

*République Algérienne Démocratique et Populaire*

*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*

*Université ABDRAHMANE MIRA de Béjaia*

*Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie*



*Magister en Microbiologie Appliquée*

## *Thème*

*La Ruminococcine A et son rôle antibactérien à l'égard  
de souches multirésistantes isolées des hôpitaux de la  
région de Bejaia*

*Présenté par : M<sup>r</sup> MOKRANI Slimane*

**SOUTENU LE : 2010**

**DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE:**

Mr IGUEROUDA Amokrane	Professeur	Univ. de Bejaia	Président
M <sup>me</sup> SADOON Djamilia	Professeur	Univ. de Bejaia	Rapporteur
M <sup>me</sup> BEDJOU Fatiha	Maitre de conférences A	Univ. de Bejaia	Examinatrice
Mr KECHA Mouloud	Maitre de conférences A	Univ. de Bejaia	Examinateur
M <sup>me</sup> BENACHOUR Karima	Maitre assistante	Univ. de Bejaia	Invitée

**2009/2010**

## REMERCIEMENTS

---

Au terme de ce travail, il m'est particulièrement agréable d'exprimer ma reconnaissance et mes vifs remerciements à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à sa réalisation.

Principalement :

**A ma Directrice de thèse, Le Professeur SADOUN D ;**

Vous m'avez fait l'honneur de conduire ce travail. Grâce à votre accueil, votre disponibilité, vos conseils et votre bienveillance nous sommes arrivés au bout. Trouvez ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

- **A M<sup>r</sup> IGUEROUDA M**, Professeur à l'université de Béjaia, qui a bien voulu présider ce jury. Ses critiques constructives et ses examens minutieux du document me seront d'une grande utilité. Qu'il trouve ici ma considération et mes reconnaissances les plus distingués.

- **M<sup>me</sup> le Docteur BEDJOU F**, Maitre de conférences à l'université de Bejaia, pour nous avoir accordé un peu de son temps pour faire part de ses remarques et suggestions qui ne feront que rehausser la qualité de ce travail. Merci beaucoup M<sup>me</sup> pour la qualité des enseignement que vous m'avez assuré le long de mon cursus universitaire et pour tous les encouragements dont vous m'avez fait part à chacune de nos rencontres.

- **A M<sup>r</sup> le Docteur KECHA M**, Maitre de conférences à l'université de Bejaia, pour l'honneur qu'il nous fait, vos remarques et suggestion ne feront que perfectionner ce modeste travail. Merci beaucoup Monsieur.

- **Mon co-encadreur BENACHOUR K**, Maitre assistante à l'université de Bejaia, dont les remarques et critiques constructives m'ont été d'une grande utilité pour la réalisation de ce travail. Qu'elle soit assurée de ma gratitude et ma reconnaissance les plus respectueuses.

Vous avez accepté d'apprécier ce modeste travail. Nous vous prions de recevoir l'expression de notre sincère reconnaissance.

- **Toute l'équipe de LMA en particulier le laboratoire de Microbiologie du lait et probiotiques M<sup>elle</sup> Bendalli, M<sup>elle</sup> Titeli, M<sup>r</sup> Bendjedou, M<sup>me</sup> Feradji, M<sup>r</sup> Belhadi, Mr SADOUN, ainsi que, M<sup>r</sup> Amrouche, M<sup>r</sup> Mankou, M<sup>me</sup> Garout, M<sup>r</sup> Touati, M<sup>r</sup> Adjaoud.**

- **Mr SAHNOUN, Mr BACHIRBAY et Mr BENSaid**, qui m'ont aidé à réaliser l'analyse statistique de cette étude. Merci beaucoup Messieurs.

- Remerciement particulier à **M<sup>r</sup> Mammas**, personnel du laboratoire d'hygiène de Bejaia pour son aide et sa permanence disponibilité.

- **Tous les enseignants** de l'université de A/Mira de Bejaia, ainsi que tous les enseignants qui ont assuré ma formation tout au long de mon cursus (M<sup>r</sup> KHARBOUCHE et M<sup>me</sup> BAKOUR).
- J'exprime toute ma gratitude à mes amis et collègues de la promotion Magister en Microbiologie appliquée 2008/2009 surtout mon collègue MADI Nassim qui m'a accompagné le long de la réalisation de ce modeste travail.
- Toute ma gratitude va à tout le personnel du laboratoire ISM<sub>2</sub> de ST Jerome à Marseille, qui nous a fournis la Ruminococcine A, sans eux, ce travail n'a pu être réalisé.
- Je tiens également à remercier tout le personnel de l'hôpital d'Amizour.
- Toute ma gratitude va à tout le personnel de l'hôpital Aamriew.
- Toute ma reconnaissance va à M<sup>me</sup> le Docteur Amrane Y, ainsi que son aimable équipe du laboratoire d'anatomie et cytologie pathologique de Béjaia, qu'elle dirige. Pour avoir accepté de m'accueillir au sein de son laboratoire, de m'avoir aidé et encouragé.

*Mille mercis à tous*

## Dédicaces

---

A Dieu tout Puissant, à qui je dois tout, et surtout d'avoir honoré et éclairé mon chemin par le savoir ; mille merci mon Dieu, sans toi je n'aurais jamais existé et je ne serai jamais, et d'avoir fait de moi le petit quelqu'un que je suis.

A mes chers parents, raison de mon existence, dont la réussite était toujours de me voir réussir.

A mes frères Mahmoud ainsi que sa petite famille surtout ses enfants Abderrahman et Ibrahim, mon frère Rida et mes sœurs Hakima, Akila, Fatiha et

Djaouida, vous êtes tous ce que j'ai de plus chers au Monde.

A mon beau frère Kamel et sa fille adorable Meriem.

A toute la famille MOKRANI

A tous mes amis et collègues

A mes professeurs, Pour le savoir qu'ils m'ont transmis

Pour leur générosité et leur confiance

## Liste des abbreviations

**agr:** accessory gene regulator.

**ARN:** Acide ribonucléique.

**ATCC:** American Type Culture Collection.

**ATP:** Adenosinetriphosphate.

**B:** Bacillus.

**B:** Bêta.

**BHI:** Brain heart infusion.

**BLSE:** B-lactamase à spectre élargie.

**BMR:** Bactéries Multi Résistantes.

**BSA:** Bovin Serum Albumin.

**C:** Clostridium.

**CA-SFM:** Comité de l'Antibiogramme de Société Française de Microbiologie.

**CM:** Chopped meat broth culture.

**CNBr:** Cyanogen bromide.

**Cys:** Cysteine.

**Da:** Dalton.

**Dhb:** Didehydrobutyrine.

**E:** Escherichia.

**EC:** Ecart type.

**EMB:** Milieu à l'éosine et au bleu de méthylène.

**ERV:** Entérocoques résistants à la vancomycine.

**GB:** globules blancs.

**GNO:** gélose nutritive ordinaire.

**GR:** globules rouges.

**IL-1 :** Interleukines-1.

**KDa:** kilo Dalton.

**Lan:** Lanthionine.

**Log:** Logarithme décimal.

**Met:** Méthionine.

**SARM:** *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline.

**PLP:** protéine liant la pénicilline.

**PM:** Poids Moléculaire.

**PY glucose:** peptone Trypcase yeast extract medium.

**RAPD:** Random Amplified Polymorphism DNA.

**Rum A:** Ruminococcine A.

**S:** Staphylococcus.

**sar:** staphylococcal accessory regulator.

**TEM :** Temoneira - nom du patient.

**TSST:** Toxin Shock Syndrome Toxic.

**UFC:** Unite formant colony.

**VF:** Viande foie.

**VP:** Vosges –Proskauer.

**xpr:** extracellular protein regulator.

## Liste des figures

	<b>Page</b>
<b>Figure 1 :</b> <i>Staphylococcus aureus</i> , frottis coloré au Gram (x1500).....	3
<b>Figure 2 :</b> Variation de la flore selon la localisation anatomique .....	18
<b>Figure 3:</b> <i>Ruminococcus gnavus</i> ATCC 29149.....	30
<b>Figure 4:</b> Arbre phylogénétique de coques anaérobies basées sur des ordres du rDNA 16S.....	32
<b>Figure 5:</b> Séquence d'acides aminés de la RumA.....	35
<b>Figure 6:</b> Alignement multiple d'ordre de RumA avec homologue dactylographié de lantibiotics d'IIA.....	35
<b>Figure 7:</b> Isolement et purification des espèces bactériennes recherchées.....	38
<b>Figure 8:</b> Protocole de mesure de l'activité antibactérienne par la mesure de la densité optique et par le dénombrement de la souche retenue à différentes concentrations de la Rum A.....	50
<b>Figure 9:</b> Protocole de mesure de l'activité antibactérienne de la Rum A à l'égard de la souche retenue dans le lait écrémé.....	51
<b>Figure 10:</b> Préparation de la gamme d'étalons de KCl.....	53
<b>Figure 11:</b> Protocole de préparation du flacon Rum A et du flacon témoin.....	54
<b>Figure 12:</b> Portions de l'intestin grêle et coliques.....	57
<b>Figure 13:</b> Etapes de l'enrobage; <b>A</b> : remplissage des blocs ; <b>B</b> : formes des cassettes après l'enrobage.....	58
<b>Figure 14:</b> Distribution des antibiotiques administrés chez les 65 nourrissons retenus pour l'enquête.....	61
<b>Figure 15:</b> Répartition des souches isolées par genres et par espèces. ....	64
<b>Figure 16:</b> Antibiogrammes des espèces recherchées.....	66

<b>Figure 17:</b> Taux de résistance des souches de <i>S. aureus</i> .....	68
<b>Figure 18:</b> Taux de résistance des souches de <i>C. perfringens</i> .....	68
<b>Figure 19:</b> Taux de résistance des souches d' <i>E. coli</i> .....	68
<b>Figure 20:</b> Taux de résistance des souches d'Enterobacter sp. ....	68
<b>Figure 21:</b> Activité de la Rum A à l'égard de <i>S. aureus</i> par le test des disques.....	72
<b>Figure 22:</b> Variation de la densité optique de <i>S. aureus</i> 22 en fonction de la concentration de la Ruminococcine A.....	74
<b>Figure 23:</b> Variation du nombre de <i>S. aureus</i> 22 en fonction de la concentration de la Rum A.....	76
<b>Figure 24:</b> Variation du nombre de <i>S. aureus</i> 22 de l'échantillon Rum A et de l'échantillon témoin en fonction du temps.....	77
<b>Figure 25:</b> Variation de la concentration du potassium cellulaire de l'échantillon Rum A et l'échantillon témoin en fonction du temps.....	79
<b>Figure 26:</b> Dénombrement de <i>S. aureus</i> pendant la période de l'expérimentation animale. ....	81
<b>Figure 27:</b> Observations microscopiques des coupes réalisées sur l'intestin grêle de chaque lapin (8×10×5). ....	84
<b>Figure 28 :</b> Réaction inflammatoire à <i>S. aureus</i> (8×40×5).....	84
<b>Figure 29:</b> Observations microscopiques des coupes réalisées sur le colon de chaque lapin (8×10×5). ....	86

## Liste des tableaux

	Page
<b>Tableau I:</b> Quelques caractéristiques pour distinguer les différentes espèces de staphylocoques à coagulase positive.....	5
<b>Tableau II:</b> Facteurs de virulence de <i>S. aureus</i> .....	6
<b>Tableau III:</b> Diagnostic différentiel de quelques <i>Bacillus</i> .....	11
<b>Tableau IV:</b> Caractères cultureux des diverses espèces de <i>Clostridium</i> .....	13
<b>Tableau V:</b> Les grandes classes d'antibiotiques avec les plus usuelles. (Il inclut les molécules purement artificielles).....	22
<b>Tableau VI:</b> Clefs de différenciations présomptives des espèces de <i>Ruminococcus</i> .....	30
<b>Tableau VII:</b> Mini galeries biochimiques d'identification d' <i>Enterobacter</i> sp et d' <i>E. coli</i> .....	41
<b>Tableau VIII:</b> Identification de <i>Clostridium</i> .....	45
<b>Tableau IX:</b> L'étape de la circulation (déshydratation, éclaircissement, imprégnation).....	58
<b>Tableau X:</b> Étapes de coloration histologique.....	60
<b>Tableau XI:</b> Aspect des colonies des espèces recherchées.....	61
<b>Tableau XII:</b> Identification des quatre souches de <i>S. aureus</i> .....	62
<b>Tableau XIII:</b> Identification des six souches de <i>Bacillus subtilis</i> .....	62
<b>Tableau XIV:</b> Identification des 12 souches de <i>Clostridium perfringens</i> . .....	63
<b>Tableau XV:</b> Identification des 11 souches d' <i>Escherichia coli</i> .....	63
<b>Tableau XVI:</b> Identification des douze souches d' <i>Enterobacter</i> sp.....	63
<b>Tableau XVII:</b> Résultats des dénombrements des différentes souches après 24 heures d'incubation .....	65
<b>Tableau XVIII:</b> Diamètres des zones d'inhibition (mm) de <i>Staphylococcus aureus</i> 22 comparées à la souche de référence <i>S. aureus</i> ATCC.....	72

## **Liste des figures en annexes**

### **Annexe 3. Résultats.**

**Figure 1:** Courbe d'étalonnage du photomètre de flamme:  $C(KCl) = f(Abs)$ .

## **Liste des tableaux en annexes**

### **Annexe1. Données bibliographiques**

**Tableau I:** Les abréviations d'une lettre pour chaque acide aminé et leur correspondance aux codons ADN.

### **Annexe 2. Données matériel et méthodes.**

**Tableau II:** Composition de la gélose nutritive.

**Tableau III:** Composition du bouillon nutritif.

**Tableau IV:** Composition de la gélose.

**Tableau V:** Composition de la gélose Mossel.

**Tableau VI:** Composition de la gélose EMB.

**Tableau VII:** Composition de la gélose viande foie (VF).

**Tableau VIII:** Composition du bouillon BHI.

**Tableau IX:** Composition du bouillon Giolitti cantoni.

**Tableau X:** Composition du milieu Urée Indole.

**Tableau XI:** Composition du milieu Clark et Lubs.

**Tableau XII:** Composition du milieu de Citrate de simmons.

**Tableau XIII:** Composition du milieu Hajna-Kligler.

**Tableau XIV:** Composition du milieu Mueller-Hinton.

**Tableau XV:** Composition de la gélose à ADN.

**Tableau XVI:** Composition du milieu TSI.

### **Annexe 3. Résultats**

**Tableau XVII:** Distribution des antibiotiques selon l'âge (sexe masculin).

**Tableau XVIII :** Distribution des antibiotiques selon l'âge (sexe féminin).

**Tableau XIX:** Résultats des dénombrements (UFC/ml) de la standardisation de l'antibiogramme des quatre souches recherchées.

**Tableau XX :** Récapitulatif des phénotypes de résistance des souches de *Staphylococcus aureus*.

**Tableau XXI:** Récapitulatif des phénotypes de résistance des souches d' *Enterobacter* sp.

**Tableau XXII:** Récapitulatif des phénotypes de résistance des souches de *C. perfringens*.

**Tableau XXIII:** Récapitulatif des phénotypes de résistance des souches d' *E. coli*.

**Tableau XXIV:** Variation de la densité optique en fonction de la concentration de la Ruminococcine A.

**Tableau XXV:** Dénombrement de la souche *S. aureus* 22 dans le bouillon BHI en fonction de la variation de la concentration de la Rum A.

**Tableau XXVI:** Dénombrements de *S. aureus* 22 de l'échantillon Rum A en fonction du temps dans le lait écrémé.

**Tableau XXVII:** Dénombrements de *S. aureus* 22 de l'échantillon témoin en fonction du temps dans le lait écrémé.

**Tableau XXVIII:** Mesures des absorbances par le photomètre de flamme de la gamme d'étalons.

**Tableau XXIX :** Mesures des absorbances par le photomètre de flamme de l'échantillon Rum A et de l'échantillon témoin.

**Tableau XXX:** Concentration du potassium (mg/ml) de l'échantillon Rum A et de l'échantillon témoin.

**Tableau XXXI:** Comptes fécaux log N de *Staphylococcus aureus* du lot 1 (Lapins infectés ou traités) durant l'expérimentation animale.

**Tableau XXXII:** Comptes fécaux log N de *Staphylococcus aureus* du lot 2 (Lapins infectés, traités) durant l'expérimentation animale.

#### **Annexe 4. Analyse statistique**

**Tableau XXXIII:** Test de différence entre deux proportions (STATISTICA 5.0) pour *E. coli*. (N1= N2= 11).

**Tableau XXXIV:** Test de différence entre deux proportions (STATISTICA 5.0) pour *C. perfringens*. (N1= N2= 12).

**Tableau XXXV:** Test de différence entre deux proportions (STATISTICA 5.0) pour *S. aureus*. (N1= N2= 4).

**Tableau XXXVI:** Test de différence entre deux proportions (STATISTICA 5.0) pour Enterobacter sp. (N1= N2=8).

**Tableau XXXVII:** Corrélation entre la concentration de la Rum A, mesure de la DO et Log N de *S. aureus* (R= - 0,95).

**Tableau XXXVIII:** Test de Student des résultats des dénombrements de l'activité antibactérienne de la Rum A à l'égard de *S. aureus* 22 dans le lait écrémé.

**Tableau XXXIX:** Test de Student des résultats du test de la fuite du potassium cellulaire.

**Tableau XXXX:** Test de Student des résultats des comptes fécaux durant la période de l'expérimentation animale.

## GLOSSAIRE

**Antibiothérapie** : Un traitement par antibiotique

**Anti diarrhéique** : Tout médicament qui soulage des symptômes de la diarrhée

**Caecum** : Cul-de-sac formé par la partie initiale du gros intestin, au-dessous de l'abouchement de l'intestin grêle, et portant l'appendice vermiculaire.

**Commensal** : Espèces commensales, dont l'une vit associée à l'autre en profitant des débris de ses repas, mais sans lui nuire.

**Déshydratation** : Un état résultant d'une diminution excessive et dangereuse de l'eau dans les tissus

**Diarrhée toxino-invasive** : Diarrhée qui met en œuvre la sécrétion des toxines et l'invasion des germes sur les muqueuses intestinales.

**Ecosystème** : désigne l'ensemble formé par une association ou communauté d'êtres vivants (ou biocénose) et son environnement géologique, pédologique et atmosphérique (le biotope).

**Épithélium** : tissu fondamental formant soit un revêtement externe (en surface de la peau) ou interne (en surface d'une muqueuse), soit une glande.

**Entérocytes** ; Les cellules les plus internes de l'intestin grêle, celles qui sont en contact avec le chyme.

**Electrolytes** : Ensemble d'eau et sels minéraux qui se trouvent dans la lumière intestinale.

**Endémique** : se rapporte à endémie, maladie due à une agression toxique ou infectieuse, laissant souvent des séquelles mentales

**Epidémie** : Atteinte simultanée d'un grand nombre d'individus d'un pays ou région par une maladie contagieuse

**Gastro-entérite** : Une gastro-entérite est une inflammation ou infection de la muqueuse de l'estomac et celle des intestins.

**Péristaltisme** : Activité péristaltique(mouvements, contractions péristaltiques, qui se produisent dans les organes tubulaires (notamment ceux du tube digestif) et provoquent le déplacement du contenu de l'organe (aliments, etc.)) (de l'œsophage, de l'intestin, etc.).

**Septicémie** : infection générale due à la pullulation dans le sang de bactéries pathogènes

**Vomissement** : est le rejet actif et involontaire par la bouche du contenu gastrique

## Sommaire

Introduction.....	1
-------------------	---

### Partie bibliographique

#### I : Les bactéries pathogènes

1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	3
1.1. Généralités.....	3
1.2. Position taxonomique et classification <i>Staphylococcus aureus</i> .....	4
1.3. Habitat et épidémiologie.....	5
1.4. Pouvoir pathogène et virulence.....	6
1.4.1. L'intoxication alimentaire staphylococcique.....	7
1.4.2. Infections à <i>Staphylococcus aureus</i> chez les lapins.....	7
1.4.2.1. Pathogénèse de <i>Staphylococcus aureus</i> chez les lapins.....	8
1.4.2.2. Abscesses et septicémie chez les lapins.....	8
2. <i>Bacillus subtilis</i> .....	9
2.1. Généralités.....	9
2.2. Caractères bactériologiques.....	9
2.3. Classification et nomenclature.....	9
2.4. Habitat.....	11
2.5. Pouvoir pathogène.....	12

3. <i>Clostridium perfringens</i> .....	13
3.1. Généralités.....	13
3.2. Classification .....	13
3. 3. Habitat .....	14
3.4. Pouvoir pathogène .....	15
3.4.1. Les infections tissulaires.....	15
3.4.2. Les affections digestives.....	15
4. Entérobactéries.....	16
4.1. <i>Escherichia coli</i> .....	16
4.1.1. Généralités.....	16
4.1.2. Position taxonomique et classification.....	17
4.1.3. Habitat.....	17
4.3.2. Pouvoir pathogène.....	18
4.2. <i>Enterobacter</i> sp.....	19
4.2.1. Généralités.....	19
4.2.2. Position taxonomiques et classification.....	19
4.2.3. Habitat.....	20
4.2.4. Pouvoir pathogène .....	20

## II : La résistance bactérienne aux antibiotiques

1. Définition.....	21
2. Principaux antibiotiques et leur classification .....	22
2.1. Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane.....	23
2.2. Antibiotiques inhibiteurs des synthèses protéiques.....	23
2.3. Antibiotiques inhibiteurs des acides nucléiques.....	24
2.4. Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des folates.....	24
3. Mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques.....	25
3.1. <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline .....	25
3.1.1. Production de Béta-lactamases.....	25
3.1.2. Modification de la cible.....	26
3.2. La résistance des entérobactéries aux Béta-lactamines.....	27
3.2.1. Mécanisme de résistance aux Béta-lactamines.....	27
3.2.1.1. Résistance par imperméabilité cellulaire.....	27
3.2.1.2. Excrétion par des systèmes d'efflux.....	27
3.2.1.3. Résistance par production de Béta-lactamases.....	28
3.2.2. Les entérobactéries productrices de Béta-lactamases à spectre élargi.....	28
3.3. Les bactéries multirésistantes (BMR).....	29

### III : *Ruminococcus gnavus*

1. Généralités.....	30
2. Caractères biochimiques.....	30
3. Phylogénie.....	31
4. Classification.....	33
5. La Ruminococcine A.....	33
5.1. Définition.....	33
5.2. Classification de la Ruminococcine A.....	34
5.3. Spectre d'activité de la Ruminococcines A.....	34
5.4. Mécanisme d'action des la Ruminococcine A.....	36
5.5. Structure de la Ruminococcines A.....	36

## **Partie pratique**

### **Matériel et méthodes**

1. Prélèvement et analyse de selles.....	37
2. Isolement et purification des souches.....	37
3. Identification.....	39
3.1. Identification de <i>S. aureus</i> .....	39
3.2. Identification des Entérobactéries.....	40
3.3. Identification de Bacillus et de Clostridium .....	43
3.3.1. Identification de Bacillus .....	43
3.3.2. Identification de Clostridium.....	45
4. Antibiogramme.....	45
4.1. Standardisation de l'antibiogramme.....	45
4.2. Mode opératoire de l'antibiogramme.....	46
5. Activité antibactérienne de la Ruminococcine A à l'égard de la souche retenue .....	47
5.1. Test des disques.....	47
5.1.1. Première concentration de la Rum A au rotavapor.....	47
5.1.2. Deuxième concentration de la Rum A par lyophilisation.....	47
5.1.3. Mode opératoire du test des disques.....	48
5.1.4. Vérification du test des disques.....	48
5.2. Estimation de l'activité antibactérienne de la Ruminococcine A à l'égard de la souche retenue en milieu liquide.....	48
5.2.1. Mesure de la densité optique.....	49
5.2.2. Dénombrement des cellules viables de la souche retenue .....	49
5.2.3. Activité antibactérienne de la Rum A à l'égard de la souche retenue dans le lait écrémé.....	51

5.3. Dosage du potassium cellulaire par le photomètre de flamme.....	52
5.3.1. Etalonnage de l'appareil.....	52
5.3.2. Examen des cellules de la souche retenue pendant l'incubation avec la Ruminococcine A.....	53
1. Préparation des échantillons à analyser.....	53
2. Mesure de la concentration de K <sup>+</sup> des échantillons préparés.....	54
6. Etude in vivo de l'activité antibactérienne de la Ruminococcine A à l'égard de la souche retenue chez des lapins holoxéniques.....	55
6.1. Provocation de la diarrhée par la souche retenue .....	55
6.2. Traitement par la Rum A.....	55
6.3. Dénombrement de la souche retenue .....	55
6.4 .Dissection des lapins.....	55
6.5. Réalisation de coupes histologiques de l'intestin grêle et du colon.....	57

## Résultats et discussion

### Chapitre I : Recherche des différentes flores fécales (chez des nourrissons diarrhéiques) résistantes aux antibiotiques

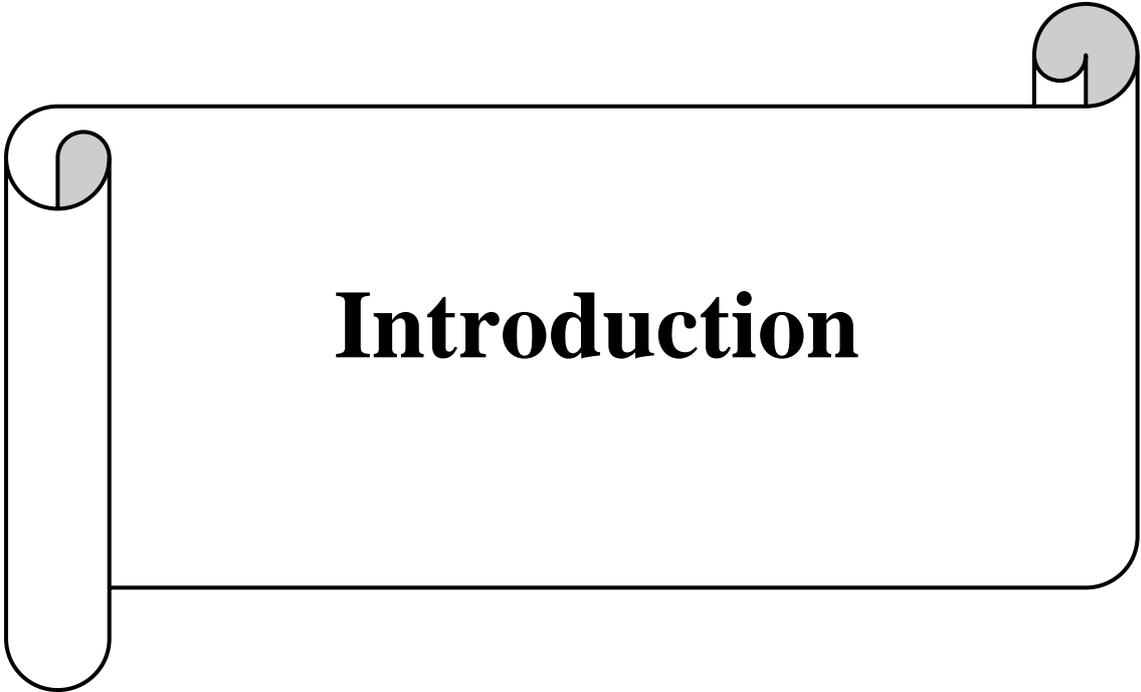
I. Isolement et identification des espèces bactériennes recherchées.....	61
1. Distribution des antibiotiques administrés.....	61
2. Identification des souches isolées.....	62
2.1. Aspect des colonies.....	62
2.2. Identification.....	62
3. Répartition des souches bactériennes isolées à partir des selles.....	64
II. Résultats des antibiogrammes.....	65
1. Résultats de la standardisation.....	65
2. Résistance des souches isolées aux antibiotiques testés.....	66

### Chapitre II : Effet antibactérien *in vitro* de la Rum A à l'égard de *Staphylococcus aureus* 22 (souche retenue)

1. Résultats du test des disques.....	72
2. Estimation de l'activité antibactérienne de la Ruminococcine A à l'égard de <i>S. aureus</i> 22 en milieu liquide.....	74
2.1. Mesure de la densité optique.....	74
2.2. Dénombrement de cellules viables de <i>S. aureus</i> 22 dans le bouillon (BHI) .....	76
2.3. Activité antibactérienne de la Rum A à l'égard de <i>S. aureus</i> 22 dans le lait écrémé...77	
3. Résultats du test de la fuite du potassium.....	79

**Chapitre III** : Effet antibactérien *in vivo* de la Ruminococcine A à l'égard de *Staphylococcus aureus* 22.

1. Résultats de l'expérimentation animale.....	81
1.1. Résultats des dénombrements.....	81
1.2. Coupes histologiques.....	83
1.2.1. Observations microscopiques des coupes réalisées sur l'intestin grêle de chaque lapin.....	83
1.2.2. Observations microscopiques des coupes réalisées sur le colon de chaque lapin.....	85
Conclusion.....	89
Références bibliographiques	
Annexes	



# **Introduction**

La flore ou microbiote intestinal est l'ensemble des bactéries qui colonise le tube digestif. Un être humain héberge  $10^{14}$  bactéries dans son tractus digestif alors qu'il ne se compose que de  $10^{13}$  cellules eucaryotes, soit dix fois moins de cellules eucaryotes que procaryotes. Pendant de très nombreuses années, le microbiote digestif n'a été que peu ou pas étudié, car plus de 70 % des bactéries qui le composent ne sont pas cultivables par les méthodes classiques (Corthier, 2007).

Dans la lutte menée contre les maladies infectieuses, vaccins et antibiotiques sont les moyens thérapeutiques les plus précieux dont on dispose. Or les bactéries cibles développent de nouveaux mécanismes pour devenir plus résistantes à l'action des antibiotiques. Ici ou là se développent des souches pathogènes qui résistent à ces derniers (Piazzini, 2000).

Poyart *et al.* (2003), définit les bactéries multi-résistantes comme étant des souches d'une espèce bactérienne trouvées résistantes au moins à deux classes d'antibiotiques auxquelles les souches de la même espèce sont habituellement sensibles. Les conséquences des infections à bactéries multi-résistantes sont multiples ; la gravité des maladies, du fait de l'inefficacité des antibiotiques, et l'augmentation des mortalités.

Compte tenu de ce problème de résistance qui accompagne l'utilisation massive des antibiotiques, des intérêts scientifiques et économiques importants se sont manifestés pour les métabolites ou autres molécules douées d'activités antibactériennes ou probiotiques, en particulier produits par les bactéries lactiques (Neetles et Barefoot, 1993).

En 2003, le marché des probiotiques pesait à peine 6 milliards d'euros, il a quasiment doublé en 5 ans pour atteindre 10 milliards d'euros en 2008, soit environ 10 % du marché Mondial des aliments fonctionnels (Alegre, 2009).

De nombreuses études scientifiques ont rapporté les propriétés prophylactiques et thérapeutiques de certains microorganismes. Parmi eux, *Ruminococcus gnavus* E1, la première bactérie anaérobie stricte, produisant une bactériocine ; la Ruminococcine A (Dabard *et al.*, 2001).

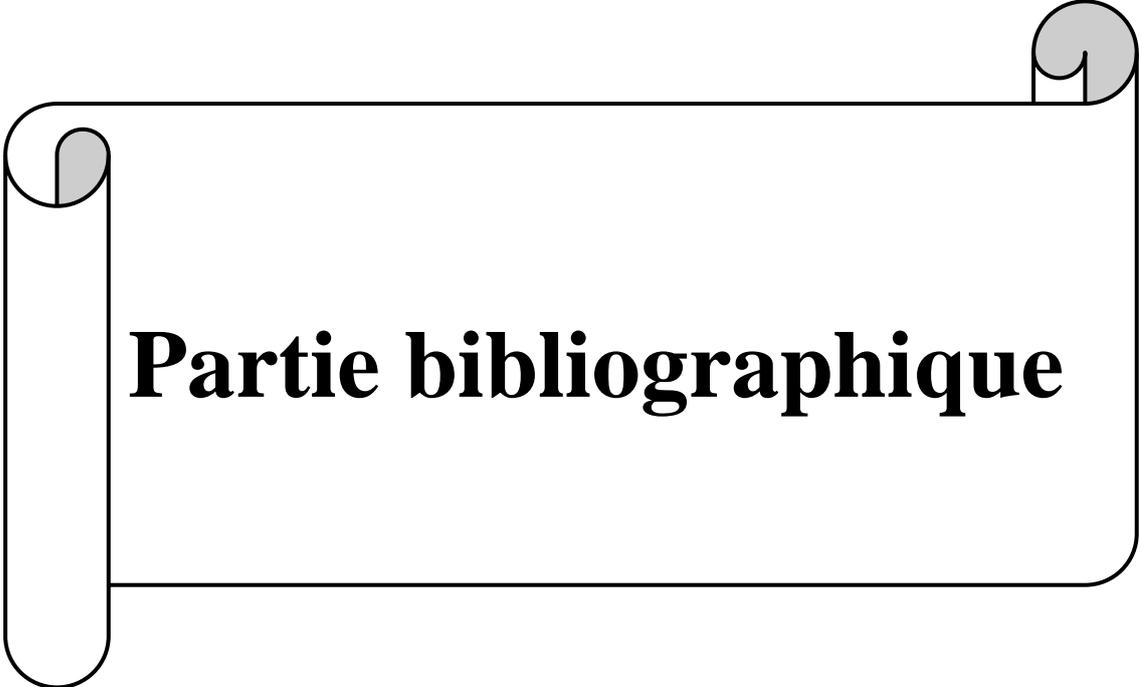
Cette bactériocine a été purifiée et séquencée au laboratoire ISM2 ST Jerome à Marseille. Elle a témoigné d'une excellente activité antibactérienne à l'égard de *Clostridium perfringens* A. L'intérêt sera donc de vérifier son spectre d'activité sur d'autres souches bactériennes multirésistantes responsables de maladies nosocomiales.

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude, qui sera axée sur la recherche et l'évaluation de l'activité in vitro et in vivo (sur lapins holoxéniques) de la Ruminococcine A, à l'égard des souches pathogènes multi-résistantes, isolées d'hôpitaux de la région de Bejaia à partir des selles d'enfants âgés de moins de deux ans, ayant développé une diarrhée après un traitement antibiotique.

***Ce travail a été réalisé au Laboratoire de  
Microbiologie Appliquée.***

***Équipe lait et probiotiques de l'université***

***A. Mira de Béjaïa.***



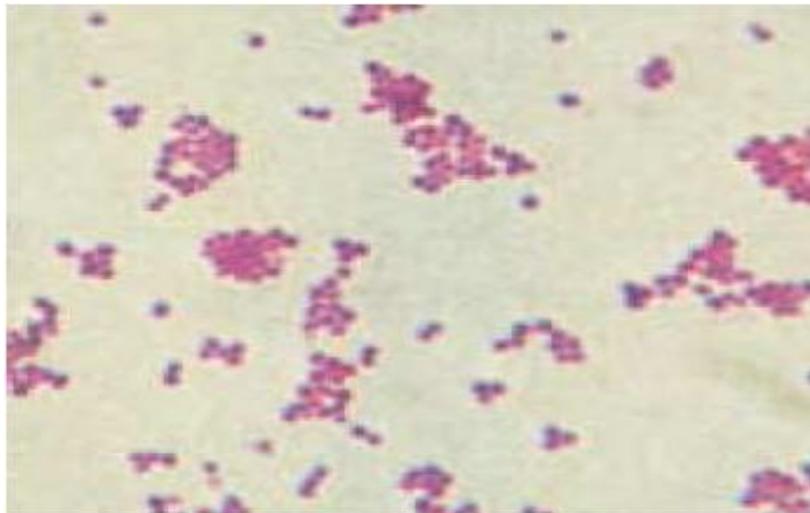
**Partie bibliographique**

## I. Les bactéries pathogènes

### 1. *Staphylococcus aureus*

#### 1.1. Généralités

*Staphylococcus aureus*, appelé couramment staphylocoque doré en raison de la couleur jaunâtre des colonies formées sur gélose. C'est une bactérie sphérique à Gram positif, anaérobie facultative, immobile et formant des amas réguliers en forme de grappes de raisin (Hiron, 2007).



**Figure 1 :** *Staphylococcus aureus*, frottis coloré au Gram (x1500). (Hiron, 2007)

## 1.2. Position taxonomique et classification de *S. aureus*

*Staphylococcus aureus* appartient à la famille des micrococaccaceae qui est composée de trois genres de cocci à Gram positif en amas qui diffèrent selon leur G+C %: *Staphylococcus* (30-39 %) et *Micrococcus* (65-75 %) et *Planococcus* (48-52 %). Ce dernier genre n'est rencontré qu'en bactériologie marine (Avril *et al.*, 2000).

Les espèces du genre *Staphylococcus* peuvent être divisées en deux groupes: les Staphylocoques à coagulase positive et les Staphylocoques à coagulase négative. Les Staphylocoques à coagulase positive sont caractérisés par leur capacité à produire une coagulase libre, une protéine extracellulaire produite par certaines espèces de Staphylocoques. (Lamprell, 2003).

Selon Bergey's *et al.*, (2008) *Staphylococcus aureus* est classé comme suit:

**Domaine:** Bacteria

**Phylum:** Firmicutes

**Classe :** Bacilli

**Ordre :** Bacillales

**Famille :** Micrococaccaceae

**Genre :** *Staphylococcus*

**Espèce :** *Staphylococcus aureus*

Il existe aujourd'hui sept espèces de staphylocoques à coagulase positive. Le tableau I regroupe quelques caractéristiques qui différencient les Staphylocoques à coagulase positive entre elles. Ces mêmes tests sont également utilisés pour l'identification de *S. aureus*.

**Tableau I:** Quelques caractéristiques pour distinguer les différentes espèces de staphylocoques à coagulase positive (Lamprell, 2003).

Espèce	Acidification de maltose	Acidification de d-trehalose	Hémolyses	Pigment	Coagulase liée
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
<i>S. intermedius</i>	f	+	d	-	d
<i>S. hyicus</i>	-	+	-	-	-
<i>S. schleiferi ssp.</i>					
<i>Coagulans</i>	-	-	+	-	-
<i>S. delphini</i>	+	-	+	-	-
<i>S. lutrae</i>	+	+	+	-	-

+, plus de 90% des souches sont positives ; -, plus de 90% des souches sont négatives ; f, faible réaction ; d, 11 à 89% des souches sont positives.

### 1.3. Habitat et épidémiologie

Les staphylocoques sont des germes très répandus dans la nature (air, eau, sol) ; en particulier les espèces *S. aureus* et *S. epidermidis*, qui font partie de la flore normale de nombreux individus qui sont des « porteurs asymptomatiques » (Avril *et al.*, 2000).

20 à 75 % des sujets sont porteurs de *S. aureus* : porteurs persistants, porteurs occasionnels, ou transitoires ; à l'opposé certains individus sont non porteurs (Singleton, 2005).

Les staphylocoques peuvent être trouvés particulièrement dans les fosses nasales antérieures (*S. aureus* 30-40 %). *S. epidermidis* peut être isolé de la peau et surtout des zones chaudes et humides de celle-ci (creux axillaire, périnée) ou l'on peut également trouver *S. aureus*.

Il n'est pas rare d'isoler *S. aureus* des selles (Avril *et al.*, 2000).

Le nouveau-né est rapidement colonisé par *S. aureus* après l'accouchement et, plus tard l'enfant peut être contaminé au sein d'une collectivité. La contamination interhumaine est très variable, certains individus étant de « dangereux disséminateurs », alors que d'autres sujets ne transmettent pratiquement jamais leurs souche (Avril *et al.*, 2000).

#### 1.4. Pouvoir pathogène et virulence

*S. aureus* possède de nombreux facteurs de virulence. Il s'agit de toxines, d'enzymes et de la structure même du germe (Tableau II). Son pouvoir pathogène est aussi lié à son défaut d'antigénicité et par conséquent à une anomalie de production d'anticorps.

**Tableau II :** Facteurs de virulence de *S. aureus* (Spicer, 2003).

Type	Facteurs de virulence	Action
Toxines	Cytotoxine (5), de alpha à epsilon (hémolysines) (epsilon = leucocidine) Exfoliatines (toxine épidermolytique) A & B Toxine du Toxic Shock Syndrome (TSST-1) Enterotoxine (6), de A à F.	Lyse des neutrophiles, les GR, d'autres cellules ; Inhibition de la phagocytose Séparation des cellules de la couche granuleuse Stimulation du relargage d'IL-1 Stimulation des vomissements et le péristaltisme
Enzymes	Coagulase (forme liée et forme libre) Catalase Fibrinolysine (staphylokinase) Hyaluronidase (facteur de propagation) Lipase Nucléase B-Lactamases (pénicillinases, céphalosporinases)	Protection par la formation de fibrine Protection en détruisant l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dans les GB Dissociation de la fibrine Hydrolyse l'acide hyaluronique des lymphocytes T cytotoxiques La survit dans les glandes sébacées Dégradation de l'ADN Destruction des B-lactamines
Structure	Paroi cellulaire, capsules	Diminution du chimiotactisme, l'opposition et la phagocytose Facilite l'adhérence aux matériaux synthétiques

*S. aureus* est un pathogène humain opportuniste bien documenté. Il peut provoquer des infections cutanées, des septicémies, le syndrome du choc toxique et de nombreuses autres maladies.

Les infections à *S. aureus* peuvent être acquises dans les collectivités, mais sont aussi importantes que les infections nosocomiales. Un obstacle important dans le contrôle des infections à *S. aureus* est sa résistance aux antibiotiques.

Les souches de *S. aureus* (SARM) sont un problème majeur clinique et épidémiologique dans les hôpitaux ; en plus de leur résistance à la méthicilline, d'autres déterminants de la résistance indépendants dans leur génome. Cela a conduit à l'évolution des souches de SARM résistantes à presque tous les antibiotiques couramment utilisés (Spicer, 2003).

Ces souches sont rares en médecine vétérinaire. De la description originale de SARM chez les animaux (Devriese et Hommez, 1975) à la fin du XXe siècle, seules les souches de SARM montrant les caractéristiques souvent observées chez les souches épidémiques de l'Homme ont été isolées.

### **1.4.1. L'intoxication alimentaire staphylococcique**

L'intoxication alimentaire staphylococcique est due à des entérotoxines produites par plusieurs espèces de *Staphylococcus* (principalement *S. aureus*). Les entérotoxines (type A à H) provoquent habituellement des vomissements, et souvent de la diarrhée, peu de temps après l'ingestion de nourriture contaminée. Le mode d'action des toxines est inconnu. Les vomissements résultent d'une stimulation des cellules ganglionnaires de l'intestin, causant la libération d'histamine et de leucotriène par les mastocytes. Comme les entérotoxines sont des superantigènes, les effets de cytokines peuvent jouer un rôle dans leur pathogénèse (Singleton, 2004).

### **1.4.2. Infections à *Staphylococcus aureus* chez les lapins**

Chez le lapin, *S. aureus* provoque principalement la mammite, la dermatite exsudative, abcès sous-cutané, et pododermatites (Okerman *et al.*, 1984).

La transmission de l'Homme aux lapins ou entre les lapins peut être directe ou indirecte (à travers les matériaux de cages, les cheveux volants, et les chaînes alimentaires (Devriese *et al.*, 1981).

Souvent, les relations qui existent entre les clapiers infectés par des souches de *S. aureus* et l'apport de nouveaux reproducteurs dans le troupeau est probablement la plus importante source d'infection, même après une insémination artificielle (Rossi *et al.* 1995).

#### **1.4.2.1. Pathogenèse de *Staphylococcus aureus* chez les lapins**

Chez *S. aureus*, l'expression de protéines extracellulaires et de paroi cellulaire nécessaires pour la colonisation et les phases de l'infection invasive est régie par trois gènes de régulation, à savoir l'agr, xpr, et sar, qui modulent de façon très complexe et efficace la réponse hautement coordonnée de la bactérie vers les environnements changeant pendant le processus d'infection (McNamara et Iandolo, 1998).

#### **1.4.2.2. Abscesses et septicémie chez les lapins**

Chez les lapins, les bactéries *S. aureus* est capable d'infecter les petites lésions dermiques. D'autres voies d'entrée peuvent être possibles ; le moignon ombilical chez le lapin nouveau-né (Hagen, 1963) et l'appareil génito-urinaire (Rossi *et al.*, 1995). La glande mammaire est souvent infectée par l'allaitement des jeunes. Contrairement à des problèmes de mammites chez les bovins, où staphylocoques pénètre dans la glande mammaire par le canal du trayon, chez le lapin, il est principalement une infection de la plaie des mamelons et les tissus qui les entourent.

## **2. *Bacillus subtilis***

### **2.1. Généralités**

*Bacillus subtilis* est une bactérie vivant dans le sol à des températures modérées (5°C-65°C). Dans sa niche écologique, elle doit souvent faire face à des stress et des carences en nutriments, ce qui le conduit à développer diverses stratégies afin de survivre en conditions défavorables.

Il est notamment capable de former des spores, qui lui permettent de survivre longtemps dans des conditions extrêmes, C'est l'une des bactéries les plus étudiées, le second chez les procaryotes, juste après *Escherichia coli* (Marchadier, 2009).

### **2.2. Caractères bactériologiques**

Les espèces du genre *Bacillus* sont des bacilles Gram positif rectilignes, à extrémités carrées ou arrondies, de taille variable (de 0,5 x 1,2 µm jusqu'à 2,5 x 10 µm), sporulés, à Gram positif (Ruth *et al.*, 2005).

Les espèces appartenant au genre *Bacillus* se distinguent des genres proches par la production d'endospore, une activité catalase positive et par l'aptitude à se développer en conditions aérobies (Sutra *et al.*, 1998).

### **2.3. Classification et nomenclature**

Les espèces du genre *Bacillus* sont classées en se basant sur leur morphologie et la position de leurs spores. Cette classification divise le genre de *Bacillus* en 3 groupes :

**Groupe 1 :** Bacilles à spores ne déformant pas le corps bactérien.

**Groupe 2 :** Bacilles à spores déformantes, ovales.

**Groupe 3 :** Bacilles à spores déformantes, rondes.

A l'intérieur de ces groupes, les espèces et les variétés se distinguent par des caractères morphologiques et physiologiques (Avril *et al.*, 2000).

Le genre *Bacillus* comprend une vingtaine d'espèces, mais on s'intéresse essentiellement à *Bacillus anthracis*, en raison de son pouvoir pathogène (animaux, homme) et à *Bacillus cereus* (intoxication alimentaire).

Néanmoins, depuis quelques années, de nombreuses publications rendent d'autres espèces de *Bacillus* responsables d'infections chez les immunodéprimés (bactériémies, méningites, méningo-encéphalites, pneumonies, endocardites (Avril *et al.*, 2000).

Selon Bergey's *et al.*, (2008) *Bacillus subtilis* est classé comme suit :

**Domaine:** Bacteria

**Phylum:** Firmicutes

**Classe :** Bacilli

**Ordre :** Bacillales

**Famille :** Bacillaceae

**Genre :** *Bacillus*

**Espèce :** *Bacillus subtilis*

Le diagnostic de genre repose sur la morphologie, l'affinité tinctoriale (parfois très difficile à déterminer, l'étude du type respiratoire et la mise en évidence d'une spore (bien visible lors d'un examen au contraste de phase). La capacité de sporulation est un caractère fondamental parfois très difficile à obtenir *in vitro*. Il convient d'utiliser des milieux de sporulation (souvent des géloses nutritives enrichies de 10 à 50 mg/l de manganèse) ou de laisser vieillir les cultures une dizaine de jours (Avril *et al.*, 2000).

**Tableau III:** Diagnostic différentiel de quelques *Bacillus* (Avril *et al.*, 2000).

	<i>B. cereus</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. subtilis</i>
Mobilité	V	+	V	+
Anaérobiose	+	+	-	-
Gaz en glucose	-	+	-	-
Hydrolyse d'amidon	+	+	+	+
VP	+	+	-	+
NO <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	+	+	V	+
Croissance en 7% NaCl	+	+	+	+
Culture à 50 °C	-	+	-	+
Lécitinase	+	-	-	-

V : variable.

## 2.4. Habitat

La majorité des espèces de *Bacillus* est saprophyte et largement distribuée dans l'environnement naturel. Les habitats principaux sont les sols, les colonnes d'eau et les sédiments

d'eau douce ou d'eau salée. Leurs spores survivent très facilement dans d'autres habitats et peuvent constituer alors des contaminants ubiquitaires. À l'exception de *B. anthracis*, agent du charbon qui est devenu exceptionnel en France, et de *B. cereus*, responsable de toxi-infections alimentaires collectives (Farhat *et al.*, 2008).

## 2.5. Pouvoir pathogène

*Bacillus* est très souvent considéré comme un contaminant. En effet, les infections à *Bacillus* spp. sont rares et surviennent chez des patients fréquemment immunodéprimés. *Bacillus cereus* est l'espèce la plus fréquemment responsable d'infections notamment de toxi-infections alimentaires, toutefois d'autres espèces peuvent être responsables de syndrome infectieux grave (Farhat *et al.*.,2008).

Selon Richard *et al.*, (1988) *Bacillus* spp. est responsable de 1% des bactériémies identifiées sur une période de six ans ; les auteurs rapportent 11 cas de bactériémies nosocomiales, dont huit dues à *B. subtilis*.

### 3. *Clostridium perfringens*

#### 3.1. Généralités

Les bactéries du genre *Clostridium* sont des anaérobies stricts, Gram positif, sporulées ; appartenant à un groupe taxonomique important et hétérogène. Elles ont des propriétés intéressantes, allant de la production de solvants, à des conditions désastreuses cliniques causés par la synthèse de certaines des toxines les plus meurtrières connues (Canard *et al.*, 1992).

Isolé pour la première fois en 1881, ce germe a vu son rôle reconnu dans les gangrènes par Welch, Nuttall et Frankel, puis dans les appendicites aiguës par Veillon.

L'étude des facteurs toxiques et la différenciation des types de *Clostridium* remontent aux années 1950. En 1953 Hobbs démontre l'existence d'une entérotoxine (Avril *et al.*, 2000).

#### 3.2. Classification

Au sein des *Clostridium*, *C. perfringens* figure dans le groupe des espèces saccharolytiques, non ou faiblement protéolytique.

Il se distingue des autres *Clostridium* par son immobilité et par la présence d'une capsule. L'espèce *C. perfringens* est divisée en cinq sous-types toxiques désignés par des lettres de A à E. Les souches sont homogènes du point de vue de l'ARN 23 S.

Le type A est surtout retrouvé en pathologie humaine, les autres types sont responsables d'enterotoxémie d'origine endogène chez l'animal (ovidés, bovidés) rarement d'infection humaines (Spicer, 2003).

**Tableau IV:** Caractères cultureux des diverses espèces de *Clostridium* (Vuillermoz, 2005)

Caractères cultureux	Lécithinase	Lipase	Hydrolyse de la glycérine	Digestion de la caséine	Production d'indole	Glucose	Lactose	Sucrose	Maltose	Autres caractéristiques
<i>Clostridium tetani</i>	-	-	+	-	V	-	-	-	-	Spore terminale, endospore sphérique
<i>Clostridium botulinum</i>	I	-	+	+	-	+	-	-	+	Spore subterminale
	II	-	+	+	-	+	-	-	+	
	III	V	+	+	-	V	+	-	V	
	IV	-	-	+	+	-	-	-	-	
<i>Clostridium perfringens</i>	+	-	+	+	-	+	+	+	+	Immobile

V : variable.

Selon Bergey's *et al.*, (2008) la classification de *Clostridium perfringens* se présente comme suit :

**Domaine:** Bacteria

**Phylum:** Firmicutes

**Classe :** Clostridia

**Ordre :** Clostridiales

**Famille :** Clostridiaceae

**Genre :** Clostridium

**Espèce :** *Clostridium perfringens*

### 3. 3. Habitat

*Clostridium perfringens* est présent dans la flore intestinale de l'homme et de nombreuses espèces animales. Parmi les espèces présentes dans l'intestin, *C. perfringens* arrive par ordre de fréquence en deuxième place derrière *C. ramosum*.

*C. perfringens* bactérie ubiquiste, est très répandu dans l'environnement : (Sol, eau, air) (Avril *et al.*, 2000).

### 3.4. Pouvoir pathogène

Connu comme l'agent des gangrènes gazeuses ou des septicémies du post-partum, *Clostridium perfringens* est isolé actuellement lors d'intoxications alimentaires et d'infections tissulaires.

Selon Avril *et al*, (2000) les maladies causés par *Clostridium perfringens* sont les suivantes :

#### 3.4.1. Les infections tissulaires

- **Infection localisée de la peau et des tissus mous (tissus sous-cutanés) :**  
Infection évoluant lentement et souvent indolentes, tels les ulcères de pied, de décubitus...
- **Cellulites et fasciites diffuses :** Tous les plans superficiels de la peau sont touchés, on retrouve des abcès et la formation de gaz. En absence de traitement, on observe une extension rapide de la fasciite et un état de choc.
- **Myonécrose et gangrènes gazeuses**

#### 3.4.2. Les affections digestives

- Toxi-infection alimentaire (TIA)
- Entérites nécrosantes
- Diarrhées post-antibiotiques

#### 4. Entérobactéries

D'après Joly et Reynaud . (2002) la famille des Enterobacteriaceae comprend 33 genres bactériens possédant en commun les caractères suivants :

- Bacilles de 2-6  $\mu\text{m}$  de long sur 0,3-0,5 $\mu\text{m}$  de large.
- Immobiles (*Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia peptis*) ou plus fréquemment mobile grâce à une ciliature péritriche (sauf *Tatumella*).
- Oxydase -, catalase + (sauf *Shigella dysenteriae* sérotype I).
- Réduction des nitrates en nitrites.
- Fermentation du glucose
- Culture sur milieux ordinaires.

Au sein de chaque genre, on individualise des espèces, par l'étude des caractères biochimiques ou antigéniques. Les entérobactéries possèdent tous des antigènes de paroi « somatiques » ou antigènes O. Ceux qui sont mobiles possèdent en plus des antigènes flagellaires ou antigènes H. Enfin, certains possèdent un antigène d'enveloppe ou antigène K (Euzéby, 2009).

##### 4.1. *Escherichia coli*

###### 4.1.1. Généralités

*Escherichia coli* est l'espèce type du genre *Escherichia*. Appelée communément « colibacille » cette espèce qui a fait l'objet d'un très grand nombre d'études constitue le modèle des bacilles à Gram négatif aéroanaérobies (Larpen, 2000).

C'est un colibacille, mobile capable de fermenter le lactose et de produire de l'indole.

Commensal du tube digestif de l'homme, il représente à lui seul la plus grande partie de la flore bactérienne de l'intestin (espèce aérobie dominante) (Joly et Reynaud, 2002).

#### 4.1.2. Position taxonomiques et classification

Selon Bergey's *et al.*, (2008) *E. coli* est classée comme suit :

**Domaine:** Bacteria

**Phylum:** Proteobacteria

**Classe :** Gamma Proteobacteria

**Ordre :** Enterobacteriales

**Famille :** Enterobacteriaceae

**Genre :** Escherichia

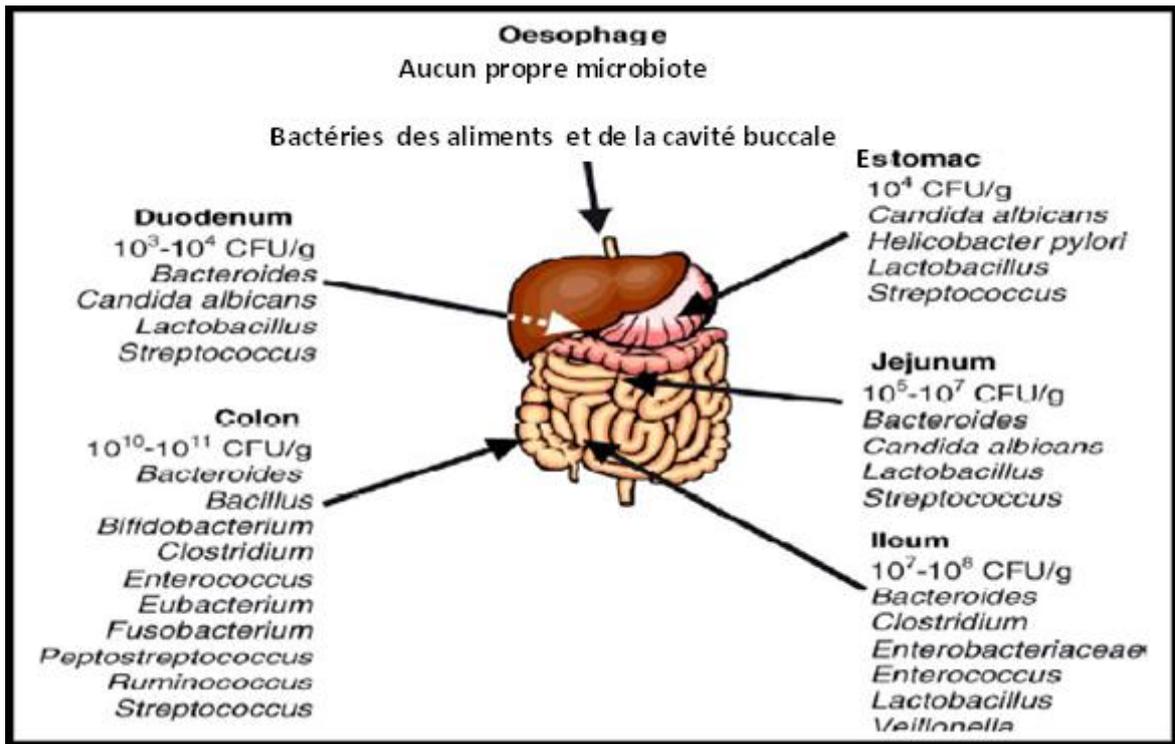
**Espèce :** *Escherichia coli*

#### 4.1.3. Habitat

*E. coli* est une espèce commensale du tube digestif de l'homme et des animaux. Dans l'intestin *E. coli* est l'espèce aérobie quantitativement la plus importante, présente à raison de  $10^7$  à  $10^9$  bactéries par gramme de selles.

Cette population bactérienne ne représente que 1% de celle des anaérobies (**Figure 2**) (Goulet, 2009)

La présence d'*E. coli* dans d'eau, les aliments ou dans le sol est anormale, permet d'apprécier leur qualité microbiologique. À ce titre, elle est un indicateur très utilisé pour rechercher et mesurer une pollution fécale (Avril *et al.*, 2000).



**Figure 2:** Variation de la flore selon la localisation anatomique (Isolauri, 2004).

#### 4.1.4. Pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène d'*E. coli* chez l'animal et chez l'homme est important et varié (Levine, 1985 ; Joly et Reynaud, 2002).

*E. coli* est un composant normal de la flore aérobie du tube digestif ; il est responsable d'infections urinaires, des plaies, des poumons, des méninges et de septicémie. Certaines souches sont des causes importantes de la diarrhée du voyageur et du syndrome hémolytique et urémique (Spicer, 2000).

Les souches entéropathogènes d'*E. coli* (EPEC) sont classées par leurs antigènes O (Et subdivisées par leurs antigènes H et K) (Spicer, 2003).

Les autres souches importantes sont :

- Entéro-adhésives (EAEC).
- Entéro-invasives (EIEC).
- Entérotoxique (ETEC) : exotoxines ;
- Entéro-hémorragique (EHEC) : vérotoxines cytotoxiques.

## 4.2. *Enterobacter* sp

### 4.2.1. Généralités

Les espèces du genre *Enterobacter* sont très proches de *Klebsiella*, si ce n'est qu'elles sont mobiles et ornithine positive. Elles sont divisées en plusieurs espèces par leur biochimie, en particulier par l'arginine et la lysine décarboxylase (*E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. sakasakii*...etc.) (Spicer, 2003).

Le genre *Enterobacter* a été créé en 1985. Il comprend 14 espèces. L'espèce type est *Enterobacter cloacae* (Hormaeche et Edwards, 1960).

De nombreux remaniements ont eu lieu dans ce genre depuis sa création surtout dans les vingt dernières années au cours des quelles se sont intensifiées des études de taxonomie moléculaire. Ainsi les espèces *Enterobacter hafnia* et *Enterobacter agglomerans* sont classées actuellement dans des genres différents, respectivement : *Hafnia alvei* et *Ponoea agglomerans*. À l'inverse certaines espèces du genre *Erwinia* sont maintenant attachées au genre *Enterobacter*, il s'agit des espèces : *Enterobacter dissolvens*, *Enterobacter nimipressuradis* et *Enterobacter cancerogenus* (Joly et Reynaud, 2002).

### 4.2.2. Position taxonomiques et classification

Selon Bergey's *et al.*, (2008) les espèces appartenant à ce genre sont classées comme suit :

**Domaine:** Bacteria

**Phylum:** Proteobacteria

**Classe :** Gammaproteobacteria

**Ordre :** Enterobacteriales

**Famille :** Enterobacteriaceae

**Genre :** *Enterobacter*

#### 4.2.3. Habitat

Les *Enterobacter* sont naturellement présents dans l'environnement (sol, eau, végétaux...). Depuis quelques années leur fréquence augmente dans le domaine hospitalier où ils sont responsables d'infections nosocomiales. *E. aerogenes*, *E. cloacae*, et dans une moindre mesure *E. sakazakii* sont les espèces les plus fréquemment isolées dans ces circonstances (Sanders et Sanders, 1997).

#### 4.2.4. Pouvoir pathogène

Certaines souches du genre *Enterobacter* peuvent être responsables d'infections nosocomiales :

***Enterobacter aerogenes*** : est isolé chez l'homme dans les prélèvements d'origine variée. Rare en milieu communautaire, cet isolement est assez fréquent dans les services de soins intensifs et chez les patients immunodéprimés. Ces infections nosocomiales sont surtout respiratoires et sont favorisées par l'antibiothérapie (Davin-Regli *et al.*, 1996 ; Jalaludin *et al.*, 1998).

***Enterobacter sakazakii*** : est une cause rare mais connue de septicémie néonatale et d'une forme de méningite à évolution grave, provoquant une mortalité de 10 à 80 %. Plusieurs infections ont été mises en rapport avec la consommation d'aliments pour nourrissons (Joly et Reynaud, 2002).

***Enterobacter cloacae*** : c'est un germe qui colonise souvent les patients hospitalisés et plus particulièrement ceux traités aux antibiotiques, et peut être à l'origine d'infections urinaires et de pneumonies, ainsi que d'infections cutanées.

Il peut également être responsable de bactériémies, et c'est un pathogène dont l'incidence en milieu hospitalier a considérablement augmenté ces dernières années.

*Enterobacter cloacae* est principalement isolé chez des patients ayant des pathologies sévères ou certains facteurs les prédisposant aux infections, comme par exemple les voies veineuses centrales et les traitements antibiotiques au long cours (Joly et Reynaud, 2002).

## II. La résistance bactérienne aux antibiotiques

Depuis l'introduction des antibiotiques dans l'arsenal thérapeutique des maladies infectieuses, les microorganismes ont développé des moyens de défense leur conférant une insensibilité aux antibactériens. Ces résistances aux antibiotiques aux doses thérapeutiques apparaissent plus ou moins rapidement selon la complexité chimique des antibiotiques et du patrimoine génétique de la bactérie. Actuellement quelque soit l'antibiotique utilisé, il existe des souches de différentes espèces bactérienne qui leur sont résistantes. Il existe pour l'instant quelques exceptions comme l'absence de souches de *S. pyogenes* résistante à la Pénicilline G. Le mécanisme de résistance peut avoir comme support génétique, un gène d'origine plasmidique ou chromosomique. La réponse de la bactérie est souvent complexe (Bryskier *et al.*, 1999).

Toutes les espèces ou genres bactériens sont concernés par le phénomène de la résistance aux antibiotiques posant parfois de véritables problèmes thérapeutiques.

La résistance aux antibiotiques est un phénomène universel, qui semble plus aigu dans certains pays en voie de développement du fait de la « monotonie » des antibiotiques utilisables. Dans les pays industriels, le même phénomène peut être décrit du fait de pression sélective dans un hôpital donné, ceci a été bien démontré avec l'usage intensif en monothérapie de la ceftazidime ou l'usage excessif de l'imipenème dans les unités de soins intensifs qui a permis l'émergence de *Stenotrophomonas maltophilia* (Bryskier *et al.*, 1999).

### 1. Définition

Un antibiotique est :

- Une molécule toxique (microbiostatique ou microbicide) pour un groupe cible de micro-organismes (bactéries, champignons, virus, parasites eucaryotes)
- Spécificité d'un mode d'action.
- Active à des concentrations faibles de l'ordre du  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ .
- Généralement synthétisé par un microorganisme mais souvent modifié chimiquement, synthétisé entièrement en industrie.
- Peu toxique pour les cellules eucaryotes supérieures, donc utilisables par voie général.

Ainsi on pourra parler d'antibiotiques antifongiques, et à la limite antimicrobien ; pour ces derniers il faut préciser qu'il existe des antibactériens comme les sulfamides qui sont aussi actifs sur certains parasites eucaryotes. Des antibiotiques toxiques existent main ne sont évidemment pas utilisés (Carbon *et al.*, 1995).

## 2. Principaux antibiotiques et leur classification

La classification des antibiotiques n'est pas aisée : à l'heure actuelle, les antibiotiques sont regroupés selon leur nature biochimique.

**Tableau V:** Les grandes classes d'antibiotiques avec les plus usuelles. (Il inclue les molécules artificielles (Joffin et Leyral, 1991).

Classe d'Antibiotiques	Exemples
Aminosides	Streptomycine, Kanamycine, Gentamycine, Néomycine, Tobramycine, Amykacine, Netlimicine
Antifongiques	Amphotéricine B, Fluorocystosine, Kétoconazol
Antituberculeux particulier	Ethambutol, Isoniazide
Bétalactamines – Pénams	Pénicilline G Méthicilline, Oxacilline (anti- Staphylococcus) Amino-Pénicilline (Ampicilline) Carboxy-Pénicillines (Carbénicilline) Uréido-Pénicillines(Azlocilline)
Béactamines-Oxapenam	Acide clavulanique
Bétalactamines-Carbapenems	Imipénème
Bétalactamines-Cephemset Oxacephem (Céphalosporines)	Céfalotine, Céfamandole Céfotaxime, Céfopérazone.....
Bétalactamines-Monobactams	Aztréonam
Bétalactamines-Pénicillines	Pénicilline G, Ampicilline, Méthicilline, Oxacilline, Amoxicilline
Fosfomycine	Fosfomycine
Lincosamides	Clindamycine, Lincomycine
Macrolides	Erythromycine, Spiramycine, Josamycine
Nitrofuranes	Nitrofurantoine
Nitro-5-Imidazolés	Métronidazole....
Phénicolés	Chloramphénicol, Thiamphénicol
Polypeptides	Bacitracine, Colistine, Polymyxine
Quinolones	Acide nalidixique.....
Sulfamides-2-4- pyrimidines(Sulfones)	Sulfaméthoxazole Triméthoprime....
Streptogamines	Pristinamycine, Virginiamycine
Tétracyclines	Tétracycline, Minocycline....
Vancomycine	Vancomycine

## **2.1. Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane**

### **2.1.1. Béta-lactamines**

Elles inhibent la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane et comporte toutes le noyau Béta-lactame. Elles sont séparées en trois groupes en fonction des cycles et des radicaux associés :

**Groupe I :** Pénames, Carbapénems et Clavames.

**Groupe II :** Céphèmes et Oxacéphèmes

**Groupe III (monobactames)**

### **2.1.2. Fosfomycine**

Elle agit au début de la synthèse du peptidoglycane et est le représentant unique de cette famille.

### **2.1.3. Glycopeptides**

Ils comprennent la vancomycine et la teicoplanine qui inhibent la synthèse de la paroi en de fixant sur le dipeptide D-ala-D des précurseurs du peptidoglycane.

## **2.2. Antibiotiques inhibiteurs des synthèses protéiques**

### **2.2.1. Aminoglycosides**

Ils sont constitués par un ou plusieurs cycles glucosidiques liés à un aminocyclitol et agissent au niveau des ribosomes.

### **2.2.2. Macrolides, Lincosamines, Streptogramines.**

Ils se fixent au niveau de la sous unit é 50 S des ribosomes.

### **2.2.3. Tétracyclines**

Elles se fixent sur la sous-unité 30 S des ribosomes. Les molécules actuellement les plus utilisés sont la doxycycline et la minocycline.

### **2.2.4. Chloramphénicol**

Il se fixe sur la sous unité 50 S du ribosome.

### **2.2.5. Acide fusidique**

Il inhibe la phase d'élongation de synthèse protéique (Carbon *et al.*, 1995).

### **2.3. Antibiotiques inhibiteurs des acides nucléiques**

#### **2.3.1. Quinolones**

Elles agissent au niveau de l'ADN gyrase.

#### **2.3.2. Rifampicines**

Elles se fixent sur l'ARN polymérase et bloquent la synthèse des ARN messagers. On distingue la rifamycine SV et la rifampicine.

#### **2.3.4. Nitro-imidazolés**

Ils agissent essentiellement sur les bactéries anaérobies qui réduisent le groupement NO<sub>2</sub> de la molécule. Après réduction, les dérivés se fixent sur l'ADN et provoquent des coupures des brins et son déroulement.

#### **2.3.5. Nitrofuranes**

Ils agissent au niveau de l'ADN, après réduction de leur groupement NO<sub>2</sub>.

### **2.4. Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des folates**

#### **2.4. 1. Sulfamides**

Ils inhibent la dihydroptéroate synthétase et diminuent donc la synthèse d'acide dihydrofolique.

#### **2.4.2. Diaminopyrimidines**

Ils agissent par inhibition des dihydrofolate réductases bactériennes. Le principal produit est triméthoprime.

#### **2.4.3. Polymixines**

Elles agissent au niveau de la membrane des bacilles à Gram négatif, puis de la membrane cytoplasmique. Les deux molécules utilisées sont la polymixine B et la polymixine E (colistine).

#### **2.4.4. Antituberculeux**

L'isoniazide inhibe la synthèse des acides mycoliques et l'oxydation du NADH en NAD. Le pyrazinamide a un mécanisme d'action proche. L'éthambutol inhibe la fixation des acides mycoliques à la paroi de la mycobactérie (Carbon *et al.*, 1995).

### 3. Mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques

La découverte et l'utilisation clinique de sulfamidés lors des années 30, puis de la pénicilline au début des années 40, nous a longtemps permis de considérer les antibiotiques comme étant les armes parfaites qui sauraient éradiquer toutes maladies infectieuses d'origine bactérienne. Toutefois, l'utilisation abusive de ces composés, que ce soit dans le domaine médical ou agroalimentaire, a eu pour conséquence l'apparition progressive d'une multitude de mécanismes de résistance chez ces microorganismes. Au cours des années 90, il a été question de différentes épidémies de souches multirésistantes, tels les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV), les staphylocoques résistants à la méthicilline (SARM) ainsi que les pseudomonas multirésistants qui rendent maintenant difficile et parfois impossible le traitement de ces infections d'origine bactérienne (Roy, 2000).

La propagation d'organismes pathogènes résistants aux antibactériens est une des menaces les plus sérieuses pour un traitement efficace d'une maladie. Cette section décrit les moyens par lesquels les bactéries acquièrent une résistance aux antimicrobiens et comment la résistance se propage au sein d'une population bactérienne.

Les bactéries deviennent résistantes aux antibiotiques de différentes manières. Il faudrait préalablement noter qu'un type particulier de mécanisme de résistance n'est pas réservé à une seule catégorie de substances. Deux bactéries peuvent utiliser des mécanismes différents pour résister à un même agent chimiothérapeutique. En outre, des mutants résistants apparaissent spontanément et sont ensuite sélectionnés. Les mutants ne sont pas créés directement par une exposition à un antibiotique (Prescott *et al.*, 2003).

#### 3.1. *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

Deux principaux mécanismes sont impliqués dans la résistance acquise de *S. aureus* aux Béta-lactamines : la production de Béta-lactamases et la modification de la cible des antibiotiques (Corne, 2004).

##### 3.1.1. Production de B-lactamases

Les Béta-lactamases staphylococciques appartiennent au sous-groupe 2a dans la classification de Bush. Ce sont des enzymes le plus souvent de support plasmidique ou transposable et sont extrêmement fréquentes, retrouvées chez 80 % à 90 % des isolats de *S. aureus*. Ces enzymes sont libérées dans le milieu extracellulaire et inactivent la Pénicilline G, les aminopénicillines (ampicilline, amoxicilline), les carboxypénicillines (ticacilline) et les ureidopénicillines (piperacilline), alors que les pénicillines M (méthicilline),

les céphalosporines et les carbaénèmes (imipenème) sont peu ou pas hydrolysés, Les inhibiteurs de Béta-lactamases comme l'acide clavulanique restaurent l'activité des pénicillines (Cavallo *et al.*, 2004).

Les Béta-lactamases staphylococciques sont inductibles, la méthicilline et le céphotaxime étant les inducteurs les plus puissants (Hamdad *et al.*, 2006).

Lorsque la souche hyperproduit sa pénicilline, l'oxacilline a une activité diminuée sans toutefois que la souche puisse être classée résistante. La souche est dite alors « Borderline » (BORSA) (Hamdad *et al.*, 2006).

### 3.1.2. Modification de la cible

La résistance par modification de la cible moléculaire est un mécanisme plus fréquent pour la résistance aux Béta-lactamines. La cause génétique de la résistance des SARM est la synthèse d'une cinquième PLP additionnelle, la PLP2a (ou 2'), caractérisée par une faible affinité à la méticilline et pour toutes les autres Béta-lactamines, par contraste avec les quatre PLP (PLP1, 2, 3 et 4) présentes naturellement et qui sont impliquées dans la biosynthèse du peptidoglycane (Corne, 2004 ; Hamdad *et al.*, 2006).

Contrairement aux autres PLP, la PLP2a est capable de réaliser à elle seule la polymérisation de la paroi bactérienne. Cependant la paroi bactérienne synthétisée par la PLP2a comporte des altérations morphologiques (diminution du degré de réticulation, prédominance de monomères ou dimères) qui ne sont pas favorables à la bonne croissance de la bactérie (Corne, 2004).

La PLP2a est codée par le gène *mecA* dont l'expression dépend au moins de deux systèmes régulateurs agissant au niveau transcriptionnel : le système de gènes *mecI* et *mecRI* situés en amont du gène *mecA* et le système *bll* et *blrI* situés en amont du gène *blaZ* de la pénicillinase. La protéine MecR, produit du gène *mecRI*, agirait comme transducteur de signal et détecte la présence de B-lactamines grâce à son domaine extracellulaire. Un fois, l'antibiotique lié, il y a activation du domaine intracellulaire. Celui-ci subirait une activation par protéolyse limitée lui conférant une activité protéasique. Cette dernière conduit à la dégradation du MecI répresseur de la transcription codé par *mecI* fixé au niveau de l'opérateur d'où libération de ce dernier et expression du *mecA* (Roy, 2000).

Il existe également des souches de *S. aureus* présentant une résistance limitée ou de bas niveau à la méticilline et qui n'expriment ni le gène *mecA* ni le *blaZ*. Ce sont en fait les souches appelées MODSA (pour modified *S. aureus*) dont la résistance est due soit à la diminution de la synthèse et/ou de l'affinité d'une des PLP soit une hyper production de PLP4 (Djoudi, 2007 ; Hamdad *et al.*, 2006).

### **3.2. La résistance des entérobactéries aux B-lactamines**

#### **3.2.1. Mécanisme de résistance aux B-lactamines**

##### **3.2.1.1. Résistance par imperméabilité cellulaire**

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des Béta-lactamines, à travers la membrane externe constituée de phospholipides s'effectue à travers les porines.

La sensibilité aux Béta-lactamines dépend du nombre de porines fonctionnelles. L'altération de ces dernières par mutation est à l'origine de résistance acquise aux Béta-lactamines, soit par une modification structurale d'une porine, ce qui a été chez *E. coli* soit par une diminution quantitative des porines, qui est la situation la plus fréquente (Cavallo et al., 2004).

Deux porines principales sont présentes chez *E. coli* : OmpF et OmpC. Les isolats cliniques d'*E. coli* caractérisée par une altération ou expression réduite de porines de type OmpC et/ou OmpF ont une susceptibilité réduite aux Béta-lactamines (Roy, 2000).

Chez *K. pneumoniae*, il existe un phénotype de résistance à la céfoxitine, assurée par la perte des porines OmpK 35 et Omp K36 (Roy, 2000).

Ce mécanisme de résistance s'exprime généralement à bas niveau, peut toucher de multiples familles d'antibiotiques et il est souvent associé à d'autres mécanismes de résistance : efflux et/ou production de Béta-lactamases (Bonnet, 2006).

##### **3.2.1.2. Excrétion par des systèmes d'efflux**

La résistance acquise aux Béta-lactamines peut résulter de l'expression active de l'antibiotique, dite par hyper expression de systèmes d'efflux, Elle a été décrite initialement chez les bactéries à GRAM négatif comme *E. coli*, *P. aeruginosa* ou *N. gonorrhoea*, puis plus récemment chez les bactéries à Gram positif (Cavallo et al., 2004).

L'hyperexpression se fait souvent suite à des mutations survenant dans les gènes répresseurs qui régulent la transcription des systèmes transporteurs, comme par exemple, l'hyperproduction de l'activateur transcriptionnel MarA (multiple antibiotic resistance) chez *E. coli* est capable de stimuler l'expression de nombreux gènes dont certains codent pour des pompes d'efflux actives comme system AcrAB (Roy, 2000).

### 3.2.1.3. Résistance par production de B-lactamases

Les Béta-lactamases catalysent de manière efficace et irréversible l'hydrolyse de la liaison amide du cycle Béta-lactamines des antibiotiques de la famille des Béta-lactamines, donnant un produit biologiquement inactif qui perd totalement son activité antimicrobienne. Ainsi, les pénicillines dégradées en acide pénicillinoïque et les céphalosporines en acide céphalosporoïque. Ces enzymes sont localisées au niveau de l'espace périplasmique chez les bactéries à Gram négatif (Barrial et Scott, 2006 ; Gangoue-Pieboji, 2007).

### 3.2.2. Les entérobactéries productrices de B-lactamases à spectre élargie

Les enzymes, dénommées Béta-lactamases à spectre élargie ou étendu (BLSE) constituent un vaste groupe de Béta-lactamases véhiculées habituellement par des plasmides. Elles ont été initialement découvertes chez *Klebsiella sp* en 1983 en Allemagne, puis en 1984 chez *Klebsiella pneumoniae* et *E. coli* en France et en Tunisie (Mirabaud, 2003 ; Philippon et Arlet, 2006)

Ces enzymes ont la propriété commune de conférer la résistance aux pénicillines, à la 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> génération de céphalosporines, aux monobactames (aztreonam). En revanche, elles n'inactivent pas les céphamycines (cefoxitine, cefotetan...), ni les carbapénèmes (imipenème) (Mirabaud, 2003).

Les souches BLSE sont très souvent résistantes aux, aminosides, en particulier à la tobramycine et l'amikacine et aux fluoroquinolones (Jarlier, 2004 ; Gangoue-Pieboji, 2007).

L'utilisation des techniques moléculaires et la détermination des séquences peptidiques ont permis de démontrer que la plupart part des BLSE dérivent des pénicillines déjà connues (TEM-1 , TEM-2 et SHV-1 ), par changement au niveau de certains nucléotides et entrainer la modification d'acides aminés situés au niveau de la partie active de l'enzyme, aboutissant à l'hydrolyse de certains antibiotiques et par conséquent à la résistance des bactéries porteuses de BLSE (Mirabaud, 2003 ; Gangoue-Pieboji, 2007).

#### ❖ B-lactamase de type CTX-M

Les BLSE constituent un nouveau groupe de B-lactamases plasmidiques. Ces enzymes hydrolysent très fortement le céfotaxime et faiblement la céftazidime. Elles sont signalées de plus en plus souvent et dans de nombreux pays chez certaines entérobactéries comme *E. coli*, *S. enterica sérovar typhimurium*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *Citrobacter spp* et *Enterobacter spp* (Cavallo et al., 2004).

### 3.3. Les bactéries multirésistantes (BMR)

Les bactéries sont dites résistantes ou multirésistantes (BMR) lorsque, du fait de l'accumulation de résistances naturelles ou acquises, elles ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques habituellement actifs en thérapeutique. Les BMR ne sont pas plus pathogènes ni plus virulentes que les espèces sensibles mais elles sont plus difficiles à traiter et causent des échecs thérapeutiques (C.CLIN-Ouest, 2002).

Les BMR concernent d'abord les infections hospitalières ; les entérobactéries productrices de Béta-lactamases à spectre étendu, *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM), entérocoques résistant à la vancomycine, *Acinetobacter baumannii* multirésistant et *Pseudomonas aeruginosa* multirésistant (Giamarellou, 2006).

Mais aussi communautaire comme les pneumocoques ou bacille de la tuberculose multirésistant, *Salmonella typhimurium* multirésistante.

### III. *Ruminococcus gnavus*

#### 1. Généralités

C'est une bactérie anaérobie obligatoire, non sporulée, immobile ou mobile avec un à trois flagelles, coccie Gram positif qui se présente en chaînettes ou par paires. Les cellules sont souvent légèrement allongées avec les extrémités relativement coniques (**figure 3**).



**Figure 3:** *Ruminococcus gnavus* ATCC 29149.

#### 2. Caractères biochimiques

D'après Moore *et al.* (1976), certaines des caractéristiques biochimiques de 23 isolats de ces espèces sont rapportées dans le **tableau VI**.

*R. gnavus* est identifiée par sa nature fortement fermentative, les hydrates de carbone fermentés, et la production d'éthanol, et d'acides acétique et formique en grande quantité.

**Tableau VI:** Clefs de différenciations présomptives des espèces de *Ruminococcus* (Moore *et al.*, 1976).

Fermentation of:					Fermentation products	Suggested species			
Cellobiose	Arabinose	Mannitol	Lactose	Maltose					
+ <sup>a</sup>	+				A2(l,s) <sup>b</sup>	<i>R. obeum</i>			
					SA(FI,py)	<i>R. callidus</i>			
	-				ASF(l)	<i>R. flavefaciens</i>			
					A2(fsl)	<i>R. albus</i>			
-	+				FAI2	<i>R. gnavus</i>			
		-	+				FLAs	<i>R. lactaris</i>	
			-	+				La2(fs)	<i>R. torques</i>
				-				a2(lfpb)	<i>R. bromii</i>

<sup>a</sup> +, hydrate de carbone fermenté ; -, hydrate de carbone non fermenté.

<sup>b</sup> a, acide acétique ; b, acide butyrique ; f, acide formique ; l, acide lactique ; p, acide propionique ; py, acide pyruvique ; s, acide succinique ; 2, éthanol.

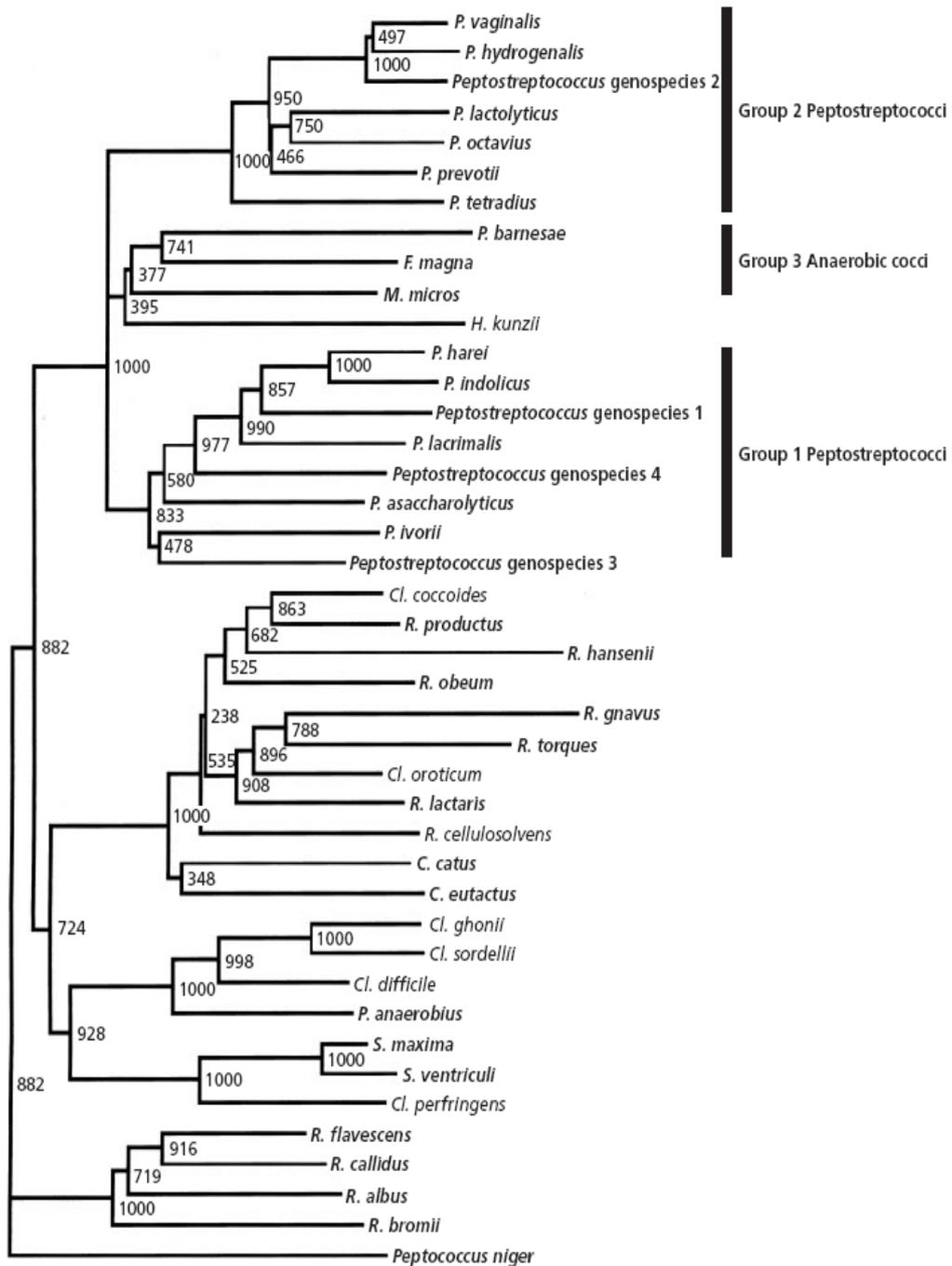
Les majuscules indiquent 1 meq (ou plus) par 100 ml de culture ; les minuscules indiquent plus moins de 1 meq/100 ml de culture. Des produits entre parenthèses ne sont pas uniformément détectés.

### 3. Phylogénie

Les coques anaérobies obligatoires et Gram positif étaient autrefois classés dans la famille des Peptococcaceae Kluyver et van Niel 1936 (Rogosa, 1974).

Cette famille a inclu les genres Ruminococcus, Coprococcus, Sarcina, Peptococcus et Peptostreptococcus. La plupart des membres de ces genres appartiennent au phylum Firmicutes. Les Sarcina ont une similitude de 95% avec *Clostridium perfringens* et sont liés au groupe Clostridial I. (Li *et al.*, 1994 ; Collins *et al.*, 1994) *Peptostreptococcus anaerobius* a été associé au *Clostridium sordellii* du groupe Clostridial XI (Collins *et al.*, 1994).

Les Ruminococci sont réparti dans deux différents phyla importants (Rainey et Janssen, 1995). Ainsi, tous les types d'espèces des membres de la famille Peptococcaceae sont reclassifiés en trois groupes Clostridiales. Ceci signifie que la famille Peptococcaceae n'est plus une classification légitime.



**Figure 4:** arbre phylogénétique de coques anaérobies basées sur des ordres du rDNA 16S.

Le caractère gras indique les coques anaérobies obligatoires.

Des genres sont abrégés comme : **P.**, Peptostreptococcus ; **F.**, Finegoldia ; **M.**, Micromonas ; **H.**, Helcococcus ; **Cl.**, Clostridium ; **S.**, Sarcina ; **C.**, Coprococcus ; **R.**, Ruminococcus ; **E.**, Eubacterium.

**Groupe 1:** Utilisation de la peptone comme source d'énergie importante et le butyrate en tant que leur produit final métabolique. Ce sont des microorganismes non-saccharolytiques.

**Groupe 2 :** Ce sont des microorganismes saccharolytiques et produisant le butyrate comme produit final métabolique important.

**Groupe 3 :** Contient *Peptostreptococcus barnesae* et deux espèces nouvellement reclassés : *Finegoldia magna* et *Micromonas micros* (Murdoch et Shah, 1999).

#### 4. Classification

Selon Moore *et al.* (1976) *Ruminococcus gnavus* est classée comme suit :

**Domaine:** Bacteria

**Phylum:** Firmicutes

**Classe:** Clostridia

**Ordre:** Clostridiales

**Famille:** Ruminococcaceae

**Genre:** Ruminococcus

**Espèce:** *Ruminococcus gnavus*

### 5. La Ruminococcine A

#### 5.1. Définition

La Ruminococcine A, est une bactériocine \* produite par une souche de *Ruminococcus gnavus*, isolée à partir des fécès humains.

Une fois cultivée en présence de la trypsine, la souche de *Ruminococcus gnavus* E1, isolée à partir d'un échantillon fécal humain, produit une substance antibactérienne dans le surnageant. Cette substance, appelée ruminococcine A, a été purifiée par chromatographie en phase inverse. Il s'est avéré que cette bactériocine a un PM de 2,675 Da hébergeant une structure de lanthionine. La ruminococcine purifiée est active à l'égard de divers *Clostridium* pathogènes et les bactéries phylogénétiquement apparentées à *R. gnavus*. C'est le premier rapport sur la caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie strictement anaérobie à partir du microbiote fécal humain (Dabard *et al.*, 2001).

---

\* Klaenhammer (1988) définit les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice. Les bactériocines sont représentées par 4 classes de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action.

## 5.2. Classification de la Ruminococcine A

D'après Klenhammer. (1993) les bactériocines ont été divisées en quatre classes principales dont la classe des lantibiotiques: sous classe IIa à laquelle appartient la ruminococcine A.

La Ruminococcine A appartient à la sous-classe IIa de lantibiotiques qui contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toutes une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus **YGNGV** ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action (Fimland *et al.*, 2000 ; Richard *et al.*, 2006).

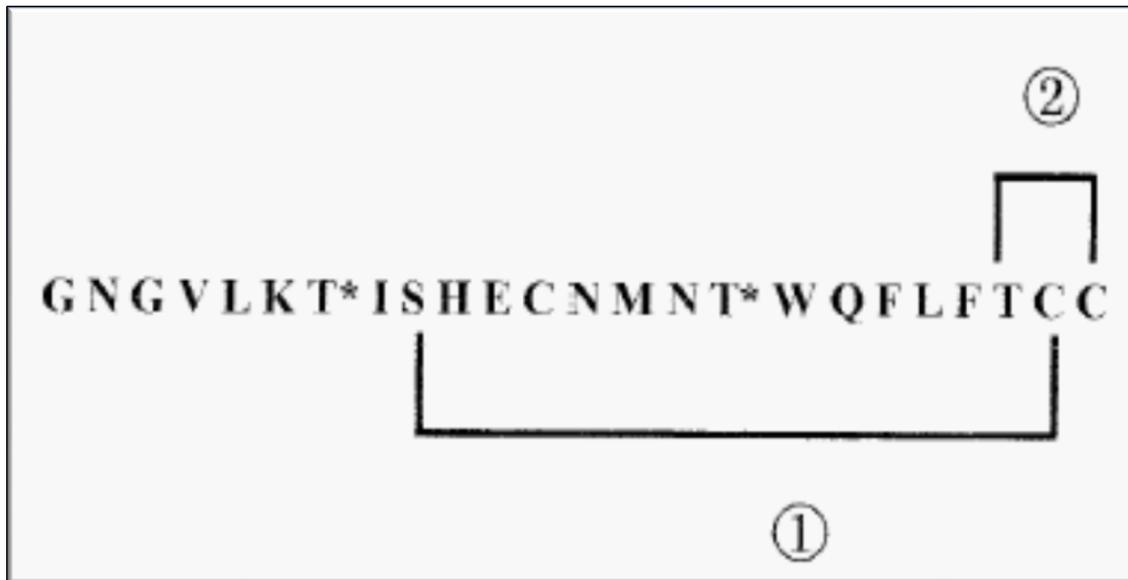
Elles ont toutes une activité contre *Listeria monocytogenes*. Certaines bactériocines de cette sous-classe contiennent également un deuxième pont disulfure dans leur domaine C-terminale qui semble être important dans la stabilisation de la structure tertiaire. Il semble par ailleurs qu'il leur conférerait une meilleure activité antimicrobienne, une meilleure résistance à l'exposition à des hautes températures et un spectre d'action plus large (Eijsink *et al.*, 1998 ; Fimland *et al.*, 2000 ; Drider *et al.*, 2006 ; Richard *et al.*, 2006).

## 5.3. Structure de la Rum A

La structure hypothétique de la RumA considérant la présence du motif TCC dans sa séquence C-terminale, la mesure de la masse moléculaire de la molécule (2.675 Da) la fait nécessaire de considérer la présence de deux Dhb non réagis, l'un Lan, et l'autre le résidu Met-Lan. Puisque les résidus Met-Lan sont bien connus pour étant responsables des colmatages pendant la dégradation d'Edman, Dhb7, Dhb167, et Cys12 ne peuvent pas être impliqués dans une telle structure. L'association entre Ser9 et Cys12 dans une structure de Lan n'est pas possible, depuis la réaction de CNBr a accentué la présence d'une liaison covalente enjambant le résidu Met14. Ainsi, il est fortement probable que (i) Ser9 et les Cys23 putatifs et (ii) les His22 et les Thr24 putatifs soient associés dans un Lan et un résidu Met-Lan, respectivement (**Figure : 5**).

Dhb7 et Dhb16 non réagis des résidus sont notés comme T\* ; les numéros cerclés 1 et 2 indiquent les structures LAN et Met-Lan putatives, respectivement (Dabard *et al.*, 2001).

L'utilisation de la dégradation d'Edman et des techniques tandem de spectrométrie de masse, suivies de l'ordonnement d'ADN d'une partie du gène de structure, ont permis l'identification de 21 résidus d'acides aminés. La similitude à d'autres bibliothèques actuelles de bactériocines dans l'ordre a fortement suggéré l'appartenance de la ruminococcine A à la classe IIA de lantibiotiques (**Figure : 6**).



**Figure 5:** Séquence d'acides aminés de la Rum A.

① ② : Ponts disulfures.



**Figure 6:** Alignement multiple d'ordre de RumA avec homologue dactylographié de lantibiotiques d'IIA. RumA a été comparé aux ordres de peptide du butyrvibriocin OR79A (Bvi79A) (13), du lacticin 481 (LctA) (22), du variacin (VarA) (23), du streptococcin A-M49 et de l'A-FF22 (ScnA) (8, 9), et mutacin II (MutA).

#### 5.4. Mécanisme d'action de la Ruminococcine A

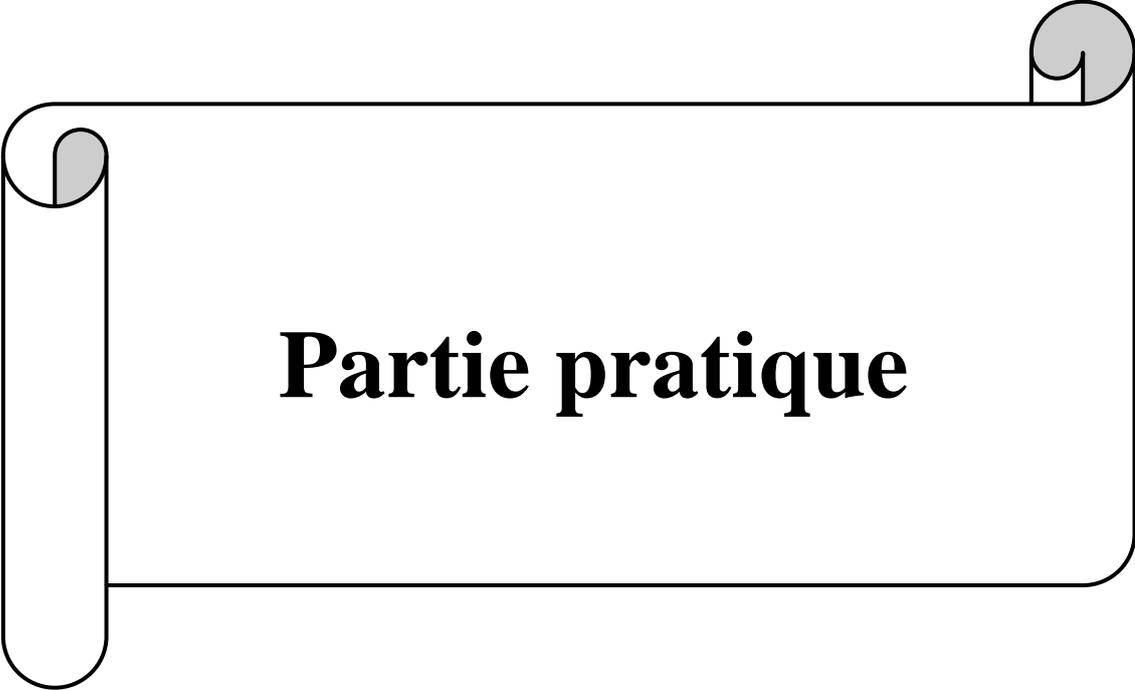
Le siège d'activité des bactériocines est la membrane cellulaire, raison pour laquelle les bactériocines n'ont pas d'activité contre les bactéries Gram-. Cependant, les mécanismes d'action des bactériocines sur la membrane sont variés (Dortu et Thonart, 2008).

Le mécanisme d'action de lantibiotiques de sous classe IIa dont la Ruminococcine A fait partie est l'interaction avec la membrane cellulaire de type électrostatique ou par liaison à des récepteurs spécifiques tels que le lipide II (undecaprenyl-pyrophosphoryl-MurNAc-pentapeptides-GlcNAc), un précurseur de peptidoglycanes. Suite à cette liaison, les lantibiotiques peuvent former des pores larges et non spécifiques dans la membrane cytoplasmique, ce qui va causer l'efflux rapide des petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP, etc. Cette augmentation de la perméabilité membranaire va conduire à la dissipation des deux composantes de la force proton motrice, à la cessation rapide des activités cellulaires et à la mort de la cellule. L'interaction avec le lipide II permet d'augmenter la stabilité des pores formés et de réduire la concentration du lantibiotique nécessaire à la formation des pores, mais peut également conduire à l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire (Twomey *et al.*, 2002). Les lantibiotiques de type A dissipent la force proton-motrice par formation de pores et interfèrent avec la synthèse des peptidoglycanes.

#### 5.5. Spectre d'activité de la Ruminococcine A

L'activité de la Rum A a été examinée contre différentes souches choisies comme suit :

- i Représentant Gram négatif anaérobie de bactéries de l'humain prédominant microbiote intestinal (*Bacteroides* spp).
- ii Représentant gram positif anaérobie de bactéries de l'humain prédominant microbiote intestinal (*Bifidobacterium* spp) ou phylogénétiquement étroitement lié à la souche E1 (*Ruminococcus* spp, *Eubacterium* sp; *Clostridium Oroticum* et *Clostridium nexile*).
- iii *Clostridium* pathogènes *C. difficile*, *C. perfringens*, *C.sordellii* de *C.*, *bifermentans* ; *C. sporogènes* ; *C. septicum* de *C.*, *histolyticum* et *C. botulinum* et *B. cereus*.
  - ❖ Toutes les souches de *Bacteroides* sp sont résistantes à la RumA.
  - ❖ Les souches de *Bifidobacterium* sp ont montré une sensibilité intermédiaire, sauf *Bifidobacterium longum*, qui était aussi sensible que *C. perfringens*.
  - ❖ Les souches phylogénétiquement liées à *R. gnavus* ont été sensibles à la RumA, à l'exception de *Ruminococcus torques* et *C. oroticum*.
  - ❖ Les espèces pathogènes de *Clostridium* ont été sensibles excepté *C. sporogènes*.
  - ❖ La plupart des souches de *B. cereus* étaient plutôt peu sensibles ou résistantes à l'activité de la RumA (Dabard *et al.*, 2001).



# **Partie pratique**



# **Matériel et méthodes**

## 1. Prélèvement et analyse des selles

Les selles sont recueillies à l'hôpital dès leur émission dans de boîtes de coprocultures. Une aliquote du volume d'une noix est prélevée à l'aide d'une spatule puis transféré dans un pot hermétique propre à usage unique le prélèvement est immédiatement acheminé au laboratoire.

Des données concernant les malades, tel que l'âge et le sexe ont été recueillies.

## 2. Isolement et purification des souches

L'isolement des différentes souches est réalisé selon la méthode classique de la recherche de germes pathogènes ; trois tubes ont servi pour l'enrichissement et qui se repartissent comme suit :

- **Tube 1** : Un tube de bouillon nutritif pour l'enrichissement d'*E. coli* et *Bacillus*.
- **Tube 2** : Un tube de Giolliti Cantoni additionné de tellurite de potassium pour l'enrichissement de *Staphylococcus*.
- **Tube 3** : Un tube de bouillon nutritif comptenant une couche d'huile de vasline (assurer l'anaérobiose) pour l'enrichissement de *Clostridium*.

Les trois tubes sont incubés à 37 °C/24 h.

Après incubation, un isolement par stries est effectué sur une boîte de Pétri contenant un milieu sélectif correspondant à chaque espèce recherchée :

- **EMB** : *Enterobacter* sp et *E. coli*.
- **Chapman** : *Staphylococcus*.
- **Viande Foie (additionné d'alun de fer et de sulfite de sodium)** : *Clostridium*
- **GNO ou Moselle** : *Bacillus*.

### ❖ Purification des souches

La purification de chaque souche est réalisée par 2 à 3 repiquages successifs sur le même milieu sélectif que celui de l'isolement de chaque espèce; une colonie suspecte est caractérisée par son aspect.

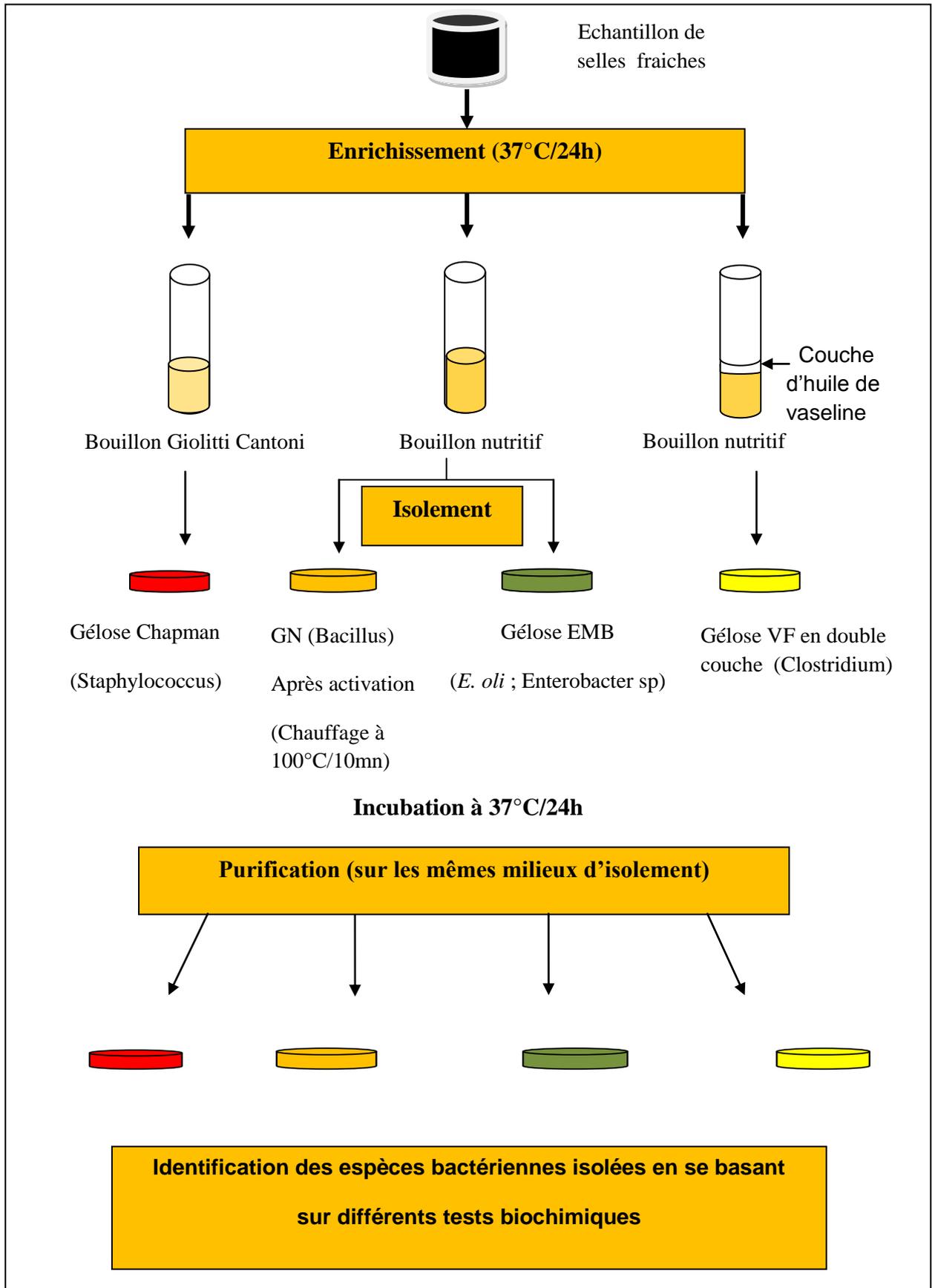


Figure 7: Isolement et purification des espèces bactériennes recherchées.

### 3. Identification

L'identification de chaque espèce est basée sur des mini galeries biochimiques, ainsi que des tests réalisés pour chaque souche après coloration de Gram et recherche de la catalase.

#### 3.1. Identification de *S. aureus*

On examine les différentes colonies ayant poussé sur gélose Chapman selon les critères macroscopiques suivants : la forme, la couleur, le bord, l'opacité, l'élévation et la surface. Procéder ensuite à la coloration de GRAM, au test de la catalase et de la coagulase afin d'identifier la souche.

Sur gélose Chapman, *S. aureus* forme des colonies jaunes. En 18 à 24 heures sur ce milieu on observe des colonies de 1 à 2 mm de diamètre produisant parfois un pigment jaune d'orée, et constitué de cocci à Gram (+) en amas, catalase (+) .

(Avril *et al.* , 2000).

Sur les colonies suspectes, on recherchera la coagulase :

##### 3.1.1. Recherche de la Coagulase

La propriété de *Staphylococcus aureus* de provoquer la coagulation d'un plasma recueilli sur anticoagulant est un critère important de son identification. Elle est due à la sécrétion d'une enzyme : la coagulase.

La staphylocoagulase possède une action voisine de la Thrombine plasmatique mais calcium indépendante.



Parmi les *Staphylococcus*, seul *Staphylococcus aureus* la possède. Certaines souches de *Staphylococcus aureus* peuvent en être dépourvues (10 à 15 en milieu hospitalier), la perte de la coagulase étant souvent liée à un traitement aux antibiotiques. L'observation du caractère coagulase – doit être donc confirmé par la mise en œuvre d'autres tests (protéine A, récepteur au fibrinogène, thermonucléase ...) (Joffin et Leyral, 1991).

A partir d'un milieu Chapman déjàensemencé, prendre une colonie ayant fermenté le Mannitol et la mettre dans un bouillon nutritif.

Placer le bouillon nutritif à l'étuve à 37 °C pendant 18 à 24 h.

Mesurer dans un tube à hémolyse :

- 0,5 ml de dilution de plasma (diluer le plasma en lui ajoutant le volume d'eau distillé indiqué sur le flacon).
- 0,5 ml de bouillon de culture.
- Agiter.

Porter au Bain Marie à 37°C.

Examiner les tubes toutes les ½ heures.

La coagulation doit apparaître en un temps inférieur à 3 h.

### **3.1.2. Recherche de la DNase**

Elle a pour but de déterminer la pathogénicité d'un staphylocoque.

Ensemencer une boîte DNase. Incuber à 37 ° C pendant 24 heures.

Inonder après 24 h avec la solution normale d' HCl.

Les colonies productrices de DNase sont entourées d'une zone claire (Joffin et Leyral, 1991).

### **3.2. Identification des Entérobactéries**

Les souches d' Entérobactéries isolées ont été identifiées par l'étude de plusieurs caractères biochimiques, le **tableau VII** représente les différents tests réalisés.

**Tableau VII:** Mini galeries biochimiques d'identification d'Enterobacter sp et d'*E. coli*.

Tests	Mode opératoire	Résultats positifs
Recherche de l'action de l'uréase	<p>L'hydrolyse de l'Urée en carbonate d'ammoniaque par l'uréase est un élément important de diagnostic des germes qui utilisent l'Urée comme seule source d'azote.</p> <p>A partir d'un milieu de culture ensemencé en culture pure, ensemencer une anse de platine bien pleine de germes dans un milieu Urée-Indole.</p> <p>Porter à l'étuve à 37 °C (6 heures à 18 heures).</p>	Le milieu jaune devient rouge.
Epreuve de Christensen au citrate	<p>Permet de tester l'attaque du citrate en milieu complexe et à pH 6.</p> <p>Ensemencer un milieu de Christensen au Citrate.</p> <p>Placer à l'étuve à 37 °C, 24 h à 48 h.</p>	Couleur rouge du milieu liée à l'alcalinisation.
Réaction au rouge de méthyle	<p>Elle a pour but l'identification des Entérobactéries par la recherche de l'acidification d'un milieu liquide glucosé.</p> <p>Mettre dans un tube à essai :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 5 ml de culture vieille de 5 jours dans le milieu Clark et Lubs.</li> <li>- 5 ml de réactif (rouge de méthyle).</li> </ul>	Le milieu jaune devient rouge.
production d'indole	<p>Prendre une culture de moins de 24 heures en milieu urée-indole.</p> <p>Verser quelques gouttes de réactif de Kovacs le long des parois du tube.</p>	Formation d'un anneau rouge en surface

<p>Vosges - Proskauer</p>	<p>Le produit mis en évidence est l'Hydroxy-3-butanol, appelée aussi : acétoine ou Acétyl –méthyl-carbinol, en réalité des dérivés aussi le sont dans cette réaction : Butane dione (diacétyl) et le Butane diol oxydé par l'oxygène de l'air en Hydroxy-3-butanone.</p> <p>Ensemencer un milieu Clark et Lubs, puis incubé à 37 °C 24 h.</p> <p>Transvaser une aliquote du milieu en tube à hémolyse.</p> <p>Ajouter les réactifs volumes à volume pour la réaction en tube) incliner le tube que l'on peut éventuellement chauffer au Bec bunsen.</p> <p>Attendre 10 min avant de conclure.</p>	<p>Coloration rouge : VP +</p>
<p>Croissance à 44 °C</p>	<p>un tube de bouillon nutritif est ensemencé, puis incubé à 44°C/24 h.</p>	<p>Apparition du trouble</p>
<p>Utilisation du Lactose, Glucose production de gaz et d' H<sub>2</sub>S</p>	<p>La pente du milieu Hajna-Kligler ou TSI est abondamment ensemencée par stries serrées ou par inondation et le culot par simple piqûre, à l'aide de la même pipette ou d'un fil droit.</p> <p>Le milieu est incubé 18 heures à 37 ° C.</p>	<p><b>Lactose + :</b> virage au jaune de la pente</p> <p><b>Glucose + :</b> virage au jaune au fond du tube.</p> <p><b>Gaz + :</b> apparition de poches gazeuses qui décollent la gélose du bas du tube.</p> <p><b>H<sub>2</sub>S + :</b> noircissement du tube.</p>

### **3.3. Identification de Bacillus et de Clostridium**

Sur chaque souche isolée des deux espèces les trois tests suivants sont réalisés :

#### **1. Coloration de Gram**

#### **2. Catalase**

#### **3. Recherche de la spore, qui est réalisée comme suit :**

- Réaliser un frottis et le fixer.
- Coloration : Recouvrir d'une solution de vert malachite à 5%. Chauffer jusqu'à émission de vapeurs. Laisser refroidir et chauffer à nouveau. L'opération doit durer 5 minutes.
- Epreuve : Laver à l'eau distillée.
- Contre coloration : Recouvrir la lame de safranine ou de fushine pendant 30 secondes.
- Laver, sécher entre deux feuilles de papier absorbant.
- Observer à l'objectif 100 ×10 à immersion.

La spore apparaît en vert foncé, et le corps bactérien en rose.

#### **3.3.1. Identification de Bacillus**

##### **1. Croissance à 50°C**

C'est un test clef qui permet la différenciation entre les espèces du genre Bacillus.

Des tubes du bouillon nutritif sont ensemencés à partir de colonies de souches pures.

Après incubation à 37°C/24h, la présence ou l'absence du trouble est notée ; traduisant l'aptitude d'une souche de croître ou non à cette température.

##### **2. Croissance en anaérobiose**

Des tubes du bouillon nutritif sont inoculés à partir de colonies, puis additionnés d'une couche d'huile de vaseline en surface pour assurer l'anaérobiose, et incubés à 37°C/24 h. La présence du trouble indique que la souche en question croît en anaérobiose, dans le cas de l'absence du trouble la souche est inapte à croître en condition d'anaérobiose, elle est dite aérobie stricte.

### **3. Dégradation de l'amidon**

Ce test permet de révéler la présence d'enzymes de dégradation de l'amidon : amylases ...etc. Ce milieu est préparé par l'addition de 4 % d'amidon à une gélose nutritive ordinaire et qui est ensemencé par strie centrale.

Après incubation à 37°C/24h, La révélation de la dégradation de l'amidon est mise en évidence en versant du bleu de méthylène sur les boîte de Pétri.

Dans le cas de réaction positive ; il y a apparition d'une zone claire autour des bactéries, ce qui signifie la présence d'enzyme de dégradation de l'amidon, dans le cas de réaction négative la coloration bleue persiste sur toute la surface des boîte de Pétri.

La préparation de la gélose à l'amidon est réalisée par l'ajout de 1 % d'amidon à une gélose nutritive ordinaire.

### **4. Dégradation de la gélatine**

Ce test permet la mise en évidence de l'enzyme appelée gélatinase qui dégrade la gélatine, il est également un test clef de caractérisation et d'identification de certains groupes bactériens.

La gélose à la gélatine est préparée en ajoutant de la gélatine à raison de 4 % à une gélose nutritive ordinaire (GNO).

Ce milieu de culture est inoculé avec un strie centrale tout au long des boîtes de Pétri.

Après incubation à 37°C/24h, la présence de la gélatinase est révélée par l'apparition d'une zone claire autour de la zone de croissance bactérienne (liquéfaction de la gélatine).

### 3.3.2. Identification de Clostridium

Les souches de Clostridium isolées sont identifiées par les tests regroupés dans le **tableau VIII**.

**Tableau VIII:** Identification de Clostridium.

Test	Mode opératoire	Résultats
Mobilité	Préparer un frottis à l'état frais	Mobile ou immobile
Production de Gaz et H <sub>2</sub> S	Ensemencer un tube de gélose viande foie additionné d'une couche d'huile de vaseline en surface, puis incubé à 37°C/24 h.	Formation d'une poche d'air dans le tube et souvent le décollement du fond. La réduction des sulfites se traduit par le noircissement du tube.

## 4. Antibiogramme

Toutes les souches ont fait l'objet d'un antibiogramme standard sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM 2009).

### 4.1. Standardisation de l'antibiogramme

La standardisation de l'antibiogramme sert à fixer l'inoculum de départ à 10<sup>8</sup> UFC/ml pour les bactéries à Gram positif et 10<sup>7</sup> UFC/ml pour les bactéries à Gram négatif (sauf pour Clostridium 10<sup>9</sup> UFC/ml), pour réaliser un dénombrement en boîte de Pétri pour chaque espèce isolée de: Bacillus, Staphylococcus, *E. coli* et Enterobacter sp.

Deux souches, l'une de Clostridium (18), et l'autre d' Enterobacter sp (59) parmi les souches isolées et trois souches de références : *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25223, *E. coli* ATCC 25298 (SAIDAL-Antibiotical) sont standardisées parmi chaque espèce en préparant une suspension de culture pure dans l' NaCl (0,9%) d'une densité optique équivalente à 0,5 (longueur d'onde de 625 nm). Chaque suspension, subit une série de dilutions décimales. Les milieux utilisés pour le dénombrement sont respectivement: gélose viande foie, GNO, Chapman et EMB (*E. coli* et Enterobacter sp), puis les boîtes sont incubées à 37°C/24h.

Après incubation, on détermine le nombre de bactéries en UFC/MI correspondant à DO = 0,5.

### **4.2. Mode opératoire de l'antibiogramme**

La méthode consiste à déposer à la surface de la gélose Mueller Hintonensemencée en bactéries, des disques d'antibiotiques à étudier.

Les molécules diffusent radialement dans la gélose pour constituer un gradient de concentration qui permet de déterminer l'effet antibactérien de chaque antibiotique. La sensibilité d'une souche se traduit par la forte inhibition de sa croissance autour d'un disque (présence d'un halo de grand diamètre). A l'inverse, lorsqu'une souche est résistante, elle se développe au contact ou à proximité du disque (absence ou présence d'un faible halo). Une souche est dite intermédiaire, lorsqu'elle présente une zone d'inhibition moyenne.

#### **4.2.1. Inoculum**

A partir d'une culture pure sur milieu d'isolement :

- Prélever à partir d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Décharger l'anse dans 3 ml d'eau distillée.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne.

#### **4.2.2. Ensemencement**

- Tremper un écouvillon dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en pressant fermement (en tournant) sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface de la gélose Mueller Hinton de haut en bas en stries serrées.
- Répéter l'opération trois fois en tournant la boîte de 60 ° C à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.
- Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- Les disques d'antibiotiques sont ensuite déposés sur la surface de la gélose Muller Hinton.
- L'incubation se fait à 30° C pendant 24 h.

Après l'incubation, on mesure le diamètre des zones d'inhibition, puis on exprime les résultats selon que la souche est sensible (S), résistante (R), ou intermédiaire (I).

### **5. Activité antibactérienne de la Ruminococcine A à l'égard de *Staphylococcus aureus***

#### **5.1. Test des disques**

##### **5.1.1. Première concentration de la Rum A au rotavapor**

Un volume de 7 ml du surnageant natif après décongélation à température ambiante est placé dans le dispositif de filtration contenant deux flacons : un flacon agité, chauffé à 50 °C et fermé hermétiquement. Un autre flacon contenant l'eau récupérée au cours de l'évaporation.

Un volume final de 3,5 ml (1/2 du volume initial: concentration à 50 %) est récupéré 8 heures après.

##### **5.1.2. Deuxième concentration de la Rum A par lyophilisation**

Un autre volume correspondant à 13,5 ml du surnageant natif est congelé dans des boîtes de Pétri bien fermées par le papier cellophane et trouées ; est lyophilisée pendant 24 h dans les conditions suivantes par un lyophilisateur de marque « CHRIST » réglé au condition:

- Pression = 5,8 Bars.
- Température = - 65 °C.

Un poids final de 1,3 g est récupéré à la fin de la lyophilisation.

- **Déshydratation**

Afin d'éliminer les traces d'humidité dans le lyophilisat, la quantité de la ruminococcine A récupéré à la fin de la lyophilisation (1,3 g) est séchée à l'étuve à 40 ° C pendant 24 h. On arrive donc à la fin à un poids sec de 1g de Ruminococcine A lyophilisée séchée.

### 5.1.3. Mode opératoire du test des disques

Un gramme du lyophilisat final séché est mélangé avec 3,5 ml du surnageant concentré au rotavapor ; puis la solution du mélange est agitée ensuite stérilisée par filtration sous vide sur membrane d'acetate de cellulose 0,22  $\mu\text{m}$ .

Cette solution du mélange constitue la solution avec laquelle sont réalisés les tests d'activité antibactérienne à l'égard de la souche retenue par la méthode des disques.

Une boîte de gélose Mueller Hinton bien séchée préalablement, est ensemencée par la méthode d'écouvillonnage par une suspension de la souche retenue à  $10^7$  UFC/ml.

25  $\mu\text{l}$  de la solution du mélange ont été versés à l'aide d'une micropipette en trois reprises: 10  $\mu\text{l}$ , 10  $\mu\text{l}$  puis 5  $\mu\text{l}$  à la surface des disques en papier « Wattman » stériles. Les disques sont séchés pendant 5 à 10 mn à l'air libre.

La diffusion de la bactériocine est réalisée sous une hotte à flux laminaire pendant 2 heures. Les boîtes sont ensuite incubés à 37 °C/24h. Après incubation les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés.

### 5.1.4. Vérification du test des disques

Pour confirmer l'apparition des zones d'inhibition, ainsi que la comparaison, la solution du mélange est testée par les deux méthodes, sur une souche de *Staphylococcus aureus* de référence ATCC 25223 fournie par l'hôpital d'Amizour de Bejaia.

### 5.2. Estimation de l'activité antibactérienne de la Ruminococcine A à l'égard de la souche retenue en milieu liquide

Une solution mère de la Ruminococcine A est préparée à raison de 100 mg/ml dans du bouillon BHI, stérilisée par filtration sous vide.

A partir de cette solution, différentes dilutions sont réalisées en ajoutant (5 ml, 4 ml, 3 ml, 2 ml et 1 ml) de la solution mère de Rum A à (4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml et 8 ml) du bouillon BHI stérile. On obtient alors 9 ml dans chaque tube que l'on inocule avec 1 ml d'une suspension de la souche retenue ( $10^7$  UFC/ml), pour avoir une concentration finale de  $10^6$  /ml de la souche retenue dans chaque tube.

Les concentrations de la Rum A correspondantes sont : 90 mg/ml, 50 mg/ml, 40 mg/ml, 30 mg/ml, 20 mg/ml, 10 mg/ml.

Un tube témoin est préparé avec la souche retenue dans du Bouillon BHI et sans la Rum A.

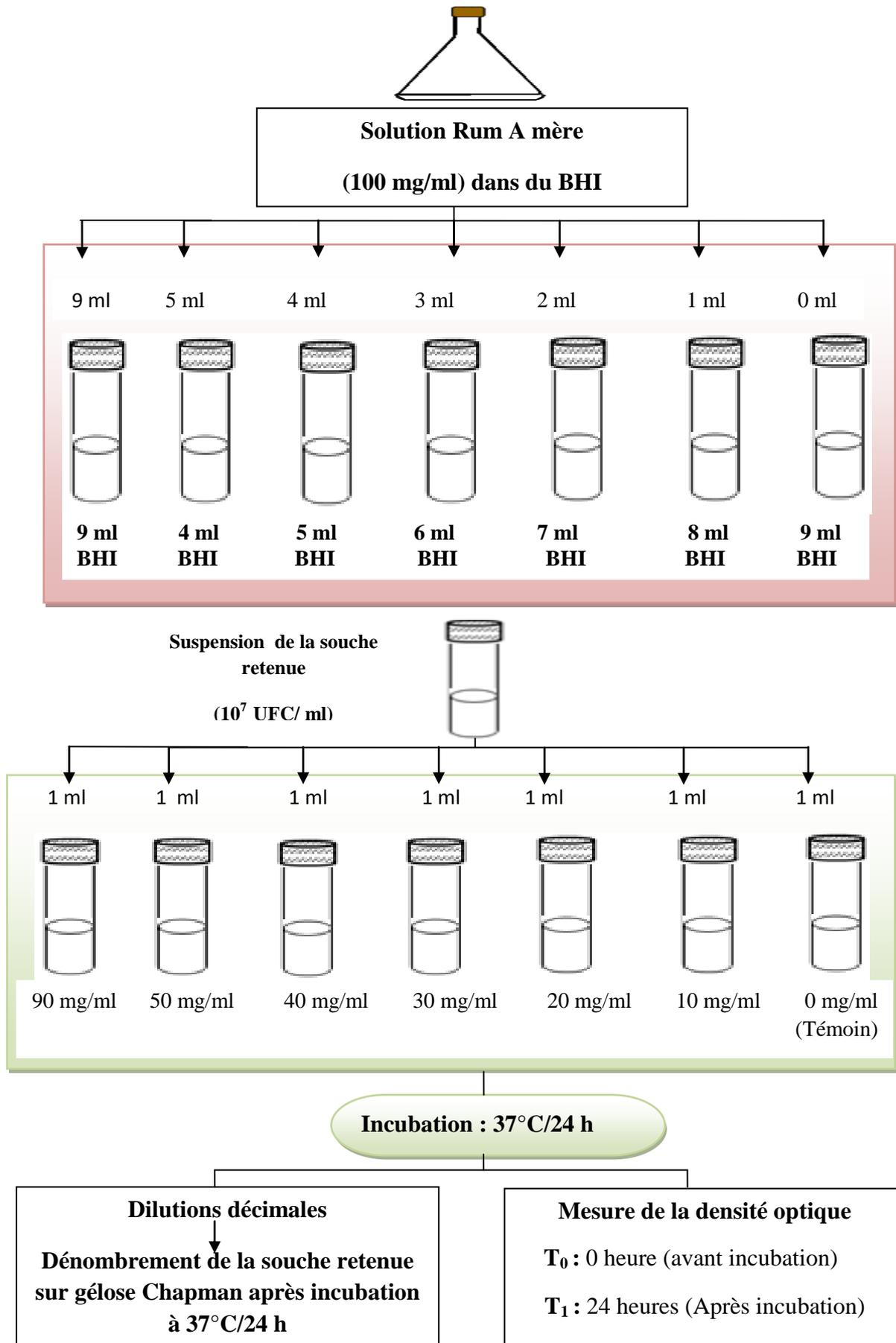
### **5.2.1. Mesure de la densité optique**

La mesure de la densité optique est réalisée pour chaque tube avant et après 24 heures d'incubation à 37°C, pour estimer le nombre de cellules viables à une DO = 625 nm

### **5.2.2. Activité antibactérienne de la Rum A à l'égard de la souche retenue dans le bouillon (BHI)**

Pour chaque tube, une série de dilutions décimales est préparée, puis un dénombrement est effectué sur gélose Chapman, après 24 heures d'incubation à 37°C.

Le protocole de mesure de la densité optique et du dénombrement de la souche retenue est résumé dans la **figure 8**.



**Figure 8:** Protocole de mesure de l'activité antibactérienne par la mesure de la densité optique et par le dénombrement de la souche retenue à différentes concentrations de la Rum A.

### 5.2.3. Activité antibactérienne de la Rum A à l'égard de la souche retenue dans le lait écrémé

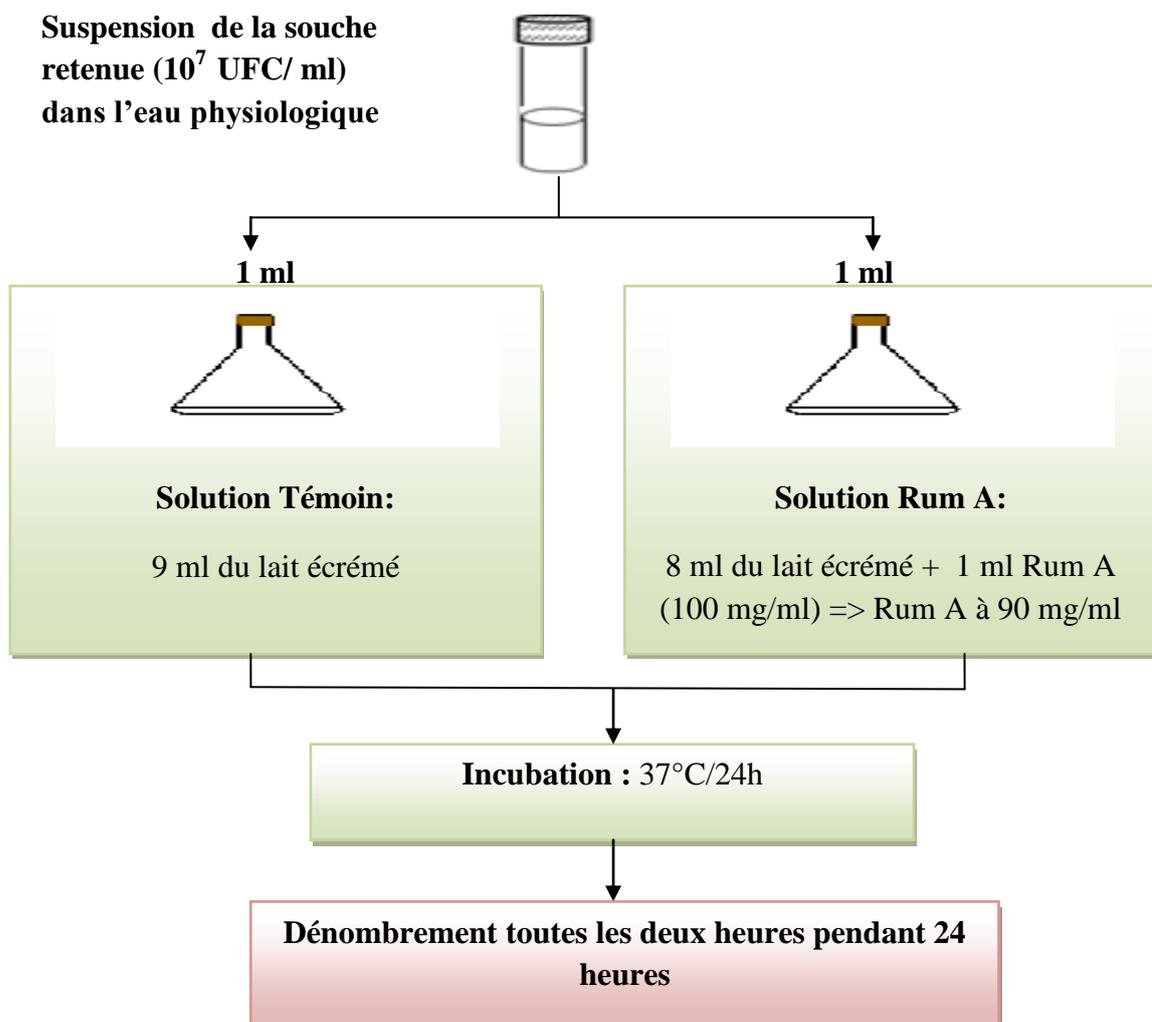
L'étude de l'antagonisme direct in vitro de la Ruminococcine A à l'égard de la souche retenue dans le lait écrémé a pour but de vérifier l'impact de cette substance à l'égard de la souche retenue dans ce milieu, qui sera utilisé par la suite pour l'étude in vivo.

Deux solutions sont préparées :

- **Solution Rum A** : Contient 8 ml du lait écrémé « Candia », la souche retenue ( $10^6$  UFC/ml) et la Ruminococcine A à une concentration de 90 mg/ml.
- **Solution témoin** : Contient 9 ml du lait écrémé, la souche retenue ( $10^6$  UFC/ml).

Le volume final des deux solutions est de 10 ml.

Les deux solutions sont incubées à 37°C, et un dénombrement sur milieu Chapman est réalisé toutes les deux heures en prélevant à chaque fois 1 ml de chaque solution.



**Figure 9:** Protocole de mesure de l'activité antibactérienne de la Rum A à l'égard de la souche retenue dans le lait écrémé.

### 5.3. Dosage du potassium cellulaire

#### 5.3.1. Étalonnage de l'appareil

La technique d'analyse par photométrie de flamme \* procède par comparaison avec une série de quelques solutions étalons dont les propriétés sont analogues aux solutions inconnues. Cet étalonnage de l'appareil doit être fait lors de chaque série de dosages. Peser 1,91 gramme de KCl dans une coupelle tarée.

- Mettre le KCl dans une fiole d'un litre complétée avec de l'eau bidistillée; on obtient une solution mère de 1,0 g/l de  $K^+$ .
- A partir de la solution mère, préparer des solutions de 2 mg/l, 4 mg/, 6 mg/l, 8 mg/l, 10 mg/l, 20 mg/l, 60 mg/l et 80 mg/l.

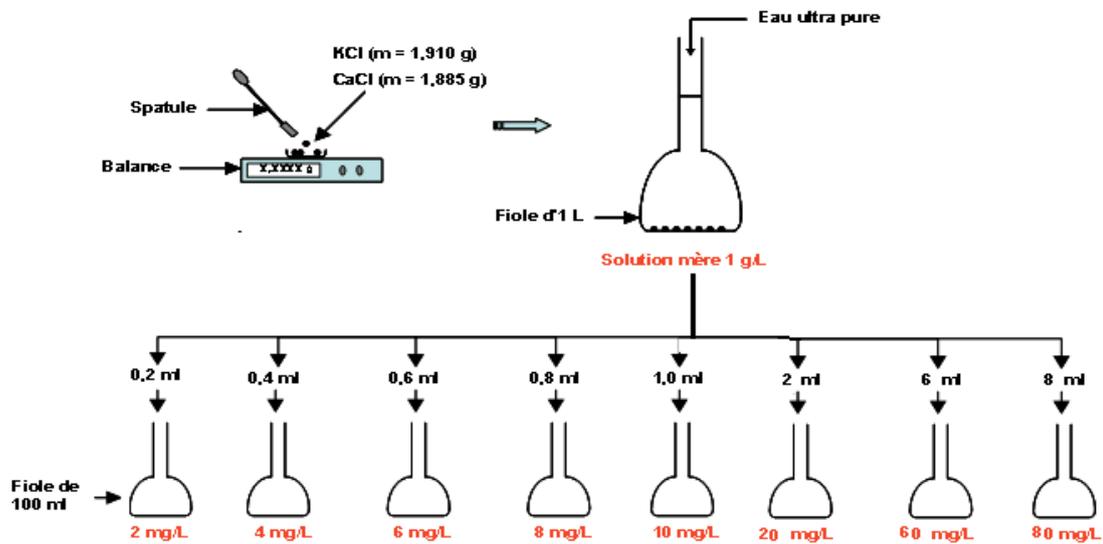
Ces solutions étalons de concentrations croissantes seront dosées au photomètre après avoir réglé le zéro, à partir de l'eau bidistillée.

Les étapes de la préparation de la gamme d'étalons du  $K^+$  sont représentées dans la **figure 10**.

---

\* Le photomètre de flamme permet l'excitation des atomes. Une flamme alimentée par du butane va exciter les ions alcalins et alcalinoterreux d'une solution.

Les ions à exciter sont sélectionnés, les ions  $K^+$ , grâce à un filtre spécifique. Une pompe à air va aspirer la solution d'échantillon à analyser et cet air va la fractionner en microgouttes. Les plus grosses vont être évacuées par un tuyau tandis que les microgouttes (environ 20% du volume aspiré) vont se diriger vers le brûleur où se trouve la flamme qui va exciter les ions qu'elles contiennent. Ces ions vont par la suite dégager un photon pour revenir à leur état fondamental. Un système optique va permettre de sélectionner les photons et le filtre va sélectionner les ions que l'on veut doser et absorber tous les autres. Une cellule photoélectrique va par la suite transformer l'énergie lumineuse en énergie électrique pour créer un signal qui sera amplifié par un amplificateur incorporé au photomètre (Lundegard, 1934).



**Figure 10:** Préparation de la gamme d'étalons de KCl.

### 5. 3.2. Examen des cellules de la souche retenue pendant l'incubation avec la Ruminococcine A

#### 1. Préparation des échantillons à analyser

Deux flacons sont préparés :

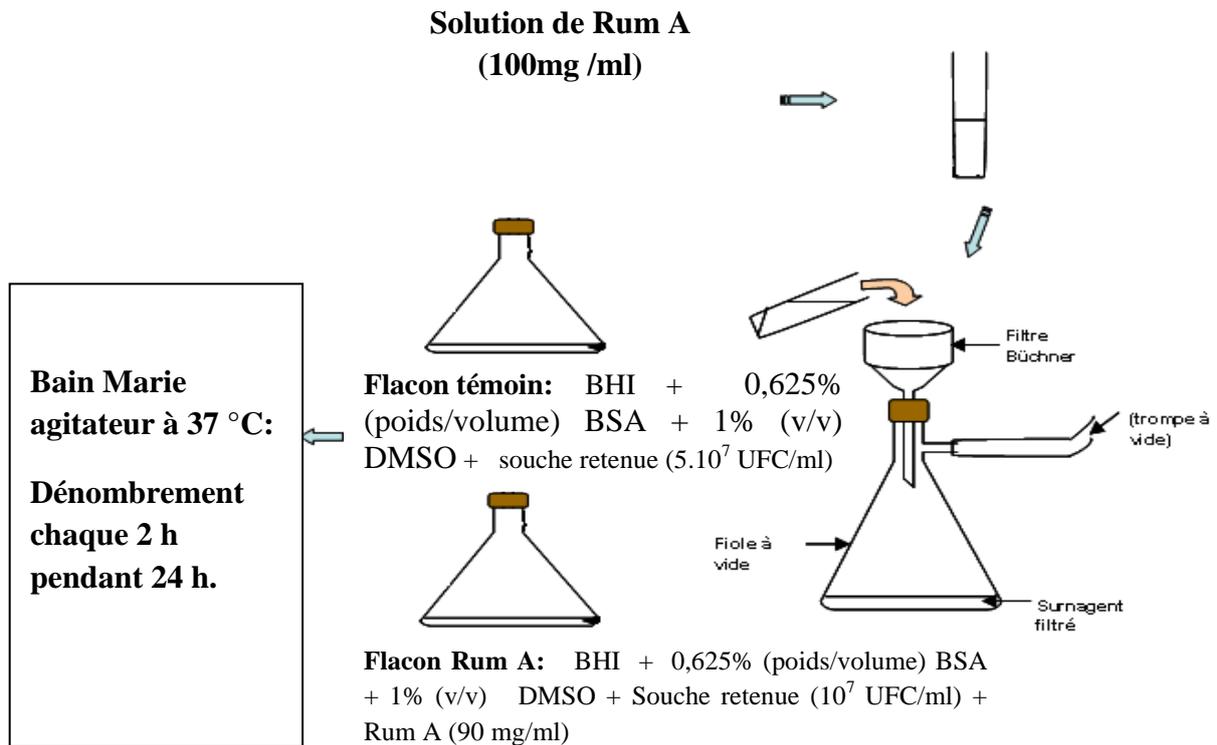
**Flacon Rum A:** Contient 20 ml du bouillon BHI; 0,625% (poids/volume) BSA et 1% (v/v) du DMSO, la souche retenue  $\sim 10^7$  UFC/ml et la Ruminococcine A a une concentration de (90 mg/ml)

Le DMSO et la BSA sont préparés dans des solutions distinctes tampon phosphate de sodium à 20 mM (pH 7.0)

**Flacon témoin:** Contient 20 ml de bouillon BHI, 0,625% (poids/volume) BSA et 1% (v/v) du DMSO et la souche retenue  $\sim 10^7$  UFC/ml, mais sans la Ruminococcine A.

Des flacons en verre ont été utilisés pour réduire la probabilité des bactéries viables adhérant (NCCLS, 1999).

1



**Figure 11:** Protocole de préparation du flacon Rum A et du flacon témoin.

## 2. Mesure de la concentration de K<sup>+</sup> des échantillons préparés

Après 0, 2, 4, 6, 8, 10 et 12 h d'incubation, 0,1 ml d'échantillons a été prélevé de chaque flacon.

Ces échantillons ont été dilués 100 fois, afin d'être ensuite passés au photomètre de flamme pour mesurer la valeur d'absorbance correspondante.

Une courbe d'étalonnage pourra être réalisée grâce aux résultats de la gamme étalon, ce qui nous permettra de déterminer la concentration en potassium en mg/l (Cushnie et Lamb, 2005).

## **6. Étude in vivo de l'activité antibactérienne de la Ruminococcine A à l'égard de la souche retenue chez des lapins holoxéniques**

L'étude a porté sur 10 lapins holoxéniques, âgés de 30 jours. Ces lapins sont répartis en deux lots de quatre lapins chacun et placés dans des cages individuelles.

Les deux autres lapins étant utilisés comme témoins : un lapin diarrhéique et un lapin sain.

L'élevage de ces lapins est effectué au niveau de l'animalerie (bien aérée et propre) de l'université A/Mira de Bejaia. Ces animaux ont été d'abord installés une semaine avant, dans le milieu qui leur était réservé, pour éviter toute instabilité de leur microflore intestinale qui serait due au stress ou au régime d'expérimentation.

Pour estimer le nombre de la souche retenue dans la flore fécale, un dénombrement a été effectué sur gélose Chapman avant de procéder à l'expérimentation.

### **6.1. Provocation de la diarrhée par *Staphylococcus aureus***

La diarrhée est provoquée par l'administration par voie gavage d'une dose journalière de 5 ml du lait écrémé contenant  $1,08 \cdot 10^7$  UFC / ml de la souche retenue.

Ce « préferment » de la souche retenue est réalisé pendant toute la période de contamination, et cela en préparant une suspension de la souche retenue dans l'eau physiologique d'une densité optique qui est égale à 0,5 équivalant à  $10^8$  UFC/ml selon les résultats de la standardisation déjà obtenue. Cette suspension est diluée une fois dans 9 ml de lait écrémé.

### **6.2. Traitement par la Rum A**

Juste après apparition de la diarrhée, les lapins sont traités comme suit :

- ❖ **Lot 1** : Les lapins reçoivent 1 ml du lait écrémé stérile (lapins non traités).
- ❖ **Lot 2** : Les lapins reçoivent 1 ml du lait écrémé contenant la Ruminococcine A à une concentration de 100 mg/ ml, préparé par dilution d'un gramme de lyophilisat de la Rum A dans 9 ml du lait écrémé stérile.

Ce traitement est suivi jusqu'à disparition complète de l'état diarrhéique.

### 6.3. Dénombrement de la souche retenue

Avant chaque dénombrement la cage est nettoyée.

Le dénombrement de la souche retenue est effectué tous les matins pendant toute la période de l'expérimentation animale, et il est réalisé comme suit:

- Durant la période de contamination par la souche retenue.
- Durant les 7 jours de traitement avec la Rum A.

Après quelques heures d'administration de la dose de la souche retenue ou du traitement avec la Rum A, les selles fraîches de lapins sont prélevées avec une spatule stérile et déposées dans une boîte de Pétri stérile puis acheminées rapidement au laboratoire pour la réalisation du dénombrement. Ce dernier est effectué comme suit : 1 g de selles prélevées est dissout dans 9 ml d'eau physiologique (dilution  $10^{-1}$ ).

À partir de cette dernière, des dilutions décimales sont réalisées. Pour chaque dilution, 0,1 ml est ensemencé en surface sur gélose Chapman et incubé à 37°C/24h.

Après incubation, un dénombrement de la souche retenue est réalisé.

### 6.4. Dissection

Le but de la dissection est de voir et de comparer la structure des villosités intestinales et des cryptes du colon des lapins des deux lots pour voir l'effet de souche retenue et de la Ruminococcine A sur le traitement de la diarrhée.

La dissection est effectuée à différentes étapes de l'expérimentation animale:

- ❖ Un lapin disséqué dès apparition d'un état diarrhéique persistant.
- ❖ Un deuxième lapin diarrhéique traité à la Rum A.
- ❖ Un troisième lapin diarrhéique non traité à la Rum A.
- ❖ Un lapin sain est disséqué au terme de l'expérimentation.

## 6.5. Réalisation des coupes histologiques

Les coupes histologiques des portions intestinales et coliques des lapins disséqués sont réalisées au niveau du laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologiques du Dr AMRANE (Béjaia), selon la méthode de Hould (1984) modifiée.

### 1. Préparation des cassettes

Les portions d'intestin grêle et de côlon de chaque lapin sont coupées sous forme d'un ruban fin de 10 à 15 mm de longueur et de 3 à 5 mm de largeur qui seront déposés dans des cassettes. Les cassettes sont imprégnées dans un bac de formol pendant 24 h (post fixation).



**Figure 12:** Portions de l'intestin grêle et colique.

**2. Étape de circulation, qui est constituée de 3 sous étapes :** déshydratation, éclaircissement, et imprégnation.

Les étapes de la circulation sont résumées dans le **tableau IX:**

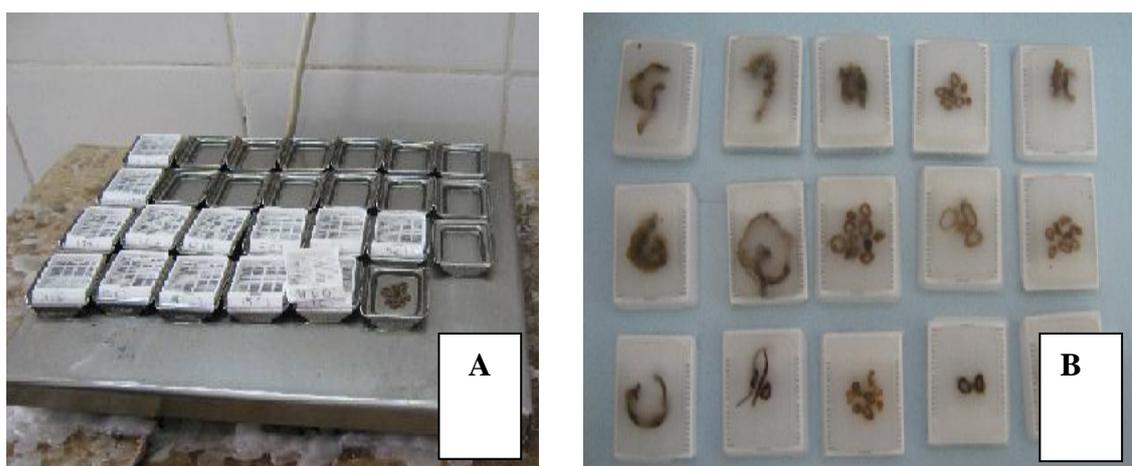
**Tableau IX:** L'étape de la circulation (déshydratation, éclaircissement, imprégnation).

Étape	Duré
<b>Déshydratation</b>	
Ethanol (70 %) 1 <sup>ier</sup> bain	30 mn
Ethanol (80 %) 2 <sup>ème</sup> bain	30 mn
Ethanol (90 %) 3 <sup>ème</sup> bain	1h
Ethanol (96 %) 4 <sup>ème</sup> bain	1h
Acétone un seul bain	1h
<b>Eclaircissement</b>	
Xylène 1 <sup>ier</sup> bain	30 mn
Xylène 2 <sup>ème</sup> bain	1h
<b>Imprégnation</b>	
Paraffine 1 <sup>ier</sup> bain	30 mn
Paraffine 2 <sup>ème</sup> bain	1h

### 3. Enrobage

Pour pouvoir couper au microtome, les segments sont enrobés dans des blocs de paraffine fondue au préalable. Les blocs obtenus sont mis à 4 °C pour une meilleure solidification.

L'enrobage est représenté sur la **figure 13**.



**Figure 13:** Étapes de l'enrobage; **A** : remplissage des blocs ; **B** : formes des cassettes après enrobage.

#### **4. Dégrossissement et réalisation de la coupe**

Les coupes histologiques sont réalisées au microtome en une épaisseur de 5  $\mu\text{m}$ .

#### **5. Étalement des coupes**

Les coupes obtenues sont étalées délicatement sur la surface des lames. Puis, collées entre lame et lamelle en ajoutant quelques gouttes de masse collante (mélange blanc d'œuf, glycérine et une goutte du formol) .Les lames sont ensuite séchées sur une plaque chauffante à 60 °C, puis à l'air.

#### **6. Déparaffinage**

Les lames sont placées sur une plaque chauffante à 60 °C pendant 30 mn. Puis trempées dans deux bains de xylène pendant 15 mn chacun.

#### **7. Coloration des lames à l' Hématoxyline de Harris-Éosine**

Afin de distinguer les différents tissus, on peut avoir recours à différents colorants. Parmi les différentes techniques de coloration, « hématoxyline-Éosine » permet une coloration bleue du noyau et rose du cytoplasme (Welsh, 2000).

Le procédé de coloration histologique est représenté dans le **tableau X**.

**Tableau X:** Étapes de coloration histologique.

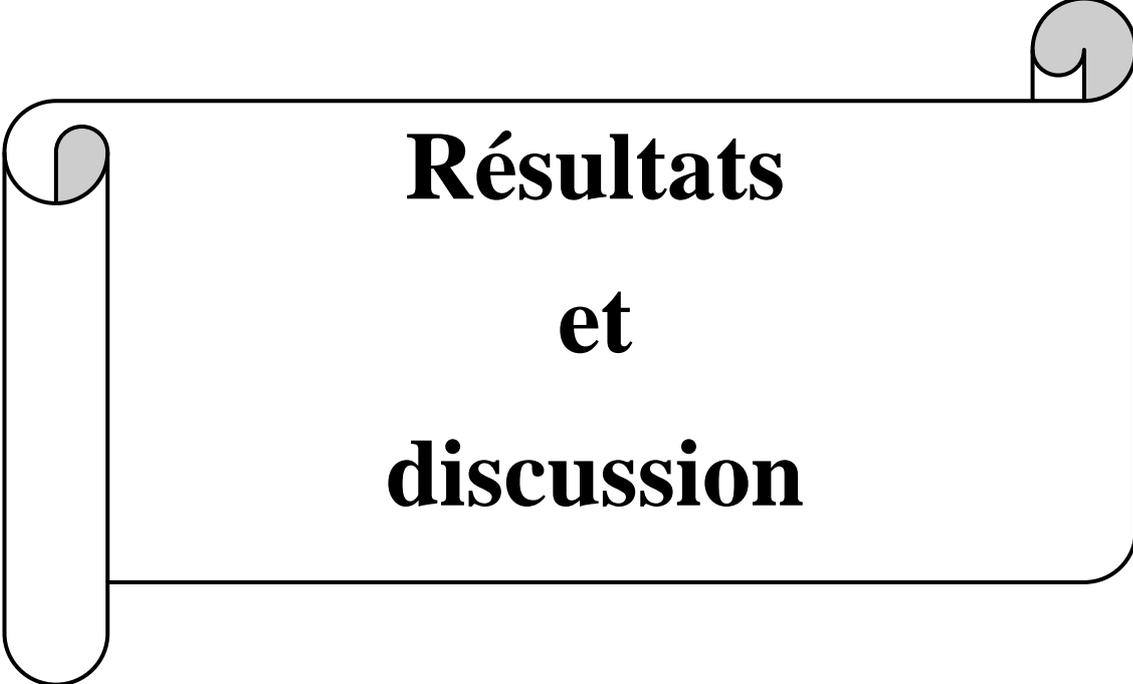
Étape	Duré
Ethanol 96 %	2 mn
Ethanol 96 %	2 mn
Réhydratation	5-10 mn
<b>Première coloration : Hématoxyline de Harris</b>	10 mn
Rinçage à l'eau	Passage
Bain d'alcool acidifié (1/4 L d'eau + 5 gouttes HCl)	2 plongées
Bain d'eau	2 plongées
Bain d'eau ammoniacal	2 plongées
Bain d'eau	2 mn
<b>Deuxième coloration : Eosine</b>	10 plongées
Bain d'eau	1 plongée

### 8. Montage des lames

Le montage est la dernière étape de la préparation des lames pour la lecture au microscope optique. Il s'agit de recouvrir avec quelques gouttes d' Eukitt l'étalement entre lames et lamelles. Le but du montage est multiple ; il permet de protéger mécaniquement l'étalement et la conservation de l'éclat des colorations.

### 9. Observation microscopique

L'observation microscopique ou la lecture des lames se fait à l'aide d'un matériel de base qui est le microscope optique (grossissement x10).



**Résultats**  
**et**  
**discussion**

**Chapitre I:** Recherche des différentes flores fécales (chez des nourrissons diarrhéiques) résistantes aux antibiotiques.

## I. Isolement et identification des espèces bactériennes recherchées

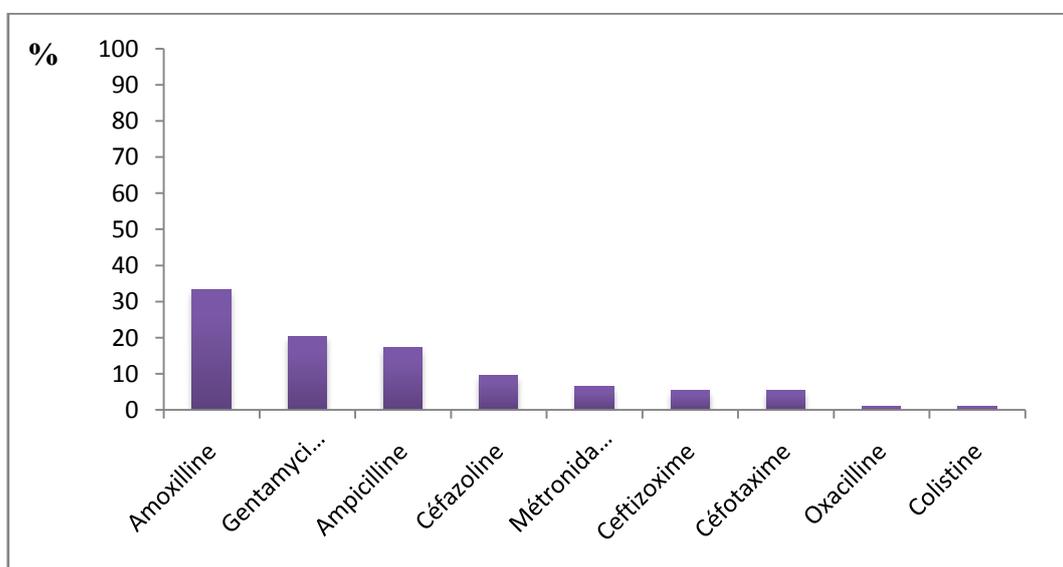
### 1. Distribution des antibiotiques administrés

Au cours de cette étude 65 échantillons de selles de nourrissons de 1 à 18 mois provenant de différents hôpitaux de la région de Béjaïa ont été analysés:

41 échantillons de sexe masculin (63 %).

24 échantillons de sexe féminin (27 %).

Des diarrhées ont été observées chez les 65 nourrissons ayant subi au préalable un traitement antibiotique (**annexe**) pour différentes pathologies.



**Figure 14:** Distribution des antibiotiques administrés chez les 65 nourrissons retenus pour l'enquête.

D'après la **figure 14**, on constate que l'amoxicilline est l'antibiotique le plus administré avec un taux de 33,33 % suivi par la Gentamicine à 20,43 % et l'ampicilline à 17,21 %.

Les pourcentages d'administration les plus faibles sont notés pour la colistine, l'oxacilline à un taux de 1 % et le céfotaxime, et le céftriaxone à un taux de 5 %.

Cependant Bartlett (2002), a rapporté que les pourcentages d'administration chez les adultes sont de 5 à 10 % pour l'ampicilline, 10 à 25 % pour l'association amoxicilline-acide clavulanique, 15 à 20 % pour les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (céfotaxime,...etc), 2 à 5 % pour les fluoroquinolones (Péfloxacine, Ofloxacine..), les macrolides (erythromycine) et les tétracyclines (métacyline...).

## 2. Identification des souches isolées

### 2.1. Aspect des colonies

Le **tableau XI**, représente l'aspect caractéristique des colonies de chaque espèce recherchée.

**Tableau XI: Aspect des colonies des espèces recherchées.**

	<i>Staphylococcus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Clostridium</i>	<i>E. coli</i>	<b>Enterobacter sp</b>
<b>Aspect des colonies</b>	crémeuses, pigmentées (typiquement jaune d'orées), qui tournent autour de 4 mm de diamètre et opaques.	Forme très caractéristique Colonies de grosses tailles, avec un contour irrégulier	Grosses colonies de couleur noire	Petites Colonies plates de couleur verte avec éclat métallique	Colonies de taille moyenne, bombées et mucoides

### 2.2. Identification

Les 66 souches isolées ont été identifiées et on a révélé que 4 souches appartenant à *Staphylococcus aureus*.

**Tableau XII:** Identification des quatre souches de *S. aureus*.

Forme cellule (coques)	Gram	Grappe raisin et/ou isolés et/ou paires et/ou courte chaîne.	Coagulase	D nase	Catalase
+	+	+	+	+	+

### Six souches à *Bacillus subtilis*

**Tableau XIII:** Identification des six souches de *Bacillus subtilis*.

Gram	Catalase	Forme cellule (Bacille)	Spore centrale non déformante	Croissance à 50°C	Croissance anaérobie	Dégradation amidon	Dégradation gélatine
+	+	+	+	+	-	+	+

**12 souches à *Clostridium perfringens***

**Tableau XIV:** Identification des 12 souches de *Clostridium perfringens*.

Gram	Forme cellule (Bacille)	Catalase	Spore ovoïde subterminale	Gaz	H <sub>2</sub> S	Mobilité
+	+	-	+	+	+	-

**11 souches à *E. coli***

**Tableau XV:** Identification des 11 souches d' *Escherichia coli*.

Gram	Forme de la cellule (coccobacille)	Croissance à 44°C	Indole
-	+	+	+

**Douze souches d' *Enterobacter sp***

**Tableau XVI:** Identification des douze souches d'*Enterobacter sp*.

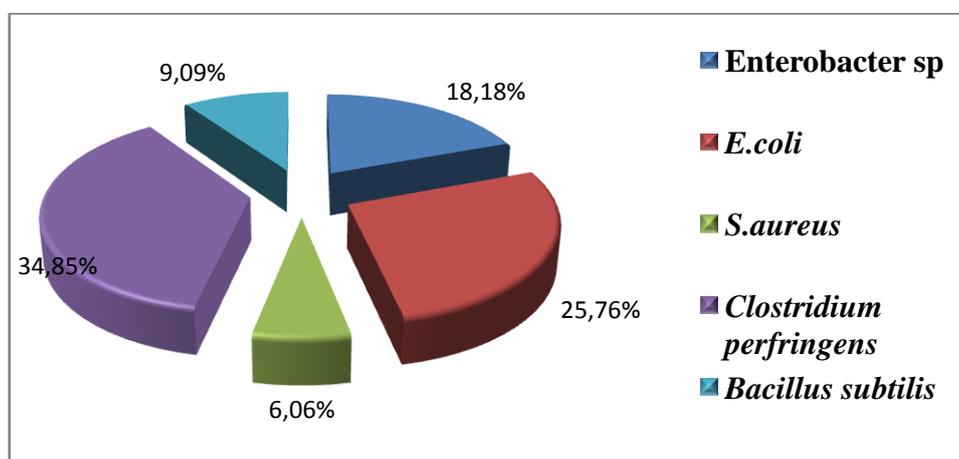
Gram	Forme Cellule (Bacille)	Manitol	Mobilité	Uré	Indol	TDA	Citrate	VP	RM	Glu	Lac	Gaz	H <sub>2</sub> S
-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-

### 3. Répartition des souches bactériennes isolées à partir des selles

Selon les résultats obtenus, on constate que l'espèce la plus fréquente est *Clostridium perfringens* avec un taux de 34,85 %.

*Clostridium perfringens* est suivi par *Escherichia coli* avec un pourcentage de 25,76 %. *Enterobacter sp*, *Bacillus subtilis* ont des pourcentages proches de ; 18,18 %, 9,09 %, respectivement.

L'espèce la moins fréquente enregistrée est *Staphylococcus aureus* avec un taux de 6,06 % (**figure 15**). Néanmoins, seules ces dernières années, sont apparues les Staphylococques dans les selles du fait de leur multirésistance acquise.



**Figure 15:** Répartition des souches isolées par genres et par espèces.

D'après Corthier *et al.* (2007), l'analyse de la composition de la flore intestinale en taxa (genres bactériens et/ou groupes phylogénétiques) fait ressortir l'existence de composantes récurrentes, retrouvées chez tous les individus. Trois Phyla bactériens, Firmicutes, Bacteroidetes et Actinobacteria rassemblent la plus grande part des bactéries fécales dominantes.

Le phylum des Firmicutes (bactéries à Gram positif) est toujours fortement représenté. Il comprend tout d'abord le groupe dit « Eubacterium rectal – Clostridium coccoides » qui est souvent le plus important (14 à 31 % des bactéries totales en moyenne suivant les études) (Sghir *et al.* , 2000; Rigottier-Gois et al 2003).

Des études récentes rapportées par De La Cochetiere *et al.* (2005), stipulent que les antibiotiques sont connus pour affecter la flore microbienne intestinale, et les changements suivants peuvent avoir comme conséquence des diarrhées associées aux antibiotiques.

Lindeberg *et al.* (2004), a rapporté concernant le portage des Staphylocoques dans les échantillons fécaux obtenus, à partir de 50 enfants en bas âge à 1, 2, 4 et 8 semaines d'âge, que la colonisation augmente de 20 % chez les nourrissons âgés de 3 jours, 40 % de 1 semaine, 52 % de 2 semaines, 60 % de 4 semaines, et 64 % à 8 semaines d'âge. Les dénombrements de la population des Staphylocoques étaient souvent de  $10^6$  UFC/g de selles.

Dans l'étude rapportée par Nowrouzian *et al.* (2003), la flore fécale d'*Escherichia coli* a été caractérisée chez 70 enfants Suédois, suivie pendant la première année de leur vie. 42 % des 70 enfants ont été colonisés par *Escherichia coli* dès 3 jours après leur naissance

## II. Résultats des antibiogrammes

### 1. Résultats de la standardisation

Afin de pouvoir effectuer les antibiogrammes des souches isolées ainsi que les différents tests d'inhibitions, les inocula de celles-ci ont été standardisés.

Après les dénombrements pour les différentes souches appartenant à chaque espèce, le nombre de cellules viables par ml de culture pour chaque souche est illustré sur le **tableau XVII**.

**Tableau XVII:** Résultats des dénombrements des différentes souches après 24 heures d'incubation.

Souche	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Enterobacter sp	<i>E .coli</i>
Nombre UFC/ml	$2, 3. 10^6$	$3,5.10^6$	$1,08.10^8$	$2,5. 10^8$	$1. 10^6$

## 2. Résistance des souches isolées aux antibiotiques testés

### - Résistance des souches de *S. aureus*

Dans cette étude nous avons observé 100 % de résistance vis-à-vis de la pénicilline, suivi par le cephotaxime et cephoxitine pour 25 % de résistance chacun. Aucune souche n'a montré de résistance vis-à-vis de l'erythromycine, la vancomycine, la gentamycine et le chloramphénicol (**figure 17**).

### - Résistance des souches de *C. perfringens*

Les souches de *Clostridium perfringens* ont montré une résistance de 100 % vis-à-vis du chloramphénicol et de l'ampicilline, un taux de résistance de 8,33 % vis-à-vis de l'imipenem et 6,66 % vis-à-vis de la colistine (**figure 18**).

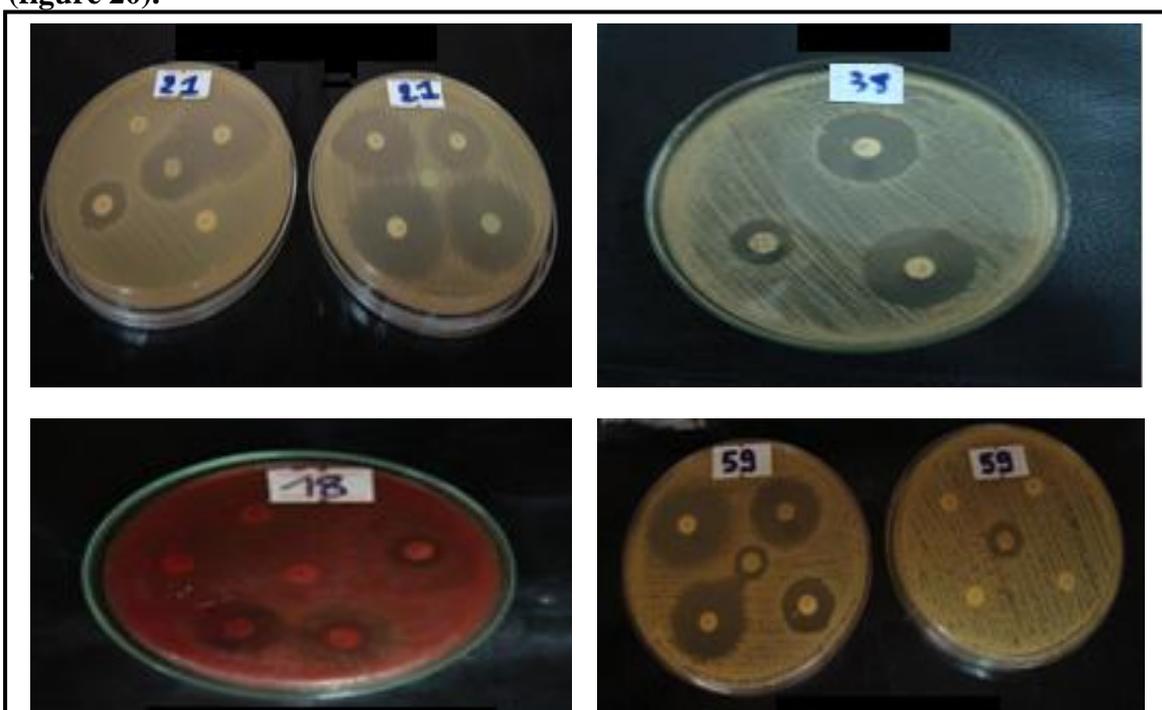
### - Résistance des souches d' *E. coli*

D'après les résultats de l'antibiogramme, les souches d' *E. coli* montrent 54,54 % de résistance vis-à-vis de l'association d'antibiotiques triméthoprim/sulfaméthoxazole, 9,09 % de résistance envers le cefotaxime, ceftriaxone et la gentamycine. Aucune souche n'est résistante à l'imipénème et le chloramphénicol (**figure 19**).

### - Résistance des souches d' Enterobacte sp

Le taux maximal de résistance des espèces d' Enterobacter sp est noté pour l'amoxicilline + acide clavulanique de 80 %, suivi par l'amoxicilline de 70 %. La résistance aux cefotaxime, la kanamycine et la gentamycine sont de 40 % pour l'ensemble des souches testées. Le chloramphénicol, l'amikacine et l'imipenem ne montrent aucune résistance.

(**figure 20**).



**Figure 16: AntibioGrammes des espèces recherchées.**

A : AntibioGramme d' Enterobacter sp

C : AntibioGramme de *C. perfringens*

B : AntibioGramme de *S. aureus*

D : AntibioGramme d' *E. coli*

### - Résistance des souches de *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* a témoigné d'une sensibilité à tous les antibiotiques testés (gentamycine, érythromycine, pénicilline et néomycine).

La fréquence de résistance aux antibiotiques est différente d'un pays à l'autre. L'étude présentée en 1992 au grand congrès américain d'antibiothérapie (Icaac) par Voss *et al.* (1994), publiée quelques années plus tard, avait montré des différences considérables de taux de résistance de *Staphylococcus aureus* à la méticilline (SARM) entre les pays européens, les taux allant de 0 % dans certains pays du Nord (Finlande, Danemark, Suède) à environ 35 % à 40 % dans certains pays (Italie, France).

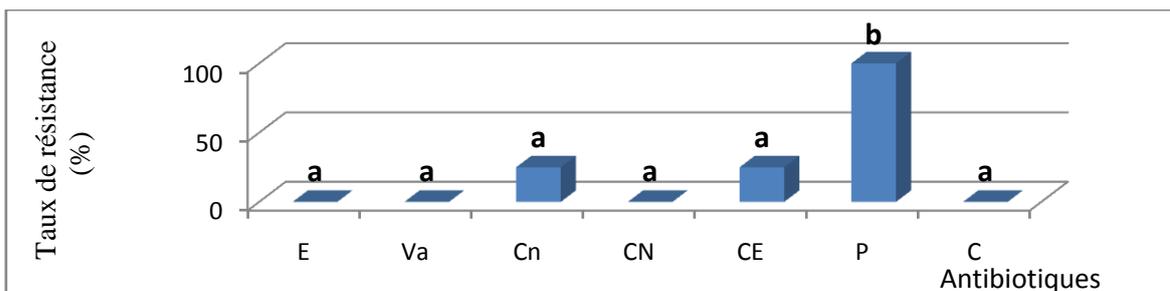
Des différences de pratique d'antibiothérapie sont sans aucun doute parmi les causes possibles de cette différence (Fomsgaard *et al.*, 1995). Des protocoles écrits d'antibiothérapie sont disponibles dans certains pays et pas dans d'autres (Vincent *et al.*, 1996).

La résistance des Enterobactéries aux aminopénicillines poursuit une évolution lente et progressive et se situe en 2004 aux alentours de 60 à 70 %. La résistance à l'association amoxicilline-acide clavulanique, et aux céphalosporines de première génération (céfaloquine) se situe entre 40 et 60 %, avec un grand nombre de souches intermédiaires probablement fortes productrices de pénicillinase. Les fréquences de résistance sont plus faibles pour les céphalosporines de deuxième génération (céfoxitine) à 23 %, les céphalosporines de troisième génération (7 à 10 %) (Soussy, 1997).

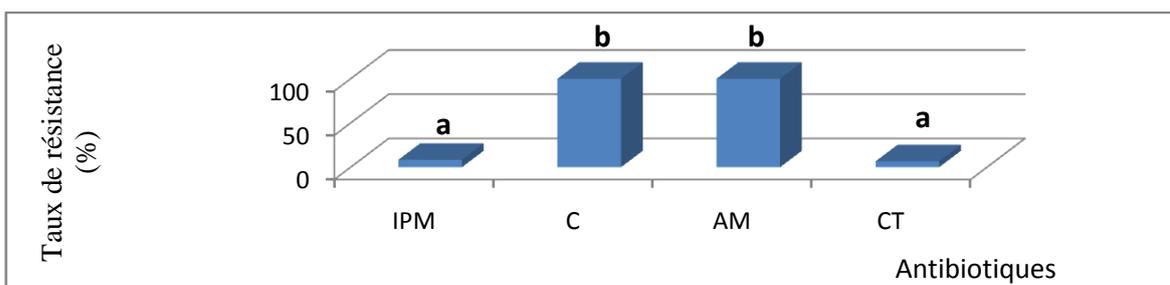
L'imipénème reste actif sur la quasi-totalité des entérobactéries, malgré la description de quelques souches résistantes soit en raison d'une diminution importante de la perméabilité associée à une hyperproduction de céphalosporinases, soit en raison de la production de carbapénémases, notamment chez *Enterobacter cloacae* (Yang *et al.*, 1990).

En ce qui concerne les aminosides, le fait le plus marquant est l'apparition, en 1969, de la résistance plasmidique à la gentamicine souvent associée à une résistance à la kanamycine. On enregistre une élévation rapide de la fréquence de cette résistance jusqu'en 1974, puis d'une diminution et d'une stabilisation autour de 10 %.

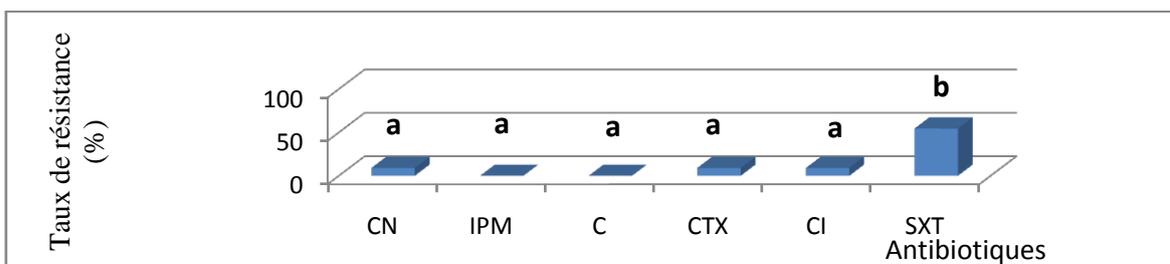
La résistance à l'amikacine, plus stable à l'inactivation enzymatique, reste inférieure à 5 %. La résistance aux sulfamides est stable, autour de 35 % des souches, celle au triméthoprime est légèrement inférieure. En ce qui concerne le chloramphénicol, la résistance est de 20 %, la tendance est plutôt à une diminution puis à une stabilisation de la résistance (Kahlmeter, 2003).



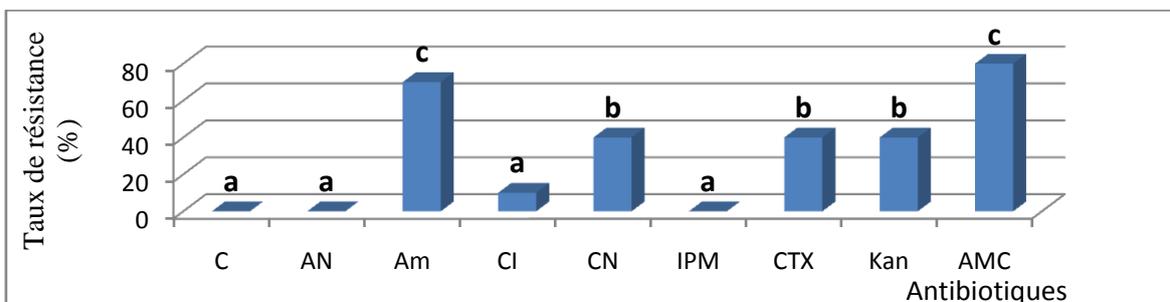
**Figure 17:** Taux de résistance des souches de *S. aureus*.



**Figure 18:** Taux de résistance des souches de *C. perfringens*.



**Figure 19:** Taux de résistance des souches d' *E. coli*.



**Figure 20:** Taux de résistance des souches d'Enterobacter sp.

Les barres désignées par une même lettre minuscule sont statistiquement identiques ( $P > 0,05$ ).

**Am:** amoxylline, **AMC:** amoxicilline + acide clavulanique, **AN:** amikacine,

**AM:** ampicilline, **Cn:** cephoxitine, **CTX:** Cefotaxime, **CE:** cephotaxime,

**CT:** doxycycline hydrochloride, **CI:** ceftriaxone, **C:** Chloramphénicol,

**CN:** gentamycine, **E:** Erythromycine, **IPM:** imipenème

Chez *E. coli*, la résistance aux amino-pénicillines a augmenté progressivement pour atteindre 50 % des souches en 2004. Une grande partie de ces souches apparaissent intermédiaires, voire résistantes, et même aux associations amoxicilline (ou ticarcilline)-acide clavulanique en raison de la production soit d'un haut niveau de pénicillinase, soit d'enzymes de type TRI ( TEM Résistant aux Inhibiteurs).

Pour les autres antibiotiques, les fréquences de résistance apparaissent relativement stables, à l'exception de celles concernant le cotrimoxazole, mais aussi les quinolones où la résistance augmente depuis une dizaine d'années avec une fréquence actuelle supérieure à 15 % pour l'acide nalidixique et qui dépasse 10 % pour la ciprofloxacine (Sirot *et al.*, 1994).

On retrouve ces caractéristiques chez *E. coli* rapportées par Kahlmeter. (2003), dans cette étude, on observe que chez *E. coli*, la résistance est fréquente à l'ampicilline (29,8 %, variant selon les pays de 15,5 % à 53,9 %) où les seuls antibiotiques pour lesquels la résistance est inférieure ou égale à 10 % sont l'imipénème (0 %), les céphalosporines de deuxième et troisième générations (de 1 à 5 %), (10 %), l'imipénème (0 %), les aminosides (de 1 à 7 %) à l'exception de la kanamycine.

Les souches appartenant au genre, *Enterobacter* associent presque constamment des résistances naturelles à divers caractères de résistance acquise. Ce sont typiquement des bactéries hospitalières. Les résistances naturelles sont, la résistance aux aminopénicillines et aux céphalosporines de première génération par production de céphalosporinase.

La fréquence des résistances acquises apparaît aujourd'hui relativement plus faible qu'autrefois pour *Enterobacter cloacae*.

*Staphylococcus aureus* est majoritairement résistant à la pénicilline G par production de pénicillinase. Les staphylocoques résistants à la méticilline sont également résistants à de nombreux autres antibiotiques. Ainsi, la résistance aux aminosides qui ne concernait, jusqu'en 1975, que la streptomycine et la kanamycine a été modifiée par l'apparition de deux nouveaux phénotypes de résistance plasmidique (Corne, 2004).

Le premier phénotype (GKTo) intéresse simultanément Gentamicine, Kanamycine et Tobramycine avec un faible niveau de résistance à l'amikacine et à la nétilmicine.

Le second phénotype (KTo) intéresse Kanamycine et Tobramycine avec un faible niveau de résistance à l'amikacine.

Il faut signaler la nette diminution des souches résistantes à la gentamicine, contrairement à ce qui est observé pour la kanamycine, traduisant la diminution relative des souches (GKTo) par rapport aux (KTo). Ainsi, la résistance se situe, en 2004, entre 20 et 25 %, à l'exception de la gentamicine.

La résistance aux macrolides montre une fréquence plus grande à l'érythromycine (29 %) traduisant une prédominance des résistants constitutifs par rapport aux résistants inductibles.

La résistance aux synergistines reste rare.

L'évolution de la résistance aux fluoroquinolones a été constante, passant de 15 % en 1985 à près de 40 % en 1994 puis autour de 32 % en 2004.

Les glycopeptides (vancomycine et teicoplanine) restent presque constamment actifs sur *Staphylococcus aureus*, à l'exception de rares souches GISA (CASFM, 2005).

En ce qui concerne les autres antibiotiques, il faut noter que la résistance de *S. aureus* aux tétracyclines, au cotrimoxazole et au chloramphénicol est passée au-dessous de 10 % après avoir atteint des valeurs plus élevées dans le passé.

Stark *et al.* (1993), a rapporté que des souches de *Clostridium* multirésistantes ont été trouvées seulement dans le domaine hospitalier chez les sujets traités aux antibiotiques. L'ampicilline était l'antibiotique auquel la plupart des souches anaérobies étaient résistante ; et aucune souche ne s'est avérée résistante à l'imipénème.

Levy *et al.* (1988), a observé statistiquement une croissance significative dans le nombre de souches résistantes à l'ampicilline parmi les patients hospitalisés présentant une histoire récente de traitement antibiotiques non spécifié. Une corrélation distincte entre la consommation d'antibiotiques et la prédominance locales des micro-organismes fécaux anaérobies résistants a été rapportée pour l'ampicilline et la doxycycline (Kling *et al.*, 1989; Levy *et al.*, 1988).

Le facteur le plus important dans la résistance de *Clostridium* aux B-lactamines semble être la production de B-lactamases (Nord *et al.*, 1990).

Ces mécanismes de résistance aux antibiotiques de la famille des B-lactamines chez les bactéries anaérobies sont élaborés et attribués aux B-lactamases qui inactivent

l'antibiotique par changement du nombre ou du type de pénicillines binding protéines (PLP), et qui affectent l'affinité des protéines pour les antibiotiques ; ainsi que la pénétration de l'antibiotique sera bloquée dans l'emplacement actif par l'intermédiaire du changement des porines membranaires externes des bactéries cibles (Finegold, 1989; Tally *et al.*, 1984).

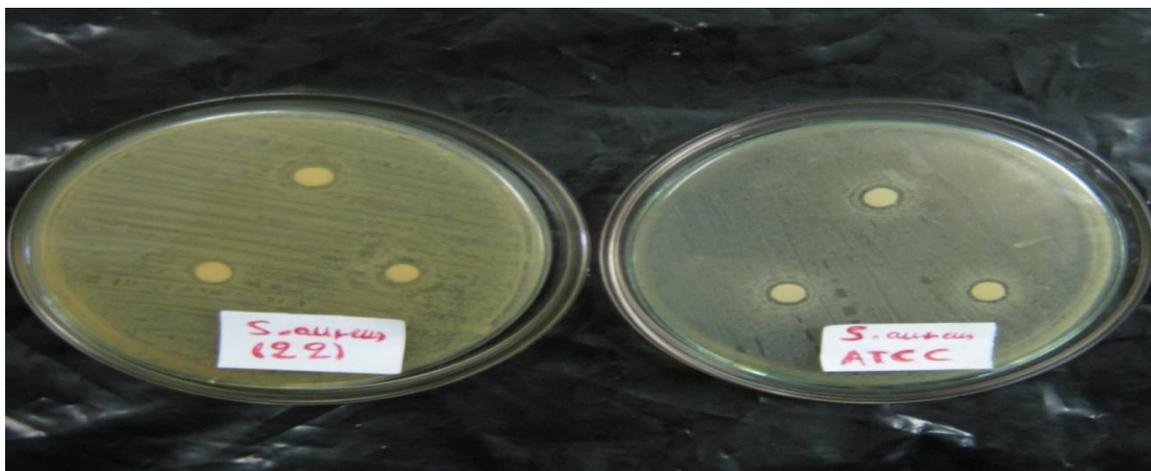
La résistance aux carbapénems tels que l'imipénème est très rare (Cuchural *et al.*, 1986; Hedberg *et al.*, 1992).

Au terme de cette première partie de l'étude, *Staphylococcus aureus* 22 (isolée de l'échantillon de selles du 22<sup>émé</sup>/ sur 65 nourrissons) a été retenue pour la suite de l'étude pour sa plus grande résistance à tous les antibiotiques testés (**Figures 16 à 20**).

**Chapitre II:** Effet antibactérien in vitro de la Rum A à l'égard de *Staphylococcus aureus* 22 (souche retenue).

**1. Résultats des tests des disques**

Après incubation à 37°C/24 heures des zones d'inhibitions sont observées autour des disques (**figure 21**).



**Figure 21:** Activité de la Rum A à l'égard de *S. aureus* par le test des disques.

Ce test d'antagonisme direct (**figure 21**) confirme que la Ruminococcine A a un effet inhibiteur vis-à-vis de la souche *Staphylococcus aureus* 22. Cette inhibition est due à l'activité antibactérienne du surnageant de culture de la souche *Ruminococcus gnavus* E1, qui étant contenir la Ruminococcine A en grande quantité, obtenue par l'ajout de la trypsine qui draine le métabolisme cellulaire de cette souche vers la synthèse accrue de la Ruminococcine A.

Les diamètres des zones d'inhibition obtenues par les deux méthodes sont représentés dans le **tableau XVIII**:

**Tableau XVIII:** Diamètres des zones d'inhibition (mm) de *Staphylococcus aureus* 22 comparées à la souche de référence *S. aureus* ATCC.

		<i>S. aureus</i> 22	<i>S. aureus</i> ATCC	
<b>Test des discs</b>	8	Moyenne 9,33	8	Moyenne 9,00
	10		10	
	10		9	

D'après le **tableau XVIII** la méthode des disques révèle un diamètre moyen de 9,33 mm pour la souche de *Staphylococcus aureus* 22 et un diamètre moyen faiblement inférieur, qui est de 9 mm pour la souche de référence *S. aureus* ATCC.

Le test de comparaison de moyenne (STATISTICA 5.0) ne révèle aucune différence significative entre les deux moyennes ( $P_{\text{observé}} = 0,7267 \leq P_{\text{théorique}} = 0,05$ ).

Il est à noter que les spectres d'inhibition des bactériocines sont le plus souvent établis à partir de surnageant de cultures ou de préparation semi-purifiées. Ce résultat est donc représentatif de l'activité antibactérienne globale d'une souche et non de l'activité d'une seule bactériocine Jasniewski. (2008).

Bien que plusieurs rapports soient disponibles, dans lesquelles les bactéries Gram positif particulièrement les bactéries lactiques ont montré un antagonisme à l'égard des staphylocoques (Franz *et al.*, 1997 ; Lewus *et al.*, 1991).

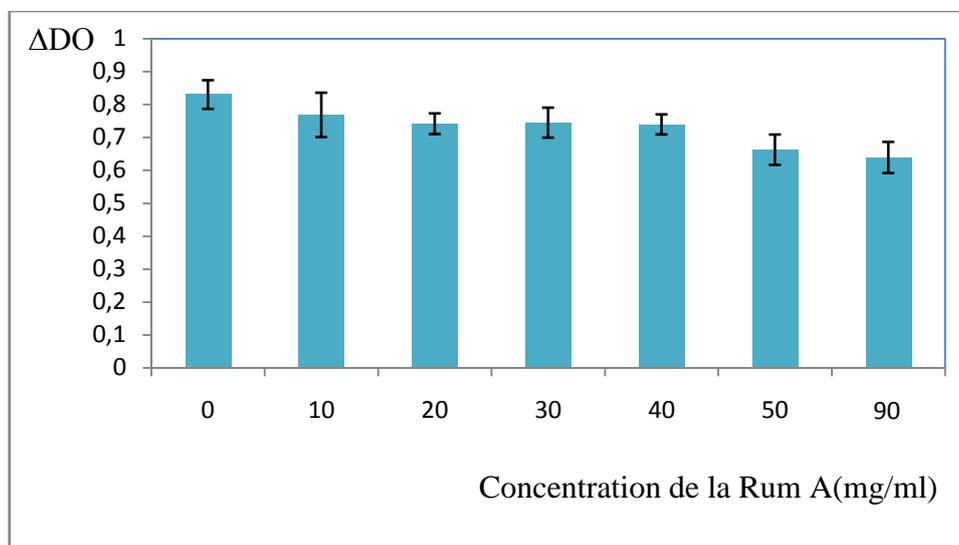
Jasniewski. (2008), a rapporté que le spectre d'activité des bactériocines de la sous-classe IIa est variable. Il est plus ou moins large mais touche essentiellement des bactéries phylogénétiquement proches de la souche productrice. Dans tous les cas, le genre *Listeria* est inhibé, il comprend également de bactéries lactiques et autres bactéries à Gram positif, en particulier des espèces pathogènes ou indésirables comme *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* sp, *Bacillus* sp et *Micrococcus* sp.

D'après Morency *et al.* (2001), des bactériocines de séquences proches peuvent présenter des spectres d'action différents, ce qui laisse supposer une grande spécificité d'action ou de résistance.

De plus, les concentrations minimales inhibitrices varient considérablement d'une espèce bactérienne à l'autre et même entre souches appartenant à la même espèce (Meghrou *et al.*, 2000a).

## 2. Estimation de l'activité antibactérienne de la Ruminococcine A à l'égard de *S. aureus* 22 en milieu liquide

### 2.1. Mesure de la densité optique



**Figure 22:** Variation de la densité optique de *S. aureus* 22 en fonction de la concentration de la Ruminococcine A.

D'après ce graphe, la densité optique diminue proportionnellement à la concentration de la Ruminococcine A, ce qui signifie la diminution du nombre de *S. aureus* 22.

La diminution de la densité optique suggère que l'activité de Ruminococcine A induit une lyse cellulaire.

Quand les cellules de *Staphylococcus aureus* 22 sont inoculées dans du bouillon BHI additionné des différentes concentrations de Rum A, une réduction significative (**figure 22**) dans la densité optique est observée comparativement à la culture témoin.

Aux concentrations les plus faibles (10 mg/ml, 20 mg/ml et 30 mg/ml), un faible effet est observé. Après 24 heures d'incubation et comparé au témoin, la différence n'est pas significative.

En revanche, pour les concentrations 50 mg/ml et 90 mg/ml des variations significatives sont observées correspondant à 0,6627 et 0,6391 et traduisant une inhibition de la croissance bactérienne plus importante.

Pour la suspension témoin, à laquelle la Rum A n'est pas ajoutée, la croissance de la souche *S. aureus* 22 est maximale, notée par une variation de densité optique  $\Delta DO = 0,8302$ .

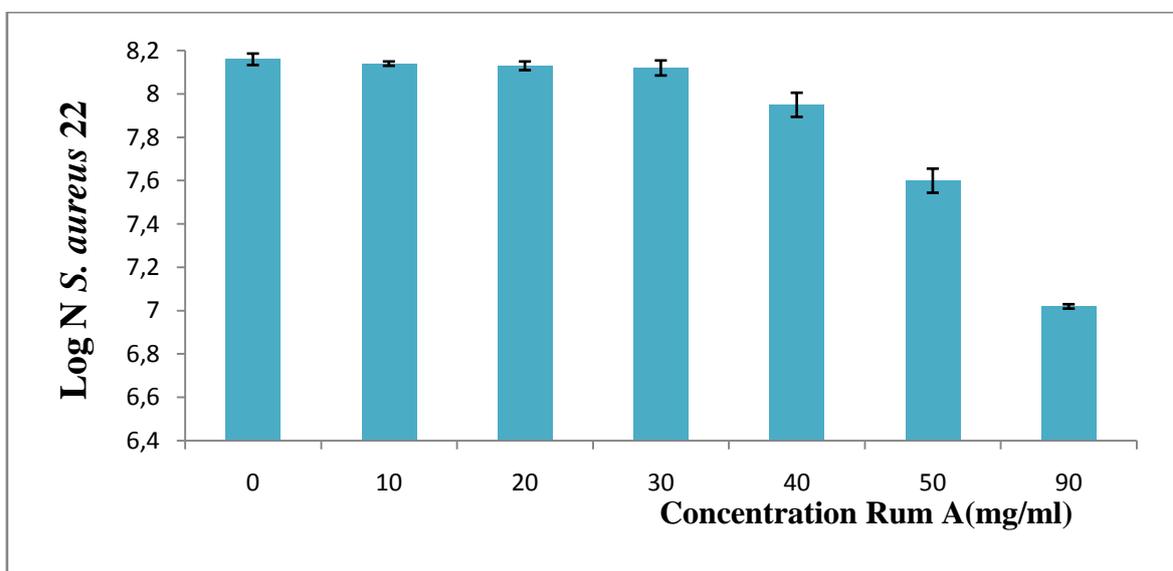
Daba *et al.* (1991), ont rapporté que la méthode de dosage de l'activité antibactérienne des bactériocines consiste à doser l'activité antibactérienne contre une souche cible par mélange d'une suspension de cette souche cible et de l'échantillon à tester (surnageant de bactériocine) en cuves ou en microplaques. Le titre de l'activité antibactérienne est défini comme la quantité nécessaire donnant une inhibition de 50 % du microorganisme cible par rapport à un témoin ensemencé dans les mêmes conditions, mais sans bactériocine.

L'effet observé pour une bactériocine donnée dépend souvent des conditions expérimentales, comme la concentration et la pureté de la bactériocine, la souche cible, la population initiale ainsi que le milieu de culture. L'état physiologique des bactéries cibles joue également un rôle très important dans ce type d'étude (Brrena-Gonzalez *et al.*, 1996 ; Martinez-Cuesta *et al.*, 1997).

D'après Jasniewski. (2008), le mécanisme d'action des bactériocines est très largement étudié. Il admet qu'il se décompose en trois étapes. La première consiste en la fixation du peptide sur la membrane de la cellule cible. C'est durant cette étape que le peptide adopte sa conformation tridimensionnelle permettant l'expression de son activité. La seconde étape est l'insertion de la bactériocine dans la membrane cytoplasmique. Durant cette étape, plusieurs peptides sont recrutés pour former un pore. La dernière étape est la formation du pore. Ce dernier conduit à des fuites de composés intracellulaires vitaux. Leur perte entraîne donc des effets néfastes pour les cellules, allant d'un simple ralentissement de la croissance bactérienne, à la mort cellulaire.

## 2.2. Dénombrement de cellules viables de *S. aureus* 22 dans le bouillon (BHI)

Les résultats des dénombrements de *S. aureus* 22 de l'échantillon témoin et des différentes dilutions de la Rum A dans le bouillon BHI (**figure 23**), en partant d'un inoculum de départ de l'ordre de  $10^6$  UFC/ml de *S. aureus*, ont montré des différences significatives.



**Figure 23:** Variation du nombre de *S. aureus* 22 en fonction de la concentration de la Rum A.

L'activité antibactérienne de la Ruminococcine A à l'égard de la souche *Staphylococcus aureus* 22 augmente nettement en fonction de la concentration.

La diminution du nombre de *Staphylococcus aureus* 22 peut être interprétée par l'effet bactéricide de la Ruminococcine A à l'égard de cette souche.

Ces résultats montrent que pour une concentration de 90 mg/ml de Rum A, une inhibition maximale est obtenue, le nombre est ainsi réduit de 8,16 Log à 7,07 Log correspondant à une inhibition de 1,14 Log, suivie par la concentration 50 mg/ml de Rum A, où l'on a observé une inhibition de 0,56 Log.

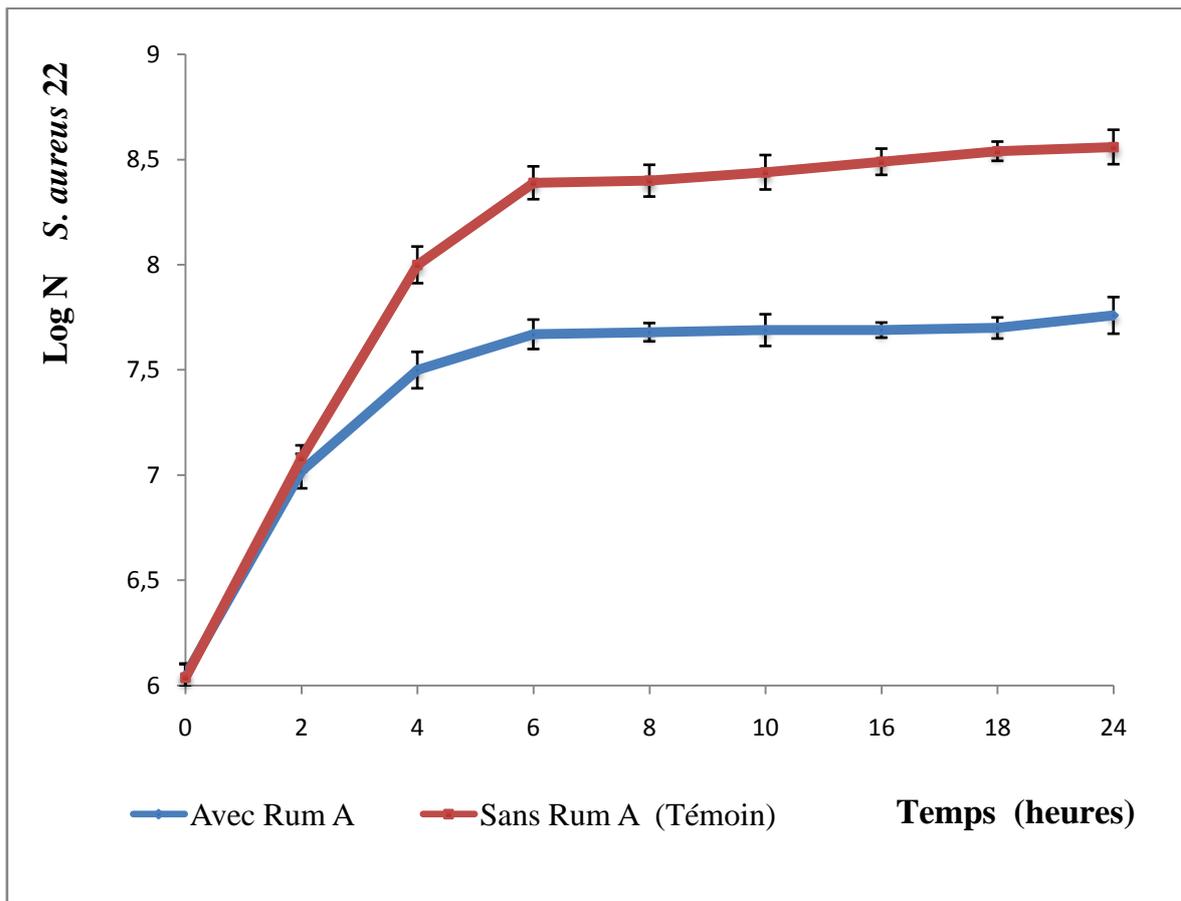
Pour les autres concentrations comprises entre 10 mg/ml et 30 mg/ml, une faible activité est enregistrée.

Le test statistique de corrélation entre la densité optique, Log N de *Staphylococcus aureus* et la concentration de la Ruminococcine A, a démontré une nette corrélation négative, c'est à dire lorsque la concentration de Rum A augmente, le nombre de *Staphylococcus aureus* 22 et la densité optique diminuent, ce qui veut dire que l'inhibition exercé par la Rum A augmente.

### 2.3. Activité antibactérienne de la Rum A à l'égard de *S. aureus* 22 dans le lait écrémé

Cette étude a été réalisée en suivant l'évolution du nombre de *Staphylococcus aureus* 22 (ensemencé à  $10^6$  UFC/ml) en fonction du temps, en présence de 90 mg/ml de Ruminococcine A.

Un témoin a été également réalisé en cultivant *S. aureus* 22 en culture pure. Les dénombrements ont été effectués toutes les deux heures pendant 24 h/37°C (**figure 24**).



**Figure 24:** Variation du nombre de *S. aureus* 22 de l'échantillon Rum A et de l'échantillon témoin en fonction du temps.

La croissance de la souche *S. aureus* 22 suit une croissance normale, une phase exponentielle, une phase stationnaire.

On note l'absence de phase de latence, le lait est riche en acides aminés libres qui favorisent une bonne croissance de la souche *Staphylococcus aureus* 22.

Après, 6 heures d'incubation le nombre de *Staphylococcus aureus* 22 augmente de 6 Log UFC/ ml à 8,39 Log UFC/ml (début de la phase stationnaire).

Lorsque la souche *Staphylococcus aureus* 22 se trouve en présence de la Ruminococcine A, une diminution significative du nombre de *S. aureus* est notée après 2 heures d'incubation (phase exponentielle) et jusqu'à la fin de l'incubation (fin de la phase stationnaire).

Après 2 heures d'incubation, aucune différence n'est à noter entre la croissance de la souche *Staphylococcus aureus* 22, dans le lait écrémé en présence ou en absence de la Ruminococcine A, et qui est plus nette au bout de 4 heures d'incubation.

Au delà de 4 heures d'incubation, la croissance de la souche *S. aureus* 22 dans le lait écrémé est toujours inférieure en présence de la Ruminococcine A qu'exerce une activité inhibitrice à l'égard de la souche *S. aureus* 22.

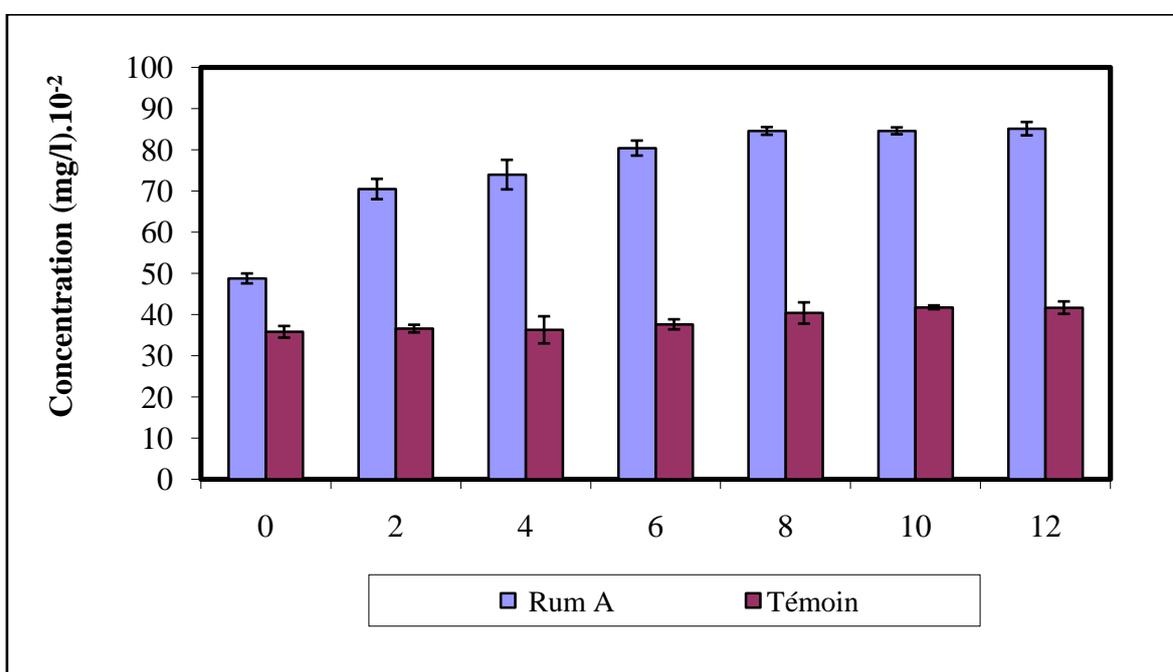
Une inhibition de 0,8 Log UFC/ml est notée après 24 heures d'incubation entre l'échantillon traité à la Rum A et l'échantillon témoin.

L'analyse statistique par le test de « Student » a révélé une différence très hautement significative entre l'échantillon traité à la Ruminococcine A et l'échantillon témoin, qui s'est traduit avec des valeurs de P observées inférieures à 0,05.

### 3. Résultats du test de la fuite du potassium

Pour déterminer si la Rum A a un impact sur la perméabilisation cellulaire exprimé par la fuite des ions  $K^+$ , la concentration externe de ces derniers est mesurée dans le surnageant de culture (en bouillon BHI) de cellules témoins et de cellules traitées avec la Ruminococcine A toutes les 2 h d'incubation, pendant 12 h (**figure 25**).

En utilisant la formule :  $(y = 0,148 x - 1,397)$  obtenue par la courbe d'étalonnage, on peut déduire facilement la concentration correspondante à chaque valeur d'absorbance donnée par le photomètre de flamme.



**Figure 25:** Variation de la concentration du potassium cellulaire de l'échantillon Rum A et l'échantillon témoin en fonction du temps.

L'échantillon traité avec la Rum A montre de grandes différences de concentration extracellulaire des ions  $K^+$  comparé à l'échantillon témoin. La fuite des ions  $K^+$ , est observée après 2 heures du traitement avec la Rum A et augmente remarquablement de  $48,77.10^{-2}$  mg/ml à  $84,59.10^{-2}$  mg/l, au bout de 8 h. Puis elle atteint une concentration maximale de  $85,14.10^{-2}$  mg/l, après 12 heures d'incubation.

Alors que pour l'échantillon témoin cette concentration reste inchangée pendant toutes les 12 heures d'incubation, à une concentration moyenne de  $38,58.10^{-2}$  mg/l.

D'après, Yildirim *et al.* (1999), l'action des peptides actifs sur la membrane résulte en une perte des ions de l'intégrité membranaire et la perte des ions potassium.

Les conséquences immédiates de la formation des pores sont la fuite de composés intracellulaires aboutissant à une dépolarisation de la membrane cytoplasmique. La fuite de composants intervenant dans la création de force protomotrice. Les fuites d'ions, et particulièrement de protons et de potassium, impliquent une modification de la force protomotrice (FPM). Cette diminution de FPM a pour conséquence un dysfonctionnement de certaines enzymes membranaires FPM-dépendant. C'est le cas du système phosphotransferase (PTS) sous l'action de la pediocine JD (Christensen and Hutkins, 1992) et de la nisine (Waite and Hutkins, 1998a), du transport actif de certains acides aminés tels le glutamate, la lysine et la leucine sous l'action de la mésentericine Y105 (Maftah *et al.*, 1993).

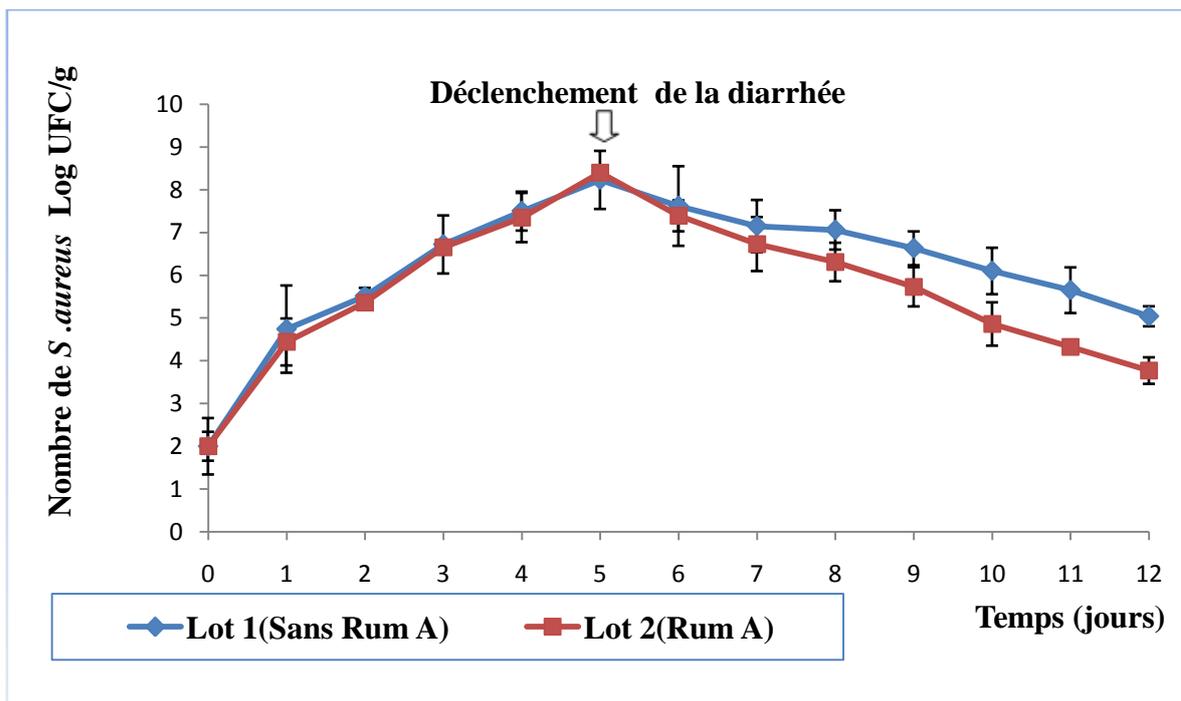
L'analyse statistique par le test de « Student » pour les échantillons indépendants démontre une différence très hautement significative entre l'échantillon traité et l'échantillon témoin, à partir de deux heures d'incubation, au moment où les valeurs de P observées sont inférieures à 0,001.

**Chapitre III :** Effet antibactérien in vivo de la Ruminococcine A à l'égard de *Staphylococcus aureus* 22

**1. Résultats de l'expérimentation animale**

**1.1. Résultats des dénombrements**

Les résultats du dénombrement de *Staphylococcus aureus* 22 pendant la période de l'expérimentation animale sont représentés sur la (figure 26).



**Figure 26:** Dénombrement de *S. aureus* pendant la période de l'expérimentation animale.

Le nombre initial de *Staphylococcus aureus* dans les selles des lapins est de 1,25 Log pour le lot 1 (non traité) et 1,67 pour le lot 2 (traité).

Ces dénombrements de *S. aureus* à Jo (avant la contamination), expriment le nombre de *Staphylococcus aureus* dans la flore fécale de lapins sains.

Ces résultats concordent avec les résultats de Simons *et al.* (2007), qui ont rapporté que le nombre de *S. aureus* dans les selles de lapins varie de 1 à 1,79 Log UFC/g de selle.

Au niveau des lots 1 et 2, le nombre de *S. aureus* augmente, pour atteindre 8 Log au bout de 5 jours de contamination, qui est la dose infectieuse provocatrice de la diarrhée.

L'augmentation du nombre de *Staphylococcus aureus* pour les deux lots suit la même allure, l'analyse statistique ne révèle aucune différence significative.

Au niveau du lot 2, le nombre de *Staphylococcus aureus* commence à diminuer significativement après 3 jours de traitement à la Rum A, par rapport au lot témoin.

Au terme du traitement (7 jours), le nombre de *S. aureus* atteint son maximum de diminution pour atteindre 3,77 Log.

A l'inverse, pour les lapins du lot 1, qui ne recevaient que du lait écrémé stérile, on a observé une diminution du nombre de *Staphylococcus aureus*, cependant moindre que pour le lot 2 elle atteint 5,04 Log après 7 jours, soit 2 Log de plus

L'analyse statistique par le test de « Student », a démontré une différence significative à partir du 5<sup>ème</sup> jour du traitement entre le lot traité avec la Ruminococcine A et le lot témoin.

Les études menées par (Schillinger *et al.*, 1996) ont prouvé que les bactériocines ne sont pas aussi efficaces dans les aliments comparées aux milieux de culture en laboratoire.

Les aliments sont des systèmes complexes se composant des divers microenvironnements qui agissent les uns avec les autres. Les interactions entre les molécules de bactériocine et les ingrédients des aliments peuvent négativement contribuer à l'efficacité des bactériocines.

D'après Laukoval *et al.* (1999) ; Smith-Palmer *et al.* (2004), l'élimination ou la réduction de *Staphylococcus aureus* in vivo, est possible par l'administration de substances douées de propriétés antibactériennes, dont on trouve les acides organiques, les extraits de plantes, les bactériocine, telle que l'enterocine CCMU231 qui exerce un rôle antistaphylococcus.

### 1.2. Coupes histologiques

#### 1.2.1. Observations microscopiques des coupes réalisées sur l'intestin grêle de chaque lapin

Au niveau de l'intestin grêle du lapin infecté par *Staphylococcus aureus* (**figure 27 B**), il y a présence de zones d'ulcérations et des cellules de l'épithélium intestinales détachées.

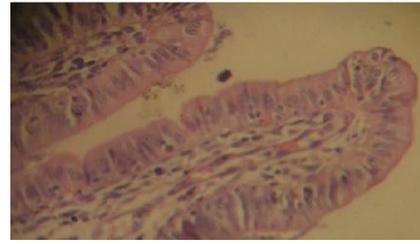
L'intestin grêle du lapin infecté par la souche de *S. aureus* 22, montre bien un effacement et un raccourcissement des villosités (nappes de cellules). On voit aussi l'apparition d'un infiltrat de lymphocytes et des infiltrats cubiques, une exocytose lymphocytaire sur l'épithélium de surface altéré qui est signe d'infection traduisant la réaction immunitaire suite à la défense du corps de lapin (**figure 28**).

Contrairement à l'observation du lapin sain (**figure 27 A**), qui montre un épithélium intestinal de structure normale avec des villosités très apparentes et bien définies, on voit bien apparaître les valvules conniventes et les 4 couches de l'intestin grêle, d'histologie normale avec des plaques de « Peyer » : la muqueuse, la musculaire muqueuse, la sous muqueuse et la musculuse.

Pour l'intestin grêle du lapin traité à la Ruminococcine A (**figure 27 C**), on a observé l'absence de zones d'atrophie villositaire, l'absence de zone d'ulcération, ainsi que la présence de zones de restauration des villosités et de la muqueuse intestinale.

Alors que, pour le lapin non traité (**figure 27 D**), les observations des coupes histologiques montrent la persistance des zones atrophiques et de cellules intestinales détachées.

Ce qui confirme l'efficacité au niveau du l'intestin grêle, du traitement par la Rum A par rapport aux observations des lapins diarrhéiques et non traités.



**Figure 28:** Réaction inflammatoire à *S. aureus* (8×40×5).



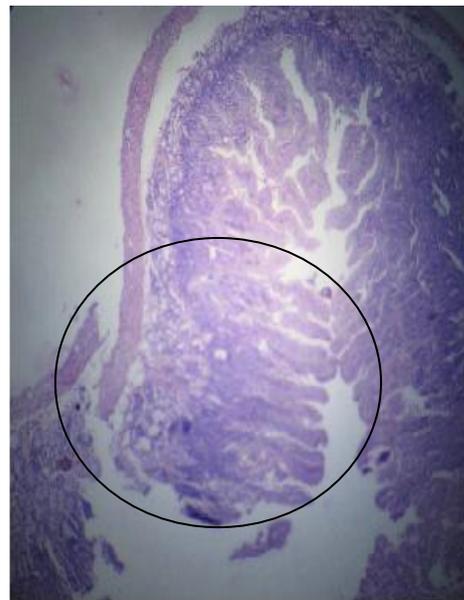
**A :** Lapin témoin.



**B :** Lapin infecté.



**C :** Lapin traité avec la Rum A.



**D :** Lapin non traité.

**Figure 27:** Observations microscopiques des coupes réalisées sur l'intestin grêle de chaque lapin (8×10×5).

### 1.2.2. Observations microscopiques des coupes réalisées sur le colon de chaque lapin.

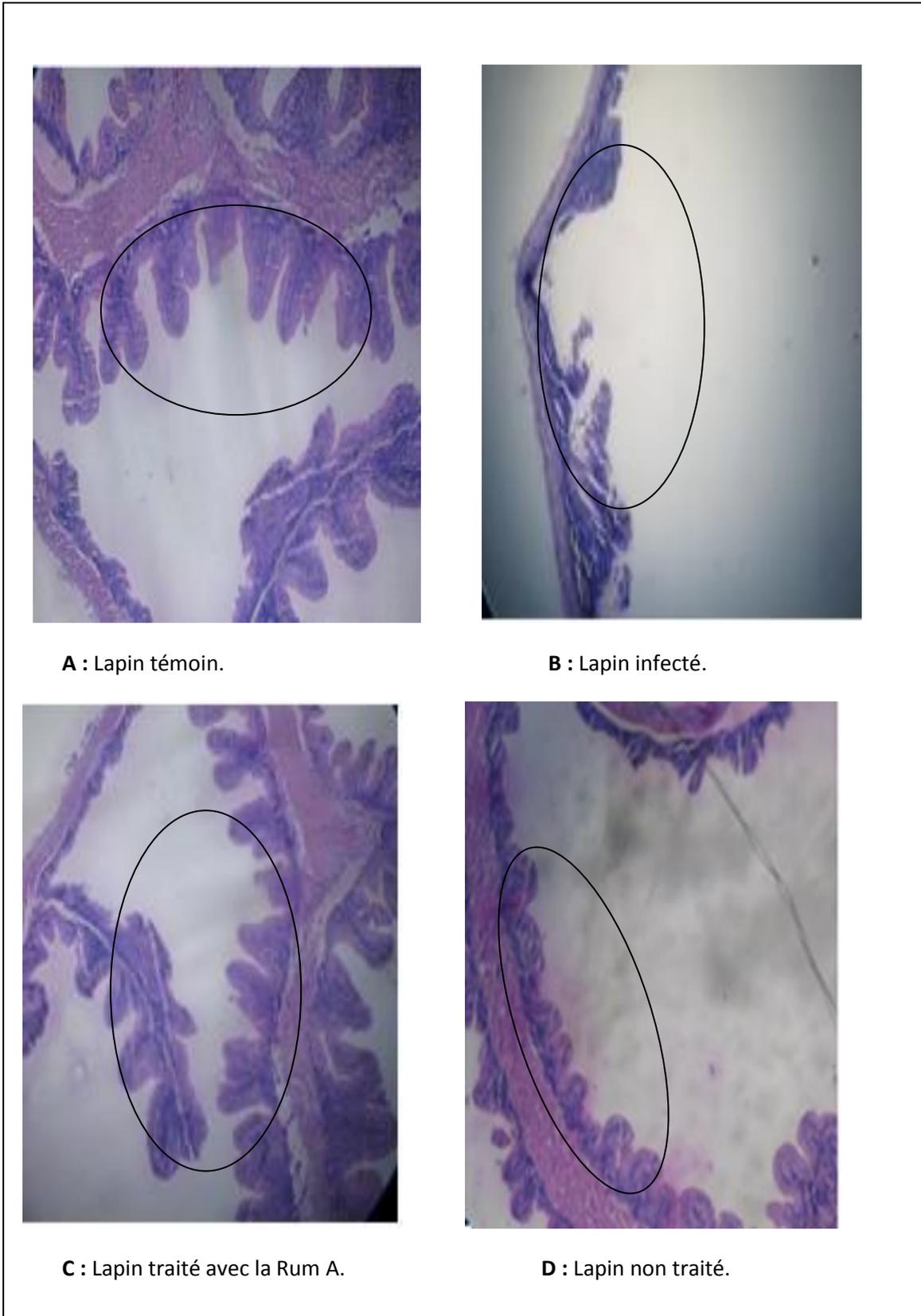
Les cryptes coliques du lapin sain (**figure 29 A**) apparaissent de grande taille sans aucune anomalie observée. Le colon est normal, l'épithélium cylindrique est régulier, pas de réaction inflammatoire, un corian normal et quelques structures de glandes de morphologie normales.

Contrairement aux cryptes du lapin infecté par *Staphylococcus aureus* (**figure 29 B**), où l'on a révélé une nette zone d'aplatissement tout au long de l'observation, la structure de la muqueuse et des villosités totalement disparues et un épithélium pseudostratifié.

Au niveau des cryptes coliques du lapin traité à la Ruminococcine A (**figure 29 C**) on a observé une régénération de la structure des cryptes bien définies, proches de celle du lapin sain. On note l'absence de réaction inflammatoire.

Cela peut s'expliquer par la restauration des cryptes grâce au traitement avec la Ruminococcine A.

Des anomalies ont été observées au niveau du lapin non traité (**figure 29 D**), des cryptes minuscules de structure anormale, des cellules non cylindriques pseudo stratifiées et dédifférenciées, contrairement aux observations du colon du lapin traité, ce qui confirme la restauration de l'épithélium intestinal au niveau de ce dernier.



**Figure 29:** Observations microscopiques des coupes réalisées sur le colon de chaque lapin (8×10×5).

Les anomalies observées aux niveaux de l'intestin grêle et du colon peuvent être interprétées par la pathogénicité de la souche de *Staphylococcus aureus* attribuée à une combinaison des facteurs extracellulaires, telles que la sécrétion des toxines, et la capacité des ces souches à adhérer aux molécules de matrice grâce aux différentes protéines des composants microbiens de surface identifiant les molécules adhésives de matrice (MSCRAMMs ; microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) qui sont impliquées dans l'adhésion de *Staphylococcus aureus* (Foster et Hook., 1998).

Hermans *et al.*, (2000), ont démontré que chez les lapins, les souches de *Staphylococcus aureus* de haute virulence ont une meilleure capacité de colonisation que les souches de basse virulence.

Dans un travail précédent ces auteurs avaient identifié des élevages de lapins dans lesquels les souches de *Staphylococcus aureus* étaient, soit grave soit bénigne (Hermans *et al.*, 1999).

Ils ont comparé les souches isolées de ces différents élevages en faisant l'hypothèse que la capacité à coloniser des souches était une composante importante des facteurs de virulence. Ils ont effectivement confirmé que les souches provenant d'élevages gravement atteints colonisent le lapin plus rapidement que les autres et qu'elles persistent plus longtemps dans l'animal. Seules les souches pathogènes ont provoqué des lésions (Hermans *et al.*, 2000).

Une seconde étude est également d'importance car elle montre qu'une technique de biologie moléculaire (RAPD) permet d'identifier les souches pathogènes et les souches non pathogènes (Herhmans et al ., 2000).

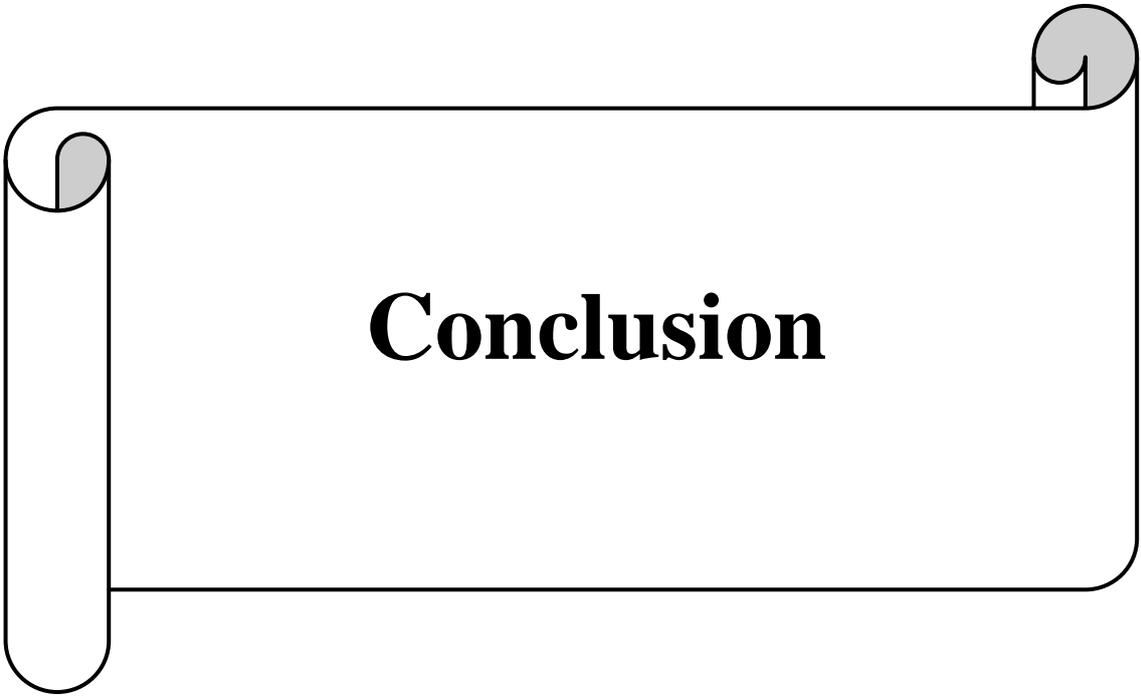
Ceci peut être provoqué par une différence d'adhésion entre les souches. En outre, les MSCRAMMs sont à l'origines de l'attachement de *Staphylococcus aureus* aux différents types de cellules (Dziewanoska *et al.*, 1999).

La responsabilité de *S. aureus* en tant qu'agent étiologique des DAA (diarrhées associées aux antibiotiques) et des colites pseudomembraneuses a été évoquée dès 1950 car la bactérie a été isolée de façon prédominante dans les selles de patients présentant des diarrhées survenues après une antibiothérapie (Oeding *et al.*, 1954; Altemeier *et al.*, 1963).

Par la suite, son rôle a été contesté, notamment en l'absence de modèle animal. À partir de 1990, la responsabilité de *S. aureus* dans certaines diarrhées post antibiotiques a été évoquée à nouveau ; ces souches de *S. aureus* sont presque toujours méticilline-résistantes (Kodama *et al.*, 1997) et produisent une entérotoxine A et une leucotoxine LukE-LukD (Gravet *et al.*, 1999), qui, expérimentalement dégradent l'épithélium intestinal chez les lapins. (Kaltenbach *et al.*, 2003).

Ces souches entraînent un déséquilibre de la flore digestive et permettent la sélection de *S. aureus* méticilline-résistants, retrouvés dans la majorité des DAA à *S. aureus*. Le traitement des DAA sévères à *S. aureus* reposerait sur la prescription de vancomycine par voie orale (Gravet *et al.*, 1999).

Au terme de cette étude *in vivo*, l'arrêt de la diarrhée, la réduction significative des comptes fécaux de *S. aureus* et les observations des villosités intestinales et les cryptes coliques du lapin traité à la Ruminococcine A, confirment le potentiel antibactérien de la Rum A pour le traitement de la diarrhée à *Staphylococcus aureus*.



**Conclusion**

Au cours de ces dernières décennies, on observe un intérêt croissant pour l'application et l'utilisation de nouvelles substances d'origines bactériennes douées d'activités antibactérienne. Ces substances trouveraient des applications, à côté des antibiotiques dans le domaine thérapeutique, et remédieraient au problème d'émergence du phénomène de la résistance aux antibiotiques. Cet aspect a été abordé dans cette étude et pour cela, 65 échantillons d'origine fécale de nourrissons diarrhéiques âgés de moins de deux ans, ayant subi un traitement antibiotique et provenant de différents hôpitaux de la région de Bejaia, ont été analysés.

D'après les résultats de la répartition des antibiotiques administrés, on a constaté que l'amoxicilline est l'antibiotique le plus administré avec un taux de 33,33 % suivi par la gentamicine à 20,43 % et l'ampicilline à 17,21 %. Les pourcentages d'administration les plus faibles sont notés pour la colistine, l'oxacilline et le céfotaxime, et le céftriaxone.

A partir de ces échantillons 66 souches pathogènes multirésistantes ont été isolées:

Selon les résultats obtenus, on constate que l'espèce la plus fréquente est *Clostridium perfringens*, suivi par *Escherichia coli*, puis *Enterobacter* sp, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* à des taux moindres.

La Ruminococcine A (Rum A), bactériocine fournie par le Laboratoire de Marseille et étudiée comme alternative a montré une bonne activité antibactérienne à l'égard d'une des souches *Staphylococcus aureus* multirésistante aux antibiotiques testés.

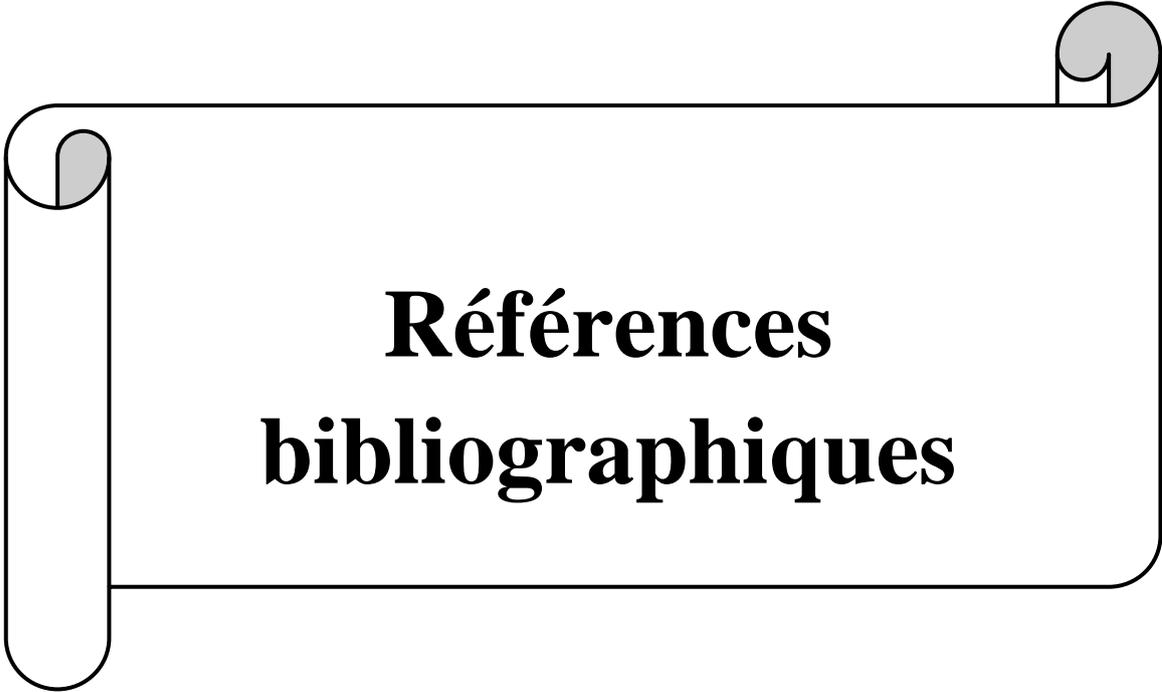
L'activité antibactérienne de la Rum A agirait sur la perméabilité membranaire matérialisée par la fuite du potassium cellulaire qui révèle une différence significative entre l'échantillon traité par la Rum A et l'échantillon témoin.

Une étude *in vivo* a été menée sur des lapins holoxéniques rendus diarrhéiques par contamination avec *S. aureus* et répartis en deux lots. Un rétablissement des lapins du lot traité par 100 mg/ml de la Rum A a été observé par rapport au lot non traité.

L'observation des différentes coupes histologiques des lapins, après dissection, a montré que l'intestin grêle et le colon des lapins infectés par la souche *S. aureus* et non traités par la Rum A, étaient atrophiques, montrant des destructions et des lésions des villosités intestinales et des cryptes coliques. A l'inverse, chez les lapins traités par la Rum A, une restauration des villosités est observée se rapprochant de l'aspect de celles des lapins sains.

La Rum A semble donc être une alternative pour agir sur *Staphylococcus aureus* et en l'occurrence sur le SARM.

En perspective à cette étude, des essais de la Rum A doivent être réalisés sur d'autres espèces pathogènes et sur *Staphylococcus aureus* avec une meilleure maîtrise de la dose à administrer.



**Références  
bibliographiques**

## ***Références bibliographiques***

- **Altmeier, W.A., Hummel, R.P., Hill, E.O.** (1963). Staphylococcal enterocolitis following antibiotic therapy. *Ann Surg.* **157**: 847–58.
- **Alegre, E. I.** (2009). Les protéines bactériennes tant que biomarqueurs de l'activité probiotique. [thèse Doctorat]. Université de Strasbourg. 215 p.
- **Avril, J.L ; Dabernat, H ; Denis, F et Monteil, H.** (2000). Bactériologie clinique : 3<sup>ème</sup> édition. Ed. Ellipses, Bargo, Paris. 6-434.
- **Barrene-Ganzalez, C., Huot, E and Petidemange, H.** (1996). Mode of action of bacteriocin (J46). *Journal of Food Protection.* **9**: 955-96.
- **Barrial, K and Scott, J.** (2006). Classification Raisonnée Des B-lactamines Chez Les Bacilles Gram Négatif Perspectives D'évolution [thèse Doctorat]. 1-108.
- **Bergey's, M; Garriti, G. M; Bell, J.A. and Timothy, G. L.** (2008). Taxonomie outline of the prokaryotes: *BERGEYS Manual Of systematic bacteriology.* Ed. Springer, New York. 401 p.
- **Bartlett, J.G.** (2002). Antibiotic-associated diarrhea. *N Eng J Med* 2002. **9**: 346334.
- **Bonnet, R.** (2006). B-lactamines et entérobactéries P. ed Courvalin, Leclerc R et Bingen E, *ANTIBIOGRAMME*, 2<sup>ème</sup> ed. ESKA, Paris. 141-162.
- **Bryskier, A ;Acar, J ;Glauser, M et Moreillon, P.** (1999). Antibiotiques agents antibactériens et antifongiques. Ed. Ellipses Edition Marketing S.A, Paris. 91p.
- **C-CLIN Ouest, S.** (2002). Risques infectieux et soins ambulatoires. Hygiène des soins infirmiers en ambulatoire : 13-31.
- **Canard, B; Garnier, T; LA FAY, B; Christen, R et Cole, T.** (1992). Phylogenetic Analysis of the Pathogenic Anaerobe *Clostridium perfringens* Using the 16s rRNA Nucleotide Sequence. Ed. *International journal of systematic bacterial*, Copyright©. 312-314.
- **Carbon, C ; Regnier, B ; Saimot, G ; Vilde, J.L et Yeni, P.** (1995). Médicaments anti- infectieux. Ed. *Medecine Sciences-Flammarion*, Casimir-Dalvigne, Paris. 3-4.

- **Carlton, L. G; John, F; Prescott, J; Songer, G and Charles Thoen, O.** (2004). Pathogenesis of bacterial infections: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Ed. Blackwell Publishing Professional, State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA. 45 p.
- **Cavallo, J.D ; Antoniotti, G ; Baffo, N ; Condrais, G.S ; Horn, C ; Le Gouhir, C ; Le Carbonnel, A ; Blanckaert, K ; Naas, T ; Seringe, E ; Botherel, A.H ; Aggoune, M ; Lahoute C ; Cattoen, C ; Astagneaul, P ; Normann, P et Coignard, B.** (2004). Diffusion régionale inter hospitallère d'un *Acinetobacter baumannii* multirésistant, producteur de Beta-lactamase à spectre étendu VEB-1, Nord-Pas-de-Calais, avril 2003 à février. BEH 2004. **32-33** :141-159.
- **Christensen, D.P and Hutkins, R.W.** (1992). Collapse of the proton motive force in *Listeria monocytogenes* caused by a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. Applied and Environmental Microbiology. **58(10)**: 3312-5.
- **Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.** (2005). Communiqué. Numéro spécial SFM et site internet : <http://www.sfm.asso.fr/>
- **Corne, P.** (2004). *Staphylococcus aureus* dans un service de réanimation : étude génétique, phénotypique et épidémiologique. [thèse Doctorat]. Université Montpellier. 1-116.
- **Corthier, G., Sokol, H., Dore, J.** (2007). Diversité du microbiote et de ses fonctions. Springer. **2**: 215–220.
- **Corthier, G; Sokol, H; Dore J.** (2007). Diversité du microbiote et de ses fonctions. Springer. **2**: 215–220.
- **Cuchural, G. J., Jr., M. H. Malamy, and F. P. Tally.** (1986). B-lactamase-mediated imipenem resistance in *Bacteroides fragilis*. Antimicrob. Agents Chemother. **30**:645-648.
- **Cushnie, T.P. Tim, Lamb Andrew .J.** (2005). Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. Journal of Ethnopharmacology. **101**: 243–248.
- **Daba, H., Pandian, S., Gosselin, J.F., Simand, R.E., Huang, I and Lacoix, R.E.** (1991). Detection and activity of a bacteriocin produces by *Leuconostoc mesenteroides*. Applied and Environmental Microbiology. **57(12)**: 3450-5.
- **Dabard, J ; Bridonneau, C ; Phillipe, C ; Anglade, P ; Molle, D, Nardi, M ; Ladiré, Hould, R.** (1984). Technique d'histologie et cytologie. Ed. Gécarié. 65-76.

- **Dabard, J., Bridonneau, C., Phillippe., C., Anglade, P., Molle, D., Nardi., M., Ladiré, M., Girardine, H., Marcilles., F., Gomez., A and Fons, M .** (2001). Ruminococcin A, a new Lantibiotic Produced by a Ruminococcus gnavus Strain Isolated from Human Feces. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**: 4111-4118.
- **Davin-Regli, A ; Bosi, C ; Charrel, R.N ; Ageron, E ; Papazian, L ; Grimont, P.A.D; Cremieux, A and Bollet, C.** (1996). A nosocomial outbreak due to *Enterobacter cloacae* strains with the *E. hormachei* genotype in patients treated with fluoroquinolones treatment, *J. Clin. Microbiol.* **35**: 1008-1010.
- **De La Cochetiere M.F ; Durand, T ; Lepage, P ; Bourreille, A ; Galmiche, J.P, and Dore, J.** (2005). Resilience of the Dominant Human Fecal Microbiota upon Short-Course Antibiotic Challenge. *American Society for Microbiolog.* **43** (11): 5588–5592.
- **Devriese, L. A., and J. Hommez.** (1975). Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds. *Res. Vet. Sci.* **19**:23–27.
- **Devriese, L. A., Godard, C., Okerman, L. and Renault, L.** (1981). Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains from rabbits. *Ann. Rech. Vét.* **12**: 327–332.
- **Djoudi, F.** (2007). Etude de profils de résistance aux B-lactamines de souches hospitalières dans la Wilaya de Béjaia. [thèse Magister]. Universté A. MIRA. 1-65.
- **Dortu, C., Thonart, P.** (2008). Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2009 13(1) :143-154.
- **Drider, D et al.** ( 2006). The continuing story of class IIa bacteriocin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.***70** (2): 564-582.
- **Dziewanowska, K., Patti, J. M., Deobald, C. F., Bayles, K. W., TRumble W. R., Bohach, G.A.** (1999). Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect. Immun.* **67**:4673-4678.

- **Eijsink, V.G. et al.** (1998). Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64(9)**: 3275-3281.
- **Ennhar, S., Deschamps, N., Richard, J.** (2000a). Natural variation in susceptibility of *Listeria* strains to classe IIa bacteriocins. *Current Microbiology*. **41(1)**: 1-4.
- **Farhat, H ; Cachât, E ; Antoun, S ; Nitenberg, G ; Zahar, J.R.** (2008). Infections à *Bacillus* et immunodépression, à propos de deux cas Two cases of *Bacillus* infection and immunodepression. Elsevier Masson SAS. **38** :612-614.
- **Fimland, G. et al.** (2000). A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *J. Bacteriol.*, **182**: 2643-2648.
- **Finegold, S. M.** (1989). Mechanisms of resistance in anaerobes and new developments in testing. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **12**: 117-120.
- **Fomsgaard, A., Hoiby, N., Friis, H et al.** (1995). Prevalence and antibiotic sensitivity of Danish versus other European bacterial isolates from intensive and hematology oncology units. *Eur. J. Clin. Microb. Infect. Dis.* **14** (4) : 275-281.
- **Foster, T.J., Hook, M.** (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* **12**: 484-488.
- **Franz, C.M., Du Toit, M., Von Holy, A., Schillinger, U., Holzapfel, W. H.** (1997). Production of nisin-like bacteriocins by *Lactococcus lactis* strains isolated from vegetables. *Journal of basic microbiology* .**37(3)**:187-96.
- **Gangoue-Pieboji, J.** (2007). Caractérisation des Beta-lactamases et leurs par les extraits de plantes médicinales [thèse Doctorat]. Université de Liege. 1-105.
- **Giamarellou, H.** (2006). Treatment options for multidrug-resistant bacteria. *Expert Rev. Anti Infect*: 601-618.
- **Goulet .O.** (2009). La flore intestinale : un monde vivant à préserver. **22** : 102-106.
- **Gravet, A., Rondeau, M., Harf-Monteil, C., Grunenberger, F., Monteil, H., Scheftel, J.M., et al.** (1999). Predominant *Staphylococcus aureus* isolated from antibiotic-associated diarrhea is clinically relevant and produces enterotoxin A and the bicomponent toxin LukE-LukD. *J Clin Microbiol.* **37**: 4012–9.
- **Guiraud, J., et Galzy, P.** (2003). L'analyse microbiologique dans les industries agroalimentaires. Ed. Dunod masson ho. 696 p.

- **Hagen, K. W.** (1963). Disseminated staphylococcal infection in young domestic rabbits. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **142**: 1421–1422.
- **Hamdad, F; Donda, F; Laurans, Canarelli, G.B, Rousseau, F; Biendo, M; Thomas, D.F.** (2006). Performance of different methods of oxacillin resistance detection in atypical strains of *Staphylococcus aureus*. *Pathologie Biologie.*; **54**:447-452.
- **Hedberg, M., C. Edlund, L. Lindquist, M. Rylander, and C. E. Nord.** (1992). Purification and characterisation of an imipenem hydrolysing metallo-beta-lactamase from *Bacteroides fragilis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **29**:105-113.
- **Hermans, K., De Herdt, P., Devriese, L.A., Godard, C., Haesebrouck, F.** (2000). Colonisation of rabbits with *Staphylococcus aureus* after experimental infection with high and low virulence strains. *Vet. Microbiol.* **72**: 277-284.
- **Hermans, K., De Herdt, P., Devriese, L.A., Hendrickx, W., Godard, C., Haesebrouck, F.** (1999). Colonization of rabbits with *Staphylococcus aureus* in flocks with and without chronic staphylococcosis. *Vet. Microbiol.* **67**: 37-46.
- **Hermans, K., Haesebrouck, F., Vaneechoutte, M., Devriese, L., Godard, C and De Herdt, P.** (2000). Differentiation between high and low virulence *Staphylococcus aureus* strains from rabbits by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-analysis. *Elsevier Science B.V.* **72 (3-4)**: 311-319.
- **Hiron, A.** (2007). Les transporteurs de peptides de *Staphylococcus aureus*. *Agro Paris Tech.* [thèse Doctorat]. 242 p.
- **Hormaeche, E and Edwards, P.R.** (1960). A proposed genus *Enterobacter*. *Int. Bull of Bacteriological Nomenclature*, **10**: 71-74.
- **Isolauri, E.** (2004). Probiotics. University of Turku, Finland.**18**: 299-313.
- **Jalaluddin, S; Devaster, J.M; Scéen, R; Gerard, M and Butzel, J.P.** (1998). Molecular epidemiological study of nosocomial *Enterobacter aerogenes* isolated in Belgian hospital. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 1846-1852.
- **Jarlier, V.** (2004). Bactéries multirésistantes dans les hôpitaux français : bilan en 2004 et perspectives de surveillance nationale dans le cadre du Réseau d'Alerte d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN). **2001**:1-10.

- **Jasniewski, J.** (2008). Etude des mécanismes d'action de bactériocines de la sous-classe IIa. [thèse Doctorat]. Nancy-University (INPL). 155 p.
- **Joffin, J.N et Leyral, G.** (1991). Microbiologie techniques. Ed. Centre régional de documentation pédagogique-Bordeaux. 32p.
- **Joly, B et Reynaud, L.** (2002). Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic. Ed. Tec et Doc, Lavoisier, Paris. 27-92.
- **Kahlmeter, G.** (2003). An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO-SENS Project. *J Antimicrob Chemother.* **51**: 69-76.
- **Kaltenbach, G., Gravet, A., Heitz, D., Noblet-Dick, M., Prévost, G., Monteil, H.** (2003). Comparaison des caractéristiques des diarrhées postantibiotiques à *Clostridium difficile* et à *Staphylococcus aureus*. Presse Med sous presse.
- **Klaenhammer, T.R.** (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, **70**: 337-349.
- **Klaenhammer, T.R.** (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12(1-3)**: 39-85.
- **Kling, P.A., R. Ostensson, S. Granstrom, and L. G. Burman.** (1989). A 7-year survey of drug resistance in aerobic and anaerobic fecal bacteria of surgical inpatients: clinical relevance and relation to local antibiotic consumption. *Scand. J. Infect. Dis.* **21**:589-596.
- **Kodama, T., Santo, T., Yokoyama, T., Takesue, Y., Hiyama, E., Imamura, Y., et al.** (1997). Postoperative enteritis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Surg Today.* **27**:816–25.
- **Lamprell, H.** (2003). Production des entérotoxines dans les fromages en fonction de la diversité phénotypique et génétique des souches de *Staphylococcus aureus*. Université de Bourgogne. [thèse Doctorat]. 223 p.
- **Larpent, J.P.** (2000). Introduction à la nouvelle classification bactérienne : les principaux groupes bactériens. Ed. Tec et DOC, Lavoisier-Paris. 93 p.
- **Lauková, A., Czikkova, S., Burdova, O.** (1999). Anti-staphylococcal effect on enterocin in Sunar ® and yogurt. *Folia Microbiol.* **44**: 707-711.
- **Leder, P., Clayton, D. A and Rubenstein, E.** (1994). Introduction to Molecular Medicine. Ed. Scientific American, Inc., New York. P 333.
- **Levine, M.M.** (1985). *Escherichia coli* infections. *N. Engl. J. Med.* **313** :445-447.

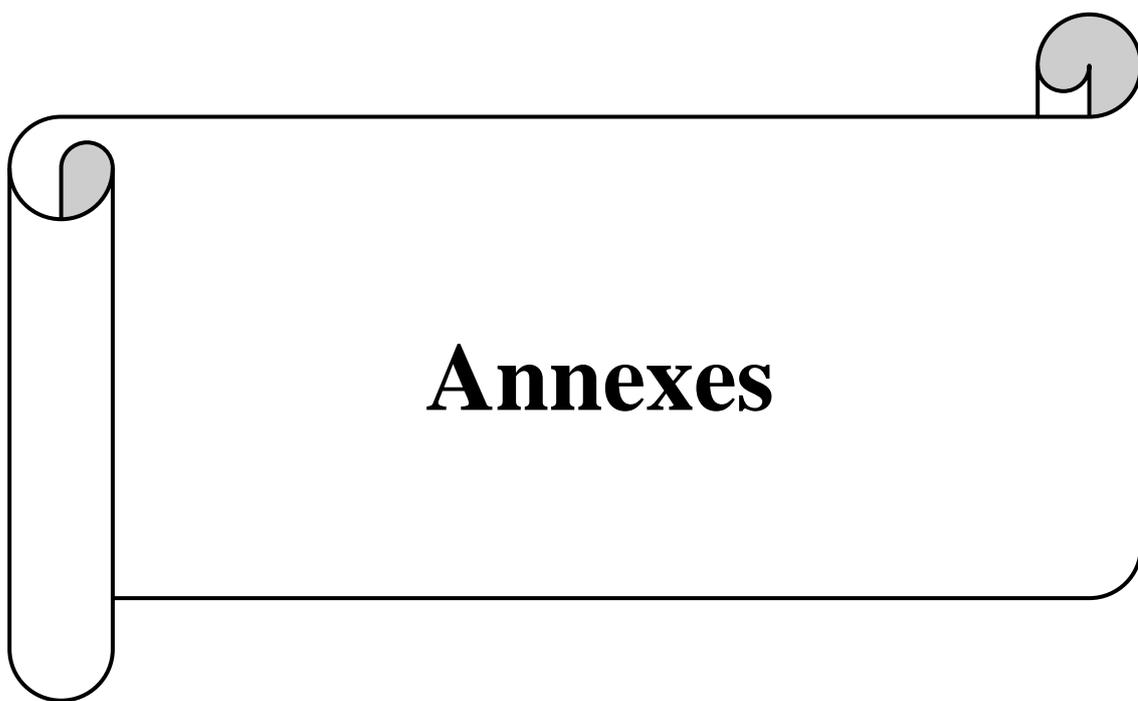
- **Levy, S. B., B. Marshall, S. Schluederberg, D. Rowse, and J. Davis.** (1988). High frequency of antimicrobial resistance in human fecal flora. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**:1801-1806.
- **Lewus, C.B., Kaiser, A., Montville, T.J.** (1991). Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Appl Environ Microbiol.* Jun. **57(6)**:1683–1688.
- **Lindberg, E., Adlerberth, I., Hesselmar, B., Saalman, R., Strannegård, I.L., A°berg, N and E. Wold, A.** (2004). High Rate of Transfer of *Staphylococcus aureus* from Parental Skin to Infant Gut Flora. *American Society for Microbiology.* **42(2)**:530–534.
- **Lundegard, H.** (1934). « Die quantitative Spektral analyse der Elemente », Jena.
- **Maftah, A., Renault, D., Vignoles, C., Hechard, Y., Bressollier, P., Ratinaud, M.H., Cenatiempo, Y and Julien, R.** (1993). Membrane permeabilization of *Listeria monocytogenes* and mitochondria by the bacteriocin mesentericin Y105. *Journal of Bacteriology.* **157(10)**: 3232-5.
- **Marchadier, E.** (2009). Etude fonctionnelle d'un centre d'interactions protéiques chez *Bacillus subtilis* par une approche intégrée. [thèse Doctorat]. Université Paris. 6-7.
- **Marchal, N., Bourdon, J.L and Richard, C.** (1982). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed. Doin Editeurs, Paris. 482 p.
- **Martinez- Cuesta, M.C., Pelaez, C., Juarez, M and Requentia, T.** (1997). Autolysis of *Lactococcus lactis ssp. lactis* and *Lactobacillus casei ssp. casei* cell lysis induced by a crude bacteriocin. *International Journal of Microbiology.* **38(2-3)**: 125-31.
- **McNamara, P. J., and Iandolo, J.J.** (1998). Genetic instability of the global regulator *agr* explains the phenotype of the *xpr* mutation in *Staphylococcus aureus* KSI9051. *J. Bacteriol.* **180**:2609–2615.
- **Meghrou, J., Fliss, I., Bouksaim, M and Lacoix, C.** (1999). Digoxigenin-labeled probe for rapid identification of nisinogenic *Lactococcus lactis* strains. *FEMS Microbiology Letters.* **171(1)**: 43-8.
- **Mirabaud, M.I.** (2003). Entérobactéries à beta-lactamases à spectre élargie en pédiatries en 1996 (thèse Doctorat). Université De Genève. 1-44.

- **Morency, H., Mota-Meira, M., Lapointe, G., Lacoix, C and Lavoie, C.** (2001). Comparison of the activity spectra against pathogens of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic. *Canadian Journal of Microbiology*. **47(4)**: 322-31.
- **NCCLS.** (1999). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Approved Guideline (M26-A), vol. 19. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pennsylvania.
- **Nettles, C.G. and Barefoot, S.F.** (1993). Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*. **56**: 338–356.
- **Nord, C. E., and M. Hedberg.** (1990). Resistance to beta-lactam antibiotics in anaerobic bacteria. *Rev. Infect. Dis.* 12(Suppl. 2):231-234.
- **Nowrouzian, F., Hesselmar, B., Saalman, R., Strannegard, I.L., Åberg, N., E. Wold, A and Adlerberth, I.** (2003). *Escherichia coli* in Infants' Intestinal Microflora: Colonization Rate, Strain Turnover, and Virulence Gene Carriage. International Pediatric Research Foundation, Inc. **54 (1)**: 8–14.
- **Oeding, P., Austarheim, K.** (1954). The occurrence of staphylococci in the intestinal content after treatment with antibiotics. *Acta Pathol Microbiol Scand*. **35**: 473–83.
- **Okerman, L., Devriese, L. A; Maertens, L; Okerman, F and Godard, C.** (1984). Cutaneous staphylococcosis in rabbits. *Vet. Rec.* **114**:313–315.
- **Philippon, A et Arlet, G.** (2006). B-lactamases de bacilles à Gram négatif : Le mouvement perpétuel. *Ann Biol Clin*. **64** :37-51.
- **Piazzini, C** (2000). Les bactéries font de la résistance. Ed. Réseau CNDP, Paris. p 8.
- **Poyart, C., Jardy, L; Quesne, G., Berche, P., Trieu-Cuot, P.**(2003). Genetic basis of antibiotic resistance in *Streptococcus agalactiae* strains isolated in a French hospital. *Antimicrobial agents and chemotherapy*.**47**:794-7.
- **Prescott, L. M; Harley, J.P; Klein, D. A.** (2003). *MICROBIOLOGE*. Ed. De Boeck and Larcier - Bruxelles. 818 p.
- **Rabago, A.M.** (2001). Larousse. Ed. IME, Paris. 333 p.
- **Richard, C. et al.** (2006). Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. *Food Microbiol.*, **23(2)**: 175-183.

- **Richard, V ; Auwera, V.P ; Snoeck, R ; Daneau, D ; Meunier, F.** (1988). Nosocomial bacteremia caused by *Bacillus* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* .**7**:783–5.
- **Rigottier-Gois, L., Le Bourhis, A.G., Gramet, G et al.** (2003). Fluorescent hybridisation combined with flow cytometry and hybridisation of total RNA to analyse the composition of microbial communities in human faeces using 16S rRNA probes. *FEMS Microbiology Ecology*. **43**: 237-45.
- **Rossi, G., Stanzel, C and Witte, W.** (1995). *Staphylococcus aureus* infections in the rabbit and the transmission of the pathogens with the sperma. 9. Arbeitstagung über Haltung und Krankheiten der Kaninchen, Pelztiere und Heimtiere, 251-257.
- **Roy, D.** (2000). Identification et caractérisation de la région variable des intégrons de classe I identifiés chez différents isolats cliniques à Gram-négatif et caractérisation du mécanisme de résistance aux B-lactamines chez un isolat de *Salmonella* spp. Isolé au Québec. Université Laval-Canada. [thèse Doctorat]. 179 p.
- **Ruth, A.M.V; Cantera1, G and Asuncion, K. R.** (2005). Utilization of a polyphasic approach in the taxonomic reassessment of antibiotic and enzyme-producing *Bacillus* spp. isolated from the Philippines. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **21**:635–644.
- **Sanders, W. E and Sanders, C.C.** (1997). *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**: 220-241.
- **Schillinger, U., Geisen, R., and Holzaphel, W. H.** (1996). Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservations of foods. *Trends in Food Science and Technology*. **7**: 158–164.
- **Sghir, A., Gramet, G., Suau, A et al.** (2000). Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol.* **66**: 2263-6.
- **Simonova, M., Fotta, M., Laukova.** (2007). Characteristics of *Staphylococcus* isoated from Rabbits. *Folia Microbiol* .**52 (3)** : 291-296.
- **Singleton, P.** (2004). *Bactériologie: pour la médecine, la biologie et les biotechnologies.* Ed. Dunod, Paris. 329-364.
- **Singleton, P.** (2005). *Bacteriologie: pour la médecine, la biologie et les biotechnologies.* Ed, Dunod, Paris. 311-329.

- **Sirot, D., Chanal, C., Henquell, C et al.** (1994). Clinical isolates of *Escherichia coli* producing multiple TEM mutants resistant to B-lactamase inhibitors. *J Antimicrob Chemother.* **33**: 1 117-26.
- **Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyle, L.** (2004). Influence of subinhibitory concentration enterotoxins A and B and  $\alpha$ -toxin by *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* **53**: 1023-1027.
- **Soussy, C.J.** (1997). État actuel de la résistance aux antibiotiques. *Médecine Thérapeutique 3 : hors-série janvier* : 24-36.
- **Spicer, J. W.** (2000). *Pratique clinique en bactériologie, mycologie et parasitologie.* Ed. Harcourt Publisher Limited-London. 2-43.
- **Spicer, J. W.** (2003). *Pratique clinique en bactériologie, mycologie et parasitologie.* Ed. Flammarion Médecine-sciences, France. 28-47.
- **Stark, C.A., Edlund, C., Sjostedt, S., Kristensen, G and NORD, C.E.** (1993). Antimicrobial Resistance in Human Oral and Intestinal Anaerobic Microfloras. *American Society for Microbiology.***37 (8)**: 1665-1669.
- **Sutra, L; Federighi, M and Jouve, J.L.** (1998). *Manuel de bactériologie clinique.* Ed. POLYTECHNICA, Lacépède-Paris. 163 p.
- **Tally, F. P., G. J. Cuchural, Jr., and M. H. Malamy.** (1984). Mechanisms of resistance and resistance transfer in anaerobic bacteria: factors influencing antimicrobial therapy. *Rev. Infect. Dis.* **6(Suppl. 1)**:260-269.
- **Twomey, D., Ryan, M., Meaney, B and Hill, C.** (2002). Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek.* **82**:165-185.
- **Vincent, J., Bihari, D., Suter, P.** (1995). The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe: results of the European Prevalence of infection in intensive care (EPIC) study. *JAMA .* **274**: 639-644.
- **Voss, A.,Milatovic, D., Wallrauch-Schwartz, C., Rosdahl, V., Braveny, I.** (1994). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13** : 50-55.
- **Vuillermoz, L.** (2005). *Etude du botulisme aviaire dans le cadre d'un lac artificiel urbain.* Université Claude-Bernard-Lyon. [thèse Doctorat]. 93 p.
- **Waite, B.L and Hutkins, R.W.** (1998a). Bacteriocins inhibit glucose PEP: PTS activity in *Listeria monocytogenes* by induced efflux of intracellular metabolites. *Journal of Bacteriology.* **85(2)**: 287-92.

- **Weber, D.J; Saviteer, S.M; Rutala, W.A; Thomann, C.A.** (1988). In vitro susceptibility of *Bacillus* spp. to selected antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.***32**:642–5.
- **Welsh, U.** (2000). *Sobotta. Atlas d'histologie.* Ed. Tech & Doc. 4ème édition. 427 p.
- **Yang, Y., Wu, P., Livermore, D.M.** (1990) Biochemical characterization of a B-lactamase that hydrolyses penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrob Agents and Chemother.* **34**: 755-8.
- **Yildirim, Z ., Winters, D., Johnson, M.G.**(1999). Purification, amino acid sequence and mode of action of bifidocin B produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *Journal of Applied Microbiology.* **86**: 45-54.



# **Annexes**

## Annexe1. Données bibliographiques

**Tableau I:** Les abréviations d'une lettre pour chaque acide aminé et leur correspondance aux codons ADN. D'après (Leder *et al.*, 1994).

Acide aminé	Abréviations 3-Lettres	Abréviations 1 -Lettre	Codon(s)
Alanine	Ala	A	GCA, GCC, GCG, GCT
Arginine	Arg	R	CGA, CGC, CGG, CGT, AGA, AGG
Aspartic acid	Asp	D	GAC, GAT
Asparagine	Asn	N	AAC, AAT
Cysteine	Cys	C	TGC, TGT
Glutamic acid	Glu	E	GAA, GAG
Glutamine	Gln	Q	CAA, CAG
Glycine	Gly	G	GGA, GGC, GGG, GGT
Histidine	His	H	CAC, CAT
Isoleucine	Ile	I	ATA, ATC, ATT
Leucine	Leu	L	CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, TTG
Lysine	Lys	K	AAA, AAG
Methionine	Met	M	ATG
Phenylalanine	Phe	F	TTC, TTT
Proline	Pro	P	CCA, CCC, CCG, CCT
Serine	Ser	S	TCA, TCC, TCG, TCT, AGC, AGT
Threonine	Thr	T	ACT, ACC, ACG, ACT
Tryptophan	Trp	W	TGG
Tyrosine	Tyr	Y	TAC, TAT
Valine	Val	V	GTA, GTC, GTG, GTT
STOP	-	-	TAG, TAA, TGA

## Annexe 2. Données matériel et méthodes

**Tableau II:** Composition de la gélose nutritive (pH = 7,2) (Guiraud et Galzy, 2003).

Composition	Quantité g/l
Peptone	10 g
Extrait de viande	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
pH = 7,2	

**Tableau III:** Composition du bouillon nutritif (Guiraud et Galzy, 2003).

Composition	Quantité g/l
Peptone	10 g
Extrait de viande	5 g
NaCl	5 g
pH = 7,2	

**Tableau IV:** Composition de la gélose Chapman (pH = 7,4-7,5) (Guiraud et Galzy, 2003).

Composition	Quantité g/l
Peptone	11
Extrait de viande	1
Chlorure de sodium	75
Manitol	10
Agar	15
Rouge de phénol	0,025

**Tableau V:** Composition de la gélose Mossel (Marchal *et al.*, 1982).

Composition	Quantité g/l
Extrait de viande	1
Peptone	10
D-Manitol	10
Chlorure de sodium	10
Rouge de phénol	0,025
Agar	12
pH = 7,1	

**Tableau VI:** Composition de la gélose EMB (Guiraud et Galzy, 2003).

Composition	Quantité g/l
Peptone de viande	10
Lactose	10
Phosphate di potassique	2
Eosine jaunâtre	0,4
Bleu de méthylène	0,067
Agar	13,5
pH = 7	

**Tableau VII:** Composition de la gélose viande foie (VF) (Marchal *et al.*, 1982).

Composition	Quantité g/l
Extrait de viande -foie	30
Glucose	2
Amidon	2
Gélose	12
pH = 7,6	

**Tableau VIII:** Composition du bouillon BHI (pH = 7,4) (Marchal *et al.*, 1982).

Composition	Quantité g/l
Protéose peptone	10
Infusion de cervelle de veau	12,5
Infusion de cœur de bœuf	5
Chlorure de sodium	5
Phosphate disodique	2
Glucose	7,4
pH = 7,4	

**Tableau IX:** Composition du bouillon Giolitti cantoni (Marchal *et al.*, 1982).

Composition	Quantité g/l
Tryptone	10
Extrait de viande	5
Extrait de levure	5
Chlorure de sodium	5
Glycine	20
Pyruvate de sodium	3
pH = 6,9	

**Tableau X:** Composition du milieu Urée Indole (Marchal *et al.*, 1982)..

Composition	Quantité g/l
Tryptophane	03
Phosphate monopotassique	01
Phosphate bipotassique	05
Chlorure de sodium	05
Urée	20
Rouge de phénol	10,025
Alcool à 90°	10 ml
pH = 6,7	

**Tableau XI:** Composition du milieu Clark et Lubs (Marchal *et al.*, 1982).

Composition	Quantité g/l
Peptone trypsique ou polypeptone	5
Glucose	5
Phosphate bipotassique	5
pH= 7.	

**Tableau XII:** Composition du milieu de Citrate de simmons (Marchal *et al.*, 1982).

Composition	Quantité g/l
Citrate de sodium	02
Chlorure de sodium	05
Sulfate de magnésium	0,2
Phosphate monoammoniaque	1
Phosphate bipotassique	1
Bleu de bromothymol	0,08
Agar	15
pH = 7,0-7,2	

**Tableau XIII:** Composition du milieu Hajna-Kligler (Marchal *et al.*, 1982).

Composition	Quantité g/l
Extrait de viande de bœuf	3
Extrait de levure	3
Peptone	20
Chlorure de sodium	5
Citrate ferrique	0,3
Thiosulfate de sodium	0,3
Lactose	10
Glucose	1
Rouge de phénol	0,05
Agar	12
pH=7,4	

**Tableau XIV:** Composition du milieu Mueller-Hinton (Marchal *et al.*, 1982).

Composition	Quantité g/l
Infusion de viande de bœuf	300
Hydrolysât de caséine	17,5
Amidon	1,5
Agar	17
pH=7,4	

**Tableau XV:** Composition de la gélose à ADN (Marchal *et al.*, 1982).

Composition	Quantité g/l
Peptone pepsique ou trypsique de caséine	20
Acide désoxyribonucléique (ADN)	2
Na Cl	5
Agar	15
pH=7,3	

**Tableau XVI:** Composition du milieu TSI (Marchal *et al.*, 1982).

Composition	Quantité g/l
Extrait de viande de bœuf	03
Extrait de levure	03
Peptone	20
Chlorure de sodium	05
Citrate ferrique	0,3
Thiosulfate de sodium	0,3
Lactose	10
Saccharose	10
Glucose	01
Rouge de phénol	10,05
Agar	12
pH=7,4	

### Annexe 3. Résultats

**Tableau XVII:** Distribution des antibiotiques selon l'âge (sexe masculin).

Echantillon	Age (mois)	ATB
1	1,67	ampicilline, métronidazole
2	8	ampicilline, gentamycine, céfazoline
3	4,5	métronidazole, céfazoline
4	12	gentamycine, céfazoline
5	24	amoxilline
6	12	métronidazole, ampicilline
7	18	céfazoline
8	18,5	amoxilline
9	28 jours	amoxilline, gentamycine
10	6	amoxilline
11	6	amoxilline
12	1,1	gentamycine, ampicilline
13	1,23	ampicilline
14	8,5	amoxilline
15	24	amoxilline
16	1,33	ampicilline, gentamycine, ceftizoxime
17	1,5	ampicilline
18	18	céfotaxime
19	2,5	gentamycine, métronidazole
20	5	ampicilline
21	1,33	gentamycine, ampicilline, ceftizoxime
22	1,5	ampicilline
23	18	gentamycine, ceftizoxime
24	5	amoxilline
25	2,5	amoxilline
26	14	ampicilline
27	9	amoxilline
28	28 jours	amoxilline
29	9	céfazoline
30	3	amoxilline, gentamycine, colistine
31	1,33	amoxilline, gentamycine
32	6	céfotaxime
33	3	gentamycine, céfotaxime
34	8	gentamycine, amoxilline
35	2	amoxilline, gentamycine
36	1,37	amoxilline, gentamycine
37	2	amoxilline
38	9	céfazoline
39	7	amoxilline
40	3	ampicilline
41	5	amoxilline

**Tableau XVIII :** Distribution des antibiotiques selon l'âge (sexe féminin).

Echantillon	Age (mois)	ATB
1	10	amoxiline
2	6	gentamycine, céfazoline
3	18	amoxiline, céfazoline
4	6,5	gentamycine, céfotaxime , métronidazole
5	5,5	métronidazole
6	6	gentamycine, ceftizoxime
7	6	gentamycine, oxacilline
8	6	amoxiline
9	12	amoxiline
10	12	amoxiline
11	12	ampicilline
12	12	amoxilline
13	12	amoxilline
14	3	céfazoline
15	3	ceftizoxime
16	8	ampicilline
17	5	amoxilline
18	8	amoxilline
19	8	ampicilline
20	6	amoxilline
21	18	ampicilline
22	4	céfotaxime, gentamycine
23	5,5	amoxilline
24	18	amoxilline

**Tableau XIX:** Résultats des dénombrement (UFC/ml) de la standardisation de l'antibiogramme des quatre espèces recherchées.

Dilution	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Enterobacter sp	<i>E. coli</i>
10 <sup>-4</sup>	156	IND	IND	299
10 <sup>-4</sup>	197	IND	IND	288
10 <sup>-5</sup>	58	IND	IND	35
10 <sup>-5</sup>	49	IND	IND	66
10 <sup>-6</sup>	IND	109	244	IND
10 <sup>-6</sup>	IND	107	250	IND
10 <sup>-7</sup>	ND	41	26	ND
10 <sup>-7</sup>	ND	30	34	ND

**Tableau XX :** Récapitulatif des phénotypes de résistance des souches de *Staphylococcus aureus*.

Souche	E	Va	Cn	CN	CE	P	C
22	S	S	R	S	R	R	S
38	S	S	S	S	S	R	S
59	S	S	S	S	I	R	S
60	S	S	I	S	I	R	S

**Tableau XXI:** Récapitulatif des phénotypes de résistance des souches d' Enterobacter sp.

Souche	C	AN	Am	CI	CN	IPM	CTX	Kan	AMC
17	S	S	I	S	S	S	S	S	R
18	S	S	R	S	S	S	S	S	R
37	S	S	R	S	S	S	S	S	R
39	S	S	R	R	R	S	R	R	R
47	S	S	R	I	R	S	R	I	R
59	S	S	R	I	R	S	R	R	R
60	S	S	R	I	R	S	I	R	R
62	S	S	R	I	R	S	R	R	R

**Tableau XXII:** Récapitulatif des phénotypes de résistance des souches de *C. perfringens*.

Souche	IPM	C	AM	CE
18	R	R	R	S
19	I	R	R	I
30	I	R	R	I
32	I	R	R	S
36	I	R	R	S
38	I	R	R	R
45	I	R	R	S
53	I	R	R	S
55	I	R	R	R
58	I	R	R	S
62	I	R	R	S
63	I	R	R	S

**Tableau XXIII:** Récapitulatif des phénotypes de résistance des souches d' *E. coli*.

Souche	CN	IPM	C	CTX	CI	SXT
1	S	S	S	S	S	R
11	S	S	S	S	S	R
14	S	S	S	S	S	S
13	S	S	S	S	S	R
15	S	S	S	S	S	S
17	R	S	S	R	R	S
19	S	S	S	S	S	R
21	S	S	S	S	S	S
25	S	S	S	S	S	S
30	S	S	S	S	S	R
32	S	S	S	S	S	R

**Tableau XXIV:** Variation de la densité optique en fonction de la concentration de la Ruminococcine A.

Concentration Rum A (mg/ml)	DO (T <sub>0</sub> )	DO (T <sub>1</sub> )	Δ DO	Moyenne Δ DO	EC
0 (Témoin)	0,0208	0,7897	0,8105	0,8302	0,04353
	0,0301	0,7699	0,8000		
	0,0202	0,8599	0,8801		
10	0,0857	0,6631	0,7488	0,7684	0,06740
	0,0855	0,7025	0,7880		
	0,0851	0,7950	0,8801		
20	0,0864	0,6580	0,7444	0,7416	0,03139
	0,0863	0,6852	0,7715		
	0,0866	0,6223	0,7089		
30	0,0893	0,6156	0,7049	0,7449	0,04556
	0,0899	0,6454	0,7353		
	0,0893	0,7052	0,7945		
40	1,0505	1,7896	0,7391	0,7395	0,03050
	1,0799	1,7891	0,7092		
	1,0186	1,7888	0,7702		
50	1,6018	2,2440	0,6422	0,6627	0,04603
	1,6143	2,2444	0,6301		
	1,5289	2,2441	0,7152		
100	1,9177	2,5767	0,659	0,6391	0,04739
	1,9040	2,5773	0,6733		
	1,9905	2,5755	0,5850		

T<sub>0</sub> : 0 heure ; T<sub>1</sub> : 24 heures ; Δ DO : variation de la densité optique.

**Tableau XXV:** Dénombrement de la souche *S. aureus* 22 dans le bouillon BHI en fonction de la variation de la concentration de la Rum A.

Concentration de la Rum A (mg/ml)	Boite 1	Boite 2	Boite 3	Moyenne Log	EC
0 (Témoin)	8,13	8,18	8,17	8,16	0,02645
10	8,14	8,15	8,13	8,14	0,01000
20	8,15	8,13	8,11	8,13	0,02000
30	8,1	8,16	8,1	8,12	0,03464
40	7,89	7,96	8	7,95	0,05567
50	7,65	7,54	7,61	7,60	0,05567
90	7,01	7,03	7,02	7,02	0,01000

**Tableau XXVI:** Dénombrements de *S. aureus* 22 de l'échantillon Rum A en fonction du temps dans le lait écrémé.

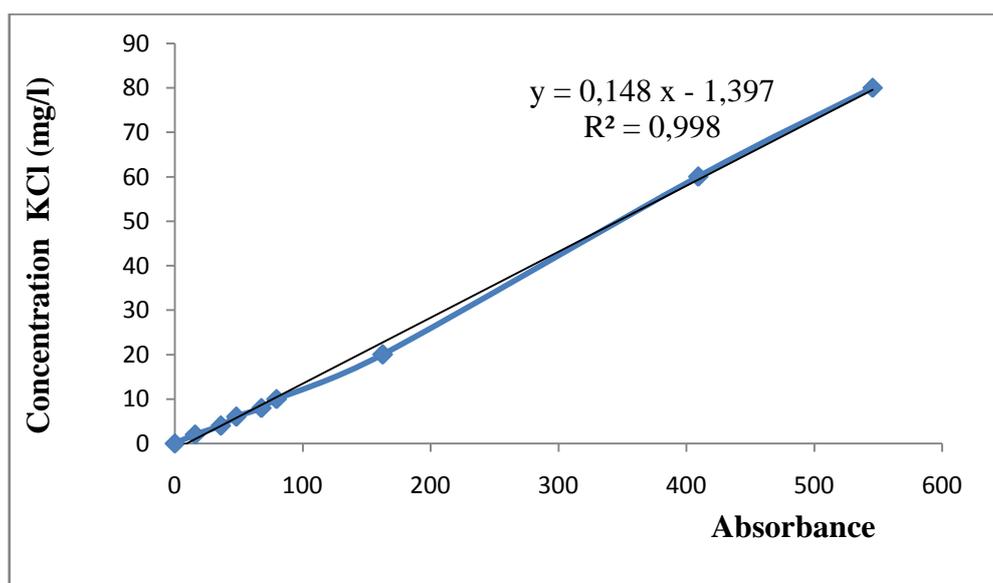
Temps (heures)	Boite 1	Boite 2	Boite 3	Moyenne	EC
0	6,00	6,04	6,11	6,05	0,0556
2	6,95	7,11	7,00	7,02	0,0818
4	7,55	7,55	7,4	7,50	0,0866
6	7,59	7,72	7,7	7,67	0,0700
8	7,63	7,7	7,71	7,68	0,0435
10	7,7	7,61	7,76	7,69	0,0754
16	7,66	7,68	7,73	7,69	0,0360
18	7,65	7,7	7,75	7,70	0,0500
24	7,80	7,66	7,82	7,76	0,0871

**Tableau XXVII:** Dénombrements de *S. aureus* 22 de l'échantillon témoin en fonction du temps dans le lait écrémé.

Temps (heures)	Boite 1	Boite 2	Boite 3	Moyenne	EC
0	5,99	6,11	6,02	6,04	0,0624
2	7,01	7,13	7,1	7,08	0,0624
4	7,9	8,04	8,06	8,00	0,0871
6	8,3	8,44	8,43	8,39	0,0781
8	8,32	8,41	8,47	8,40	0,0754
10	8,35	8,46	8,51	8,44	0,0818
16	8,42	8,54	8,51	8,49	0,0624
18	8,5	8,59	8,53	8,54	0,0458
24	8,47	8,63	8,58	8,56	0,0818

**Tableau XXVIII:** Mesures des absorbances par le photomètre de flamme de la gamme d'étalons.

Concentration KCl (mg/l)	Mesure (ABS 1)	Mesure (ABS 2)	Mesure (ABS 3)	ABS moyenne
0	0	0	0	0
2	16	16	16	16
4	31	45	32	36
6	47	47	50	48
8	65	69	69	67.66
10	78	79	82	79.66
20	138	163	187	162.66
60	397	398	433	409.33
80	521	558	558	545.66



**Figure 1:** Courbe d'étalonnage du photomètre de flamme:  $C(KCl) = f(Abs)$ .

**Tableau XXIX :** Mesures des absorbances par le photomètre de flamme de l'échantillon Rum A et de l'échantillon témoin.

Temps (heures)	ABSORBANCE					
	Echantillon Rum A			Echantillon témoin		
0	339	354	340	259	240	255
2	487	502	468	250	257	263
4	510	485	533	240	243	280
6	542	550	566	252	269	263
8	581	587	575	302	270	274
10	582	575	586	293	294	288
12	597	582	575	290	281	302
Pool total	660	651	670	492	466	480

**Tableau XXX:** Concentration du potassium (mg/l) de l'échantillon Rum A et de l'échantillon témoin

Temps (heures)	Concentration du potassium (mg/l). 10 <sup>-2</sup>					
	Echantillon Rum A			Echantillon témoin		
0	48,74	50,94	48,97	36,9	34,21	36,29
2	70,65	72,86	67,93	35,64	36,64	37,49
4	74,08	70,34	77,52	34,16	34,63	40,08
6	78,79	80,08	82,39	35,97	38,38	37,51
8	84,52	85,56	83,69	43,34	38,63	39,17
10	84,69	83,74	85,4	41,97	42,08	41,23
12	86,92	84,77	83,73	41,52	40,23	43,26
Pool total	96,25	95,01	97,28	71,36	67,64	69,64

**Tableau XXXI:** Comptes fécaux log N de *Staphylococcus aureus* du lot 1  
(Lapins infectés non traités) durant l'expérimentation animale.

Jours	Lapin 1	Lapin 2	Lapin 3	Lapin 4	Moyenne	EC1
0	2,3	2,75	1,7	1,25	2	0,6595
1	5,74	5,49	3,74	3,99	4,74	1,0206
2	5,64	5,71	5,38	5,31	5,51	0,1947
3	7,42	7,17	6,02	6,27	6,72	0,6794
4	7,95	7,83	7,05	7,17	7,5	0,4556
5	8,46	9,03	8,00	7,43	8,23	0,6796
6	7,27	8,73	7,94	6,55	7,62	0,9312
7	6,84	7,47	7,83	6,47	7,15	0,6119
8	6,49	7,01	7,13	7,61	7,06	0,4600
9	6,32	7,16	6,72	6,34	6,63	0,3954
10	6,46	6,41	6,25	5,30	6,10	0,544
11	6,44	5,45	5,47	5,25	5,65	0,5343
12	5,03	5,35	4,78	5,01	5,04	0,2342

**Tableau XXXII:** Comptes fécaux log N de *Staphylococcus aureus* du lot 2  
(Lapins infectés, traités) durant l'expérimentation animale

Jours	Lapin 1	Lapin 2	Lapin 3	Lapin 4	Moyenne	EC2
0	2,25	2,33	1,75	1,67	2	0,338
1	4,89	4,94	3,99	3,94	4,44	0,5492
2	5,48	5,5	5,24	5,22	5,36	0,1505
3	6,70	6,83	6,61	6,47	6,65	0,1515
4	7,44	8,06	7,27	6,66	7,35	0,5757
5	8,54	8,54	8,26	8,26	8,4	0,1616
6	7,93	7,2	7,15	7,3	7,39	0,362
7	7,60	6,81	6,23	6,30	6,73	0,6319
8	6,77	5,70	6,47	6,30	6,31	0,4507
9	6,42	5,51	5,47	5,53	5,73	0,459
10	5,17	4,42	4,45	5,42	4,86	0,507
11	4,41	4,35	4,23	4,32	4,32	0,075
12	3,79	3,84	4,11	3,36	3,77	0,3103

#### Annexe 4. Analyse statistique

**Tableau XXXIII:** Test de différence entre deux proportions (STATISTICA 5.0) pour *E. coli*. (N1=N2= 11) :

% résistance <i>E. coli</i>	9,09	54,54
0	0,3184	0,0094 ***
9,09	- - -	0,0332 *

**Tableau XXXIV:** Test de différence entre deux proportions (STATISTICA 5.0) pour *C. perfringens*. (N1= N2= 12) :

% résistance <i>C. perfringens</i>	8,33	100
16,66	0,5436	0,0004 ***
8,33	- - -	0,0002 ***

**Tableau XXXV:** Test de différence entre deux proportions (STATISTICA 5.0) pour *S. aureus*. (N1= N2= 4) :

% résistance <i>S. aureus</i>	0	100
25	0,3262	0,071
0	- - -	0,0312 *

**Tableau XXXVI:** Test de différence entre deux proportions (STATISTICA 5.0) pour *Enterobacter sp.* (N1= N2=8) :

% résistance <i>Enterobacter sp</i>	10	40	70	80
0	0,3744	0,0653	0,0108 **	0,0056 ***
10	- - -	0,1876	0,028 *	0,0138 **
40	- - -	- - -	0,2478	0,1248
70	- - -	- - -	- - -	0,6513

\* : Différence significative.

\*\* : Différence hautement significative.

\*\*\* : Différence très hautement significative.

**Tableau XXXVII:** Corrélacion entre la concentration de la Rum A, mesure de la DO et Log N de *S. aureus* (R= - 0,95).

	Concentration	Log	DO
Concentration	1,0000	- 0,9573	- 0,9100
	P = _ _ _ _	P = 0,001	P = 0,004
Log	- 0,9573	1,0000	0,9172
	P = 0,001	P = _ _ _ _	P = 0,004
DO	- 0,9100	0,9272	1,0000
	P = 0,004	P = 0,004	P = _ _ _ _

**Valeur positive :** Corrélacion positive ; **valeur négative :** corrélacion négative

**Tableau XXXIII:** Test de Student des résultats des dénombrements de l'activité antibactérienne de la Rum A à l'égard de *S. aureus* 22 dans le lait écrémé.

Le tableau donne les valeurs de P observées comparées à (P théorique= 0,05, ddl = 4).

Temps (heures)	P observés
0	0,846106
2	0,369889
4	0,002137 ***
6	0,000287 ***
8	0,000139 ***
10	0,000309 ***
16	0,000043 ***
18	0,000028 ***
24	0,000317 ***

\*\*\* : Différence très hautement significative.

**Tableau XXXIX:** Test de Student des résultats du test de la fuite du potassium cellulaire. Le tableau donne les valeurs de P observées comparées à la valeur de P théorique = 0,05, dd l = 4).

Temps (heures)	C Rum A (mg/l).10 <sup>-2</sup>	C Témoin (mg/l).10 <sup>-2</sup>	EC Rum A	EC Témoin	P observé
0	48,77	35,80	1,209	1,410	0,000213 ***
2	70,48	36,59	2,469	0,926	0,000024 ***
4	73,98	36,29	3,591	3,290	0,000179 ***
6	80,42	37,62	1,823	1,220	0,000004 ***
8	84,59	40,38	0,936	2,577	0,000010 ***
10	84,61	41,76	0,832	0,462	0,000000 ***
12	85,14	41,67	1,626	1,520	0,000005 ***
Pool total	96,18	69,64	1,136	1,861	0,000030 ***

C Rum A : Concentration moyenne du potassium de l'échantillon Rum A.

C Témoin : Concentration moyenne du potassium de l'échantillon témoin.

EC Rum A : Ecart type de l'échantillon Rum A.

EC Témoin : Ecart type de l'échantillon témoin.

\*\*\* : Différence très hautement significative.

**Tableau XXXX:** Test de Student des résultats des comptes fécaux durant la période de l'expérimentation animale. Le tableau donne les valeurs de P observées comparées à (P théorique= 0,05, ddl = 6).

		Jours	P observés
Contamination	}	0	1,000
		1	0,6232
		2	0,2687
		4	0,7112
		5	0,6437
		6	0,6648
Traitement	}	7	0,3791
		8	0,0587
		9	0,0246*
		11	0,0157*
		12	0,0026*

\* : Différence significative

## Abstract

Identification and antibiograms of the various pathogenic strains isolated were realized. The samples were obtained from stools of infants, old of less than two years in various pedantries of the area of Bejaia.

antagonistic test were done in the presence of Rum A. The results of the discs test show good antibacterial activity of Rum A with regard to the tested strain which resulted in zone inhibition of 9.33 mm. Thus, the activity test in BHI, skimmed milk and the study of the escape of the cellular K<sup>+</sup> ions, come to confirm the results of the antagonism of Rum A with respect to the strain of *S. aureus* (multiresistente strain compared to the other isolated species), showing significant results of the sample treated with Rum A compared to the control sample, the maximum of activity is noted with a concentration of 90 mg Rum A/ml.

During the in vivo study, carried out on holoxenic rabbits from approximately 1 month of age, a reduction in the duration of the diarrhea and fecal accounts of *Staphylococcus aureus* in rabbits treated with Rum A compared to the control rabbits is observed.

Observations of the histological cuts showed that the small intestine and the bowels of rabbits infected by the strain of *S. aureus* and untreated by Rum A, were atrophic, showing destructions and lesions of intestinal villositities and bowels crypts. Contrary, in rabbits treated by Rum A, restoration of intestinal villositities and bowels crypts is observed, approaching the aspect of histological cuts of healthy rabbits.

These results open prospects for the use of skimmed milk added with Rum A as therapeutic even preventive treatment for the antidiarrheic *Staphylococcus aureus* fight in therapy of young infants, but complementary tests are necessary to prove and improve the effectiveness of this treatment.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus* (MRSA), Antibiotic, diarrhea, Ruminococcine A, Antibiosis.

## الملخص

تم تحديد السلالات و الحساسيات للمضادات الحيوية لمختلف السلالات البكتيرية المسببة للأمراض. أخذت العينات من براز الرضع الذين تقل أعمارهم عن سنتين من مختلف خدمات طب الأطفال في منطقة بجاية.

لوحظت عدة محاولات التثبيط في وجود Ruminococcine A . نتائج اختبار

« Test des disques » عرض تثبيط جيد ل Ruminococcine A ضد سلالة البكتيريا المجربة الذي أسفر عن منطقة تثبيط ملاحظة تعادل ٩، ٣٣ ملم ٠ كما أسفرت كل من اختبارات التثبيط في الوسط BHI ، في الحليب الخالي من الدسم و اختبار تسرب معادن البوتاسيوم الخلوي التي تأتي بدورها لتأكيد نتائج تثبيط ل Ruma ضد سلالة *Staphylococcus aureus* (سلالة مقاومة بالمقارنة مع الأنواع الأخرى المعزولة)، نتائج معتبرة للعينة المعاملة ب Rum A مقارنة مع العينة الضابطة، لوحظ نشاط أقصى لتركيز ٩٠ ملغ Ruma /ملل.

أثناء الدراسة المجرات على الأرانب « Holoxéniques » عمرها يقارب شهر لوحظ تناقص مدة الإسهال وحسابات *Staphylococcus aureus* في براز الأرانب المعاملة مقارنة بالأرانب الضابطة. أظهرت أيضا مراقبة أقسام نسيجية للأمعاء الدقيقة و القولون للأرانب المصابة بسلالة *Staphylococcus aureus* و غير المعالجة بأنها ضامرة، والتي تبين أيضا حجم الدمار و الأضرار التي لحقت بالزغب المعوية وأقبية القولون. في المقابل عند الأرانب المعالجة ب Rum A لوحظ استعادة الزغب المعوية و أقبية القولون التي تقارب ملاحظات الأقسام النسيجية للأرانب الصحية.

هته النتائج تفتح آفاق استخدام الحليب الخالي من الدسم المضاف إليه Rum A لأغراض علاجية و وقائية للكفاح ضد الإسهال ب *Staphylococcus aureus* ، لكن هناك حاجة إلى اختبارات إضافية لتحسين فعالية هذا العلاج.

الكلمات المفتاحية : *Staphylococcus aureus* (SARM) ، مضاد حيوي، إسهال ، Ruminococcine A ، تضاد.

## Résumé

Les identifications et les antibiogrammes des différentes souches pathogènes isolées ont été réalisés. Les prélèvements ont été faits à partir de selles de nourrissons, âgés de moins de deux ans dans différents services de pédiatrie de la région de Bejaia.

Des essais antagonistes ont été réalisés en présence de la Rum A. Les résultats du test des disques montrent une bonne activité antibactérienne de la Rum A à l'égard de la souche test qui s'est traduite par une zone d'inhibition de 9,33 mm. Ainsi, le test d'activité en bouillon BHI, le lait écrémé et le test de la fuite des ions K<sup>+</sup> cellulaires, viennent pour confirmer les résultats de l'antagonisme de la Rum A vis-à-vis de la souche de *S. aureus* (souche multirésistante en comparaison des autres espèces isolées), montrant des résultats significatifs de l'échantillon traité avec la Rum A par rapport à l'échantillon témoin, le maximum d'activité est noté à une concentration de 90 mg Rum A/ml.

Durant l'étude in vivo, réalisée sur des lapins holoxéniques d'environ 1 mois d'âge, une diminution de la durée de la diarrhée et des comptes fécaux de *Staphylococcus aureus* chez les lapins traités à la Rum A par rapport aux lapins témoin est observée.

Les observations des coupes histologiques a montré que l'intestin grêle et le colon des lapins infectés par la souche *S. aureus* et non traités par la Rum A, étaient atrophiques, montrant des destructions et des lésions des villosités intestinales et des cryptes coliques. A l'inverse, chez les lapins traités par la Rum A, une restauration des villosités intestinales et des cryptes coliques est observée, se rapprochant de l'aspect des coupes histologiques des lapins sains.

Ces résultats ouvrent des perspectives quant à l'emploi de lait écrémé additionné de Rum A à des fins thérapeutiques voire préventives dans la lutte antidiarrhéique à *Staphylococcus aureus* des jeunes nourrissons, mais des essais complémentaires sont nécessaires pour améliorer l'efficacité de ce traitement.

**Mots clés:** *Staphylococcus aureus* (SARM), Antibiotique, diarrhée, Ruminococcine A, Antibiose.