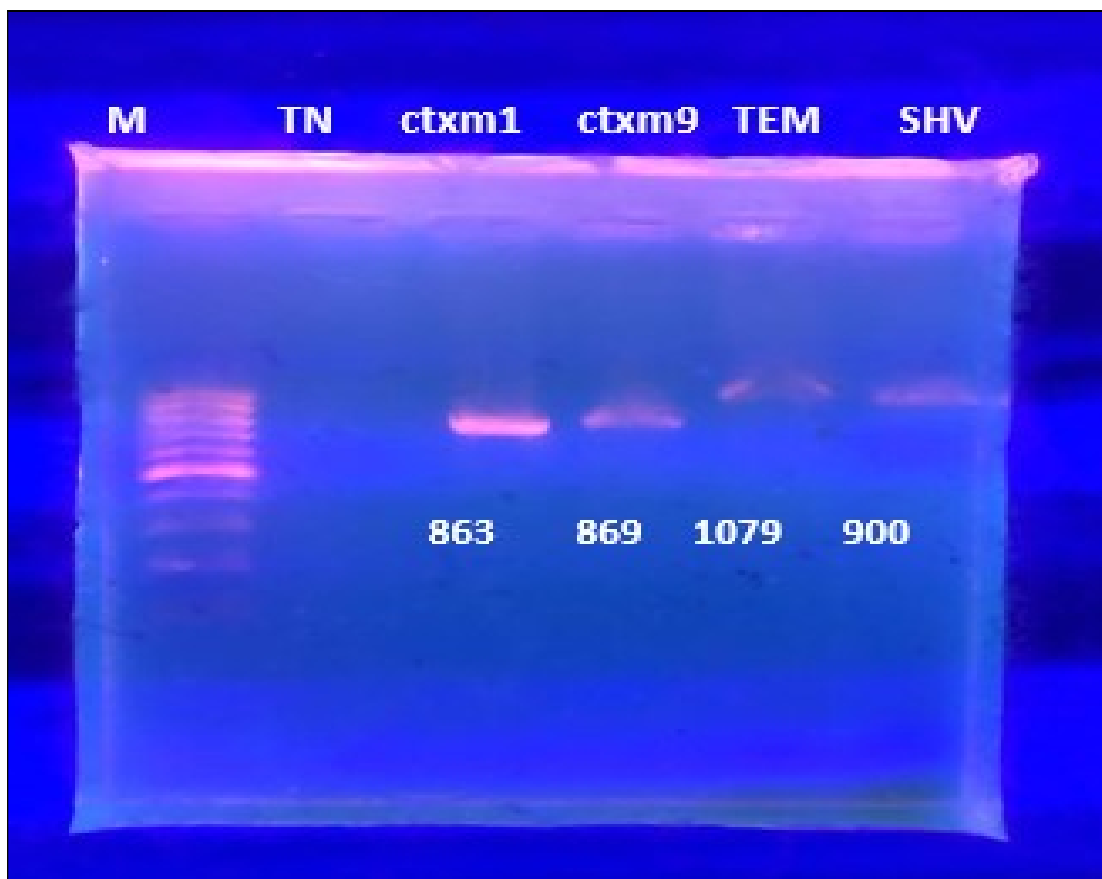


Figure 11: photo réel de la migration électrophorétique au niveau de laboratoire de microbiologie à FMPE. (* chaque bande du marqueur de taille est de 100pb)

II-2 Interprétation :

Le marqueur de taille (M) utilisé est de 100 pb, chaque bande représente 100pb. Le témoin négatif (TN) indique l'absence du gène d'intérêt. La bande 863 pb correspond au CTX-M1 (Cefotaximase-Munich) c'est une bande plus intense ce qui explique que la concentration d'ADN est plus importante. Les CTX-M9 migrent jusqu'à 869pb avec une bande moins intense. La bande des TEM (Temoneira - nom du patient) migre jusqu'à 1079 pb avec une faible intensité. Ces trois bandes représentent les bandes spécifiques des EBLSE CTX-M1, CTX-M9 et les TEM. Les SHV (Sulfhydryle variable) ont une bande de 900pb avec une faible intensité, les shv ont une bande spécifique de 795 pb, cependant ce n'est pas le cas pour nous donc cette bande n'est pas spécifique pour shv.

II-3 Résistance de Kp aux antibiotiques

La visualisation des zones d'inhibitions autour les disques d'antibiotiques après une incubation de 18h à 24h à 37°C.



Figure 12: Souche Kp2

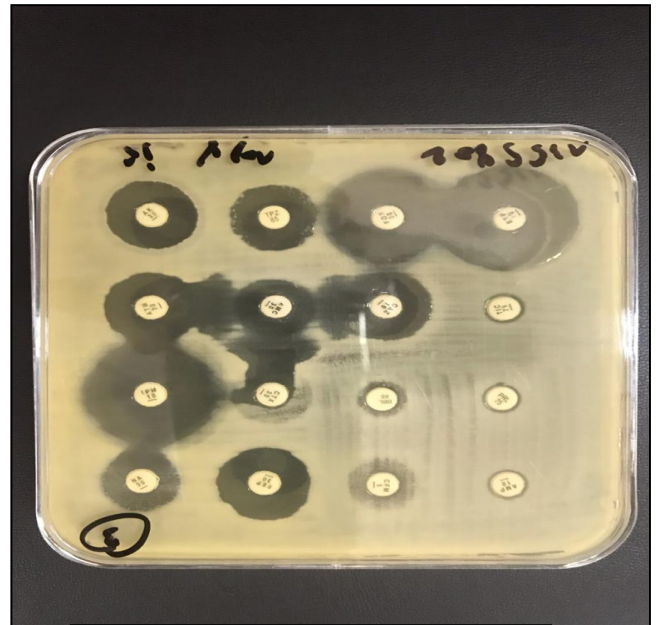


Figure 13 : Souche Kp1

📊 Lecture des deux antibiogrammes

Après un contact d'au minimum 18h entre les deux bactéries et les antibiotiques sur le milieu nutritif on a observé et mesuré s'il y a des zones d'inhibitions autour les disques d'antibiotiques. Si la bactérie a réussi à croître en présence de l'antibiotique, elle est résistante à cette antibiotique et on note 'R' et si la bactérie n'a pas réussi à se multiplier, elle est sensible pour cette antibiotique et on note 'S'. Tableau 9.

Tableau 9 : résultats de la lecture des deux antibiogrammes

Antibiotique	Souche Kp ₁	Souche Kp ₂
PRL	R	R
TPZ	S	R
AMC	R	R
TIC	R	-
TCC	R	R
AMP	R	R
FOX	R	R
CAZ	R	R
CTX	S	R
CFM	R	R
IPM	S	S
ETP	R	S
NA	-	S
FEP	S	S
ATM	S	R
AK	S	S

🌈 La souche Kp₁ est résistante à la famille des pénicillines PRL, TIC, AMP, AMC, TCC, cependant l'association de l'AB pénicilline avec le tazobactam rend la bactérie sensible, mais ce n'ai pas le cas pour les AMC et BBL qui sont deux types de pénicillines associés avec un inhibiteur de bêtalactamases du premier class A. la bactérie reste résistante aux céphalosporines de 2ème génération FOX et CAZ et aux

céphalosporines de 3ème génération CFM mais sensible aux CTX de la même génération, pour la famille des Carbapénèmes la souche est sensible aux IPM et résistante aux ETP. L'espèce *Klebsiella pneumoniae* dans ce test de sensibilité est sensible aux FEP, ATM, AK qui sont des AB des familles quinolones, Monobactames et aminosides.

🚦 La souche Kp₂ est résistante aux antibiotiques de la famille des pénicillines PRL, TPZ, TIC, AMC et TCC, ainsi aux AB de la famille des céphalosporines FOX, CAZ, CTX et CFM, mais reste sensible aux antibiotiques des familles Carbapénèmes, quinolones et aminosides. Cependant elle a développé une résistance contre ATM de la famille des Monobactames. On observe selon le test de synergie entre les deux antibiotiques de la famille céphalosporines de 3ème génération (CAZ et CTX) et l'acide clavulanique (AMC) une augmentation de la zone d'inhibition autour des AB CTX et CAZ. C'est l'apparition du bouchon de champagne.

Discussion

La méthode de détection génotypique par réaction PCR nous a montré la présence des gènes codants pour les enzymes BLSE chez *Klebsiella pneumoniae*, la technique a mis en évidence l'occurrence des gènes suivants :

- BlaCTXM-1, blaCTXM-9 sont des gènes qui ont un haut niveau pour hydrolyser les Céfotaxime.
- BlaTEM sont capable d'hydrolyser les pénicillines et la génération 1 des céphalosporines.
- BlaSHV qui n'est pas spécifique dans notre expérience

Cette résultat est en accord avec une étude de **(Dehshiri et al., 2018)** et **(Eftekhar et al. In 2012)** qui ont montré la présence de ces trois gènes blaCTX, blaTEM et blaSHV. Cependant les taux de la prévalence de ces gènes codants pour les BLSE sont différents selon le pays et parfois les différentes parties de chaque pays, et dépend de la matière d'antibiotique utilisé dans chaque pays.

La méthode phénotypique qui est basée sur la sensibilité aux antibiotiques montre une résistance pour les pénicillines Pipéracilline "PRL", Ticarcilline "TIC", et Ticarcilline+Acide clavulanique "TCC" mais on a remarqué la résistance pour Amoxicilline + acide clavulanique "AMC". Une résistance aux Céfoxitine "FOX" et Ceftazidime "CAZ" et Céfixime "CFM" mais sensible aux Céfotaxime "CTX". La souche sensible aux Imipénèmes "IPM" et résistante aux Etrapénèmes "ETP". Sensible aux Péfloxacine "FEP", Aztréonam "ATM", Amikacine "AK" qui sont des AB des familles quinolones. Ces résultats montrent que la souche Kp₁ est pénicillinase et céphalosporinase de haut niveau.

Sur la base de la lecture de l'antibiogramme et l'aspect du test de synergies entre C3G, C4G et inhibiteur AMC montre (bouchon de champagne) montre que la souche Kp₂ a une forte résistance aux pénicillines PRL, TPZ, TIC, AMC et TCC, ainsi aux AB de la famille des céphalosporines FOX, CAZ, CTX et CFM. Sensible aux AB des familles Carbapénèmes, quinolones et aminosides.

Ces résultats de test de sensibilités sont confirmés par une autre étude de **(Hamouche, 2012)** en montrant une diminution de la sensibilité aux CTX et TPZ.

Conclusion

Dans ce travail nous avons détecté les gènes codants pour les enzymes bêtalactamases de classe A par la méthode génotypique la réaction PCR, ainsi la réalisation des antibiogrammes pour tester la sensibilité de la souche *Klebsilla pneumoniae* aux antibiotiques.

Notre travail confirme la présence des gènes (CTX-M, SHV, TEM) codants pour la résistance des entérobactéries en particulier l'espèce *Klebsiella pneumoniae* aux bêtalactamines. En effet la sensibilité de l'espèce *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques montre la présence des BLSE qui ont pour le rôle d'hydrolyser la majorité des antibiotiques de la famille des bêtalactamines en particulier les pénicillines, les céphalosporines de 2eme et 3eme génération, les Carbapénèmes, les quinolones et les Monobactames.

L'acquisition des mécanismes de résistances chez les entérobactéries pose un grand problème à l'échelle mondial car ces bactéries font une partie de la flore commensale.

Une véritable prise de conscience est nécessaire pour limiter ou enrayer l'utilisation incontrôlée des antibiotiques par l'homme afin de réduire la dissémination des BLSE.

Références Bibliographiques

Acoby GA, Munoz-Price, 2019. Extended-spectrum bêta-lactamases.

Abouddihaj Barguigua, 2011. Characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from the community in Morocco.

Carole et al., 2018. Eugénisme: corriger la nature.

B. Demoré. Pathologie infectieuse Partie VIII Coordinateur.

Bêtalactamases à spectre élargi - Revue Médicale Suisse.pdf.

Cattoir, Vincent, et al. 2016. Bactériologie médicale: Techniques usuelles. Elsevier Health Sciences.

Cavallo, J. D., et al. 2004 « Bêtalactamines ». EMC - Maladies Infectieuses, vol. 1, n° 3, août 2004, p. 129-202. ScienceDirect.

Courvalin, Patrice. 2008 « La résistance des bactéries aux antibiotiques : combinaisons de mécanismes biochimiques et génétiques ». Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France, vol. 161, n° 1.

Dehshiri et al., 2018. The frequency of *Klebsiella pneumoniae* encoding genes for CTX-M, TEM-1 and SHV-1 extended-spectrum beta lactamases enzymes isolated from urinary tract infection.

Développement et Santé | Antibiotiques : modes d'action, mécanismes de la résistance. <https://devsante.org/articles/antibiotiques-modes-d-action-mecanismes-de-la-resistance>.

Eftekhar et al. En 2012. Detection of Extended Spectrum B-Lactamases in Urinary Isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Relation to Bl_{SHV}, Bl_{TEM} and Bl_{CTX-M} Gene Carriage.

Faraj, Professeur Abdelmalek. « UNIVERSITE MOHAMMED V- SOUSSI FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT ». Médecine Interne, p. 158.

Hamouche, 2012. Évolution de la sensibilité aux antibiotiques de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* dans un CHU de Beyrouth entre 2005 et 2009.

Jacques BUXERAUD Sébastien FAURE Les bêtalactamines, 2016). Les bêtalactamines - ScienceDirect.

Laafifi, Amina, et al. 2021. Enterobacteries BÀ-lactamases a spectre etendu EBLSE.

Matthew I Hutchings, Andrew W Truman and Barrie Wilkinson Antibiotics, 2019: Past, Present and Future | Elsevier Enhanced Reader.

Naima, Mehamdia, et Mouassa Selma. 2014. Mécanismes de la résistance aux antibiotiques.

Nauciel C, Vildé J.L. (2005). Bactériologie médicale 2 édition. Page 45.

Neuwirth, Catherine, et al 1995. « Imipenem resistance in clinical isolates of *Proteus mirabilis* associated with alterations in penicillin-binding proteins ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 36, n° 2, 335-42. Silverchair.

Nicolas, Jean-François, 2002 et al. Immunologie clinique et allergologie: compte rendu du séminaire 2002, Faculté de médecine, CHU Lyon-Sud, 30 et 31 mai 2002. John Libbey Eurotext.

Oduro-Mensah et al., 2016 « Genetic characterization of TEM-type ESBL-associated antibacterial resistance in Enterobacteriaceae in a tertiary hospital in Ghana », *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, vol. 15, no 1, p. 29, déc. 2016, doi: 10.1186/s12941-016-0144-2.

Oefner, C., et al 1990. « Refined Crystal Structure of β -Lactamase from *Citrobacter freundii* indicates a Mechanism for β -Lactam Hydrolysis ». *Nature*, vol. 343, n° 6255, 6255, p.

Paterson, David L. et Robert A. Bonomo. 2005 « Extended-Spectrum β -Lactamases: à Clinical Update ». *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 18, n° 4, p. 657-86. journals.asm.org (Atypon).

Peirano et J. D. D. Pitout. 2019. Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Update on Molecular Epidemiology and Treatment Options », *Drugs*, vol. 79, no 14, p. 1529-1541, sept. 2019, doi: 10.1007/s40265-019-01180-3.

Maulana Azad. Pharmacologique Classification Of Drugs.2019 (Anglais. Sixte Edition, Jappée Brother Médical Publisher.

Révisé Ambler classification of β -lactamases | *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* | Oxford Académique.

Robin, Frédéric, et al. 2012 « Résistances naturelles et acquises aux β -lactamines chez les entérobactéries : comment les identifier en pratique quotidienne ? » *Revue Francophone des Laboratoires*, vol. 2012, n° 445, *, p. 47-58. DOI.org (Crosser).

Roy, P. H. 1997 « Dissémination de la résistance aux antibiotiques : le génie génétique à l'œuvre chez les bactéries ». *M/S. Médecine sciences*.

Samir Vora, Dr Raymond Auckenthaler,2009, Que signifie « bêtalactamases à spectre élargi » en pratique?

Sanderson et al., 2014. Modification of gel architecture and TBE/TAE buffer composition to minimize heating during agarose gel electrophoresis. *Anal Biochem.* 454, 44-52. PMID-[24637158](#); Full-Text Links: [Sciencedirect](#), [PMC4021863](#).

Sbiti, Mohammed, et al 2017. « Profil Épidémiologique Des Entérobactéries Uropathogènes Productrices de Bêta-Lactamases à Spectre Élargi ». *Pan African Medical Journal*, vol. 28, n° 1.

Sobhan Ghafourian, Nourkhoda Sadeghifard, et Sara Soheili, Zamberi Sekawi. 2015. Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology », *Curr. Issues Mol. Biol.*, 2015, doi: 10.21775/cimb.017.011.

Tidrarine S., (2019). Epidémiologie des entérobactéries multirésistantes productrices de carbapénémase à le HIT. Thèse de doctorat : en Médecine. Université de Cadi Ayyad, 24-25p.

Vodovar et al., 2013. Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi : épidémiologie, facteurs de risque et mesures de prévention Enterobacteriaceae producing extended spectrum bêta-lactamase: Epidemiology, risk factors, and prevention.

Yala, D., et al, 2001, Résistance bactérienne aux antibiotiques. p. 2.

Annexe 1

Tableau 2: les différents types d'antigènes

Antigènes O	Antigènes de la paroi, toujours présents, sont des antigènes somatiques.	-Composition LPS. - thermostables -Agglutination granulaire lente - difficilement dissociable
Antigènes H	Ag flagellaires si la bactérie est mobile	-Thermolabile -Flagelline, agglutination par les flagelles.
Antigènes K	Ag de surface	-Ag de capsule si souche capsulée, de nature polysaccharidique (virulence) -Ag d'adhérence -Agglutination granulaire stable lente. -Antigène O inaccessible

Annexe 2

Pendant la durée de stage on a appris plusieurs techniques :

- Technique d'ensemencement sur un milieu solide par épaissement :

C'est la technique de 4 quadrants pour obtenir des colonies isolées, Antibiogramme on réalise des stries serrées à l'aide d'un écouvillon, on a réalisé aussi des ensemencements en milieu incliné en pente, ensemencement par piqure centrale et ensemencement en profondeur qui consiste à mettre le produit à analyser et rajouter la gélose dessus refroidie à 45°C, laisser se solidifier et incubé.

- La préparation des milieux de culture

Les milieux de cultures sont indispensables à la multiplication bactérienne, ce qui permet par la suite l'identification ainsi que l'étude de la sensibilité aux antibiotiques lorsque la bactérie est isolée en culture pure.

Un milieu de culture est une préparation au sein de laquelle des micro-organismes peuvent se multiplier. Il doit donc satisfaire les exigences nutritives du micro-organisme étudié et posséder les propriétés physico-chimiques convenant à cette culture :

- Couvrir les besoins en ions minéraux, en facteurs de croissance, apporter la source de carbone, d'énergie et d'azote.

- Présenter un pH voisin au pH optimal, une pression osmotique et une viscosité Adéquate.

La plupart de ces milieux microbiologiques sont produits par les principaux fournisseurs de milieux déshydratés. Ceux-ci comprennent tous les milieux normalement utilisés dans le laboratoire de diagnostic de microbiologie clinique et pour l'examen de routine des aliments et de l'eau.

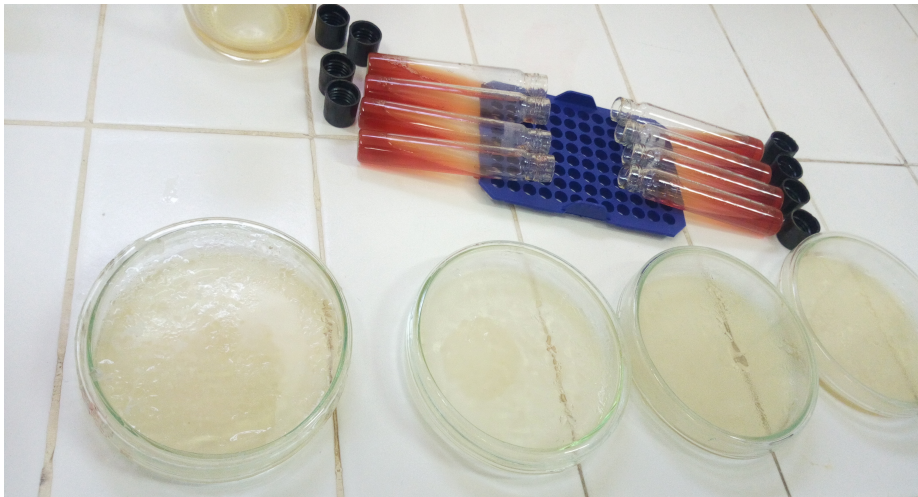
On a préparé les milieux de cultures à partir d'une poudre lyophilisée et la diluer dans l'eau distillée stérile. Puis on fait l'écoulement de ces milieux en boîte de pétri ou dans des tubes.

Les milieux de cultures qu'on a préparés sont :

- TSA (Tryptone Soy Agar) : La gélose tryptone soja aussi appelé gélose tryptocaseïne soja ou gélose trypticase soja est un milieu de culture utilisé en microbiologie pour des bactéries peu exigeantes aérobies et anaérobies. Ce milieu existe aussi sans agar sous forme de bouillon comme milieu d'enrichissement.

- Le milieu de Hajna-Kligler :

Ce milieu d'identification permet de mettre en évidence : la fermentation du glucose avec ou sans production de gaz, la dégradation du lactose, la production de H₂S. Il permet aussi la recherche de la β -galactosidase en 2ème jour.



MILIEUX TSA et Hajna-Kligler

- La gélose Mueller-Hinton :

La gélose Mueller-Hinton est un milieu solide standardisé recommandé pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux agents antimicrobiens par la méthode de diffusion ou de dilution en gélose.

On a réalisé la technique de filtration sur membrane et un test d'endotoxines à des prélèvements des eaux de dialyse.



Filtration sur membrane

