

République algérienne démocratique et populaire

**Ministère de l'enseignement supérieur
Et de la recherche scientifique
Université de Saad Dahleb de Blida
Faculté des sciences vétérinaires
Département de vétérinaire**

Thèse : en vue de l'obtention d'un diplôme de « docteur vétérinaire »

Thème :

**Etude de la résistance des souches
d'Eschérichia coli d'origine aviaire vis-à-vis de
quelques antibiotiques**

Présenté par :

Melle : LOUMI Baya
Melle : HALFAOUI Zehor

Promoteur : Bachir Pacha Mohamed maître de conférence

Devant les membres de jury :

Mr : BERBER. A	maître de conférence	-Président
Mr : KELANAMER. R	maître assistant	-Examineur
Mr : KHELADI. A	maître assistant associé	-Examineur

Année universitaire : 2005-2006

Remerciements

Nous exprimons notre grande gratitude envers Allah, le clément et le miséricordieux, puis tous nos remerciements vont :

A monsieur Bachir Pacha Mohamed, notre promoteur de thèse qui nous a inspiré ce travail, ainsi que pour ses conseils, orientations et encouragements fournis tout au long de ce travail.

A monsieur LOUMI Boualem, directeur de production de l'unité MITAVIC Soumaà qui n'a épargné aucun effort pour le bon déroulement de ce travail et pour son soutien moral, ses aides, et son suivi.

A tout le personnel de l'unité MITAVIC.

A Noura et Fatiha, travaillant au laboratoire vétérinaire régional de DBK, qui nous ont beaucoup aidé pour notre stage pratique.

A tous nos enseignants pour avoir élargit nos horizons de savoir et de la connaissance dans le domaine de la médecine vétérinaire.

A tous les membres de jury pour avoir accepté d'examiner notre thèse.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Dédicaces :

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents pour leur amour et leurs sacrifices et qui n'ont épargné aucun effort pour le bon déroulement de ce travail, que dieu les protège et les garde pour moi,

Mes sœurs : Fouzia, Amel et mes frères : Nacer et Mohamed pour leur encouragements et leur amour,

Ma belle sœur : Nassiba

Mon fiancé : Naim qui n'a épargné aucun effort pour me soutenir moralement et m'encourager pendant le déroulement de ce travail et à sa famille : Gharbi

Mes amis,

Hassina,

Mon binôme Zohor avec qui j'ai passé des chaleureux moments inoubliables, que dieu nous garde amies à vie et à sa petite famille,

A tous ceux qui me sont chers.

Dédicaces :

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents, partis trop tôt pour que je puisse leur manifester, à juste titre, mon incommensurable gratitude. Ce travail est une expression de ce que je leur ai toujours porté ; l'amour et le respect, que dieu les garde dans son vaste paradis.

*Mes sœurs : Lilia, Safia et Hassiba et beaux frères : Aissa, Mahfoud et Hamza.
Toute ma famille et spécialement ma tante Bahia.*

Mon cousin Rheda et ma cousine Faiza.

Mon binôme Baya, mon soutien et a toute sa petite famille avec qui j'ai passé de chaleureux moments.

Mes amis.

Hassina.

Tous ceux qui me sont chers.

Sommaire

Préambule	1
Introduction.....	3

Partie théorique

Chapitre I : Présentation de l'entreprise MITAVIC SOUMAA

I. Situation géographique.....	5
II. Activité principale de l'entreprise.....	5
III. Description des structures de production.....	5

Chapitre II : Eschérichia coli

I. Historique.....	10
II. Habitat.....	12
III. Pouvoir pathogène et pathogénie.....	12
III.1 Pouvoir pathogène et pathogénie chez l'homme.....	13
III.2 Pouvoir pathogène et pathogénie chez les animaux.....	16
IV. Etude bactériologique.....	26
IV.1 Définition de la famille des entérobactériacea.....	26
IV.2 Taxonomie	26
IV.3 Caractères morphologiques	27
IV.4 Caractères cultureux	28
IV.5 Caractères biochimiques	29
IV.6 Caractères antigéniques	29

Chapitre III : Les antibiotiques

I. Historique.....	33
II. Définition des antibiotiques.....	34
III. Les effets des antibiotiques sur les bactéries.....	34
IV. Structure de la bactérie	37
V. Mécanisme d'action des antibiotiques antibactériens.....	45
V.1 Action sur la paroi.....	45
V.2 Action sur la membrane cytoplasmique.....	45

V.3 Action au niveau des acides nucléiques.....	46
V.4 Action sur la synthèse protéique.....	46
V.5 antibiotiques actifs au niveau des métabolismes intermédiaires.	48
VI.Classification.....	49
VII.Les grandes familles des antibiotiques.....	50
VIII.Le spectre d'activité d'un antibiotique.....	53

Chapitre IV : L'antibiogramme

I. L'antibiogramme.....	55
II. Principe.....	56
II.1 Méthodes de dilution en tube ou en gélose.....	56
II.2 Méthodes de diffusion sur gélose	56
III. Contrôle de qualité.....	57
III.1 Objectif.....	57
III.2 Procédure de contrôle.....	57

Partie pratique

I. Matériel et méthode.....	62
I.1 Matériel.....	62
I.2 Méthode.....	65
I.2.1 Autopsie.....	65
I.2.2 Bactériologie.....	66
I.2.2.1 Isolement et identification des bactéries.....	66
I.2.2.1.1 Isolement.....	66
I.2.2.1.2 Identification.....	67
I.3 Antibiogramme.....	85
I.3.1 Liste des antibiotiques testés pour Eschérichia coli au laboratoire régional de D.B.K.....	85
I.3.2 Méthode.....	85

Résultats et interprétation 91

Liste des figures

Figures :	pages
Figure N°1 : Filiale ORAC.....	9
Figure N°2 : Colibacillose respiratoire, périhépatite, aérosaculite fibrineuse.....	18
Figure N°3 : Colibacillose respiratoire sur un poulet de huit semaines sous forme de péricardite.....	18
Figure N°4 : Colisepticémie : carcasse rouge, foie dégénéré à aspect luisant, donné par le léger liquide.....	19
Figure N°5 : Colisepticémie : ampoule cloacale et bourse de Fabricius distendues, ascite + néphrite.....	20
Figure N°6 : Salpingite colibacillaire de la poule, l'utérus contient un boudin caséeux.....	21
Figure N°7 : maladie de Hjarre ou coligranulomatose : lésions granulomateuses du mésentère et de l'intestin de la poule.....	22
Figure N°8 : granulomes de la maladie de Hjarre.....	22
Figure N°9 : Abdomen distendu par une omphalite sur un poussin.....	23
Figure N°10 : Facteurs de risque des colibacilloses aviaires.....	24
Figure N°11 : Observation microscopique de Eschérichia coli.....	27
Figure N°12 : La structure de la paroi.....	38
Figure N°13 : La structure de la membrane cytoplasmique.....	39
Figure N°14 : La structure du cytoplasme.....	40
Figure N°15 : Le matériel nucléaire.....	41
Figure N°16 : La capsule.....	42
Figure N°17 : Les dispositions des flagelles.....	43
Figure N°18 : La spore.....	44
Figure N°19 : Mécanisme d'action des antibiotiques.....	49
Figure N°20 : Coloration de Gram.....	69
Figure N°21 : méthodologie générale de diagnostic, bactériologique pour les Escherichia coli.....	83
Figure N°22 : Détermination de la sensibilité et la résistance d'Escherichia coli « Antibiogramme ».....	84

Figure N°23 : Ensemencement.....	87
Figure N°24 : principe de mesure.....	88
Figure N°25 : Histogramme représentant le pourcentage de sensibilité et de résistance de Eschérichia coli aux ATB chez la reproductrice ponte.....	98

Liste des tableaux

Tableaux :	pages
Tableau N°1 : Capacité de production de l'entreprise	8
Tableau N°2 : Caractères biochimiques.....	29
Tableau N°3 : Caractères antigéniques.....	31
Tableau N°4 : Classification des antibiotiques.....	52
Tableau N°5 : les prélèvements effectués.....	63
Tableau N°6 : Famille des antibiotiques testés à DBK.....	64
Tableau N°7 : Interprétation des résultats du milieu « TSI ».....	74
Tableau N°8 : Listes des antibiotiques testés pour Eschérichia coli au laboratoire de DBK.....	85
Tableau N°9 : valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour les entérobactéries (espèce aviaire).....	89
Tableau N°10 : valeurs limites des diamètres des zones d'inhibition pour les souches de référence utilisées pour le contrôle de qualité.....	90
Tableau N°11 : Résultats des différents tests biochimiques.....	91
Tableau N°12 : Résultats du test de contrôle de qualité.....	93
Tableau N°13 : Résultats des diamètres des zones d'inhibition (en mm)	96
Tableau N°14 : Résistance de Eschérichia coli aux ATB.....	97
Tableau N°15 : pourcentage de résistance et de sensibilité de Eschérichia coli isolées chez la reproductrice ponte.....	98

Liste des abréviations :

ADN : Acide Désoxy Ribo Nucléique
AgO : Antigène somatique.
Agk : Antigène capsulaire
AgH : Antigène flagellaire
ATB : Antibiotique.
ATP : Adénine Triple Phosphate.
BCP : Bromocrésol pourpre.
BHIB : Broth heart infusion (bouillon cœur cerveau)
CP : Centre de production.
DBK : Draa ben kheda.
DCI : Dénomination Commune Internationale.
DO : Densité optique.
EPE : Entreprise publique économique.
g : gramme.
ISA :Istitut de sélection animale
l : litre.
LVR : Laboratoire vétérinaire régionale .
MH : Mueller Hinton.
MITAVIC : Mitidja Avicole.
ml : millilitre.
Mm : Millimètre.
m-RNA :Messenger Acide Ribo Nucléique
OAC: Oeuf à couver.
OMS : Organisation mondiale de la santé.
ORAC : Office Régional de l'Aviculture du Centre.
SPA : Société par actions.

Résumé

Depuis de nombreuses années, la modernisation de l'élevage des poulets et des pondeuses a été centrée sur la rapidité de la croissance, liée à un faible indice de conversion alimentaire.

Sujet cent fois évoqué, et pourtant toujours d'actualité, l'histoire de la résistance aux antibiotiques est en fait celle d'une compétition entre la recherche pharmaceutique et les bactéries, qui a commencé dès le début de la Microbiologie.

L'espèce *Eschérichia coli* est responsable de pertes économiques importantes chez l'espèce aviaire, elle est parmi les bactérie à tester dans un programme de suivi national d'antibiorésistance car elle est résistante à la plus part des antibiotiques.

Notre étude a démontré les résultats suivants :

La tétracycline et l'ampicilline ont donné une mauvaise activité vis-à-vis *Eschérichia coli* avec un taux de résistance de 88,24% et la fluméquine avec un taux de résistance de 82,35%.

Pour la colistine, toutes les souches isolées ont manifesté une sensibilité de 100%, par contre pour la triméthoprine -sulfaméthoxasole et la néomycine elles ont manifesté une sensibilité de 94.12%.

Enfin, l'enrofloxaciné a manifesté la résistance intermédiaire la plus significative.

Mots clefs :

Eschérichia coli , antibiotiques , Résistance , antibiorésistance .

ملخص

منذ عدة أعوام، تربية الدواجن أصبحت مركزة على سرعة النمو ارتباطا بكمية قليلة من الغذاء.

المقاومة ضد المضادات الحيوية، رغم أن هذا الموضوع نوقش لعدة مرات، إلا أنه يبقى محل بحث، و تبقى هذه المقاومة منافسة بين البحث الصيدلي و البكتيريا التي بدأت مع ظهور علم الأحياء الدقيقة.

البكتيريا E.COLI هي مسؤولة عن خسائر اقتصادية معتبرة عند الدواجن، و تعتبر من ضمن البكتيريا التي يجب اختبارها ضمن جدول عمل وطني لمراقبة المقاومة ضد المضادات الحيوية.

دراستنا بينت النتائج التالية:

E.COLI أظهرت مقاومة ضعيفة نحو تيتراسيكلين و الأمبيسيلين بنسبة 88,24 % و الفلوميكين بنسبة 82,35 % .

بنكوليستين، كل البكتيريا المعزولة أظهرت حساسية 100 % أما تريميتوبريم، سولفاميتوقزazol و النييوميسين بنسبة 94,12 %
أخيرا، الأونروفلوكساسين أظهرت المقاومة المتوسطة الأكثر بروزا.

Depuis de nombreuses années, la modernisation de l'élevage des poulets et des pondeuses a été centrée sur la rapidité de la croissance, liée à un faible indice de conversion alimentaire.

L'importation de la souche ISA BROWN a été accompagnée par un guide d'élevage, qui a pour but d'aider l'importateur à mettre en valeur les potentialités des parentales ISA BROWN.

Sur le terrain, la provenance diverse des animaux, (étrangère et locale) rend cette aviculture très vulnérable en l'absence d'une prise en charge effective des problèmes sanitaires à tous les niveaux de la production.

Les recommandations d'élevage et d'alimentation, qui ont été faites sont basées sur leurs dernières recherches et leurs expériences sur le terrain. Nous avons la certitude que les parentales ISABROWN, correctement élevées et nourries donneront d'excellents résultats aussi bien en période d'élevage qu'en période de ponte.

Le programme d'élevage de la souche ISA BROWN offre un équilibre excellent entre la production d'œufs à couver, l'éclosabilité, la viabilité, le gain de poids, l'efficacité de l'alimentation et la conformation. Les parentales ISABROWN reproductrices pontes ont en elles-mêmes toutes ces possibilités génétiques potentielles, qui n'attendent qu'à être utilisées par EPE/MITAVIC/SPA.

Aussi, nous nous sommes rendus compte que des bactéries, (*Escherichia coli*) notamment multirésistantes aux quinolones, étaient isolées chez l'espèce aviaire dans plusieurs unités avicoles à travers le territoire national.

Dans la surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques, il faut également tenir compte des antibiotiques prescrits à titre curatif, préventif et utilisés comme facteurs de croissance.

Nous avons décidé de contribuer à l'état sanitaire du Cheptel ISABROWN importé de France, en enquêtant sur la résistance des souches d'*Escherichia*

coli isolées à partir des reproductrices ponte vis-à-vis de quelques antibiotiques sur plusieurs niveaux de production.

Le choix de l'espèce *Escherichia coli* est motivé par le fait que plusieurs souches sont pathogènes pour les animaux et les humains et responsables de pertes économiques importantes chez l'espèce aviaire et de par ses dérivés entrant dans la chaîne alimentaire.

Escherichia coli, est également recommandé par l'organisation mondiale de la santé « OMS », parmi les bactéries à tester dans un programme de suivi national d'antibiorésistance.

La standardisation de l'antibiogramme selon les normes NCCLS, (National Committee for Clinical Laboratory Standards) recommandées par l'OMS, a touché les laboratoires de médecine vétérinaire en 1999.

Les résultats d'antibiorésistances sont édités chaque année par l'institut Pasteur d'Algérie, ces résultats seront d'un apport certain pour l'orientation de la politique nationale en matière d'antibiothérapie.

L'époque où les antibiotiques ont été considérés comme des « drogues miracles », destinées à éliminer de manière définitive les maladies infectieuses, semble encore très proche.

Malgré tout, l'espoir qu'a fait naître l'antibiothérapie a été de courte durée, puisque des phénomènes d'antibiorésistance ont été vite observés et malheureusement se sont développés pour la plupart des antibiotiques connus. Ainsi, s'affirmait le pouvoir extraordinaire d'adaptation des bactéries.

Le problème de la résistance des bactéries vis-à-vis des antibiotiques peut être abordé sous différents aspects, qui ont chacun leur intérêt.

L'aspect biochimique, consistant à savoir par quels moyens une bactérie peut s'opposer à sa destruction par un antibiotique, a trouvé ses ouvertures, (principalement au niveau appliqué) dans la recherche de l'industrie pharmaceutique, puisque c'est à partir de la connaissance de certains mécanismes biochimiques de résistance que l'on a pu construire des molécules capables de passer outre, ce qui est le cas des pénicillines résistantes à l'hydrolyse par les pénicillinases, ou des nouveaux aminosides résistants à l'inactivation par divers enzymes.

L'aspect génétique, consiste à essayer de savoir comment une bactérie, au niveau de son matériel génétique, acquiert l'information qui va lui permettre de produire les protéines qui assurent ses mécanismes de résistance.

« Une bactérie résiste à un antibiotique lorsqu'une modification de son capital génétique lui permet de croître en présence d'une C.M.I significativement plus élevée de cet antibiotique ». [1]

Il y a un troisième aspect, très différent, qui est le problème vu sous l'angle purement médical. Les conséquences médicales de la résistance sont évidentes : elle empêche plus au moins la réussite d'un traitement

antibiotique. Donc la résistance des bactéries *in vivo* pose un ensemble de problèmes qui intéressent le médecin.

Enfin, le dernier aspect est devenu l'aspect de la santé publique et, pourrait-on dire, l'aspect socio écologique et aussi épidémiologique de la résistance aux antibiotiques.

Sujet cent fois évoqué, et pourtant toujours d'actualité, l'histoire de la résistance aux antibiotiques est en fait celle d'une compétition entre la recherche pharmaceutique et les bactéries, qui a commencé dès le début de la Microbiologie. Il est donc utile de connaître les règles du jeu pour rester maître de la partie.

partie théorique

Chapitre I

I. Situation géographique : [5]

Le complexe avicole soumaà est situé à une dizaine de kilomètres du chef-lieu de la Wilaya de Blida et au sud-ouest de la commune de soumaà, à 1,5 kilomètre de la ville, proche de la route nationale reliant Blida à Alger, dont la distance séparant les deux Wilaya est de 50 kilomètres.

II. Activité principale de l'entreprise : [5]

L'entreprise est à vocation avicole, elle est spécialisée dans les activités suivantes :

a. production :

- élevage de la reproductrice chair et ponte,
- production d'œufs à couver ponte et chair,
- production du poussin d'un jour ponte et chair.

b. Commercialisation :

La commercialisation porte sur les produits suivants :

- œufs à couver ponte et chair,
- poussins d'un jour ponte et chair.

III. description des structures de production : [5]

• bâtiments d'élevage et équipements :

MITAVIC est constituée :

1. d'un complexe avicole composé de :

♦ trois centres de production d'œufs à couver OAC (CP1, CP2, CP3) doté de bâtiments obscurs d'une capacité globale de 11.000.000 œufs par an .La structure générale de MITAVIC est représentée par la figure N°1

♦ d'un couvoir à soumaà.

2. d'une unité couvoir située à Dar el Baida spécialisée en poussins ponte.

Les trois centres de production d'OAC sont dotés chacun de 06 bâtiments obscurs à ambiance contrôlée d'une capacité de 6500 à 7500 sujets / bâtiment assurant eux –mêmes le déroulement des deux phases (d'élevage et production), et ceci dès l'arrivée du poussin d'un jour jusqu'à la réforme du cheptel après 64 semaines d'âge (chair) et 72 semaines (ponte).

Chaque bâtiment est subdivisé en 05 boxes équipés de :

- assiettes plastiques pour premier âge (100 assiettes / bâtiment),
- abreuvoirs pour poussins en matières plastiques translucides d'une capacité de 03 litres (100 abreuvoirs / bâtiment),
- éleveuses infrarouges à gaz soit 500 poussins par éleveuse (02 éleveuses / poussinière),
- la température ambiante est agréable par thermostat,
- le système de ventilation dynamique par dépression,
- Salle d'expédition, pour la période de démarrage jusqu'à 06 à 08 semaines d'âge.

Cet équipement est nécessaire et indispensable

Pour la période de croissance, le bâtiment contient :

- 05 lignes automatiques d'alimentation tubulaire à assiettes (type chaîne chortime), soit 450 assiettes / bâtiment,
- 04 lignes d'abreuvoirs automatiques ronds ; soit 100 abreuvoirs / bâtiment,
- système de ventilation dynamique par dépression.

Tandis que pour la phase de production, le bâtiment contient des pondoirs dotés de nids à raison de 960 nids / bâtiment, soit 96 pondoirs de nids / bâtiment.

Ramassage d'œufs automatique, 1 nid pour 05 poules.

Le sol est en béton, légèrement incliné (1 %) vers une rigole afin de faciliter le nettoyage et la désinfection en fin de bande.

Un rotoluve avec un système d'arrosage (désinfection des véhicules) à l'entrée de chaque centre de production et un pédiluve à l'entrée de chaque bâtiment.

Chaque bâtiment est équipé d'un silo d'alimentation d'une capacité de 16 tonnes, d'un système de ventilation dynamique par dépression avec humidification et recyclage d'air, grâce à l'existence de deux ventilateurs sous forme de gaine trouée (phanjet) le long du bâtiment, il existe également, un groupe d'extracteurs (06) dont la capacité unitaire est de 4000m³/h permettant l'évacuation de l'air vicié .

Sur chaque face latérale des bâtiments, un système « PAD-COLING » y occupe le centre et sert à rafraîchir l'atmosphère à l'intérieur en refroidissant l'air chaud qui provient de l'extérieur par des panneaux de cellulose mouillée, il faut noter que ce système ne fonctionne qu'en été ou en cas de chaleur extrême.

La durée de lumière est contrôlée par une horloge (suivant le programme lumineux appliqué). Le réglage de l'intensité lumineuse est assuré par un rhéostat et l'apport de chaleur est assuré par des radiants à gaz de propane (en phase de démarrage).

L'alimentation dans la phase de démarrage se distribue dans des plateaux sur la litière, chaque bâtiment est équipé de 05 chaînes d'alimentation comprenant 450 assiettes, et 04 chaînes d'abreuvement tout au long du bâtiment, soit 100 abreuvoirs/bâtiment.

Description de couvoir :

Le couvoir a une capacité annuelle de 8.000.000 poussins, et un potentiel de production pouvant s'élever jusqu'à 11.000.000 d'OAC/ soit 22% de la capacité du GAC qui est de 50.000.000 d'OAC/an.

Equipé de douze incubateurs d'une capacité de 54.000 OAC/incubateur et six éclosiers de 16800 OAC/éclosier qui se trouvent en bon état. Ce couvoir est composé aussi de plusieurs ateliers qui sont disposés l'un à côté de l'autre en suivant un sens unique de façon à éviter toute contamination.

Ces salles se présentent comme suit :

- salle de réception des OAC et mise en plateaux,
- salle de stockage,
- salle de préchauffage,
- salle d'incubation,
- salle de transfert,
- salle d'éclosion,
- salle de tri de poussin,
- salle d'expédition.

Tableau N° 1 : Capacité de production de l'entreprise

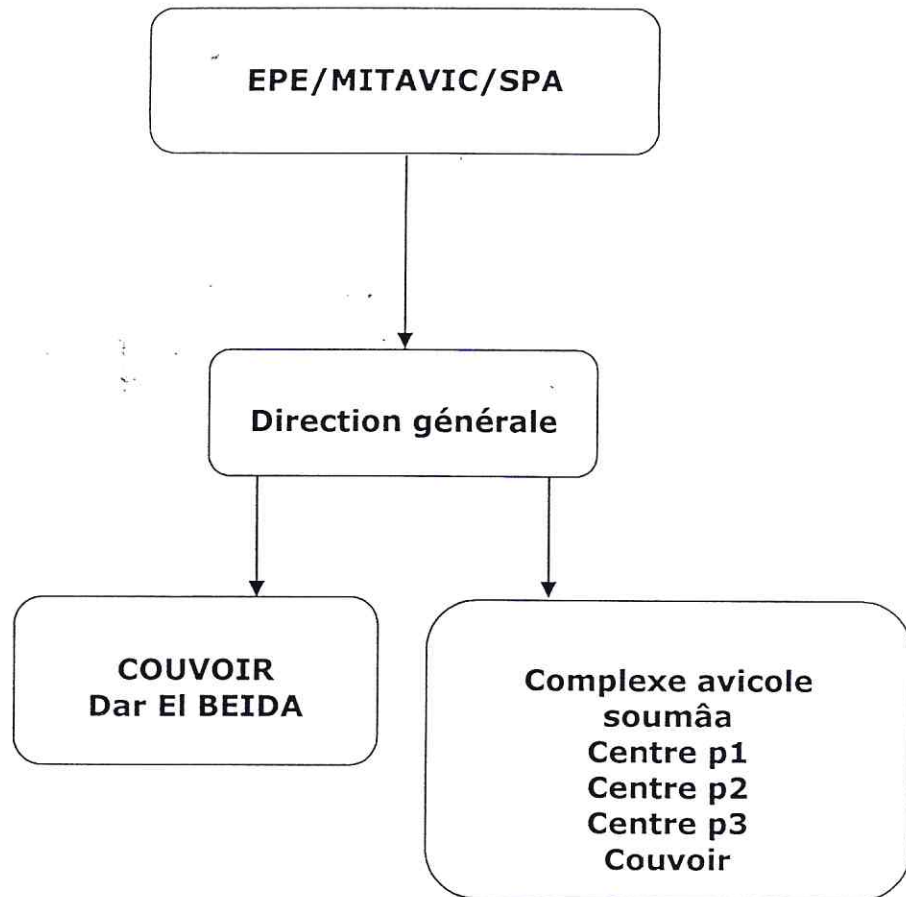
Facteur de production	Quantité annuelle	Structure assurant la production
Œufs à couvrir ponte	9871625	Cp1 centre Soumâa
Poussin ponte d'un jour	2672800	Couvoir Dar El Beida
Poussin chair d'un jour	6376810 de sujets	Couvoir Soumaa+Dar El Beida
Œufs à couvrir chair	5666140 d'unités	Centre Soumaa

Nos prélèvements ont été effectués au complexe avicole _ Soumâa et particulièrement au centre P3.

Le centre préalablement préparé selon les normes techniques de vide sanitaire et un repos biologique.

La mise en place de poussin reproductrice ponte d'un jour de souche ISA BROWN importée de France à été réalisé le 4 /11/2005 avec un effectif départ de 43274 femelles et 4876 mâles . Cet effectif est réparti dans les 6 bâtiments d'une capacité chaque de 6500 femelles et 584 mâles durant toute la phase d'élevage. Du premier jour à la 19^{ème} semaine, le cheptel reproductrice ponte a reçu un plan de prophylaxie contre les maladies bactériennes, virales, celui a été respecté minutieusement par le personnel de l'unité.

Figure N°1 : filiale ORAC



Chapitre II

I. Historique :

Théobald Escherich (pédiatre allemand), le 15 Août 1885 publie le texte d'une conférence dans lequel, il décrit le colibacille bacterium Coli qui deviendra Escherichia coli. Escherich constate que ce germe, qui fait partie de la flore intestinale tue le lapin et le cobaye lorsqu'il est injecté à forte dose. [6]

Escherichia coli, est l'espèce bactérienne qui a été la plus étudiée par les fondamentalistes pour des travaux de physiologie et de génétique. [1]

En 1889, Laruelle venait en premier à suggérer la possibilité de pathogénicité d'Escherichia coli, d'où l'attention a été fixée envers ses potentialités pathogéniques et les méthodes qui permettent de les différencier des autres coliformes.

Un grand nombre d'investigateurs, [Ligniers (1894), Martel (1897), Claussen (1907), Leiss (1914), Palmer, Baker (1923), Davis (1938) et Twisselmann (1939)] ont fait un rapport sur l'isolement des coliformes à partir de l'infection septicémique des oiseaux.

- Quelques uns ont suggéré qu'Escherichia coli peut causer une septicémie, si la résistance de l'oiseau est devenue faible à cause de la soif, la faim et des températures extrêmes [Claussen (1907), Davis (1938)].

En revanche en 1940, Bueno a trouvé que les coliformes se trouvent en général dans la partie inférieure du tractus digestif des poules. Par la suite, en 1946, Osborne et All ont fait subir à vingt quatre poussins jeunes, des inoculations de diverses souches d'Escherichia coli par voie intra péritonéale. Au bout de vingt quatre heures, tous les poussins sont tombés malades et deux seulement ont survécu. [4]

Cordon, en 1959 décrit une maladie respiratoire compliquée d'aerosacculite due au seul Escherichia coli.

Suite aux travaux de Gross (1956), Renault, Lafont et Schricke ont pu montrer en (1960-1961), que l'injection intra péritonéale à des poussins de

10^5 à 10^6 colibacilles entraînaient la mort de 50% des sujets avec des lésions fibrineuses identiques aux infections respiratoires compliquées d'aérosacculites.

En 1961, Reid montre que par trempage des œufs dans une culture d'une souche pathogène pour le poussin d'un jour, il obtient une baisse d'éclosabilité et augmentation du taux de mortalité.

Le rôle pathogène de certaines souches d'Escherichia coli chez les volailles, semble inconstatable, même s'il intervient avec d'autres facteurs favorisants.

En 1965, Hemsley et Harry, pour la forme septicémique, ont constaté qu'il n'y avait pas de contamination entre poussins issus de parents différents, élevés dans des poulaillers voisins, ceci a confirmé que la colibacillose du poussin correspond essentiellement à une maladie contractée dans l'éclosoir.

Bessarabov et All, en 1972, pour la forme respiratoire observée chez les poussins comme chez les poulets, ont constaté qu'elle est en rapport avec une infection des sacs aériens et que la contamination ne s'effectue pas par voie cloacale mais par voie aérienne.

En 1973, les travaux de William Smith en Angleterre, ont montré que 87% d'Escherichia coli pathogènes isolées de lésions aviaires présentent une résistance aux antibiotiques, et que 60% résistaient à plus d'un antibiotique.

En France, par contre, les travaux de Renault en 1974, montrent que plus de 50% des souches sont résistantes à de nombreux antibiotiques. [20]

En Algérie, A- Benlmouffok et A-Cherif (1979-1989), ont constaté que les souches d'Escherichia coli isolées à partir des lésions aviaires, présentent un fort pourcentage de résistance aux divers antibiotiques. [32]

II. Habitat :

Escherichia coli, hôte normal de l'intestin de l'homme et des animaux souvent retrouvé en petit nombre dans les urines saines, est une bactérie largement répandue dans le milieu extérieur ; elle ne semble cependant pas

pouvoir y mener une vie saprophyte authentique : sa présence en quantité importante témoigne d'une contamination fécale récente.

Les mammifères et la volaille sont colonisés par *Escherichia coli* dans les premiers jours après la naissance ou l'éclosion de l'œuf au contact du milieu extérieur. [30]

III. Pouvoir pathogène et pathogénie :

Afin qu' *Escherichia coli* soit pathogène, les bactéries doivent exprimer des facteurs leur permettant d'adhérer à la surface de la muqueuse (adhésine) afin d'éviter le lavage dû à la motricité intestinale. [35]

Le pouvoir pathogène des colibacilles est lié à la capacité d'adhérence par des pilis codés par un plasmide.

Escherichia coli est capable de capter le fer par la synthèse de sidérophores eux-mêmes codés par un plasmide. Il existe d'autres systèmes de captation de fer par des chromosomes.

La possibilité de conjugaison bactérienne ou de transfert des plasmides rend virtuellement pathogène tout colibacille du tube digestif des oiseaux.

Le système d'aérobactine permet la captation du fer essentiel à leur multiplication, on le retrouve chez les bactéries pathogènes responsables de septicémies aviaires. [38]

Ce système d'aérobactine est composé d'une molécule simple : aérobactine et d'un récepteur spécifique à cette molécule : la protéine lut A. Lors d'une carence en fer libre dans les liquides organiques, l'aérobactine est synthétisée par la bactérie puis excrétée dans le substrat. Elle forme un complexe réversible avec le fer sérique de l'organisme, puis revient à se fixer sur son récepteur et pénètre dans la bactérie où elle libère le fer. [9]

♦ Le système aérobactine : [11]

1. captation du fer par l'aérobactine.
2. fixation du fer sur le récepteur spécifique.
3. pénétration dans la bactérie du fer fixé sur l'aérobactine.

4. fer libéré dans la bactérie.
5. détection diagnostique spécifique du récepteur par anticorps monoclonal.

On peut conclure qu'Escherichia coli possède des facteurs de pathogénicité :

1. une capsule qui s'oppose à la phagocytose,
2. des protéines de la membrane externe et LPS donnant aux bactéries la capacité d'échapper à l'activité bactéricide du sérum de l'hôte en s'opposant à la fixation du complément,
3. des systèmes de capacité du fer : les sidérophores,
4. des adhésines conférant aux souches qui les possèdent, la propriété de se fixer aux cellules épithéliales. L'adhérence constitue une étape essentielle de la pathogénie des infections aux bactéries entériques.

III.1 Pouvoir pathogène et pathogénie Chez l'homme :

L'existence de diarrhées à Escherichia coli est connue depuis 1940. On reconnaît aujourd'hui au moins quatre types de forme intestinale. [1]

↳ Forme intestinale :

-Escherichia coli entéropathogènes (ECEP) :

Ces souches étaient responsables dans les années cinquante, de diarrhées infantiles, graves. Non traitées, leur pronostic chez l'enfant est très grave, souvent mortel chez le nourrisson. Ces souches, encore appelées Escherichia coli (des gastroentérites infantiles), sont plus rarement rencontrées aujourd'hui [1, 30]. Elles sont capables :

1. d'adhérer aux entérocytes de l'intestin grêle (cette adhésion des EPEC est précoce), les bactéries se fixent alors à la surface des entérocytes, s'agrègent et forment des micros colonies « clusters ».
2. de produire des lésions histopathologiques au niveau des entérocytes : il y a destruction des microvillosités de la bordure en brosse des entérocytes, et modification de leur membrane, ce phénomène est appelé « attachement effacement ». [18]

-Escherichia Coli entérotoxigènes (ECET) :

Responsables de diarrhées très liquides, dans les pays en voie de développement et chez les voyageurs « Turista ». [1]

Ces souches sont capables :

3. de coloniser la bordure entérocytaire de l'intestin grêle : les facteurs d'adhésion sont les pilis rigides spécifiques d'espèce,

4. de sécréter des toxines qui sont spécifiquement actives sur les entérocytes et ont un effet cytonique, leur action se traduit par l'augmentation de l'AMPc (seconds messagers intracellulaires). [18]

Il existe deux types de toxines, entérotoxine thermolabile et entérotoxine thermostable (ST). Ces toxines entraînent :

- ◆ activation de l'Adényl cyclase,
- ◆ augmentation de l'AMPc,
- ◆ activation de kinase AMPc dépendante,
- ◆ la phosphorylation des protéines membranaires,
- ◆ l'hypersécrétion intestinale d'eau et de chlorure.

-Escherichia coli entéroinvasifs (ECEI) :

Elles sont isolées de syndromes dysentériques tant chez l'adulte que chez l'enfant. La présence de leucocytes dans les selles témoigne du processus invasif. [1]

Les ECEI sont capables de pénétrer dans les cellules épithéliales du côlon, de s'y multiplier et de provoquer des diarrhées aiguës et de la fièvre. La virulence de ECEI est liée à la présence d'un plasmide très proche de celui connu chez Shigella. [18]

-Escherichia Coli entérohémorragiques (ECEH) ou producteurs de vérotoxines (VTEC) :

Ces souches ont été décrites en Amérique du Nord, au Japon et en Europe. Elles sont responsables d'épidémies de diarrhée aqueuse puis hémorragique. Elles sont aussi responsables du syndrome hémolytique

urémique (SHU, anémie hémolytique micro angiopathique. Un produit alimentaire contaminé peut être à l'origine de la diffusion de l'épidémie. [1]

Ces souches adhèrent aux cellules épithéliales de la muqueuse, au niveau de l'iléon, du caecum et du côlon droit et sécrètent des exotoxines, qui sont au nombre de deux différents immunologiquement et par leur séquence en acides aminés, il s'agit des toxines SLT_I et SLT_{II} « SHIGA-LIKE » (elles sont aussi appelées vérotoxines), elles agissent par inhibition de la synthèse protéique, elles sont aussi immunologiquement différentes.

Deux autres facteurs de virulence ont été récemment décrits :

- ◆ Hémolysines : son rôle dans l'infection chez l'homme est discuté,
- ◆ La sérine protéase extra cellulaire : inactive le facteur V de coagulation, elle pourrait contribuer au syndrome hémorragique chez les patients. [18]

-Escherichia Coli entéroagréatifs (ECEAg) :

Ils peuvent être responsables de diarrhée persistante. [1]

ECEAg est responsable d'infections para intestinales : appendice, cholécystite et péritonites. Les facteurs de pathogénicité sont encore mal connus.

Un facteur d'adhésion d'information plasmidique et de structure protéique organisée sous la forme d'un pili confère un phénotype d'adhésion particulier. [18]

-Escherichia Coli à adhésion diffuse (ECAD) :

Ils sont responsables de septicémie méningites et infections ostéoarticulaires. Ces Escherichia coli ont été individualisés en raison de leur phénotype d'adhésion particulier, les bactéries qui adhèrent aux cellules ne forment pas d'amas particuliers. [18]

-Escherichia coli uropathogènes :

Responsables de cystite et pyélonéphrite, les souches « uropathogènes » adhèrent, d'une manière constante, aux cellules

épithéliales grâce à des facteurs d'adhésion (adhésines), mais elles produisent aussi des hémolysines et sidérophores. [18]

III.2 Pouvoir pathogène et pathogénie chez les animaux :

Escherichia coli intervient fréquemment chez diverses espèces.

▸ **Les bovins :**

Colibacillose septicémique du veau, mammite colibacillaire, avortement, pyélonéphrite, entérites néonatales, dues à des souches entéropathogènes. [30]

▸ **Le cheval :**

Septicémie du jeune, avortement. [30]

▸ **Le chien :**

Affections pyogènes, métrites, pyomètres, infection urinaire. [30]

▸ **Le porc :**

Entérite colibacillaire du porcelet nouveau né, maladies de l'œdème, la toxine produite est proche de celle des ECEI. [30,18]

▸ **La volaille (Etude clinique et nécropsique) :**

• **Facteurs de risque des colibacilloses aviaires :**

Le colibacille présent dans le tube digestif de la volaille, n'exprimera son pouvoir pathogène qu'à la faveur de facteurs de déclenchement ou de risque.

Les causes majeures qui sont à l'origine de ces pathologies colibacillaires sont très diverses (figure N°10) et représentées par : les virus, les mycoplasmes et le stress. [6]

• **Virus :**

Soit lors d'infections naturelles (maladie de Gumboro, bronchite infectieuse, maladie de New Castle), soit lors de vaccinations avec des vaccins vivants. [6,14]

- **Mycoplasmes :**

Souvent présents dans l'appareil respiratoire, préparent ainsi les tissus aux surinfections colibacillaires. [6]

- **Stress :** Dû au :

- a. sur densité,
- b. changement d'aliment non progressif,
- c. manipulation des oiseaux (débecquage, injection),
- d. forte variation de température et d'humidité,
- e. entrée en ponte.

Le praticien sérieux ne doit donc se contenter d'un diagnostic de colibacillose, mais doit rechercher les causes premières de son apparition pour mettre en place une prophylaxie rationnelle et efficace, propre au cas considéré. [6]

- **Les expressions cliniques dominantes des colibacilloses aviaires :**

Contrairement à ce qui se passe chez les mammifères, *Escherichia coli*, chez les volailles n'est qu'assez peu impliquée en pathologie digestive, mais participe à des syndromes variés évoluant sous forme septicémique ou localisée : maladie respiratoire chronique, omphalite, synovite, coli granulomatose, salpingite. [9]

- **La colibacillose respiratoire :** (voir figures N°2, 3)

Elle se présente souvent chez les animaux de six à dix semaines comme une complication d'une infection mycoplasmique ou virale, survenue dans les deux ou trois premières semaines de vie, les conditions d'ambiance jouant un rôle déterminant dans l'apparition de la gravité du processus.

Si le colibacille vient compliquer une affection respiratoire, les premiers signes seront bien sûr ceux de l'affection primitive.

Si la colibacillose est primitive, les manifestations cliniques seront celles d'une maladie respiratoire chronique non spécifique : larmolement, jetage, râles, toux, sinusite, aérosacculite associée souvent à une péri hépatite et une péricardite fibrineuse.

La morbidité dépasse souvent 20% et la mortalité reste inférieure à 5% sauf complications.

Les formes subcliniques provoquent une diminution de la prise alimentaire et les conséquences de la maladie sont surtout d'ordre économique. [38,9]

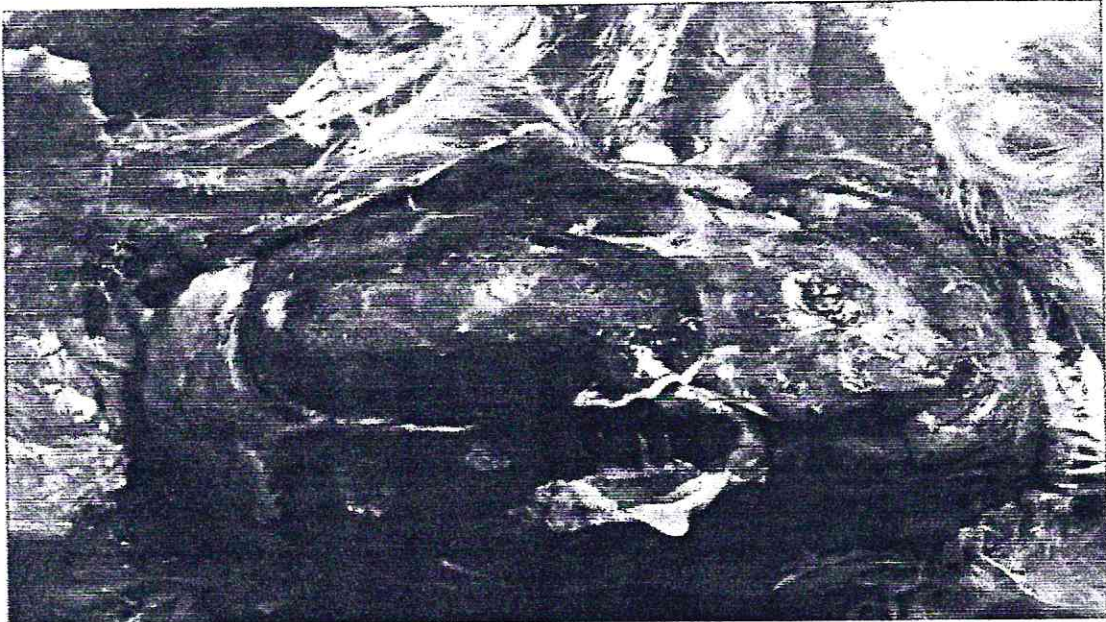


Figure N°2 : Colibacillose respiratoire, périhépatite, aérosacculite fibrineuse

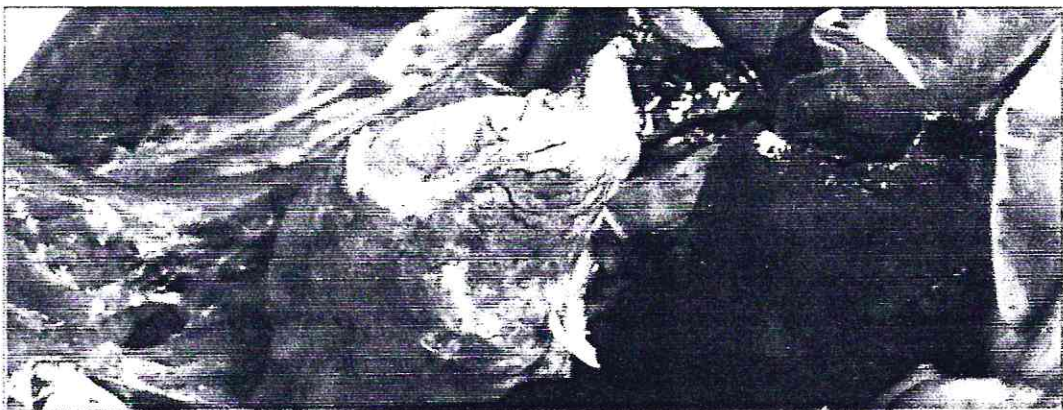


Figure N°3 : Colibacillose respiratoire sur un poulet de huit semaines sous forme de péricardite

La colisèpticémie : (Figures N° 4,5)

C'est la septicémie provoquée par l'invasion colibacillaire des jeunes oiseaux. Elle se traduit par des mortalités brutales après abattement et anorexie des poussins de gallinacés ou palmipèdes.

Il y a souvent complication de colibacillose respiratoire, d'omphalites ou de synovites.

Le diagnostic de certitude sera fait au laboratoire par ensemencement des milieux de culture à partir du sang, du cœur, du foie ou de la rate de plusieurs animaux, si l'on obtient des cultures pures abondantes de colibacilles sur tous les prélèvements. [38]



Figure N°4 : Colisepticémie : carcasse rouge, foie dégénéré à aspect luisant, donné par le léger liquide d'ascite



135

Figure N°5 : colisépticémie : ampoule cloacale et bourse de Fabricius distendues, ascite + néphrite.

- **Les formes génitales :** (Figure N°6)

Observées chez les poulets de quatre à treize semaines ou chez les adultes, elle peut correspondre à une affection ascendante par cloaque et l'oviducte à l'occasion de piquage et de cannibalisme.

En effet, les oiseaux ne possèdent qu'un diaphragme rudimentaire, la contamination de séreuse peut s'effectuer entre les sacs aériens diaphragmatiques et les ovaires. C'est ainsi que les oiseaux guéris de leur maladie respiratoire peuvent rester porteurs d'*Escherichia coli* pathogène dans leur tractus génital. [6]

Elles se traduisent par des chutes de ponte survenant en particulier au deuxième à troisième mois de ponte, des morts subites et des diarrhées blanches.

L'autopsie révèle des lésions souvent spectaculaires d'ovaro-salpingite et de péritonites. Cette forme génitale provoque chez les poussins des mortalités embryonnaires (15% à 20%), des mortalités en coquille (3% à 5%) et des mortinatalités (10% à 20%). [9]

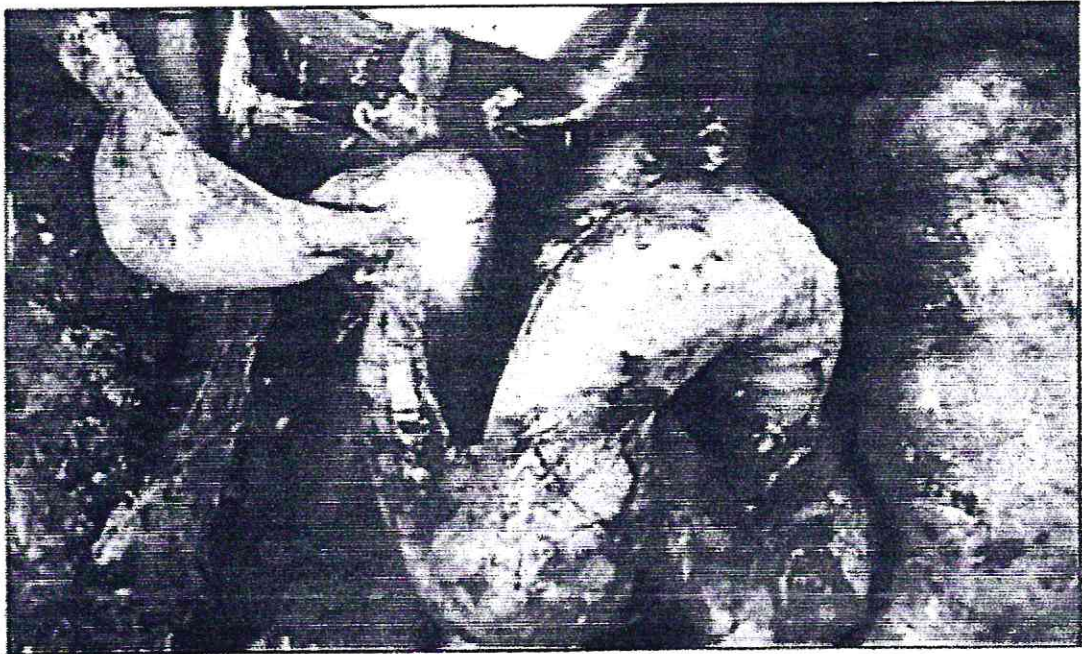


Figure N°6 : Salpingite colibacillaire de la poule, l'utérus contient un boudin caséux

- **Les autres formes cliniques**

- ◆ **Coli granulomateuse (maladie de Hjarre) :** (Figures N°7, 8)

Maladie infectieuse non contagieuse des poules à la fin de la période de ponte, elle est caractérisée par l'apparition de multitude de petites formations nodulaires (granulomes) sur l'intestin grêle, les caeca, le mésentère et le foie sans atteinte de la rate ce qui facilite le diagnostic différentiel avec la tuberculose.

Les granulomes sont provoqués par une réaction de l'organisme autour d'amas d'Escherichia coli du type M (muqueux). [39,9]

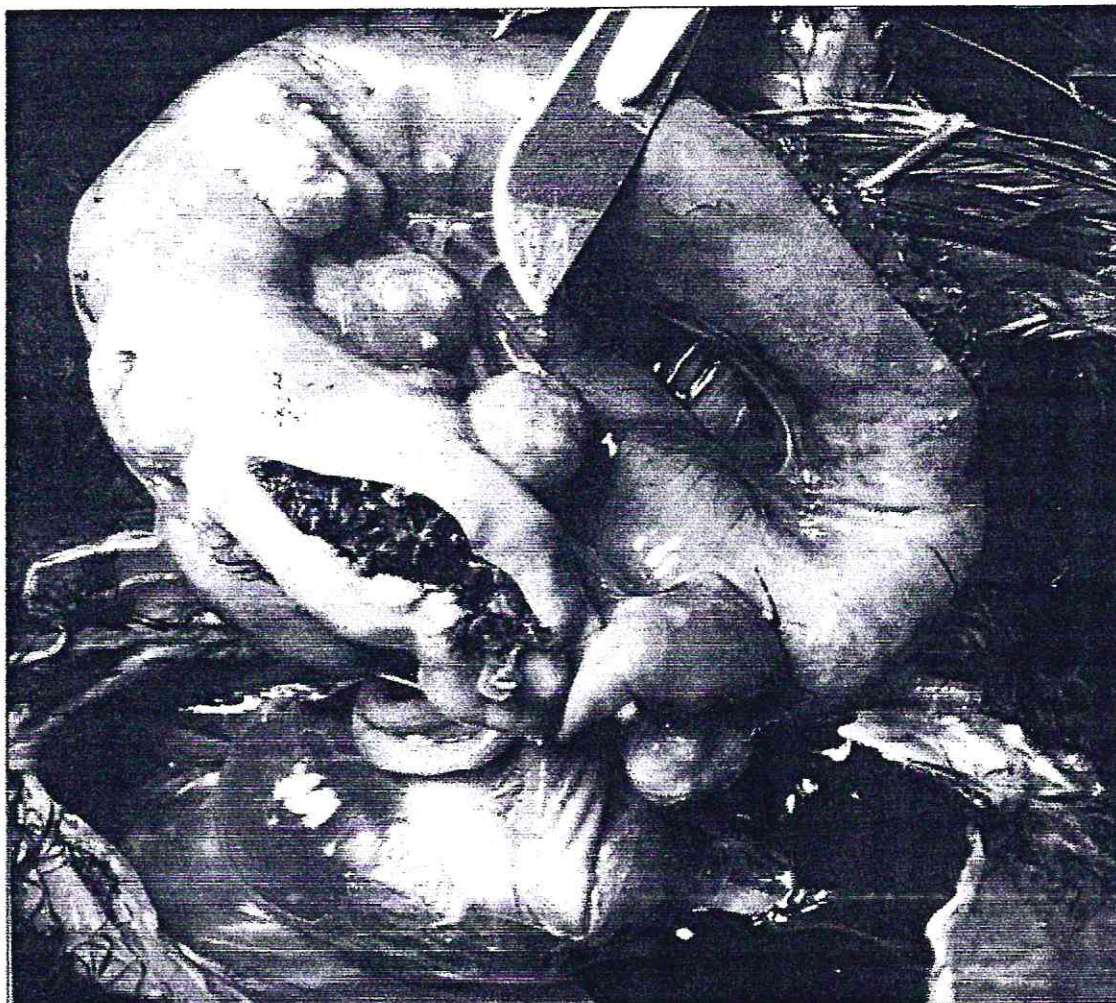


Figure N°7 : maladie de Hjarre ou coligranulomatose : lésions granulomateuses du mésentère et de l'intestin de la poule

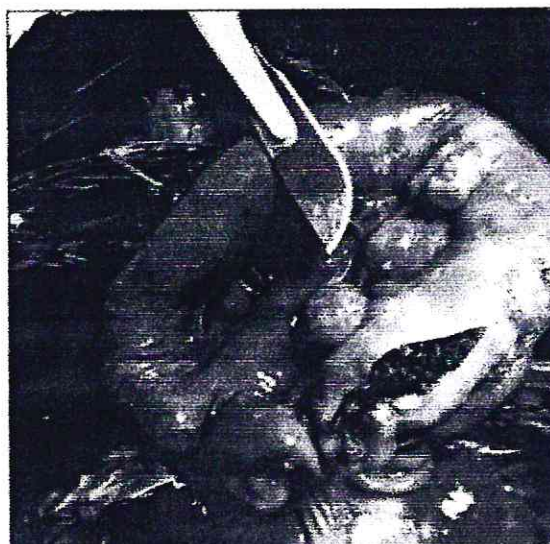


Figure N°8 : granulomes de la maladie de Hjarre

♦ **Les arthrites et les synovites :**

Les colibacilles peuvent sur infecter des maladies primitives :

- Arthrite à réovirus (poulet, canard),
- Synovite à mycoplasma synoviale.

Ou être inoculés par des blessures ou traumatismes. [38]

♦ **Les omphalites colibacillaires :** (Figure N° 9)

Elles correspondent à des fautes d'hygiène en amont de l'éclosion et en éclosoir, permettant la pénétration d'Escherichia coli dans le sac vitellin (jaune de l'œuf) des poussins nouvellement éclos. La mortalité peut être importante. Les lésions correspondent à l'altération du sac vitellin dont le contenu va du jaune brun au vert et de la consistance aqueuse à granuleuse. [38]



Figure N°9 : Abdomen distendu par une omphalite sur un poussin

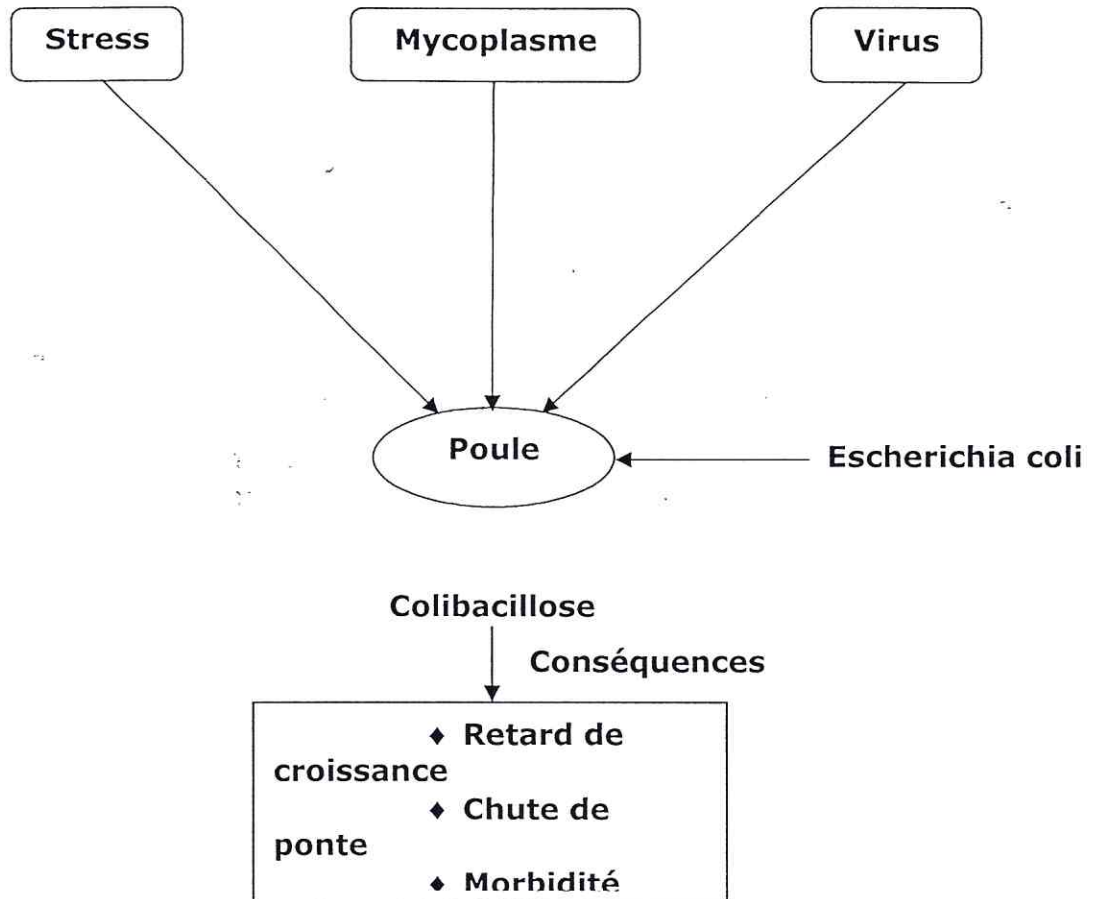


Figure N°10 : Facteurs de risque des colibacilloses aviaires

• **Etude nécropsique :**

-La colibacillose respiratoire :

L'examen nécropsique révélera surtout des lésions d'inflammation plus au moins productives de toute les séreuses viscérales : péricardite, périhépatite.

Lors d'attente de tractus respiratoire, l'aérosacculite va du simple dépolissement à la formation d'omelette fibrineuse des sacs aériens.

Les lésions ont tendance à se stériliser naturellement avec le temps, mais elles persistent souvent jusqu'à l'abattage. [30,21]

-la colisepticémie :

Les lésions de la forme aigue sont non exsudatives :

- le foie : hypertrophié, coloration intense, quelques zones de dégénérescence parfois verdâtres

-la rate : hypertrophiée avec des points de nécrose.

-les reins : néphrite, dépôt d'urates.

-les intestins : ampoule cloacale distendue par des gaz et des matières liquides blanchâtres.

-légère ascite : aspect brillant des viscères par de liquide abdominale inflammatoire. [30]

-Les formes génitales :

On rencontre parfois une ovarite allant jusqu'à la ponte intra - abdominale d'ovules infectés, à aspect cuit en omelette péritonéale nauséabonde sur les femelles en ponte. [30]

-Les omphalites :

Les lésions correspondent à l'altération du sac vitellin dont le contenu va du jaune brun au vert et de la consistance aqueuse à granuleuse. [30]

• **Pathogénie :**

La voie d'entrée principale de l'agent pathogène est le tractus respiratoire via l'inhalation de poussière contaminée par des Escherichia coli excrétés du tractus digestif d'animaux sains. Les intestins sont, en effet, le réservoir le plus important des Escherichia coli pathogènes aviaires. Après une Première multiplication au niveau du tractus respiratoire supérieur, les bactéries colonisent les voies respiratoires profondes, à savoir les sacs aériens

et les poumons. A partir des sacs aériens, la contamination peut s'effectuer de séreuse à séreuse et atteindre ainsi le tractus génital.

Comme dernière étape, les bactéries atteignent le sang et colonisent les organes internes (cœur, foie, rate...). [37]

IV. Etude bactériologique :

Escherichia Coli appartient à la famille des Entérobacteriaceae.

IV .1 Définition de la famille des Entérobacteriaceae :

Ce sont une vaste famille de germes qui, comme leur nom l'indique, sont des microbes commensaux de l'intestin (humain et animal), présents tout particulièrement dans le colon et le rectum, jouant un rôle dans les phénomènes digestifs. Le domaine des entérobactéries ne se limite pas à l'intestin, on les trouve aussi dans la cavité buccale, au niveau des voies aériennes supérieures et sur les organes génitaux. Ils présentent les caractères communs suivants :

- bacilles à gram négatif de dimensions moyennes : 0.5µm sur 3µm,
- immobiles ou mobiles grâce à une ciliature péritriche,
- se développant aisément sur milieux ordinaires,
- aérobies facultatifs et faisant fermenter le glucose avec ou sans gaz,
- ne possédant pas d'oxydase,
- réduisant les nitrates en nitrites (quelques exceptions parmi Erwinia).

Les quatorze principaux genres de la famille des Entérobacteriaceae sont : Escherichia, Shigella, Citrobacter, Salmonella, Klebsiella, Enterobacter, Pantoea, Serratia, Hafnia, Edwardsiella, Yersinia, Proteus, Providencia, Morganella. (30,18)

IV.2 Taxonomie :

Règne : Eubactéria

Division : Gracillicutes (Gram)

Classe : Proteobactéria

Ordre : Enterobactériale

Famille : Enterobactériacea

Genre : Escherichia

Espèce : Escherichia coli
Escherichia fergusonii
Escherichia blattae
Escherichia hermannii
Escherichia vulneris

IV. 3 Caractères morphologiques :

Ce sont des bacilles à Gram négatif, de 0.5 μ m de largeur sur 3 μ m de longueur en moyenne, généralement polymorphes, on rencontre parfois des éléments coccoïdes. Ils sont soit isolés, soit groupés en paire, soit en courtes chaînes. Ils sont mobiles grâce à leur ciliature péritriche selon un trajet sinueux, quelques fois immobiles, cette mobilité est très variable, jamais sporulés, quelques fois capsulés. [30, 2, 36]

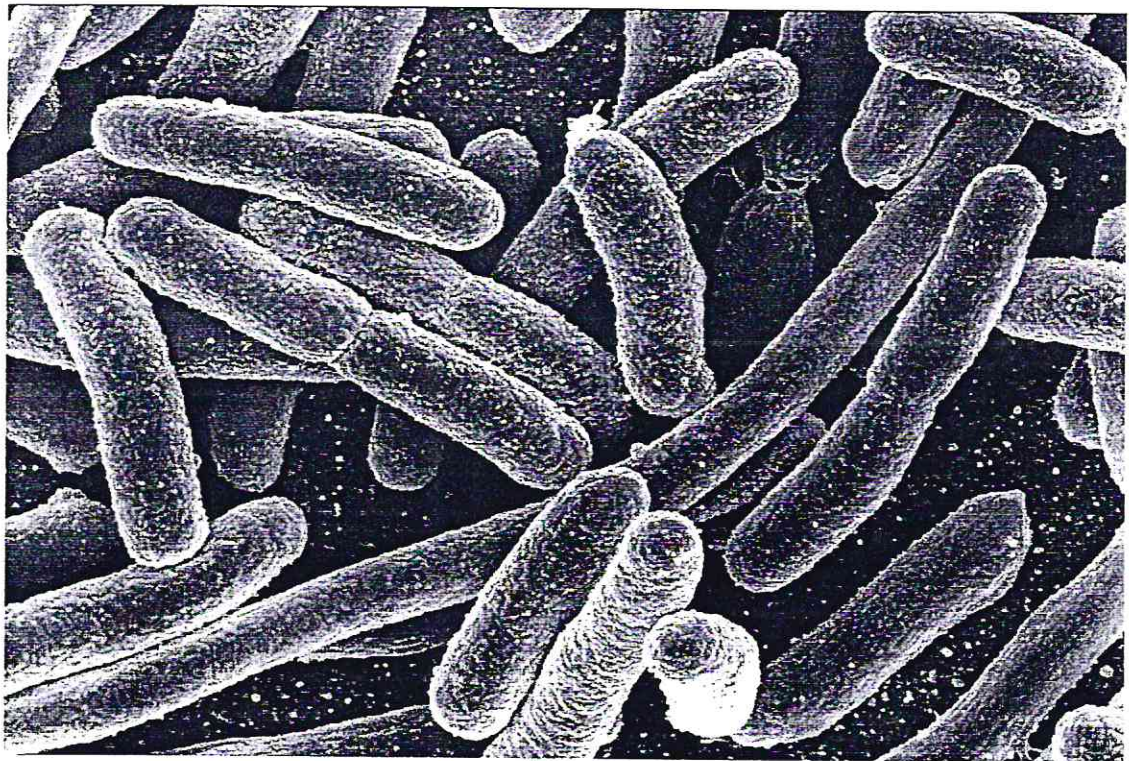


Figure n° 11 : observation microscopique de escherichia Coli

IV 4. Caractères cultureux :

Les exigences nutritionnelles de Eschérichia coli sont en général réduites, une source de carbone simple comme le glucose suffit pour leur multiplication. La température optimale de culture est de 37°C, mais ce germe pousse entre 15°C et 45°C. Eschérichia coli possède une grande tolérance aux variations de pH, bien que le pH optimum de culture est de 7.5. [28,1]

‡ Gélose nutritive :

Eschérichia coli se développe en vingt quatre heures à 37°C, les colonies sont rondes, lisses, à bord régulier, légèrement bombées, translucides et de 1.5mm à 3mm de diamètre. [30, 1]

‡ Gélose Macconkey lactosé, bilié, salé :

Après dix huit heures à vingt quatre heures d'incubation à 37°C, les colonies sont « lactose positives » de couleur rouge brique, entourées d'un halo opaque de sels biliaires précipités, cette coloration est due à l'acidification résultant du métabolisme du lactose et de la fixation du rouge neutre du milieu. [17, 26,1]

‡ Gélose lactosée au bromocrésol pourpre (BCP) :

Après incubation à 37°C, pendant dix huit heures à vingt quatre heures, les colonies sont jaunes soit de forme smooth (lisses), routh (rugueuses), M (muqueuses), laissant passer la lumière lorsqu'on les examine par transparence, la coloration jaune est due à la fermentation du lactose. [17]

‡ Gélose au sang :

Après incubation à 37°C, pendant dix huit heures à vingt quatre heures, on obtient des colonies blanches, plates à contour régulier, certaines souches sont hémolytiques (un halo clair autour des colonies). [17,1]

IV 5. Caractères biochimiques : (Tableau N°2)

Les caractères biochimiques essentiels sont les suivants : [26]

Caractères	Résultats
Glucose	+avec, en général, gaz
Lactose	+ en général
B galactosidase	+ (sauf quelques exceptions)
Mannitol	+
Indole	+
R.M (rouge de méthyle)	+
VP (voges - proskawer)	-
Citrate de simmons	-
H ₂ S	-
Uréase	-
Nitrate réductase	+
Phényle Alanine désaminase	-

IV 6. Caractères antigéniques :

La structure antigénique des colibacilles est complexe, ces bactéries composent des antigènes majeurs O, K, H et des antigènes mineurs R, M...

▶ **Antigènes somatiques AgO :**

Ils sont de nature lipopolysaccharidiques, localisés au niveau de la paroi bactérienne, il est en fait l'endotoxine bactérienne très toxique, libérée au moment de l'autolyse. Cet Ag comprend :

- une fraction protéique qui confère au complexe son antigénicité,
- une fraction lipidique qui rend le complexe toxique,
- une fraction poly osidique responsable de la spécificité.

Au moyen d'immunosérums spécifiques, il est possible de classer sérologiquement les souches de Eschérichia coli dans les groupes O. Cette sérotypie est la seule à être utilisée en routine pour reconnaître notamment les souches E.C.E.P. [1,22]

On a distingué jusqu'à présent 163 antigènes O différents.

Exemples : [30]

- chez l'homme : 12 sérotypes classiques de gastroentérite du nourrisson, O₁₁₁, O₅₅, O₂₆, O₁₁₉, O₈₆,...
- chez les bovins et le mouton : O₈, O₉, O₁₅, O₂₀, O₂₆, O₃₅, O₇₈, O₂₆, O₁₀₄, O₁₁₅, O₁₃₇,...
- chez le porc : O₈, O₄₅, O₅₄, O₁₃₈, O₁₄₁, O₁₄₇, O₁₄₉, O₁₅₇.
- Chez les volailles : O₁, O₂, O₈, O₁₁, O₇₈, O₂₂, O₃₇, O₇₁.

○ **Antigènes capsulaires (AgK) :**

Inhibent l'agglutinabilité de O lorsqu'ils sont présents. Selon la nature biochimique, on distingue :

- les antigènes capsulaires polysaccharidiques : sont thermostables et sont présents chez les souches mucoïdes.
- Les antigènes capsulaires protéiques : correspondent à la présence de pili ou fimbriae, ils confèrent aux bactéries qui en sont pourvues des propriétés adhésives et hem agglutinantes, ils sont les plus importants, il s'agit de l'antigène K88 et K99. [30]

On distingue trois catégories d'antigène K, en fonction de leurs propriétés : L, A, B. (voir tableau N°1), [30]

Tableau N°3 : Caractères antigéniques

Antigène L	Antigène A	Antigène B
Après chauffage pendant une heure à 100°C, ils perdent antigénicité, agglutinabilité et pouvoir de saturation des agglutines.	Thermostables pendant 2 ^h 30 à 100°C. Pour démasquer l'AgO sous jacent, il faut chauffer 2 ^h 30 à 120°C. le chauffage détruit le pouvoir agglutinogène mais non le pouvoir de fixation des agglutines.	Après chauffage 1 ^h à 100°C, il n'est pas agglutinable et démasque l'AgO. il ne perd pas son pouvoir de saturer les agglutines.
Une souche possédant des AgL dissocie en colonie : L ₊ : bombées et opaques, O inagglutinables (sauf après chauffage 1h à 100°C). L : claires transparentes, O agglutinables.	Une souche possédant un AgA dissocie en colonies : A ₊ : mucoïdes, denses, opaques, O inagglutinables A : claires, transparentes, O agglutinables.	On n'observe pas de dissociation chez les souches.
Les souches L ₊ sont hémolytiques, toxiques pour la souris, nécrosantes chez les lapins par voie intradermique.	Les souches A ₊ ne sont pas hémolytiques, sont peu toxiques et nécrosantes peu pathogènes pour l'homme, elles offrent cependant une grande résistance à la phagocytose.	Les souches B ₊ peuvent être entéropathogènes pour l'homme. Les antigènes B sont les seuls Ag de surface, recherchés en pratique (chez l'homme).
L'AgL se rencontre chez les bactéries non capsulées.	l'AgA ne se rencontre que chez les bactéries capsulées.	L'AgB se rencontre chez les bactéries non capsulées.

• **Antigènes H (flagellaires) :**

Présents chez les formes mobiles des bactéries à Gram négatif, ils sont de nature protéique, ils sont thermolabiles.

L'agglutination H sera une agglutination des bactéries par leurs flagelles. Les anticorps anti H se fixant sur ceci et faisant un lien entre les flagelles voisins, il en résulte une agglutination floconneuse, lâche, facile à dissocier par agitation parce que les flagelles très fins peuvent être aisément cassés. [1, 22,30]

Chapitre III

I. Historique :

C'est à la fin du dix-neuvième siècle qu'est mise en évidence l'existence de substances antibiotiques. Après que Louis Pasteur ait démontré le rôle de germes microscopiques dans l'apparition de maladies infectieuses. Enuile Duchesme observe, en 1897 les propriétés bactéricides de certaines moisissures. Vers 1900, le bactériologiste Rudolf Von Emmerich isole une substance, la pyocynase, qui détruit in vitro les germes du choléra et de la diphtérie, mais qui se relève toute fois inefficace dans le traitement de ces maladies.

Au début du vingtième siècle, le médecin et chimiste allemand Paul Ehrlich tente de synthétiser des composés organiques sélectifs qui attaqueraient l'agent infectieux sans nuire à l'organisme hôte, ses expériences aboutissent, en 1909, au développement du Salvarsan, composé synthétique contenant de l'arsenic et qui fait preuve d'une action sélective contre les spirochètes responsables de la syphilis. Le Salvarsan reste le seul traitement de la syphilis jusqu'aux années quarante, ensuite il a été remplacé par la pénicilline, découverte en 1928 par Alexander Fleming (qui démontre son efficacité in vitro contre de nombreuses bactéries pathogènes) et isolée par Ernest Chain et six Howard Florey. Le lysozyme est également découvert par Alexander Fleming, il s'agit d'une enzyme aux fortes propriétés antimicrobiennes, mais aux applications médicales limitées car elle a principalement pour cible des bactéries non pathogènes. [23]

En 1939, la tyrothricine, isolée à partir de bactéries vivants dans le sol par le bactériologiste américain d'origine française René Dubos, est le premier antibiotique utilisé pour traiter une maladie, un an avant que Chain et Florey testent la pénicilline chez l'homme. En 1944, le biologiste américain Salman Waksman découvre la streptomycine, employé pour traiter des maladies contre les quelles la pénicilline est inefficace, en particulier la tuberculose. [24]

Depuis la généralisation de l'usage des antibiotiques dans les années cinquante, les chiffres de morbidité et de mortalité ont fortement diminué. Ainsi, certaines maladies, comme la tuberculose, les pneumonies d'origine

bactérienne où encore les septicémies, classées parmi les principales causes de mortalité à l'échelle mondiale, ont considérablement reculé. Elles sont toutefois loin d'avoir disparu et la tuberculose, par exemple, qui sévit fortement dans les pays en développement, est en nette recrudescence dans les pays industrialisés. [34]

II. Définition des antibiotiques :

On peut retenir deux définitions parmi d'autres :

Le terme antibiotique désignait tout composé chimique naturel produit par des micro-organismes qui ont la propriété d'inhiber la croissance et même de détruire d'autres micro-organismes à faible concentration. [40]

Actuellement, on appelle « antibiotique » toute substance ayant la propriété de tuer les bactéries pathogènes ou d'empêcher leur prolifération, elle est sans effet sur les infections parasitaires et virales, ni sur les mycoses. Elle peut être d'origine synthétique, semi synthétique ou naturelle, produite par des bactéries ou des champignons agissant spécifiquement au niveau de certaines structures ou dans diverses réactions de synthèse. [19]

Selon WAKSMAN, c'est toute substance chimique produite par des micro-organismes ayant le pouvoir d'inhiber et même de détruire les bactéries et d'autres micro-organismes en solution diluée.

Le terme même « antibiotique » fut né en 1889 par Paul Vuillemin. Un antibiotique est dérivé produit par le métabolisme des micro-organismes possédants une activité antibactérienne à faible concentration et dénué de toxicité pour l'hôte. Cette notion est étendue aux molécules obtenues par hémisynthèse. [8]

III. les effets des antibiotiques sur les bactéries :

Les effets des antibiotiques sont extrêmement divers puisqu'ils dépendent de l'antibiotique, du germe étudié, de l'état physiologique de la bactérie ou du champignon inférieure de l'environnement d'étude (in vitro, condition physiques et chimiques, in vivo, organe considéré).

En pratique on étudie l'effet des antibiotiques essentiellement in vitro et dans des conditions normalisées de culture pour les bactéries, le milieu de culture est le milieu dit de Mueller-Hinton dont la composition est maintenue aussi constante que possible par les fabricants, le PH d'étude est 7.2, la température d'étude est de 35°C à 37°C et l'atmosphère (aérobie/anaérobie) dépend des exigences du germe.

L'effet des antibiotiques n'est que rarement étudié au niveau cellulaire. C'est l'effet sur la population bactérienne qui est analysé, le résultat final est donc statique et ne reflète pas les nations d'un individu microbien donné. [19]

- **Activité bactéricide/ bactériostatique :**

Lorsqu'on étudie l'évolution d'une colonie bactérienne en culture, en l'absence d'antibiotique, on observe une courbe de croissance rapide, suivie par un plateau.

Lors de l'introduction d'un antibiotique dans le milieu, les courbes de croissance observées tendent à se rapprocher de l'horizontale.

- ◆ **Bactériostase :**

Il y a effet bactériostatique lorsque, après introduction d'un antibiotique, le nombre de germes est inférieur à celui du témoin sans antibiotique, tout en restant supérieur à celui de l'inoculum de départ. [12]

La bactériostase correspond à un ralentissement de la croissance bactérienne (bactériostase partielle), pouvant aller jusqu'à l'arrêt de la croissance, ceci ne vaut que si la bactérie était en phase de croissance avant le contact. Dans le cas contraire une absence de développement peut aussi correspondre à une augmentation très prononcée du temps de latence. Cette dernière hypothèse est très rarement évoquée. [16]

La bactériostase peut être étudiée en milieu liquide par exemple, par un suivi photométrique de la croissance des microorganismes en présence de concentrations variées d'antibiotiques. [16]

Selon Yahi, les antibiotiques bactériostatiques sont les antibiotiques pour lesquels la concentration minimale bactéricide CMB est très supérieure à la concentration minimale inhibitrice CMI. [41]

◆ **Bactéricide :**

Il y a effet bactéricide lorsque, après introduction de l'antibiotique, le nombre de germe devient inférieur à celui de l'inoculum, l'action de l'antibiotique aboutit à la mort des germes. [12]

Selon Rahal K, Liassine, Rechal, les antibiotiques bactéricides sont les antibiotiques dont la CMB est identique ou proche de la concentration minimale inhibitrice, c'est-à-dire qui ont un rapport CMB/CMI voisin de 1. [31]

• **La concentration minimale inhibitrice (CMI) :**

La CMI d'un antibiotique correspond à la plus faible concentration capable d'inhiber toute croissance visible du germe après un temps de contact de douze heures à dix huit heures.

Donc la mesure d'un effet bactériostatique ne donne pas des renseignements sur l'état de la population bactérienne et notamment ne permet pas de préciser si cette dernière est partiellement ou totalement détruite ou si elle a seulement cessé de se multiplier. [31]

• **La concentration minimale bactéricide (CMB) :**

La CMB est la plus petite concentration d'antibiotique qui agissant sur une population bactérienne, laisse un faible pourcentage de bactéries survivantes après un temps de contact de douze heures à dix huit heures. Ce pourcentage est usuellement fixé à 0.01% en France et à 0.1% dans les pays Anglo-Saxons. [31,7]

• **La concentration critique inférieure (CCI) :**

C'est la concentration sérique minimale de l'antibiotique lors d'un traitement aux doses habituelles. [31]

- **La concentration critique supérieure (CCS) :**

Correspond à la concentration sérique maximale de l'antibiotique ne donnant pas lieu à un effet toxique. [31]

Parmi les antibiotiques il y a qui sont :

- actifs sur les germes en voie de multiplication rapide (Bêta - lactamines : pénicillines, céphalosporines).

- actifs également sur les germes au repos : (aminosides, polypeptides).

- bactériostatiques : (Tétracyclines, Chloramphénicol, Macrolides).

[12]

IV. Structure de la bactérie: [27]

Rappel :

La connaissance des différentes structures des bactéries est nécessaire pour comprendre leur métabolisme. Certaines de ces structures sont permanentes, d'autres inconstantes.

♦ La Paroi :

Elle est présente chez toutes les espèces bactériennes à l'exception des mycoplasmes. Elle entoure la bactérie et constitue la structure constante la plus externe.

On rencontre deux types de paroi :

♦ Les parois épaisses et denses :

Elles sont faites presque uniquement de peptidoglycane ou muréine ou mucopeptide. Cette substance à structure lamellaire est faite de chaînes glucidiques reliées entre elles par des peptides ; lui sont associés des acides téchoïques.

◆ Les parois fines et lâches :

Elles ont une structure plus complexe constituée d'une fine couche de mucopeptide (à structure plus lâche que celui des parois épaisses) recouverte à l'extérieur d'une membrane externe ou pariétale. Cette paroi est séparée de la membrane cytoplasmique par un espace appelé espace périplasmique.

La membrane externe a la structure de toutes les membranes cellulaires. Elle est faite de lipides (phospholipides et lipopolysaccharides) organisés en deux couches hydrophiles séparées par une couche hydrophobe. Dans l'épaisseur de cette membrane sont enchâssées des protéines, les porines, qui permettent le passage de petites molécules telles que les antibiotiques. Les lipopolysaccharides les plus externes portent les antigènes O des bactéries et constituent l'endotoxine des bactéries.

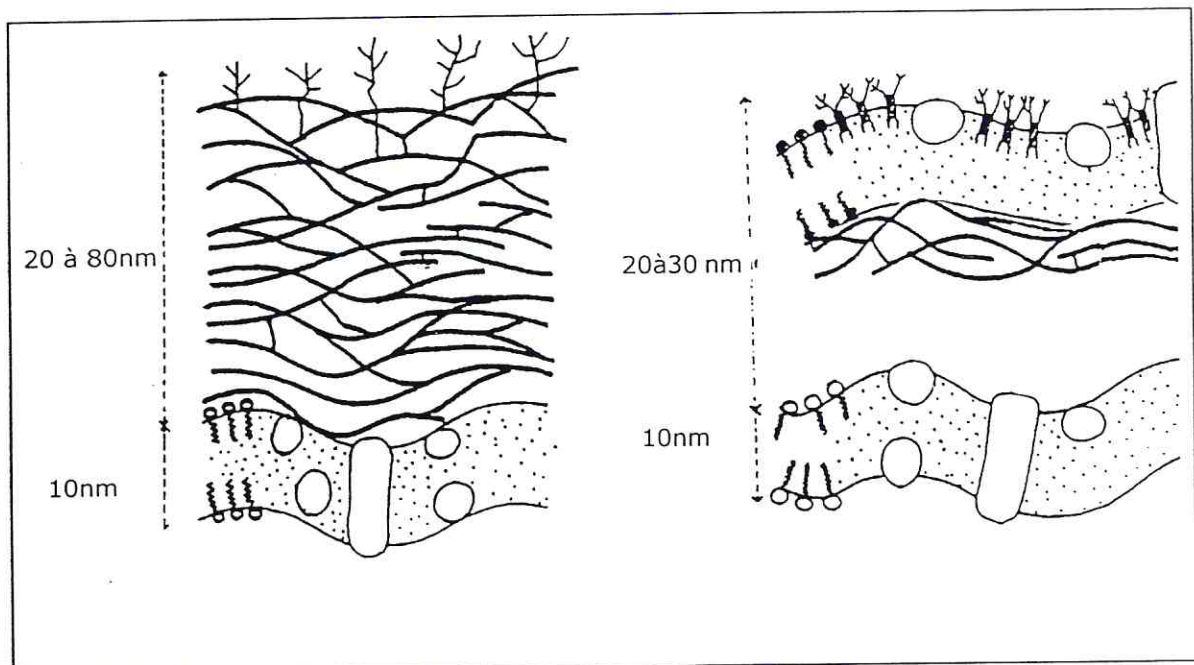


Figure N°12 : La structure de la paroi

La paroi détermine la forme de la bactérie, elle la protège (une bactérie qui n'a plus de paroi meurt), elle est un passage obligé pour les échanges avec le milieu extérieur, elle est antigénique (antigène O).

La paroi est la cible d'antibiotiques tels que les bêtalactamines qui bloquent sa synthèse.

♦ **La coloration de Gram :**

Permet de séparer les bactéries à paroi épaisse des bactéries à paroi fine.

Après fixation des bactéries sur une lame microscopique, on traite la préparation par un premier colorant : le "violet de gentiane" puis on mordance par une solution de lugol. A ce stade, toutes les bactéries apparaissent violet. On lave la préparation avec de l'alcool qui décolore les seules bactéries à paroi fine qui ne sont donc plus visibles. On surcolore par de la fuchsine (colorant rouge) qui recolore les bactéries décolorées. Après coloration de Gram, les bactéries à paroi épaisses sont colorées en violet : elles sont dites "à Gram positif", les bactéries à paroi fine sont colorées en rouge : ce sont les bactéries "à Gram négatif".

• **La membrane cytoplasmique :**

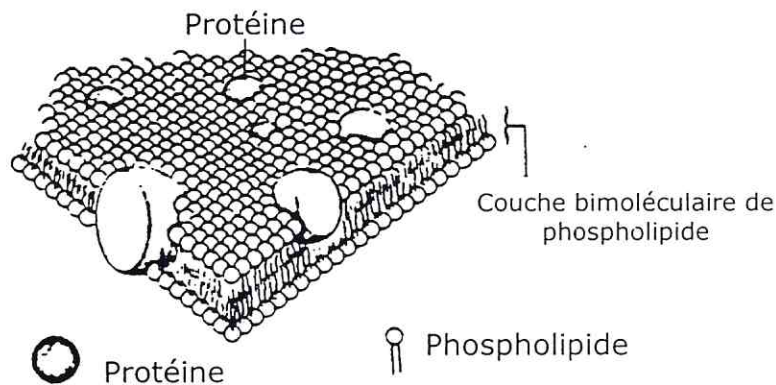


Figure N°13 : La structure de la membrane cytoplasmique

La membrane cytoplasmique entoure le cytoplasme, elle a la structure lipidoprotidique de toutes les membranes cellulaires.

Les molécules qui la constituent sont mobiles et "flottent" dans son épaisseur lui donnant une grande plasticité. Parmi les diverses protéines, certaines sont constitutives, d'autres ont un rôle de transport permettant le passage de diverses molécules ou ions (Na, K, Cl, sucres, aminoacides ou oligopeptides). Elle contrôle donc les entrées et sorties de la cellule.

La membrane cytoplasmique des bactéries contient en outre de nombreux enzymes assurant les synthèses et fournissant l'énergie nécessaire au métabolisme. La membrane assure les fonctions des mitochondries, qui n'existent pas chez les bactéries.

Certaines bactéries produisent des bactériocines, substances toxiques pour les bactéries et certaines de ces bactériocines perturbent le fonctionnement de la membrane cytoplasmique.

La membrane est la cible des antibiotiques polypeptidiques.

- **Le cytoplasme :**

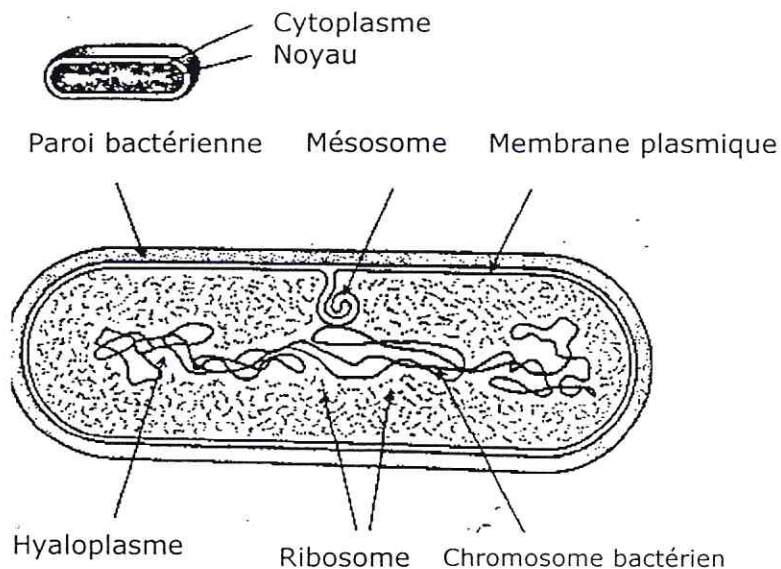


Figure N°14 : La structure du cytoplasme

Il contient essentiellement les ribosomes qui assurent les synthèses protéiques en traduisant le m-RNA. Ils sont en étroit contact avec le matériel nucléaire. Les ribosomes des bactéries sont différents des ribosomes des eucaryotes. Ils sont la cible de nombreux antibiotiques.

- **Le matériel nucléaire :**

Les cellules procaryotes ne possèdent pas de noyau mais possèdent du matériel nucléaire sous forme d'un chromosome unique, circulaire, d'une longueur voisine de 1 mm. Ce chromosome est constitué d'un filament hélicoïdal d'acide désoxyribonucléique (ADN) bicaténaire. Chaque chaîne est faite d'une succession d'acide phosphorique et de desoxyribose sur lequel est branché une base. Quatre bases entrent dans la composition de l'ADN : adénine (A), guanine (G), thymine (T) et cytosine (C). Les deux chaînes, liées entre elles par les bases, ont la même structure mais chaque base détermine obligatoirement la base opposée car à l'adénine ne peut se lier que la thymine et à la guanine, la cytosine (A-T, G-C). La séquence de ces bases est spécifique de chaque ADN.

L'ADN des bactéries est le support des informations transmises aux ribosomes qui effectuent les synthèses.

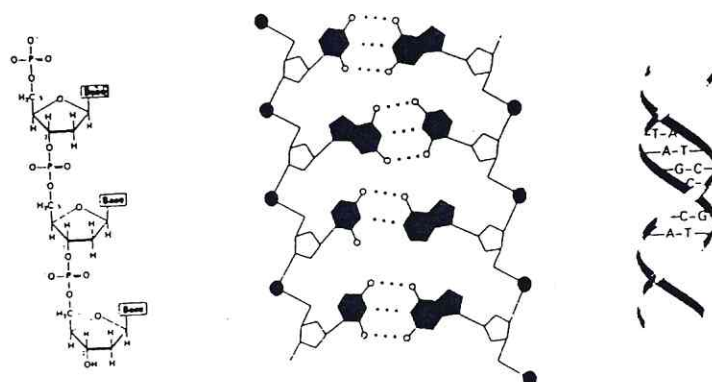


Figure N°15 : Le matériel nucléaire

- **La capsule :**

La capsule est une structure extérieure **non constante**. Elle entoure la bactérie. Sa constitution est le plus souvent polysaccharidique, parfois protéique. Elle n'est pas colorable par les techniques bactériologiques. Pour la mettre en évidence au microscope, on réalise une suspension des bactéries dans de l'encre de chine et on observe la capsule sous forme d'un halo clair et réfringent.

C'est un facteur de virulence car elle protège la bactérie de la phagocytose.

La capsule est antigénique, les antigènes capsulaires sont dénommés antigène K.

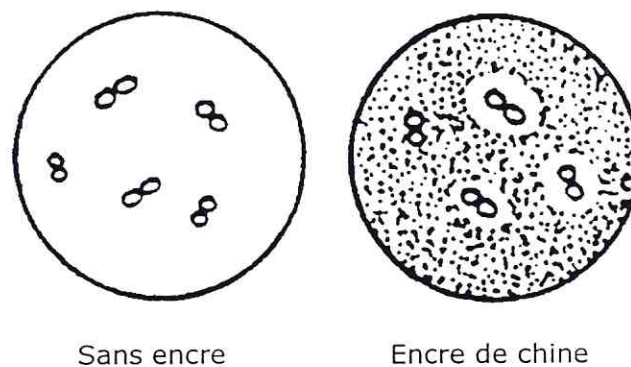


Figure N°16 : La capsule

- **Les flagelles :**

Les flagelles ou cils sont des structures rigides, ondulées qui naissent de la membrane cytoplasmique. Ils permettent la mobilité des bactéries et seules les espèces qui en sont pourvues sont mobiles. Ils sont constitués d'une protéine appelée flagelline.

Plusieurs dispositions sont possibles :

- un seul flagelle polaire = ciliature monotriche,
- une touffe de flagelles polaires = ciliature lophotriche,
- un flagelle à chaque pôle = ciliature amphitriche,
- des flagelles entourant la bactérie = ciliature prétriche,
- les spirochètes ont un flagelle interne dénommé filament axial.

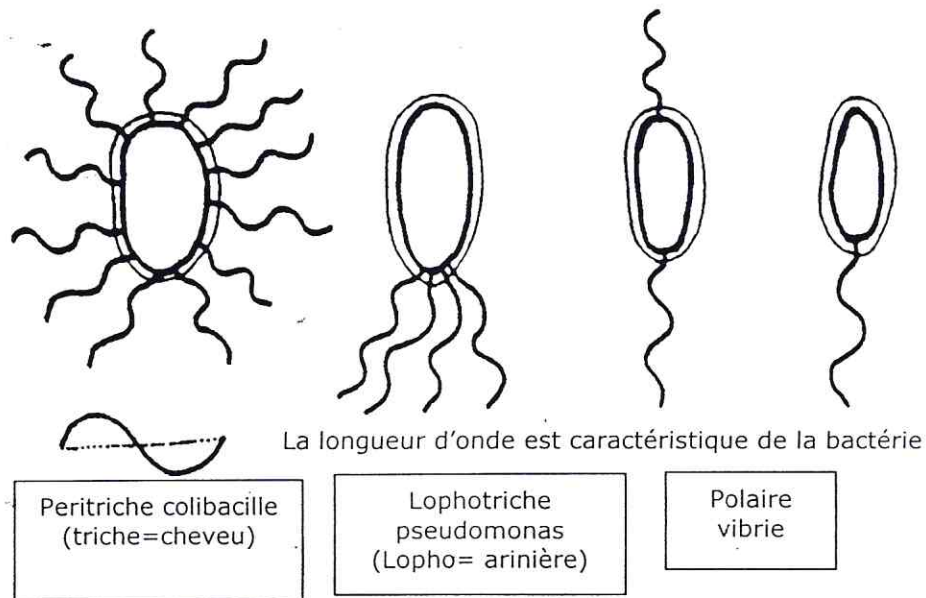


Figure N°17 : Les dispositions des flagelles

Les antigènes des flagelles sont appelés Antigène H.

- **La spore :**

- Si on place les bactéries dans des conditions défavorables de survie, pour certaines d'entre elles (bacilles Gram + : Bacillus et Clostridium) il y a formation de spores ; c'est la sporulation.

- Si on place des spores dans des conditions favorables, elles retournent à l'état de bactéries végétatives ; c'est la germination.

La spore contient, sous forme condensée, le génome et une partie du cytoplasme déshydraté autour d'une enveloppe très résistante. On peut observer au microscope les spores en voie de formation dans les corps bactériens. La situation de la spore est caractéristique de l'espèce. Les spores constituent une forme de résistance des bactéries et sont la cause de certaines contaminations d'origine tellurique (tétanos, charbon).

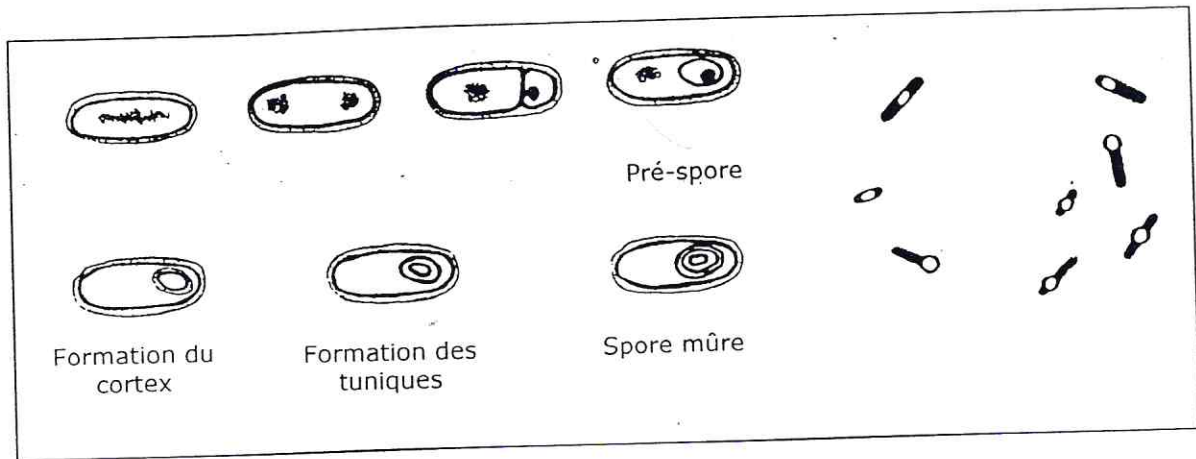


Figure N°18 : La spore

- **Les pili :**

Les pili (poils) sont des formations qu'on ne peut observer qu'au microscope électronique. Certains d'entre eux, dénommés pili communs ou fimbriae (frange) sont courts et cassants. Ils sont utiles pour l'adhésion des bactéries aux interfaces et particulièrement aux muqueuses et sont donc des facteurs de virulence. Ils ont une structure protéique : la piline.

Les pili sexuels, plus longs, relient deux bactéries et sont voies d'échanges de matériel génétique entre les bactéries. Les bactéries capables de produire des pili sexuels sont dénommées bactéries "mâles" à l'opposé des autres qui sont dites "femelles".

- **Les plasmides :**

Les plasmides sont de petits éléments circulaires constituant du matériel génétique extra chromosomique. Ils sont faits d'ADN et portent, comme le chromosome, des informations génétiques. Ils sont autonomes et capables de se répliquer indépendamment du chromosome. Ils codent pour la synthèse de différentes protéines enzymatiques conférant ainsi à la bactérie qui les possède des caractères particuliers tels que possibilité d'utiliser tel ou tel substrat ou résistance aux antibiotiques.

Ces plasmides sont **transmissibles** à d'autres bactéries.

V. Mécanisme d'action des antibiotiques antibactériens : [23]

V.1 Action sur la paroi :

- **Les bêta- lactamines :**

Inhibent la synthèse du peptidoglycane constituant la paroi des bactéries gram⁺. Elles bloquent la réaction de transpeptidation, qui permet la transformation des ponts peptidiques donnant à la paroi sa structure réticulée. Leurs cibles sont des protéines situées dans l'espace péri plasmique dont l'activité enzymatique intervient dans la réaction de transpeptidation. Cette fixation entraîne, si les bactéries sont en phase de multiplication, l'arrêt de la croissance et des modifications morphologiques, qui sont suivies de la lyse des cellules par activation d'enzymes auto lytiques.

- **D'autres antibiotiques :**

Agissent sur la synthèse de la paroi mais à des stades plus précoces que les bêta-lactamines. C'est le cas de la bacitracine qui provoque l'accumulation de précurseurs du peptidoglycane sous forme monomère. La cyclosérine, la vaucamycine, la fosfomycine et la novobiocine inhibent à un stade plus précoce la synthèse du monomère.

V.2 Action sur la membrane cytoplasmique :

- **Les polymyxines :**

Se fixent aux lipopolysaccharides et aux phospholipides, c'est-à-dire au niveau de la membrane externe des bactéries gram⁻ et de la membrane cytoplasmique. Il se crée une désorganisation membranaire, qui se traduit par des changements morphologiques et une fuite dans le milieu extérieur de composants intracellulaires. Il s'ensuit une lyse de la cellule.

- **Les gramicidines et les tyrocidines :**

Réagissent également avec les phospholipides de la membrane cytoplasmique, ce qui entraîne un accroissement de la perméabilité et la fuite des constituants intracellulaires.

V.3 Action au niveau des acides nucléiques :

La structure des acides nucléiques (DNA et RNA) bactériens ou fongiques ne présente pas de particularités, si bien que de nombreux produits actifs sur ces structures sont toxiques pour toutes les cellules. Certains d'entre eux sont d'ailleurs utilisés comme antibiotiques, tels la nutomycine, la puromycine, l'actinomycine ou la rubidomycine. Quatre groupes d'antibiotiques agissant à ce niveau sont cependant utilisables en thérapeutique : les quinolones, la novobiocine, les rifamycines et les nitrofuranes.

- **Les quinolones :**

La cible des quinolones est la sous unité alpha ou A des DNA-gyrases. En présence de quinolone, le surenroulement du DNA ne peut se constituer et les brins de DNA coupés par la gyrase ne pouvant plus se souder, les exo nucléases sont activées. Les quinolones inhibent donc la réplication du DNA, cet effet entraîne la mort de la cellule (effet bactéricide).

- **La novobiocine :**

Inhibe la réplication du DNA en empêchant compétitivement la fixation de l'ATP sur le complexe [gyrase (sous unité bêta)-DNA].

- **Les rifamycines :**

Se fixent sur la sous unité bêta de la RNA polymérase DNA dépendance. Il s'en suit un blocage de la synthèse de RNA messenger par inhibition des RNA polymérases bactériennes.

- **Les nitrofuranes :**

Interagissent sous forme réduite avec le DNA bactérien. Il en résulte des lésions qui deviennent létales quand la bactérie ne peut les réparer.

VI. Action sur la synthèse protéique :

Il existe de nombreux inhibiteurs de la synthèse protéique des procaryotes capables de bloquer spécifiquement une étape de la synthèse. Nous allons rappeler uniquement l'action des produits utilisés en thérapeutique.

- **Les aminosides :**

Les aminosides se fixent sur la fraction 30S du ribosome bactérien, au niveau des protéines particulières. Il s'en suit une altération ou une inhibition complète de la synthèse protéique. Cette action est due à des effets pléotropes en particulier au niveau de l'irritation par inhibition de l'activité dissociante au niveau de l'élongation ou au cours de la translocation. La fixation au ribosome se traduit aussi par une augmentation du transfert à travers le cytoplasme qui se trouve désorganisé et dont le fonctionnement est altéré. Cet effet et d'autres mécanismes encore imprécis expliquent l'action bactéricide de la plupart des aminosidés.

- **Les tétracyclines :**

Elles inhibent la phase d'élongation de la synthèse protéique en empêchant la fixation du complexe [aminoside-t RNA] sur le complexe [RNA massenger-ribosome]. D'autres mécanismes d'action sont également possibles dont une altération de la membrane cytoplasmique.

- **Le chloramphénicol :**

Le chloramphénicol se fixe sur une partie du site accepteur A de la sous unité 50S. Ainsi il empêche la formation de la liaison peptique (réaction de transpeptidation au niveau du site ribosomal).

- **Les macrolides et apparentés :**

Les macrolides se fixent sur la sous unité 50S. Les grands macrolides (spiramycine,...) inhibent les premières étapes de la synthèse protéique. Les macrolides de petite taille (érythromycine,...) agissent à un stade plus tardif en inhibant la translocation.

- Les licosamides : se fixent également sur la sous unité 50S au niveau du site A et de la peptidyltransférase.
L'inhibition de la synthèse protéique survient dans les premières étapes par impossibilité de formation de la liaison peptidique.

- Les streptomycines : sont constituées de deux composants, qui se fixent sur la sous unité 50S dont l'association est nécessaire pour obtenir un effet bactéricide important. Les composants appartenants au groupe A ont pour cible la peptidyltransférase, ce qui perturbe l'activité des sites A et P. cette fixation favorise celle des composants des groupes B dont la cible est encore indéterminée mais qui du fait de leur structure peptidique agiraient par inhibition stérique.

- L'acide fusidique inhibe la translocation de la chaîne peptidique en agissant sur le facteur d'élongation.

VII. Antibiotiques actifs au niveau des métabolismes intermédiaires :

De nombreux produits sont actifs sur les métabolismes intermédiaires de la bactérie mais mis à part les sulfamides, peu d'entre eux sont utilisés en thérapeutique antibactérienne.

- **Antibiotique inhibant le métabolisme énergétique :**

Le transport d'électrons par la chaîne respiratoire et le transport d'énergie résultant du transport d'électrons (synthèse d'ATP) peuvent être inhibés par divers antibiotiques tels que les antimycines et les oligomycines.

- **Antibiotiques ayant une action antimétabolite :**

Les sulfamides inhibent le métabolisme des folates. L'acide folique nécessaire au métabolisme du DNA et de certains acides aminés doit être synthétisé par les bactéries car elles ne peuvent pas incorporer les folates exogènes. Les sulfamides agissent sur ce métabolisme par inhibition compétitive qui entraîne un arrêt de la croissance.

- **Des produits variés :**

Antagonisent des métabolites essentiels avec lesquels ils ont une action structurale, tels que des acides aminés, des nucléosides et des vitamines.

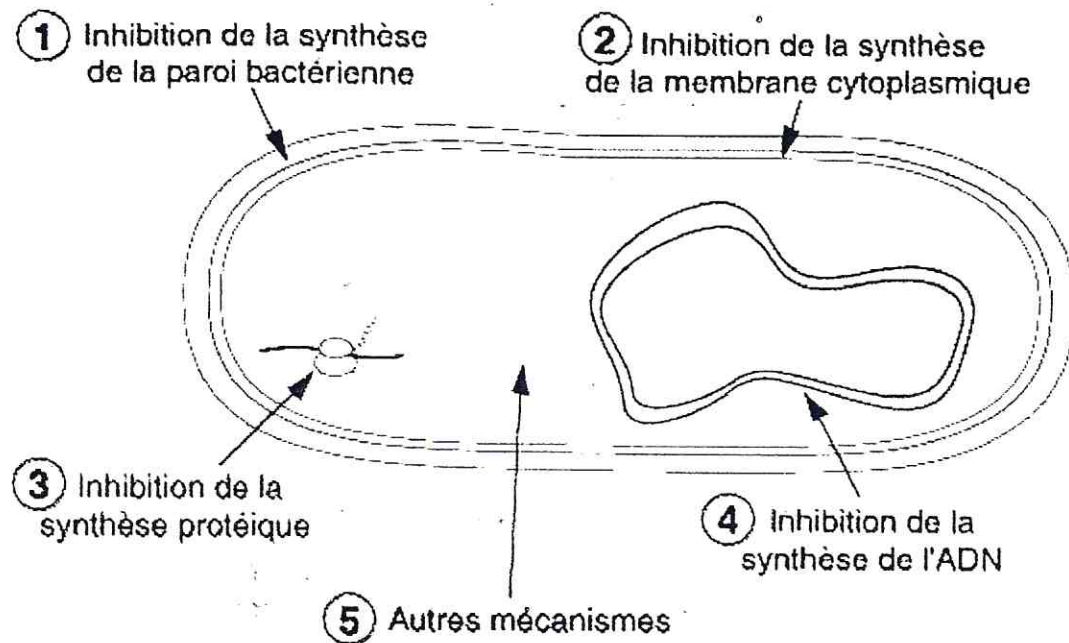


Figure N°19 : Mécanisme d'action des antibiotiques

VI. Classification :

Les antibiotiques, en fonction de leur structure chimique, sont regroupés en plusieurs grandes familles. Dans chaque famille on retrouve :

- une structure chimique voisine, plus au moins homogène,
- des bactéries physico-chimiques voisins, déterminant un devenir généralement assez proche dans l'organisme,
- une activité antibactérienne du même ordre. [13]

Il existe plusieurs systèmes de classification des antibiotiques, le plus courant prend en compte leur mode d'action sur les agents infectieux. Certains antibiotiques attaquent la paroi ou la membrane cellulaire alors que les autres inhibent la synthèse des acides nucléiques et des protéines.

Un autre système consiste à classer les antibiotiques en fonction de leur spectre d'action (staphylocoques, streptocoques,...), on peut aussi les classer en fonction de leur structure chimique. Les différentes familles sont alors les B lactamines, les aminosides, les tétracyclines, les macrolides, les sulfamides et les quinolones. [16]

Parmi les dizaines de milliers de molécules découvertes et étudiées dans les centres de recherches industrielles depuis 1944, seule une centaine de produits sont utilisés en thérapeutique humaine ou animale, ils ont un nom scientifique ou une dénomination commune internationale (DCI) et des noms commerciaux désignant le produit pur et les préparations diverses le contenant. [13]

VII. Les grandes familles des antibiotiques : [12]

- **Les bêta lactamines :**

Sont caractérisés, sur le plan chimique, par un cycle dit bêta lactame. Deux groupes sont distingués dans cette famille :

- a. les pénicillines, extraites de souches de pénicillium (pénicilline G) et leurs dérivés de semi synthèse,
- b. les céphalosporines, extraites de souches de céphalosporium.

- **Les aminosides :**

Dont le plus connu est la streptomycine, extraits de diverses souches de streptomyces.

- **Le chloramphénicol :**

Antibiotique de structure chimique simple, initialement extrait d'une souche de streptomyces, obtenu aujourd'hui par synthèse totale.

- **Les tétracyclines :**

A structure tétra cyclique (quatre cycles), extraits de diverses souches de streptomyces.

- **Les antibiotiques polypeptidiques :**

Constitués de chaînes d'acides aminés (d'où leur nom de polypeptides) extraits de bactérie du germe bacillus.

- **Les macrolides et antibiotiques apparentés :**

Contenant dans leur structure un volumineux cycle lactone ou « olide » extrait de diverses souches de streptomyces.

Exemple : érythromycine, tylosine.

- **Les antibiotiques antifongiques :**

Actifs contre les champignons parasites (mycoses).

- **Divers :**

Antibiotiques de structure et de prévenance très diverses, utilisés notamment en antibiosupplémentation.

Tableau N°4 : Classification des antibiotiques [23]

Antibiotiques antibactériens		
famille	Site d'action/mode d'action	origine
Bêta-lactamine • Pénicilline • Céphalosporine • Céphamycine	Para / bactéricide Para / bactéricide Para / bactéricide	• Pénicillium Semi synthèse • Céphalosporium Semi synthèse • Streptomycine Semi synthèse
Aminoside	Ribosomes (30S) / bactéricide	Streptomyces micro monospora Semi synthèse
Chloramphénicol	Ribosome (50S)/bactériostatique	Streptomyces Synthèse
Tétracycline	Ribosome (50S)/bactériostatique	Streptomyces Semi synthèse
Macrolides Lincosamines Streptogramines	Ribosome (50S)/bactériostatique ou bactéricide	Streptomyces
Polypeptides	Membrane cytoplasmique, bactéricide	Bacillus nocardia
Quinolones	DNA gyrase / bactéricide	Synthèse
Sulfamides Triméthoprimes	Métabolismes des folates bactériostatiques	Synthèse
Vancomycine Novobiocine Fosfomycine Acide fusidique	Paroi / bactéricide	Streptomyces Fusidium
Vitro furanes	DNA / bactéricide	Synthèse

VIII. Le spectre d'activité d'un antibiotique : [12]

Correspond à l'ensemble des germes sensibles à cet antibiotique. Les bactéries sont regroupées, suivant leur affinité pour certains colorants, en deux classes :

- ceux à gram positif : staphylocoques, streptocoques, clostridies,
- ceux à gram négatif : coliformes, salmonelles...

En fonction de l'étendue du spectre d'activité d'un antibiotique, on distingue des antibiotiques à spectre étroit, à spectre large et très large :

° Spectre très large :

- pénicillines à large spectre (groupe A),
- chloramphénicol,
- tétracyclines.

° Spectre étroit à moyen :

• Gram négatif :

- aminosides,
- polypeptides cycliques.

• Gram positif :

- pénicillines (groupe G et M),
- macrolides et apparentés.

Ces notions sont fondamentales. Le choix d'un antibiotique dans le traitement d'une infection par un germe déterminé ou soupçonné sera basé en grande partie sur son activité antibactérienne à l'égard de ce germe.

Lorsque la nature du germe en cause est ignorée (cas assez fréquent en médecine vétérinaire) ou lors d'atteinte par plusieurs germes, les antibiotiques à large spectre seront utilisés.

On peut réaliser également des associations d'antibiotiques, en se fondant sur la complémentarité de spectre d'action.

Exemple :

Pénicilline streptomycine : association active sur la plupart des germes gram positifs et négatifs.

Mais aussi et surtout, sur l'activité antibactérienne des antibiotiques à associer en règle générale.

L'association d'un antibiotique bactériostatique (tétracycline, chloramphénicol) et d'un antibiotique bactéricide agissant sur les germes en multiplication rapide (pénicilline) est peu intéressante : l'action inhibitrice de la multiplication bactérienne due à l'antibiotique bactériostatique diminue l'activité de l'antibiotique bactéricide.

L'association de deux antibiotiques bactériostatiques donne une addition d'effets.

L'association de deux antibiotiques bactéricides ayant des sites d'actions différentes procure une action supérieure à l'action de chacun des deux antibiotiques administrés seul (potentialisation).

Ainsi les associations pénicillines – aminosides, (par exemple, pénicilline -streptomycine ou pénicilline – antibiotique polypeptidique), sont particulièrement intéressantes.

Chapitre IV

I. L'antibiogramme :

L'antibiogramme ou la détermination de la sensibilité des bactéries aux agents antibactériens (ATB) est basé sur l'étude de la croissance bactérienne en présence d'un gradient de concentration réalisé dans des milieux de culture. [27]

Selon Henry, Leclerc l'antibiogramme est la méthode analytique qui permet de définir in vitro l'antibiotique le plus actif sur un germe, donc celui qui a le plus de chance de guérir le malade infecté par ce germe. Elle doit tenir compte d'un certain nombre de facteurs susceptibles de modifier l'activité antimicrobienne. Ces facteurs sont propres à l'antibiotique, à ses propriétés, au milieu et à la bactérie. [25]

I.1 L'antibiotique :

Il doit être stable et conserver son activité au cours du test :
À la température de 37°C, habituellement la plus favorable à la croissance microbienne, certains antibiotiques la perdent. Ainsi en vingt quatre heures à pH égal 7.

Le pouvoir de diffusion de l'antibiotique joue aussi un rôle capital au cours de la mesure en milieu solide. Il n'est pas souhaitable d'évaluer la sensibilité des microorganismes à la polymyxine sur un milieu gélosé où cet antibiotique diffuse mal. [25]

I.2 Le milieu :

Il doit avoir une composition rigoureusement définie, permettant une reproduction fidèle des résultats.

Les milieux contenant du sang ou du sérum stimulent assez fortement la croissance bactérienne. Sauf nécessité, ils ne sont pas les plus indiqués car ils peuvent inhiber l'activité antibiotique. Le glucose augmente celle de la pénicilline et diminue celle de la streptomycine. Le pH est sans doute un des facteurs les plus influents. Le pouvoir optimum de chaque antibiotique est

conditionné par un pH optimum : la pénicilline est la plus active en milieu acide, à pH égal à 6.6, la streptomycine l'est d'avantage en milieu alcalin puisqu'elle est cent fois plus active à pH égal à 7.4 qu'à pH égal à 6. En définitive, au cours des mesures, la solution la plus sage consiste à choisir le pH neutre. [25]

I.3 La bactérie :

Le nombre de bactéries mises au contact de l'ATB devait être toujours le même. En milieu solide, les zones d'inhibition observées autour des sources d'ATB sont inversement proportionnelles à l'abondance de l'inoculum.

Les micro-organismes à croissance rapide sont les plus sensibles à l'action d'antibiotique.

Le temps d'incubation des cultures ne doit pas être prolongé car l'ATB, en perdant son activité, favorise la multiplication des cellules les moins sensibles. [25]

II. Principe :

C'est la technique d'étude de la sensibilité d'une souche bactérienne aux antibiotiques. [1]

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour établir un antibiogramme :

II.1 Méthodes de dilution en tube ou en gélose :

Peu utilisées car elles sont trop longues et ne permettent d'étudier qu'un seul antibiotique à la fois. [33]

II.2 Les méthodes de diffusion sur gélose :

Couramment utilisées, ces techniques sont une simplification de la sensibilité aux antibiotiques.

Des disques de papier buvard, imprégnés d'une quantité définie d'antibiotiques, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablementensemencé avec une suspension de bactéries en phase exponentielle de croissance.

L'antibiotique diffuse dans toutes les directions et il se forme un gradient de concentration à partir de la source (disque). Après incubation de dix huit heures à 35°C, on constate que chaque disque est entouré d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne dont le diamètre est plus au moins large.

Les points où s'arrête la multiplication bactérienne correspondent à la CMI, mais la lecture et l'interprétation sont faites en terme de diamètre d'inhibition.

L'antibiogramme classe les bactéries en trois catégories :

- Sensible (S),
 - Intermédiaire (I),
 - Résistante (R).
- Si la CMI \leq CCI, la souche est dite sensible (S), sa croissance est inhibée par la concentration sérique obtenue au cours d'un traitement à dose habituelle par voie générale.
 - Si la CMI $>$ CCS, la souche est dite résistante (R), la concentration sérique ne pouvant pas atteindre la CMI dans les conditions du traitement, sauf à utiliser des posologies toxiques.
 - Si la CCI $<$ CMI \leq CCS, la souche est dite intermédiaire, dans ce cas le succès thérapeutique est imprévisible. [3,10]

III. Contrôle de qualité : [29]

- **Objectif :**

Le contrôle de qualité a pour but d'assurer :

- la précision et la fiabilité de la technique des tests de sensibilité,
- la performance des réactifs utilisés dans les tests,
- la performance du personnel qui effectue les tests et la lecture.

IV. procédure de contrôle :

Le contrôle de qualité doit se faire à chaque nouveau lot de MUELLER Hinton (MH) et d'antibiotiques. Ce travail de contrôle doit être permanent. Il est conseillé de désigner dans chaque laboratoire une personne chargée de la supervision du contrôle de qualité.

La souche de référence qui doit être obligatoirement testée à titre d'exemple pour *Eschérichia coli* est *Eschérichia coli* ATCC 25922. Cette souche sera testée dans les mêmes conditions opératoires que celles décrites pour les bactéries isolées.

Des antibiogrammes seront réalisés une fois par semaine pour cette souche. Toutefois d'autres souches peuvent être intégrées dans le système de contrôle, leur choix est laissé à l'appréciation du microbiologiste et doit tenir compte du type d'antibiogramme pratiqué.

A titre d'exemple un antibiogramme *Eschérichia coli* peut être validé par une souche de référence testée dans les mêmes conditions opératoires, c'est d'ailleurs le même principe pour l'ensemble des souches de référence.

Il est recommandé de faire une analyse mensuelle de l'ensemble des tests de contrôle de qualité par molécule et par technicien. Si les résultats ne sont pas satisfaisants, il faudra contrôler chacun des paramètres suivants :

- 1- la lecture et l'interprétation des diamètres des zones d'inhibition,
- 2- le milieu de culture,
- 3- l'inoculum,
- 4- les disques d'antibiotiques,
- 5- les souches de référence.

Le contrôle de qualité doit être pratiqué par tous les techniciens et jamais par un seul (appliqué le système de rotation pour le personnel du laboratoire).

Afin d'améliorer la qualité de ces tests, il a été recommandé de :

- 1- changer la souche de référence chaque début de mois,
- 2- d'effectuer les tests pour des cultures fraîches de dix huit heures,
- 3- d'utiliser des disques d'ATB correctement conservés (-20°C),
- 4- d'utiliser un densitomètre pour une mesure exacte de l'inoculum bactérien.

III.2.1 Lecture et interprétation :

La lecture de l'antibiogramme doit se faire à l'aide d'un pied à coulisse. Elle doit être précise :

- pour éviter au maximum les erreurs des mesures en maintenant l'instrument de mesure perpendiculairement à l'axe optique,
- il faut vérifier que les interprétations (S, I, R) correspondent bien aux diamètres mesurés,
- il faut éviter les confusions entre les différentes tables de lecture.

Les deux causes principales d'erreur sont :

- 1- mauvais ensemencement (stries non serrées),
- 2- mauvaise mesure de diamètre.

III.2.2 contrôle du milieu :

- pH :

Doit être de 7.2 à 7.4, il faut le contrôler pour chaque nouveau lot de Mueller Hinton à l'aide d'un pH mètre. En effet toute variation de pH affecte l'activité des aminosides, des macrolides et des phénicolés.

Plonger l'électrode dans un flacon de Mueller Hinton, semiliquide (faire attention, car il y a risque d'éclatement de l'électrode si la température est trop élevée), la gélose doit se solidifier autour de l'extrémité de l'électrode, à ce moment là, mesurer le pH.

- Humidité :

Les boîtes doivent être convenablement séchées avant l'ensemencement.

-Concentration en thymidine :

Une concentration trop élevée en thymidine, entraîne une réduction des diamètres d'inhibition autour des disques de Sulfamides et triméthoprime. Pour cela, il faut tester le milieu Mueller Hinton avec la souche de référence *Eschérichia faecalis* ATCC 29212, un diamètre d'inhibition ≥ 20 mm doit être observé autour du disque triméthoprime/sulfaméthoxazole.

partie pratique

- Concentration en cations divalents :

Une concentration trop élevée en ions divalents (principalement Ca^{2+} et Mg^{2+}), entraîne une diminution des zones d'inhibition pour les aminosides, alors que de faibles concentrations donnent des zones d'inhibition trop grandes.

III.2.3 Contrôle de l'inoculum :

- d. préparer l'étalon 0.5Mc Farland en versant 0.5ml d'une solution de BaCl_2 dihydraté à 1% (10g/l) dans une éprouvette de 100 ml, compléter à 100ml avec de H_2SO_4 à 1% (10ml/l). L'étalon ainsi préparé doit avoir une densité optique (DO) de 0.08 à 0.1, lecture à 625 nm.
- e. Répartir la solution en volume de 10ml dans des tubes identiques à ceux qui serviront à la préparation des inoculums.
- f. Sceller ces tubes de façon à éviter toute évaporation (parafilm, ruban adhésif...)
- g. Repérer le niveau du liquide à l'aide d'un marqueur et le contrôler régulièrement en prenant la densité optique (DO).
- h. Conserver les tubes à température ambiante et à l'abri de la lumière (papier aluminium)
- i. Il faut homogénéiser le tube étalon avant de le comparer à l'inoculum préparé : inoculum et étalon doivent avoir la même turbidité lorsqu'ils sont examinés sur un fond rayé.

III.2.4 Disques d'antibiotiques :

- j. avant d'utiliser toute cartouche d'ATB, il faut vérifier la date de péremption, surtout pour les bêtas - lactamines, ainsi que la charge des disques,
- k. le stock de cartouches d'ATB doit être conservé ,à -20°C , les cartouches dans leur étuis correctement rebouchés, les applicateurs, munis de cartouches d'ATB sont conservés à $+4^\circ\text{C}$,
- l. tout disque mouillé, ou ayant été directement au contact de la glace ou bien encore conservé à température ambiante ne devrait pas être utilisé,

- m. les cartouches doivent être retirées du congélateur une à deux heures avant leur utilisation.

III.2.5 Souches de référence :

- Dés leur réception, les souches de référence doivent être isolées dans un milieu adéquat, une gélose nutritive ordinaire suffit pour les bactéries non exigeantes.
- n. A partir de cette culture, faire douze congélations a -70°C ,
- o. Chaque mois, sortir un tube de congélation de chaque souche qui sera testée,
- p. Gratter la souche à l'aide d'un écouvillon sans la décongeler,
- q. Refaire douze congélations pour l'année suivante à partir du douzième tube de conservation.

Objet de l'étude :

Toutes les bactéries peuvent développer des résistances aux ATB, ce qui impose pratiquement le recours à l'antibiogramme. Pour la bactérie *Escherichia coli*, qui fait l'objet de notre étude, nous avons fait recours à cette étape qui est nécessaire pour définir la stratégie de la thérapie et le choix de l'ATB.

I. Matériel et méthode :

I.1 Matériel :

Matériel biologique :

♦ **Période :**

Décembre 2005 jusqu'à Avril 2006.

♦ **Nature :**

Les analyses bactériologiques pratiquées au laboratoire sont effectuées sur divers prélèvements à partir d'organes de reproducteurs ponte (foie, cœur, et rate) à différents âges d'élevage.

♦ **Origine :**

Les échantillons sont prélevés au niveau de l'unité MITAVIC (SOUMÂA).

♦ **Nombre :**

Les prélèvements ont été effectués et réalisés au laboratoire de D.B.K (W. Tizi-ouzou).

Les souches *Escherichia coli* ayant servi à notre étude ont été isolées à partir d'organes des reproductrices ponte à différents âges d'élevage.

Cinquante prélèvements ont été effectués à partir d'organes de volaille, dont 17 sont contaminés par *Escherichia coli* :

- douze souches de *Escherichia coli* ont été isolées à partir du foie,
- trois souches de *Escherichia coli* ont été isolées à partir de la rate,
- deux souches de *Escherichia coli* ont été isolées à partir du cœur,

Tableau N°5 : les prélèvements effectués.

Nombre de prélèvements effectués	Organe à partir duquel le germe a été isolé	Résultats positifs	Résultats négatifs
30	Foie	12	18
12	Cœur	2	10
8	Rate	3	5

Matériel non biologique :

- ◆ **Milieu de culture :** (voir annexe)

Tous les milieux sont fabriqués par l'institut Pasteur d'Algérie (IPA).

- ◆ **Réactifs et solutions :** (voir annexe)

- ◆ **Verrerie et appareillage :** (voir annexe)

- ◆ **Les antibiotiques :**

Nous avons utilisé des disques de 6 mm de diamètre imbibés d'antibiotique à des concentrations connues, livrés par l'institut Pasteur de Paris.

Les antibiotiques que nous avons testés sur les souches d'*Eschérichia coli* isolées au niveau du laboratoire de DBK sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau N°6: Famille des antibiotiques testés à DBK

Famille	Antibiotique	Sigle	présentation
Bêta - lactamines	Ampicilline	AM	10 Ug
Aminosides	Néomycine	N	30 Ug
Polypeptides	Colistine	Cs	10 Ug
Sulfamides	Triméthoprim Sulfaméthoxasole	SXT	1.25/23.75 Ug
Tétracyclines	Tétracycline	TE	30 Ug
Quinolones	Fluméquine	UB	30 Ug
	Enrofloxacin	ENR	5 Ug

I.2 Méthodes :

I.2.1 Autopsie :

La qualité des résultats des examens bactériologiques effectués par le laboratoire dépend étroitement de la qualité du prélèvement. Le choix du prélèvement sera effectué selon la maladie suspectée.

◆ Confection du prélèvement :

- Sur animal moribond ou très rapidement après sa mort.
- Avant tout traitement.
- Prés de la flamme du bec bunsen.
- Avec du matériel stérile.

◆ Protocole de prélèvement :

Il est souhaitable de fournir en vue d'un examen au laboratoire cinq volailles vivantes. Les animaux sont sacrifiés, puis placés en position dorsale sur un grand plateau :

- désinfection des plumes à l'aide d'une solution aqueuse désinfectante,
- incision cutanée médiane,
- on écarte latéralement les membres postérieurs jusqu'à désarticulation des hanches de l'animal déposé en décubitus dorsal,
- incision de la peau du cou sur toute la ligne médiane d'un centimètre au dessous du cloaque jusqu'à l'arrière du bec et détacher ensuite la peau de cou de façon à découvrir la paroi abdominale,
- sectionner la paroi abdominale un peu au dessus du cloaque à l'aide de ciseau jusqu'aux côtés,
- ouverture du cadavre et éviscération.

I.2.2 Bactériologie :

I.2.2.1 Isolement et identification des bactéries :

I.2.2.1.1 Isolement : préparation de l'échantillon.

- **Prélèvement :**

- **Organe :**

Après autopsie, les organes sont mis dans les boîtes de Pétri stériles [intestin, vésicule biliaire, foie, grappe ovarienne (poule pondeuse)].

- **Broyage :**

Les organes prélevés seront découpés en petit morceaux à l'aide d'une paire de ciseaux et une pince stérile.

Les organes prélevés (foie, cœur et rate)

- **Pré - enrichissement :**

Près du bec bunsen, mettre l'organe broyé (cœur, cœur ou rate) dans un tube contenant l'eau physiologique ou du bouillon B. H. I. B.

- **Ensemencement :**

A partir de chaque tube de pré enrichissement, on prélève une goutte à l'aide d'une anse de platine stérilisée que l'on ensemence sur gélose Mac Conkey et B. C. P pour la recherche de Escherichia coli

Remarque :

La gélose Mac Conkey est un milieu sélectif pour la recherche des Salmonelles Schigella ainsi que les bactéries coliformes dans l'eau.

Escherichia coli apparaît rouge avec un halo trouble.

La gélose B.C.P est spécifique pour les entérobactéries lactose (+). Les colonies jaunâtres représentent des Escherichia coli.

- **Incubation :**

Incuber les boîtes de Pétri pendant vingt quatre heures à 37°C à l'étuve.

I.2.2.1.2 Identification :

a- Examen bactérioscopique :

En sélectionnant une à deux colonies de chaque boîte de Pétri pour chaque colonie ayant les caractéristiques suivantes :

- bien isolée,
- identique.

*** Etat frais :**

Principe :

Consiste à examiner les bactéries à l'état vivant en l'absence de toute fixation ou coloration.

But :

L'examen microscopique à l'état frais a pour but d'observer les bactéries à l'état vivant, d'étudier leur morphologie, leur mode de groupement et leur mobilité, il permet aussi l'estimation quantitative du nombre des cellules dans un champ microscopique.

Technique :

Le matériel à examiner sera prélevé à partir d'un milieu de culture liquide ou solide ou même à partir d'un produit pathologique naturel.

Prélèvement et préparation des frottis :

- prélèvement à partir d'un milieu liquide :

Sur la partie centrale d'une lame de microscope propre, déposer une gouttelette de la suspension de culture au moyen d'une pipette pasteur stérile ou d'une anse de platine, l'anse doit être stérilisée par flambage à la flamme d'un bec Bunsen puis refroidie. Déposer sur la goutte une lamelle également propre, qui doit être bien orientée pour éviter la formation des bulles d'air. Examiner au microscope à l'objectif 40.

- prélèvement à partir des cultures sur milieu solide :

Dans ce cas il faut s'adresser, le plus possible, à des cultures jeunes.

Comme précédemment, choisir une lame porte-objet, déposer au centre une goutte d'eau distillée ou d'eau physiologique, dans laquelle, on dissocie un fragment d'une colonie prélevée au fil ou à l'anse de platine préalablement flambée et refroidie.

Lecture :

Bacilles Gram négatifs, mobiles, non capsulés et non sporulés.

*** Coloration de Gram :**

Principe :

Les germes sont colorés en bleu violet avec le cristal violet phéniqué. Après l'action d'un mordant (solution lugöl), une décoloration à l'acétone - alcool est tentée. La safranine ou la fuschine basique agissent ensuite comme colorants de contraste.

But :

La coloration de gram permet de classer les bactéries en « Gram positives » et en « Gram négatives »

Technique :

- préparation et fixation des frottis :

Utiliser des lames propres, pratiquer l'étalement du germe, laisser sécher à l'air, puis fixer à la chaleur (passage rapide au dessus de la flamme) ou à l'alcool.

- coloration :

- couvrir le frottis avec une solution de cristal violet ou de violet de gentiane et laisser en contact trente secondes à une minute,
- rincer rapidement à l'eau pour enlever l'excès de colorant,
- recouvrir de la solution de lugöl et laisser agir pendant environ une minute, puis laver doucement à l'eau,
- décolorer la lame avec le mélange alcool acétone, ensuite rincer soigneusement à l'eau,

- ▶ recolorer le frottis avec la fuschine basique, laisser en contact pendant trente secondes (fuchsine peut être remplacée par la safranine),
- ▶ laver la lame à l'eau, sécher et examiner à l'immersion.

- interprétation :

Les bactéries « Gram positives » sont celles qui après différenciation à l'alcool acétone, restent colorées en bleu, tandis que les bactéries « Gram négatives » prennent la coloration de contraste en rouge par la fuchsine ou la safranine.

Les Eschérichia coli sont « Gram négatives ».



Figure N°20 : Coloration de Gram

b- Etude biochimique :

♦ **Galerie biochimique :**

Elle sert à confirmer les suspicions :

▶ **Préparation de la suspension bactérienne :**

- Mettre dans deux tubes à essai de l'eau physiologique avec l'anse de platine à boucle, on prélève une colonie suspecte de la gélose B.C.P pour chaque organe,
- mettre la colonie dans l'eau physiologique et agiter le tube,
- laisser incuber une heure à 37°C dans l'étuve.

▶ **Préparation de la galerie complète :**

- milieu TSI,
- mannitol mobilité,
- réaction urée – indole,
- citrate de Simmons,
- réaction VP – RM,
- ONPG,
- ODC,
- LDC.

▶ **Etude des enzymes respiratoires :**

○ **Recherche de la catalase :**

Principe :

La catalase est une enzyme du système respiratoire, présente chez les bactéries qui ont un métabolisme oxydatif, elle décompose l'eau oxygénée en eau et en oxygène :



Pratique :

Déposer une goutte d'eau oxygénée à dix volumes sur une lame porte objet, prélever un fragment de la colonie à examiner et l'émulsionner avec une goutte d'eau oxygénée.

La présence d'une catalase se manifeste par une production de bulles dans la goutte d' H_2O_2 .

Eschérichia coli est catalase négative.

○ **Recherche de l'oxydase :**

Principe :

Cette enzyme catalyse la formation d'indole phényle qui s'oxyde rapidement au contact de l'air en donnant une coloration violette.

Pratique :

La mise en évidence se fait en mettant un disque oxydase « OX » dans un tube contenant 0.5ml de culture. L'apparition de la couleur violette témoigne de la présence de l'oxydase.

Eschérichia coli est oxydase négative.

○ **Recherche des nitrates réductases :**

Principe :

Sous l'action d'une nitrate réductase synthétisée par certaines bactéries, les nitrates sont réduites en nitrites mises en évidence par le réactif de GRIESS qui donne une coloration rouge.

Le réactif de GRIESS comprend deux réactifs :

- réactif A : acide sulfanilique, 0.8g.
Acide acétique 5N, 100ml.
- réactif B : alphanaphtylamine, 0.6g.
Acide acétique 5N, 100ml.

Milieu de culture :

Pour le test des nitrites, utiliser soit de la gélose nutritive ordinaire, soit du bouillon nutritif dans lesquels ajouter du nitrate de potassium à raison de 1g/l. Le pH du milieu est ajusté à 7 – 7.2. La stérilisation se fait à l'autoclave à 120°C pendant vingt minutes.

Si on utilise de la gélose, la répartition du milieu se fait dans des tubes à raison de 5ml par tube, qui sera solidifiée en position inclinée.

Technique :

- ensemencer les bactéries à étudier dans le milieu,
- incuber à l'étuve à 37°C durant vingt quatre heures,
- après incubation, déposer à la surface du milieu nitraté trois gouttes des réactifs A et B.

Lecture :

- l'apparition de coloration rouge signifie une réduction des nitrates en nitrites,
- l'absence de coloration rouge indique une réaction négative.

Eschérichia coli est nitrate positive .

Remarque :

Il est conseillé d'utiliser un tube témoin c'est-à-dire un tube de milieu non inoculé dans lequel on ajoute trois gouttes des réactifs A et B.

■ **Etude des substances énergétiques :**

♦ **Le milieu « gélose glucosée lactosée saccharosée au citrate de fer » (TSI) :**

C'est le milieu typique pour l'étude de la dégradation des glucides, il est utilisé pour identifier en analyse de routine les bactéries pathogènes Gram - négatives dans les fécès et les autres produits. Ce milieu a été prévu à l'origine par SULKIN et WILLETT (1940) pour la différenciation des bactéries intestinales gram - négatives.

La composition de ce milieu correspond à une modification de HAJNA (1945) et équivaut à la gélose glucosée - lactosée au citrate de fer selon KLIGLER et contient cependant en plus 1% de saccharose.

Cette addition de saccharose permet la détermination des Proteus, Hafnia, providencia et autres bactéries qui ne décomposent pas le lactose et permet également la séparation de ces mêmes germes lors de la recherche des salmonelles.

• **Mode d'action :**

La dégradation des sucres avec formation d'acides est révélée par virage du rouge orangé au jaune de l'indicateur, une alcalisation se traduit par une coloration foncée.

Le thiosulfate est réduit par quelques germes en hydrogène sulfuré, qui réagit avec les sels ferriques en donnant du sulfure de fer noir.

La dégradation du glucose en acide se produit seulement en couche profonde en provoquant le virage coloré, car par suite de la faible concentration en glucose, les petites quantités d'acides se volatilisent rapidement sur le plan incliné. Par contre le lactose et le saccharose, qui existent en fortes concentrations sont dégradés et provoquent le virage au jaune, aussi bien dans l'épaisseur de la couche que sur le plan incliné.

La formation des cavités (bulles) et le boursoufflement du milieu doivent être considérés comme le signe d'une formation de gaz à la suite de la dégradation des sucres.

• **Technique :**

A l'aide d'un fil de platine ou de pipette Pasteur, prélever un fragment d'une colonie bien isolée d'*Escherichia coli*, repiquer en strie centrale sur la surface et en piqûre profonde dans le culot du milieu (TSI). Placer le tube à l'étuve à 37°C durant vingt quatre heures au maximum.

Escherichia coli est glucose positif.

Tableau N°7 : Interprétation des résultats du milieu « TSI »

Réaction	Interprétation
Utilisation du lactose et du saccharose ou de l'un ou de l'autre	Réaction positive : pente jaune Réaction négative : la teinte rouge s'intensifie
Utilisation du glucose	Réaction positive : culot jaune avec ou sans formation de gaz Réaction négative : aucun changement du culot
Production d' H ₂ S	Réaction positive : noircissement du culot qui s'étend parfois jusqu'à la pente Réaction négative : aucun noircissement
Formation de gaz	Réaction positive : formation de poches de gaz dans le milieu. Réaction négative : absence de poches de gaz

♦ **Test mannitol mobilité :**

Ensemencer le milieu mannitol mobilité par piqûre centrale puis incubé vingt quatre heures à 35°C.

L'utilisation du mannitol acidifie le milieu respectif et le fait virer au jaune. Les germes immobiles ne se développent que le long de la piqûre centrale, par contre les germes mobiles diffusent parfaitement dans le milieu.

Escherichia coli est mannitol positif.

♦ **Test au citrate de Simmons :**

Le milieu de culture utilisé pour ce test est le citrate de Simmons.

• **Principe :**

L'utilisation du citrate comme seule source de carbone entraîne une alcalinisation du milieu de culture qui est révélée par un virage au bleu foncé de l'indicateur de pH, le bleu de Bromothymol.

• **Technique :**

Le milieu citrate de Simmons qui se trouve en position inclinée dans un tube à essai, doit être ensemencé à partir d'une culture prélevée sur milieu gélosé.

NB : il ne faut pas se servir d'une culture en bouillon qui apporterait avec les bactéries des éléments nutritifs susceptibles de fausser les résultats.

- ensemencer le milieu par stries centrales en surface,
- incuber à l'étuve à 37°C pendant un à dix jours en observant les résultats chaque jour,
- l'apparition d'une coloration bleue démontre l'utilisation du citrate (citrate+)
- si le milieu ne change pas de couleur, ça veut dire que le citrate n'a pas été utilisé (citrate-).

Eschérichia coli est citrate négative.

■ **Etude des réactions cataboliques :**

-**Métabolisme des glucides :**

• **Recherche de la bêta galactosidase :**

• **Principe :**

Les bactéries en culture sur milieu nutritif incliné sont mises en suspension et additionnées d'une solution d'ONPG (orthonitrophénil - galactopiranoside).

En présence de Bêta Galactosidase, l'ONPG est hydrolysé en orthonitrophénol de coloration jaune et en galactose.

• **Technique :**

- couler dans un tube à hémolyse 0.25ml d'eau physiologique stérile,
- prélever une öse de culture de germes à étudier à partir d'un tube de gélose nutritive inclinée et l'émulsionner dans les 0.25ml d'eau physiologique,
- Introduire dans le tube à hémolyse un disque d'ONPG et incubé à 37°C.

• **Lecture :**

Une réaction positive se manifeste par l'apparition d'une couleur jaune due à la libération de nitrophénol, la coloration apparaît généralement entre quinze et trente minutes.

Cependant, les tubes présentant une réaction négative seront observés à nouveau au bout de deux heures, trois heures et vingt quatre heures d'incubation.

La recherche de la « Bêta - Galactosidase » apparaît particulièrement intéressante pour l'identification des enterobactériaceae.

Eschérichia coli est galactosidase positif.

• **Réaction de Voges – Proskauer**

Elle consiste à la recherche de l'acétone ou de l'acétyl carbinol ou de la réaction de Voges – Proskauer. On a utilisé, ici, le milieu MR-VP Methyl-Red Voges - Proskauer broth (MR-VP- medium).

• **Principe :**

De nombreux microorganismes forment à partir du glucose de l'acétoïne (acétylméthylcarbinol).

La mise en évidence de ce métabolite est réalisée au moyen du réactif de O'Meara (1931) amélioré par Levine et Coll (1934) ou au moyen du réactif du Barrit (1936) ou d'autres réactifs. Pour cela la solution d'acétoïne est oxydée en diacétyl en milieu fortement alcalin. Le diacétyl donne un composé coloré en rouge (réaction de Voges – Proskauer positive) avec la guanidine (O'Meara 1931) contenue dans la créatine ou avec l'alpha – naphthol (Barritt 1936).

• **Technique :**

Ensemencer le bouillon MRVP avec les germes à analyser, qui doivent provenir d'une culture pure (notre germe c'est Escherichia coli) puis incuber à 37°C pendant quarante huit heures,

Réaction de Barritt :

- Après incubation, prélever 2ml du milieu MRVP, ajouter 0.5ml d'une solution d'alpha naphthol (solution à 6% dans l'alcool à 50°) et 1ml d'une solution de soude caustique à 16% dans l'eau distillée,
- agiter énergiquement et laisser reposer durant dix minutes à la température ambiante.
- L'apparition d'une coloration rose ou rouge prédominante à la surface ou généralisée, démontre une réaction positive (VP₊).

Escherichia coli est VP négative.

• **Réaction au rouge de méthyle (RM) :**

Le milieu utilisé est celui de Clarck et Lubs (composition et préparation du milieu, voir annexe pour milieux de culture).

• **Principe :**

Le rouge de méthyle a une zone de virage comprise entre 4.4 à 6. la coloration devient rouge lorsque le pH atteint 4.5.

Le glucose du milieu Clarck et Lubs est fermenté en acides, donnant un pH aux environ de 4.5.

Cette réaction n'est utilisée que pour les germes qui fermentent le glucose : entérobactéries.

Pour que le pH soit inférieur à 4.5, il faut que le germe soit capable de former à partir du glucose, une quantité suffisante d'acides (formique, acétique et propionique) et que ces acides soient suffisamment dissociés, c'est-à-dire à chaîne courte.

acétique et propionique) et que ces acides soient suffisamment dissociés, c'est-à-dire à chaîne courte.

Technique :

- Inoculer le milieu de Clarck et Lubs avec le germe à étudier,
- incubé à l'étuve à 37°C pendant vingt quatre heures,
- ajouter deux gouttes d'une solution de rouge de méthyle dans le tube.
- Coloration rouge : réaction positive (RM₊)
- Coloration jaune : négative (RM₋).

Eschérichia coli est RM positif.

- Métabolisme des protides :

Test de l'indole :

• Principe :

Sous l'action d'une tryptophanase, le tryptophane est transformé au cours de l'incubation en indole qui donne une coloration rouge – rose avec le réactif de Kovacs.

• Technique :

- ensemercer le tube d'eau peptonée avec la souche à étudier,
- incubé à l'étuve à 35°C pendant vingt quatre heures,
- après incubation, ajouter quelques gouttes de réactif de Kovacs (soit environ 0.5ml) jusqu'à la formation d'un anneau en surface,
- agiter légèrement le tube.

• Lecture :

- présence d'indole : apparition d'une couche superficielle de coloration rose – rouge pourpre,
- absence d'indole : le réactif formant la couche superficielle garde sa teinte originelle (couleur jaunâtre).

NB : Le milieu de culture utilisé pour le test de la production d'indole est « l'eau peptonée ». La peptone, qui rentre dans la composition de ce milieu,

♦ **Etude de la dégradation des acides aminés :**

Un grand nombre de microorganismes possède des enzymes capables de dégrader certains acides aminés.

Les acides aminés sont métabolisés par deux voies principales : la désamination et la décarboxylation.

- La désamination est le processus le plus fréquemment rencontré chez les microorganismes, elle conduit à la production d'acide et d'ammoniac.
- La décarboxylation est effectuée par une grande variété de microorganismes, les métabolites obtenus sont souvent des amines volatiles responsables de l'odeur spécifique de putréfaction.

♦ **Recherche des décarboxylases (ornithine décarboxylase ou ODC) :**

Pour l'étude de la décarboxylation on a utilisé le bouillon de Möller (composition et préparation : voir annexe).

• **Technique :**

- préparer trois tubes contenant chacun 3ml du bouillon de Möller et y'ajouter respectivement de la lysine, de l'ornithine et de l'arginine,
- ensemercer chaque tube avec les microorganismes à étudier,
- recouvrir le milieu à l'aide d'une couche d'huile de paraffine stérile (environ 15mm de hauteur),
- incuber à l'étuve à 37°C durant quatre jours.

Lecture :

- réaction positive : coloration violet à pourpre,
- réaction négative : coloration jaune.

NB :

La recherche des décarboxylases est très utile à la classification biochimique de nombreux bacilles à Gram négatif.

Eschérichia coli est ODC positive.

NB :

La recherche des décarboxylases est très utile à la classification biochimique de nombreux bacilles à Gram négatif.

Eschérichia coli est ODC positive.

↳ **Décarboxylation de la lysine ou (LDC) :**

• **Principe :**

La lysine décarboxylase transforme la lysine en une amine primaire : la cadavérine. Le caractère alcalin de la cadavérine augmente le PH de la suspension et fait évoluer l'indicateur coloré du jaune au violet ou pourpre.

• **Milieux de culture :**

Pour la décarboxylation de la lysine, on utilise le milieu à la lysine de Taylor (composition et préparation : voir annexe) ou le milieu de Carlquist.

-Lysine de Taylor :

Technique :

Ensemencer le milieu avec le microorganisme à étudier puis incubé à 37°C durant vingt quatre heures.

Lecture :

- réaction positive : coloration violet à pourpre,
- réaction négative : coloration jaune.

-Milieu de Carlquist :

Technique :

Dans ce cas, la technique est légèrement différente.

- après avoir ensemencé le milieu, incubé à 37°C durant vingt quatre heures,
- ajouter 1ml d'une solution de soude 4N et agiter légèrement,
- ajouter encore 2ml de chloroforme et répéter l'agitation,

Lecture :

- coloration lilas : LDC - positif,
- pas de coloration LDC – négatif.

Eschérichia coli est LDC positif.

Détection de la phénylalanine désaminase :

Principe :

La phénylalanine - désaminase est une enzyme qui transforme le phénylalanine en acide phénylpyruvique, cet acide se combine à l'ion ferrique pour donner une coloration verte.

Composition du milieu de culture : voir annexe.

Préparation et ensemencement :

- dissoudre par chauffage doux et ajuster le pH à 7.2, répartir 5ml environ par tube, mettre à l'autoclave vingt minutes à 120°C, laisser refroidir en position inclinée pour obtenir une longue tranche,
- au moment de l'emploi, ensemencer le milieu avec les germes à étudier, ensuite incuber à 37°C pendant vingt quatre heures,
- après incubation, ajouter sur la gélose quatre à cinq gouttes d'une solution à 10% de chlorure ferrique.

Lecture :

- réaction positive (APP₊) : coloration verte franche,
- réaction négative (APP₋) : absence de coloration verte.

Eschérichia coli est APP positif.

Détection de la tryptophane – désaminase :

Principe :

La désamination oxydative du tryptophane (mise en jeu par la même enzyme que par la phénylalanine : APP) produit l'acide indole – Pyruvique qui donne une coloration brun rouge avec le chlorure ferrique.

Milieu de culture :

On a utilisé le milieu « urée – indole selon Ferguson » (composition du milieu : voir annexe)

Préparation et ensemencement :

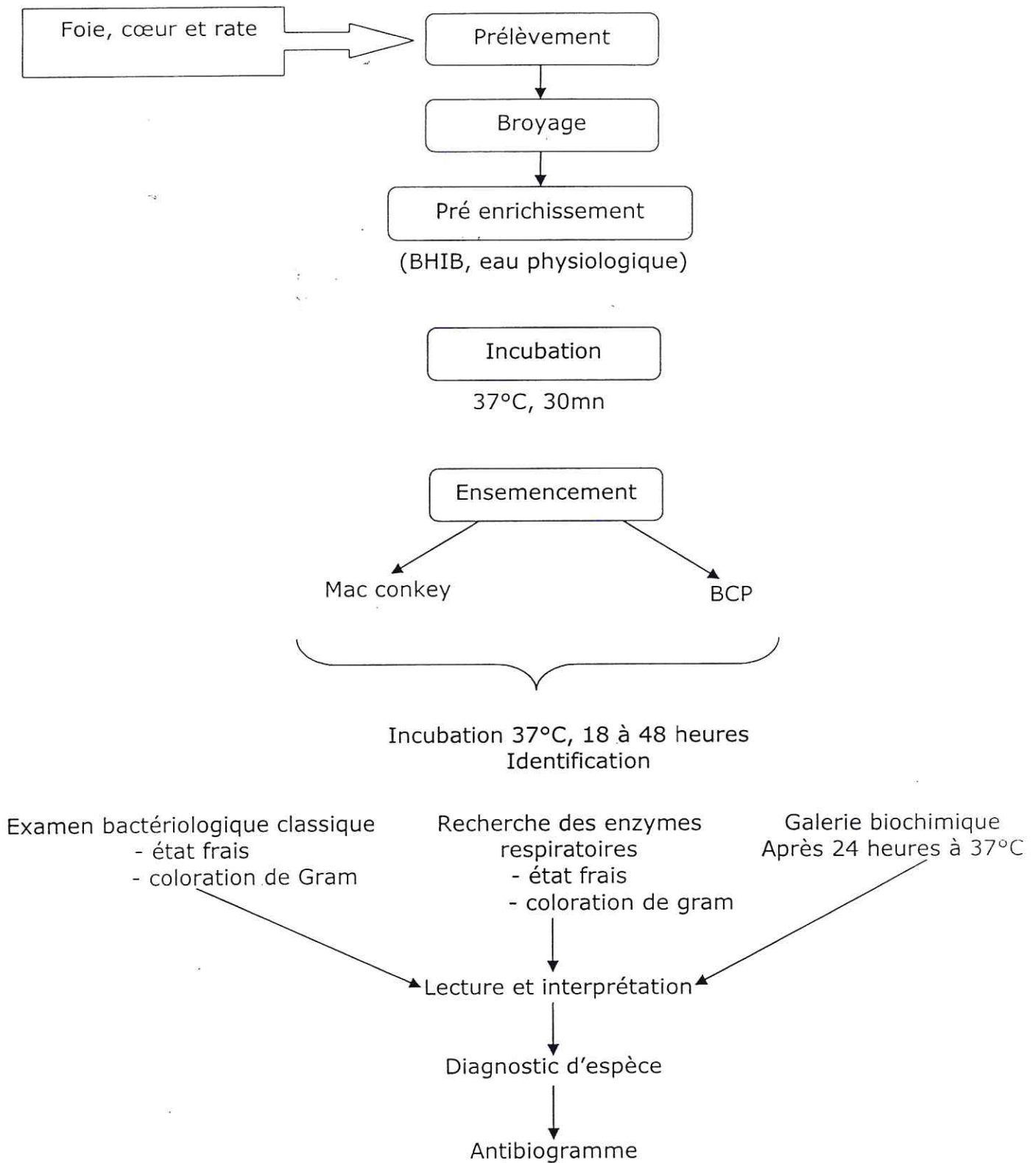
- faire dissoudre tous les ingrédients, puis stériliser par filtration, répartir aseptiquement en petits tubes à raison de 1ml,
- ensemencer le milieu avec les germes à étudier à partir d'une culture solide puis incubé à l'étuve à 37°C pendant deux heures ou plus,
- après incubation, ajouter dans le tube de milieu environ six à sept gouttes d'acide chlorhydrique N/5 et six à sept gouttes d'une solution aqueuse de perchlorure de fer à 10%.

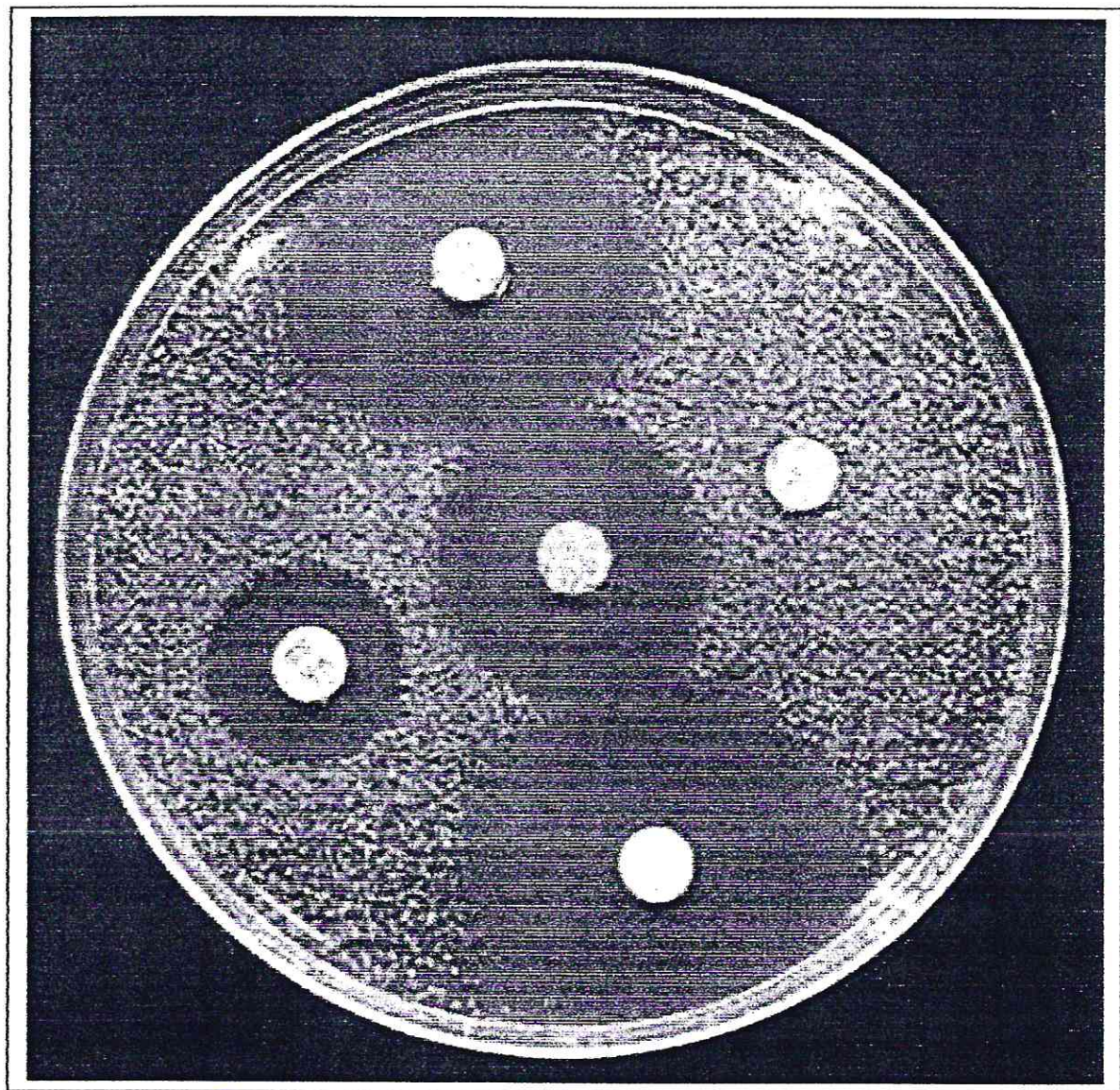
Lecture :

- réaction positive (TDA₊) : coloration brun rouge,
- réaction négative (TDA₋) : absence de coloration brun rouge.

Eschérichia coli est TDA négative.

Figure N°21: méthodologie générale de diagnostic, bactériologique pour les Escherichia coli





**Figure N°22 : Détermination de la sensibilité et la résistance
d'Escherichia coli
« Antibiogramme »**

I.2.3 Antibiogramme :

I.2.3.1 Listes des antibiotiques testés pour *Eschérichia coli* au laboratoire de DBK :

Tableau N°8 : Listes des antibiotiques testés pour *Eschérichia coli* au laboratoire de DBK

Antibiogramme	Abréviation
Ampicilline	AM
Néomycine	N
Colistine	CS
Triméthoprim	SXT
Sulfaméthoxazol	
Tétracycline	TE
Fluméquine	UB
Enrofloxacin	ENR

I.2.3.2 Méthode :

L'antibiogramme peut être obtenu à partir de techniques classiques directes (dilution en gélose ou en milieu liquide) permettant de définir une concentration minimale inhibitrice (CMI) de référence, ou indirecte (diffusion en gélose ou méthode de disque) et plus récemment avec des méthodes automatisées (indirecte ou directe).

La méthode de disque est celle utilisée lors de notre expérimentation. Elle est fondée sur la fiche technique : « antibiogramme Pasteur ».

■ Milieu de culture :

Le milieu de culture Mueller Hinton (gélose - non sélective) est utilisé pour l'étude de la sensibilité ou de la résistance des germes pathogènes envers les antibiotiques.

■ **Composition de la gélose Mueller Hinton :** (voir annexe)

▸ **Composition de la gélose Mueller Hinton :** (voir annexe)

-Préparation de la gélose :

- la gélose en flacons est chauffée (au bain marie), coulée en boîtes de pétri sur une épaisseur de quatre millimètres, puis laissée sécher trente minutes à 37°C avant son emploi,
- les disques d'antibiotiques conformes aux normes OMS sont commercialisés en cartouches de cinquante disques.

- Préparation de l'inoculum :

Après identification et isolement de la bactérie *Escherichia coli*, elle est conservée et mise en culture sur gélose nutritive pour sa croissance (multiplication),

- racler à partir d'une culture pure de dix huit heures sur milieu d'isolement, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques,
- décharger l'anse de platine dans 5 à 10 ml d'eau physiologique à 0.9%,
- bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland ou à une densité optique de (0.08 - 0.10), lecture à 625nm.

L'inoculum peut être ajusté en ajoutant de la culture s'il est trop faible ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

-Ensemencement :

- il doit se faire dans les quinze minutes qui suivent la préparation de l'inoculum,
- tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne,
- l'essorer en le pressant fermement sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée séchée, de haut en bas, en stries serrées,
- Répéter l'opération deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois.

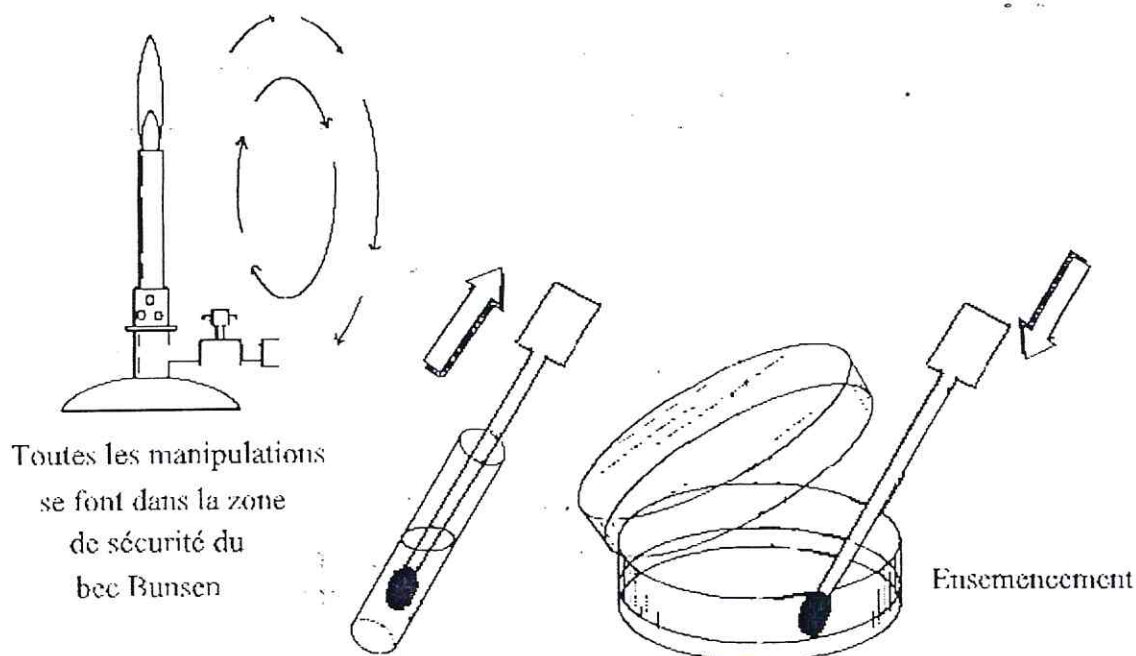


Figure N°23 : Ensemencement

-Application des disques antibiotiques :

- Il ne faut pas mettre plus de six disques d'antibiotiques sur une boîte de 90mm de diamètre,
- placer les antibiotiques dans les distributeurs manuels (cinq antibiotiques),
- mettre le distributeur à l'intérieur de la boîte de pétri, presser d'un coup sec sur le distributeur,
- retirer le distributeur et remettre le couvercle de la boîte pétri,
- laisser incuber à 37°C pendant dix-huit heures.

- Lecture :

- mesurer avec précision le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'intérieur de la boîte,
- comparer ces résultats aux valeurs critiques figurant dans la table de lecture (tableau N°8)
- classer *Escherichia coli* dans l'une des catégories : sensible, intermédiaire ou résistante pour chacun des antibiotiques testés.

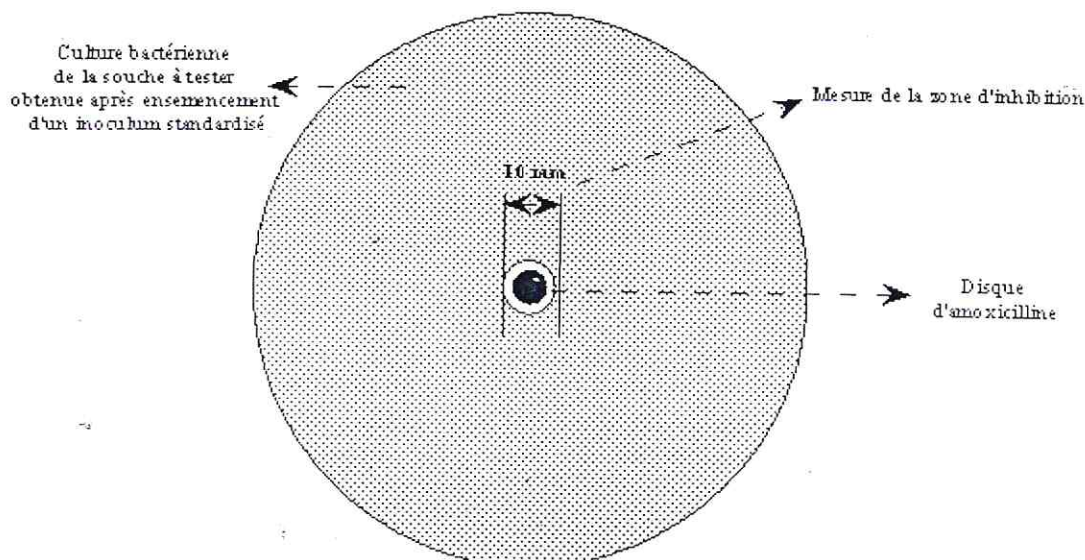


Figure N°24 : principe de mesure

Les catégories :

La zone d'inhibition correspond à :

- une bande brique : souche sensible (S),
- une bande pointillée : souche intermédiaire (I),
- une bande hachurée : souche résistante (R).

- Interprétation :

Une souche sensible est une souche qui peut être atteinte par un traitement à une dose habituelle par voie générale.

Une souche intermédiaire est une souche qui peut être atteinte par un traitement local, ou une augmentation de la dose.

Une souche résistante est une souche qui ne répondra probablement pas, quelque soit le type de traitement.

Tableau N°9 : valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour les **entérobactéries** (espèce aviaire)

Contrôle de qualité : escherichia coli ATCC 25922

Incubation : 35°C, atmosphère ordinaire, dix huit heures

Antibiotiques testés	Charge des disques	résistant	intermédiaire	sensible
		Diamètres critiques (mm)		
B-LACTAMINES				
Ampicilline	10ug	≤13	14-16	≥17
Amoxicilline**	10ug	≤14	- - -	≥21
Amoxicilline+ac.clavulanique***	20/10ug	≤13	14-17	≥18
Ceftiofur***	30ug	≤17	18-20	≥21
AMINOSIDES				
Néomycine	30ug	≤13	14-17	≥18
Gentamicine	10ug	≤12	13-14	≥15
SULFAMIDES				
Trimethoprim/sulfamethoxazole	1.25/23.75ug	≤10	11-15	≥16
TETRACYCLINES				
Tétracycline	30ug	≤14	15-18	≥19
QUINOLONES				
Acide nalidixique	30ug	≤13	14-18	≥19
Fluméquine	30ug	<21	- - -	≥25
Norfloxacine	10ug	≤12	13-16	≥17
Enrofloxacine	5ug	≤16	17-22	≥23
Polypeptides				
Colistine	10ug	- - -	- - -	≥15
Furanes				
Nitrofurantoin	300ug	≤14	15-16	≥17
Phénicolés				
Chloramphénicol	30ug	≤12	13-17	≥18

Tableau N°10 : valeurs limites des diamètres des zones d'inhibition pour les souches de référence utilisées pour le contrôle de qualité

Antibiotiques testés	Diamètres limites (mm)			
	Charge des disques	E.coli ATCC 25922	p.aeruginosa ATCC 27853	s.aureus ATCC 25923
Ampicilline	10ug	16-22	--	27-36
Amoxicilline+ac.clavulanique**	20/10ug	19-25	--	28-36
Acide nalidixique				
Bacitracine**				
Ceftiofur	30ug	26-31	14-18	27-31
Cefalexine**	30ug			
Colistine	10ug	11-15	--	--
Chloramphénicol	30ug	21-27	--	19-26
Erythromycine	15ug	--	--	22-30
Enrofloxacin	5ug	32-40	15-19	27-31
Furanes	300ug	20-25	--	18-22
Fluméquine**				
Gentamicine***	10ug	19-26	16-21	19-27
Néomycine	30ug	17-23	--	18-26
Oxacilline	1ug	--	--	18-24
Pénicilline	10UI	--	--	26-37
Streptomycine**				
Triméthoprime/sulfaméthoxazole	1.25/23.75ug	23-29	--	24-32
Tétracyclines	30ug	18-25	--	24-30
Tilmicosine				
vancomycine	30ug	--	--	17-21

Résultats et interprétation

Tableau N° 11 : Résultats des différents tests biochimiques

Les souches d'Escherichia coli ont toutes été confirmées et présentaient les caractères biochimiques suivants :

Caractères biochimiques	Escherichia coli
Lactose	+
Indole	+
Uréase	-
TDA et phénylalanine désaminase	-
Glucose + gaz	+
Mannitol mobilité	+
Saccharose	-
Citrate de Simmons	-
β galactosidase	+
Catalase	-
Oxydase	-
Nitrate réductase	+
VP	-
RM	+
LDC	+
H ₂ S	-

Tableau N°12 : Résultats du test de contrôle de qualité

Nos tests de contrôle concernant les diamètres des zones d'inhibition obtenus avec les souches de référence accompagnés des normes pour chaque ATB.

NB : nous avons utilisé dans le test de contrôle de qualité uniquement les ATB disponibles au niveau du laboratoire vétérinaire régional de D.B.K.

Escherichia coli ATCC 25922

Valeurs limites des diamètres des zones d'inhibition pour les souches de référence utilisées pour le contrôle de qualité

ATB Test	ampicilline		Amoxicilline+AC clavulanique		Ceftiofur		Colistine		Enrofloxacine		Néomycine		tétracycline	
	R	N	R	N	R	N	R	N	R	N	R	N	R	N
	17	16-22	22	19-25	26	26-31	15	11-15	33	32-40	23	17-23	20	18-25
	21	16-22	20	19-25	27	26-31	14	11-15	31	32-40	21	17-23	20	18-25
	18	16-22	23	19-25	28	26-31	13	11-15	34	32-40	21	17-23	19	18-25

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Test	Ceftiofur		Enrofloxacine	
	R	N	R	N
	15	14-18	17	15-19
	16	14-18	17	15-19
	14	14-18	18	15-19

Staphylococcus aureus ATCC25923

ATB Test	Ampicilline		Amoxicilline+AC clavulanique		Ceftiofur		Tétracycline		Vancomycine	
	R (mm)	N (mm)	R	N	R	N	R	N	R	N
	35	27-35	29	28-36	28	27-31	29	24-30	17	17-21
	34	27-35	28	28-36	29	27-31	30	24-30	22	17-21
	32	27-35	35	28-36	27	27-31	25	24-30	20	17-21

R : Résultat (mm)

N : Norme (mm)

Conclusion du test de contrôle de qualité :

Nos tests de contrôle ont été positifs, car les résultats de la majorité des diamètres des zones d'inhibition pour les trois souches de référence ont été inclus dans l'intervalle de valeurs critiques (normes) avec une tolérance d'une ou deux valeurs en dehors des valeurs critiques définies pour la souche et l'ATB.

Le fait que les résultats obtenus correspondent aux valeurs limites des diamètres des zones d'inhibition pour les souches utilisées pour notre contrôle de qualité prouve que :

- la précision et la fiabilité de la technique des tests de sensibilité est correcte,
- la performance des réactifs utilisés est adéquate,
- la performance du personnel qui effectue les tests et la lecture est bonne.

Tableau N°13 : Résultats des diamètres des zones d'inhibition (en mm).

	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄	E ₅	E ₆	E ₇	E ₈	E ₉	E ₁₀	E ₁₁	E ₁₂	E ₁₃	E ₁₄	E ₁₅	E ₁₆	E ₁₇
Ampicilline	13	10	10	13	13	13	13	12	15	15	10	12	10	10	13	11	12
Enrofloxacin	17	20	22	22	22	22	21	21	18	21	18	20	20	24	23	20	20
Colistine	17	18	16	16	17	18	18	15	15	15	15	16	16	19	17	16	15
Flumequine (UB)	20	19	20	20	20	18	17	18	15	20	17	25	27	20	19	19	25
Triméthoprim sulfaméthoxazol SXT	16	13	17	18	18	17	17	16	19	20	16	16	20	18	20	16	19
Tétracycline	13	12	10	10	16	13	7	10	12	11	13	17	10	10	11	11	12
Néomycine	19	18	18	19	22	15	20	19	22	26	19	24	23	19	20	22	18

Résultats des antibiogrammes :

Tableau N° 14 : Résistance de Eschérichia coli aux ATB

	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄	E ₅	E ₆	E ₇	E ₈	E ₉	E ₁₀	E ₁₁	E ₁₂	E ₁₃	E ₁₄	E ₁₅	E ₁₆	E ₁₇
Ampicilline	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	R	R	R	R
Enrofloxacin	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	S	S	I	I
Colistine	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Flumequine (UB)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S
Triméthoprime sulfaméthoxazole SXT	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Tétracycline	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R
Néomycine	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

R : résistante,
S : sensible,
I : intermédiaire.

Tableau N°15 : pourcentage de résistance et de sensibilité de *Escherichia coli* isolées chez la reproductrice ponte.

Les antibiotiques	Résistante		Intermédiaire		Sensible	
	Nombre de souche	%	Nombre de souche	%	Nombre de souche	%
Ampicilline	15	88.24	2	11.76	0	0
Enrofloxacin	0	0	15	88.24	2	11.76
Colistine	0	0	0	0	17	100
Fluméquine	14	82.35	0	0	3	17.65
Triméthoprime+Sulfaméthoxasole	0	0	1	5.88	16	94.12
Tétracycline	15	88.24	2	11.76	0	0
Néomycine	0	0	1	5.88	16	94.12

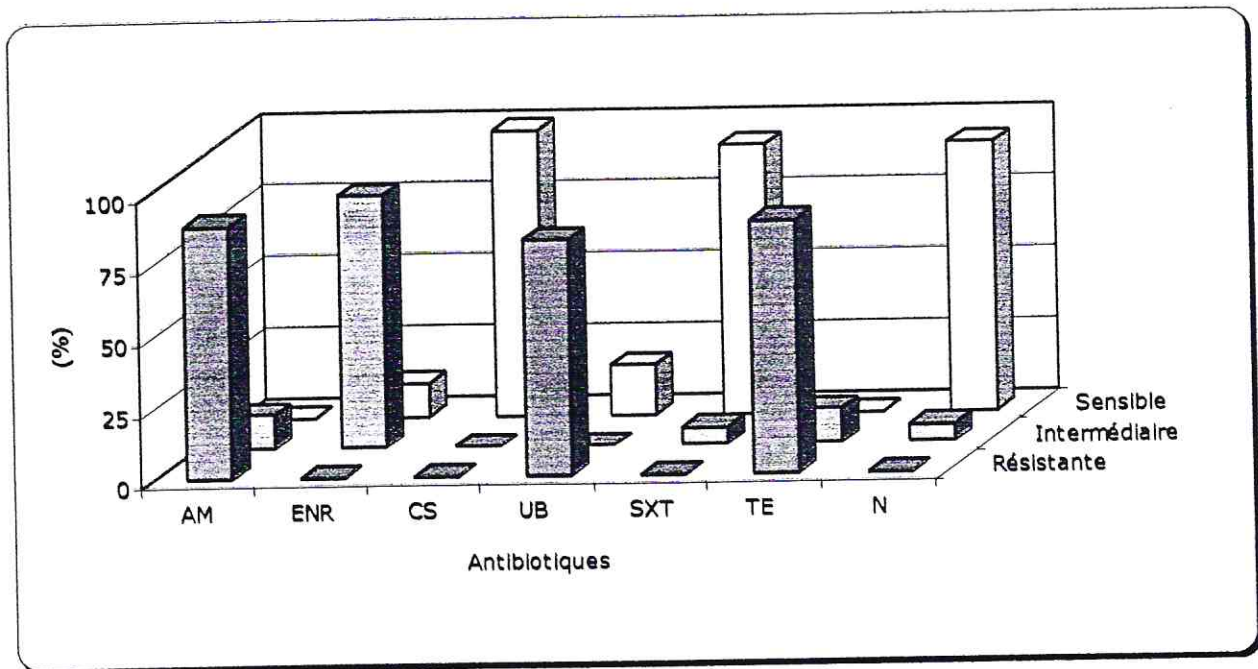


Figure N°25 : Histogramme représentant le pourcentage de sensibilité et de résistance de *Escherichia coli* aux ATB chez la reproductrice ponte.

Effet des antibiotiques testés :

L'identification des souches d'Eschérichia coli isolées chez les reproductrices pontes a été fondée sur des caractères bactériologiques classiques (fermentation des sucres, production d'indole, présence d'enzymes...) qui ont été recherchés après culture en aérobiose.

Le nombre de souches résistantes, sensibles ainsi que les résistantes intermédiaires sont représentées respectivement dans le tableau N°14.

Commentaire et résultats des antibiogrammes :

▸ **L'ampicilline** est non active sur toutes les souches à l'exception des souches E₉ et E₁₀ qui ont manifesté une résistance intermédiaire.

▸ **L'enrofloxacin**e à un effet intermédiaire sur toutes les souches d'Escherichia coli à l'exception des souches E₁₄ et E₁₅ qui ont manifesté une sensibilité.

▸ **La colistine** est active sur toutes les souches d'Eschérichia coli (E₁...E₁₇).

▸ **La fluméquine** est non active sur toutes les souches à l'exception des souches E₁₂, E₁₃ et E₁₇ qui ont manifesté une sensibilité.

▸ **La triméthoprime** et **la sulfaméthoxazole** sont actives sur toutes les souches d'Eschérichia coli à l'exception de la souche E₂, qui a manifesté une résistance intermédiaire.

▸ **La tétracycline** est non active sur toutes les souches d'Eschérichia coli à l'exception des souches E₅ et E₁₂ qui ont manifesté une résistance intermédiaire.

▸ **La néomycine** est active sur toutes les souches à l'exception de la souche E₆ qui a manifesté une résistance intermédiaire.

Le taux de résistance et de sensibilité exprimé en pourcentage (%) des isolats d'*Escherichia coli* chez la reproductrice ponte est représenté dans le tableau N°15 et par une représentation graphique sous forme d'histogramme dans la figure N°25.

Pour l'ampicilline et la tétracycline une résistance de 88,24% est enregistrée, en ce qui concerne la fluméquine les résultats indiquent une résistance de 82,35% et enfin l'enrofloxacin a un effet intermédiaire avec un taux de 88.24%.

Pour la colistine, toutes les souches isolées ont manifesté une sensibilité de 100%, par contre pour la triméthoprime -sulfaméthoxazole et la néomycine elles ont manifesté une sensibilité de 94.12%.

L'histogramme représenté sur la figure N°25 nous montre que parmi les antibiotiques testés vis-à-vis d'*Escherichia coli*, la tétracycline a révélé la résistance la plus élevée (88.24%), la néomycine une très haute sensibilité (94,12%) et enfin l'enrofloxacin avec une résistance intermédiaire la plus significative (88.24%).

Analyse :

Nous savons que dans la majorité des cas pendant la période d'élevage, les éleveurs de volailles administrent les antibiotiques sans prescription médicale aux oiseaux dans l'aliment ou l'eau de boisson.

L'utilisation intensive et répétée des antibiotiques dans l'alimentation comme facteur de croissance, dans la prévention et la thérapeutique contribue à la sélection des germes résistants dans l'espèce aviaire.

Cette situation nous a motivé à faire une étude sur la résistance de quelques antibiotiques mis à notre disposition par le laboratoire vétérinaire régionale de Draa-Ben khedda (L. V. R. de D. B. K) vis-à-vis des germes d'*Eschérichia coli* isolés à partir des reproductrices pontes.

Notre étude a démontré que la tétracycline et l'ampicilline ont donné une mauvaise activité vis-à-vis d'*Eschérichia coli* avec un taux de résistance de 88.24% et la fluméquine avec un taux de résistance de 82,35%. Ceci est probablement dû à l'utilisation abusive de ces trois antibiotiques à large spectre dans l'élevage avicole.

Un pourcentage plus élevé a été déjà signalé dans une étude effectuée sur soixante souches d'*Eschérichia coli* présentant un taux de résistance de 99% à l'ampicilline (BOUAROUR et AL, 1999).

Les auteurs comme LEROY-SETRIN et AL, ont rapporté un taux de 99% de souches d'*Eschérichia coli* d'origine aviaire résistantes à la tétracycline et de 79% vis-à-vis la fluméquine.

Les taux obtenus dans notre étude sont respectivement de 88.24% et de 82.35% (résultats obtenus proches de ceux des auteurs cités ci-dessus).

Les souches d'*Escherichia coli* isolées à partir des reproductrices pontes ont montrée une résistance assez élevée vis-à-vis de ces trois antibiotiques testés (tétracycline, ampicilline et fluméquine).

Nous pouvons en déduire que l'usage abusif et fréquent de ces antibiotiques a favorisé la pression de sélection et la présence de germes

résistants, ou bien le non respect des règles de l'antibiothérapie qui pour conséquence les échecs thérapeutiques.

Notre étude a montré aussi la bonne activité de la colistine (100% sensible à *Eschérichia coli*).

Conclusion :

Connaître les antibiotiques pour mieux les utiliser : mieux nous connaissons les supports génétiques et les mécanismes biochimiques, mieux nous serons à même de prévoir le développements de la résistance, avec création de réseaux nationaux de surveillance pour les espèces bactériennes pathogènes pour l'homme et les animaux, selon les recommandations de l'OMS (standardisation de l'antibiogramme en médecine vétérinaire à l'échelle nationale établie par les ministères de l'agriculture et de la santé, voir 3^{ème} édition 2005), il n'est pas question de cesser d'utiliser les antibiotiques. Il est néanmoins évident que le fait d'en rationaliser l'usage, non seulement en thérapeutique vétérinaire mais également humaine, va entraîner une diminution de la pression sélective.

Le bon usage des antibiotiques relève donc d'une politique cohérente de la thérapeutique et de l'usage des antibiotiques en tant qu'accélérateur de croissance chez l'animal.

Bibliographie

- [1] : AVRIL. J.L, DABERNAT. H, DENIS. F, MONTAIL.H. 2000
Bactériologie clinique, p:175-181
- [2] : AZELE Ferron ,1984
Bactériologie médicale à l'usage des étudiants en médecine, p:121-129.
- [3] : BERGOGNE.E, BEREZIN, BROGARD J.M 1999
« Base biologique de l'antibiothérapie » Edition MASSONI.P , p:20-41,
275-283
- [4] : BIESTER H.E et SCHWARTE, 1959
Diseases of poultry, 4^{ème} édition, p:354-375.
- [5] : bilan moral exercice 2005.p:7, 9, 11,12
- [6] : BORNE P.M, 1998
Les colibacilloses avicoles : des bactéries toujours à l'affect : Afrique
agriculture n° 259, p:83
- [7] : BRIAND NON MICHEL, 1991.
« Mécanismes moléculaires de la bactéricide Rifampicine »
« Mécanismes moléculaires de la bactéricide Tétracycline »
- [8] : BRYSKIER, 1999
Antibiotique, agents antibactériens et antifongiques : édition ellipses.
- [9] BRUGERE-PICOUX.J et AMER Silim, 1992
Manuel de pathologie aviaire, p:237-239
- [10] : COURVALIN. P, PHILIPPON.A, 1990.
« Mécanismes biochimiques de la résistance bactérienne aux agents
antibactériens »
Bactériologie médicale 2^{ème} édition FLAMARION, p : 332-351
- [11] : EUZEBY J.P, 2003
Dictionnaire de bactériologie.
- [12] : FONTAINE. M
VADE MECUM du vétérinaire XV^{ème} édition, volume 1, p:107-109
- [13] : FONTAINE.M et CADORE J.N, 1995.
VADE MECUM du vétérinaire 16^{ème} édition, Paris, p:107-203
- [14] : FORT DODJE, 1999
Santé animale. Filière avicole n° 615, p:18

- [15] : GAYRAL J.P, Septembre 1997.
« Détecter les résistances » Bio Futur n° 170, p :24-26
- [16] : GOATER (E), 1999.
« Moins d'antibiotiques utilisés plus de résistance » filière avicole,p :60.
- [17] : Institut Pasteur de Paris, 1987
Milieux et réactifs de laboratoire Pasteur, 3^{ème} édition.
- [18] : JOLY. Bernard et Alain Reynaud, 2003
Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic, p :3-8 et 27-38
- [19] : KEZZAL. K, 1993.
Les antibiotiques : classification, résistance, action.
Laboratoire de microbiologie.
- [20] : LAFONT (J.P) ,1973
Hygiène des couvoirs et contamination microbienne des poussins à la naissance, p : 7-8.
- [21] : LAFONT (J.P) ,1975
La colibacillose : sixième coloquaire accoureur, p : 1-7
- [22] : LARPENT (J.P), LARPENT (M) : GOURGAUD, 1985
Éléments de microbiologie, p : 232.
- [23] : LARPENT et SANGLIER, 1989.
Biotechnologie des ATB : édition MASSON : PARIS 5, p : 5-17.
- [24] : LECHAT, 1973.
Abrégé de pharmacologie médicale, édition MASSON et Cie PARIS.
- [25] : LECLERC Henri, 1969
Microbiologie tome 1, p :240-249.
- [26] : Léon LE MINOR, 1972.
Le diagnostic de labo des bacilles à gram négatif : entérobactéries
TOME1, 4^{ème} édition, p :87-92.
- [27] : Léon LE MINOR, Michel VERON, 1989.
Bactériologie médicale chapitre II
- [28] : LESBOURYIES (G), 1965.
Pathologie des oiseaux de basse cour,Vigot éditeurs,p :159-162.
- [29] : OMS, 2005
Standardisation de l'antibiogramme en médecine vétérinaire à l'échelle Nationale, 3^{ème} édition,p :47-50,72 et 82.

- [30] : PILET. C, J. L BORDON, B.TOMA, N. MARCHAL, C. BALBASTRE, 1979,
2^{ème} édition.
Bactériologie médicale et vétérinaire, systématique bactérienne,p :81-
90. et 108-11
- [31] : RAHAL. K, LIASSINE. N, RECHAL, 1999.
Relevé épidémiologique mensuel (R. E. M)
Institut national de la santé publique Volume II n°8, p :48-49
- [32] : Rapport annuel du fonctionnement de l'institut Pasteur d'Algérie, 1979-
1989 : service de microbiologie et épizootologie.
- [33] : ROUVEIX. B, 1990
« Médicaments en pathologie infectieuse »
Édition MASSON. p : 5-7 et 78.
- [34] : RUCKEBUSCH, 1981.
Physiologie, pharmacologie, thérapeutique à Alès MALOINE. SA 2^{ème}
édition PARIS
- [35] : SANSETTI P. J (2000)
Facteurs de pathogénicité d'Esherichia coli,p :22-24 et 28.
- [36] : SINGLETON.P, SAINSBURY.D, 1984.
Abrégé de bactériologie ed Doin éditeurs,p :230.
- [37] : STORDEUR. P, MAINIL. J, 2002
la colibacillose aviaire,p :11-18.
- [38] : VILLATE. D, 2001
Maladies des volailles 2^{ème} édition, p :237-242.
- [39] : VILLEMIN Marital 3^{ème} édition
Dictionnaire des termes vétérinaires et zootechniques.
- [40] : WILLIAMS (R. H), WARNER. P 1980
Infect - Immun,p :29 et 411-416.
- [41] : Yah, 1997.
Antibiotique spécifique adapté,p :93.

ANNEXES

I. Verrerie et appareillage :

- ◆ Réfrigérateur.
- ◆ Etuve à 37°C.
- ◆ Microscope photonique.
- ◆ Hôte (MEMMERT).
- ◆ Bec bensun.
- ◆ Boîtes de pétri stériles.
- ◆ Pipettes Pasteur.
- ◆ Tubes à essai.
- ◆ Ecouillons.
- ◆ Lames et lamelles.
- ◆ Ciseaux.
- ◆ Pincés métalliques.
- ◆ Etalon Mac Farland 0.5.
- ◆ Agitateur.
- ◆ Anse de platine.
- ◆ Bain marie
- ◆ Distributeur de disques antibiotiques.

II. Les milieux solides :

II.1 Gélose nutritive :

La gélose nutritive est un milieu qui convient à la culture des germes ne présentant pas d'exigences particulières.

Formule : (en g/l d'eau distillée)

Peptone.....	5	
Extrait de viande	1	
Extrait de levure	2	PH = 7.4
Chlorure de sodium	5	
Agar.....	15	

Préparation :

- Verser 28 g dans un litre d'eau distillée.
- Porter à ébullition jusqu'à dissociation complète.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °c pendant 15 minutes.

II.2 Gélose Hektoen :

La gélose Hektoen est un milieu utilisé pour l'isolement des entérobactéries. Il permet la différenciation des entérobactéries pathogènes

Formule :(en mg/ l d'eau distillée)

Protéine peptone	12	
Extrait de levure	3	
Chlorure de sodium	5	
Sels biliaires	5	
Thiosulfate de sodium	9	
Citrate de fer ammoniacal.....	1.5	PH = 7.5
Salicine	2	
Lactose	12	
Saccharose	12	
Fuschine acide	0.1	
Bleu de bromothymol.....	0.065	
Agar	14	

Préparation :

- Verser 76 mg de poudre dans un litre d'eau distillée.
- Chauffer légèrement et laisser bouillir quelques secondes.
- Ne pas autoclaver.
- Refroidir à 60 °c et couler en boites de pétri.

II.3 Gélose TSI : (gélose glucose – lactose – saccharose – H₂S) :

La gélose TSI est un milieu d'identification rapide pour les entérobactéries. Ce milieu permet de mettre en évidence la fermentation du glucose (avec ou sans dégagement du gaz) du saccharose et la production d'hydrogène sulfureux (H₂S).

Formule :(en g / l d'eau distillée).

Peptone	20	
Extrait de viande	03	
Extrait de levure	03	
Chlorure de sodium	05	
Citrate ferrique	0.3	
Thiosulfate de sodium	0.3	
Lactose	10	PH =7,4
Saccharose	10	
Glucose	01	
Rouge de phénol	0.5	
Agar	12	

Préparation :

- Verser 60 g de poudre dans un litre d'eau distillée.
- Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète.
- Bien mélanger et répartir en tubes.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °c pendant 15 minutes.
- Incliner les tubes de façon à obtenir un culot de 3 cm de hauteur.

II.4 Milieu mannitol – mobilité :

Ce milieu est utilisé pour la différenciation rapide des entérobactéries. Il permet de rechercher simultanément, la mobilité et l'utilisation du mannitol.

♦ **Formule :** (en g/l d'eau distillée)

Peptone trypsine.....	20
Gélose	4.5
Mannitol	2
Nitrate de potassium	1.5
Rouge de phénol à 1%.....	4 ml
Eau	1000 ml

♦ **Préparation :**

- Mettre 28 g de milieu déshydraté.
- Attendre 5 minutes puis, mélanger jusqu'à obtention d'une suspension homogène.
- Chauffer lentement en agitant fréquemment puis porter à l'ébullition jusqu'à complète dissolution.
- Ajuster si nécessaire le PH à 8.1 à 8.2.
- Repartir en tubes de façon à obtenir un culot de 6 à 7 cm.
- Stériliser à l'autoclave à 120 °c pendant 15 minutes.

II.5 Milieu au citrate de Simmons :

C'est un milieu solide utilisé pour l'identification des bacilles à gram négatif. Il permet de rechercher de l'utilisation du citrate de sodium comme seule source de carbone.

♦ **Formule :** (en g/l d'eau distillée) :

Sulfate de magnésium	0.2
Citrate de sodium	0.2
Chlorure de sodium	0.05
Phosphate d'ammonium monosodique	0.8
Phosphate d'ammonium	0.2
Bleu de Bromotymol	0.08
Agar	15

PH =7

♦ **Préparation :**

- Verser 23 g de poudre dans un litre d'eau distillée.
- Mélanger en agitant fréquemment.
- Chauffer et laisser bouillir pendant une minute.
- Repartir en tubes et stériliser en 121 °c pendant 15 minutes.
- Refroidir en position inclinée pour obtenir une pente longue.

III. Les milieux liquides :

III.1 Bouillon nutritif :

Le bouillon nutritif est un milieu liquide qui permet la croissance des germes, ne présentant pas d'exigences particulières.

♦ **Formule :** (en g/l d'eau distillée)

Peptone	05	
Extrait de viande	01	
Extrait de levure	02	PH =7.4
Chlorure de sodium	05	

♦ **Préparation :**

- Verser 13 g de poudre dans un litre d'eau distillée.
- Bien mélanger et repartir en tubes.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

III.2 Eau peptonnée : exempte d'indole : c'est un milieu liquide qui permet la croissance des germes ne présentant pas d'exigences particulières. Elle est surtout utilisée pour la recherche de la production d'indole.

Formule : (en g/l d'eau distillée) :

Peptone exempte d'indole	10	
Chlorure de sodium	5	PH =7.2

♦ **Préparation :**

- Mettre 15g de milieu déshydraté dans un litre d'eau distillée.
- Mélanger soigneusement jusqu'à complète dissolution.

- Ajuster, si nécessaire, le PH a 7.2.
- Repartir puis stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes.

III.3 Milieu Clark et Lubs :

Ce milieu sert à l'étude de deux réactions :

- Réaction de rouge de méthyle(RM).
- Réaction de Vogé – Proskauer.

Elles sont utilisées en particuliers dans la différenciation des entérobactéries .la réaction VP positive est caractéristique de certaines bactéries lorsqu'il y a présence d'acétyl – méthyl carbinol (acétoine) dans le milieu , ce composé est un produit de dégradation de l'acide pyruvique .

La réaction de RM consiste à une mesure du PH du milieu, en effet, de nombreuses bactéries produisent des composés organiques acides à partir de l'acide pyruvique.

◆ Formule : (en g/l d'eau distillée)

Peptone de white	5	
Glucose	5	ph= 7.5
Phosphate de potassium	5	
Eau distillée	1ml	

◆ Préparation :

- Dissoudre 15 g de poudre dans un litre d'eau distillée.
- Mélanger soigneusement pour obtenir une dissolution complète.
- Ajuster le PH à 7.5 environ.
- Répartir à raison de 10 ml /tube.
- Stériliser à 121 °c pendant 15 minutes.

III.4 Milieu urée- indole :

Ce milieu permet de rechercher l'uréase qui est une urée amidon – hydrolyse :



L'hydrolyse se traduit par une alcalinisation du milieu due à la formation de NH₃.

♦ **Formule :** (en g/l d'eau distillée)

L - tryptophane	0.3
Phosphate monopotassique	0.1
Phosphate dipotassique	0.1
Chlorure de sodium	0.5
Urée	0.2
Alcool à 95 °	1 ml
Rouge de phénol à 1 %	0.25 ml
Eau distillée	1ml

♦ **Préparation :**

- Dissoudre le tryptophane dans l'eau chauffé à 80 °c .
- Ramener à 50 °c et ajouter le reste des ingrédients.
- Après dissolution, stériliser le milieu par filtration stérilisante.
- Répartir en ampoule ou tubes stériles.

III.5 Milieu MOLLER : (bouillon pour l'essai de l'ornithine, lysine, arginine)

♦ **Formule :** (en g/l d'eau distillée)

Peptone spéciale	5
Extrait de viande bœuf.....	5
Pyridoxal	0.005
Solution aqueuse de pourpre de bromocrésol à 1p 500	5 ml
Solution aqueuse de rouge de crésol à 1 p 500	5ml
Glucose	0.5

♦ **Préparation :**

- Dissoudre l'ensemble des ingrédients dans un litre d'eau distillée et ajuster le PH à 6.
- Ajouter 1% de L - lysine, ou L - arginine ou de Ornithine selon la préparation envisagée.
- Réajuster le PH après l'addition des acides aminés.
- Répartir à raison de 3 à 5 ml par tube.
- Stériliser à l'autoclave à 120 °c pendant 10 minutes.

- Un léger précipité peut se former dans les tubes renfermant de l'ornithine, sans perturber les réactions.

III.6 bouillon nitraté :

Le bouillon au nitrate est utilisé pour la recherche d'un nitrate réductase (NR) chez les bactéries (réduction de nitrates en nitrite soit en azote)

◆ Formule : (en g/l d'eau distillée)

Infusion cerveau - cœur	25
Nitrate de potassium	10 PH final= 7,2+/- 0,2
Eau distillée	1000 ml

◆ Préparation :

- Dissoudre complètement 16.5 g de poudre dans un litre d'eau distillée.
- Répartir et stériliser à l'autoclave à 121 °c pendant 15minutes.

III.6 Milieu de Carlquist :

Formule : (en g/l d'eau distillée)

Peptone pancréatique de caseine.....	15
Phosphate dipotassique	2
Glucose	1
Eau distillée	1000 ml

III.7 Milieu pour la recherche de la phénylalanine désaminase :

◆ Formule : (en g/l d'eau distillée)

Peptone.....	10
Phosphate bipotassique	1
Chlorure de sodium	5
Extrait d levures	3
D-L phénylalanine	2
Agar	12
Eau distillée	1000 ml

◆ Préparation :

- Dissoudre par chauffage doux et ajuster le PH à 7.2.
- Répartir 5 ml par tube.
- Autoclaver 20 minutes à 120 °C.
- Laisser refroidir en position inclinée pour obtenir une longue tranche.

◆ **Solutions :**

· l'eau physiologique stérile.

· l'eau distillée stérile.

· l'eau peptonnée.