

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mentouri Constantine

N° d'ordre :

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

N° de série :

Département de Biochimie-Microbiologie

Mémoire Présenté pour l'Obtention du Diplôme de Magistère

Spécialité : BIOCHIMIE

Option : Technologie des explorations biochimiques

Par : **MEZIANI MERIEM**

Contribution du diagnostic biochimique bactérien dans l'établissement des parentés phylogénétiques : Cas des Entérobactéries et *Pseudomonas*

Soutenu le : 20 / 02 / 2012

Devant le jury :

Président : Mr BEN SEGUENI A. Maître de conférences Université Mentouri Constantine.

Rapporteur : Mr HAMIDECHI M.A. Maître de conférences Université Mentouri Constantine.

Examineurs : Mr BOUDEMAGH A. Maître de conférences Université Mentouri Constantine.

Mr CHIKHI A. Maître de conférences Université Mentouri Constantine.

Année Universitaire : 2011-2012



Ce mémoire n'aurait pas pu être réalisé sans la contribution de nombreuses personnes que je tiens à remercier par ces quelques lignes.

Mes remerciements s'adressent d'abord, à mon encadreur, Monsieur **HAMIDECHI M. A.** maître de conférences à l'université Mentouri de Constantine, sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour. Vous m'avez guidé dans la réalisation de ce travail malgré vos multiples occupations. Infatigable, toujours disponible, aimable, ces qualités vous ont valu l'estime de tous les étudiants et forcent l'admiration de tous. Apprendre à vos côtés a été un réel plaisir. J'ai gardé de bons souvenirs de vos enseignements avec clarté et précision. Soyez assuré de ma fidèle reconnaissance.

Je remercie aussi très vivement, Monsieur **BEN SEGUENI A.** Maître de conférences à l'université Mentouri de Constantine. Vous me faites le grand honneur de présider ce jury. Je vous prie de bien vouloir recevoir le témoignage de mon profond respect.

Un tout grand merci à Monsieur **BOUDEMAGH A.** Maître de conférences à l'université Mentouri de Constantine. Je vous remercie de me faire l'honneur de juger ce modeste travail. Veuillez accepter mes chaleureux remerciements pour votre participation à ce jury.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur **CHIKHI A.** Maître de conférences à l'université Mentouri de Constantine. Je vous remercie de m'honorer par votre présence en tant qu'examineur et pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire.

Merci à tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre ont contribué à la réalisation de ce travail, et que je ne peux citer individuellement.

Dans la vie, il y a trois facteurs : le talent, la chance, le travail.
Avec deux de ces facteurs, on peut réussir.
Mais l'idéal est de disposer de trois.

(De Bernard Werber)

Méziani Mériem



A mon cher père

Tes conseils m'ont suivi et m'ont permis d'atteindre le bout du chemin. Sois fier de moi aujourd'hui et vois à travers ce travail mon amour sincère et ma gratitude profonde.

A ma chère mère

Ma douce et tendre mère. Quoique je fasse, je ne pourrais te rendre ce que tu as fait pour moi. Si je suis arrivée là, c'est bien grâce à toi. Que dieu te donne longue vie et te protège pour moi.

A ma tendre sœur Naouel

La généreuse, au cœur d'or. Je souhaite simplement que Dieu nous accorde une longue vie et une bonne santé pour que nous puissions cheminer ensemble sur la route du destin avec amour, honnêteté, sincérité, respect mutuel, solidarité, dignité comme nous l'ont enseigné nos parents.

Tout particulièrement, à Lyes

Je te remercie énormément pour ton soutien moral, et tes précieux conseils.

A mes chers frères

Zoheir, Merouane, Farouk.

J'ai beaucoup apprécié l'estime et l'amour fraternel que vous me portez. Que Dieu vous préserve.

A mes neveux et nièces

Que Dieu fasse que vous suiviez mes traces et que vous fassiez plus que moi. Je vous aime.

A vous les petits anges, Alae et Abd elwadoud. Que Dieu tout puissant vous donne longue vie, beaucoup de santé et vous préserve du mal.

A ma Tante Saliha

Je ne saurais te distinguer de ma mère, J'ai toujours apprécié ton amour envers moi.

A mon oncle Walid

Que dieu te préserve.

A mes belles-sœurs Lamia, Wissal, Doha

Vers lesquelles j'ai un grand respect.

A toute ma famille.

A tous mes camarades de promotion, surtout Soumia, Kamilia, Rym
Et plus particulièrement à Mohsène. Tu as été pour moi durant ces années passées ensemble plus qu'un ami, un frère. Toute ma gratitude et ma sympathie pour ton soutien.

M. Mériem

TABLE DES MATIERES

PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1: BIOLOGIE DES ENTEROBACTERIES.....	3
1 Définition et caractéristiques principales.....	3
2 position taxonomique.....	3
3 Les caractères bactériologiques.....	4
3.1 Les caractères morphologiques.....	4
3.2 Les caractères cultureux.....	5
3.3 Les caractères antigéniques.....	5
3.4 Les caractères biochimiques.....	5
4 Tests biochimiques discriminant les entérobactéries.....	7
4.1 Mise en évidence du type respiratoire.....	7
4.2 Recherche de la catalase.....	8
4.3 Recherche de l'oxydase.....	8
4.4 Recherche de la nitrate-réductase.....	8
4.5 Les tests biochimiques du catabolisme des glucides.....	9
4.5.1 Etude de la voie d'attaque des glucides.....	9
4.5.2 Milieux glucidiques pour bactéries fermentatives.....	10
4.5.3 Milieu mannitol-mobilité.....	13
4.5.4 Le milieu RM-VP (bouillon Clark et Lubs).....	14
4.5.5 L'utilisation du citrate de sodium.....	15
4.6 Les tests biochimiques du catabolisme des protéines.....	15
4.6.1 La désamination.....	15
4.6.2 La décarboxylation.....	15
4.7 Milieu urée-indole.....	16

4.7.1 Recherche de l'uréase.....	16
4.7.2 Recherche de l'indole.....	17
4.7.3 Test TDA.....	17
5 La résistance aux antibiotiques.....	18
5.1 Définition.....	18
5.2 Classes des antibiotiques.....	18
5.3 Mécanismes d'action des antibiotiques.....	19
CHAPITRE 2: TAXONOMIE NUMERIQUE ET PHYLOGENIE.....	20
1 Définition.....	20
2 Les différentes approches taxonomiques.....	20
2.1 Taxonomie phénétique.....	21
2.2 Chimiotaxonomie.....	21
2.3 Taxonomie moléculaire.....	21
2.4 Taxonomie numérique.....	21
3 Phylogénie et méthodes de construction des arbres.....	24
3.1 Définition.....	24
3.1.1 Méthodes cladistiques.....	24
3.1.2 Méthodes phénétiques.....	24
4 Les algorithmes phylogénétiques.....	25
4.1 La méthode UPGMA.....	25
4.2 La méthode NJ.....	25
4.2.1 Les étapes de la méthode NJ.....	26
 <u>PARTIE II : MATERIEL ET METHODES</u>	
1. Matériel.....	27
1.1 Les souches étudiées.....	27
2. Méthodologie.....	28

2.1 Analyse bactériologique.....28

2.2 Phylogénie phénétique.....37

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

1. Résultats.....39

2. Discussion.....56

PARTIE IV : CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....67

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....68

ANNEXE.....

LISTE DES ABREVIATIONS

ADH : Arginine di hydrolase

AM : Ampicilline

AMC : Augmentin

AX : Amoxicilline

CIP : Ciprofloxacine

CN : Gentamycine

CTX : Céfotaxime

FOX : Céfoxitine

K : Kanamycine

LDC : Lysine décarboxylase

NA : Acide Nalidixique

ODC : Ornithine décarboxylase

ONPG : Orthonitrophényl – B-D – galactopyranoside

RM : Rouge de Méthyle

SXT : Co-Trimoxazole

TDA : Tryptophane désaminase

TSI : Triple Sugar Iron

VP : Voges-Proskauer

NJ : Neighbor Joining

OTU : Unité taxonomique opérationnelle

CSFM : Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les différents genres appartenant aux <i>Enterobacteriaceae</i>	4
Tableau 2 : Les caractères d'identification des genres le plus fréquemment rencontrés...6	
Tableau 3 : calcul du coefficient de Jaccard entre deux souches A et B.....	22
Tableau 4 : Répartition des souches analysées.....	27
Tableau 5 : Diamètres critiques pour l'appréciation de la Sensibilité/Résistance selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.....	31
Tableau 6 : Codage des états des caractères.....	39
Tableau7 : Le profil de résistance/sensibilité chez les entérobactéries et les <i>Pseudomonas</i>	48
Tableau 8 : Taux d'azote total chez les souches identifiées.....	49
Tableau9 : Matrice binaire des caractères étudiés.....	51
Tableau10 : Matrice de similarité des souches étudiées.....	53
Tableau11 : Matrice des distances des souches étudiées.....	54
Organigramme 1 : La démarche de la taxonomie numérique.....	23
Organigramme 2 : Les étapes de l'antibiogramme.....	33

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure chimique de l'ONPG.....	12
Figure 2 : Alcalinisation du milieu et virage de couleur au jaune.....	36
Figure 3 : Aspect du distillat avant et après le titrage.....	36
Figure 4 : Aspect du milieu TSI avec <i>Escherichia coli</i> et <i>Klebsiella pneumoniae</i>	39
Figure 5 : Aspect du milieu TSI avec <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
Figure 6 : Aspect du milieu Citrate de Simmons avec <i>Escherichia coli</i>	41
Figure 7 : Aspect du milieu Citrate de Simmons avec <i>Klebsiella pneumoniae</i>	41
Figure 8 : Test d'indole.....	41
Figure 9 : Test de la catalase.....	42
Figure 10 : Test ONPG.....	43
Figure 11 : Aspect du test VP positif.....	44
Figure 12 : Test RM.....	44
Figure 13 : Test Uréase.....	46
Figure 14 : Arbre phylogénétique des souches étudiées construit selon la méthode NJ.....	54
Figure15 : Arbre phylogénétique construit à partir des séquences d'ARNr 16S des souches à Gram négatif (logiciel MEGA 4.0).....	55

ملخص

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

الكلمات المفتاحية: الامعائيات , النمط الظاهري البيوكيميائي , نسالة

RESUME

Dix souches bactériennes ont été isolées à partir des prélèvements cliniques fournies par le laboratoire de bactériologie (DAKSI). Elles ont été identifiées par les méthodes microbiologiques standardisées (galerie biochimique). Parmi les dix souches étudiées, huit souches appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae* et deux souches font partie des bacilles à Gram négatif non fermentaires (*Pseudomonas*). Ces souches ont été identifiées présomptivement selon leurs caractères biochimiques, leur sensibilité ou leur résistance aux antibiotiques, et leur taux d'azote total mesuré par la méthode Kjeldahl. Un profil phylogénétique a été réalisé par les méthodes phénétiques de distances, en utilisant l'algorithme NJ et l'analyse des séquences de l'ADN 16S. L'analyse des topologies obtenues a permis de déterminer le poids du phénotype biochimique dans l'établissement des parentés phylogénétiques.

Mots clés : Entérobactéries, phénotype biochimique, phylogénie.

ABSTRACT

Ten bacterial strains were isolated from clinical specimens provided by the bacteriology laboratory (DAKSI). They were identified by standard microbiological methods (biochemical gallery). Among the ten strains studied, eight strains belonging to the *Enterobacteriaceae* and two strains are among the Gram-negative bacilli non-fermentative (*Pseudomonas*). These strains were identified presumptively by their biochemical characteristics, susceptibility or resistance to antibiotics, and total nitrogen measured by the Kjeldahl method. A phylogenetic profile was produced by phenetic distance methods, using NJ algorithm and sequence analysis of 16S DNA. The analysis of topologies obtained was used to determine the place of the biochemical phenotype in establishing phylogenetic relationships.

Key-words: Enterobacteria, Biochemical phenotype, Phylogeny.

INTRODUCTION

Introduction

Les entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif qui constituent une part importante des bactéries isolées lors du diagnostic bactériologique des infections humaines. Leur abondance dans l'intestin, leur mobilité, leur rapidité de multiplication, leur fréquente résistance aux antibiotiques expliquent qu'elles soient les bactéries les plus impliquées en pathologie infectieuse humaine.

On les rencontre dans des prélèvements très divers, mais particulièrement dans les urines et les prélèvements sanguins, qui constituent une part importante de l'activité du laboratoire de bactériologie.

La multirésistance des entérobactéries aux antibiotiques et leur pouvoir d'adaptation expliquent la variété des espèces et les multiples circonstances dans lesquelles elles sont isolées. L'importance médicale des entérobactéries, et leur grand intérêt comme matériel de recherche, font de ce groupe bactérien l'un des mieux connus et des plus étudiés.

L'identification des espèces de la famille *Enterobacteriaceae* est de plus en plus facilitée au laboratoire par l'utilisation de nombreuses galeries d'identification :

- Les galeries classiques avec un nombre de caractères limités, et en utilisant d'autres tests biochimiques complémentaires.
- Les galeries API sont très performantes mais leur coût est élevé.

Le développement du matériel d'analyse a considérablement contribué dans l'avancement de la systématique et les méthodes de diagnostic. Face à cette avancée, est-il suffisant de dresser des conclusions quant aux méthodes phénotypiques employées en bactériologie ?

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

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

- Réaliser une identification présomptive de quelques entérobactéries en se basant sur le phénotype biochimique par l'analyse d'un ensemble de caractères liés aux activités enzymatiques et aux différentes voies métaboliques de ce groupe bactérien et en plus la réalisation d'un antibiogramme et le dosage de l'azote total bactérien.

- Faire une analyse numérique des résultats grâce à l'approche bioinformatique en utilisant des algorithmes de clustérisation.
- Confronter nos résultats d'identification présumptive aux séquences de DNA 16S relevées sur une banque génomique telle que : EMBL¹.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1 : BIOLOGIE DES ENTEROBACTERIES

1. Définition et caractéristiques principales

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

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

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

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

2-Position taxonomique

La famille des entérobactéries fut connue pour la première fois en 1937 lorsque Otto Rahn proposa le genre *Enterobacter* pour regrouper les microorganismes présentant des propriétés biochimiques et morphologiques communes et parmi lesquels on trouvait déjà des noms tels que *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia* et *Shigella*. Avec les travaux de Brenner et de Grimont, cette famille a connu une véritable explosion avec un très

grand nombre de nouveaux genres et espèces décrits depuis une vingtaine d'années (Ewing *et al.*, 1960 ; Murray *et al.*, 1999).

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

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

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

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

3- LES CARACTERES BACTERIOLOGIQUES

3.1. Les caractères morphologiques

Toutes les entérobactéries ont une morphologie habituellement typique, sous forme de bacilles à Gram négatif de 2 à 3µ de long sur 0,6µ de large, généralement polymorphes. Certaines espèces sont mobiles grâce à une ciliature péritriche, par contre les autres sont immobiles (*Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia pestis*). Dont le genre de *Klebsiella* est caractérisé

par la présence d'une capsule visible au microscope. La plupart des espèces pathogènes chez l'homme possèdent des pili (fimbriae) qui constituent des facteurs d'adhésion. (Bossert *et al.*, 1986).

3.2. Les caractères culturaux

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

3.3. Les caractères antigéniques

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

3.4. Les caractères biochimiques

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

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

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

	<i>Escherichia</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Serratia</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Providencia</i>	<i>Yersinia</i>
Lactose	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	+	-	+/-	-	-	+
Indole	+	-	-	+/-	-	-	+/-	+/-	+	+/-
VP (Acétoïne)	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+*
Citrate	-	+	+	+	+	+/-	-	+/-	+	-
Mobilité	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+*
Urée	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
PDA	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
H2S	-	+/-	-	-	-	+	-	+/-	-	-

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

4- Tests biochimiques discriminant les entérobactéries

4.1. Mise en évidence du type respiratoire

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

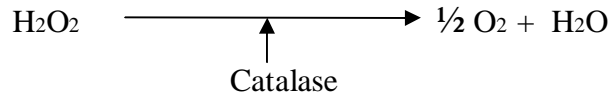
Les bactéries ont des besoins respiratoires spécifiques, elles sont soit : (Delarras, 2007 ; Joffin *et al.*, 2006) :

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

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

4.2. Recherche de la catalase

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



4.3. Recherche de l'oxydase

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

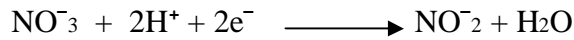
Les bactéries qui possèdent l'enzyme oxydase peuvent oxyder le N,N,N,N-tétraméthyl-1,4-phénylène diamine qui est un composant du réactif de la recherche de la cytochrome-oxydase en bactériologie, ce qui donne des produits violacés.

4.4. Recherche de la nitrate-réductase

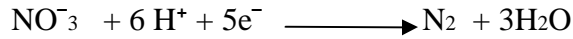
La nitrate réductase est une enzyme qui catalyse la réaction de réduction des nitrates en nitrites dont leur mise en évidence est réalisée en utilisant le réactif de Griess. Parfois, certaines bactéries peuvent poursuivre cette réduction, jusqu'à une dénitrification selon :



La nitrate-réductase réduit les nitrates jusqu'au stade nitrites selon :



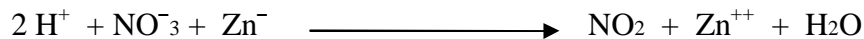
La nitrate-réductase réduit les nitrates jusqu'au stade diazote (gazeux) selon :



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

L'absence de coloration rouge ne signifie pas obligatoirement que la bactérie testée ne possède pas de nitrates-réductase, car elle peut posséder une nitrate-réductase très active qui est capable de réduire les nitrates jusqu'au stade diazote N_2 et une bactérie possédant une telle enzyme consomme tout les nitrates du milieu.

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



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

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

4.5. Les tests biochimiques du catabolisme des glucides

4.5.1. Etude de la voie d'attaque des glucides

Les bactéries utilisent les glucides suivant deux voies métaboliques :

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

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

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

4.5.2. Milieux glucidiques pour bactéries fermentatives

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

a- Bouillon au rouge de phénol

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

b-Milieu de Kligler- Hajna

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

- Utilisation des glucides :

Le culot :

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

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

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

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

La pente :

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

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

- La production de gaz :

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

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

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

Le sulfure d'hydrogène réagit avec les ions (Fe³⁺) du citrate de fer ammoniacal pour former un précipité de sulfure de fer noir. Ainsi : Une bactérie H₂S⁺ présente un précipité noir, par contre une bactérie H₂S⁻ : pas de précipité noir.

- Test ONPG : OrthoNitroPhényl – B-D – Galactopyranoside

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

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

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

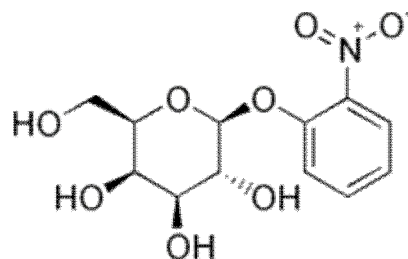
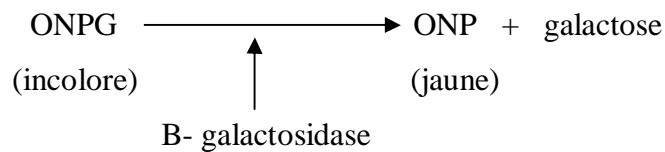


Figure 1 : Structure chimique de l'ONPG

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



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

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

b- Milieu TSI (Triple Sugar Iron)

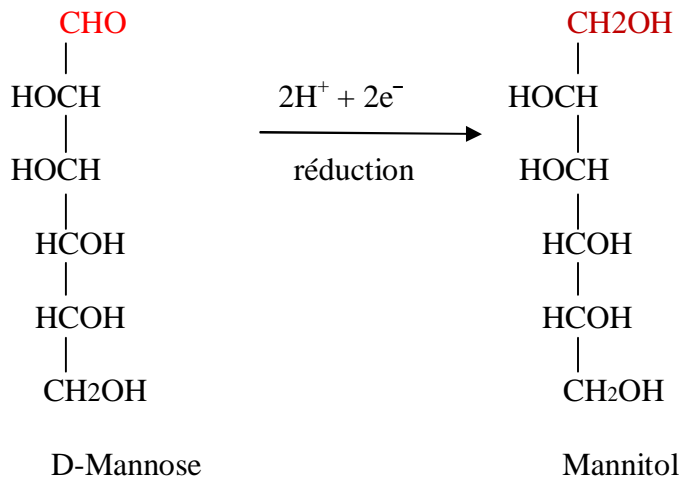
Ce milieu de culture, proposé par Hajna (1945), est principalement utilisé pour la caractérisation biochimique des entérobactéries. C'est un milieu différentiel par la capacité à mettre en évidence les fermentations du : glucose, lactose et/ou saccharose ainsi que la production d'hydrogène sulfuré (H₂S)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

4.5.3. Milieu mannitol-mobilité

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

- Le test mannitol :

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



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

- Le test de mobilité bactérienne :

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

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

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

- Test du rouge de méthyle (test RM) :

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

- Réaction de Voges-Proskauer (test VP) :

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

4.5.5. L'utilisation du Citrate de Sodium

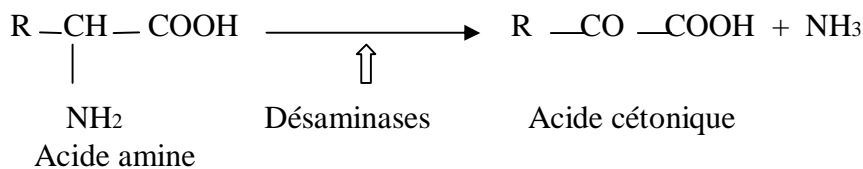
Certaines entérobactéries sont capables d'assimiler le citrate de Sodium comme seule source de Carbone et d'énergie et la recherche de cette propriété se fait avec le milieu de Simmons au Citrate de Sodium. Ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone ; le citrate. Les bactéries possédant l'enzyme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

4.6. Les tests biochimiques du catabolisme des protéines

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

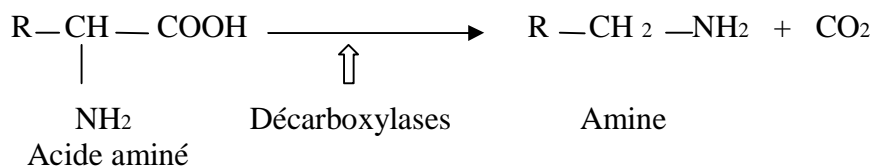
4.6.1. La désamination :

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



4.6.2. La décarboxylation :

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



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

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

- L'ornithine décarboxylase (ODC) est une enzyme qui libère le groupement carboxyle de l'acide aminé ornithine et donne production de la putriscine qui alcalinise le milieu.
- La lysine décarboxylase (LDC) est une enzyme qui libère le groupement carboxyle de l'acide aminé lysine et donne production de la cadavérine qui alcalinise le milieu.
- L'arginine dihydrolase (ADH) est une enzyme qui dégrade l'arginine en libérant de l'ammoniac et des amines qui alcalinisent le milieu.

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

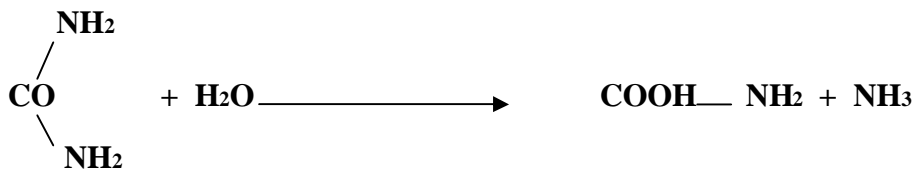
4.7-Milieu urée-indole

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

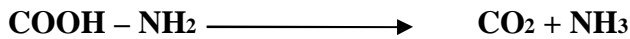
4.7.1. Recherche de l'uréase

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

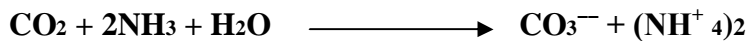
Les bactéries hydrolysent l'urée :



Une uréase très active aboutit à la réaction :



Ensuite les $\text{CO}_2 + \text{NH}_3$ se combinent et donnent du carbonate d'ammonium :



Le carbonate d'ammonium formé alcalinise le milieu, ce qui traduit le virage de l'indicateur coloré.

4.7.2. Recherche de l'indole :

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

4.7.3. Test TDA :

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

5- La résistance aux antibiotiques

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

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

Les infections urinaires sont très fréquentes aussi bien en milieu communautaire qu'hospitalier (Larabi *et al.*, 2003). Elles occupent la deuxième position après les infections respiratoires (Alvarez *et al.*, 1992). Les bactéries les plus fréquemment isolées appartiennent à la famille des entérobactéries avec *E. coli* en tête de liste.

5.1. Définition

Un antibiotique est toute substance, naturelle ou synthétique capable d'inhiber *in vivo* le développement des bactéries. Les molécules d'antibiotiques doivent être idéalement les plus toxiques pour les bactéries et les moins toxiques pour les cellules de l'organisme qui les hébergent. On les divise en antibiotiques à large spectre ou à spectre étroit selon leur activité contre beaucoup ou peu de germes (Gaudy, 2005).

5.2. Classes des antibiotiques

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

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

5.3. Mécanismes d'action des antibiotiques

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

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

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

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

- Résistance naturelle : On parle de la résistance naturelle lorsque toutes les souches de la même espèce sont résistantes à un antibiotique donné.
- Résistance acquise : La résistance acquise advient lorsque quelques souches d'une même espèce normalement sensibles deviennent résistantes. C'est une résistance chromosomique acquise par mutagénèse.

CHAPITRE 2: TAXONOMIE NUMERIQUE ET PHYLOGENIE

1. Définition

La taxonomie est l'ensemble des principes et théories qui permettent de classer et de valider le classement des organismes. Elle étudie la diversité des microorganismes et les relations de parenté qui peuvent exister entre eux. Sur la base de leurs relations phénétiques et/ou phylogénétiques, les microorganismes sont classés en taxons.

Le taxon constitue un groupe d'organismes reconnu en tant qu'unité formelle à chacun des niveaux de la classification. Deux ou plusieurs taxons peuvent être à leur tour groupés en un nouveau taxon d'un niveau hiérarchique supérieur qui comprendra un plus grand nombre d'individus. De regroupements en regroupements, on arrivera à faire rentrer tous les individus dans un même ensemble (le dendrogramme).

La taxonomie est essentielle pour l'identification et la nomenclature des souches bactériennes. Elle recouvre trois domaines différents : la classification, la nomenclature, et l'identification (Wayen *et al.*, 1987 ; Larpent, 2000 ; Stackebrandt *et al.*, 2000).

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

2. Les différentes approches taxonomiques

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

2.1. Taxonomie phénétique

Elle s'intéresse aux données apparentes morphologiques, physiologiques, biochimiques...etc. Les premières classifications bactériennes sont basées sur la comparaison de critères morphologiques. Jusqu'au début des années 1960, toute la taxonomie bactérienne reposait sur la classification phénétique. Cette classification utilise un certain nombre de caractères considérés comme importants, tels que la morphologie, la mise en évidence d'un caractère biochimique, le pouvoir pathogène... etc. (Mayr, 1986).

2.2. Chimiotaxonomie

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

2.3. Taxonomie moléculaire

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

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

2.4. Taxonomie numérique

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

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

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

La taxonomie numérique est une démarche utilisée pour :

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

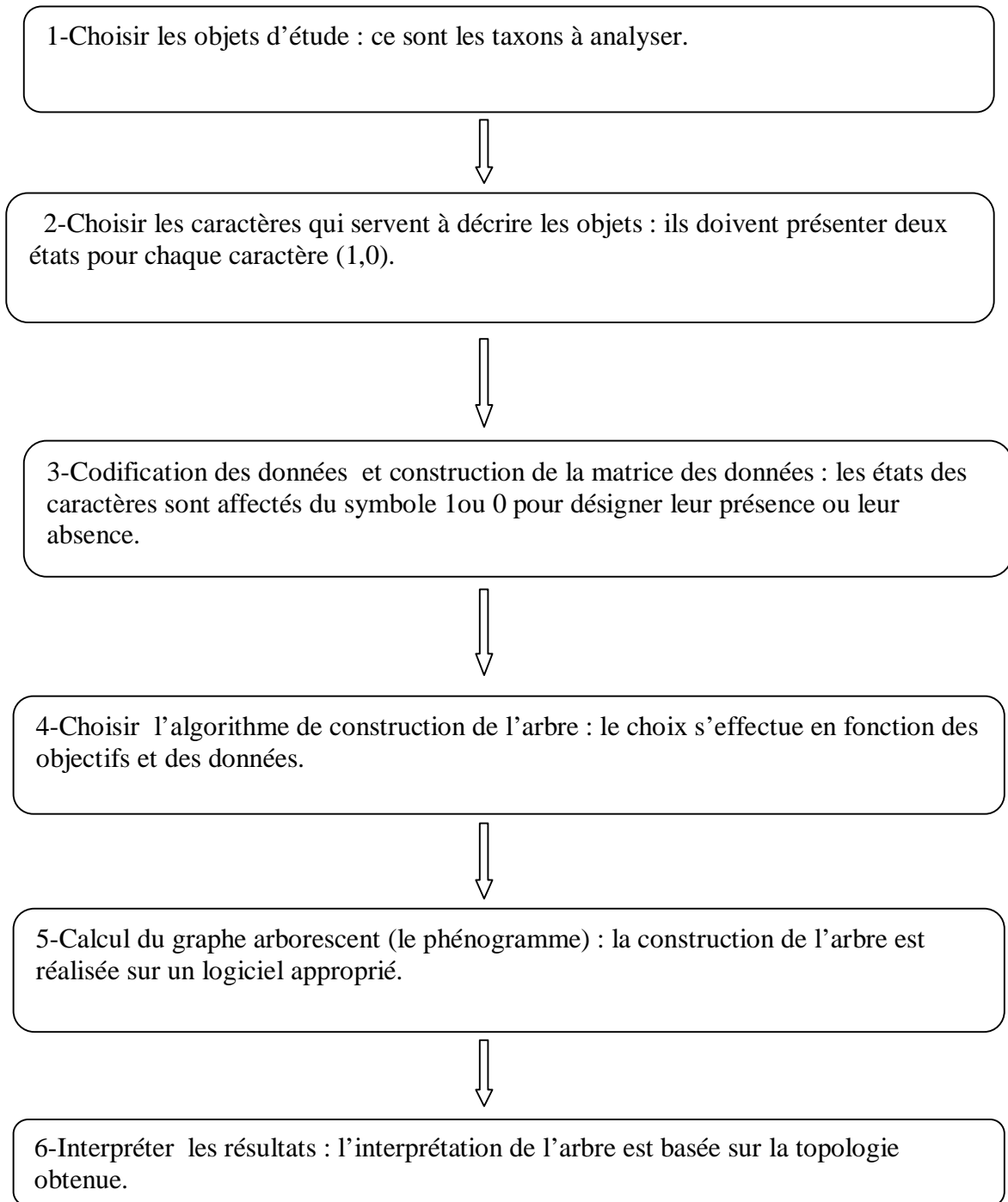
La taxonomie numérique est fondée sur la mathématisation des données observées par un calcul du coefficient de similitude. Le plus utilisé en microbiologie étant celui de Jaccard (tableau 3).

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

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

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

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



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

3. Phylogénie et méthodes de construction des arbres

3.1. Définition

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

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

3.1.1. Méthodes cladistiques

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

3.1.2. Méthodes phénétiques

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

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

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

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

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

4. Les algorithmes phylogénétiques

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

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

4.1. La méthode UPGMA

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

4.2. La méthode NJ

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

4.2.1. Les étapes de la méthode NJ

Etape 1 : Consiste à calculer la divergence nette $r(i)$ de chacun des N OTU par rapport aux autres.

Etape 2 : Consiste à calculer la nouvelle matrice des distances en utilisant cette formule :

$$M(i,j) = d(i,j) - (r(i) + r(j)) / (N - 2)$$

Etape 3 : Consiste à choisir deux OTU ayant le $M(i,j)$ le plus petit. Les deux premiers OTU forment un nouveau nœud u .

Etape 4 : Consiste à calculer la distance de chacun des deux OTU par rapport au nœud u .

Etape 5 : Consiste à calculer les distances entre le nœud u et toute les OTU.

Etape 6 : Consiste à créer une nouvelle matrice et répéter l'opération depuis le début (Lecointre *et al.*, 2001).

**MATERIEL
ET
METHODES**

1. Matériel

1. Les souches étudiées

Notre étude a porté sur des souches pré-identifiées au niveau du laboratoire de bactériologie de la clinique rénale (Daksi-Constantine), par des méthodes microbiologiques standardisées (galerie biochimique). Nous avons étudié huit souches d'entérobactéries et deux souches de bacilles à Gram négatif non fermentaires (*Pseudomonas*); soit un total de 10 souches dont la distribution est donnée dans le tableau (4).

Tableau 4 : Répartition des souches analysées

Famille	Espèces	Nombre de souches	Code de l'espèce
<i>Entérobactériaceae</i>	<i>Escherichia coli</i>	4	EC1, EC2, EC3, EC4
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	KP1, KP2
	<i>Serratia marcescens</i>	1	SM
	<i>Proteus mirabilis</i>	1	PROT
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	PS1, PS2
TOTAL		10	

Notre travail a été effectué aux laboratoires de microbiologie et de biochimie de la faculté des sciences de la nature et de la vie (Université Mentouri Constantine), dans lesquels nous avons réalisé un ensemble d'analyses microbiologiques et biochimiques sur les différentes souches fournies par le laboratoire de bactériologie de la clinique rénale (Daksi-Constantine).

2. Méthodologie

2. 1. Analyse bactériologique

2. 1. 1. Préparation de l'inoculum

La suspension bactérienne de chacune des 10 souches a été préparée dans un bouillon nutritif avec des colonies prélevées à partir d'un milieu solide (gélose nutritive). La conservation des souches a été réalisée en tubes sur gélose nutritive inclinée.

2. 1. 2. Identification présomptive des souches

L'identification des souches a porté sur une série de tests biochimiques, un antibiogramme et un dosage de l'azote total bactérien.

Les tests biochimiques ayant servi à l'identification sont :

- 1- Gaz en glucose, production d'H₂S, métabolisme du lactose et du saccharose. (Milieu TSI).
- 2- Utilisation du citrate en tant que seule source de carbone (cycle de Krebs).
- 3- Production d'indole (métabolisme du Tryptophane).
- 4- Mannitol-mobilité.
- 5- Production de l'oxydase (physiologie respiratoire).
- 6- Production de catalase (physiologie respiratoire).
- 7- Production de la B-galactosidase (ONPG) (enzyme exocellulaire).
- 8- Test VP (Voges-Proskauer) : fermentation butanediolique et production d'acétoïne.
- 9- Test RM (Rouge de Méthyle) : fermentation des acides mixtes.
- 10- Production de l'uréase : métabolisme protéique.
- 11- Production des décarboxylases ODC, LDC et dihydrolases ADH bactériennes : métabolisme des acides aminés.

1- Milieu TSI

La pente du milieu TSI estensemencée par stries et le culot par piqure centrale, puis incubation à 37C° pendant 18 heures.

2- Utilisation du citrate

La pente du milieu estensemencée avec une strie sur toute la surface. Incubation à 37°C, pendant 18 heures.

3- Test de l'indole

Le test est réalisé en introduisant dans de l'eau peptonée exempte d'indole quelques gouttes de la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette Pasteur suite à une incubation de 18 heures à l'étuve, l'addition du réactif de Kovacs montre la production de l'indole qui se traduit par un anneau rouge en surface du milieu.

4- Mannitol-mobilité

L'ensemencement du milieu s'est fait par piqûre centrale jusqu'au fond du tube avec la souche à tester à l'aide d'une anse de platine (fil droit sans boucle). Incubation à 37C° durant 18 heures.

5- Test de l'oxydase

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

6- Production de la catalase

Une colonie est prélevée à partir de la boîte de Pétri et déposée sur une lame. Une goutte de H₂O₂ (10 volumes) est déversée sur cette colonie.

7- Production de la B-galactosidase (Disques ONPG)

Le test est pratiqué en réalisant une suspension épaisse de la bactérie testée dans de l'eau distillée puis à l'aide d'une pince flambée et refroidie nous avons ajouté un disque imprégné d'ONPG et nous avons mis le tube dans le bain-marie pendant 15 à 20 minutes.

8- Test RM-VP

Pour réaliser ce test, nous avons utilisé le milieu Clarck et Lubs et nous l'avonsensemencé à l'aide d'une anse de platine avec la souche bactérienne à analyser. Après avoir incubé à 37C° pendant 18 heures nous avons partagé le milieu en deux tubes pour pratiquer les deux tests :

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

9- Production de l'uréase

La mise en évidence de l'uréase s'est faite en utilisant le milieu urée-indole. Ce dernier est inoculé avec quelques gouttes de la suspension bactérienne après l'avoir préparée dans de l'eau physiologique. Ensuite une incubation de 18 heures à 37C°.

10- Production de décarboxylases ODC, LDC et dihydrolases ADH

Ces trois tests ont été réalisés sur les bouillons LDC, ODC et ADH (appelés milieux de Moëller). Nous avons préparé une suspension en eau physiologique de la souche à étudier ensuite nous avonsensemencé chaque milieu avec quelques gouttes de cette suspension et nous avons ajouté l'huile de la paraffine car il s'agit d'enzymes anaérobies (cytoplasmiques). A la fin, les trois tubes et le tube de témoin ont été incubés à 37C° pendant 18 heures.

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

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion des disques imprégnés d'antibiotiques en milieu Mueller-Hinton selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Les antibiotiques suivants ont été testés : Céfoxitine, ampicilline, gentamycine, augmentin (amoxicilline + acide clavulanique), cotrimoxazole, acide nalidixique, ciprofloxacine, kanamycine, céfotaxime, amoxicilline. Dont leurs diamètres critiques sont représentés dans le tableau (5).

Tableau 5 : Diamètres critiques pour l'appréciation de la Sensibilité/Résistance selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.

Antibiotiques	Charge du disque (μg)	Diamètres critiques (mm)	
		Sensible (S)	Résistante (R)
Céfoxitine (FOX)	30	≥ 22	< 15
Ampicilline (AM)	10	≥ 21	< 16
Gentamycine (CN)	10	≥ 15	< 13
Amoxicilline + Acide clavulanique (AMC)	30	≥ 23	< 16
Cotrimoxazole (SXT)	25	≥ 17	< 11
Acide nalidixique (NA)	30	≥ 20	< 15
Ciprofloxacine (CIP)	5	≥ 25	< 22
Kanamycine (K)	30	≥ 21	< 19
Céfotaxime (CTX)	30	≥ 26	< 23
Amoxicilline (AX)	25	≥ 23	< 16

A)- Mode opératoire :

a- Préparation de la gélose

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

b- Préparation et ajustement de l'inoculum

L'inoculum est préparé à partir d'une souche bactérienne de 18 heures. Des colonies de la bactérie à étudier ont été prélevées avec la pipette Pasteur et ont été introduites dans un tube contenant 10 ml d'eau physiologique en formant une suspension.

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

c- Ensemencement

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

d- Disposition des disques d'antibiotiques

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

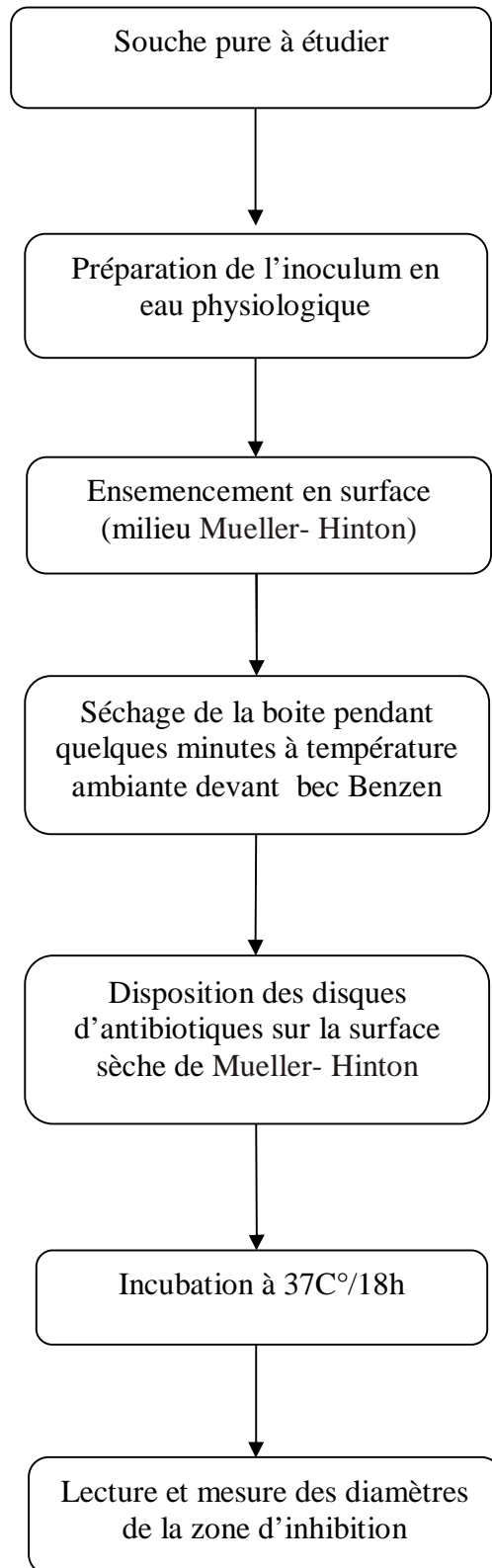
e- Incubation

L'incubation s'est faite à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures.

f- Lecture interprétative

Les diamètres d'inhibition autour des disques sont mesurés puis ils sont comparés aux diamètres critiques conformément aux normes CASFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société française de Microbiologie). Il convient de noter toutefois, qu'une souche dont la sensibilité aux antibiotiques est ainsi évaluée peut être déclarée " sensible, intermédiaire ou résistante"

L'organigramme suivant résume la démarche adoptée :



Organigramme 2 : Les étapes de l'antibiogramme (Roland, 2006)

2. 1. 4. Dosage de l'azote total par la Méthode Kjeldahl (Kjeldahl, 1883)

A-Principe

L'azote est présent dans les cellules vivantes principalement sous forme de protéines et d'acides nucléiques. Pour le doser il faut détruire les composés organiques de manière à obtenir tout l'azote sous forme minérale.

B-Méthode

La méthode Kjeldahl consiste à transformer l'azote organique en azote minéral (minéralisation), puis à déplacer l'ammoniac du sel d'ammonium obtenu (distillation) pour le neutraliser par une solution acide de titre connu (dosage).

a)- Minéralisation

La minéralisation est effectuée à l'aide d'un excès d'acide sulfurique concentré, en présence d'un mélange de catalyseurs (K_2SO_4 et $CuSO_4$) pour permettre une minéralisation plus rapide.

Pour réaliser cette étape nous avons suivi le protocole expérimental suivant :

Un volume de 5 ml de chaque suspension bactérienne préparée dans de l'eau physiologique est transféré dans des tubes Kjeldahl (matras) puis 0,5 g de catalyseurs ($K_2SO_4 + CuSO_4$) est additionné, ensuite à l'aide d'une pipette graduée nous avons ajouté 10 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) et 10 ml d'eau oxygénée (30 volumes).

Une fois les six matras préparés, le minéralisateur est mis en route pendant deux heures. Ce dernier comprend : un bloc chauffant, six tubes qui peuvent accueillir un volume de 250 ml, une tête avec six sorties est reliée à un système d'aspiration par une trompe à eau, pour évacuer les vapeurs et fumées produites lors du chauffage.

Le bloc chauffant est relié à un programmeur qui permet la programmation de la température. Il comprend dix programmes ou l'on détermine la température souhaitée. Dans notre cas nous avons utilisé le programme 8 qui correspond à 400-440°C.

Après les deux heures, notre solution dans chaque matras devient limpide. Et après le refroidissement à température ambiante pendant 30 min, nous avons ajouté dans chaque

matras 50 ml d'eau distillée. Après avoir réalisé cette dernière étape, nous avons récupéré le contenu des matras dans des flacons pour passer à l'étape de distillation.

b)- Distillation

Après la minéralisation, l'azote se trouve dans le minéralisat sous forme de NH_4^+ . Le dosage de l'azote est un dosage acide-base. Dans un premier temps les ions ammonium du minéralisat sont déplacés sous forme de NH_3 (ammoniac), puis l'ammoniac est récupéré pour pouvoir le doser à l'aide d'une solution étalonnée d'acide fort. Pour isoler l'ammoniac nous avons procédé par distillation.

La distillation s'est faite en utilisant un appareil qui comprend :

- Un système automatique d'apport de vapeur, de soude et d'eau distillée.
- Un système de récupération du distillat.
- Un système de distillation.
- Les tubes qui ont servi à la minéralisation sont directement adaptés dans le distillateur.

Pour réaliser la distillation nous avons suivi ce protocole :

Un volume de 25 ml d'acide borique à 4% (H_3BO_3) et quelques gouttes d'indicateur coloré de pH (le rouge de méthyle) sont introduits dans un erlenmeyer, ensuite dans le tube du distillateur nous avons mis 20 ml de l'échantillon avec 40 ml d'hydroxyde de sodium provenant du système d'apport de soude.

Après avoir placé le tube et l'erlenmeyer récepteur sur l'appareil à distiller, le distillateur est mis en route en effectuant les réglages éventuels pour réaliser la distillation pendant 4 min. A la fin l'appareil s'arrête automatiquement.

L'ammoniac est recueilli dans la solution d'acide borique (H_3BO_3). L'acide borique est un acide faible qui ne réagit pas avec l'ammoniac, il sert simplement de piège à ammoniac. Lorsque l'ammoniac arrive dans l'acide borique il alcalinise le milieu qui vire au jaune.

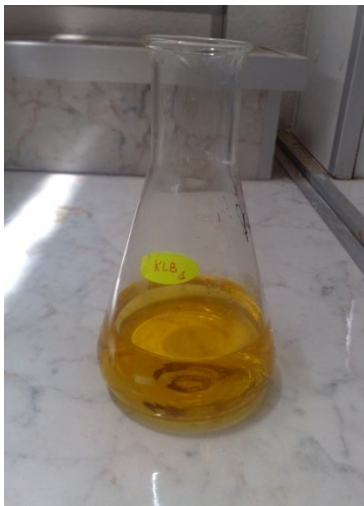


Figure 2 : Alcalinisation du milieu et virage de couleur au jaune

L'ammoniac ainsi piégé est neutralisé au fur et à mesure de son arrivée par une solution d'acide fort (HCl) en présence d'un indicateur coloré : le rouge de méthyle.

c)- Titrage :

Le distillat récupéré dans l'erlenmeyer est titré avec la solution d'acide chlorhydrique à 0,1 N jusqu'à ce que la solution jaune revienne à sa couleur initiale rouge.



a)- Distillat avant titrage



b)- Distillat après titrage

Figure 3 : Aspect du distillat avant et après le titrage

Après avoir titré le contenu du l'erenmeyer avec l'acide HCl, nous avons noté le volume de l'acide utilisé pour chaque distillat pour déduire le taux d'azote en pourcentage en utilisant cette équation :

$$N_2 \% = (V_1 \times 0,014 \times 100 \times N) / V_0$$

Avec : N : Normalité de la solution d'acide chlorhydrique utilisée pour l'échantillon= 0,1N

V₀ : Le volume en ml de l'échantillon= 5 ml

V₁ : Le volume en ml de la solution d'acide chlorhydrique utilisée pour l'échantillon

2. 2. Phylogénie phénétique

3. 2. 1. codification des états des caractères

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

Tableau 6 : Codage des états des caractères

Caractères	Code 1	Code 0
Tests biochimiques	Résultat positif	Résultat négatif
Mobilité	Mobile	Immobile
Sensibilité aux antibiotiques	Résistante	Sensible
Taux d'azote N ₂ %	> Moyenne	< Moyenne

2. 2. 2. L'analyse phylogénétique

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

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

$$d = 1 - S$$

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

RESULTATS
ET
DISCUSSION

1. Résultats

1.1 Tests biochimiques

Les résultats obtenus sont représentés dans une matrice binaire (tableau 9) qui a concerné toutes les souches étudiées. Grace aux tests biochimiques, il est possible de connaître certaines caractéristiques du métabolisme des bactéries analysées.

1.1.1 Milieu TSI

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

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

Les souches d'*Escherichia coli*, et *Klebsiella pneumoniae* ont fermenté le lactose ainsi que le saccharose, elles produisent du gaz mais pas du sulfure d'hydrogène H₂S.

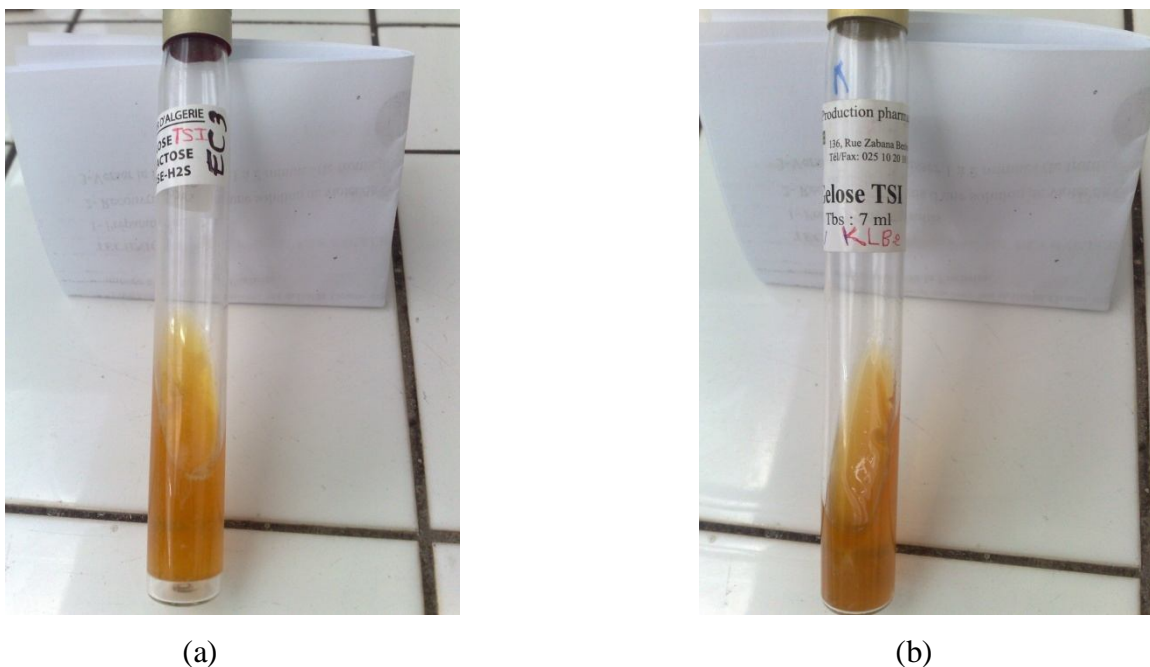


Figure 4: Aspect du milieu TSI avec *Escherichia coli* (a) et *Klebsiella pneumoniae* (b)

L'espèce *Serratia marcescens* a fermenté le saccharose mais pas le lactose et elle n'a produit ni du gaz ni du H₂S.

L'espèce *Proteus mirabilis* a fermenté le glucose avec production de gaz et H₂S mais elle n'a pas fermenté ni le lactose ni le saccharose.

Quant à la souche de *Pseudomonas aeruginosa*, elle n'a rien fermenté et n'a pas produit de gaz ni de H₂S comme le montre la figure suivante :



Figure 5: Aspect du milieu TSI avec *Pseudomonas aeruginosa*

1.1.2 Utilisation du citrate

Les souches d'*Escherichia coli* n'utilisent pas le citrate comme seule source de carbone, par contre *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis* et *Pseudomonas aeruginosa* utilisent le citrate comme seule source de carbone et entraînent une alcalinisation du milieu, d'où le virage du vert au bleu.



Figure 6 : Aspect du milieu citrate de Simmons avec *Escherichia coli* (-)



Figure 7 : Aspect du milieu citrate de Simmons avec *Klebsiella pneumoniae*(+)

1.1.3 Production d'indole

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

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



a : Aspect du test négatif



b : Aspect du test positif

Figure 8: Test d'indole

1.1.4 Le milieu Mannitol-mobilité

C'est une gélose molle conditionnée en tubes et qui permet d'étudier la fermentation du mannitol et la mobilité des germes.

Les souches d'*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, et *Proteus mirabilis* ont fermenté le mannitol dont la fermentation de ce dernier a été matérialisée par un virage du milieu au jaune. Par contre l'espèce *Serratia marcescens* et le genre *Pseudomonas* n'ont pas utilisé le mannitol.

En ce qui concerne la mobilité les bactéries mobiles ont diffusé à partir de la ligne verticale d'ensemencement en créant un trouble, et nous avons l'exemple comme : *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*. Alors que Les bactéries immobiles ont uniquement poussé le long de la strie d'ensemencement : *Klebsiella pneumoniae*.

1.1.5 Production d'oxydase

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

Les entérobactéries étaient dépourvues d'oxydase et il n'y a pas eu de coloration, donc elles sont oxydase négative. Par contre le genre *Pseudomonas* s'est révélé oxydase positive (test instantanément positif).

1.1.6 Production de la catalase

Toutes les entérobactéries que nous avons analysées sont des catalases positives et de même pour le genre *Pseudomonas*, dont la présence de la catalase se matérialise par la production de bulles.

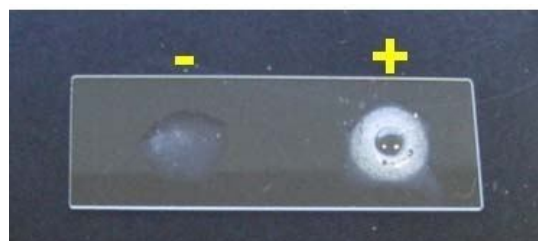


Figure 9: Test de la catalase

1.1.7 Production de la B-Galactosidase (test ONPG)

Les souches d'*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* étaient pourvues de la B-Galactosidase, elles ont donné un résultat positif c'est-à-dire ONPG+ ou le milieu utilisé devient jaune. Alors que les deux espèces *Proteus mirabilis* et *Pseudomonas aeruginosa* ont donné un résultat négatif avec le test ONPG c'est-à-dire le milieu restait incolore.



a : Aspect du test négatif

b : Aspect du test positif

Figure 10: Test ONPG

1.1.8 Tests RM-VP

Le test VP (Voges-Proskauer) s'est fait sur le milieu Clark et Lubs et met en évidence la production d'acétoïne. Si le milieu reste incolore donc le test VP est négatif, par contre Si le milieu donne une couleur rose à rouge donc le test VP est positif.

Les souches d'*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* et *Pseudomonas aeruginosa* étaient VP négatif car après ajouts des réactifs VP1 et VP2 il n'y a pas eu de réaction. Par contre les souches de *Klebsiella pneumoniae* et *Serratia marcescens* ont donné un résultat positif.



Figure 11: Aspect du test VP positif

Concernant le test RM, les souches d'*Escherichia coli*, et *Proteus mirabilis* étaient RM positif car le milieu est devenu rouge après l'addition du réactif de rouge de méthyle. Alors que *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, et *Pseudomonas aeruginosa* étaient RM négatif car le milieu n'est pas devenu rouge donc aucune réaction ne s'est produite.



a : Aspect du test RM négatif



b : Aspect du test RM positif

Figure 12: Test RM

1.1.9 Production de décarboxylases

Les milieux de Moëller (LDC= lysine décarboxylase, ODC= ornithine décarboxylase, ADH= arginine dihydrolase) permettent de montrer la présence de ces enzymes par la mise en évidence de l'acidification du milieu et sa réalcalinisation éventuelle. Après avoir effectué les tests nous avons obtenu les résultats suivants :

Pour les souches d'*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, les deux milieux de moëller ADH et ODC ont changé de couleurs et sont devenus jaunes car les milieux sont devenus acides donc négatif car il aurait fallu avoir une ré-alcalinisation, par contre le milieu LDC n'a pas changé de couleur et il est resté violet donc LDC positif.

Alors que pour les deux autres entérobactéries restantes, nous avons :

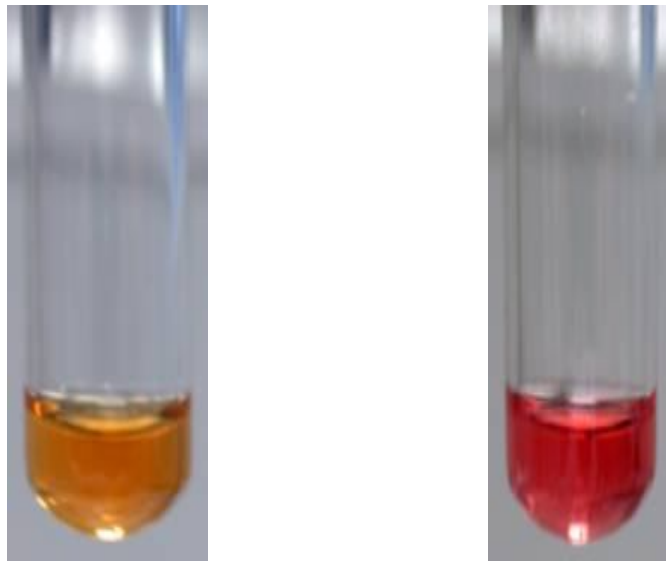
L'espèce *Serratia marcescens* était LDC, ODC positifs et ADH négatif, par contre *Proteus mirabilis* a donné une réaction négative avec les milieux LDC, ADH et une réaction positive avec le milieu ODC.

En ce qui concerne l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* nous avons eu des résultats différents avec les milieux de moëller ; une souche PS1 était LDC, ADH positifs mais ODC négatif. Par contre la souche PS2 était LDC, ODC négatifs et ADH positif.

1.1.10 Production d'uréase

La production d'uréase se matérialise par un changement de la coloration au rouge, du fait de l'alcalinisation du milieu. En utilisant le milieu Urée-Indole pour rechercher cette enzyme, nous avons obtenu les résultats suivants :

Les souches d'*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, et *Pseudomonas aeruginosa* étaient uréase négatif, par contre les deux espèces de *Klebsiella pneumoniae*, et *Proteus mirabilis* ont donné un résultat positif.



a : Aspect du test négatif

b : Aspect du test positif

Figure 13: Test Uréase

1.2. L'antibiogramme

Comme nous l'avons mentionné précédemment, chaque souche identifiée a été soumise à un antibiogramme afin de déterminer la sensibilité aux différentes bactéries. Pour rappel les antibiotiques testés ainsi que leurs diamètres critiques sont repris au tableau 5.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries et des *Pseudomonas* a permis d'obtenir les résultats suivants que nous présentons au tableau 7.

Tableau 7: Le profil de résistance/sensibilité chez les entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*.

	FOX	AM	CN	AMC	SXT	NA	CIP	K	CTX	AX
EC1	S	R	S	R	R	R	R	R	S	R
EC2	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R
EC3	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R
EC4	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R
KP1	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
KP2	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R
SM	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
PROT	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R
PS1	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
PS2	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R

1.3. Détermination du taux de l'azote total par Kjeldahl

La méthode repose sur une minéralisation de l'échantillon en milieu acide, suivie d'un passage en milieu alcalin pour transformer les ions ammonium en ammoniac, ce dernier est ensuite distillé et récupéré dans une solution indicatrice pour être dosé par un acide. Après le dosage, et après avoir calculé le taux d'azote total pour chaque souche bactérienne, nous avons obtenu les résultats suivants que nous présentons dans le tableau 8.

Tableau 8: Taux d'azote total chez les souches étudiées

Souche bactérienne	Taux d'azote total (%)
EC1	0.033
EC2	0.028
EC3	0.030
EC4	0.047
KP1	0.044
KP2	0.050
SM	0.036
PROT	0.075
PS1	0.056
PS2	0.053
Nombre de mesures	10
Moyenne	0.045

1.4. Analyse phylogénétique

Tous les résultats obtenus sont représentés dans une matrice binaire (tableau 9).

Tableau 9: Matrice binaire des caractères étudiés

	EC1	EC2	EC3	EC4	KP1	KP2	SM	PM	PS1	PS2
Lactose	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
Saccharose	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
Gaz	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
H ₂ S	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Citrate	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
Indole	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Mannitol	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
Mobilité	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
Oxydase	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Catalase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ONPG	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
RM	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0
VP	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
LDC	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
ODC	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
ADH	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Uréase	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
N ₂ %	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1
FOX 30	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
AM 10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CN 10	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
AMC 30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
SXT 25	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1

NA 30	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1
CIP 5	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0
K 30	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1
CTX 30	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1
AX 25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

1.4.1 Calcul du Coefficient de Jaccard (I_S) :

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

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

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

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

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

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

$$d = 1 - I_S$$

Les deux matrices de similitude et des distances sont représentées dans les tableaux 10 et 11 respectivement.

Tableau 10: Matrice de similarité des souches étudiées

	EC1	EC2	EC3	EC4	KP1	KP2	SM	PROT	PS1
EC2	0,76								
EC3	0,92	0,81							
EC4	0,77	0,86	0,82						
KP1	0,63	0,45	0,55	0,47					
KP2	0,45	0,55	0,47	0,57	0,61				
SM	0,47	0,36	0,43	0,39	0,63	0,45			
PROT	0,47	0,40	0,47	0,50	0,41	0,42	0,39		
PS1	0,43	0,26	0,39	0,34	0,45	0,34	0,57	0,40	
PS2	0,33	0,21	0,29	0,30	0,41	0,30	0,60	0,42	0,82

Tableau 11: Matrice des distances des souches étudiées

	EC1	EC2	EC3	EC4	KP1	KP2	SM	PROT	PS1
EC2	0,24								
EC3	0,08	0,19							
EC4	0,23	0,14	0,18						
KP1	0,37	0,55	0,45	0,53					
KP2	0,55	0,45	0,53	0,43	0,39				
SM	0,53	0,64	0,57	0,61	0,37	0,55			
PROT	0,53	0,60	0,53	0,50	0,59	0,58	0,61		
PS1	0,57	0,74	0,61	0,66	0,55	0,66	0,43	0,60	
PS2	0,67	0,79	0,71	0,70	0,59	0,70	0,40	0,58	0,18

1.4.2. Reconstruction des arbres phylogénétiques:

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

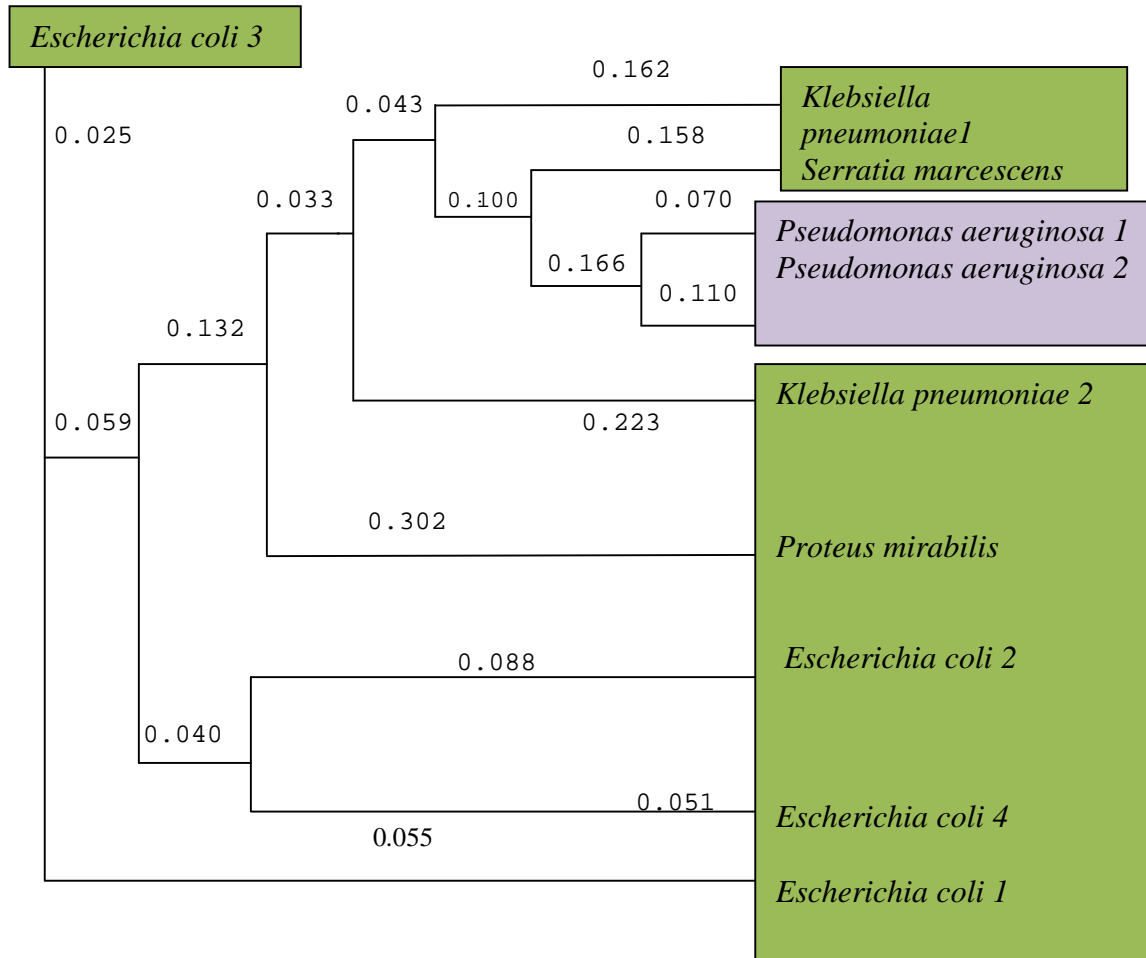
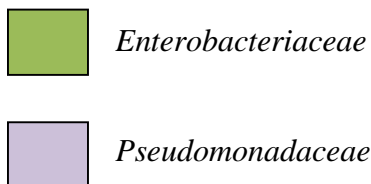


Figure 19: Arbre phylogénétique des souches étudiées construit selon la méthode NJ



1.4.3. Reconstruction par la phylogénie moléculaire

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

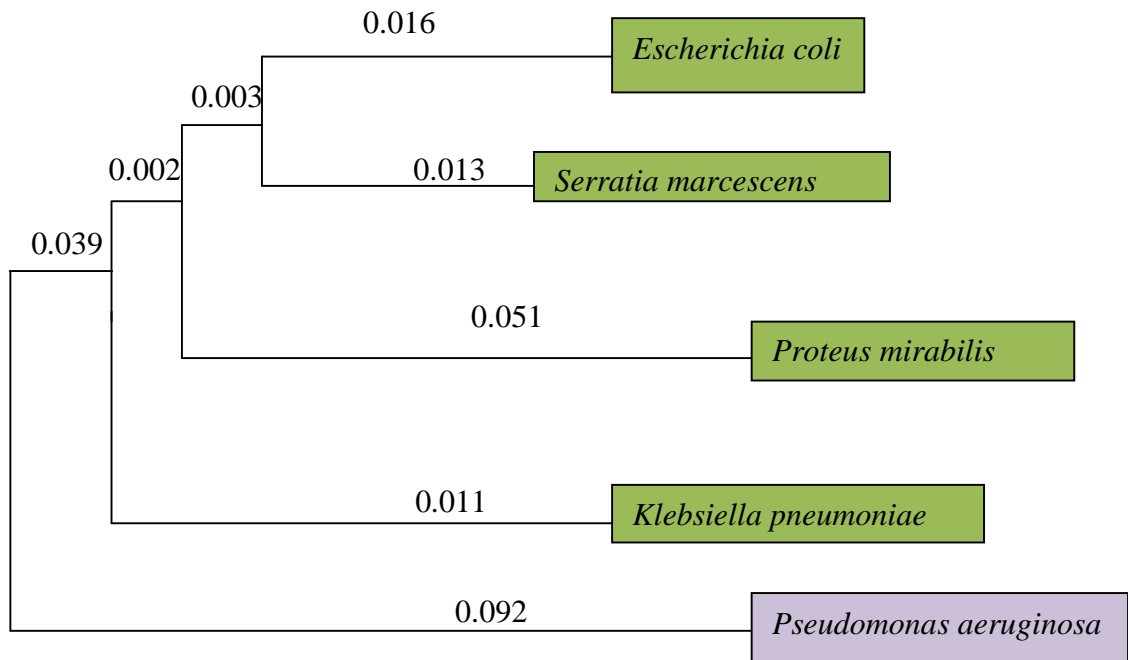




Figure 20 : Arbre phylogénétique construit à partir des séquences d'ARNr 16S des souches à Gram négatif (logiciel MEGA 4.0)

 *Enterobacteriaceae*

 *Pseudomonadaceae*

2. Discussion

Les dix souches à Gram négatif isolées à partir des prélèvements cliniques ont été identifiées sur la base de leurs caractères biochimiques, leur sensibilité aux antibiotiques, et leurs taux d'azote total.

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

2.1. Les résultats des tests biochimiques

L'identification présomptive des bactéries a été effectuée en comparant nos résultats avec ceux relevés sur des références de systématiques bactériennes (Holt *et al.*, 1994 ; Prescott *et al.*, 2003 ; Joffin *et al.*, 2006).

2.1.1. Milieu TSI

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

Au cours de notre étude, nous avons trouvé que toutes les souches d'*Escherichia coli* : EC1, EC2, EC3, EC4 que nous avons analysées fermentent le lactose, le saccharose, le glucose avec production de gaz, et sans production de l'H₂S. Ces résultats sont en accord avec ceux de Hajna, 1945 ; Berche *et al.*, 1988.

De même pour les souches de *Klebsiella pneumoniae*, nous avons trouvé le même profil biochimique que *Escherichia coli* concernant la gélose TSI, comme signalé par Hajna, 1945.

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

En ce qui concerne les souches de *Pseudomonas aeruginosa*, elles ont donné avec le milieu TSI des résultats négatifs, corroborés par les études de Dhayanithi *et al.*, 2010.

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

2.1.2. Utilisation du citrate

Le milieu de citrate de Simmons est un milieu synthétique où la seule source de carbone est le citrate. Les résultats obtenus avec nos espèces bactériennes analysées sont superposables à ceux obtenus par les travaux de Sylla, 2005 ; Ying *et al.*, 2009 ; Nkang *et al.*, 2009 ; Zarei *et al.*, 2010.

Seules les bactéries autotrophes sont capables de croître en présence de citrate comme seule source de carbone et d'alcaliniser le milieu, notons que le citrate est le premier composé du cycle de Krebs ; s'il est utilisé, il y a croissance et le milieu s'alcalinise et cela se traduit par le virage de couleur du vert en bleu.

2.1.3. Production d'indole

Notre étude nous a permis de distinguer des souches d'*Escherichia coli* qui ont donné une réaction positive avec le test indole. Ces résultats sont confirmés par la littérature, en comparant nos résultats avec ceux obtenus par Soomro *et al.*, 2002.

Par contre, ce n'était pas le cas pour les autres espèces étudiées telles que *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, et *Pseudomonas aeruginosa*. Ces résultats sont d'une part conformes à ceux rapportés par Alves *et al.*, 2006 ; Zarei *et al.*, 2010 ; Nkang *et al.*, 2009.

L'indole est obtenu de la dégradation du tryptophane, grâce à une enzyme bactérienne « la tryptophanase ». Il se forme de l'indole, de l'acide pyruvique et de l'ammoniac. L'indole est apolaire, donc soluble dans les solvants organiques et réagit fortement en milieu acide avec le para diméthylamino-benzaldehyde contenu dans le réactif de Kovacs.

2.1.4. Production de l'uréase

En présence de l'enzyme de l'uréase, l'urée est transformée en carbonate d'ammonium et il en résulte une alcalinisation du milieu.

Avec l'espèce de *Proteus mirabilis* étudiée, nous avons constaté une réponse à l'urée fortement positive. Ce phénomène s'explique par le fait que cette espèce possède une uréase très active qui entraîne la formation d'ions ammonium.

Ces ions ammonium vont alcaliniser le milieu et entraîner le virage de l'indicateur du pH (le rouge de phénol) du jaune au rouge en milieu basique. Le résultat obtenu du test uréase avec l'espèce de *Proteus mirabilis* est vérifié par celui noté par Xian *et al.*, 2011.

Par contre, avec les souches de *Klebsiella pneumoniae*, nous avons noté une positivité importante de la réaction, c'est-à-dire une couleur rouge intense au delà de 18heures. Cela s'explique par le fait que les klebsielles ont une activité uréasique faible. La positivité du test uréase avec *Klebsiella pneumoniae* est confirmée par les travaux de Carleen *et al.*, 1993.

Toutes les souches d'*Escherichia coli*, et *Serratia marcescens*, ont donné une réaction négative avec le test de l'uréase. Cela s'explique par l'absence de l'enzyme de l'uréase chez ces espèces. Ces résultats sont corroborés par les résultats qui sont décrits par Keri *et al.*, 2002 ; Prischmann *et al.*, 2008.

Il a été décrit dans la littérature et selon les travaux de Dhayanithi *et al.*, 2010 ; Xian *et al.*, 2011 que les *Pseudomonas aeruginosa* donnent une réaction positive avec le test uréase. D'après notre étude, nous avons trouvé le contraire ; nos souches de *Pseudomonas aeruginosa* étaient uréase négative. Nous avons donc pensé à deux éventualités : Possibilité de contamination par une souche à caractère uréase (-), ou il s'agit d'une autre souche.

2.1.5. Utilisation du mannitol

La fermentation du mannitol se traduit par une acidification du milieu qui sera mise en évidence par le virage de l'indicateur coloré du pH (le rouge de phénol).

Conformément à la littérature (Nkang *et al.*, 2009) et durant notre étude, nous avons bien observé des souches d'*Escherichia coli*, et de *Klebsiella pneumoniae*, qui ont utilisé le mannitol comme source de carbone et d'énergie.

En ce qui concerne l'espèce de *Serratia marcescens*, elle était mannitol (-), alors que Prischmann *et al.*, 2008 ; Zarei *et al.*, 2010 ont confirmé l'utilisation du mannitol par cette espèce.

C'est le même cas pour l'espèce de *Proteus mirabilis*, au lieu d'avoir un résultat négatif comme signalé par Matsen *et al.*, 1972 ; Nkang *et al.*, 2009, nous avons obtenu un résultat positif.

Pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa*, les résultats obtenus sont en parfait accord avec ceux décrits par Phibbs *et al.*, 1978.

Les discordances liées à la recherche de l'utilisation du mannitol par les entérobactéries s'expliquent par une mauvaise manipulation ou bien il s'agit des souches atypiques.

2.1.6. La mobilité

D'après notre étude, nous avons obtenu des résultats positifs concernant le test de mobilité avec toutes les souches d'*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, et *Pseudomonas aeruginosa*. Ces résultats sont corroborés par les études de Dhayanithi *et al.*, 2010 ; Zarei *et al.*, 2010 ; Catherine *et al.*, 1999.

Conformément aux résultats obtenus par Alves *et al.*, 2006, nous avons obtenu un résultat négatif du test de mobilité avec les souches de *Klebsiella pneumoniae*.

2.1.7. Production d'oxydase

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

pseudomonas qui est toujours oxydase positive. En réalisant ce test, nous avons obtenu des résultats conformes à ceux rapportés par Le Minor *et al.*, 1989 ; Dhayanithi *et al.*, 2010.

Les souches de *Pseudomonas* ont donné une réaction fortement positive par rapport au test d'oxydase. Cela est dû au fait qu'elles possèdent un cytochrome oxydase qui catalyse la réaction d'oxydation du cytochrome C par l'oxygène moléculaire.

Ce cytochrome oxydase intervient dans la chaîne respiratoire des *Pseudomonas*. Ainsi, le cytochrome oxydase oxyde le cytochrome C qui va, à son tour, oxyder le N,N,N,N-tétraméthyl-1,4-phénylène diamine, substrat qui prend une coloration violet foncé.

2.1.8. Production de la catalase

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

De même pour l'espèce de *Pseudomonas aeruginosa*, nous avons observé une positivité du test catalase. Ce résultat est superposable à celui obtenu par Nkang *et al.*, 2009. Par contre les études de Dhayanithi *et al.*, 2010 ont montré que l'espèce de *Pseudomonas aeruginosa* peut donner une réponse négative au test catalase.

2.1.9. Test ONPG

Dans notre étude, nous avons observé le caractère lactose (+) chez toutes les souches d'*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*. Ce sont des espèces lactose positif, donc capables de scinder le lactose en glucose et galactose, grâce à l'enzyme intracellulaire la β -galactosidase, cette réaction ne peut être possible qu'en présence d'une autre enzyme, également intracellulaire, la β -galactoside perméase qui assure la pénétration du lactose dans la cellule bactérienne et par conséquent sa fermentation.

Dans le test ONPG, c'est donc la β -galactosidase qui est recherchée, cette enzyme permet de scinder le composé synthétique, incolore, ONPG (orthonitrophényl- β -D-galactopiranoside) et libérer l'orthonitrophénol soluble qui donne la coloration jaune.

Selon Delarras, 2007, les bactéries Lactose + possèdent la β -galactosidase, et donc elles sont toujours ONPG +. En comparant nos résultats avec ces données, nous pouvons déduire que nos résultats obtenus avec le test ONPG chez *Escherichia coli*, et *Klebsiella pneumoniae* sont corrects.

Par contre certaines bactéries sont dépourvues de la β -galactosidase mais elles sont favorables pour le test ONPG (ONPG+), c'est le cas de *Serratia marcescens*. Nous avons obtenu dans notre étude une réaction positive au test ONPG, ce résultat est conforme à celui obtenu par Zarei *et al.*, 2010.

Dans notre travail, toutes les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus mirabilis* étaient ONPG (-), ces résultats sont vérifiés par ceux notés par Djelouat, 2009 ; Vieu *et al.*, 1978 qui ont confirmé ce caractère.

2.1.10. Test RM-VP

Selon Nkang *et al.*, 2009 ; Rahman *et al.*, 2010 , les espèces de *Proteus mirabilis* , *Escherichia coli* , fermentent le glucose en produisant de nombreux acides organiques plus ou moins forts par la voie des fermentations acides mixtes. Par contre les espèces de *Serratia marcescens* , *Klebsiella pneumoniae* fermentent le glucose par la fermentation butanediolique en produisant l' **acétoïne** qui est mis en évidence par le test VP. Cette distinction des deux voies peut justifier une règle parfois contestable mais fréquemment vérifiée: les bactéries VP + sont toujours RM -, les bactéries RM + sont VP -.

En ce qui concerne les espèces de *Pseudomonas aeruginosa* et comme signalé par Dhayanithi *et al.*, 2010, elles ne fermentent le glucose ni par la voie des acides mixtes ni par la voie butanediolique , parcequ'elles sont des bactéries aérobies strictes non fermentatives et qui ont un métabolisme oxydatif.

D'après notre étude, nos résultats sont en parfait accord avec ceux décrits par les auteurs précédemment cités.

2.1.11. Production de décarboxylases

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

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

En comparant nos résultats avec ceux rapportés par Matsen *et al.*, 1972 ; Le Minor *et al.*, 1989 ; Prischmann *et al.*, 2008 ; Zarei *et al.*, 2010, nous pouvons dire que notre identification par rapport à ce caractère biochimique a été excellente, nous avons trouvé presque les mêmes résultats, sauf pour le genre de *Pseudomonas*, une souche a présenté un caractère discordant qui est la LDC+, ce qui est anormal car la souche type de *Pseudomonas aeruginosa* ne possède pas cette décarboxylase et donc n'aurait pu scinder l'acide aminé présent dans le milieu.

L'explication que nous pouvons donner sur la positivité de ce caractère c'est que ce caractère biochimique (LDC+) inhabituel observé est un nouveau caractère acquis, et comme tous les caractères biochimiques représentant le phénotype reflétant donc le génotype, il est fort possible que ce caractère ait été transformé par une mutation.

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

Les discordances liées à la recherche de certains caractères peuvent être expliqués par une mauvaise manipulation dont la contamination qui est un phénomène courant lors d'isolement des bactéries au niveau du laboratoire qui est à l'origine de difficulté d'avoir une

souche pure, ou bien ces discordances sont dues à la mutation qui nécessite une grande attention quand on sait que la mutation et le réarrangement sont deux mécanismes permettant aux bactéries de créer de nouveaux gènes de résistance aux antibiotiques, à travers une modification ponctuelle ou un réarrangement de leurs ADN.

2.2. Sensibilité et résistance aux antibiotiques

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

D'après notre étude, les résultats obtenus montrent que 100% des souches testées d'*Escherichia coli* sont résistantes à l'ampicilline, l'amoxicilline, et l'association d'acide clavulanique et l'amoxicilline, par contre elles présentent le phénotype sensible aux céfoxitine, gentamycine, et céfotaxime. En ce qui concerne les autres antibiotiques, nous observons qu'au sein de la même espèce et pour le même antibiotique il y a des souches qui présentent le phénotype sensible et d'autres présentent le phénotype résistant.

D'une manière générale, en prenant le cas de l'amoxicilline, l'ampicilline, et l'association d'acide clavulanique et l'amoxicilline, nous remarquons que nos résultats sont conformes à ceux rapportés par Davis *et al.*, 2011 ; Ferjani *et al.*, 2010. Par contre dans le cas par exemple de la gentamycine, nos résultats présentent une discordance avec les résultats décrits par Baker *et al.*, 2010 qui ont confirmé la résistance d'*Escherichia coli* à la gentamycine, alors que dans notre étude, nous avons trouvé que 100% des souches de cette espèce étaient sensibles.

De même, pour les autres souches d'entérobactéries que nous avons testées. Leur comportement avec les antibiotiques diffère, des fois les souches bactériennes analysées présentent des sensibilités ou des résistances qui sont en parfait accord avec les résultats rapportés par d'autres auteurs, et parfois elles présentent une discordance.

En ce qui concerne les souches de *Pseudomonas aeruginosa*, elles sont toutes résistantes aux antibiotiques testés dans notre travail, sauf pour la gentamycine et la ciprofloxacine, certaines souches sont sensibles et d'autres sont résistantes. Selon Avril *et al.*, 2000 ; Susana *et al.*, 2011 les résistances que nous avons identifiées sont donc en parfait accord avec les résistances naturelles de ces bactéries.

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

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

2.3. Le taux d'azote total chez les souches étudiées

La méthode Kjeldahl est la technique la plus universelle pour l'analyse de l'azote, elle est utilisée pour mesurer la teneur en azote d'échantillons très diversifiés.

Dans notre étude, nous avons mesuré le taux d'azote total dans chaque souche bactérienne identifiée. Pour rappel, les résultats obtenus sont repris au tableau 8. L'ensemble des résultats montre que chez les entérobactéries, le taux d'azote est compris entre 0.02% et 0.05% donc les valeurs se rapprochent. Pour les *Pseudomonas*, la teneur en azote est comprise entre 0.05% et 0.07%.

En comparant le taux d'azote total chez les entérobactéries avec celui des *Pseudomonas*, nous remarquons qu'il s'agit d'une différence non significative, donc nous pouvons déduire que ce caractère est considéré comme étant un caractère mineur qui ne permet pas une bonne identification.

2.4. La phylogénie

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

- Les tests biochimiques.
- Le profil de résistance/sensibilité aux antibiotiques.
- Le taux d'azote total de chaque espèce bactérienne identifiée.

Le calcul du coefficient de Jaccard est basé sur 28 caractères utilisés dans notre étude qui restent insuffisants pour pouvoir aboutir à une identification précise de l'espèce, car le principe de base de la taxonomie numérique consiste à comparer sur un plus grand nombre de caractères.

La construction phylogénétique par l'algorithme NJ a aboutit à un arbre non raciné. Cette construction phylogénétique qui concerne les bactéries à Gram négatif comprenant les deux familles : *Enterobacteriaceae*, et *Pseudomonadaceae* a révélé quatre regroupements : trois font partie des entérobactéries et le quatrième fait partie des *Pseudomonas* dont *Pseudomonas aeruginosa*.

Le clade regroupant les deux souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Serratia marcescens* montre que cette dernière est éloignée de *Pseudomonas aeruginosa* 1 (PS1) par une distance de : $0,070 + 0,166 + 0,158 = 0,394$. La liaison de *Serratia marcescens* avec *Pseudomonas aeruginosa* est inacceptable du fait qu'elles appartiennent à deux familles différentes.

Sur la topologie NJ, nous constatons que les deux souches de *Pseudomonas aeruginosa* (*Pseudomonadaceae*) sont mal placées, elles font partie du même clade que : *Klebsiella pneumoniae*1, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*2 (*Enterobacteriaceae*).

Le clade comprenant les deux souches d'*Escherichia coli* (EC2, EC4) montre qu'elles sont séparées par une distance de $0.051 + 0.088 = 0.139$. La liaison de (EC2 avec EC4) est acceptable du fait que les deux souches font partie de la même espèce.

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

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

Cette analyse phylogénétique a aboutit à la construction d'un arbre phylogénétique, dans le quel nous distinguons deux groupes distincts séparés par une distance de : $0.092 + 0.039 = 0.131$.

- Groupe 1 : *Pseudomonas aeruginosa*.
- Groupe 2 : Reste des clades (entérobactéries).

Au sein du groupe 2, nous constatons que *Serratia marcescens* se place dans la même branche phylogénétique qu'*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, et occupe une ligne phylogénétique commune avec l'espèce *Escherichia coli* dont elles sont séparées par une faible distance ($0.016 + 0.013 = 0.029$).

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

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

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

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

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

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

**CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES**

Conclusion et Perspectives

Le pouvoir pathogène des Entérobactéries a évolué depuis plusieurs décennies, en particulier dans le domaine humain. Les infections dont elles sont responsables (septicémies, infections nosocomiales, infections urinaires, méningites...), sont devenues plus variées dans leurs localisations et leurs manifestations.

Le diagnostic microbiologique et le traitement de ces infections imposent l'identification correcte de l'agent étiologique en vue d'une bonne prise en charge thérapeutique.

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

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

Au terme de ce travail, il ressort que :

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

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

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

-
- Alvarez C., Pangnon B., Allouch P.Y., Ghnassia J.C. (1992). Infections urinaires: principaux aspects épidémiologiques, bactériologiques et cliniques. *Feuill Biol.* **23** (189) : 15-24.
 - Alves M.S., Rubens C.S.D., De Castro A.C.D., Riley L.W., Moreira B.M. (2006). Identification of clinical isolates of indole-positive and indole-negative *Klebsiella* spp. *Journal of clinical microbiology.* **44** (10) : 3640-3646.
 - Avril J-L., Dabernat H., Denis F. et al. (2000). Bactériologie Clinique. Ellipses. 601 p.
 - Barker I.K., Allen S.E., Boerlin P., Janecko N., Lumsden J.S., Pearl D.L., et al. (2010). Antimicrobial Resistance in Generic *Escherichia coli* Isolates from Wild Small Mammals Living in Swine Farm, Residential, Landfill, and Natural Environments in Southern Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology.* **77** : 882-888.
 - Berche P., Gaillard J.L., Simonet M. (1988). Bactéries des infections humaines. Flammarion Médecine-Sciences. p. 100-545.
 - Bossert I.D., Young L.Y. (1986). Anaerobic oxidation of paracresol by a denitrifying bacterium. *Applied and environmental Microbiology.* **52** (5) : 1117-1122.
 - Bouteleux C. (2005). Survie d'Entérobactéries dans les eaux de distribution : Rôle de la matière organique d'origine algale. Thèse de Doctorat. Université Henri-Poincaré-Nancy I. 275 p.
 - Camin J.H., Sokal R.R. (1965). A method for deducing branching sequences in phylogeny. *Evolution.* **19**: 311-326.
 - Carbonnelle B., Denis F., Marmonier A., et al. (1987). Bactériologie Médicale : Techniques usuelles. *SIMEP SA.* Paris. p.121-137.
 - Carleen M.C., Delia M.G., Heike L. (2006). Identification of a nitrogen-regulated promoter controlling expression of *Klebsiella pneumoniae* urease genes. *Molecular Microbiology.* **8** (1) : 187-198.
 - Catherine A.M., Robert B. (1999). Genomic rearrangements in the flagellin genes of *Proteus mirabilis*. *Molecular Microbiology.* **31** (2) : 679–690.
 - D'Acremont V., Genton B. (2006). Diarrhée des voyageurs : résistance aux antibiotiques. *Revue Médicale Suisse.* **2** : 33-122.
 - Darlu P., Tassy P. (2004). La reconstruction phylogénétique. Concepts et méthodes. Masson. Paris. 241 p.
 - Davis J.A., Jackson C.R., Fedorka-Cray P.J., Barrett J.B., Brousse J.H., Gustafson J., et al. (2011). Anatomical distribution and genetic relatedness of antimicrobial-resistant

-
- *Escherichia coli* from healthy companion animals. *Journal of Applied Microbiology*. **110** (2) : 597-604.
 - Delarras C. (2003). Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux. TEC & DOC. Lavoisier. Paris. 269 p.
 - Dellarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Technique et documentation. France. Lavoisier. 462 p.
 - Dhayanithi N.B., Ajith Kumar T.T., Kathiresan K. (2010). Effect of neem extract against the bacteria isolated from marine fish. *Journal of Environmental Biology*. **31** : 409-412.
 - Djelouat S. (2009). Les entérobactéries : L'essentiel. [En ligne]. <http://knol.google.com/k/salim-djelouat/mes-knols/> . (Consulté le 16 Mai 2011).
 - Edwards A.W.F., Cavalli-Sforz L.L. (1964). Phenetic and phylogenetic classification. Chapter Reconstruction of evolutionary trees. *System. Association Publ.* **6** : 67-76.
 - Ewing W.H., Edwards P.R. (1960). The principal divisions and groups of Enterobacteriaceae and their differentiation. *Intern Bull Bacteriol Nomencl Taxon*. **10** : 1-12.
 - Felsenste J. (1973). Maximum likelihood and minimum- steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. *Syst. Zool.* **22** : 240-249.
 - Ferjani A., Mkaddemi H., Tilouche S., Marzouk M., Hannechi N., Boughammoura L., et al. (2011). Caractéristiques épidémiologiques et bactériologiques des bactéries uropathogènes isolées dans un milieu pédiatrique. *Archives de Pédiatrie*. **18** (2) : 230-234.
 - Gaudy C. (2005). Antibiotiques : pharmacologie et thérapeutiques. Elsevier. Amsterdam. 269 p.
 - Gérard A., Jehl F., Chomar M., et al. (2003). De l'antibiogramme à la prescription. 2^{ème} édition Biomérieux. p.22.
 - Goettsch W., Van Pelt W., Nagelkerke N., et al. (2003). Increasing resistance to fluoroquinolones in *E. coli* from urinary tract infections in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother.* **46** : 223.
 - Goldstein F.W. (2000). The Multicentre Study Group Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary tract infections in France. *Eur J Clin Microbiol Infect Diseases*. **19**: 7-112.

-
- Gupta K., Scholes D., Stamm W. (1999). Increasing prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in women. *J Am Med Association*. **281**: 736.
 - Hajna A.A. (1945). Triple Sugar Iron Medium for the Identification of the Intestinal groups of Bacteria. *J. Bact.* **49** : 516-517.
 - Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., et al. (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology. Williams & Wilkins. Baltimore. 787 p.
 - Joffin J.N., Leyrol G. (2006). Microbiologie technique. Tome1. Dictionnaire des techniques. Bordeaux : CRDP d'aquitaine. 363 p.
 - Joly, B., Reynaud A. (2003). Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic. TEC & DOC. Lavoisier. Paris. 356 p.
 - Keri L.B., Amy E.W., John R.W., Sookie S.B. (2002). Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation. *Journal of Biotechnology*. **93** (2) : 171-181.
 - Khan F., Rizvi M., Shukla I., Malik A. (2011). A novel approach for identification of members of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical samples. *Biology and Medicine*. **3** (2) : 313-319.
 - Kitouni M. (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de Doctorat. Université Mentouri de Constantine. 171 p.
 - Kjeldahl J. (1883). Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Z. Anal. Chem.* **22** : 366-382.
 - Larabi K., Masmoudi A., Fendri C. (2003). Etude bactériologique et phénotypique de résistance des germes responsables d'infections urinaires dans un CHU de Tunis. *Méd Mal Infect.* **33** : 52-348.
 - Larpent J.P. (2000). Introduction à la nouvelle classification bactérienne. Technique et documentation. Paris. Lavoisier. 261p.
 - LE Minor L., Veron N. (1989). Bactériologie Médicale. *Flam Med. Science*. **333** : 773-823.
 - Leclerc H., Mossel D.A.A., Edberg S.C., Struijk C.B. (2001). Advances in the bacteriology of the Coliform Group: their suitability as markers of microbial water safety. *Annu. Rev. Microbiol.* **55** : 201-234.

-
- Lecointre G., Le Guya der H. (2001). Classification phylogénétique du vivant. Belin. Paris. 537 p.
 - Les recommandations du comité de l'antibiogramme (CA-SFM). (2010). [En ligne] <http://www.sfm.asso.fr> (Consulté le 20 Mars 2011).
 - Luchetta P., Maurel M.C., Higuët D. et al. (2005). Evolution moléculaire. Dunod. Paris. 330 p.
 - Matsen J.M., Blazevic D.J., Ryan J.A., Ewing W.H. (1972). Characterization of Indole-Positive *Proteus mirabilis*. *Applied Microbiology*. **23** (3) : 592-594.
 - Mayr E. (1965). Classification and phylogeny. *Amer. zool.* **5**: 165-174.
 - Mayr, E. (1986). La systématique évolutionniste et les quatre étapes du processus de classification. Fayard, Fondation Diderot. Paris. p. 143-160.
 - Meacham C.A. (1984). The role of hypothesized direction of characters in the estimation of evolutionary history. *Taxon*. **33** (1): 26-38.
 - Michener C.D., Sokal R.R. (1957). A quantitative approach to a problem in classification. *Evolution*. **11**: 130-162.
 - Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., et al. (1999). Manual of clinical Microbiology. 7th ed. American Society for Microbiology, Washington DC. p. 442-458.
 - Nkang A.O., Okonko O.I., Fowotade A., Udeze A.O., Ogunnusi T.A., Fajobi E.A., et al. (2009). Antibiotics susceptibility profiles of bacteria from clinical samples in Calabar, Nigeria. *J. Bacteriol. Res.* **1** (8) : 89-96.
 - O'Donnel A.G., Minnikin D.E., Goodfellow M. (1985). Integrated lipid and wall analysis of actinomycetes. In Chemical methods in bacterial systematic. Ac. Press., London. p. 131-143.
 - Pechère J.C., Frottier J. (1995). Une menace croissante : la résistance aux antibiotiques. *Médecine Hygiène*. **2090**: 107.
 - Phibbs P., McCowen S., Feary T., Blevins W. (1978). Mannitol and Fructose Catabolic Pathways of *Pseudomonas aeruginosa* Carbohydrate-Negative Mutants and Pleiotropic Effects of Certain Enzyme Deficiencies. *J. Bacteriol.* **133** (2) : 717-728.
 - Pilet C., Bourdon J.L., Toma B., et al. (1979). Les entérobactéries : Bactériologie médicale et vétérinaire : systématique bactérienne. Doins. Paris. p.109-187.
 - Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., et al. (2003). Microbiologie. 2ème édition. Boeck Université. 1099 p.

- Prischmann A.D., Lehman R.M., Christie A.A., Dashiell K.E. (2008). Characterization of bacteria isolated from maize roots: Emphasis on *Serratia* and infestation with corn rootworms (Chrysomelidae: Diabrotica). *Applied soil ecology*. **40** : 417-431.
- Rahal K., Benslimani A., Ammari H., et al. (2009). Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. [En ligne]. <http://www.sante.dz/aarn/index.htm> . (Consulté le 07 Juin 2011).
- Rahman M.M., Akhter S., Mahm J., Pandeya D.R., Haque M.A., Alam M.F. et al. (2010). Control of coliform bacteria detected from diarrhea associated patients by extracts of *Moringa oleifera*. *Nepal Med Coll J*. **12** (1) : 12-19.
- Roland A. (2006). Profil antibiologique des bactéries responsables d'infection urinaire communautaire. Thèse de Doctorat. Université de Bamako. 131 p.
- Saitou N., Nei M. (1987). The Neighbor-joining Method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4** (4) : 406-425.
- Sokal R.R., Sneath P.H. (1963). Principe of numerical taxonomy. Freeman and company. San Francisco. London. 359 p.
- Soomro A.H., Arain M.A., Khaskheli M., Bhutto B. (2002). Isolation of *Escherichia Coli* from raw milk and milk products in relation to public health sold under market conditions at Tandojam. *Journal of Nutrition*. **1** (3) : 151-152.
- Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P., Kämpfer P., Maiden M., et al. (2000). Report of the ad hoc committee for the reevaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52** : 1043-1047.
- Sulkin E.S., Willet J.C. (1940). A Triple Sugar Ferrous Sulfate Medium for use in Identification of Enteric Organisms. *J. Lab. Clin. Med.* **25**: 649-653.
- Susana S., Bostjan J., Roman J., Ignacio M., Mirian F., José L., et al. (2011). Structural Features Governing the Activity of Lactoferricin-Derived Peptides That Act in Synergy with Antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* *In Vitro* and *In Vivo*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **55** (1) : 218-228.
- Sylla M.B. (2005). Infections invasives à *Escherichia coli* dans le service de pédiatrie du CHU Gabriel Touré Bamako. Thèse de Doctorat. Université de Bamako. 58 p.
- Tariq A.L., Prabakaran J.J. (2010). Molecular Characterization of Psychrotrophic *Serratia marcescens* TS1 Isolated from Apple Garden at Badran Kashmir. *Journal of Agriculture and Biological Sciences*. **6** (3) : 364-369.

-
- Vieu J.F., Vieu M. (1978). Le test à l'O.N.P.G. et l'épidémiologie de *Pseudomonas aeruginosa*. *Médecine et Maladies Infectieuses*. **8** (5) : 231-234.
 - Wayen G., Bernner D.J., Colwell R.R., Grimont P.A.D., Kandler O., Krichevsky M. et al. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematic. *Int. J. Syst. Microbiol.* **37** : 463-464.
 - Wise R., Hart T., Cars O., et al. (1998). Antimicrobial resistance is a major threat to public health. *British Med J.* **317**: 10.
 - Xian G., Lixia Z., Ganzhen D., Chang L., Chengye L., Changwei Q., et al. Aerobes and Levels of Estradiol and Progesterone in Cystic Endometrial Hyperplasia-Pyometra Complex Bitches. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2011 ; **10** (8) : 965-971.
 - Ying T.C., Tsai L.L., Keh-Ming W., Jing-Jou Y., I.Wen H., Min-Chi L., et al. (2009). Genomic diversity of citrate fermentation in *Klebsiella pneumoniae*. *BMC Microbiology*. **168** : 1-9.
 - Zarei M., Aminzadeh S., Zolgharnein H., Safahieh A., Ghoroghi A., Daliri M., et al. (2010). *Serratia marcescens* B4A chitinase product optimization using Taguchi approach. *Journal of biotechnology*. **8** (4) : 252-262.
 - Zavarzin G.A., Stackebrandt E., Murray R.G. (1991). A correlation of phylogenetic diversity in the *Proteobacteria* with the influences of ecological forces. *Cano I. Microbiol.* **37**: 1-6.

ANNEXE

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

Taxon	ID	Séquences
<i>Escherichia coli</i>	Z83204	<p>atcctggctcagattgaacgctggcggcaggcctaacacatgcaagtcgaacggtaacagg aaacagcttgctgcttctgctgacgagtgccggacgggtgagtaaatgtctgggaaactgcctga tggagggggataactactggaacggtagctaataccgcataacgtcgcaagaccaaagag ggggaccttcgggctcttccatcggatgtgccagatgggattagctagtaggtgggta acggctcacctaggcgacgatccctagctggtctgagaggatgaccagccacactggaact gagacacgggtccagactcctacgggagcagcagtggggaatattgcacaatgggcgcaa gcctgatgcagccatgccgctgtatgaagaaggccttcgggtgtaaaagtacttccagcggg gaggaagggagtaaaagtaataccttctgctcattgacgttaccgcagaagaagcaccggct aactcctgccagcagccgctgtaatacggagggtgcaagcgttaacggaactactgggc gtaaagcgcacgcaggcgggttgttaagtcagatgtgaaatccccgggtcaacctgggaac tgcactgatactggcaagcttgactcgtagagggggtagaattccaggtgtagcgggtga aatgcgtagagatctggaggaatacgggtggcgaaggcggccccctggacgaagactgac gctcaggtgcgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtccacgccgtaa acgatgctgacttgaggtgtgcccttgaggcgtggcttccggagcgaacgcgtaagtcga ccgcctggggagtagcggcccaagggtaaaactcaaatgaattgacggggggccgcacaa gcggtggagcatgtggttaattcgtatgcaacgcgaagaaccttacctggtctgacatccac ggaagtttccagag</p>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AM922113	<p>agtctttagagggggtagaattccaggtgtagcgggtgaaatgcgtagagatctggaggaa taccgggtggcgaaggcggccccctggacaagactgacgctcaggtgcaaaagcgtggg gagcgtgtggtggttttttttntnnntnnnttngtngnaacnancctgtdngtgttag ccctgctcgaaggccatgatgactgacgtcatccccaccttccctcagttatcactggca gtctccttgagtcccggccgraccgctggcaacaaaggataagggtgctcgtgctgggg acttaaccaacatttcacaacacgagctgacgacagccatgcagcacctgtctcagattcc cgaaggcaccaatccatctctgaaagtctgtggatgtcaagaccaggttaaggtcttcgct tgcacgaattaaaccacatgtccaccgcttgcgggccccctcaattcattgagtttaa ccttgcggcctactccccagcggctgatttaacgcgttagctccggaagccacgcctcaa gggcacaacctccaatcgacatcgttacggcgtggactaccagggtatctaactctgttgc tccccagc</p>
<i>Proteus mirabilis</i>	JF784046	<p>tacacatgcagtcgagcggtaaacaggagaaagcttcttctgctgacgagcggcgacgg gtgagtaatgtatgggatctcccgatagagggggataactactgaaacgggtggctaa ccgcataatgtctacggacaaagcaggggctcttcggaccttgcactatcggatgaacccat atgggattagctagtaggtgggtaaaaggctcactaggcagcagatctctagctggtctgaga ggatgatcagccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggaggcagcagtg ggaatattgcacaatgggcgcaagcctgatgcagccatcccgcgtgtatgaagaaggcctta gggtgtaaaagtacttccagcggggaggaagggtgataagggttaaaccttatcaattgacgtt accgcagaagaagcaccgggtaactccgtgccagcagccgcggtaatacggagggtgca agcgttaacggaactactgggcgtaaagcgcacgcagggcgtcaattaagtcagatgtgaa agccccgagcttaactgggaattgatctgaaactggttggctagagctttagagggggg tagaattccatgttagcgggtgaaatgcgtagagatgtggaggaataccggtggcgaaggcg gccccctggacaaagactgacgctcaggtgcgaaagcgtggggagcaaacaggattagat accctgtagtccacgctgtaaacgatgctgatttagaggttgggtctgaaaccgtggctctg gagctaacgcgttaaatcaccgctggggagtagcggccgcaagggttaaaactcaaatgaat tgacggggggccgcacaagcgggtggagcatgtggttaattcgtatgcaacgcgaagaacctt acctactctgacatccagcgaatccttagagatagaggagtgccttcgggaacgctgagac aggtg</p>

<p><i>Serratia marcescens</i></p>	<p>AJ233431</p>	<p>gctcagattgaacgctggcggcaggcttaacacatgcaagtcgagcggtagcacagggga gcttgctccctgggtgacgagcggcggacgggtgagtaatgtctgggaaactgcctgatgg agggggataactactggaaacggtagctaataaccgcataacgtcgcaagaccaaaagggg ggaccttcgggcctcttcccatcagatgtcccagatgggattagctagtaggtggggaatg gctcacctaggcgacgatccctagctggctgagaggatgaccagccacactggaactgag acacggtccagactcctacgggaggcagcagtggggaatattgcacaaatgggcgcaagcct gatgcagccatgccgctgtgtgaagaaggccttcgggtgtaaagcactttcagcgaggag gaaggtggtgagcttaatacgttcatcaattgacgttactcgagaagaagcaccggctaact ccgtgccagcagccgcggtataaccggagggtgcaagcgtaaacggaactgggcgtaa agcgcacgcagcgggtttgtaagttagatgtgaaatccccgggctcaacctgggaactgca ttgaaactggcaagctagagtctctgtagaggggggtagaattccaggtgtagcgggtgaaat gcgtagagatctggaggaataaccggtggcgaaggcgggcccctggacgaagactgacgct caggtgccaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctgtagtccacgctgtaaacg atgtcgattggaggtgtgccctgaggcgtggctccggagctaacgcgttaaatcgaccg cctggggagtagcggccgcaagggttaaaactcaaatgaattgacggggggcccgcacaagcg gtggagcatgtggttaattcgatgcaacgcgaagaaccttacctactcttgacatccagagaa cttccagagatggat</p>
<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i></p>	<p>AM419153</p>	<p>tttgatcctggctcagattgaacgctggcggcaggcctaacacatgcaagtcgagcggatga agggagcttgctcctggattcagcggcggacgggtgagtaatgcctaggaatctgcctggta gtgggggataaacgtccggaacgggcgctaataaccgcatacgtcctgagggagaaagtgg gggatcttcggacctacgctatcagatgagcctaggtcggattagctagttggtggggtaaa ggcctaccaaggcgacgatccgtaactggtctggaggatgatcagtcacactggaactgag acacggtccagactcctacgggaggcagcagtggggaatattggacaatgggcgaaagcc tgatccagccatgccgctgtgtgaagaaggcttcggattgtaaagcactttaagttgggag gaagggcagtaagttaataccttctgtttgacgttaccacagaataagcaccggctaactt cgtgccagcagccgcggtataacgaagggtgcaagcgtaaacggaactactgggcgtaaa gcgcgcgtaggtggttcagcaagttggatgtgaaatccccgggctcaacctgggaactgat ccaaaactactgagctagatgaggttagaggggtggtggaattcctgtgtagcgggtgaaatg gtagatataaggaaggaacaccagtgggcgaaggcgaccacctggactgatactgacactgag gtgcgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtccacgccgtaaacgatg tcgactagccgtgggatcctgagatcttagtggcgcagctaacgcgataagtcgaccgct ggggagtagcggccgcaagggttaaaactcaaatgaattgacggggggcccgcacaagcggtg gagcatgtggttaattcgaagcaacgcgaagaaccttacctggccttgacatgctgagaactt tccagagatg</p>

Nom : MEZIANI Prénom : MERIEM	Date de soutenance : 20 / 02 / 2012
DIPLOME DE MAGISTERE	
Contribution du diagnostic biochimique bactérien dans l'établissement des parentés phylogénétiques : Cas des entérobactéries et <i>Pseudomonas</i>	
<p>Résumé</p> <p>Dix souches bactériennes ont été isolées à partir des prélèvements cliniques fournies par le laboratoire de bactériologie (DAKSI). Elles ont été identifiées par les méthodes microbiologiques standardisées (galerie biochimique). Parmi les dix souches étudiées, huit souches appartiennent à la famille des <i>Enterobacteriaceae</i> et deux souches font partie des bacilles à Gram négatif non fermentaires (<i>Pseudomonas</i>). Ces souches ont été identifiées présomptivement selon leurs caractères biochimiques, leur sensibilité ou leur résistance aux antibiotiques, et leur taux d'azote total mesuré par la méthode Kjeldahl. Un profil phylogénétique a été réalisé par les méthodes phénétiques de distance, en utilisant l'algorithme NJ et l'analyse des séquences de l'ADN 16S. L'analyse des topologies obtenues a permis de déterminer le poids du phénotype biochimique dans l'établissement des parentés phylogénétiques.</p>	
<p>Mots clés : Entérobactéries, phénotype biochimique, phylogénie.</p>	
<p><u>Laboratoire de recherche</u></p> <p>Laboratoires de Microbiologie et de Biochimie. Département de Biochimie-Microbiologie. Faculté des sciences de la Nature et de la Vie. Université Mentouri Constantine.</p>	
<p>Président : Mr BEN SEGUENI A. Maître de conférences université Mentouri Constantine.</p> <p>Rapporteur : Mr HAMIDECHI M.A Maître de conférences Université MentouriConstantine.</p> <p>Examineurs : Mr BOUDEMAGH A Maître de conférences université Mentouri Constantine.</p> <p style="text-align: center;">Mr CHIKHI A. Maître de conférences université Mentouri Constantine.</p>	