

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Constantine



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Microbiologie

Mémoire Présenté pour l'Obtention on du Diplôme de Master en Microbiologie
Option : Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes

**Thème : Phylogénie Moléculaire et Diagnostic des
Souches Hospitalières**

Présenté par :

BESTANDJI MOUNIRA

FANTAZI DOUNIA

Soutenu le : 26 / 06 / 2014

Jury de soutenance :

Présidente : LAHLAH F.

Maître Assistante Université Constantine 1.

Encadreur : MEZIANI M.

Maître Assistante Université Constantine 1.

Examinatrice : BELMESIKH F.

Maître Assistante Université Constantine 1.

Année Universitaire : 2013-2014

REMERCIEMENTS

Avant tout, nous remercions le Dieu tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et les moyens à fins de pouvoir accomplir ce modeste travail.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre encadreur mademoiselle Meziani Meriem maître assistante à l'université Constantine 1, qu'elle nous soit permise de la remercier vivement, et lui exprimer notre profonde gratitude pour l'aide précieuse et les conseils qu'elle nous sans cesse prodigué afin de mener à terme ce travail.

Nous remercions aussi les membres de jury qui nous ont fait l'honneur d'accepter le jugement de notre travail.

Melle **Lahlah F** . Maître assistante à l'université de Constantine 01. Vous me faites le grand honneur de présider ce jury .

Melle **Belmesikh A** Maître assistante à l'université de Constantine 01.

Nous vous remercions de nous honorer par votre présence.

Notre sincère reconnaissance à nos enseignants du département : microbiologie et biochimie et ainsi tous notre enseignants depuis le primaire.

Enfin Nous remercions tous ceux qui ont contribué de pré ou de loin à l'élaboration de ce modeste travail, trouvent ainsi l'expression de notre profondes gratitude et respects.

DOUNIA ET MOUNIRA

Dédicaces

j'ai toujours pensé faire ou offrir quelque chose à mes parents en signe de reconnaissance pour tout ce qu'ils ont consenti comme efforts, rien que pour mes voir réussir, et voilà , l'occasion est venue .

Je dédie ce présent mémoire :

A ma seule raison de vivre, ma très chère maman **Hayat** , ma première et dernière école.

A l'homme qui j'ai toujours aimé et respecté, à mon très cher père **Saïd**

Qui m'on soutenu moralement et matériellement pour l'acquisition de ce travail.

A mes sœurs **Hanane, Karima, Yasmine** et **Radia**.

A mon beau frère **Fouad** et sa famille **Debbah**.

A mon neveu **Louai Siradj Eddine**

A mon binôme **Mounira** et toute sa famille

ainsi qu'a toute la famille **Fantazi** et **Benathemene** Sans oublier mon très cher oncle Salim (Rabi yarehmek)

A toutes mes collègues **Layla ,Lamai, Hanane, Radia, Sana, Naima, Sadjea** et **hadjer** . A ma meilleure amie **Kouki**

Dounia

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite

Avec tout mon amour éternel et avec l'intensité de mes émotions. Je dédie ce mémoire

A l'âme de mon cher père **Hansali** , J'espère que tu habites les paradis.

A ma très chère mère **Hayet** : Tu représentes pour moi le symbole du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi

A ma précieuse sœur **Amel**, les mots ne peuvent résumer ma reconnaissance et mon amour à ton égard

A mes tantes et à mes oncles.

A chaque cousins et cousines.

A mon binôme : **Dounia** et toute sa famille

Ainsi qu'a toute la famille **Bestandji** et **Bouranene**

A tous mes amies : **Asma** , **Rima** , **Rayen**.

Mounira

TABLE DES MATIERES

PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1: BIOLOGIE DES GERMES	2
1 Définition et caractéristiques principales des des Entérobactérie.....	2
1.1. Position taxonomique.....	2
1.2. Les caractères bactériologiques.....	3
1.2.1 Les caractères morphologiques.....	3
1.2.2 Les caractères cultureux.....	4
1.2.3 Les caractères antigéniques.....	4
1.2.4 Les caractères biochimiques.....	4
2. Définition et caractéristiques principales des Staphylocoques.....	6
2.1. Définition.....	6
2.2. Historique.....	6
2.3. Classification.....	6
2.4. Caractères morphologiques et structuraux.....	7
2.5. Caractères cultureux.....	8
2.6. Caractéristiques biochimiques.....	8
3 Tests biochimiques discriminant les bactéries	9
3.1 Mise en évidence du type respiratoire.....	9
3.2. 3.2. Recherche de la catalase.....	10
3.3 Recherche de l'oxydase.....	10
3.4 Recherche de la nitrate-réductase.....	11

3.5 Les tests biochimiques du catabolisme des glucides.....	11
3.5.1 Etude de la voie d'attaque des glucides.....	11
3.5.2 Milieux glucidiques pour bactéries fermentatives.....	12
3.5.3 Milieu mannitol-mobilité.....	15
3.5.4 Le milieu RM- VP (bouillon Clark et Lubs).....	16
3.5.5 L'utilisation du citrate de sodium.....	16
3.6 Les tests biochimiques du catabolisme des protéines.....	16
3.6.1 La désamination.....	16
3.6.2 La décarboxylation.....	17
3.7 Milieu urée-indole.....	17
3.7.1 Recherche de l'uréase	18
3.7.2 Recherche de l'indole.....	18
3.7.3 Test TDA.....	18
4 .La résistance aux antibiotiques Définition.....	18
4.1. Définition.....	19
4.2. Classe des antibiotiques.....	19
4.3. Mécanismes d'action des antibiotiques.....	19
CHAPITRE 2: APPROCHES TAXONOMIQUES ET PHYLOGENIE.....	21
1. Définition.....	21
2. Les différentes approches taxonomiques.....	21
2.1. Taxonomie phénétique	21
2.2. Chimiotaxonomie	22
2.3. Taxonomie moléculaire	22

2.4. Taxonomie numérique.....	22
3 .Phylogénie et méthodes de construction des arbres	25
3.1. Définition.....	25
3.1.1.Méthodes cladistiques	25
3.1.2. Méthodes phénétiques.....	25
4.Les algorithmes phylogénétiques.....	26
4.1.La méthode UPGMA.....	26
4.2. La méthode NJ.....	26

PARTIE II MATERIALS ET METHODES

1.Matériel.....	27
1. 1. Les souches étudiées.....	27
2. Méthodologie	28
2. 1. Analyse bactériologique.....	28
2. 1. 1. Préparation de l'inoculum.....	28
2. 1. 2. Identification présomptive des souches.....	28
2. 1. 3. Réalisation pratique de l'Antibiogramme	29
2. 2. Phylogénie phénétique.....	31
2. 2. 1. Codification des états des caractères.....	31
2. 2. 2. L'analyse phylogénétique.....	31

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

1. Résultats	32
2.Discussion.....	41

PARTIE IV : CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....48

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

LISTE DES ABREVIATIONS

ADH : Arginine dihydrolase

AM:Augmentin

CIP :Ciprofloxacin

CSFM :Comité de l'antibiogramme de la société française de micro biologie

CEF :Céfotaxime :

GENT :Gentamycine

LPS :lipopolysaccharides

LDC :Lysine décarboxylase

MEVAG : Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides

NJ : neighbourjoining

ONPG :Orthonitrophényl – B-D – galactopyranoside

RM :Rouge de Méthyle

SNC :Les Staphylocoques coagulase négative

UPGMA : unweighted pair group methodwitharithmeticmean

TOBRA : tobramycine

SNC : Staphylocoques coagulase négative

TDA :Tryptophane désaminase

TSI :Triple SugarIron

VP :Vosges-Proskauer

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les différents genres appartenant aux Enterobacteriaceae	3
Tableau 2 : Les caractères d'identification des genres le plus fréquemment rencontrés	5
Tableau 3 : calcul du coefficient de Jaccard entre deux souches A et B	23
Tableau 4 : Répartition des souches analysées.....	27
Tableau 5 : Codage des états des caractères.....	31
Tableau 6 : Le profil de résistance/sensibilité chez les entérobactéries et les staphylocoques étudiés.....	36
Tableau 7 : Matrice binaire des caractères étudiés	37
Tableau 8 : Matrice de similarité des souches étudiées	38
Tableau 9 : Matrice des distances des souches étudiées:	38
Organigramme 1 : La démarche de la taxonomie numérique	24

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les différents types respiratoires	10
Figure 2 :Test d'indole	33
Figure 3 :Test de la catalase	34
Figure 4 : Aspect du test VP positif	34
Figure 5 : Test RM	35
Figure 6 :Arbre phylogénétique des souches étudiées construit selon la méthode NJ.....	39
Figure7 : Arbre phylogénétique construit à partir des séquences d'ARNr 16S des souches étudiées selon le logiciel MEGA 4.0.....	40

ملخص

تم عزل عشرة سلالات بكتيرية من عدة عينات تم الحصول عليها من مخبر الميكروبيولوجيا و علم الجراثيم (بن باديس) وقد تم تحديدها و التعرف على انواعها بواسطة الأساليب الميكروبيولوجية القياسية (البيوكيميائية) . من بين العشرة سلالات التي درست تسع سلالات تنتمي إلى سلالات الأمعائيات *Enterobacteriaceae* وسلالة من عصيات اجابية الغرام التي لا تقوم بعملية التخمر *Stphylocoque* وحددت هذه السلالات بواسطة خصائصها البيوكيميائية ، والحساسية أو المقاومة للمضادات الحيوية. تم تنفيذ دراسة النشوء و التطور من خلال طرق المسافة، وذلك باستخدام خوارزمية تحليل النتائج الواردة . I'ADN 16S وتحليل NJسمح بتحديد وزن النمط الظاهري البيوكيميائي في إقامة علاقات النشوء والتطور

الكلمات المفتاحية: الامعائيات , النمط الظاهري البيوكيميائي , نسالة

RESUME

Dix souches bactériennes ont été isolées à partir des prélèvements cliniques fournies par le laboratoire de bactériologie (Ibn Badese). Elles ont été identifiées par les méthodes Microbiologiques standardisées (galerie biochimique). Parmi les dix souches étudiées, Neuf souches appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae* et une souche font partie des cocci à Gram positive (*staphylocoque*). Ces souches ont été identifiées présomptivement selon leurs caractères biochimiques, leur sensibilité ou leur résistance aux antibiotiques.

Un profil phylogénétique a été réalisé par les méthodes phénétiques de distances, en utilisant l'algorithme NJ et l'analyse des séquences de l'ADN 16S. L'analyse des topologies obtenues a permis de déterminer le poids du phénotype biochimique dans l'établissement des parentés phylogénétiques.

Mots clés : Entérobactéries, staphylocoque, phénotype biochimique, phylogénie.

ABSTRACT

Ten bacterial strains were isolated from clinical specimens provided by the bacteriology laboratory (IBN BADESE). They were identified by standard microbiological methods (biochemical gallery). Among the ten strains studied, Nine strains belonging to the *Enterobacteriaceae* and a part of the strain Gram positive cocci (Staphylococcus).

These strains were identified presumptively by their biochemical characteristics, susceptibility and resistance to antibiotics.

A phylogenetic profile was produced by phenetic distance methods, using NJ algorithm and sequence analysis of 16S DNA. The analysis of topologies obtained was used to determine the place of the biochemical phenotype in establishing phylogenetic relationships.

Key-words: Enterobacteria, staphylocoque, Biochemical ,cocci , phenotype, Phylogeny

INTRODUCTION

Introduction

Les infections bactériennes dues aux Staphylocoques et aux Entérobactéries si diverses dans leurs manifestations cliniques, sont parmi les plus fréquentes.

Les Staphylocoques sont des cocci à Gram positif, non mobiles, asporulés et habituellement non capsulés, responsables chez l'homme, d'infections qui peuvent être localisées et de propagation directe en atteignant essentiellement le revêtement cutané ; elles peuvent aussi diffuser par voie sanguine en prenant un caractère septicémique avec un polymorphisme symptomatique extrême.

Les Entérobactéries peuvent être pathogènes spécifiques ou opportunistes du tube digestif de l'homme. Leur abondance dans l'intestin, leur mobilité, leur rapidité de multiplication, leur fréquente résistance aux antibiotiques expliquent qu'elles soient les bactéries les plus impliquées en pathologie infectieuse humaine.

La multirésistance des entérobactéries et des staphylocoques aux antibiotiques et leur pouvoir d'adaptation expliquent la variété des espèces et les multiples circonstances dans lesquelles elles sont isolées.

L'importance médicale de ces bactéries, et leur grand intérêt comme matériel de recherche, font de ces groupes bactériens les mieux connus et les plus étudiés.

Durant ce travail et par l'approche de modélisation bioinformatique, nous comptons déterminer le poids de la contribution des analyses biochimiques dans la détermination bactérienne, en utilisant des méthodes à la fois phénotypiques et de bioinformatiques.

Par rapport à cette situation, nous avons tracé les objectifs suivants:

- Réaliser une identification présomptive en se basant sur le phénotype biochimique par l'analyse d'un ensemble de caractères liés aux activités enzymatiques et aux différentes voies métaboliques de ces groupes bactériens.
- Faire une analyse numérique des résultats grâce à l'approche bioinformatique en utilisant des algorithmes de clustérisation.
- Confronter nos résultats d'identification présomptive aux séquences de DNA 16S relevées sur une banque génomique telle que : EMBL.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1 : BIOLOGIE DES GERMES

1. Définition et caractéristiques principales des entérobactéries

La famille des *Enterobacteriaceae* est une famille hétérogène, elle comprend de nombreux genres bactériens qui sont rassemblés selon leurs caractères bactériologiques communs. Ce sont des bacilles à Gram négatif, non sporulés, ils sont aérobies- anaérobies facultatifs et se développent sur milieu ordinaire (18 à 24 heures à pH neutre à 37°C). Ils sont dépourvus d'oxydase, possédant une catalase et ont la faculté de fermenter le glucose en acides avec ou sans production de gaz, mais aussi de réduire les nitrates en nitrites. Ils ont une mobilité variable en fonction de la présence ou non de flagelles (Avril *et al.*, 2000).

Les entérobactéries ont une composition caractéristique des bases constituant leur ADN (GC% compris généralement entre 50% et 60%), ce qui permet de les différencier des *Pseudomonas* et des *Vibrionaceae* (Murray *et al.*, 1999 ; Bouteleux, 2005).

Les différences entre les nombreux genres et espèces viennent de critères plus précis, comme la fermentation des différents sucres, la production ou non de sulfure, la production d'indole, la production d'uréase, la présence ou l'absence d'enzymes du métabolisme (désaminases, décarboxylases)...etc.

La famille des entérobactéries regroupe de nombreuses espèces qui sont des hôtes du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux où ils sont retrouvés soit à l'état de colonisateurs normaux de ce tube digestif soit à l'état de pathogènes. Mais ce caractère écologique n'est pas exclusif. Les Entérobactéries sont très répandues dans la nature, on les retrouve également dans le sol et les eaux en raison de la contamination de l'environnement par l'intermédiaire des matières fécales animales et humaines et des eaux d'égout (Avril *et al.*, 2000).

1.1-Position taxonomique

La famille des entérobactéries fut connue pour la première fois en 1937 lorsque Otto Rahn proposa le genre *Enterobacter* pour regrouper les microorganismes présentant des propriétés biochimiques et morphologiques communes et parmi lesquels on trouvait déjà des

noms tels qu' *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia* et *Shigella*. Avec les travaux de Brenner et de Grimont, cette famille a connu une véritable explosion avec un très grand nombre de nouveaux genres et espèces décrits depuis une vingtaine d'années (Ewing *et al.*, 1960 ; Murray *et al.*, 1999).

En 1972, Edwards et Ewing rapportaient 11 genres et 26 espèces dans la famille des *Enterobacteriaceae*. En 1985, Farmer et Coll décrivaient 22 genres comprenant 69 espèces et 29 groupes entériques. En 1997, 31 genres et 139 espèces étaient caractérisés. A la date du 20 février 2006, 46 genres ont été validement publiés au sein de la famille des *Enterobacteriaceae*.

D'après Zavarzin (1991), et sur la base du séquençage de l'ARN 16S, les entérobactéries sont placées dans le groupe des Protéobactéries qui fait partie des dix groupes formant les bactéries (Zavarzin *et al.*, 1991). Dans ce groupe, les bactéries appartiennent à la sous-classe gamma dont la subdivision des genres et espèces au sein de la famille des entérobactéries est basée sur la comparaison des caractéristiques physiologiques, biochimiques, antigéniques et génétiques des bactéries. La famille des *Enterobacteriaceae* comprend actuellement près de 140 espèces regroupées en 33 genres identifiés listés dans le tableau (1) (Joly *et al.*, 2003 ; Leclerc *et al.*, 2001 ; Delarras, 2003).

Tableau 1: Les différents genres appartenant aux *Enterobacteriaceae* (Delarras, 2003 ; Joly *et al.*, 2003 ; Leclerc *et al.*, 2001)

Genres traditionnels	Genres rares ou récemment décrits
<i>Escherichia</i> , <i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Hafnia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Providencia</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Morganella</i>	<i>Cedecea</i> , <i>Ewingella</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Rahnella</i> , <i>Budvicia</i> , <i>Buttiauxella</i> , <i>Kluyvera</i> , <i>Leclercia</i> , <i>Tatumella</i> , <i>Moellerella</i> , <i>Trabulsiella</i> , <i>Yokenella</i> , <i>Edwardsiella</i> , <i>Leminorella</i> , <i>Pragia</i> , <i>Photorhabdus</i> , <i>Xenorhabdus</i> , <i>Obesumbacterium</i> , <i>Arsenophorus</i> , Groupes entériques

1.2. LES CARACTERES BACTERIOLOGIQUES

1.2.1. Les caractères morphologiques

Toutes les entérobactéries ont une morphologie habituellement typique, sous forme de bacilles à Gram négatif de 2 à 3µ de long sur 0,6µ de large, généralement polymorphes.

Certaines espèces sont mobiles grâce à une ciliature péritriche, par contre les autres sont immobiles (*Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia pestis*). Dont le genre de *Klebsiella* est caractérisé par la présence d'une capsule visible au microscope. La plupart des espèces pathogènes chez l'homme possèdent des pili (fimbriae) qui constituent des facteurs d'adhésion. (Bossert *et al.*, 1986).

1.2.3. Les caractères culturaux

Les entérobactéries sont des germes aéro-anaérobies facultatifs poussent facilement sur les milieux ordinaires en 18 heures. La température optimale de croissance est 37°C mais la culture est possible entre 20° et 40°C. Ce sont des germes mésophiles et neutrophiles (pH optimum voisin de 5,5-8) et ils sont assez tolérants aux variations de la pression osmotique. Leurs exigences nutritionnelles sont, en général, réduites et la plupart se multiplient en milieu synthétique avec une source de carbone simple comme le glucose. Sur milieux gélosés, les colonies d'entérobactéries sont habituellement rondes, lisses, brillantes à contour régulier et leur diamètre est de 2 à 3 mm après 18 heures d'incubation à 35 - 37 °C. En milieu liquide, les entérobactéries occasionnent un trouble uniforme. (Pilet *et al.*, 1979 ; Carbonnelle *et al.*, 1987).

1.2.4. Les caractères antigéniques

Au sein de chaque genre on individualise des espèces par l'étude des caractères biochimiques ou antigéniques. Toutes les entérobactéries possèdent des antigènes de paroi (somatiques) ou antigènes O qui correspondent aux polysides fixés sur les lipopolysaccharides (LPS) et qui constituent les endotoxines des bactéries à Gram négatif. Les espèces mobiles possèdent en plus des antigènes de flagelles ou antigènes H de nature protéique, constitués de flagellines. Certaines souches possèdent en plus un antigène K qui masque l'antigène O, et qui correspond à une enveloppe polysidique constituant une véritable capsule et donnant un aspect muqueux.

1.2.5. Les caractères biochimiques

Le diagnostic de genre et d'espèce repose sur l'étude des caractères biochimiques, après que le diagnostic de famille ait été établi avec certitude. Les caractères d'identification sont essentiellement "biochimiques" et utilisent des tests qui étudient le métabolisme protéique (présence d'uréase, production d'indole, dégradation du tryptophane) ou la fermentation des

sucre, la capacité d'utiliser le citrate, la présence d'enzymes (décarboxylases, désaminases), la production d'hydrogène sulfuré ou la formation de gaz.

Le tableau (2) résume les caractères d'identification des genres le plus fréquemment rencontrés :

Tableau 2 : Les caractères d'identification des genres le plus fréquemment rencontrés (Djelouat, 2009)

	<i>Escherichia</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Serratia</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Providencia</i>	<i>Yersinia</i>
Lactose	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	+	-	+/-	-	-	+
Indole	+	-	-	+/-	-	-	+/-	+/-	+	+/-
VP (Acétoïne)	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+*
Citrate	-	+	+	+	+	+/-	-	+/-	+	-
Mobilité	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+*
Urée	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
PDA	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
H ₂ S	-	+/-	-	-	-	+	-	+/-	-	-

* à 20°C seulement, (+) : Résultat positif, (-) : Résultat négatif.

2. Définition et caractéristiques principales des staphylocoques

2.1. Définition

Les Staphylocoques sont des cocci à Gram positif, non mobiles, asporulés et habituellement non capsulés. La plupart des espèces sont aéro-anaérobies facultatives et à catalase positive, à l'exception de *S. saccharolyticus* et *S. aureus subsp. anaerobius*. Ce sont des germes dépourvus d'oxydase en dehors de *S. lentus*, *S. sciuri* et *S. caseolyticus*.

2.2. Historique

Les Staphylocoques ont été identifiés par d'éminents microbiologistes à l'instar de Koch, Pasteur, Ogston et Rosenbach. En 1878, Koch souligne le rôle pathogène des bactéries se présentant sous forme de cocci Gram positif. Ces cocci seront ensuite isolées puis identifiées d'un pus par Louis Pasteur en 1880. Ils seront baptisés en 1883 par Ogston sous le nom de Staphylocoques, du latin « *Staphylla* » ou grappe et *coccus* ou « grain ». En 1884, ils sont classés en fonction de la pigmentation des colonies par Rosenbach en *S. aureus* du latin « orange » et *S. albus*, du latin « blanche ».

Les Staphylocoques sont des bactéries très répandues dans la nature, aussi bien dans l'air que dans le sol ou dans l'eau. Ce sont des commensaux extrêmement fréquents de la peau et des cavités naturelles de l'Homme et des animaux (avec une prédominance pour les fosses nasales et le périnée) : la plupart des espèces rencontrées sont opportunistes, d'autres peuvent être occasionnellement pathogènes (*S. aureus*). (Microméthodes d'identification et étude de la sensibilité des Staphylocoques, Enterocoques et Streptocoques.2001)

2.3. Classification

Le genre *Staphylococcus* appartient à la famille des *Micrococaceae* qui comprend trois autres genres :

- *Micrococcus*
- *Planococcus*
- *Stomatococcus*.

Le genre *Staphylococcus* est composé de 39 espèces et sous-espèces qui se distinguent par leurs caractères phénotypiques dont l'espèce type est *S. aureus*. Les espèces du genre *Staphylococcus* sont classées en deux groupes selon qu'elles produisent ou non une coagulase libre active sur le plasma oxalate de lapin. (Le minor L *et al* 1989) .

■ Les staphylocoques à coagulase positive

Staphylococcus aureus est le premier agent pathogène, lequel peut être responsable d'infection sévère, et il est important de le différencier des autres staphylocoques opportunistes coagulase négative.

Les autres espèces de staphylocoques coagulase positive sont :

- *Staphylococcus hyicus*
- *Staphylococcus schleiferi* sous-espèce *coagulans*
- *Staphylococcus intermedius*.

Ces souches sont occasionnellement rencontrées dans les infections humaines.

■ Les staphylocoques à coagulase négative

Les SCN sont des agents opportunistes pathogènes. On distingue plus de 30 espèces parmi lesquelles on peut citer *S. epidermidis* et *S. saprophyticus* qui sont moins fréquents dans les infections.

Les espèces les plus impliquées dans les infections sont :

- *Staphylococcus capitis*
- *Staphylococcus cohnii*
- *Staphylococcus haemolyticus*
- *Staphylococcus hominis*
- *Staphylococcus lugdenensis*
- *Staphylococcus schleiferi ssp scheiferi*
- *Staphylococcus warneri*
- *Staphylococcus simulans*

Les Staphylocoques coagulase négative (SNC) peuvent être divisés en six grands groupes. Cependant, les espèces rencontrées en pathologie humaine sont localisées dans deux groupes : le groupe de *Staphylococcus epidermidis* et le groupe de *Staphylococcus saprophyticus*. (Block P *et al* 1994) .

2.4. Caractères morphologiques et structuraux

A l'examen microscopique, les Staphylocoques se présentent sous l'aspect de coques en petits amas, en diplocoques ou en très courtes chaînettes de 3 à 5 éléments positivement colorés au Gram.

Le mode de groupement dit en « grappe » ou en « amas » est plus caractéristique après culture sur un milieu gélose. La disposition en amas s'explique par la division cellulaire des Staphylocoques en trois plans successifs et perpendiculaires les uns aux autres, et par le fait que les cellules filles ne se séparent pas complètement de la cellule mère dont elles sont issues. Sur le plan individuel, ce sont des cocci mesurant 0,7 à 1,2 μm , immobiles asporulés, généralement acapsulés ou ayant une faible capacité de synthèse de capsule. (Fleurette J .1982).

2.5. Caractères cultureux

Les Staphylocoques sont en général aéro-anaérobie facultatif et poussent sur milieu ordinaire en aérobiose à l'exception de *S. saccharolyticus* et *S. aureus anaerobius* qui sont donc catalase négative. Certaines souches nécessitent cependant une forte pression en CO₂ pour une croissance optimale ainsi que la présence d'autres métabolites tels que l'hémine ou la ménadione.

Cependant, certains facteurs de croissance sont indispensables pour la multiplication des Staphylocoques ; ce sont la vitamine B1 et l'acide nicotinique. La température optimale de croissance est de +30 à +45°C avec un maximum à 37°C et le pH varie entre 4,8 à 9,4 avec un optimum à 7,5.

- En bouillon ordinaire, la culture est rapide et les Staphylocoques se multiplient en quelques heures, formant un trouble homogène ou un dépôt.

- En milieu solide, on observe fréquemment une zone claire d'hémolyse (bêta hémolyse) autour des colonies. Ceci est lié au fait que certains Staphylocoques, en particulier *S. aureus*, sont susceptibles de synthétiser quatre hémolysines distinctes et variables d'une souche à l'autre et dont l'activité diffère selon le type d'hématie en cause.

- La plupart des souches de Staphylocoques pousse sur un milieu synthétique contenant entre autres du glucose, des sels minéraux, 14 acides aminés dont la cystéine, la vitamine B1 et l'acide nicotinique.

- les Staphylocoques conservent leur vitalité à +4°C pendant trois mois dans le pus et pendant un an sur gélose ; ils sont détruits à 58°C au bout de 60 mn d'incubation.(Novick R.P.1990).

2.6. Caractéristiques biochimiques

L'activité métabolique des staphylocoques est relativement bien marquée. Ils possèdent de nombreuses [enzymes](#) capables de catalyser de nombreux substrats. Ces enzymes varient d'une espèce à une autre. Cependant, tous les staphylocoques ont les caractéristiques suivantes :

- Présence d'une [catalase](#) qui décompose l'[eau oxygénée](#), contrairement aux streptocoques qui ne possèdent pas de catalase.
- Absence d'une [oxydase](#).
- Fermentation du [glucose](#) sans production de gaz.

3- Tests biochimiques discriminant les bactéries

3.1. Mise en évidence du type respiratoire

La détermination du type respiratoire (ou type énergétique) d'une bactérie consiste en la détermination du rapport qu'a cette bactérie avec l'oxygène.

Les bactéries ont des besoins respiratoires spécifiques, elles sont soit : (Delarras, 2007 ; Joffin *et al.*, 2006) :

- 1- Des bactéries aérobies strictes : Bactéries ayant besoin d'oxygène pour leur respiration. **(Figure a).**
- 2- Des bactéries anaérobies strictes : La présence de l'oxygène est toxique pour ces bactéries. **(Figure b).**
- 3- Des bactéries aéro-anaérobies facultatives : La présence de l'oxygène est facultative, elles peuvent se développer en présence ou en absence d'oxygène. **(Figure c).**
- 4- Des bactéries micro-aérophiles : Bactéries se développent sous une faible pression d'oxygène. **(Figure d).**
- 5- Des bactéries anaérobies aéro-tolérantes : Bactéries se développent en absence d'oxygène mais elles tolèrent la présence de ce dernier dans le milieu. **(Figure e).**

La mise en évidence expérimentale de ces cinq types respiratoires peut être réalisée sur la gélose viande-foie (gélose VF).

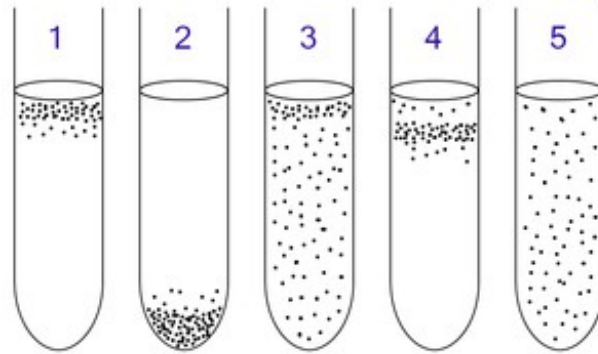
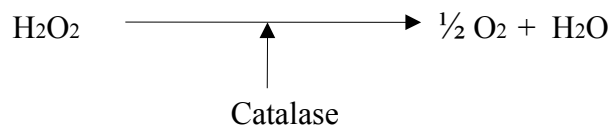


Figure (a) Figure (b) Figure (c) Figure (d) Figure (e)

Figure 1 : Les différents types respiratoires

3.2. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. La fonction principale de la catalase dans les cellules est de prévenir l'accumulation de niveaux toxiques de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) formé comme sous-produit de processus métaboliques. Elle catalyse la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène qui se dégage selon :



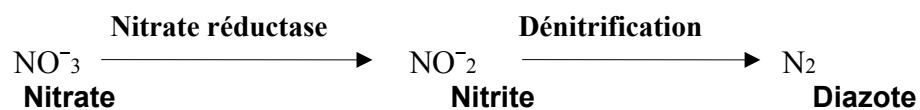
3.3. Recherche de l'oxydase

La recherche de l'oxydase est un des critères les plus discriminatifs et les plus employés pour l'identification des bactéries, surtout celle des bacilles à Gram négatif. Cette recherche consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée à oxyder la forme réduite incolore de dérivés méthylés du paraphénylène diamine, en leur forme oxydée semi-quinonique rose violacé. L'oxydase ou cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires bactériennes, c'est une enzyme qui catalyse une réaction d'oxydo-réduction en impliquant une molécule d'oxygène comme accepteur d'électrons. Dans ces réactions, l'oxygène est réduit en eau H_2O ou en eau oxygénée H_2O_2 .

Les bactéries qui possèdent l'enzyme oxydase peuvent oxyder le N,N,N,N-tétraméthyl-1,4-phénylène diamine qui est un composant du réactif de la recherche de la cytochrome-oxydase en bactériologie, ce qui donne des produits violacés.

3.4. Recherche de la nitrate-réductase

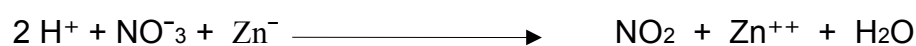
La nitrate réductase est une enzyme qui catalyse la réaction de réduction des nitrates en nitrites dont leur mise en évidence est réalisée en utilisant le réactif de Griess. Parfois, certaines bactéries peuvent poursuivre cette réduction, jusqu'à une dénitrification selon :



Le réactif de Griess, prend une teinte rouge-orangé en présence d'ions nitrites, ce qui indique que la bactérie possède une nitrate-réductase qui est capable de réduire les nitrates jusqu'au stade nitrites et c'est le cas pour les entérobactéries.

L'absence de coloration rouge ne signifie pas obligatoirement que la bactérie testée ne possède pas de nitrates-réductase, car elle peut posséder une nitrate-réductase très active qui est capable de réduire les nitrates jusqu'au stade diazote N₂ et une bactérie possédant une telle enzyme consomme tout les nitrates du milieu.

Dans ce cas le test est complété par l'épreuve de Zo-Bell en ajoutant la poudre de zinc qui est un composé capable de réduire les ions nitrates en ions nitrites :



L'apparition d'une teinte rouge indique la formation d'ions nitrites par l'action du zinc, donc ça signifie la présence des ions nitrates dans le milieu, donc la bactérie ne possède pas de nitrate-réductase.

A l'inverse, l'absence de coloration rouge indique qu'il n'y a plus d'ions nitrates dans le milieu pour réagir avec le zinc, donc la bactérie possède une nitrate-réductase très active qui a consommé tout les ions nitrates.

3.5. Les tests biochimiques du catabolisme des glucides

3.5.1. Etude de la voie d'attaque des glucides

Les bactéries utilisent les glucides suivant deux voies métaboliques :

- Une voie oxydative : en présence d'oxygène.
- Une voie fermentative : en absence d'oxygène, ou en faible tension d'oxygène.

Pour déterminer la voie d'attaque des glucides (glucose en particulier) par les bactéries à Gram négatif, (cas des entérobactéries) on utilise le milieu de Hugh et Leifson ou le milieu MEVAG. (Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides).

Ce milieu est additionné le plus souvent de glucose pour la détermination de la voie d'attaque de cet ose par les entérobactéries. Mais il peut aussi être préparé avec d'autres glucides (lactose, saccharose...) pour étudier leur métabolisme par ces bactéries. Ce milieu contient un indicateur de pH qui est le bleu de bromothymol qui permet d'apprécier le type de dégradation du glucide (glucose) qui libère des acides et éventuellement des gaz. Il vire au jaune en milieu acide, si non il conserve la couleur verte du milieu ou il vire au bleu en cas d'alcalinisation. Donc à la fin de l'incubation, on observe le changement de couleur du milieu pour déterminer le type oxydatif ou fermentatif.

3.5.2. Milieux glucidiques pour bactéries fermentatives

Des milieux de culture contenant un ou plusieurs glucides permettent d'étudier l'utilisation des sucres par les bactéries fermentatives.

a- Bouillon au rouge de phénol

Ce milieu qui est additionné d'un glucide, et qui contient la cloche de Durham est utilisé pour réaliser des tests de fermentation des glucides afin de permettre l'identification biochimique de bactéries. Après la préparation et la répartition du milieu en tubes, une solution stérile du glucide à étudier avec une concentration de 5 à 10 g/l est additionnée dans le milieu, sachant que de nombreux glucides peuvent être testés pour l'identification biochimique.

b-Milieu de Kligler- Hajna

Le milieu de Kligler- Hajna est un milieu complexe, qui permet la recherche de plusieurs caractères biochimiques, il est utilisé principalement pour l'identification des entérobactéries. C'est un milieu coulé en pente et en culot. Il renferme du lactose, du glucose, du thiosulfate et des ions ferreux. L'indicateur de pH est le rouge de phénol. C'est un milieu au niveau duquel on recherche en 24h : L'utilisation du glucose et du lactose, la production de l' H_2S , la production de gaz provenant de la fermentation du glucose, et la B-galactosidase pour les bactéries lactose (-) donc test ONPG.

- Utilisation des glucides :

Le culot :

Pour qu'une bactérie puisse utiliser le lactose, elle doit avoir deux enzymes : Une B-galactoside perméase et une B-galactosidase.

Dans le culot, l'opéron lactose est réprimé par la présence du glucose et l'absence de l'oxygène. Le glucose inhibe la synthèse des deux enzymes nécessaires à la dégradation du lactose. C'est ce que l'on appelle l'effet glucose. On est donc dans le cas de croissance en diauxie, c'est-à-dire l'utilisation du deuxième substrat (lactose) n'aura lieu qu'après l'épuisement du premier substrat énergétique qui est le glucose. Sachant que le glucose est en faible concentration par rapport au lactose.

Dans un premier temps, les bactéries fermentent le glucose avec production d'acides et au bout de 24h, tout le glucose sera fermenté, ce qui fait virer l'indicateur de pH au jaune.

Dans le cas d'où la bactérie ne peut pas fermenter le glucose, la production d'acides n'aura pas lieu et le culot reste rouge.

La pente :

Dans un premier temps, les bactéries utilisent le glucose comme source de carbone et d'énergie, donc l'effet glucose. Et elles produisent des acides qui font virer l'indicateur de pH du rouge au jaune. Après l'utilisation du glucose sur la pente et après la disparition de l'effet glucose, l'opéron lactose est induit par le lactose et la présence d'oxygène, donc :

- Si la bactérie possède les deux enzymes : B-galactoside perméase et B-galactosidase, elle va utiliser le lactose avec production d'acides et donc le virage de l'indicateur de pH au jaune est confirmé.
- Si la bactérie est B-galactoside perméase (-) et B-galactosidase (-), elle ne peut pas utiliser le lactose et donc elle utilise comme source d'énergie les peptones, ce qui aboutit à la libération des produits basiques (ammoniac) d'où une recoloration au rouge de la pente.

- La production de gaz :

La présence de gaz se matérialise par le décollement du culot et/ou la présence de bulles d'air.

- La production de sulfure d'hydrogène (H₂S) :

Elle a lieu à partir de l'ion thiosulfate provenant du thiosulfate de sodium et qui est réduit en H₂S selon cette réaction : $S_2O_3^{2-} + 10H^+ + 8e^- \longrightarrow 2H_2S + 3H_2O$

Le sulfure d'hydrogène réagit avec les ions (Fe⁺⁺⁺) du citrate de fer ammoniacal pour former un précipité de sulfure de fer noir. Ainsi : Une bactérie H₂S⁺ présente un précipité noir, par contre une bactérie H₂S⁻ : pas de précipité noir.

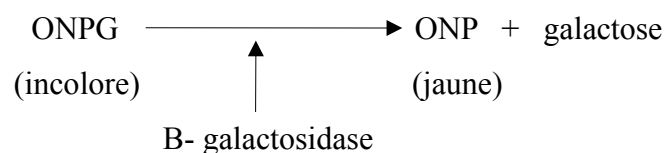
- Test ONPG : OrthoNitroPhényl – B-D – Galactopyranoside

Le test ONPG ou test de l'ONPG – Hydrolase est un test complémentaire celui-ci permet, lorsque la bactérie est Lactose (-) de trouver s'il y a présence d'une B-galactosidase que l'on reconnaît grâce à la coloration en jaune du milieu. Pour que la bactérie hydrolyse le lactose, il faut qu'elle ait deux enzymes :

- La B-galactoside perméase membranaire qui permet la pénétration du lactose dans la cellule.
- La B-galactosidase qui est une Hydrolase capable d'hydrolyser la liaison osidique en donnant le galactose et le glucose.

L'orthonitrophényl – B-D – galactopyranoside (ONPG) est un hétéroside dont l'aglycone est l'orthonitrophénol et l'ose est le galactose. C'est un analogue structural du lactose.

L'hydrolyse de l'ONPG par une B-galactosidase libère du galactose et de l'orthonitrophénol (ONP) de couleur jaune selon cette équation :



Les bactéries Lactose (+) possèdent la B-galactosidase donc elles sont toujours ONPG +, Par contre les bactéries Lactose (-) peuvent être :

- ONPG (-) : elles ne possèdent pas d'ONPG-hydrolase (B-galactosidase).
- ONPG (+) : elles possèdent soit une B-galactosidase, mais pas de B-galactosidase perméase et elles ne peuvent pas dégrader le Lactose soit une ONPG-hydrolase autre qu'une B – galactosidase.

c- Milieu TSI (Triple Sugar Iron)

Ce milieu de culture, proposé par Hajna (1945), est principalement utilisé pour la caractérisation biochimique des entérobactéries. C'est un milieu différentiel par la capacité à mettre en évidence les fermentations du : glucose, lactose et/ou saccharose ainsi que la production d'hydrogène sulfuré (H₂S) et de gaz. Le rouge de phénol est l'indicateur colorant virant du rouge au jaune pour un résultat positif. Le noircissement du culot indique la présence de H₂S.

3.5.3. Milieu mannitol-mobilité

Ce milieu permet de rechercher simultanément la mobilité, et l'utilisation du mannitol.

- Le test mannitol :

Le mannitol est un dérivé de réduction du mannose. La réduction des oses simples peut se faire sur les fonctions aldéhyde ou cétone : on obtient alors des polyalcools que l'on désigne avec le suffixe –itol.

Ce polyalcool peut être fermenté par la bactérie avec libération de produits acides qui font virer l'indicateur de pH du rouge en milieu basique au jaune en milieu acide. Donc : bactérie mannitol (+).

- Le test de mobilité bactérienne :

Si la bactérie est immobile, on observe des colonies au lieu de l'ensemencement, par contre si la bactérie est mobile on observe une répartition des colonies dans le milieu.

3.5.4 Le milieu RM-VP : (bouillon Clark et Lubs)

Ce milieu permet de rechercher les voies fermentaires des entérobactéries et de différencier la fermentation des acides mixtes et la fermentation butanediolique chez les entérobactéries.

- Test du rouge de méthyle (test RM) :

C'est une réaction utilisée pour mettre en évidence la voie fermentative des acides mixtes lors de l'identification des entérobactéries. La fermentation du glucose par les entérobactéries produit de l'acide pyruvique, puis des acides organiques. Ces acides font virer le RM au rouge et dans le cas contraire, il vire au jaune.

- Réaction de Voges-Proskauer (test VP) :

C'est une réaction utilisée pour mettre en évidence la voie fermentaire du butane – 2, 3 – diol lors de l'identification biochimique des entérobactéries, cette réaction permet de mettre en évidence l'acétoïne ou (3 – hydroxybutanone), parceque Le butane – 2, 3 – diol ne peut pas être mis en évidence facilement.

3.5.5. L'utilisation du Citrate de Sodium

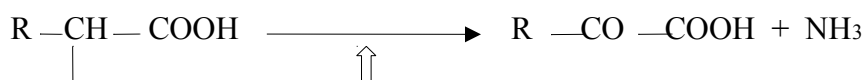
Certaines entérobactéries sont capables d'assimiler le citrate de Sodium comme seule source de Carbone et d'énergie et la recherche de cette propriété se fait avec le milieu de Simmons au Citrate de Sodium. Ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone ; le citrate. Les bactéries possédant l'enzyme citratase sont capables de se développer sur ce milieu. La bactérie qui utilise le citrate, elle alcalinise le milieu, ce qui fait virer le bleu de bromothymol du vert au bleu en milieu basique.

3.6. Les tests biochimiques du catabolisme des protéines

Les entérobactéries peuvent assimiler et dégrader les acides aminés selon deux voies métaboliques : La désamination et la décarboxylation.

3.6.1. La désamination :

Elle est réalisée par des désaminases bactériennes, c'est le départ du groupement aminé. Les désaminases, enzymes induites, agissent sur les acides aminés en entraînant la formation des acides cétoniques correspondants, selon la réaction suivante :



NH₂

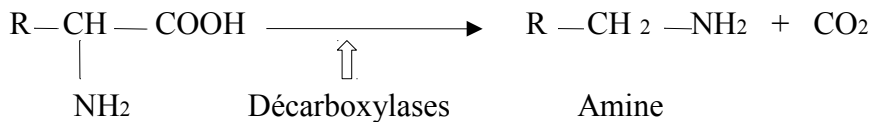
Désaminases

Acide cétonique

Acide amine

3.6.2. La décarboxylation :

Elle est réalisée par des décarboxylases bactériennes, enzymes induites qui libèrent le groupement carboxyle et forme l'amine correspondante suivant cette réaction :



Acide aminé

La recherche des décarboxylases de l'ornithine, de la lysine, et de l'arginine forment trois tests biochimiques utiles dans le diagnostic différentiel des bactéries. Ces trois tests peuvent être réalisés sur les bouillons « LDC- ODC- ADH » qui sont appelés les milieux de Moëller et qui permettent de montrer la présence des décarboxylases et dihydrolase bactériennes par la mise en évidence de l'acidification du milieu et sa réalcalinisation.

Le milieu d'étude contient du glucose, l'indicateur coloré et l'acide aminé. Chez les bactéries la fermentation du glucose entraîne une baisse de pH suffisante pour favoriser la synthèse de l'enzyme ; l'alcalinité due à l'amine entraîne ensuite le virage de l'indicateur au violet après une courte phase de jaunissement. Si la bactérie étudiée ne possède pas de décarboxylases, le milieu restera acide, donc jaune.

Il existe des acides aminés qui peuvent être décomposés selon des réactions métaboliques particulières, comme le cas du tryptophane.

3.7-Milieu urée-indole

Ce milieu de culture permet en 24 h de réaliser trois tests biochimiques qui permettent l'identification de germes, particulièrement les entérobactéries. Ces trois tests sont : Le test uréase, le test TDA, et le test indole.

3.7.1. Recherche de l'uréase

Les bactéries peuvent dégrader l'urée qui est un composé organique et qui peut servir de source d'azote unique aux bactéries possédant une uréase. En présence de cette enzyme, les bactéries uréolytiques peuvent décomposer l'urée en carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu, et qui fait virer l'indicateur coloré de pH (le rouge de phénol) du jaune au rouge en milieu basique.

3.7.2. Recherche de l'indole :

Certaines bactéries dégradent le tryptophane grâce à une tryptophanase en formant de l'indole, de l'acide pyruvique et de l'ammoniac. Après addition du réactif de Kovacs, Le diméthyl-amino-4-benzaldéhyde contenu dans le réactif de Kovacs réagit avec l'indole, et forme un composé coloré en rouge. L'indole peut être mis en évidence en utilisant le milieu urée-indole ou L'eau peptonée exempte d'indole ; c'est un bouillon qui ne contient pas d'indole, mais il contient du tryptophane pour que certaines bactéries puissent le dégrader en indole.

3.7.3. Test TDA :

Par contre certaines bactéries dégradent le tryptophane grâce à l'enzyme tryptophane-désaminase (Test TDA) et cette dernière conduit à la désamination de cet acide aminé en produisant l'ammoniac et l'acide indole – 3 pyruvique. Ce dernier est révélé par l'apparition d'une couleur brune en présence de perchlorure de fer.

4- La résistance aux antibiotiques

La résistance des bactéries aux antibiotiques pose aujourd'hui un problème majeur de santé publique, comme l'attestent de nombreux rapports publiés (Pechère *et al.*, 1995 ; Wise *et al.*, 1998). Les entérobactéries et les staphylocoques sont souvent les bactéries responsables d'infections dues à des souches multirésistantes.

Aucune espèce bactérienne, parmi celles croisées en pathologie humaine, et aucun antibiotique, même parmi les plus récents, n'échappe aujourd'hui au phénomène de résistance. (Goettsch *et al.*, 2000 ; Goldstein, 2000 ; Gupta *et al.*, 1999).

Les infections urinaires sont très fréquentes aussi bien en milieu communautaire qu'hospitalier (Larabi *et al.*, 2003). Elles occupent la deuxième position après les infections respiratoires (Alvarez *et al.*, 1992).

4.1. Définition

Un antibiotique est toute substance, naturelle ou synthétique capable d'inhiber in vivo le développement des bactéries. Les molécules d'antibiotiques doivent être

idéalement les plus toxiques pour les bactéries et les moins toxiques pour les cellules de l'organisme qui les hébergent. On les divise en antibiotiques à large spectre ou à spectre étroit selon leur activité contre beaucoup ou peu de germes (Gaudy, 2005).

4.2. Classes des antibiotiques

Les antibiotiques sont classés par famille selon la composition chimique. On distingue 17 familles d'antibiotiques et plusieurs sous-familles qui sont classées en fonction des groupements chimiques. Les plus courantes sont (Rahal *et al.*, 2009) :

- a. Beta-lactames qui ont un spectre d'activité assez large.
- b. Macrolides qui ont un spectre d'activité étroit.
- c. Tetracyclines
- d. Aminoglycosides ou aminosides, antibiotiques d'action rapide et puissante.
- e. Quinolones, antibiotiques à large spectre.
- f. Sulfamides antibactériens.

4.3. Mécanismes d'action des antibiotiques

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

Il existe différents types d'antibiotiques capables d'agir sur les bactéries selon différents mécanismes (Gaudy, 2005) :

- a- Antibiotiques qui inhibent la synthèse de la paroi bactérienne.
- b- Antibiotiques qui altèrent la perméabilité de la membrane plasmique.
- c- Antibiotiques qui inhibent la synthèse protéique.
- d- Antibiotiques actifs sur le métabolisme des acides nucléiques et de leurs précurseurs.

La résistance aux antibiotiques peut se manifester de deux manières distinctes (D'Acremont *et al.*, 2006):

- Résistance naturelle : On parle de la résistance naturelle lorsque toutes les souches de la même espèce sont résistantes à un antibiotique donné.

- Résistance acquise : La résistance acquise advient lorsque quelques souches d'une même espèce normalement sensibles deviennent résistantes. C'est une résistance chromosomique acquise par mutagénèse.

CHAPITRE 2: APPROCHES TAXONOMIQUES ET PHYLOGENIE

1. Définition

La taxonomie et l'étude de la diversité des microorganismes et des relations susceptibles d'exister entre eux. Elle est essentielle pour l'identification et la nomenclature des souches bactériennes. Elle recouvre trois domaines différents : la classification, la nomenclature, et l'identification (Wayen *et al.*, 1987 ; Larpent, 2000 ; Stackebrandt *et al.*, 2000).

- La classification : établie des groupes taxonomiques (taxons) selon des critères phénotypiques et moléculaires.
- La nomenclature : est universelle, elle est l'ensemble des règles qui régissent l'attribution d'un nom à chaque taxon distinct selon un système binomial dans lequel un nom latin de genre précède le nom de l'espèce.
- L'identification : assigne les souches inconnues à l'un des taxons décrits, suite à un ensemble de critères préalablement testés.

2. Les différentes approches taxonomiques

La taxonomie bactérienne s'est appuyée sur l'étude du phénotype exprimé et sur les variations morphologiques qui existent entre les souches bactériennes. Les critères qui permettent d'apprécier la parenté de différentes souches bactériennes ont variés dans le temps, ce qui a permis d'utiliser la taxonomie phénétique, la taxonomie numérique, la chimiotaxonomie, et la taxonomie moléculaire.

2.1. Taxonomie phénétique

Elle s'intéresse aux données apparentes morphologiques, physiologiques, biochimiques...etc. Les premières classifications bactériennes sont basées sur la comparaison de critères morphologiques. Jusqu'au début des années 1960, toute la taxonomie bactérienne reposait sur la classification phénétique. Cette classification utilise un certain nombre de caractères considérés comme importants, tels que la

morphologie, la mise en évidence d'un caractère biochimique, le pouvoir pathogène... etc. (Mayr, 1986).

2.2. Chimiotaxonomie

Ce système est basé sur l'étude de caractères chimiques. Dans cette méthode, on analyse les composants de la bactérie, on étudie par exemple : les acides aminés de la paroi cellulaire, l'examen des structures des acides gras, des glucides et autres (O'Donnel *et al.*, 1985).

2.3. Taxonomie moléculaire

C'est l'utilisation de la séquence des molécules biologiques telles que l'ADN 16S principalement et les protéines, pour obtenir des informations sur l'histoire évolutive des êtres vivants et notamment sur leur liens de parentés, et leur phylogénie. Le produit d'une analyse de phylogénie moléculaire est un arbre phylogénétique.

Les macromolécules biologiques telles que l'ADN, l'ARN ou les protéines sont des composants fondamentaux de tous les êtres vivants. Ces molécules sont des polymères constitués de l'enchaînement de briques moléculaires de base, dont la succession constitue la séquence primaire, dont la parenté des êtres vivants considérés est reflétée par la similarité de ces séquences primaires. Jusqu'à une date assez récente, la séquence primaire des molécules biologiques n'était pas directement accessible. Cependant, l'avènement de la PCR et du séquençage d'ADN par la méthode de Sanger ont permis de franchir une étape cruciale pour la taxonomie moderne des microorganismes (Kitouni, 2007).

2.4. Taxonomie numérique

En 1763, Adanson a proposé une méthode de classification qui tient compte de l'ensemble des caractères d'un organisme. A la suite au développement des techniques biochimiques analytiques, Sokal et Sneath ont appliqué une méthode similaire aux bactéries et ont développé une taxonomie qualifiée de numérique ou d'adansonienne (Sneath *et al.*, 1963).

Cette méthode consiste à étudier pour chaque souche des caractères morphologiques, biochimiques, et physiologiques. Dont les états des caractères sont codés 1 (désigne la présence du caractère) et 0 (désigne l'absence du caractère), il s'agit donc d'attribuer pour chaque caractère un code numérique binaire, ensuite les degrés de similitude entre les individus sont représentés sous forme de dendrogramme, qui représente les relations de ressemblance entre les individus (Kitouni, 2007). Cette méthode, qui nécessite de nombreux calculs, a grandement bénéficié des outils informatiques qui ont rendu l'utilisation plus accessible.

Il est à noter que dans ce type de taxonomie, les caractères choisis ne doivent posséder que deux états (présence ou absence, grand ou petit,...) mais jamais des caractères qui présentent plusieurs états à la fois telle que la couleur (jaune, bleu, vert, ...) ou la taille (1cm, 2cm, 5cm,...).

La taxonomie numérique est une démarche utilisée pour :

- Décrire un individu et le situer relativement à d'autres.
- classer des groupes systématiques peu étudiés.
- inclure des espèces nouvelles dans des classifications anciennes.

La taxonomie numérique est fondée sur la mathématisation des données observées par un calcul du coefficient de similitude. Le plus utilisé en microbiologie étant celui de Jaccard (tableau 3).

Tableau 3 : calcul du coefficient de Jaccard entre deux souches A et B.

$S(i,j) = \frac{a}{a+b+c}$	a : caractères présents chez les deux souches (1,1)
	b : caractères propres à la souche A (1,0)
	c : caractères propres à la souche B (0,1)

La matrice qui résume les valeurs de ces coefficients est appelée la matrice de similarité. Les distances taxonomiques entre tous les individus, pris deux à deux, sont alors déduites de la matrice de similarité selon l'équation : $d_{i,j} = 1 - S_{i,j}$

Selon Anderegg (1973), les étapes qui composent la démarche de la taxonomie numérique sont les suivantes :

1-Choisir les objets d'étude : ce sont les taxons à analyser.



2-Choisir les caractères qui servent à décrire les objets : ils doivent présenter deux états pour chaque caractère (1,0).



Organigramme 1 : La démarche de la taxonomie numérique (Anderegg, 1973).

3-Codification des données et construction de la matrice des données : les états des caractères sont affectés du symbole 1 ou 0 pour désigner leur présence ou leur absence.



4-Choisir l'algorithme de construction de l'arbre : le choix s'effectue en fonction des objectifs et des données.



5-Calcul du graphe arborescent (le phénogramme) : la construction de l'arbre est réalisée sur un logiciel approprié.



6-Interpréter les résultats : l'interprétation de l'arbre est basée sur la topologie obtenue.

3. Phylogénie et méthodes de construction des arbres

3.1. Définition

La phylogénie est l'étude des êtres vivants et de leur évolution en vue d'établir leur parenté. Elle est représentée couramment par l'arbre phylogénétique qui montre les relations de parentés entre les individus.

Il existe plusieurs méthodes pour construire des arbres phylogénétiques ; ces méthodes peuvent se regrouper en deux catégories : Méthodes cladistiques et méthodes phénétiques.

3.1.1. Méthodes cladistiques

Ce sont des méthodes basées sur les caractères qui prennent plusieurs états. Dans le système cladistique, la phylogénie est reconstruite à l'aide d'une analyse de caractères qui vise à identifier les états plésiomorphes (= primitifs) et apomorphes (= dérivés). Le principe de base de l'analyse cladistique est donc la mise en évidence des séries de transformations des caractères de l'état plésiomorphe vers l'état apomorphe, c'est-à-dire de caractère A vers caractère A'.

3.1.2. Méthodes phénétiques

Les différentes méthodes phénétiques peuvent être regroupées en plusieurs catégories : les méthodes de distance, les méthodes de parcimonie et les méthodes de vraisemblance. Chacune d'elles diffère à la fois par les hypothèses évolutives qu'elles impliquent et par les algorithmes qu'elles utilisent (Edwards *et al.*, 1964 ; Felsenste, 1973 ; Tassy *et al.*, 2004).

Les méthodes phénétiques (ou de distance) ont leur origine dans les méthodes de la taxonomie numérique conçues en 1957 (Michener *et al.*, 1957). Ce sont des méthodes basées sur les distances qui peuvent être le nombre de substitutions entre deux séquences ou sur la similitude globale. La phénétique considère l'état actuel du caractère sans prendre en compte son histoire évolutive.

Les méthodes phénétiques se proposent de reconstruire des arbres en partant des ressemblances observées entre chaque paire d'unités évolutives (Meacham, 1984). Cette ressemblance est une ressemblance globale établie à partir du maximum d'observations disponibles. Ces observations doivent cependant constituer un ensemble de nature homogène. Ainsi L'arbre exprimant les relations phénétiques s'appelle un phénogramme, qui est un dendrogramme produit par la taxonomie

numérique où les relations entre taxons expriment les degrés de similitude globale. (Mayr, 1965 ; Camin *et al.*, 1965).

Pour les méthodes de distance, il s'agit tout d'abord de choisir le critère de distance entre les feuilles de l'arbre (individus). Par exemple, si ces individus sont des séquences d'ADN, on peut choisir comme distance entre deux d'entre elles le nombre de nucléotides qui diffèrent. Pour déterminer cette valeur, on est amené à en effectuer un alignement, puis on utilise soit la méthode UPGMA ou bien celle de NJ pour en déduire l'arbre. Par contre, si ces individus ont été étudiés sur les plans morpho-physio-biochimiques, donc les distances découleront des coefficients de similarité.

4. Les algorithmes phylogénétiques

L'application des algorithmes plus ou moins complexes permet de déduire, à partir de la matrice de distance, les relations phylogénétiques sous forme de dendrogrammes et de rassembler dans un même clade de similitude les espèces les plus rapprochées. Parmi toutes ces méthodes, on peut distinguer celles qui résultent de l'utilisation d'une certaine procédure algorithmique comme :

- La méthode UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean).
- La méthode de Neighbor-Joining (NJ).

4.1. La méthode UPGMA

Cette méthode utilise un algorithme de clustérisation séquentiel dans lequel les relations sont identifiées dans l'ordre de leur similarité et la reconstruction de l'arbre se fait pas à pas grâce à cet ordre. Tout d'abord on identifie les deux OTU (individus) les plus proches, ensuite on traite ce groupe comme un tout, puis on recherche l'individu le plus proche et ainsi de suite (Luchetta *et al.*, 2005).

4.2. La méthode NJ

Cette méthode tente de corriger la méthode UPGMA afin d'autoriser un taux de mutations différent sur les branches (Nei *et al.*, 1987). La matrice de distance permet de prendre en compte la divergence moyenne de chacun des individus avec les autres. L'arbre est donc construit en reliant les individus les plus proches dans cette nouvelle matrice (Luchetta *et al.*, 2005).

MATERIEL
ET
METHODES

. Matériel

1. 1. Les souches étudiées

Notre étude a porté sur des souches pré-identifiées au niveau du laboratoire de bactériologie du centre hospitalo-universitaire Dr Ibn Badis par des méthodes microbiologiques standardisées (galerie biochimique). Nous avons étudié neuf souches d'entérobactéries et une souche de cocci à gram positif *Staphylococcus saprophyticus* (soit un total de 10).

Tableau 4 : Répartition des souches analysées

Famille	Espèces	Nombre de souches	Code de l'espèce
<i>Entérobactériaceae</i>	<i>Escherichia coli</i>	5	EC1, EC2, EC3, EC4, EC5
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	KP1, KP2
	<i>Serratia marcescens</i>	1	SM
	<i>Entérobacter cloacae</i>	1	ENC
<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	SS
TOTAL		10	

Notre travail a été effectué aux laboratoires de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie (Université Mentouri Constantine), dans lequel nous avons réalisé un ensemble d'analyses microbiologiques et biochimiques sur les différentes souches fournies par le laboratoire de bactériologie de centre hospitalo-universitaire Dr IBN Badis.

2. Méthodologie

2. 1. Analyse bactériologique

2. 1. 1. Préparation de l'inoculum

La suspension bactérienne de chacune des 10 souches a été préparée dans un bouillon nutritif avec des colonies prélevées à partir d'un milieu solide.

2. 1. 2. Identification présomptive des souches

L'identification des souches a porté sur une série de tests biochimiques, un antibiogramme.

Les tests biochimiques ayant servi à l'identification sont :

- 1- Gaz en glucose, production d'H₂S, métabolisme du lactose et du saccharose. (Milieu TSI).
- 2- Production d'indole (métabolisme du Tryptophane).
- 3- Production de l'oxydase (physiologie respiratoire).
- 4- Production de catalase (physiologie respiratoire).
- 5- Test VP (Voges-Proskauer) : fermentation butanediolique et production d'acétoïne.
- 6- Test RM (Rouge de Méthyle) : fermentation des acides mixtes.
- 7- Production des décarboxylases : Milieux de Moeller.

1- Milieu TSI

La pente du milieu TSI estensemencée par stries et le culot par pique centrale, puis incubation à 37C° pendant 24 heures.

2- Test de l'indole

Le test est réalisé en introduisant dans de l'eau peptonée exempte d'indole quelques gouttes de la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette Pasteur suite à une incubation de 24h à l'étuve, l'addition du réactif de Kovacs montre la production de l'indole qui se traduit par un anneau rouge en surface du milieu.

3- Test de l'oxydase

Ce test est réalisé à l'aide de disques prêts à l'emploi, imprégnés du réactif : **N-diméthyl paraphénylène diamine**, sur lequel nous avons déposé une colonie. La lecture du résultat était immédiate et sans incubation.

4- Production de la catalase

Une colonie est prélevée à partir de la boîte de Pétri et déposée sur une lame. Une goutte de H₂O₂ (10 volumes) est déversée sur cette colonie. La lecture du résultat était immédiate et sans incubation.

5- Test RM-VP

Pour réaliser ce test, nous avons utilisé le milieu Clarck et Lubs et nous l'avonsensemencé à l'aide d'une anse de platine avec la souche bactérienne à analyser. Après avoir incubé à 37C° pendant 24 heures nous avons partagé le milieu en deux tubes pour pratiquer les deux tests :

- Réaction de Voges-Proskauer en ajoutant quelques gouttes du réactif VP1 et le même volume du réactif VP2. La lecture s'effectue après quelques minutes.
- Test du rouge de méthyle en additionnant 2 à 3 gouttes de rouge de méthyle. La lecture est immédiate.

6- Production de décarboxylases ODC, LDC

Ces tests ont été réalisés sur les bouillons LDC, ODC (appelés milieux de Moëller). Nous avonsensemencé chaque milieu avec quelques gouttes de la suspension et nous avons ajouté l'huile de vaseline car il s'agit d'enzymes anaérobies (cytoplasmiques). A la fin, les tubes et le tube de témoin ont été incubés à 37C° pendant 24 heures.

2. 1. 3. Réalisation pratique de l'Antibiogramme

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion des disques imprégnés d'antibiotiques en milieu Mueller-Hinton selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Les antibiotiques suivants ont été testés : Céfoxitine, ciprofloxacine , gentamycine, augmentin (amoxicilline + acide clavulanique), tobramycine.

❖ **Mode opératoire :**

a- Préparation de la gélose

La gélose Mueller-Hinton fondue au bain-marie a été versée en respectant une épaisseur de 4 mm.

b- Préparation et ajustement de l'inoculum

Des colonies de la bactérie à étudier ont été prélevées avec la pipette Pasteur et ont été introduites dans un tube contenant 10 ml d'eau physiologique en formant une suspension.

Ensuite l'inoculum est ajusté à l'étalon 0,5 Mac Farland. Pour cela une certaine quantité de la première suspension a été prélevée en utilisant toujours la pipette Pasteur et elle a été introduite dans un autre tube contenant 10 ml d'eau physiologique. Cette suspension ainsi préparée va servir à l'ensemencement.

c- Ensemencement

L'ensemencement s'est fait par inondation de la surface entière de la gélose avec quelques gouttes de la suspension bactérienne en s'assurant d'une bonne répartition des bactéries. Enfin nous avons laissé sécher les boîtes de Pétri pendant quelques minutes à température ambiante.

d- Disposition des disques d'antibiotiques

Après le séchage, les disques sont déposés sur la gélose à l'aide d'une pince flambée, en appuyant doucement sur chaque disque pour assurer un contact uniforme avec le milieu. Les boîtes sont ensuite laissées à la température ambiante pendant 30 minutes sur la paillasse pour permettre la diffusion de l'antibiotique dans la gélose.

e- Incubation

L'incubation s'est faite à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

f- Lecture interprétative

Les diamètres d'inhibition autour des disques sont mesurés puis ils sont comparés aux diamètres critiques conformément aux normes CASFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société française de Microbiologie).

2. 2. Phylogénie phénétique

2. 2. 1. codification des états des caractères

Une fois tous les tests réalisés, nous avons procédé à la codification binaire (1,0) des résultats obtenus. La codification établie pour les différents états des caractères étudiés est résumée dans le tableau suivant :

Tableau 5 : Codage des états des caractères

Caractères	Code 1	Code 0
Tests biochimiques	Résultat positif	Résultat négatif
Sensibilité aux antibiotiques	Résistante	Sensible

2. 2. 2. L'analyse phylogénétique

a)- Calcul du coefficient de similarité de Jaccard et matrice de distances

La taxonomie numérique va nous permettre de construire une matrice numérique de type 1/0 (matrice binaire). Cette dernière servira pour construire une matrice de similarité en calculant l'indice de similarité (S) qui à son tour va servir pour construire une matrice de distances en la calculant à partir des valeurs de S en utilisant cette équation :

$$d = 1 - S$$

Cette transformation a aboutit à l'obtention d'une matrice arithmétique qui permettra la construction des arbres phylogénétiques par le logiciel Mobyly portal en utilisant la méthode basée sur le calcul des distances qui repose sur l'algorithme Neighbors Joining.

Résultat et Discussions

1. Résultats

1.1 Tests biochimiques

Les résultats obtenus sont représentés dans une matrice binaire (tableau 6) qui a concerné toutes les souches étudiées.

1.1.1 Milieu TSI

C'est un milieu coulé en pente et en culot, au niveau duquel nous avons recherché 4 caractères :

- la fermentation du lactose sur la pente qui se traduit par virage au jaune.
- la fermentation du saccharose également qui se matérialise par virage au jaune.
- la présence de gaz qui se matérialise par le décollement du culot et/ou la présence de bulles d'air.
- la production de H₂S qui se traduit par une coloration noire.

Les souches d'*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Serratia marcescens* ont fermenté le lactose ainsi que le saccharose, elles produisent du gaz mais pas du sulfure d'hydrogène.

La souche d'*enterobacter cloacae* et *staphylococcus saprophyticus* ont fermenté le lactose ainsi que le saccharose et elle n'a produit ni du gaz ni du H₂S.

1.1.2 Production d'indole

La présence d'indole se matérialise par un anneau rouge, après addition du réactif de Kovacs.

Les souches d'*Escherichia coli* ont dégradé le tryptophane en indole, donc elles sont indole positif. Alors que les autres souches étaient indole négatif.



Aspect du test négatif



Aspect du test positif

Figure 2: Test d'indole

1.1.3 Production d'oxydase

La réaction positive s'est traduite par l'apparition d'une coloration violette à l'endroit où la colonie a été déposée soit immédiatement, soit quelques secondes après. Les résultats obtenus étaient les suivants :

Les entérobactéries et les staphylocoques étaient dépourvues d'oxydase et il n'y a pas eu de coloration, c'est-à-dire elles sont oxydase négative.

1.1.4 Production de la catalase

Après avoir réalisé le test de la catalase, nous avons eu ces résultats :

Toutes les entérobactéries que nous avons analysées sont des catalases positives et de même pour l'espèce *staphylococcus saprophyticus* dont la présence de la catalase se matérialise par la production de bulles.

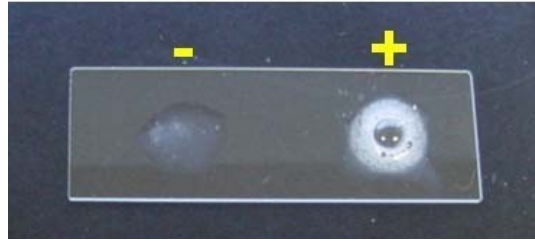


Figure 3: Test de la catalase

1.1.5 Test RM-VP

Le test VP (Voges-Proskauer) s'est fait sur le milieu Clark et Lubs et met en évidence la production d'acétoïne. Si le milieu reste incolore donc le test VP est négatif, par contre Si le milieu donne une couleur rose à rouge donc le test VP est positif. En fonction de ça, nous avons eu les résultats suivants :

Les souches d'*Escherichia coli* 1,2 et 3, étaient VP négatif car après ajouts des réactifs VP1 et VP2 il n'y a pas eu de réaction. Par contre les souches d'*Escherichia coli* 4,5, *staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella pneumoniae*, *enterobacter cloacae* et *Serratia marcescens*, ont donné un résultat positif.



Figure 4: Aspect du test VP positif

Concernant le test RM, tous les souches d'*Escherichia coli* étaient RM positif car le milieu est devenu rouge après l'addition du réactif de rouge de méthyle par contre les *staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella pneumoniae*, *enterobacter cloacae*, et *Serratia marcescens*, ont donné un résultat négatif.



Aspect du test RM négatif



Aspect du test RM positif

Figure 5: Test RM

1.1.6. Production de décarboxylases

Le diagnostic différentiel des espèces appartenant aux familles des *Enterobacteriaceae*, *staphylococcus* est souvent facilité par la recherche de la lysine décarboxylase (LDC), de l'ornithine décarboxylase (ODC) et de l'arginine dihydrolase (ADH).

Les deux types d'enzymes ont été rassemblés parce que leurs techniques de recherche sont identiques.

Une bactérie non décarboxylante utilisera les peptones du milieu, et produira des acides organiques ainsi que des bases faibles comme l'ammoniac. Le milieu deviendra jaune.

Une bactérie décarboxylante après avoir utilisé le glucose va produire du dioxyde de carbone et des amines. L'alcalinité des amines est importante, et le virage de l'indicateur de pH sera obtenu : le milieu restera violet.

Pour les souches d'*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *enterobacter cloacae* et *staphylococcus saprophyticus* le milieu de moëller ODC est devenu jaune car le milieu est devenu acide donc négatif car il aurait fallu avoir une ré-alcalinisation, par contre le milieu LDC n'a pas changé de couleur et il est resté violet donc LDC positif. Alors que pour L'espèce *Serratia marcescens* était LDC, ODC positif.

1.2. L'antibiogramme

Comme nous l'avons mentionné précédemment, chaque souche identifiée a été soumise à un antibiogramme afin de déterminer la sensibilité aux différentes bactéries.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries a permis d'obtenir les résultats suivants que nous présentons au tableau 6.

Tableau 6: Le profil de résistance/sensibilité chez les entérobactéries et les staphylocoques étudiés.

	SS	EN	SM	KP1	KP2	EC1	EC2	EC3	EC4	EC5
AM	S	R	R	S	R	R	S	R	R	R
CIP	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S
CEF	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
GENT	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S
TOBR	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S
A										

1.3. Analyse phylogénétique

Tous les résultats obtenus sont représentés dans une matrice binaire (tableau7).

Tableau 7 : Matrice binaire des caractères étudiés.

	SS	ET	SM	KP1	KP2	EC1	EC2	EC3	EC4	EC5
lac	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
sacch	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Glu	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
Gaz	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
H2s	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
indol	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
VP	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
RM	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
Oxy	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Cta	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ODC	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
LDC	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AM	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1
CIP	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
CEF	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
GE	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
TOB	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0

1.3.1 Calcul du Coefficient de Jaccard (I_S) :

Indice non symétrique, quantifie la similitude pour chaque couple bactérien selon l'équation suivante :

$$I_S = \frac{(1,1)}{(1,1)+(1,0)+(0,1)}$$

(1,1) = les deux états du caractère étudié sont présents dans les deux bactéries.

(1,0) = l'état est présent dans la première bactérie et absent dans la deuxième.

(0,1) = l'état est absent dans la première bactérie et présent dans la deuxième.

Le calcul du coefficient de Jaccard pour chaque souche bactérienne nous a permis de calculer la matrice de similarité. Une fois calculée, cette matrice servira pour le calcul de la matrice des distances selon l'équation :

$$d = 1 - I_s$$

Les deux matrices de similitude et des distances sont représentées dans les tableaux 8 et 9.

Tableau 8: Matrice de similarité des souches étudiées

	SS	EN T	SM	KP1	KP2	EC1	EC2	EC3	EC4	EC5
SS										
ENT	0,5 5									
SM	0,41	0,46								
KP1	0,85	0,50	0,38							
KP2	0,54	0,46	0,69	0,63						
EC1	0,50	0,41	0,35	0,60	0,53					
EC2	0,55	0,33	0,26	0,60	0,46	0,88				
EC3	0,55	0,45	0,35	0,44	0,50	0,90	0,77			
EC4	0,55	0,45	0,46	0,50	0,46	0,70	0,60	0,77		
EC5	0,50	0,50	0,42	0,45	0,42	0,63	0,54	0,70	0,70	

Tableau 9: Matrice des distances des souches étudiées

	SS	ENT	SM	KP1	KP2	EC1	EC2	EC3	EC4	EC5
SS										
ENT	0,45									
SM	0,59	0,54								
KP1	0,15	0,50	0,62							
KP2	0,45	0,54	0,31	0,37						
EC1	0,50	0,59	0,65	0,40	0,47					
EC2	0,45	0,67	0,74	0,40	0,54	0,12				
EC3	0,45	0,55	0,65	0,56	0,50	0,1	0,23			
EC4	0,45	0,55	0,54	0,50	0,54	0,30	0,40	0,23		
EC5	0,50	0,50	0,58	0,55	0,58	0,37	0,46	0,30	0,30	

1.3.2. Reconstruction des arbres phylogénétiques:

La matrice de distance obtenue a été traitée par le logiciel de construction des arbres phylogénétiques Mobyle portal. La méthode NJ utilisée a donné l'arbre phylogénétique suivant :

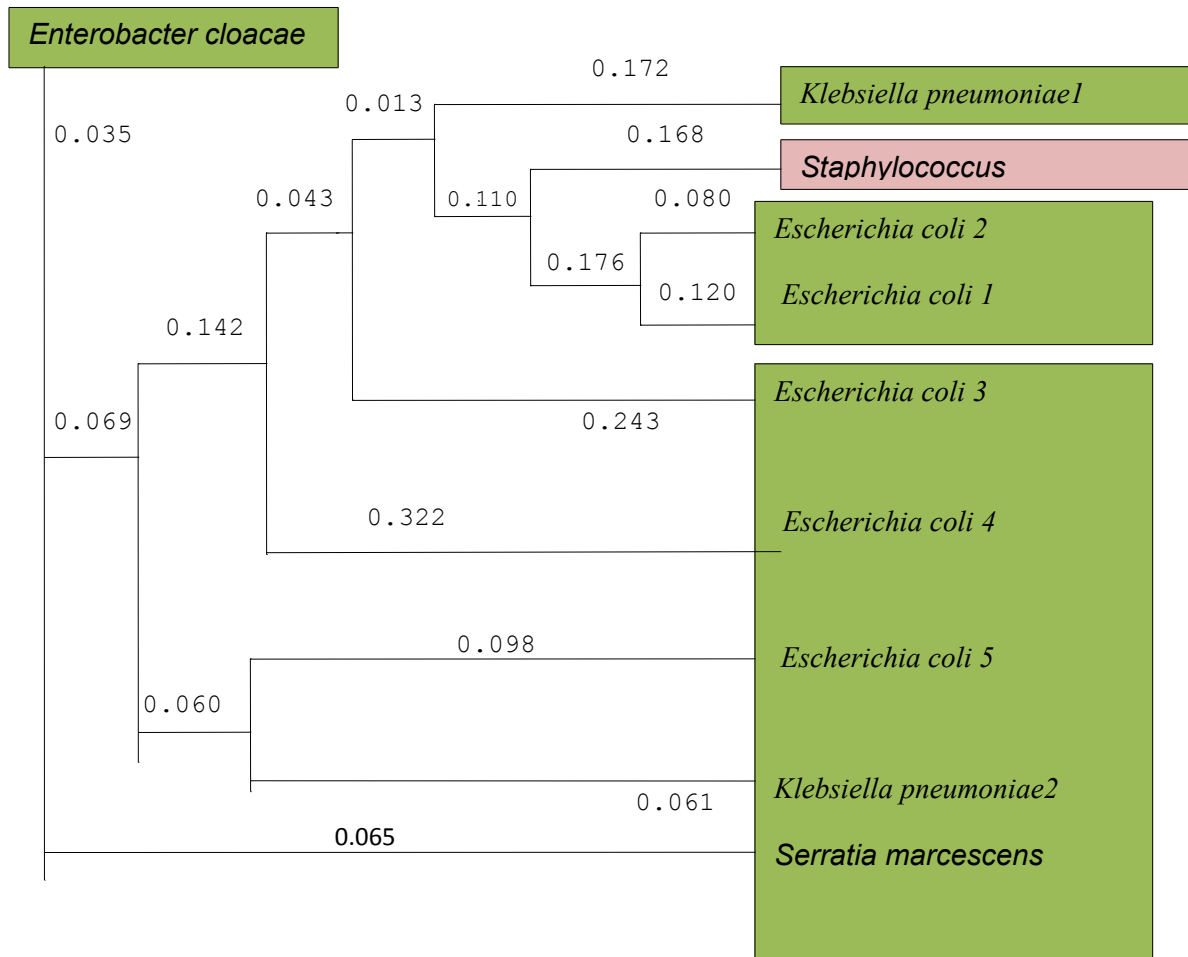


Figure 6: Arbre phylogénétique des souches étudiées construit selon la méthode

NJ

- Entérobactéries
- Staphylocoques

1.3.3. Reconstruction par la phylogénie moléculaire

Les séquences de l'ARNr 16S des souches étudiées ont été récupérées à partir d'une banque de donnée moléculaire : EMBL, et elles ont été traitées par le logiciel de construction des arbres phylogénétiques MEGA 4.0.

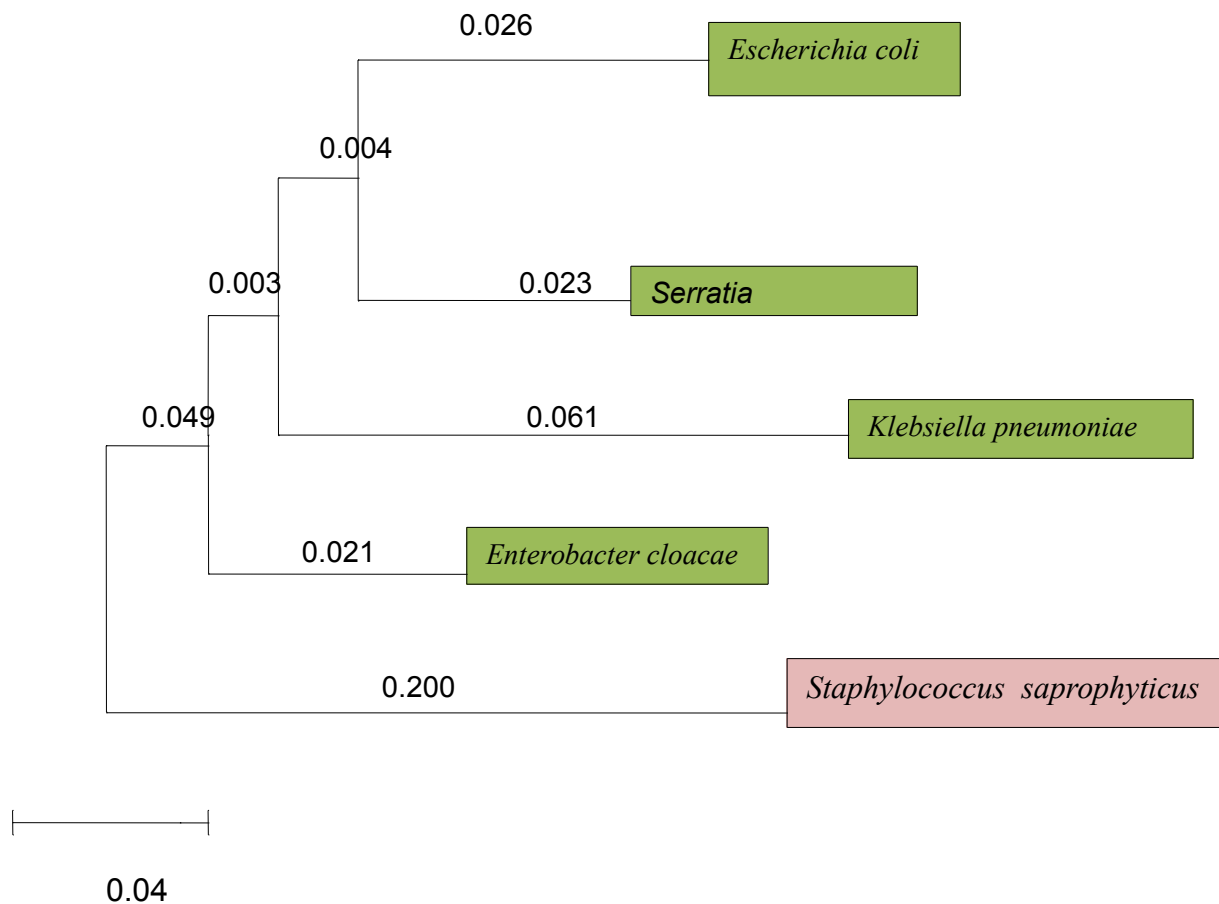


Figure 23 : Arbre phylogénétique construit à partir des séquences d'ARNr 16S des souches étudiées selon le logiciel MEGA 4.0

- Entérobactéries
- Staphylocoques

2. Discussion

Les dix souches étudiées isolées à partir des prélèvements cliniques ont été identifiées sur la base de leurs caractères biochimiques, et leur sensibilité aux antibiotiques.

Enfin, une phylogénie numérique des souches analysées a été construite selon l'algorithme NJ en la comparant avec l'arbre phylogénétique construit à partir des séquences de l'ARNr 16S.

2.1. Concernant les résultats des tests biochimiques

L'identification présomptive des bactéries a été effectuée en comparant nos résultats avec ceux relevés sur des références de systématiques bactériennes.

2.1.1. Milieu TSI

Le milieu TSI (Triple Sugar Iron) permet l'identification des entérobactéries par la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du glucose (avec ou sans production de gaz), du saccharose et de la production de sulfure d'hydrogène.

Au cours de notre étude, nous avons trouvé que toutes les souches d'*Escherichia coli* que nous avons analysées fermentent le lactose, le saccharose, le glucose avec production de gaz, et sans production de l'H₂S. Ces résultats sont en accord avec ceux de Hajna, 1945 ; Berche *et al.*, 1988. De même pour les souches de *Klebsiella pneumoniae*, nous avons trouvé le même profil biochimique que *Escherichia coli* concernant la gélose TSI, comme signalé par Hajna, 1945

Les espèces *Serratia marcescens* donne des résultats qui sont en accord avec les résultats décrits par Tariq *et al.*, 2010 ; Hajna, 1945

Pour les *Staphylococcus saprophyticuse*, et, Entérobacter cloacae elles donnent le meme profil biochemique que Escherichia coli consernnant la géloseTSI.Ces résultats sont en accord avec ceux de Kloos w.*et al.*,1981 ;Nishijima,1999.

L'utilisation de l'un des sucres contenus dans le milieu se traduit par une acidification qui fait virer le rouge de phénol au jaune, alors que la production de sulfure d'hydrogène se manifeste dans le culot par l'apparition d'une coloration noire de sulfure de fer qui est due à la réduction du thiosulfate en présence de citrate ferrique. L'apparition de bulles ou bien la fragmentation de la gélose est due à la production de gaz (hydrogène, CO₂) résultant des fermentations sucrées.

2.1.2. Production d'indole

Notre étude nous a permis de distinguer des souches d'*Escherichia coli* qui ont donné

une réaction positive avec le test indole. Ces résultats sont confirmés par la littérature, en comparant nos résultats avec ceux obtenus par Soomro *et al.*, 2002.

Par contre, ce n'était pas le cas pour les autres espèces étudiées telles que *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus saprophyticus*, et, Entérobacter cloacae, Ces résultats sont d'une part conformes à ceux rapportés par kloos w *et al.*,1981 ;nishijima.,1999 ; Alves *et al.*, 2006 ; Zarei *et al.* 2010 ; Nkang *et al.*, 2009.

L'indole est obtenu de la dégradation du tryptophane, grâce à une enzyme bactérienne la «tryptophanase ».

Il se forme de l'indole, de l'acide pyruvique et de l'ammoniac. L'indole est apolaire, donc soluble dans les solvants organiques et réagit fortement en milieu acide avec le para diméthylamino-benzaldehyde contenu dans le réactif de Kovacs. 2.1.3.

Production d'oxydase

Le

but du test d'oxydase est la recherche d'un système Cytochrome C des bactéries (oxydase positive). Ce test est un bon contrôle pour les bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, car elles sont toutes oxydases négatives, ainsi que pour les staphylococcus saprophyticus qui est toujours oxydase négatives

En

réalisant ce test, nous avons obtenu des résultats conformes à ceux rapportés par kloos w *et al.*,1981 ;nishijima.,1999 ; Le Minor *et al.*, 1989 ; Dhayanithi *et al.*, 2010

2.1.4.

Production de la catalase

Après avoir effectué le test catalase, toutes les souches d'entérobactéries que nous avons étudiées ont présenté un caractère catalase (+), ces résultats sont confirmés par (nishijima.,1999) ;(Khan *et al.*, 2011).

De même pour l'espèce de staphylococcus saprophyticus nous avons observé une positivité du test catalase. Ce résultat est superposable à celui obtenu par kloos *et al.*, 1981 2.1.5.

Test RM-VP

Selon

Nishijima.,1999 ; Nkang *et al.*, 2009 ; Rahman *et al.*, 2010 ,

les espèces *Escherichia coli* , fermentent le glucose en produisant de nombreux acides organiques plus ou moins forts par la voie des fermentations acides mixtes. Par contre les espèces de Entérobactérie cloacae *Serratia marcescens* , *Klebsiella pneumoniae* fermentent le glucose par la fermentation butanediolique en produisant l' **acétoïne** qui est mis en évidence par le test VP. Cette distinction des deux voies peut justifier une règle parfois contestable mais fréquemment vérifiée: les bactéries VP + sont toujours RM -, les bactéries RM + sont VP -.

En ce qui concerne l'espèce de staphylococcus saprophyticus et comme signalé par kloos *et al.*,

1981 fermente le glucose par la fermentation butanediolique en produisant l' **acétoïne** . D'après notre étude, nos résultats sont en parfait accord avec ceux décrits par les auteurs précédemment cités.

2.1.6. Production de décarboxylases

Les enzymes décarboxylases (LDC, ODC) et décarboxylase utilisées dans les galeries biochimiques réalisées pour l'identification des souches bactériennes isolées, présentent toutes un intérêt taxonomique.

Pour la recherche de ces enzymes, nous avons utilisé les milieux de Moeller. La première réaction est la fermentation du glucose par les entérobactéries et les staphylocoque, ce qui entraîne l'acidification du milieu (virage au jaune) qui va entraîner la deuxième réaction qui est la décarboxylation par activation des enzymes présentes dans le milieu, d'où l'alcalinisation de ce dernier (virage au violet).

En comparant nos résultats avec ceux rapportés par Matsen *et al.*, 1972 ; Kloos *et al.*, 1981 ; Le Minor *et al.*, 1989 ; Nishijima., 1999 ; Prischmann *et al.*, 2008 ; Zarei *et al.*, 2010, nous pouvons dire que notre identification par rapport à ce caractère biochimique a été excellente, nous avons trouvé presque les mêmes résultats

D'une manière générale, d'après notre étude et la série de tests biochimiques que nous avons réalisés, nos résultats montrent qu'ils sont dans la majorité des cas stables et intéressants pour l'identification bactérienne. Selon Pilet *et al.*, 1979, l'identification des bactéries commence par la détermination de la famille, ensuite du genre et enfin des différentes espèces par la galerie classique. Cependant, c'est sur l'étude des caractères biochimiques que repose le diagnostic d'espèce.

2.2. Concernant la sensibilité et la résistance aux antibiotiques

Comme nous l'avons mentionné précédemment, chaque souche identifiée a été soumise à un antibiogramme afin de déterminer la sensibilité et la résistance aux différents antibiotiques. Comme nous l'avons mentionné précédemment, chaque souche identifiée a été soumise

à un antibiogramme afin de déterminer la sensibilité et la résistance aux différents antibiotiques.

D'après notre étude, les résultats obtenus montrent que 100% des souches testées d'*Escherichia coli* sont résistantes à l'association d'acide clavulanique et l'amoxicilline, par contre elles présentent le phénotype sensible aux céfoxitine, ciprofloxacine, gentamycine, et

tobramycine. En ce qui concerne les autres antibiotiques, nous observons qu'au sein de la même espèce et pour le même antibiotique il y a des souches qui présentent le phénotype sensible et d'autres présentent le phénotype résistant. D'une manière générale, en prenant le cas de l'association d'acide clavulanique et l'amoxicilline, nous remarquons que nos résultats sont conformes à ceux rapportés par Davis *et al.*, 2011 ; Ferjani *et al.*, 2010. Par contre dans le cas par exemple de la gentamycine, nos résultats présentent une discordance avec les résultats décrits par Baker *et al.*, 2010 qui ont confirmé la résistance d'*Escherichia coli* à la gentamycine, alors que dans notre étude, nous avons trouvé que 100% des souches de cette espèce étaient sensibles.

De même, pour les autres souches d'entérobactéries que nous avons testées. Leur comportement avec les antibiotiques diffère, des fois les souches bactériennes analysées présentent des sensibilités ou des résistances qui sont en parfait accord avec les résultats rapportés par d'autres auteurs, et parfois elles présentent une discordance. En ce qui concerne les staphylococcus saprophyticus sont sensibles aux antibiotiques testés dans notre travail. Selon Leclercq *et al.*, 1991 les résistances que nous avons identifiées sont donc en parfait accord avec les résistances naturelles de ces bactéries.

A coté de ces résistances naturelles, certaines souches ont tendance à acquérir une résistance vis-à-vis de l'antibiotique, une souche sensible à un antibiotique donné peut devenir résistante, donc c'est une résistance acquise due à la mutagenèse.

Les discordances liées à la recherche de résistance ou de sensibilité des bactéries aux différents antibiotiques peuvent être expliquées par les erreurs au cours de la manipulation qui sont liées aux : inoculum non standardisé qui traduit de fausses résistances, présence d'un contaminant, mauvaise application des disques à la surface de la gélose, utilisation du milieu inapproprié...etc.

2.4. Concernant la phylogénie

L'analyse numérique des résultats réalisée grâce à l'approche bioinformatique en utilisant la méthode de construction des arbres phylogénétiques NJ est basée sur :

- Les tests biochimiques.
- Le profil de résistance/sensibilité aux antibiotiques.

Le calcul du coefficient de Jaccard est basé sur les caractères utilisés dans notre étude qui restent insuffisants pour pouvoir aboutir à une identification précise de l'espèce, car le principe de base de la taxonomie numérique consiste à comparer sur un plus grand nombre de caractères.

Le clade regroupant les deux souches d'*Escherichia coli* (EC2, EC1) et *Staphylococcus saprophyticus* montre que cette dernière est éloignée des deux souches précitées par une distance de : $0.168 + 0.176 = 0.344$. La liaison de *Staphylococcus saprophyticus* avec *Escherichia coli* est inacceptable du fait qu'elles appartiennent à deux familles différentes.

Sur la topologie NJ, nous constatons que la souche de *Staphylococcus saprophyticus* est mal placée, elle fait partie du même clade que : *Klebsiella pneumoniae*¹, *Escherichia coli* (EC2, EC1, EC3).

Le clade comprenant la souche d'*Escherichia coli* (EC5) et *Klebsiella pneumoniae*² montre qu'elles sont séparées par une distance de $0.098 + 0.061 = 0.159$, cette légère séparation est acceptable du fait que ces deux souches font partie de la même famille.

L'établissement d'un profil phylogénétique basé sur les séquences de l'ARNr 16S, relevées sur EMBL qui représentent les espèces étudiées, nous a permis de faire une étude comparative.

La séquence du gène de l'ARNr 16S pour la souche de *Staphylococcus saprophyticus* a été alignée à l'aide du logiciel ClustalW avec les séquences des espèces représentatives des entérobactéries disponibles au niveau des bases de données (GenBank, EMBL, et DDBJ).

Cette analyse phylogénétique a abouti à la construction d'un arbre enraciné, dont la racine est l'espèce de *Staphylococcus saprophyticus*.

D'après cet arbre phylogénétique, nous distinguons deux groupes distincts séparés par une distance de $0.200 + 0.049 = 0.249$.

- Groupe 1 : *Staphylococcus saprophyticus*.
- Groupe 2 : Reste des clades (entérobactéries).

Au sein du groupe 2, nous constatons que *Serratia marcescens* se place dans la même branche phylogénétique qu'*Escherichia coli*, *Eterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, et

occupe une ligne phylogénétique commune avec l'espèce *Escherichia coli* dont elles sont séparées par une faible distance ($0.026 + 0.023 = 0.049$).

Cependant, *Serratia marcescens* reste proche d'*Escherichia coli* dans l'arbre construit à partir des séquences d'ARNr 16S, mais elles sont éloignées dans le cas de l'arbre NJ.

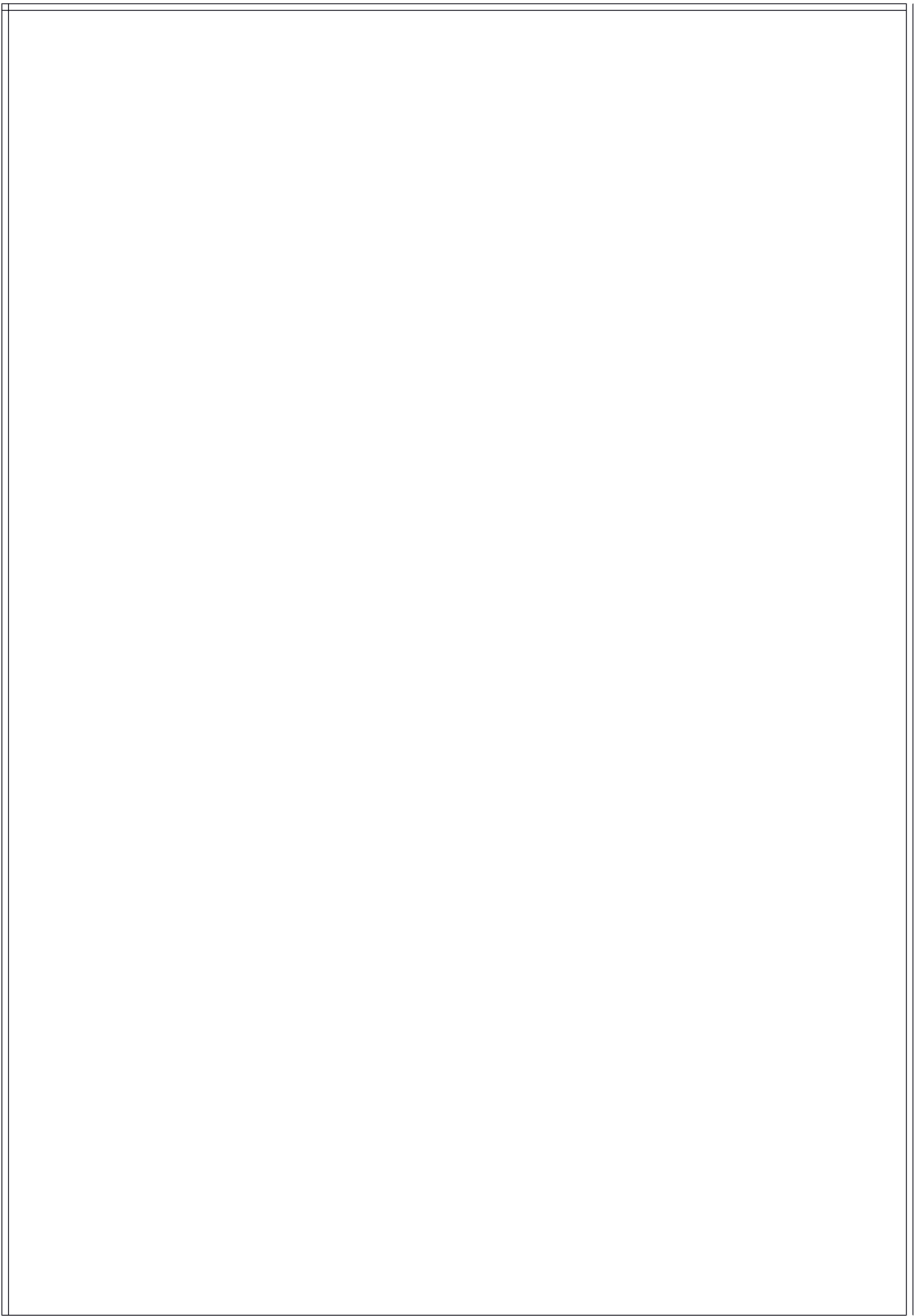
En comparant les deux arbres obtenus (moléculaire et NJ) il ressort que dans l'arbre NJ, certaines souches n'ont pas conservé leur structure cladistique.

En fin, l'analyse phylogénétique représentée par les différents dendrogrammes démontre la grande complexité à trancher pour une phylogénie définitive.

La classification bactérienne diffère selon les variations des comportements des souches pour des raisons d'adaptation avec les contraintes de l'environnement et les conditions de vie, ce qui aboutit à des interrelations phylogénétiques différentes.

Il ressort que l'information apportée par l'analyse des caractères biochimiques ne peut en aucun cas être une référence pour aboutir à des conclusions précises de systématique bactérienne, car en systématique bactérienne, l'identification des espèces est un aboutissement d'un mélange d'approches taxonomiques qu'il faut manipuler avec prudence.

Nous recommandons donc l'utilisation d'autres techniques et d'autres outils pour l'identification des espèces comme les techniques d'analyses chimiques (structures membranaires et organelles), moléculaires (l'hybridation ADN-ADN, l'ARNr 16S, microsatellites, RFLP,...), et immunologiques (les antigènes de surface), en plus l'analyse basée sur la morphologie, la biochimie, et la physiologie, pour mieux refléter les relations phylogénétiques.



CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

Conclusion et Perspectives

Les entérobactéries et les staphylocoques constituent les principales bactéries responsables d'infections humaines graves qui constituent un sujet de préoccupation croissante dans le domaine de la santé publique en raison de leur fréquence élevée et de leur gravité. Le diagnostic microbiologique et le traitement de ces infections imposent l'identification correcte de l'agent étiologique en vue d'une bonne prise en charge thérapeutique.

De ce fait, nous avons essayé de confirmer ou d'infirmer la contribution du phénotype biochimique dans l'identification bactérienne et l'établissement des parentés phylogénétiques.

Notre travail qui a fait appel à des techniques de laboratoire a permis d'identifier des différentes espèces bactériennes incriminées dans les infections humaines, d'établir leur profil de résistance/sensibilité vis à vis des antibiotiques couramment utilisés, et l'établissement d'un profil phylogénétique en utilisant l'approche de modélisation bioinformatique.

Au terme de ce travail, il ressort que :

- Le phénotype biochimique présente certaines limites dans l'identification bactérienne.
- Les entérobactéries et les staphylocoques présentent une importance croissante de la résistance vis-à-vis des antibiotiques, dont les mutations jouent un rôle important dans l'acquisition des résistances.
- L'analyse des séquences de l'ARNr 16S est un outil important dans l'identification bactérienne, puisqu'elle fournit des informations sur l'emplacement phylogénétique des espèces.

Enfin, au point de vue perspective, nous insistons sur l'élaboration d'une approche pour permettre aux laboratoires de santé de suivre une démarche simple, cohérente et fiable pour une bonne identification de ces différentes espèces d'entérobactéries et de bacilles à Gram négatif non fermentaires. Comme il est adéquat d'intégrer des outils moléculaires et bioinformatiques pour une phylogénie plus précise et plus fiable pour une systématique plus approfondie.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Alvarez C., Pangnon B., Allouch P.Y., Ghnassia J.C. (1992). Infections urinaires: principaux aspects épidémiologiques, bactériologiques et cliniques. *Feuill Biol.* **23** (189) : 15-24
- Avril J-L., Dabernat H., Denis F. et al. (2000). Bactériologie Clinique. Ellipses. 601 p
- Berche P., Gaillard J.L., Simonet M. (1988). Bactéries des infections humaines. Flammarion Médecine-Sciences. p. 100-545.
- Bossert I.D., Young L.Y. (1986). Anaerobic oxidation of paracresol by a denitrifying bacterium. *Applied and environmental Microbiology.* **52** (5) : 1117-1122.
- Bouteleux C. (2005). Survie d'Entérobactéries dans les eaux de distribution : Rôle de la matière organique d'origine algale. Thèse de Doctorat. Université Henri-Poincaré-Nancy I. 275 p.
- Carbonnelle B., Denis F., Marmonier A., et al. (1987). Bactériologie Médicale : Techniques usuelles. *SIMEP SA.* Paris. p.121-137.
- Dellarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Technique et documentation. France. Lavoisier. 462 p.
- Djelouat S. (2009). Les entérobactéries : L'essentiel. [En ligne]. <http://knol.google.com/k/salim-djelouat/mes-knols/> . (Consulté le 16 Mai 2011)
- Davis J.A., Jackson C.R., Fedorka-Cray P.J., Barrett J.B., Brousse J.H., Gustafson J., et al. (2011). Anatomical distribution and genetic relatedness of antimicrobial-resistant.
- Edwards A.W.F., Cavalli-Sforz L.L. (1964). Phenetic and phylogenetic classification. Chapter Reconstruction of evolutionary trees. *System. Association Publ.* **6** : 67-76.
- Dhayanithi N.B., Ajith Kumar T.T., Kathiresan K. (2010). Effect of neem extract against the bacteria isolated from marine fish. *Journal of Environmental Biology.* **31** : 409-412
- Delarras C. (2003). Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux. TEC & DOC. Lavoisier. Paris. 269 p.
- Dellarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Technique et documentation. France. Lavoisier. 462 p.
- Ewing W.H., Edwards P.R. (1960). The principal divisions and groups of Enterobacteriaceae and their differentiation. *Intern Bull Bacteriol Nomencl Taxon.* **10** : 1-12.
- Felsenste J. (1973). Maximum likelihood and minimum- steps methods for estimating

evolutionary trees from data on discrete characters. *Syst. Zool.* **22** : 240-249

- Ferjani A., Mkaddemi H., Tilouche S., Marzouk M., Hannechi N., Boughammoura L., et al. (2011). Caractéristiques épidémiologiques et bactériologiques des bactéries uropathogènes isolées dans un milieu pédiatrique. *Archives de Pédiatrie.* **18** (2) : 230-234..

- Goettsch W., Van Pelt W., Nagelkerke N., et al. (2003). Increasing resistance to fluoroquinolones in *E. coli* from urinary tract infections in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother.* **46** : 223.

- Goldstein F.W. (2000). The Multicentre Study Group Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary tract infections in France. *Eur J Clin Microbiol Infect Diseases.* **19**: 7-112.

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

- Gupta K., Scholes D., Stamm W. (1999). Increasing prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in women. *J Am Med Association.* **281**: 736

. - Hajna A.A. (1945). Triple Sugar Iron Medium for the Identification of the Intestinal groups of Bacteria. *J. Bact.* **49** : 516-517.

- Joffin J.N., Leyrol G. (2006). Microbiologie technique. Tome1. Dictionnaire des techniques. Bordeaux : CRDP d'aquitaine. 363 p.

- Joly, B., Reynaud A. (2003). Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic. TEC & DOC. Lavoisier. Paris. 356 p.

- Kitouni M. (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de Doctorat. Université Mentouri de Constantine. 171 p.

–Kloos W.E.and Lambejr.D.W. Staphylococcus In manual of clinical microbiology, 4th ed Am. Soc. For Microbiology , 1981 : 222-235

- Larabi K., Masmoudi A., Fendri C. (2003). Etude bactériologique et phénotypique de résistance des germes responsables d'infections urinaires dans un CHU de Tunis. *Méd Mal Infect.* **33** : 52-348.

- Larpent J.P. (2000). Introduction à la nouvelle classification bactérienne. Technique et documentation. Paris. Lavoisier. 261p.

- Leclerc H., Mossel D.A.A., Edberg S.C., Struijk C.B. (2001). Advances in the

- bacteriology of the Coliform Group: their suitability as markers of microbial water safety. *Annu. Rev. Microbiol.* **55** : 201-234
- Le mine L; Veron M. Bactériologie médicale Flam. ; Med. Science , Paris 1989 -
- Leclerc R., Courvalin P. Intrinsic usual resistance to MLS Antibiotics in bacteria. *Antimicrobs Agent chemother* 1991 : 35 : 1273-1276
- Luchetta P., Maurel M.C., Higuët D. et al. (2005). Evolution moléculaire. Dunod. Paris. 330 p.
- Mayr, E. (1986). La systématique évolutionniste et les quatre étapes du processus de classification. Fayard, Fondation Diderot. Paris. p. 143-160
- Matsen J.M., Blazevic D.J., Ryan J.A., Ewing W.H. (1972). Characterization of Indole-Positive *Proteus mirabilis*. *Applied Microbiology.* **23** (3) : 592-594
- Mayr E. (1965). Classification and phylogeny. *Amer. zool.* **5**: 165-174.
- Microméthodes d'identification et étude de la sensibilité des Staphylocoques, Enterocoques et Streptocoques. Intérêt et Application dans le diagnostic rapide infections microbiennes *Thèse pharm., UCAD, Dakar, 2001 n°100* : 3-32.
- Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., et al. (1999). Manual of clinical Microbiology. 7th ed. American Society for Microbiology, Washington DC. p. 442-458..
- Nkang A.O., Okonko O.I., Fowotade A., Udeze A.O., Ogunnusi T.A., Fajobi E.A., et al. (2009). Antibiotics susceptibility profiles of bacteria from clinical samples in Calabar, Nigeria. *J. Bacteriol. Res.* **1** (8) : 89-96
- . Nishijima, KA "Enterobacter cloacae." Master cultures de connaissances. Janvier 1999. http://www.extento.hawaii.edu/Kbase/crop/Type/e_cloac.htm
- O'Donnel A.G., Minnikin D.E., Goodfellow M. (1985). Integrated lipid and wall analysis of actinomycetes. In Chemical methods in bacterial systematic. Ac. Press., London. p. 131-143.
- Pechère J.C., Frottier J. (1995). Une menace croissante : la résistance aux antibiotiques. *Médecine Hygiène.* **2090**: 107
- . Prischmann A.D., Lehman R.M., Christie A.A., Dashiell K.E. (2008). Characterization of bacteria isolated from maize roots: Emphasis on *Serratia* and infestation with corn rootworms (Chrysomelidae: Diabrotica). *Applied soil ecology.* **40** : 417-431.
- Rahal K., Benslimani A., Ammari H., et al. (2009). Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. [En ligne]. <http://www.sante.dz/aarn/index.htm> . (Consulté

le 07 Juin 2011).

- Rahman M.M., Akhter S., Mahm J., Pandeya D.R., Haque M.A., Alam M.F. et al. (2010). Control of coliform bacteria detected from diarrhea associated patients by extracts of *Moringa oleifera*. *Nepal Med Coll J.* **12** (1) : 12-19.
- Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P., Kämpfer P., Maiden M., et al. (2000). Report of the ad hoc committee for the reevaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52** : 1043-1047.
- Wayne G., Brenner D.J., Colwell R.R., Grimont P.A.D., Kandler O., Krichevsky M. et al. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematic. *Int. J. Syst. Microbiol.* **37** : 463-464.
- Wise R., Hart T., Cars O., et al. (1998). Antimicrobial resistance is a major threat to public health. *British Med J.* **317**: 10.
- Zarei M., Aminzadeh S., Zolgharnein H., Safahieh A., Ghoroghi A., Daliri M., et al. (2010). *Serratia marcescens* B4A chitinase product optimization using Taguchi approach. *Journal of biotechnology.* **8** (4) : 252-262.
- Zavarzin G.A., Stackebrandt E., Murray R.G. (1991). A correlation of phylogenetic diversity in the *Proteobacteria* with the influences of ecological forces. *Can J. Microbiol.* **37**: 1-6.

ANNEXES

Les séquences partielles de l'ADN 16S des bactéries à Gram négatif et positif
(*Enterobacteriaceae*, *staphylocoque*) relevées sur EMBL

Taxon	Séquences
<i>Escherichia coli</i>	<p>caagggttgcgaacataccgcgcaaatagatactgatcataagcgttaaaaaaatctacaaccaacgcaacacaattcatgccctggcagtatgtcacgttctcgcgttctgaacggggaacggcgtccattgaggaagtcatcatatgaaaaatataaaattcagcctggcctggcagattctgtttgctatggtgctgggcattctcctgggaa gtaacctgactaccatagcgacagccgcgactggctggctcaattgctctctccggcggtgatattc atccatctgattaaatgattgttgccgattgatctccacgctgggtgggtatcgcggtgttggtgat gccaaacagctcggcgattggcgcgaaaaccattatctacttcgaggtgatcaccaccgtccatcattt ggggatcactctggcgaactctccagcccgggtgccgggtggatattgctgcagttggcgaccgtcgcatac tcgaaatatcagagcactacggaagcggtaaaaagcagttccacggcattatgggcacgattttgctgctgg tggcgacgaacattgtggcgtgatggcgaaggcgaatgctccgatcatcttttctcggtgctgtttggt tgggctttctccctgcccgacgcacatcgtgaaccgctggtagcgtgtccgctccatctctgaaaccatg ttaaaagtactacatggtgatgcgttatgcaaccggtgggtgtgtttgctgattgaggtgacggtggctaa ctttggttctcgtctctgtggcactggcgaactggtgctgctggtgcatttcgccattctgttctcgcgctgg tagtgctgggaattgtggcgcctgtgctgggttaagcgtctggatcctgattctgaaagatgagctg attctggcgtactccactgccagctctgaaagcgtgc...</p>
<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	<p>agatcctcggccactgctggccgaggggacatcaatgccgcaaagttaccgacgtcaatcgtagtctgctc agcctgctgctcatacatcaaatcaataacggatacggttgccccagatcgtccggttcagagcgccctgtca ccctaaaaccatcttctgataaaaccgaccgttctcattctgctcattacattggtcgtcagcttcggcg ttaacgacagcgcgatgctcaatcagcaactccccacgccacagccgaggacatccggatcgcgaacagc gcatccatatttctccggtcagcagcataaaggcagatcgggtggtcttccgtattaaccgccaccacagcg gagcctccggtaaaaatgcgcgtaccatctctccagctccttcgatacgttttgcagaaaatcatgctg gctcgcaccgaccgacaccagatcgcagtcagttatcccctcatcaggccgggaacggcggtatgtaataa ccatactttctcctttctacattcttatattctaactcaacaagcggcgtgaaatttctcaccgtgaacatgca gactcgcattcaccgattctggtatcttcagctatctggatgtctaaacgtttatacgtatgctatgaggtaa tacagttatgccaattcgggtgcaggacgagctgccagcgtcaatttctgcgaatgaaaacgtcttctgtaa tgacgacaacacgtgcaacgactcaggaaatccgcccctgaagggttaacctcaacctgatgccgaaga aaatcgagacggaaaaccagttcctgctctgctatcaaaactctccgctgcaggtggatccagttattacgt atcgatgcgcgagctgcgtaatacccctcgggagcatctgaataactttactgtaatttcgatgagatctg cgatcagaactttgacggcctgattgtaccggcgtcct...</p>

<p><i>Serratia marcescens</i></p>	<p>tcagcttggtcggggcgtgaccaaggatctgactgaccgctgaaagccggcgagttgatcggcaacgtg gcgcagcagttcggcggcaagggcggttgcacctgatatggcgatggmcgggggggacggatatcaa cgccctgccagcggcgttaaacagtgtagaagcctgggtggcctcgaagctgtgaacataaataatagca cgcaaaacgccataatactttgttgattatggcgtttcactactgtgctaacacaatctagtataatcgcg gaacaaagttttcaggtcggctaaacttaccgttatctgaggtgggaccaagctgcttacctattgtgga ttgcgcggttacgtttcaccacatatgatggataatgacgggaaactgaaaaaccgactctttaatctt tcaaggagcaagaatgtaattctgactcgtcagttggtgaaaccctcatgattggcgatgaggtcacggtc actgtgctaggggtaaaaggcaaccaggtgcgtattggtgtaacgccccaaagaggttccggtcaccg agaagaaatctatcagcgcattcaggcagagaagtcagcagacgacttactgattccgaagcagcgtctcg ttcctgacgagacgctactgcatcgtttaatcacttctcgtctccctctcttttcggtattttcccgg tgagtttctgcttggctatggacgcccggttcctgttgataaaacgcccttttgcggtgaaatcgcc atggtgagtgtaattgtgcaaacgcgcatgagttgggaaaaattggttgactaaaagtcggagaaagtaa tatgtgcgccacgagtcgcatgagcttcttaaagcaagtcaggcacaattcgaagaagcgtttggtga ggtggccgagaggctgaaggcgtcccctgctaaggagatgacggtcaaaagct</p>
<p><i>Entérobacter cloacae</i></p>	<p>cgttgcaactatcgtaactgaatacataggttaacgaggcgaaccgggggaactgaaacatctaagtaacc cgaggaaaagaaatcaaccgagattccccagtagcggcgagcgaacggggagcagcccggagtctgaa tcagcttggtgtagtggaacggtctggaaagtccgacggtacaggggatagctcccgtacacgaaagca acatgctgtaactgaagagtagggcgggacacgtggtatcctgtctgaatatggggggaccatcctcca aggctaaatactcctgactgaccgatagtgaaaccagtaaccgtgagggaaaggcgaagaacccccggcg aggggagtgaaaagaacctgaaaccgtgtacgtacaagcagtgaggagcctctttatgggggtactgcgta cctttgtataatgggtcagcgacttatattctgtagcaaggtaaccgtataggggagccgaagggaaccg agtcttaactgggcgtaagttgcagggtatagaccgaaaccgggtgatctagccatgggcaggtgaaagg ttgggtaacactaactggaggaccgaaccgactaatgttgaaaaattagcggatgacctgtggctgggggt gaaaggccaatcaaaccgggagatagctggttctccccgaaagctatttaggtagcgcctcgtgaactcatc ttcggggtagagcactgttcggctagggggccatcccggcttaccaccgatgcaaactacgaataccg aagaatgttatcacgggagacacacggcggtgctaacgtccgtcgtgaagagggaacaaccagaccg ccagctaaggtccaaaagtcaggttaagtggaacgatgtgggaaggcagacagccaggtggtg cttagaagcagccatcattaaagaagcgaatagctcactggtcagtcggcctgcgcggaagatgtaac ggggc</p>

Staphylococcus saprophyticus	atgaaaaagttaaggtataataatttaagtaataaaaccagattaaatcatcaatttaaattttctactatggc actcattattagcacttctttgatggggatagtagtacttcgacacccatcagtagaagcaaaagataaggct gattaaatattgagacgcattcgaatagtgaaaatcgcctagaacaacgcattcaagaaggtaaagagaa aattgataaattaaacatcaaagatagtcagaaagatgcttctattaaagaattacaaaagctaaaa gcacagaagaagttgaagcaatattgaagaagcaaaaaaagttgataataaaatcattgaacagaatag agtgcagagtcatttaattgaaaatgacaaaaggaagtagtctgaagataagaaaagtgtaaaagtgag ttagatagtaaaaaaatatagtttcttctgttaaagaaaagtcacatattgaagaacaagatagattg actgttcgatcaagaagacctgcaagataatacgtttgatgctaatttaaatacaagagatacaaagcaag atatactcatttagttgatatgggtaaactaatgaagaaagtaagatatagcagatatgaatgatagtg aagaaaataaaaatacggcttcagaaaaagacgcaggcgctgttaaagaaaacaaccaagacggttag cattaaagatacatctaataactaagagtaatacaatgcaacaatcagacgaaattaaaaaagacatcgat aaagttacgacaaaccattcaaaagtaaaagataatttagattattatgtcgaataaaagaaaataatta aagatattggattcaaagctttctgaacgagactcaatatctgctaaaaacaagaaaaattgaaaagga aatagaaaaacgcaacaagctaaagaacaaaatgacgttgattaaatcattacaatctgtaaata. ..
---------------------------------	--

FANTAZI DOUNIA BESTANDJI MOUNIRA	Date de soutenance 26 / 06 / 2014
DIPLOME DE MASTER	
phylogénie moléculaire et diagnostic des souches hospitalières	
<p>RESUME</p> <p>Dix souches bactériennes ont été isolées à partir des prélèvements cliniques fournies par le laboratoire de bactériologie (Ben Badis). Elles ont été identifiées par les méthodes microbiologiques standardisées (galerie biochimique). Parmi les dix souches étudiées, Neuf souches appartiennent à la famille des <i>Enterobacteriaceae</i> et une souche font partie des cocci à Gram positive (<i>Staphylocoque</i>). Ces souches ont été identifiées présomptivement selon leurs caractères biochimiques, leur sensibilité ou leur résistance aux antibiotiques.</p> <p>Un profil phylogénétique a été réalisé par les méthodes phénétiques de distances, en utilisant l’algorithme NJ et l’analyse des séquences de l’ADN 16S.</p> <p>L’analyse des topologies obtenues a permis de déterminer le poids du phénotype biochimique dans l’établissement des parentés phylogénétiques.</p>	
<p>Mots clés : Entérobactéries, staphylocoque, cocci, phénotype biochimique, phylogénie.</p>	
<p>Laboratoire de recherche</p> <p>Laboratoires de Microbiologie et de Biochimie. Département de Biochimie-Microbiologie. Faculté des sciences de la Nature et de la Vie. Université Constantine1.</p>	
<p>Présidente : LAHLAH F</p> <p>Encadreur : MEZIANI M</p> <p>Examinatrice : BELMESIH A</p>	<p>Maître assistante –classe-A-</p> <p>Maître assistante –classe-B-</p> <p>Maître assistante –classe-B-</p>