

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf : ...../UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2018

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**  
**EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER**

**Domaine : SNV      Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Microbiologie appliquée**

**Présenté par : CHELKIA Hayat et GUERIANI Amina**

***Thème***

**Facteurs abiotiques et sensibilité/résistance bactérienne  
aux antibiotiques : impact du pH et de la salinité.**

**Soutenu le : 21/09/2019**

**Devant le jury composé de :**

***Nom et prénom***

***Grade***

*Mr. LAMINE Salime*

*MCA Univ. de Bouira*

*Président*

*Mr. RAI Abdelwahab*

*MCB Univ. de Bouira*

*Promoteur*

*Mr. KEBDANI Mohammed*

*MCB Univ. de Bouira*

*Examineur*

**Année Universitaire : 2018/2019**

# *Remerciements*

## *Remerciements*

*En tout premier lieu, nous remercions le bon dieu le tout puissant de nous avoir donné la force, l'audace pour dépasser toutes les difficultés, qui nous a doté de volonté, patience pour l'élaboration de ce travail.*

*La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui nous voudrions témoigner toute notre reconnaissance.*

*Nous tenons particulièrement à remercier notre promoteur et directeur de Mémoire Monsieur « **RAI Abdelwahab** » pour avoir accepté la charge d'être rapporteur de ce mémoire, nous le remercions pour sa disponibilité, ses pertinents conseils et pour les efforts qu'il a consenti durant la réalisation de ce mémoire. Ce travail témoigne de sa confiance et de son soutien dans les moments les plus difficiles. Qu'il trouve ici l'expression de notre reconnaissance et de notre respect.*

*Nous tenons également à remercier Mr **KEBDANI Mohammed** d'avoir accepté l'évaluation et l'examen de ce manuscrit et Mr. **LAMINE Salim** d'avoir accepté de présider le jury de notre soutenance.*

*Nous adressons nos vifs remerciements et notre profonde reconnaissance à monsieur Dr. **Sayah**, pour nous*

*avoir offert l'opportunité de réaliser une partie de notre mémoire au sein de son laboratoire d'analyses médicales. Sans oublier monsieur Djamel et madame Chabane pour leur aide, soutien et les précieuses informations qui nous ont prodigués avec intérêt et compréhensions.*

*Nos s'incères gratitudes à Mesdames Dr. Selmi et Dr. Bitouche, qui nous ont procurés le matériel nécessaire afin d'élaborer ce travail dans des conditions meilleurs.*

*Un remerciement particulier va à toutes les techniciennes de l'université Akli Mohand Oulhadj, Bouira. Pour leur aide qu'elles n'hésitèrent jamais à nos proposer dans les moments difficiles. Nous n'oublierons jamais qu'elles ne nos jamais refusé une demande ; nous les remercier du fond du cœur. Ainsi, nous ne pouvons oublier de remercier, monsieur le magasinier. Nous sommes ravies d'avoir connu une personne aussi humaine, aussi gentille et aussi agréable que lui.*

*Nous profitons par le biais de ce mémoire à remercier spécialement Mme Dr. Raaf Naima de l'hôpital de Bainem qui nous a fournis les souches de référence.*

*Nous tiendrons à remercier notre promotion de master II en microbiologie appliquée sans exceptions.*

# *Dédicaces*

## *Dédicace*

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...*

*Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude,*

*L'amour, le respect, la reconnaissance...*

*Aussi, c'est tout simplement que*

*Je dédie ce*

*Mémoire à...*

*Ma douce et tendre mère♥, le symbole de patriotisme, du courage, de la responsabilité et de l'amour. En témoignage de ses prières, sa bénédiction, sa patience et ses sacrifices. Que Dieux te garde, te comble de santé, et te donne longue vie.*

*Mon très cher papa♥, ce brave homme qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venant de toi. Dieu tout puissant te garde et te procure santé, bonheur et longue vie.*

*Mon très cher frère Sofiane♥ et sa femme Natacha♥ : Les mots n'arrivent pas à exprimer le respect, le remerciement, l'attachement, et l'amour que je vous porte, Je vous souhaite un avenir radieux et plein de bonheur.*

*Mon Adorable petit frère Hamza♥, qui m'a toujours aidée, écoutée, soutenue et encouragée tout au long de mon parcours ; celui qui a toujours été présent pour moi, je te dis tout simplement : je t'aime.*

*Ma très chère sœur bien aimée Leïla♥ et son mari Sofiane En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous. Que Je te dédicace travail avec tous mes vœux de bonheur et de santé.*

*Mes tendres petites princesses Kenza♥, Lyna♥ et Céline♥, ainsi qu'à mes adorables petits anges Iliane♥, Med amine♥ et Aylan♥ que DIEU vous protège et vous garde pour nous. Je vous souhaite une longue vie pleine de joie, de bonheur et toute la réussite.*

*Mes grands-parents, tous mes oncles, mes tantes, mes cousins et mes cousines pour leur soutien, leur amour et leur encouragement malgré leur distance.*

*Ma chère amie et mon binôme, Amina♥ d'avoir eu le courage d'achever ce travail malgré tout ce qu'elle a enduré.*

*Mes très chères copines " sœurs du cœur" : Cycy♥, Sarsoura♥, Midou♥, Doudy♥, Faty♥. Ce fut un bonheur immense de passer ces dernières années, entourée de vous. Je souhaite que notre amitié soit éternelle.*

*Chelkia hayat*

## *Dédicace*

*“ Dire merci donne un sens à notre passé, apporte la sérénité à notre présent et crée une vision positive du futur... ”*

*Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.*

*A ma mère ♥ qui m'a encouragé durant toutes mes études, et qui sans elle, ma réussite n'aura pas eu lieu. Qu'elle trouve ici mon amour et mon affection.*

*A mon père ♥, qui est toujours disponible pour nous, et prêt à nous aider, je lui confirme mon attachement et mon profond respect.*

*A l'homme, mon précieux offre du dieu, qui doit ma vie, mon amour et tout mon respect : mon cher mari Rafik♥ je t'adore♥.*

*A ma chère sœur Nadjma et son époux Hakim qui n'ont pas cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études. Que Dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur.*

*A mon adorable petite sœur Afrah qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille.*

*A mes très chers frères Abd'Errahim et Faiz qui m'avez toujours soutenu et encouragé durant ces années d'études.*

*A mes tantes et mes cousines que DIEU vous protège et vous garde pour nous.*

*A toute la famille de mon mari pour leurs soutiens et leurs encouragements.*

*Sans oublier mon binôme Hayet pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.*

*A tous mes amis qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de succès souma, Nanou, Mimi, Douly, Djidji, Faty.*

*A tous mes proches et à ceux qui me donnent de l'amour et de la vivacité.*

*A tous ceux que j'aime.*

*Merci!*

*Gueriani Amina*

# *Liste des abréviations*

## Liste des abréviations

**AFSSA** : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation.

**ARNm** : Acide Ribonucléique messenger.

**ARNt**: Acides Ribonucléiques de Transfert.

**ATB** : Antibiotique.

**ATCC** : American Type Culture Collection.

**BGN** : Bactéries Gram négatif.

**BGNnF** : Bactéries Gram Négatif non Fermentaires.

**BLSE** : Bêta-Lactamases à spectre Etendu.

**C1G** : Céphalosporines de première génération.

**G2G** : Céphalosporines de deuxième génération.

**DHF** : Dihydrofolat.

**DHPS** : Dihydroptéroate synthétase.

**DO** : Densité Optique.

**FQ** : Fluoroquinolones.

**HCL** : Acide Chlorhydrique.

**LB** : Luria-Bertani.

**MLS** : Macrolides-Lincosamides-Streptogramines.

**PABA** : Para-Aminobenzoic Acid.

**PLP** : Protéine de Liaison aux Pénicillines.

**TEM** : Temoniera

# *Liste des figures*

<b>Figure 01</b> : Schéma récapitulatif montre les différentes familles des antibiotiques avec leur cible.....	06
<b>Figure 02</b> : Les mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	11
<b>Figure 03</b> : Effet du sel (NaCl) sur la croissance de la souche <i>E.coli</i> ATCC 25922.....	22
<b>Figure 04</b> : Action de la Gentamycine sur la souche <i>E. coli</i> ATCC 25922 en absence et en présence de stress salin (NaCl) appliqué directement au milieu MH.....	23
<b>Figure 05</b> : Action de la Gentamycine sur la souche <i>E. coli</i> ATCC 25922 en absence et en présence de stress salin (NaCl) appliqué de façon précoce sur la culture bactérienne destinée à la réalisation de l'antibiogramme.....	24
<b>Figure 06</b> : Action de l'acide nalidixique et de Gentamycine sur la souche <i>E. coli</i> ATCC 25922 en absence et en présence de stress salin (NaCl) appliqué directement au milieu MH.....	25
<b>Figure 07</b> : Action de l'acide nalidixique sur la souche <i>E. coli</i> ATCC 25922 en absence et en présence de stress salin (NaCl) appliqué directement au milieu MH.....	26
<b>Figure 08</b> : Action de l'acide nalidixique sur la souche <i>E. coli</i> ATCC 25922 en absence et en présence de stress salin (NaCl) appliqué de façon précoce sur la culture bactérienne destinée à la réalisation de l'antibiogramme.....	27
<b>Figure 09</b> : Action de l'acide nalidixique et de la gentamycine sur la souche <i>E. coli</i> ATCC 25922 en absence et en présence de stress salin (NaCl) appliqué de façon précoce sur la culture bactérienne destinée à la réalisation de l'antibiogramme.....	27
<b>Figure 10</b> : Tolérance de la souche <i>E. coli</i> ATCC 25922 au milieu pH.....	28
<b>Figure 11</b> : Effet de la Gentamycine sur la souche <i>E.coli</i> ATCC 25922 sous stress dû au pH. Le stress appliqué directement au milieu MH.....	29
<b>Figure 12</b> : Effet de la Gentamycine sur la souche <i>E.coli</i> ATCC 25922 sous stress dû au pH. Le stress appliqué de façon précoce sur la culture bactérienne destinée à la réalisation de l'antibiogramme.....	30

<b>Figure 13</b> : Effet de l'acide nalidixique et de la Gentamycine sur la souche <i>E.coli</i> ATCC 25922 sous stress dû au pH. Le stress appliqué directement au milieu MH .....	30
<b>Figure 14</b> : Effet de l'acide nalidixique sur la souche <i>E.coli</i> ATCC 25922 sous stress dû au pH. Le stress appliqué directement au milieu MH .....	31
<b>Figure 15</b> : Effet de l'acide nalidixique sur la souche <i>E.coli</i> ATCC 25922 sous stress dû au pH. Le stress appliqué de façon précoce sur la culture bactérienne destinée à la réalisation de l'antibiogramme .....	32
<b>Figure 16</b> : Effet de l'acide nalidixique et de la Gentamycine sur la souche <i>E.coli</i> ATCC 25922 sous stress dû au pH. Le stress appliqué de façon précoce sur la culture bactérienne destinée à la réalisation de l'antibiogramme.....	32
<b>Figure 17</b> : Effet de (NaCl) sur la croissance de la souche <i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853.....	33
<b>Figure 18</b> : Action de la Gentamycine sur la souche <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 en absence et en présence de stress salin (NaCl) appliqué directement au milieu MH.....	34
<b>Figure 19</b> : Action de la Gentamycine sur la souche <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 en absence et en présence de stress salin (NaCl) appliqué de façon précoce sur la culture bactérienne destinée à la réalisation de l'antibiogramme .....	35
<b>Figure 20</b> : Action de la Cefotaxime et de la Gentamycine sur la souche <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 en absence et en présence de stress salin (NaCl) appliqué directement au milieu MH.....	36
<b>Figure 21</b> : Action de la Gentamycine sur la souche <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 en absence et en présence de stress salin (NaCl) appliqué directement au milieu MH.....	37
<b>Figure 22</b> : Action de la Cefotaxime sur la souche <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 en absence et en présence de stress salin (NaCl) appliqué de façon précoce sur la culture bactérienne destinée à la réalisation de l'antibiogramme .....	38
<b>Figure 23</b> : Effet de la Cefotaxime et de la Gentamycine sur la souche <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 sous stress salin. Le stress appliqué de façon précoce sur la culture bactérienne destinée à la réalisation de l'antibiogramme .....	38

<b>Figure 24</b> : Tolérance de la souche <i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853 au pH.....	39
<b>Figure 25</b> : Effet de la Gentamycine sur la souche <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 sous stress du au pH. Le stress est appliqué directement au milieu MH.....	40
<b>Figure 26</b> : Effet de la Gentamycine sur la souche <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 sous stress du au pH. Le stress appliqué de façon précoce sur la culture bactérienne destinée à la réalisation de l'antibiogramme .....	41
<b>Figure 27</b> : Effet de la Ceftazidime et de la Gentamycine sur la souche <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 sous stress du au pH.....	41
<b>Figure 28</b> : Effet de la Gentamycine sur la souche <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 sous stress dû au pH. Le stress est appliqué directement au milieu MH .....	42
<b>Figure 29</b> : Effet de la Gentamycine sur la souche <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 sous stress dû au pH. Le stress appliqué de façon précoce sur la culture bactérienne destinée à la réalisation de l'antibiogramme .....	43
<b>Figure 30</b> : Effet de la Ceftazidime et de la Gentamycine sur la souche <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 sous stress dû au pH. Le stress appliqué de façon précoce sur la culture bactérienne destinée à la réalisation de l'antibiogramme .....	44

# *Liste des tableaux*

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01</b> : Antibiotiques agissant sur la paroi .....	02
<b>Tableau 02</b> : Antibiotiques agissant sur la synthèse protéique .....	04
<b>Tableau 03</b> : Antibiotiques agissant sur la membrane cytoplasmique .....	04
<b>Tableau 04</b> : Antibiotiques agissant sur les acides nucléiques .....	05
<b>Tableau 05</b> : Antibiotiques agissant sur la synthèse de l'acide folique .....	05
<b>Tableau 06</b> : Mécanisme de résistance des principales classes d'antibiotiques.....	12
<b>Tableau 07</b> : Les antibiotiques utilisés.....	18

# *Sommaire*

## Sommaire

<b>Remerciements</b>	i
<b>Dédicace</b>	viii
<b>Liste des abréviations</b>	vii
<b>Liste des figures</b>	viii
<b>Liste des tableaux</b>	xi
<b>Introduction</b>	01
<b>Chapitre I : Synthèse bibliographique</b>	
<b>I. Antibiotiques</b>	02
1. Définition	02
2. Critères de classification	02
3. Principales familles d'antibiotiques	02
<b>II. Résistance aux antibiotiques</b>	06
1. L'origine génétique de la résistance et modalité de transfert génétique	07
1.1. Résistance naturelle	07
1.2. Résistance acquise	07
1.3. Résistance croisée et Co-résistance	07
2. Mécanismes génétiques de la résistance bactérienne	08
2.1. Mécanismes génétiques de la résistance acquise	08
2.2. Résistance par mutation chromosomique	08
2.3. Résistance extra-chromosomique	08
3. Mécanismes biochimiques de la résistance acquise	09
3.1. Diminution de la perméabilité membranaire	09
3.2. Pompe à efflux	10
3.3. Modification ou remplacement de la cible de l'antibiotique	10
3.4. L'inactivation enzymatique de l'antibiotique	11
<b>III. Problème de la résistance chez <i>Escherichia coli</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	13
1. <i>Escherichia coli</i>	13
2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
<b>Chapitre II : Matériel et Méthodes</b>	
<b>I. Souches bactériennes utilisées</b>	15
<b>II. Milieux de culture utilisés</b>	15

1.	<b>Gélose nutritive (GN)</b> .....	15
2.	<b>Mueller Hinton (MH)</b> .....	15
3.	<b>Luria Bertani (LB)</b> .....	15
<b>III.</b>	<b>Confirmation de l'identité des souches</b> .....	16
1.	<b>Repiquage</b> .....	16
2.	<b>Aspect macroscopique</b> .....	16
3.	<b>Coloration de Gram</b> .....	16
4.	<b>Recherche de la catalase</b> .....	16
5.	<b>Test urée-indole</b> .....	16
6.	<b>Test Citrate de Simomns</b> .....	17
<b>IV.</b>	<b>Halotolérance des souches</b> .....	17
<b>V.</b>	<b>Effet du pH sur la croissance des souches</b> .....	18
<b>VI.</b>	<b>Effet des antibiotiques sur les bactéries stressées</b> .....	18
1.	<b>Antibiotiques utilisés</b> .....	18
2.	<b>Protocol standard del'antibiogramme</b> .....	19
3.	<b>Antibiogramme sous stress salin</b> .....	19
3.1.	Stress appliqué aux cultures destinées à l'antibiogramme.....	19
3.2.	Stress appliqué directement au milieu de culture de l'antibiogramme .....	20
4.	<b>Antibiogramme sous stress dû au pH</b> .....	20
4.1.	Stress appliqué aux cultures destinées à l'antibiogramme.....	20
4.2.	Stress appliqué directement au milieu de culture de l'antibiogramme .....	21

### **Chapitre III : Résultats**

<b>I.</b>	<b>Résultats obtenus pour la souche <i>E.coli</i></b> .....	22
1.	<b>Halotolérance bactérienne et réponse aux antibiotiques</b> .....	22
1.1.	Halotolérance bactérienne .....	22
1.2.	Réponse des bactéries stressées aux antibiotiques .....	23
1.2.1.	Effet de la Gentamycine.....	23
1.2.2.	Effet de l'acide nalidixique .....	25
2.	<b>Tolérance au pH et réponse aux antibiotiques</b> .....	28
2.1.	Tolérance au pH .....	28
2.2.	Réponse des bactéries stressées aux antibiotiques .....	29
2.2.1.	Effet de la Gentamycine .....	29

2.2.2. Effet de l'acide nalidixique .....	31
<b>II. Résultats obtenus pour <i>P. aeruginosa</i></b> .....	<b>33</b>
<b>1. Halotolérance bactérienne et réponse aux antibiotiques</b> .....	<b>33</b>
1.1. Halotolérance bactérienne .....	33
1.2. Réponse des bactéries stressées aux antibiotiques .....	34
1.2.1. Effet de la Gentamycine .....	34
1.2.2. Effet de la Ceftazidime .....	36
<b>2. Tolérance au pH et réponse aux antibiotiques</b> .....	<b>39</b>
2.1. Tolérance au pH .....	39
2.2. Réponse des bactéries stressées aux antibiotiques .....	39
1.2.1. Effet de la Gentamycine .....	39
2.2.2. Effet de la Ceftazidim .....	42
<b>Chapitre IV : Discussion</b>	
<b>Discussion</b> .....	<b>45</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>50</b>
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Résumé</b>	
<b>Abstract</b>	
<b>ملخص</b>	

# *Introduction*

## Introduction

Toute substance chimique produite par des micro-organismes ayant le pouvoir d'inhiber et même de détruire les bactéries et autres micro-organismes est définie comme antibiotique (**Hervé, 2011**). De telles substances ont soit une origine naturelle s'ils sont extraits d'organismes vivants, soit issues d'une synthèse chimique totale ou partielle. Leur effet est déterminé par leurs structures chimiques, l'organisme en face et l'environnement de ce dernier (**Madigan et Martinko, 2007**).

Les antibiotiques ont, depuis longtemps, été utilisés pour le traitement des maladies infectieuses d'origine bactérienne. Leur histoire a commencé avec l'introduction de la pénicilline au cours des années quarante du siècle passé (**Boerlin et White, 2006 ; Harbottle et al., 2006**). Cependant, l'adaptation des microorganismes, de façon progressive à ce genre de molécules a obligé les scientifiques à poursuivre le chemin des travaux visant à cribler, identifier et produire de nouvelles molécules antibiotiques (**Matyara et al., 2008**). L'apparition menaçante et continue des résistances bactériennes aux antibiotiques n'est pas uniquement due à la forte pression de sélection exercée par l'utilisation excessive des antibiotiques, mais aussi aux changements climatiques et à la mauvaise posologie lors des traitements appliqués faces aux agents pathogènes (**Staley et al., 2007**).

Dans ce contexte, ce travail est réalisé dans l'objectif d'étudier l'effet du stress environnemental, précisément celui dû au pH et au sel, sur le comportement des microorganismes vis-à-vis à quelques substances antibiotiques. Pour ceci, deux bactéries Gram négatif de référence (*E. coli* ATCC 25922 et *P. aeruginosa* ATCC 27853) et trois antibiotiques auxquels les bactéries choisies sont sensibles (Gentamycine, Acide nalidixique et Ceftazidime) ont été choisis.

Le travail est une initiation à l'étude du comportement des bactéries stressées, ou provenant d'un état de stress, une fois en contact avec des molécules antibiotiques. Ainsi, plusieurs concentrations de sel (0, 200, 400, 800 et 1000 mM) et plusieurs pH (4.5, 6, 7.3, et 11) ont été appliqués pour produire un état de stress aux microorganismes étudiés. Le stress a été appliqué de deux façons différentes :

1. De façon précoce sur les cultures bactériennes destinées à la réalisation de l'antibiogramme.
2. Directement dans le milieu de culture pendant la réalisation de l'antibiogramme.

*Chapitre I*  
*Synthèse*  
*bibliographique*

## I. Antibiotiques

Depuis l'introduction de la pénicilline au cours des années quarante du siècle passé, un grand nombre d'agents antibactériens a été développé et commercialisé à des fins thérapeutiques, réduisant ainsi la morbidité et la mortalité humaine importantes associées aux infections bactériennes observées avant « l'ère des antibiotiques » (**Boerlin et White, 2006 ; Harbottle et al., 2006**).

### 1. Définition

Un antibiotique est défini comme toute substance chimique produite par des micro-organismes ayant le pouvoir d'inhiber et même de détruire les bactéries et autres micro-organismes (**Hervé, 2011**). Les antibiotiques ont une origine naturelle s'ils sont extraits d'organismes vivants. Ils peuvent aussi être obtenus par synthèse chimique totale ou partielle (**Madigan et Martinko, 2007**). Chaque antibiotique possède un mode d'action spécifique et une cible bien déterminée. En fonction de leur concentration et du temps de contact avec les bactéries, ils peuvent être bactéricides ou bactériostatiques (**Madigan et Martinko, 2007**).

### 2. Critères de classification

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères : l'origine, la nature chimique, le spectre d'activité et le mécanisme d'action (**Yala et al., 2001**). Selon leur mode d'action, les antibiotiques sont classés en 5 groupes.

### 3. Principales familles d'antibiotiques

**Tableau 01** : Antibiotiques agissant sur la paroi (**Nauciel et Vildé, 2005**).

Famille	Groupe	Exemple d'antibiotiques	Mode d'action
<b><math>\beta</math>-lactamines</b>	Pénames	Ampicilline Amoxicilline Carbénicilline	Ils agissent sur la synthèse du peptidoglycane en inhibant les protéines liant la pénicilline (PLP). Les PLP ont une activité transpeptidasique,
	Pénèmes	Imipénème Méropénème Ertapénème	
	Oxapénamesou clavams (acide	Amoxicilline Acide clavulanique Ticarcilline	

	clavulanique	Acide clavulanique	carboxypeptidasique et transglycolasique.
	Céphèmes	Céfazoline Céfoxitine Céftriaxone	L'inhibition des PLP aboutit à l'inhibition de la formation des ponts pentacycliques responsables de la structure réticulée de la paroi. On obtient ainsi des formes rondes ou filamenteuses qui aboutissent à la lyse bactérienne.
	Monobactames	Aztréonam	
<b>Glycopeptides</b>		Vancomycine Teicoplanine	Ils bloquent la polymérisation du peptidoglycane en se fixant sur la partie DAla-D-Ala terminale des peptides impliqués dans la phase de polymérisation du peptidoglycane.
<b>Non classé</b>		Fosfomycine	Elle se fixe sur une enzyme impliquée dans la formation de l'acide N-acétylmuramique qui est l'un des précurseurs du peptidoglycane.

**Tableau 02** : Antibiotiques agissant sur la synthèse protéique

<b>Famille</b>	<b>Antibiotiques</b>	<b>Mode action</b>
<b>Aminosides</b>	Streptomycine Kanamycine Gentamicine	Ils se fixent sur la Sous unité 30S du ribosome ou ils s'interfèrent avec la synthèse des protéines ( <b>Singleton, 2005</b> ).
<b>Macrolides- Lincosamides- Streptogramines (MLS)</b>	Spiramycine Lincomycine Pristinamycine	Ils agissent au niveau de la S/unité 50S du ribosome. Ils inhibent la croissance de la chaîne polypeptidique en formation ( <b>Yala et al. ,2001</b> ).
<b>Tetracyclines</b>	Chloramphénicol Thiamphénicol	Inhibition de la peptidyl-transférase, en se fixant sur la sous- unité 50S du ribosome bactérien ( <b>Wareham et Wilson, 2002</b> )
<b>Phénicolés</b>	Chloramphénicol Thiamphénicol	Inhibition de la peptidyl-transférase, en se fixant sur la sous- unité 50S du ribosome bactérien ( <b>Wareham et Wilson, 2002</b> )
<b>Oxazolidinones</b>	Linézolide	Ils se fixent sur la sous unité ribosomale 50S et empêche sa liaison à la sous unité 30S ( <b>Nauciel et Vildé, 2005</b> ).

**Tableau 03** : Antibiotiques agissant sur la membrane cytoplasmique

<b>Famille</b>	<b>Antibiotiques</b>	<b>Mode d'action</b>
<b>Polymixines</b>	Polymixine B Colistine	Elles se fixent sur les phospholipides, et perturbent ainsi les transferts transmembranaires de nutriments et inhibent les phosphorylations oxydatives du métabolisme énergétique ( <b>Fauchère et Avril, 2002</b> ).

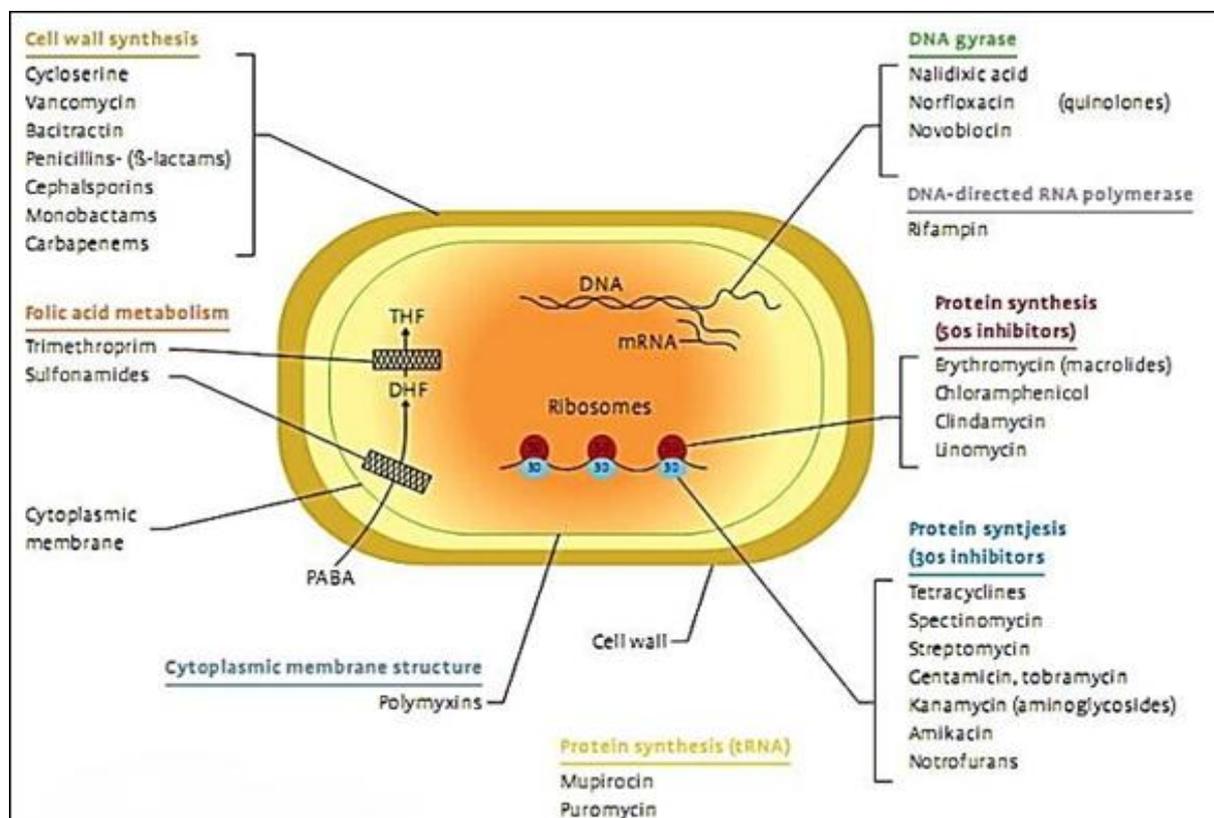
**Tableau 04** : Antibiotiques agissant sur la synthèse des acides nucléiques

<b>Famille</b>	<b>Antibiotiques</b>	<b>Mode d'action</b>
<b>Quinolones et Fluoroquinolons</b>	Acide nalidixique, Acide pipémidique, Acide oxolinique Fluméquine.	Ils agissent sur deux enzymes impliquées dans cette synthèse: ADN gyrase (cible principale des BGN) il forme un complexe ADN gyrase-Quinolones qui va bloquer la progression de l'ADN polymérase bactérienne au cours de la réplication ADN topo- isomérase IV L'interaction entre l'ADN, quinolone et topoisomérase stimule la coupure de l'ADN et inhibe la relégation. <b>(Hooper, 2002)</b>
	Péfloxacin Ofloxacin Norfloxacin Ciprofloxacine	
<b>Rifamycines</b>	Rifamycine Rifamycine SV	Inhibition de la transcription de l'ADN en ARNm par inhibition de l'ARN polymérase. <b>(Nauciel et Vildé, 2005)</b>
<b>Nitrofuranes</b>	Nitrofurantoïne Furazolidone Nifuroxazide	Elles agissent directement sur l'ADN provoquant diverses lésions (coupures et substitution de bases) <b>(Nauciel et Vildé, 2005).</b>

**Tableau 05** : Antibiotiques agissant sur la synthèse de l'acide folique

<b>Famille</b>	<b>Antibiotiques</b>	<b>Mode d'action</b>
<b>Sulfamides</b>	Sulfaméthoxazole Sulfaméthizole Sulfaguandine	Inhibent la synthèse des folates, agissent en compétition avec le PABA pour le site actif, la dihydroptéroate synthétase (DHPS) qui catalyse une réaction essentielle à la synthèse de l'acide tétrahydrofolique (DHF) nécessaire à la production des purines et pyrimidines pour la synthèse de l'acide nucléique <b>(Lambert, 1995).</b>
<b>2-4 diaminoptéridine</b>	Triméthoprime	Inhibent la synthèse des folates, en se fixant sur la dihydrofolate réductase <b>(Veysier, 1999).</b>

<b>Sulfamides+ Trimethopme</b>	Sulfaméthoxazole+ Trimethoprim (Cotrimoxazole)	Agit sur les deux enzymes précédentes <b>(Veysier, 1999).</b>
------------------------------------	--	--



**Figure 01** : Schéma récapitulatif montre les différentes familles des antibiotiques avec leur cible (Madigan *et al.*, 2000).

## II. Résistance aux antibiotiques

L'exposition d'une bactérie à un antibiotique tôt ou tard conduit à l'apparition d'un mécanisme de résistance (Alaoui *et al.*, 1999).

Le phénomène de la résistance bactérienne constitue aujourd'hui l'une des plus graves menaces pesant sur la santé mondiale. Elle atteint désormais des proportions dangereuses dans toutes les régions du monde. Chaque jour, de nouveaux mécanismes de résistance voient le jour et se propagent à l'échelle mondiale, compromettant notre capacité de traiter les maladies infectieuses les plus courantes (OMS, 2014 ; OMS, 2015).

## 1. L'origine génétique de la résistance et modalité de transfert génétique

La résistance bactérienne à un antibiotique est d'origine génétique. Les gènes de la résistance se trouvent soit dans le chromosome (résistance chromosomique). Soit dans des éléments mobiles, comme plasmides, éléments transposables ou intégrons (résistance extra-chromosomique). La résistance peut être soit naturelle, soit acquise (**Mandell *et al.*, 2009**).

### 1.1. Résistance naturelle

Les gènes de résistance font partie du patrimoine génétique de la bactérie. La résistance naturelle est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce (**Courvalin *et al.*, 2001**). Ce type de résistance est détecté dès les premières études réalisées sur l'antibiotique afin de déterminer son activité et contribue à définir son spectre antibactérien. Ceci peut être dû à l'absence de la cible (comme l'absence de paroi chez les mycoplasmes les rendant insensibles aux bêta-lactamines) ou encore à l'absence de pénétration de l'antibiotique (rôle de la membrane externe par exemple chez les bactéries Gram négatif avec la vancomycine) (**AFSSA, 2006**).

La résistance bactérienne naturelle est permanente et d'origine chromosomique. La résistance naturelle est stable, transmise à la descendance (transmission verticale) lors de la division cellulaire, mais elle n'est généralement pas transférable d'une bactérie à l'autre (transmission horizontale) (**Messai, 2006**).

### 1.2. Résistance acquise

La résistance acquise est un caractère qui ne concerne que quelques souches d'une espèce donnée. Elle est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérien, par l'acquisition des nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique ou à un groupe d'antibiotique (**Yala *et al.*, 2001 ; Sylvie-Carle, 2009**). Ce nouveau gène peut être obtenu soit par mutation au niveau du chromosome (plutôt rare) (**Chopra *et al.*, 2003**), ou par l'acquisition d'ADN étranger par le biais de plasmides (plutôt fréquent), de bactériophages ou de transposons (**Davies, 1997**).

### 1.3. Résistance croisée et Co-résistance

La résistance croisée résulte d'un seul mécanisme biochimique et concerne des antibiotiques appartenant à la même famille (**Galiman *et al.*, 2005**). La Co-résistance est liée

à plusieurs mécanismes (plusieurs gènes de résistance impliqués) et concerne des antibiotiques appartenant à différentes familles (**Courvalin, 2008**).

## 2. Mécanismes génétiques de la résistance bactérienne

### 2.1. Mécanismes génétiques de la résistance acquise

Le potentiel génétique d'une bactérie est constitué d'une part d'un génophore obligatoire, le chromosome et d'autre part d'un ou de plusieurs génophores facultatifs et extra-chromosomiques, les plasmides. Des gènes sont également portés par des éléments génétiques transposables et par des intégrons. Une bactérie peut ainsi acquérir une résistance aux antibiotiques par deux grands mécanismes génétiques. L'un a pour support le chromosome et définit une résistance chromosomique, l'autre a pour support les plasmides ou les éléments transposables ou les intégrons et ils définissent une résistance extra-chromosomique (**Tigaud, 2000**).

### 2.2. Résistance par mutation chromosomique

Les résistances bactériennes par mutation chromosomique sont induites par des modifications structurales pouvant se traduire soit par un problème de perméabilité à un ou plusieurs antibiotiques, soit en rendant les cibles spécifiques des antibiotiques indifférentes.

La résistance chromosomique est un phénomène qui présente plusieurs caractères exceptionnels. Il s'agit premièrement de sa rareté puisqu'il intervient en moyenne tous les 10<sup>5</sup> à 10<sup>10</sup> divisions de la bactérie (**Pallasch, 2003**). Ensuite elle possède un caractère aléatoire car l'antibiotique n'est par une molécule mutagène donc n'induit pas de mutation chez la bactérie. Cependant l'antibiotique participe à la sélection des bactéries mutantes. On note aussi son caractère spécifique (affecte un antibiotique ou une famille d'antibiotiques qui ont le même mécanisme d'action), son indépendance et son absence de transmissibilité (**Baudry, 2006**).

### 2.3. Résistance extra-chromosomique

La résistance aux antibiotiques acquise par les bactéries est principalement due à la présence de trois types d'éléments extra-chromosomiques portant des gènes de résistance : les plasmides, les transposons et les intégrons (**Bennett, 2008 ; Martinez, 2009 ; Walsh, 2006**). Ces derniers constituent un système de capture et d'expression de gènes contenus dans des

cassettes. Les cassettes sont des éléments mobiles capables d'être intégrés ou excisés par un système de recombinaison spécifique de site médié par une intégrase. Les intégrons ne sont pas mobiles par eux-mêmes ; ils sont incapables d'autoréplication et sont généralement portés par des plasmides ou des transposons (**Fluit et Schmitz, 2004 ; Faure, 2009**).

Les bactéries utilisent trois mécanismes principaux de transfert horizontal d'éléments génétiques entre bactéries d'une même espèce ou d'espèces et de genres différents, à savoir la conjugaison (transfert direct entre deux bactéries ayant établi temporairement un contact physique), la transformation (transfert d'ADN nu) et la transduction (transport d'ADN bactérien par des bactériophages) (**Doublet et al., 2012**).

### 3. Mécanismes biochimiques de la résistance acquise

Une souche bactérienne est dite résistante à un antibiotique quand elle est capable de se développer en présence d'une concentration élevée de cet antibiotique (**Lavigne, 2007**). Alors ces micro-organismes ont développé trois types de mécanismes de résistance.

#### 3.1. Diminution de la perméabilité membranaire

L'imperméabilisation est un phénomène observé chez les bactéries à coloration de Gram négative. La structure même de leur paroi et plus particulièrement la présence d'éléments dédiés à la pénétration de molécules exogènes est à l'origine de ce type de résistance. La perméabilité membranaire intervient dans le contrôle de la concentration de différentes classes d'antibiotiques comme les  $\beta$ -lactamines ou les quinolones via l'expression des porines ou des transporteurs-pompes (**Alekshun et Levy, 1999 ; Delilhas et Forest, 2001**).

Les structures en cause sont les porines (*Omp* ou *Opr*) qui sont des canaux aqueux ou hydrophiles constitués de trois molécules de protéines qui laissent diffuser diverses molécules de faible masse moléculaire comme des substrats ou encore des antibiotiques. Le dysfonctionnement ou la perte de l'une d'entre elles peut entraîner une augmentation de CMI de divers antibiotiques

Dans plusieurs bactéries, la disparition des porines fait intervenir l'opéron *mar*, qui, via le petit ARN antisens *micF*, déstabilise l'ARNm de la porine et ce, conjointement à l'expression des pompes d'efflux (**Hancock, 1997 ; Nikaido, 1996**).

### 3.2. Pompe à efflux

Acquisition ou surproduction des pompes efflux peuvent expulser l'antibiotique hors de la cellule même contre le gradient de concentration (**Pieboji, 2007**). Chez les bactéries à Gram-négatif, l'imperméabilité de la membrane externe et les pompes à efflux jouent en synergie un rôle important dans la résistance intrinsèque de ces bactéries. Les mutations ou/et les modifications inductibles de ces mécanismes peuvent conduire à une diminution de l'afflux et l'augmentation de l'efflux des antibiotiques, ainsi d'empêcher l'accès des antibiotiques à leur cibles. Toutefois, les niveaux de résistance conférés par ces mécanismes devraient être faibles, mais ils sont renforcés par l'interaction entre les mécanismes non enzymatiques et enzymatiques (par production de  $\beta$ -lactamases) (**Li et al., 2007**).

La première pompe à efflux qui a été rapportée était responsable de la résistance à la tétracycline en 1980 (**McMurry et al., 1980**). Depuis, cinq familles différentes de pompes à efflux ont été identifiées sur la base de la similarité en séquence. Ce sont les MATE (multi drug and toxic compound extrusion), MFS (major facilitator super family), SMR (staphylococcal multi résistance), RND (resistance-nodulation-cell division proteins) et ABC (ATP-binding cassette) (**Krulwich et al., 2005**).

### 3.3. Modification ou remplacement de la cible de l'antibiotique

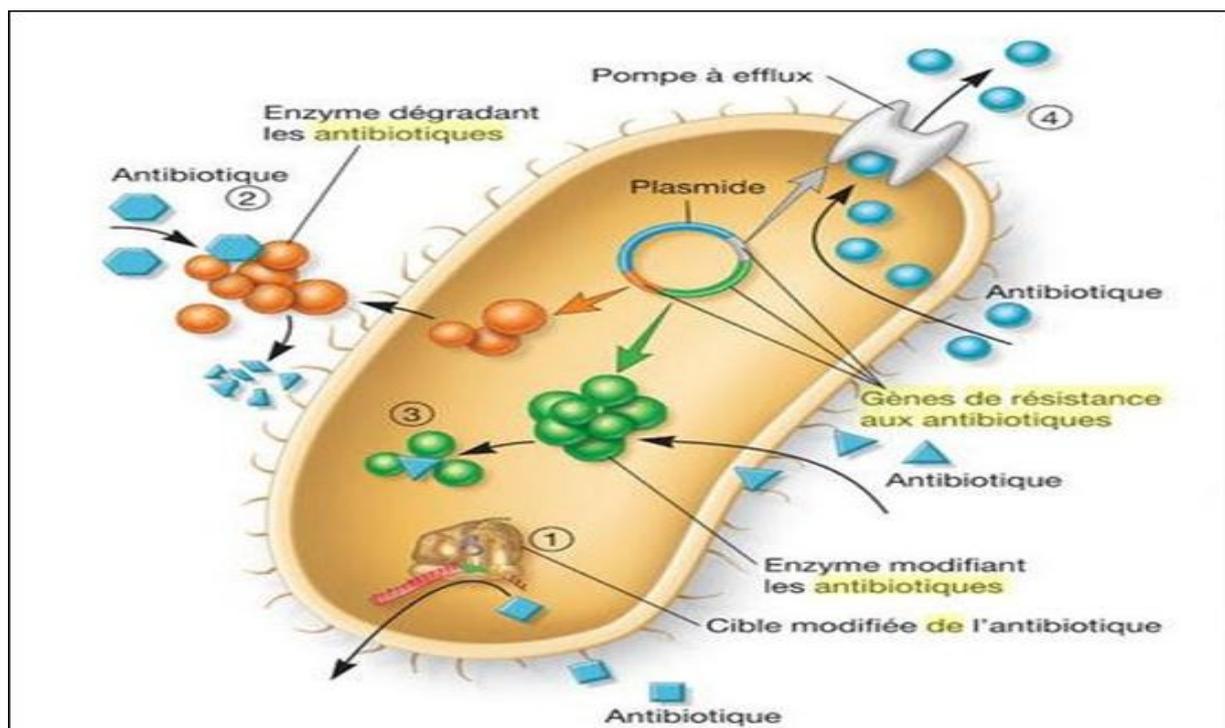
La cible de l'antibiotique peut être structurellement modifiée ou remplacée, de telle sorte que le composé antibactérien ne puisse plus se lier et exercer son activité au niveau de la bactérie. La modification de la cible, mécanisme de résistance décrit pour presque tous les antibiotiques, est particulièrement importante pour les résistances aux pénicillines, aux glycopeptides et aux molécules du groupe MLS chez les bactéries Gram positives, et pour les résistances aux quinolones chez les bactéries Gram positives et Gram négatives (**Spratt et al., 1989**).

Ce type de résistance peut être la conséquence de l'acquisition de matériel génétique mobile codant pour une enzyme modifiant la cible de l'antibiotique, ou peut résulter d'une mutation au niveau de la séquence nucléotidique de la cible. Le remplacement de la cible de l'antibiotique est, quant à lui, un mécanisme décrit pour les sulfamidés, les diaminopyrimidines (triméthoprime) et les bêta-lactames (**Guardabassi et Courvalin, 2006**; **Alekshun et Levy, 2007** ; **Nikaido, 2009**).

### 3.4. L'inactivation enzymatique de l'antibiotique

Représente le principal mécanisme de résistance des bêta-lactames, des aminoglycosides et des phénicolés. On décrit également ce type de résistance pour le groupe MLS (macrolides, lincosamides, streptogramines), pour les tétracyclines, pour la fosfomycine et plus récemment pour les fluoroquinolones, bien que cette inactivation ne représente pas le mécanisme de résistance qui prévaut pour ces molécules.

L'enzyme en modifiant le noyau actif de l'antibiotique par clivage ou par addition d'un groupement chimique, empêche la fixation de l'antimicrobien sur sa cible et provoque une perte d'activité. Parmi les réactions biochimiques catalysées par ces enzymes bactériennes, on peut citer des hydrolyses, des acétylations, des phosphorylations, des nucléotidylations, des estérifications, des réductions et des réactions d'addition d'un glutathion. Ces enzymes sont généralement associées à des éléments génétiques mobiles (**Guardabassi et Courvalin, 2006 ; Alekshun et Levy, 2007 ; Nikaido, 2009**).



**Figure 02** : Les mécanismes de résistance aux antibiotiques (**Presscot, 2018**). Les bactéries peuvent résister à l'action des antibiotiques (1) en empêchant l'accès à la cible de l'antibiotique (ou en la modifiant), (2) en dégradant l'antibiotique, (3) en modifiant l'antibiotique, ou (4) en éjectant rapidement l'antibiotique.

**Tableau 06** : Mécanisme de résistance des principales classes d'antibiotiques (**Dellit et al., 2007 ; Avorn et al., 2011**).

<b>Antibiotiques</b>	<b>Résistance Chromosomique</b>	<b>Résistance extra-Chromosomique</b>
<b>Aminosides</b>	Diminution de la perméabilité, Modification de la cible (protéine S12 sous-unité 30S).	Inactivation par acétyltransférases.
<b>Bétalactamines</b>	Diminution de la perméabilité, Diminution de l'affinité des PLP Diminution de la synthèse des PLP Inactivation enzymatique par des céphalosporinases.	Inactivation par diverses b- lactamases ou carbapénémase.
<b>Bétalactamines est inhibiteurs de bétalactamase</b>	Inactivation par des céphalosporinase chromosomiques.	Inactivation par b- lactamases Hyperproduction et b- lactamases résistantes aux inhibiteurs.
<b>Glycopeptides</b>		Modification de la cible, Diminution de l'affinité, 6 genes de résistance identifiés (VanA, VanB ,etc)
<b>Macrolides</b>		Méthylation du ribosome bactérien (ARN23S).
<b>Choromphénicol</b>	Diminution de la perméabilité.	Efflux actif, Inactivation par acétyltransférases.
<b>Quinolones</b>	Modification de la cible ADN- gyrase ou topoisomérase IV (gène <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> ou par <i>C</i> ) par mutation spontanée, Diminution de la perméabilité.	
<b>Rifampicine</b>	Modification de la cible (ARN polymérase ADN dépendant).	

<b>Sulfamides</b>	Diminution de la perméabilité, Modification par mutation de la dihydroptéroate synthétase.	Diminution de la perméabilité, Modification par mutation de la dihydroptéroate synthétase.
<b>Tétracyclines</b>	Diminution de la perméabilité.	Efflux actif spécifique.
<b>Triméthoprime</b>	Diminution de la perméabilité, Mutation par de dihydrofolate réductase.	Dihydrofolate réductase additionnelle insensible au triméthoprime.

### III. Problème de résistance chez *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginos*

La résistance aux antibiotiques s'est principalement développée durant les 50 dernières années par l'utilisation répandue et fréquente des antibiotiques favorisant une pression de sélection (Matyara *et al.*, 2008).

Plusieurs mécanismes de résistance ont été mis en évidence chez les bacilles Gram négatif qui sont, par ailleurs, responsables de la majorité des infections hospitalières (60 %) et sont de plus en plus multirésistants (Bolla *et al.*, 2011).

#### 1. *Escherichia coli*

En 1885, l'allemand Theodor Escherich décrit pour la première fois la bactérie *Escherichia coli* (Cowan *et al.*, 1954). C'est le germe le plus fréquemment impliqué en pathologie infectieuse (Lavigne *et al.*, 2002). Il possède des propriétés particulières (pouvoir d'adhésion, production de toxines etc.) nécessaires au pouvoir infectieux (Joly et Reynaud, 2002). *E. coli* est responsable d'infections diverses telles que les infections urinaires communautaires (Fabre *et al.*, 2010 ; Mouy *et al.*, 2007 ; Neuzillet *et al.*, 2012), les infections abdominales, les infections intestinales (Fauchère et Avril, 2002), il est également responsable des infections des plaies chirurgicales et des bactériémies (Alain et Bernard, 2002).

*Escherichia coli* présente une résistance naturelle à : aminopénicillines, C1G, C2G, Macrolides, Lincosamides et Streptogramines (MLS), glycopeptides et une résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines par production de  $\beta$ -lactamases (TEM, BLSE), aux Fluoroquinolones (FQ) et aux sulfamides (cotrimoxazole) (El bouamri *et al.*, 2014). Le principal mécanisme de

résistance des entérobactéries vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines est enzymatique. Ces résistances peuvent être chromosomiques ou acquise.

## 2. *Pseudomonas aeruginosa*

Les bacilles à Gram négatif non fermentant (BGNnF) sont des bactéries aérobies strictes qui se développent habituellement sur milieu ordinaire et qui sont caractérisées par un mode de production énergétique ne faisant pas intervenir la fermentation (**Richard et al., 1995**). Environ 15 % de tous les bacilles Gram négatif se développant en aérobiose, sont des non fermentaires (**Richard et al., 1995**). Ce sont des bactéries ubiquitaires retrouvées dans l'environnement (sols, eaux...) (**Berthelot et al., 2005**).

*P. aeruginosa*, communément appelé bacille pyocyanique, est l'espèce type du genre *Pseudomonas* (**Richard et Kiredjian, 1995**). C'est une bactérie présentant une réaction positive au test de cytochrome-oxydase ainsi qu'à la catalase.

*P. aeruginosa* être responsables d'infections cliniques. Elles sont dites pathogènes opportunistes car, bien que pouvant être isolées d'infections communautaires, elles sont le plus souvent responsables d'infections nosocomiales (**Berthelot et al., 2005**).

*P. aeruginosa* possède une résistance naturelle à de nombreuses classes d'antibiotiques et une facilité à développer des résistances par mutation chromosomique ou par acquisition horizontale de gènes de résistance sur plasmides, transposons, ou intégrons. Les souches de cette espèce ont deux mécanismes différents qui justifient leur résistance naturelle :

- ✓ Une induction chromosomique de bêta-lactamase *Amp C* qui la rend résistante à ampicilline, amoxicilline, amoxicilline-acide clavulanique et élargi ce spectre aux céphalosporines, céfotaxime et ceftriaxone
- ✓ Les systèmes de pompe à efflux (**Murray et al., 2007**)

*Chapitre II*  
*Matériel et Méthodes*

Le travail a été réalisé au niveau du laboratoire pédagogique du département des sciences biologiques de la faculté SNVST-Université de Bouira. Il a été mené durant la période allant d'Avril à juillet 2019. L'objectif du travail était de mettre en évidence tout effet possible du stress abiotique, particulièrement le pH et la salinité, sur le comportement des bactéries vis-à-vis d'antibiotiques habituellement utilisés comme traitement des infections qui leurs associées.

### **I. Souches bactériennes utilisées**

Dans le cadre de ce travail, deux souches bactériennes de référence, fournis par le service de microbiologie de l'hôpital Baïnem ont été utilisées, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

### **II. Milieux de culture utilisés**

#### **1. Gélose nutritive (GN)**

- Peptone tryptique .....15g
- NaCl.....5g
- Extrait de viande.....10g
- Agar .....15g
- Eau distillée.....1000ml

#### **2. Mueller Hinton (MH)**

- Infusion de viande de bœuf .....2 g
- Amidon .....15 g
- Hydrolysate de caséine .....17.5g
- Agar .....17g
- Eau distillée .....1000 ml

#### **3. LuriaBertani (LB)**

- Tryptone : .....10g
- Extrait de levure : .....5g
- Sodium de chlorure : .....10g
- Eau distillée : .....1000m

### III. Confirmation de l'identité des souches

#### 1. Repiquage

L'ensemencement des souches a été effectué par la méthode de stries serrées à la surface de la gélose nutritive, l'incubation a été faite à 37°C pour une durée de 24 heures. Les colonies sont repiquées sur le même milieu, jusqu'à confirmation de leur pureté.

#### 2. Aspect macroscopique

L'aspect macroscopique des colonies obtenues est comparé à celui de nos souches (Aspect déjà connu dans la littérature).

#### 3. Coloration de Gram

La coloration a été réalisée selon le protocole cité dans (**Prescott, 2009**).

#### 4. Recherche de la catalase

L'enzyme catalase est présente chez beaucoup de bactéries aérobies ou aéro-anaérobies et souvent absentes chez les bactéries anaérobies. Ce test a été réalisé selon le protocole de **Benyoub (2011)**.

##### 4.1. Technique

- ✓ Sur une lame stérile on dépose une goutte de la solution de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sur laquelle on ajoute une colonie bactérienne.
- ✓ Une réaction positive se traduit par l'apparition de bulles, suite au dégagement gazeux d'oxygène.

#### 5. Test urée-indole

C'est un test utilisé pour confirmer l'identité de la souche *E. coli*. Le milieu de culture permet en 24 h de réaliser deux tests biochimiques : Le test uréase et le test indole. Ils permettent l'identification des germes, particulièrement les entérobactéries. Après addition du réactif de Kovacs, ce dernier réagit avec l'indole, et forme un anneau rouge (**Meziani, 2012**).

### 5.1. Technique

- ✓ Inoculer avec quelques colonies bactériennes le milieu urée-indole et l'incuber pendant 24h à 37°C.
- ✓ Après 24h ajouter quelques gouttes de réactif de Kovacs.
- ✓ Le milieu reste inchangé : couleur orange, test négatif.
- ✓ Le milieu devient rose/rouge : test positif
- ✓ Apparition de l'anneau rouge : indole+

## 6. Test Citrate de Simmons

C'est un test utilisé pour confirmer l'identité de la souche *P. aeruginosa*, il permet de déterminer sa capacité à utiliser le citrate de sodium comme seule source de carbone. Les souches d'*Escherichia coli* n'utilisent pas le citrate comme seule source de carbone, par contre, *Pseudomonas* utilisent le citrate comme seule source de carbone et entraînent une alcalinisation du milieu, d'où le virage du vert au bleu.

### 6.1. Technique

- ✓ Ensemencer la pente du milieu avec une colonie bactérienne par une strie médiane, puis incuber pendant 24h à 37°C (Acharya, 2013).

## IV. Halotolérance des souches

L'halotolérance des souches sélectionnées a été étudiée en utilisant le milieu de culture riche LuriaBertani (LB).

Dans un premier temps, l'expérience a été réalisée en utilisant le milieu de culture LB préparé en absence de sel. Par la suite la même expérience a été répétée en présence de différentes concentrations de salinité de 200 mM à 1000 mM (200 ; 400 ; 800 et 1000 mM).

L'expérience a été conduite dans des tubes fermés. Chaque tube servira à inoculer 5ml du milieu avec 200 µL de la suspension bactérienne (0.5 Mac Farland). Enfin, les tubes sont incubés à 37 °C pendant 24 h.

La lecture est réalisée, par mesure de la densité optique (DO) à 620 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (OPTIZEN®).

## V. Effet du pH sur la croissance des souches

Pour déterminer l'effet du pH sur la croissance souches, le milieu LB liquide est préparé à une gamme de pH allant de 4.5 à 11 (4.5; 6 ; 7.3; 8.5 et 11).

L'expérience a été conduite dans des tubes fermés. Chaque tube servira à inoculer 5ml du milieu avec 200 µl de la suspension bactérienne (0.5 Mac Farland). Enfin, les tubes sont incubés à 37 °C pendant 24 h et la lecture est réalisée par mesure de la densité optique à 620 nm.

## VI. Effet des antibiotiques sur les bactéries stressées

Afin de déterminer l'effet des substances antibactériennes sur les souches bactériennes *E. Coli* ATCC 25922 et *P. aeruginosa* ATCC 27853 sous stress salin et de pH, Quatre antibiotiques commercialisés ont été choisis. Le choix des antibiotiques a été fait en fonction des profils de résistance des deux souches aux antibiotiques. L'idée est que l'antibiotique doit être enregistré comme efficace contre la souche afin de percevoir le changement dans l'interaction bactérie-antibiotique sous stress. Ainsi, deux antibiotiques ont été choisis pour chaque souche (un antibiotique commun : la gentamycine ; un antibiotique pour la souche *E. coli* : acide nalidixique et un antibiotique pour la souche *P. aeruginosa* : Ceftazidime).

### 1. Antibiotiques utilisés

Les antibiotiques utilisés dans le cadre de ce travail sont sous forme des disques commerciaux à différentes concentrations. Le nom, la famille et la charge du disque sont représentés dans le tableau 07 :

**Tableau 07** : les antibiotiques utilisés.

Antibiotiques	Charge (µg)	Famille
Gentamycine	10	Aminoglycoside
Ceftazidime	30	Céphème
Acide nalidixique	30	Quinolone

## 2. Protocole standard de l'antibiogramme

### 2.1. Principe

C'est une technique d'affrontement entre la bactérie à tester et l'antibiotique en question. Elle est réalisée sur milieu solide, communément le milieu Muller Hinton, en se servant de disques en papier imprégné de l'antibiotique à une concentration connue. Le principe en est de laisser diffuser l'antibiotique dans la gélose pendant la culture bactérienne. Un antibiotique efficace produit une zone d'inhibition où la bactérie est inapte à pousser (**CA-SFM, 2019**).

### 2.2. Technique

A partir d'une culture pure de 24 h sur milieu GN une suspension bactérienne est préparée à une charge de 0,5 Mac Farland (~ 108 UFC/ml). A partir de cette suspension bactérienne, bien homogénéisée. La suspension a étéensemencée par écouvillonnage sur des boîtes de Pétri gélosées en Mueller-Hinton préparé selon la composition décrite dessus (**CA-SFM, 2019**).

### 2.3. Application des disques d'ATB

Les disques d'antibiotiques correspondant ont été appliqués à l'aide d'une pince métallique stérile en appuyant légèrement sur la gélose, puis incubés pendant 24h à 37°C ± 1°C.

### 2.4. Lecture

La lecture a été faite par mesurer précise des différents diamètres des zones d'inhibition.

## 3. Antibiogramme sous stress salin

### 3.1. Stress appliqué aux cultures destinées à l'antibiogramme

Dans un premier temps, l'expérience a été réalisée en utilisant le milieu de culture LB préparé en absence de sel. Par la suite la même expérience a été répétée en utilisant le milieu LB en présence de différentes concentrations de salinité de 0.2M à 1M (0.2M ; 0.4M ; 0.6M et 1M).

Dans des tubes coniques, cinq ml d'un bouillon LB sontensemencés à partir d'une culture bactérienne fraîche (24h) de la souche testée (*E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). Après incubation (37°C pendant 24h), la culture a été centrifugée à 3000 rpm pendant 15 min. Le culot a été remis en suspension dans 5ml de l'eau physiologique. Après la croissance bactérienne est estimée par mesure de l'absorbance de la culture à 620 à une charge bactérienne équivalente au standard Mac Farland 0.5 (~ 108 UFC/ml). La lecture est réalisée, par mesure de la densité optique à 620 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Cette lecture est obtenue en versant le contenu de chaque tube dans des cuves à spectrophotomètre.

### 3.2. Stress appliqué directement au milieu de culture de l'antibiogramme

Il consiste à suspendre des quantités de 7.6g de poudre du milieu MH dans 200 ml d'eau distillée en rajoutant à chaque fois une concentration différente de sels : 0.2M ; 0.4M ; 0.6M et 1M. Enfin, La solution est chauffée sous agitation constante puis stérilisée à l'autoclave à 121°C pendant 15min.

## 4. Antibiogramme sous stress dû au pH

### 4.1. Stress appliqué aux cultures destinées à l'antibiogramme

Dans un premier temps, l'expérience a été réalisée en utilisant le milieu de culture LB préparé en absence de sel. Par la suite la même expérience a été répétée en utilisant le milieu LB à différents pH : 4.5 ; 6 ; 7.3 ; 8.5.

Dans des tubes coniques, cinq ml d'un bouillon LB sontensemencés à partir d'une culture bactérienne fraîche (24h) de la souche testée (*E. coli* ATCC 25922 et *P. aeruginosa* ATCC 27853). Après incubation (37°C pendant 24h), la culture a été centrifugée à 3000 rpm pendant 15 min. Le culot a été remis en suspension dans 5ml de l'eau physiologique. Après la croissance bactérienne est estimée par mesure de l'absorbance de la culture à 620 à une charge bactérienne équivalente au standard Mac Farland 0,5(~ 108 UFC/ml).

La lecture est réalisée, par mesure de la densité optique à 620 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (OPTIZEN). Cette lecture est obtenue en versant le contenu de chaque tube dans des cuves à spectrophotomètre.

#### 4.2. Stress appliqué directement au milieu de culture de l'antibiogramme

Il consiste à suspendre 7,6g de poudre MH dans 200 ml, en rajoutant à chaque fois quelques gouttes d'HCl ou NaOH jusqu'à l'obtention des valeurs du pH voulu : 4.5 ; 6 ; 7.3 ; 8.5. La solution est chauffée sous agitation constante puis stérilisée à l'autoclave à 121 C° pendant 15 min.

*Chapitre III*  
*Résultats*

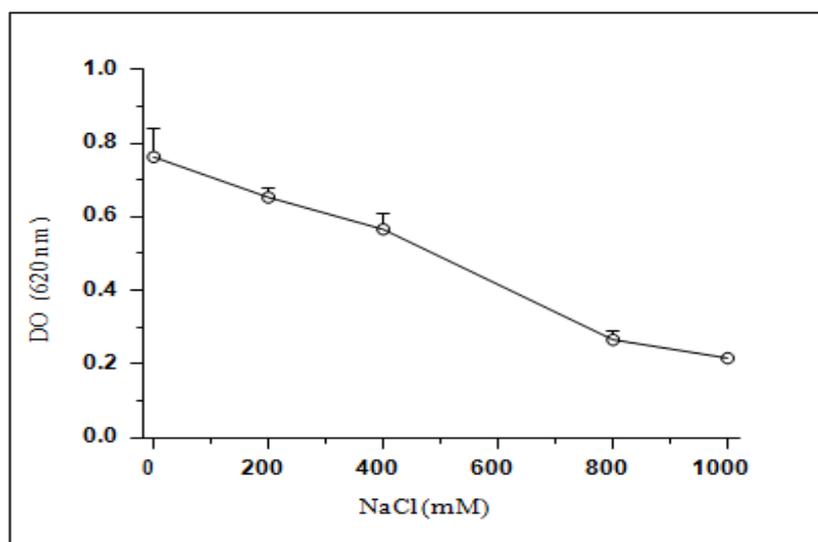
Les deux souches bactériennes de références *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ont été d'abord testées pour leur tolérance à la salinité, appliquée sous forme de concentrations croissante en NaCl, et au pH à différents degrés. Par la suite, les souches ont été soumises à des antibiogrammes vis-à-vis des antibiotiques habituellement utilisés pour le traitement des infections qui leurs sont associées. Les antibiogrammes ont été réalisés à différentes concentrations de sel et à différent pH afin d'étudier, pour la première fois, la sensibilité bactérienne aux antibiotiques dans des environnements de stress hydrique lié à la salinité et au pH.

## I. Résultats obtenus pour la souche *E. coli*

### 1. Halotolérance bactérienne et réponse aux antibiotiques

#### 1.1. Halotolérance bactérienne

Comme le montre la figure 03, la souche *E. coli* ATCC 25922 peut remarquablement tolérer des concentrations de sel allant jusqu'à 400 mM NaCl. Au-delà de cette concentration, la souche perd de façon significative sa capacité de croître sur le milieu LB. Ainsi, des densités optiques (DO) de 0.76, 0.65 et 0.56 ont été obtenues sur un milieu additionné de 0, 200 et 400 mM NaCl, respectivement. Cependant, des DO faibles, correspondant à 0.26 et 0.21, ont été lues après incubation sur un milieu additionné de 800 et de 1000 mM NaCl, respectivement.



**Figure 03 :** Effet du sel (NaCl) sur la croissance de la souche *E. coli* ATCC 25922.

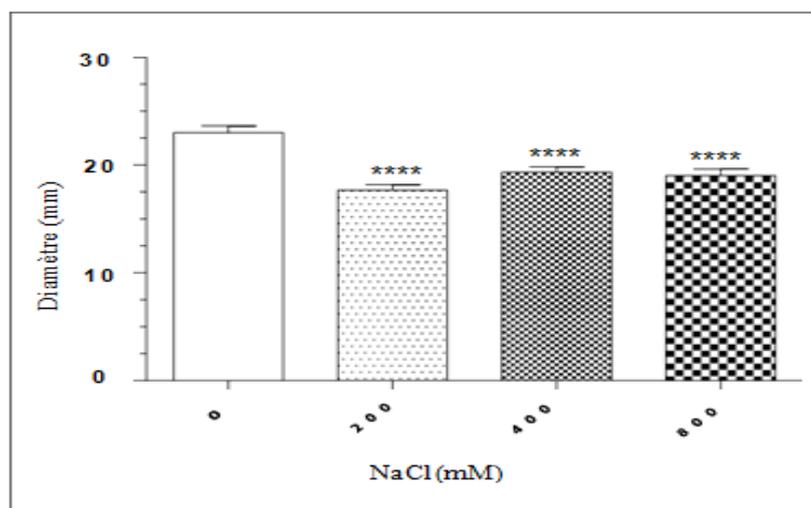
## 1.2. Réponse des bactéries stressées aux antibiotiques

### 1.2.1. Effet de la Gentamycine

La sensibilité de la souche *E. coli* vis-à-vis de la Gentamycine a été testée en absence et en présence de stress salin. Le stress a été appliqué de deux façons différentes. Dans la première, les concentrations de sel sont directement additionnées au milieu de culture MH utilisé pour l'antibiogramme. Dans la deuxième, le stress a été appliqué de façon précoce sur les cultures bactériennes destinées à la réalisation de l'antibiogramme.

- *Stress appliqué pendant l'antibiogramme*

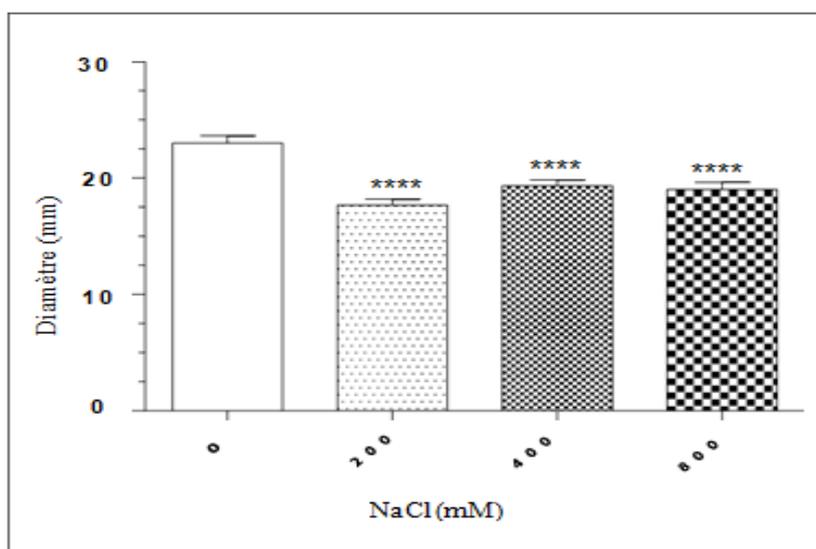
La figure 04 montre l'effet de la Gentamycine sur la souche *E. coli* ATCC 25922 en absence et en présence de stress salin (NaCl) appliqué directement au milieu MH. Les résultats obtenus montrent clairement l'effet inhibiteur du stress provoqué par 200 et 400 mM NaCl sur la résistance bactérienne à l'antibiotique testé. Cependant, un stress plus sévère de 800 mM NaCl stimule la résistance bactérienne à la gentamycine. Ainsi, le diamètre de la zone d'inhibition obtenu autour des disques d'antibiotique varie de 23 mm, en absence de stress, à 28.83 et 27.66 mm en présence de 200 et 400 mM NaCl, respectivement, et 24.66 mm en présence de 800 mM de sel.



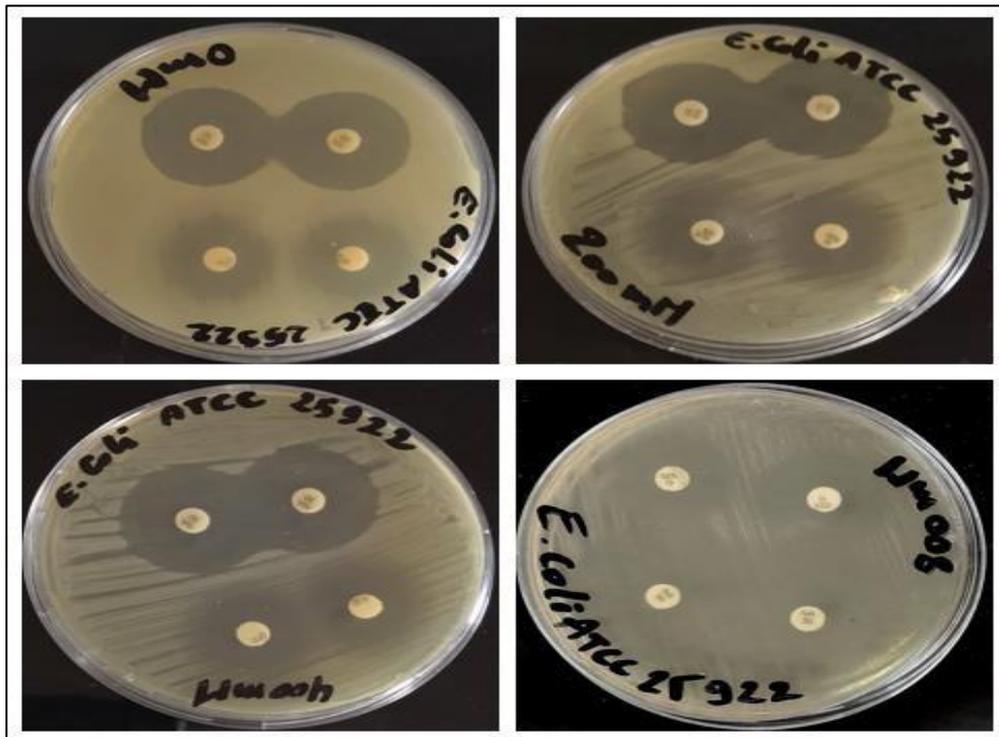
**Figure 04 :** Action de la Gentamycine sur la souche *E. coli* ATCC 25922 en absence et en présence de stress salin (NaCl) appliqué directement au milieu MH. \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ) ; \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).

- *Stress précoce appliqué avant l'antibiogramme*

L'effet de la Gentamycine sur la souche *E. coli* ATCC 25922 en absence et en présence de stress salin (NaCl) appliqué de façon précoce sur la culture bactérienne destinée à la réalisation de l'antibiogramme est montré sur la figure 05. Contrairement à ce qui a été noté avec l'application directe du stress, le stress précoce montre un effet différent sur le comportement de la souche vis-à-vis de l'antibiotique testé. Les trois concentrations de sel auxquelles la bactérie a été soumise avant la réalisation de l'antibiogramme ont augmenté la résistance bactérienne à l'antibiotique de façon significative. Ainsi, le diamètre de la zone d'inhibition a diminué de 23 mm en absence de stress à 17.66, 19.33 et 19 mm en présence de 200, 400 et 800 mM de sel, respectivement.



**Figure 05** : Action de la Gentamycine sur la souche *E. coli* ATCC 25922 en absence et en présence de stress salin (NaCl) appliqué de façon précoce sur la culture bactérienne destinée à la réalisation de l'antibiogramme. \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ) ; \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).

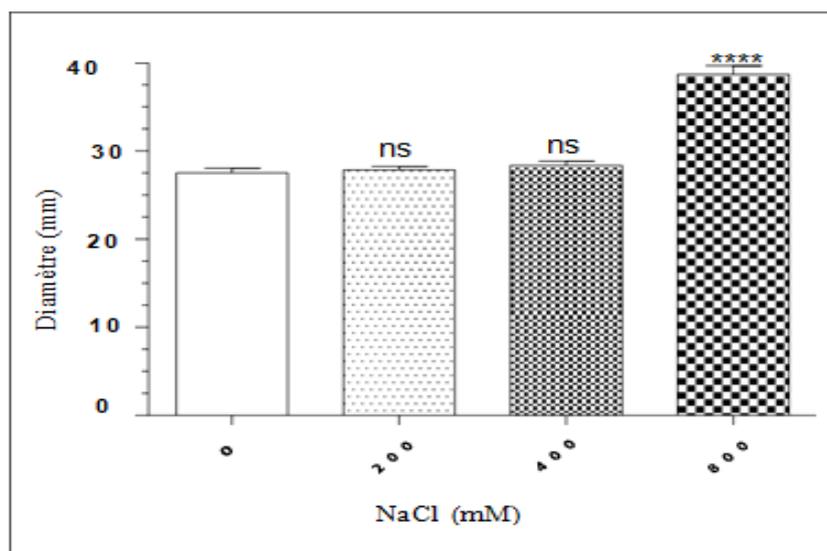


**Figure 06 :** Action de l'acide nalidixique et de Gentamycine sur la souche *E.coli* ATCC 25922 en absence et en présence de stress salin (NaCl) appliqué directement au milieu MH.

### 1.2.2. Effet de l'acide nalidixique

- *Stress appliqué pendant l'antibiogramme*

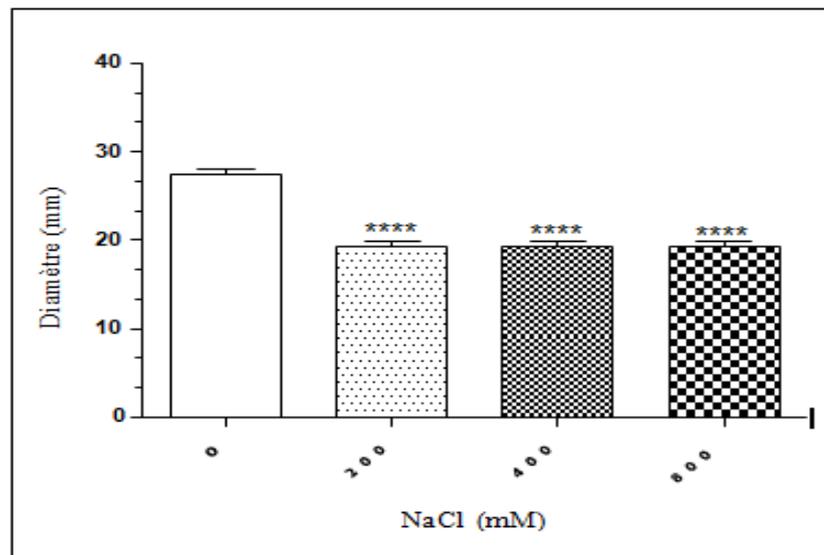
La figure 07 montre l'effet de l'acide nalidixique sur la souche *E. coli* ATCC 25922 en absence et en présence de stress salin appliqué directement au milieu de culture de l'antibiogramme MH. Aucun effet remarquable des deux concentrations de sel 200 et 400 mM NaCl sur la sensibilité de la souche à l'acide nalidixique n'a été constaté. Le diamètre de la zone d'inhibition a légèrement viré de 27.5 en absence de stress à 27.8 et 28.3 mm en présence de 200 et 400 mM NaCl, respectivement. Cependant, un stress plus sévère de 800 mM NaCl a considérablement augmenté la sensibilité de la souche à l'acide nalidixique, où le diamètre de la zone d'inhibition s'est élargi à 38.6 mm autour du disque.



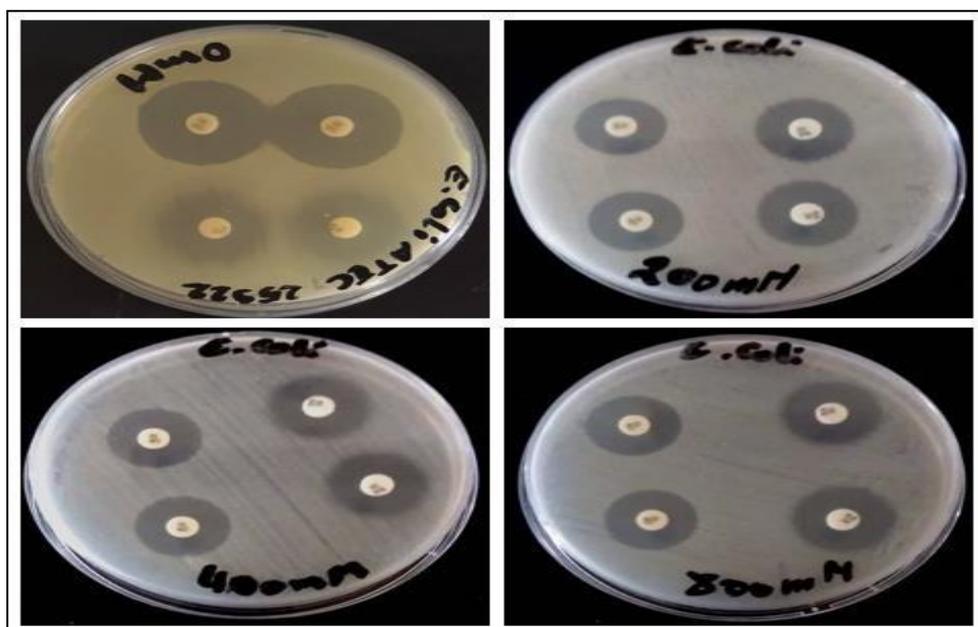
**Figure 07** : Action de l'acide nalidixique sur la souche *E. coli* ATCC 25922 en absence et en présence de stress salin (NaCl) appliqué directement au milieu MH. \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ) ; \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).

- *Stress précoce appliqué avant l'antibiogramme*

L'action de l'acide nalidixique sur la souche *E. coli* ATCC 25922 en absence et en présence de stress salin (NaCl) appliqué de façon précoce sur la culture bactérienne destinée à la réalisation de l'antibiogramme est illustré dans la figure 08. Les trois concentrations de sel, 200, 400 et 800 mM ont donné un effet similaire sur l'interaction bactérie-acide nalidixique. Le diamètre de la zone d'inhibition a significativement diminué de 27.5 mm en absence de stress à 19.33 mm de diamètre en présence des trois concentrations de sel.



**Figure 08 :** Action de l'acide nalidixique sur la souche *E. coli* ATCC 25922 en absence et en présence de stress salin (NaCl) appliqué de façon précoce sur la culture bactérienne destinée à la réalisation de l'antibiogramme. \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ) ; \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ )



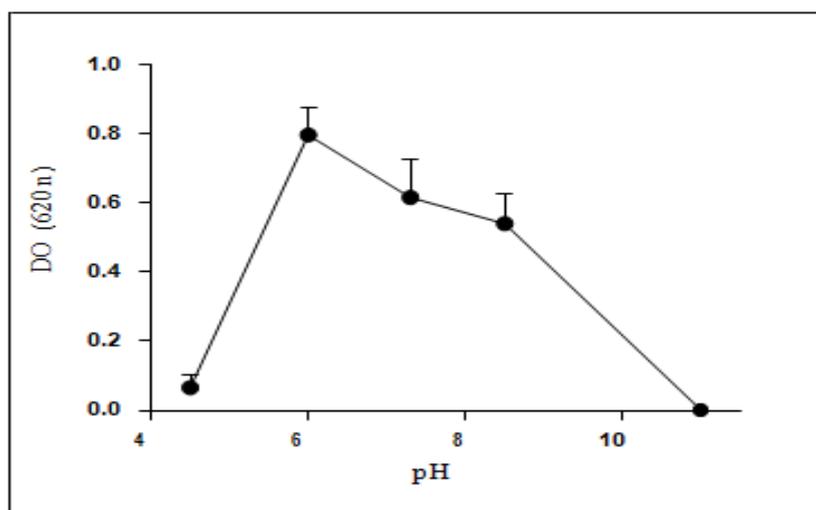
**Figure 09 :** Action de l'acide nalidixique et de la gentamycine sur la souche *E. coli* ATCC 25922 en absence et en présence de stress salin (NaCl) appliqué de façon précoce sur la culture bactérienne destinée à la réalisation de l'antibiogramme.

## 2. Tolérance au pH et réponse aux antibiotiques

Afin de déterminer l'effet des mêmes antibiotiques, Gentamycine et acide nalidixique, sur le comportement de la souche *E. coli* ATCC 25922 en présence et en absence de stress hydrique lié au pH, nous avons d'abord étudié l'effet de la variation de ce dernier sur la souche bactérienne dans le milieu de culture LB. Par la suite, la souche a été soumise à des antibiogrammes en état normal et en état de stress. Le stress lié au pH a été appliqué de deux façons différentes. Dans la première, les variations du pH sont directement appliquées au milieu de culture MH utilisé pour l'antibiogramme. Dans la deuxième, le stress a été appliqué de façon précoce sur les cultures bactériennes destinées à la réalisation de l'antibiogramme.

### 2.1. Tolérance au pH

La figure 11 montre l'effet du pH sur la croissance de la souche bactérienne *E. coli* ATCC 25922. Le test a donné des résultats différents sur les deux milieux de culture utilisés. Selon les résultats obtenus sur le milieu LB, la souche présente un pH optimum de croissance autour de 6. A partir de cette valeur, la densité optique de la culture bactérienne diminue de façon remarquable. Elle varie de 0.79 (pH=6) à 0.61 et 0.54 sous (pH= 7.3 et pH=8.5, respectivement). Aucune croissance n'a été constaté aux deux valeurs du pH 4.5 et 11. Sur le milieu MH, utilisé pour l'antibiogramme, une croissance positive a été constatée sur les boites à pH variant entre 4.5 et 8.5. Par contre, aucune croissance n'a été constatée à pH 11.



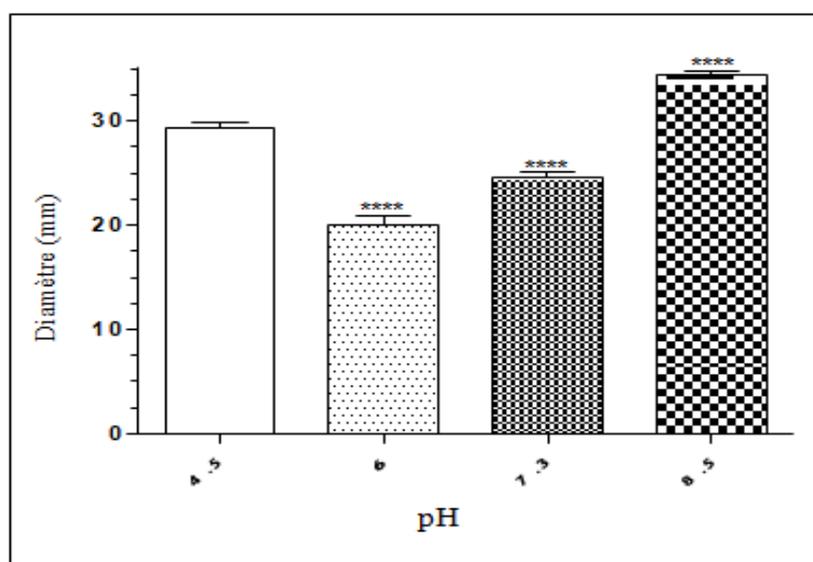
**Figure 11** : Tolérance de la souche *E. coli* ATCC 25922 au pH.

## 2.2. Réponse des bactéries stressées aux antibiotiques

### 2.2.1. Effet de la Gentamycine

- *Stress appliqué pendant l'antibiogramme*

Les deux pH extrêmes utilisés pour ce test, 4.5 et 8.5, ont considérablement fragilisé la souche face à l'antibiotique gentamycine, avec des diamètres d'inhibition de 29.33 et 34.33 mm, respectivement. Les deux autres valeurs de pH appliquées au milieu de culture de l'antibiogramme, 6 et 7.3, étant proches du pH optimum de la croissance de la souche, ont significativement allégé l'effet de l'antibiotique. De ce fait, des diamètres d'inhibition de 20 et 24.5 mm ont été obtenus sur des milieux à pH 6 et 7.3, respectivement.

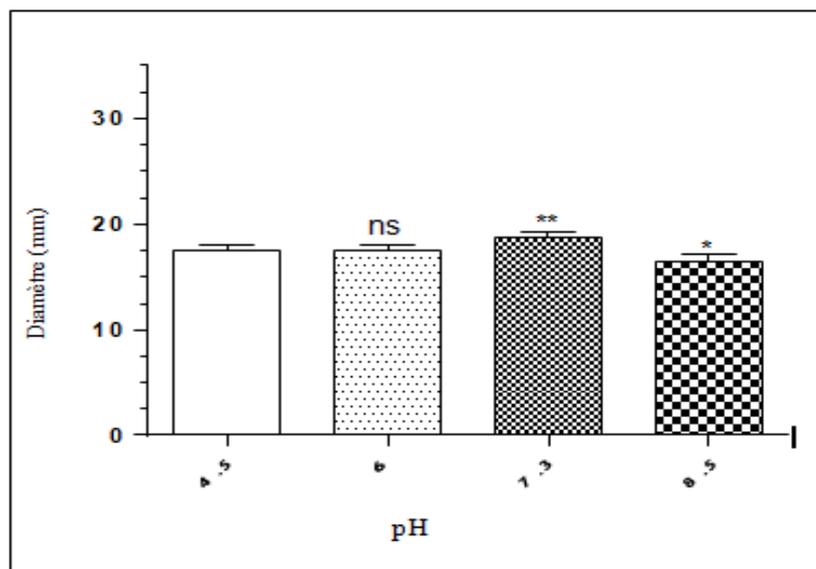


**Figure 11 :** Effet de la Gentamycine sur la souche *E. coli* ATCC 25922 sous stress dû au pH. Le stress appliqué directement au milieu MH. \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ) ; \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).

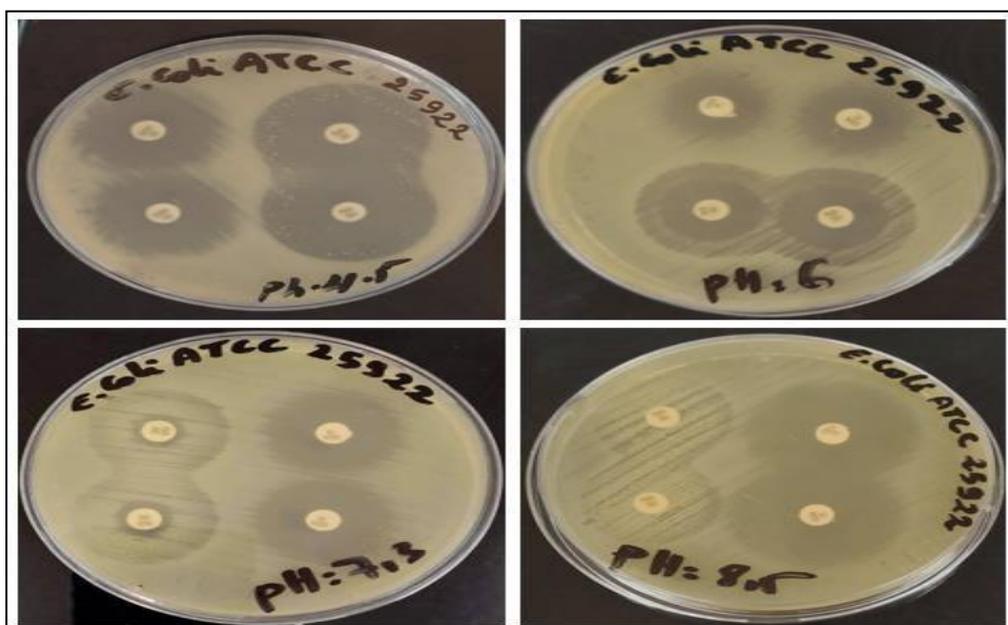
- *Stress précoce appliqué avant l'antibiogramme*

Le stress précoce dû au pH n'affecte pas de façon considérable le comportement de la souche bactérienne vis-à-vis de la gentamycine. Le meilleur effet de l'antibiotique a été noté à pH 7.3 avec une zone d'inhibition de 18.6 mm de diamètre. Les valeurs de pH 4.5, 6 et 8.5 ont, de façon légèrement significative, diminué l'effet de l'antibiotique avec des diamètres

d'inhibition de 17.5, 18.66 et 16.5, respectivement (figure 12).



**Figure 12 :** Effet de la Gentamycine sur la souche *E. coli* ATCC 25922 sous stress dû au pH. Le stress appliqué de façon précoce sur la culture bactérienne destinée à la réalisation de l'antibiogramme. \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ) ; \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).

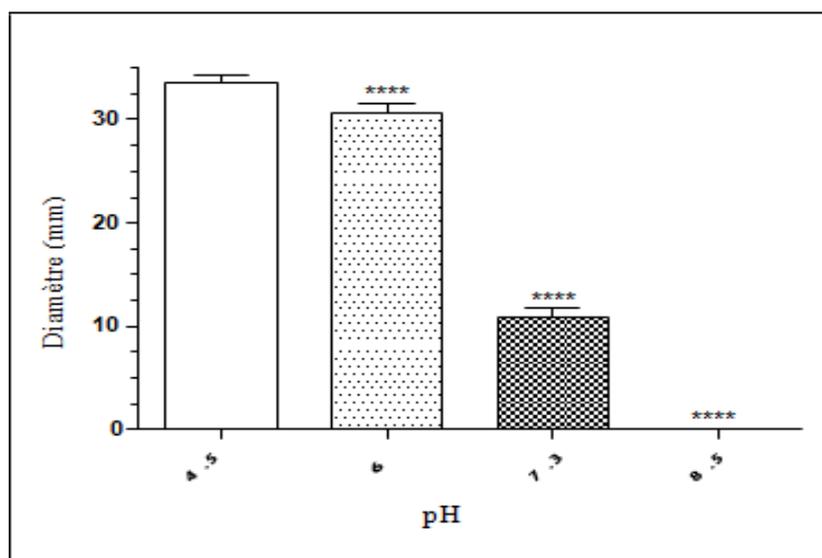


**Figure 13 :** Effet de l'acide nalidixique et de la Gentamycine sur la souche *E. coli* ATCC 25922 sous stress dû au pH. Le stress appliqué directement au milieu MH.

## 2.2.2. Effet de l'acide nalidixique

- *Stress appliqué pendant l'antibiogramme*

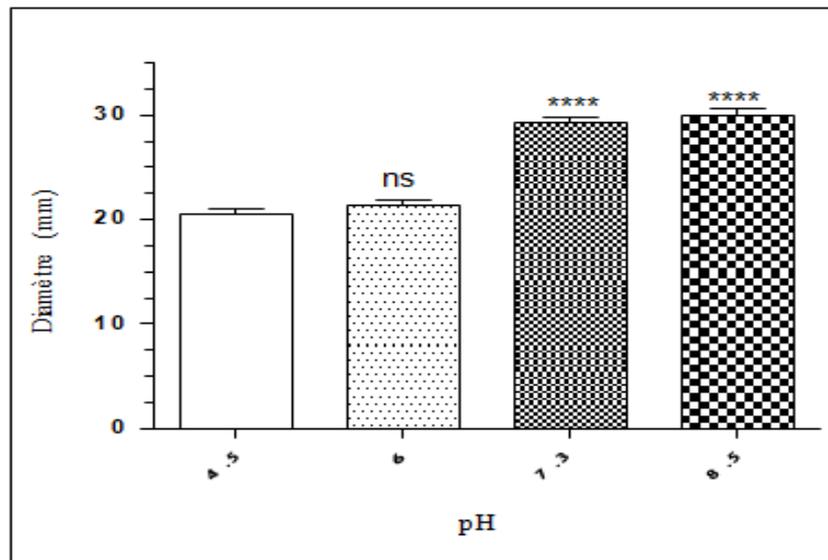
Différemment au profil obtenu pour la gentamycine, l'effet de l'acide nalidixique sur la souche *E. coli* 25922 est complètement perdu à pH 8.5. Par contre, les pH plus faibles augmentent de façon significative son effet. Ainsi, des diamètres d'inhibition de 10.83, et 33.5 mm ont été obtenus sur des milieux à pH 7.3, 6 et 4.5, respectivement (figure 14).



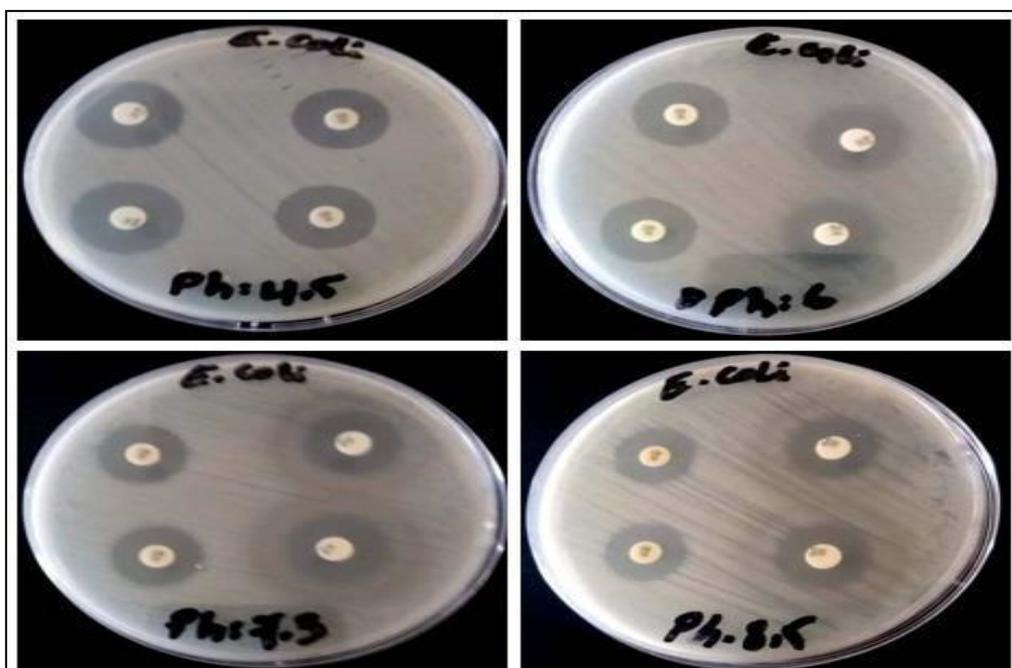
**Figure 14** : Effet de l'acide nalidixique sur la souche *E. coli* ATCC 25922 sous stress dû au pH. Le stress appliqué directement au milieu MH. \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ) ; \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).

- *Stress précoce appliqué avant l'antibiogramme*

Le stress appliqué de façon précoce agit différemment sur le comportement de la souche vis-à-vis de l'acide nalidixique. Les deux pH 4.5 et 6 ont montré un effet similaire sur l'interaction bactérie-acide nalidixique avec des diamètres d'inhibition de 20.5 et 21.33 mm, respectivement. D'une manière impressionnante, l'acide nalidixique a repris son efficacité contre la bactérie au pH 8, appliqué cette fois de façon précoce sur la culture destinée à la réalisation de l'antibiogramme. Des diamètres d'inhibition de 29.33 et 30 mm ont été obtenus avec des cultures ayant subi un stress précoce à pH 7.3 et 8.5, respectivement.



**Figure 15** : Effet de l'acide nalidixique sur la souche *E. coli* ATCC 25922 sous stress dû au pH. Le stress appliqué de façon précoce sur la culture bactérienne destinée à la réalisation de l'antibiogramme. \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ) ; \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).



**Figure 16** : Effet de l'acide nalidixique et de la Gentamycine sur la souche *E. coli* ATCC 25922 sous stress dû au pH. Le stress appliqué de façon précoce sur la culture bactérienne destinée à la réalisation de l'antibiogramme.

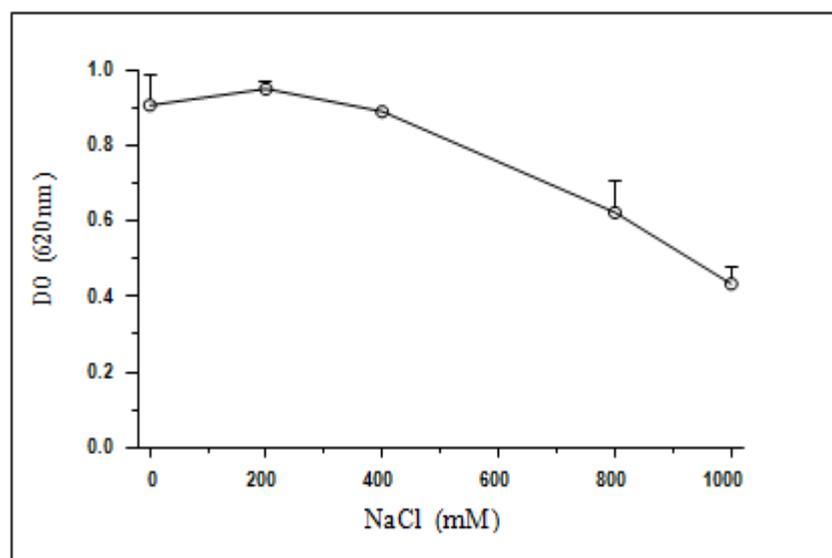
## II. Résultats obtenus pour la souche *P. aeruginosa*

Afin de mieux comprendre le comportement des bactéries en état de stress hydrique vis-à-vis des antibiotiques, le même travail réalisé avec la souche *E. coli* ATCC 25922 a été refait avec la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853. Le travail a été refait avec un antibiotique en commun, Gentamycine, et un autre antibiotique différent, Ceftazidime.

### 1. Halotolérance bactérienne et réponse aux antibiotiques

#### 1.1. Halotolérance bactérienne

La souche bactérienne *P. aeruginosa* ATCC 27853 s'est avérée légèrement plus résistante à la salinité qu'*E. coli*. Sa croissance n'est significativement affectée qu'à partir de 400 mM de sel. Des DO de 0.92, 0.95 et 0.89 ont été obtenus après 24h d'incubation de la souche sur un milieu LB contenant 0, 200 et 400 mM de sel, respectivement. Cependant, la DO de la culture a significativement chuté vers 0.62 et 0.43 en présence de 800 et 1000 mM NaCl, respectivement (figure 17).



**Figure 17 :** Effet du sel (NaCl) sur la croissance de la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853. \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ) ; \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).

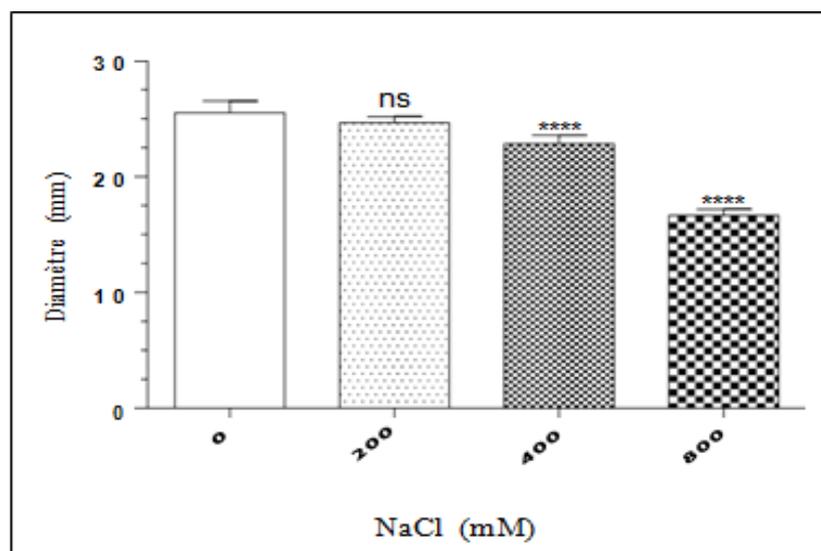
## 1.2. Réponse des bactéries stressées aux antibiotiques

### 1.2.1. Effet de la Gentamycine

- *Stress appliqué pendant l'antibiogramme*

La sensibilité de la souche *P. aeruginosa* à la Gentamycine et sous différentes concentrations de sel suit de façon remarquable sa sensibilité à ses mêmes concentrations en absence de l'antibiotique.

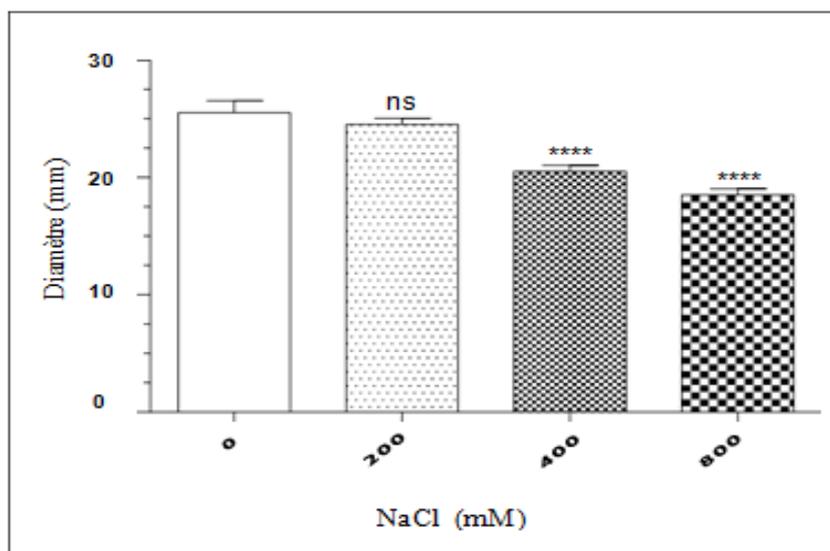
En absence de stress et en présence de 200 mM NaCl, l'effet de l'antibiotique sur la souche est statistiquement d'une même envergure. Des diamètres d'inhibition de 25.5 et 24.6 mm ont été obtenus en absence et en présence de 200 mM NaCl respectivement. Cependant, la sensibilité de la souche à l'antibiotique est significativement altérée en présence de concentrations plus élevées en sel. À 400 et à 800 mM NaCl, la Gentamycine a provoqué une inhibition de la croissance de 22.8 et 16.6 mm de diamètre, respectivement (figure 18).



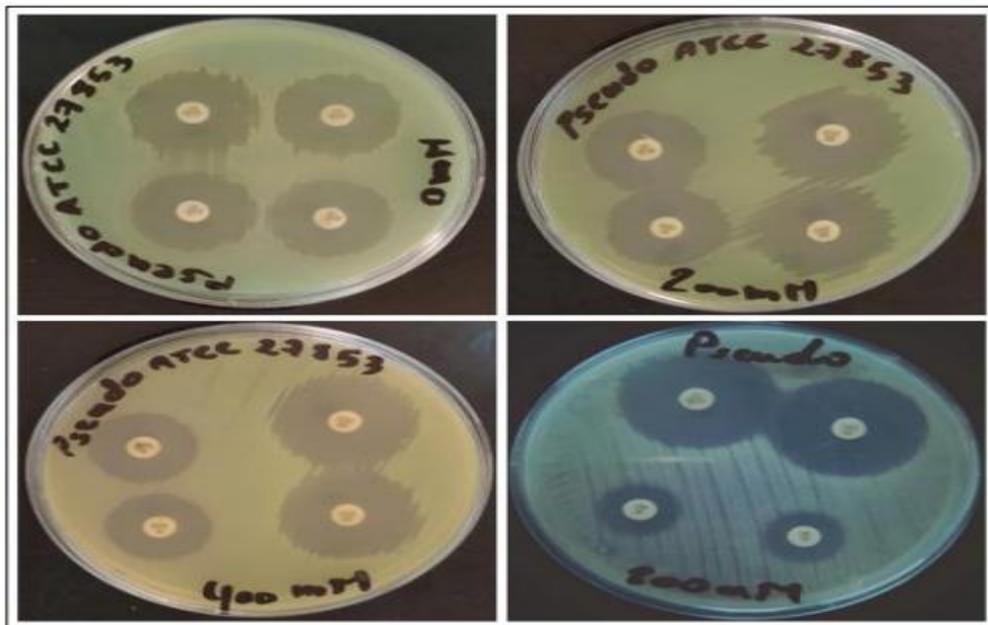
**Figure 18** : Action de la Gentamycine sur la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853 en absence et en présence de stress salin (NaCl) appliqué directement au milieu MH. \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ) ; \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).

- *Stress précoce appliqué avant l'antibiogramme*

Le stress salin précoce, auquel la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853 a été soumise avant d'être utilisée pour l'antibiogramme, a provoqué un résultat similaire à celui obtenu pour la même souche soumise à un stress au moment de la réalisation de l'antibiogramme vis-à-vis de la gentamycine. Des diamètres d'inhibition de 25.5, 24.5, 20.5 et 18.5 ont été obtenus sous les concentrations de sel 0, 200, 400 et 800 mM, respectivement.



**Figure 19:** Action de la Gentamycine sur la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853 en absence et en présence de stress salin (NaCl) appliqué de façon précoce sur la culture bactérienne destinée à la réalisation de l'antibiogramme. \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ) ; \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).

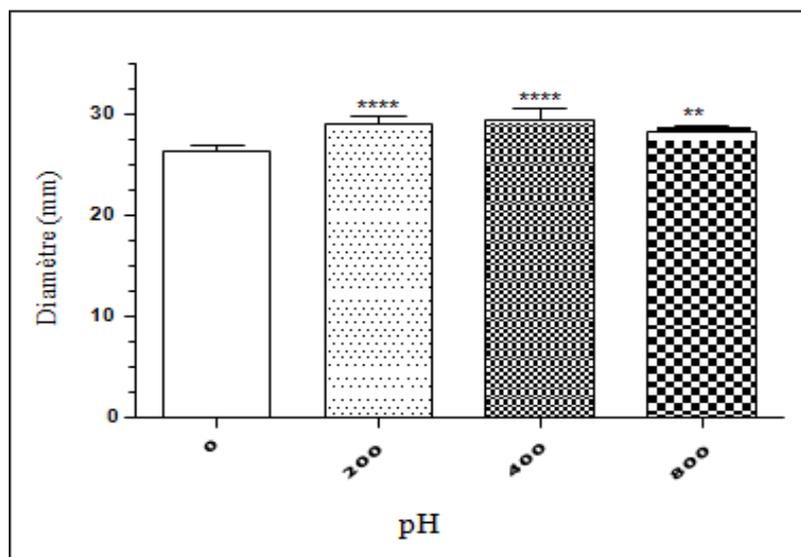


**Figure 20** : Action de la Ceftazidime et de la Gentamycine sur la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853 en absence et en présence de stress salin (NaCl) appliqué directement au milieu MH.

### 2.2.2. Effet de la Ceftazidime

- *Stress appliqué pendant l'antibiogramme*

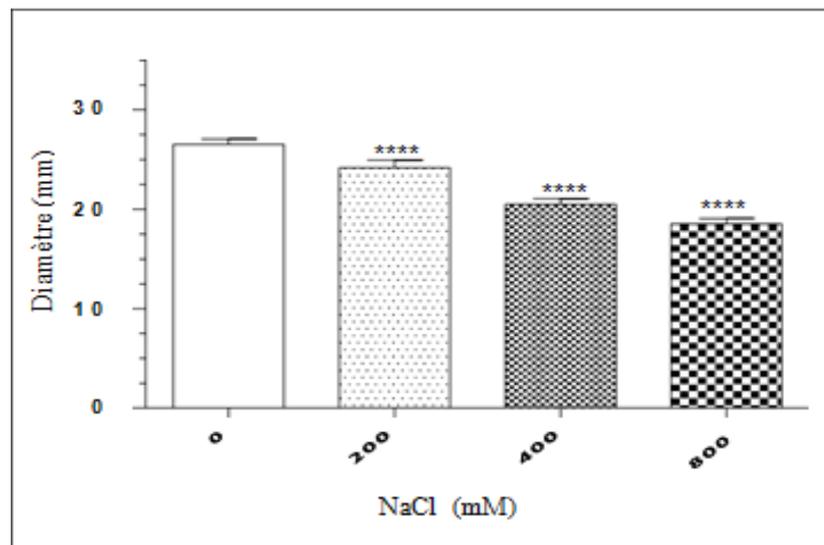
La Ceftazidime s'est avérée significativement plus efficace contre la souche *P. aeruginosa* sous des conditions de stress salin sévères. Des diamètres d'inhibition statistiquement similaires ont été obtenus en présence de 200, 400 et 800 mM de sel (29.2, et 28.3, respectivement). Cependant, l'absence de stress salin diminue la sensibilité de la souche à la Ceftazidime avec un diamètre d'inhibition de 26.5 mm (figure 21).



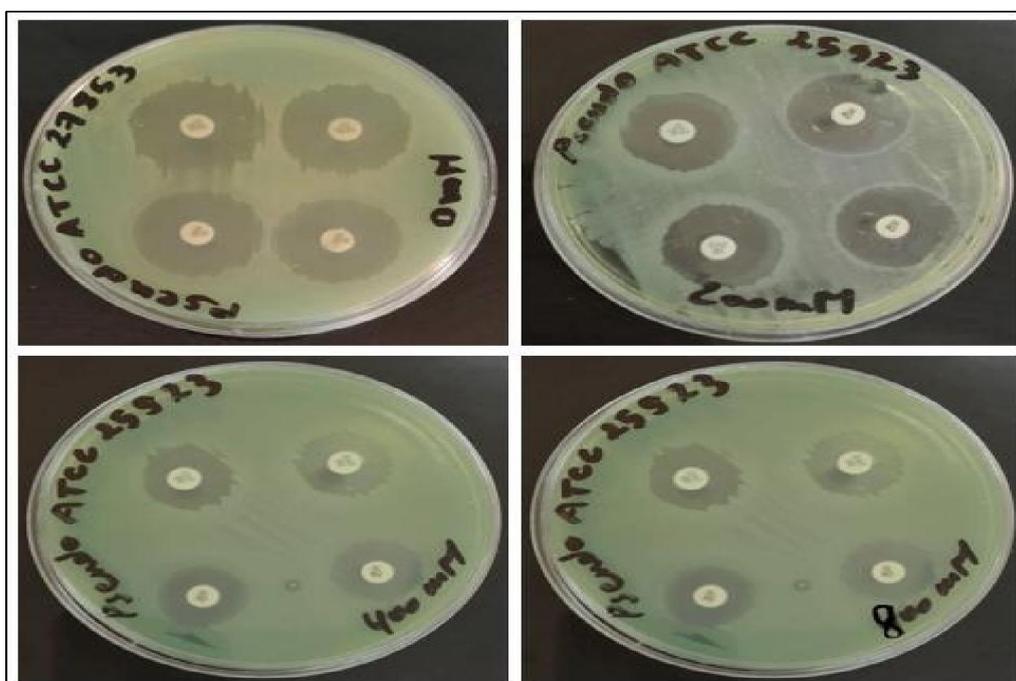
**Figure 21** : Action de la Gentamycine sur la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853 en absence et en présence de stress salin (NaCl) appliqué directement au milieu MH. \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ) ; \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).

- *Stress précoce appliqué avant l'antibiogramme*

Dans la figure 22, il apparaît clairement que le même stress, appliqué de façon précoce sur les cultures cellulaires destinées à la réalisation de l'antibiogramme, donne un résultat allant dans le sens inverse du stress appliqué momentanément avec le milieu de l'antibiogramme. Plus le stress augmente, plus la bactérie devient plus résistante à l'antibiotique. Ainsi, les deux concentrations de sel 400 et 800 mM NaCl réduisent de façon dramatique les diamètres d'inhibition induits par la Ceftriaxone sur la souche (20.5 et 18.5 mm de diamètre, respectivement). En absence de stress, la Ceftriaxone a provoqué une zone d'inhibition de 26.5 mm de diamètre, une valeur statistiquement plus élevée que celles des diamètres obtenus en présence de stress.



**Figure 22** : Action de la Ceftazidime sur la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853 en absence et en présence de stress salin (NaCl) appliqué de façon précoce sur la culture bactérienne destinée à la réalisation de l'antibiogramme. \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ) ; \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).

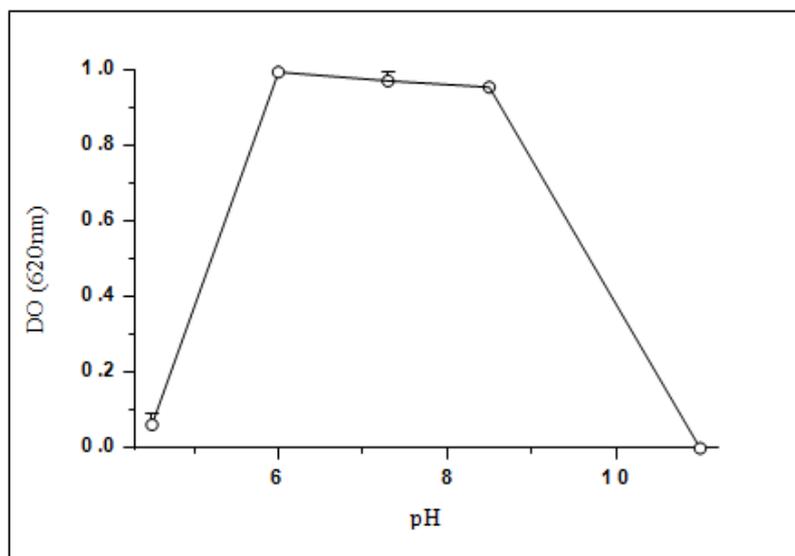


**Figure 23** : Effet de la Ceftazidime et de la Gentamycine sur la souche *P.aeruginosa* ATCC 27853 sous stress salin. Le stress est appliqué de façon précoce sur la culture bactérienne destinée à la réalisation de l'antibiogramme.

## 2. Tolérance au pH et réponse aux antibiotiques

### 2.1. Tolérance au pH

La figure 24 illustre l'effet du pH sur la croissance de la souche bactérienne *P. aeruginosa* ATCC 27853. Le test a donné des résultats différents sur les deux milieux de culture utilisés. Selon les résultats obtenus sur le milieu LB, la souche présente une large gamme de pH sur laquelle sa croissance est statistiquement optimale (entre 6 et 8.5). A partir de cette valeur, la densité optique de la culture bactérienne diminue de façon remarquable. Sur le même milieu, la souche est incapable de croître aux deux pH 4.5 et 11. Cependant, une croissance positive a été obtenue au pH 4.5 sur le milieu MH utilisé pour la réalisation de l'antibiogramme. La souche *P. aeruginosa* ATCC 27853 révèle donc une meilleure tolérance aux variations de pH, comparée à la souche *E. coli* ATCC 25922.



**Figure 24** : Tolérance de la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853 au pH.

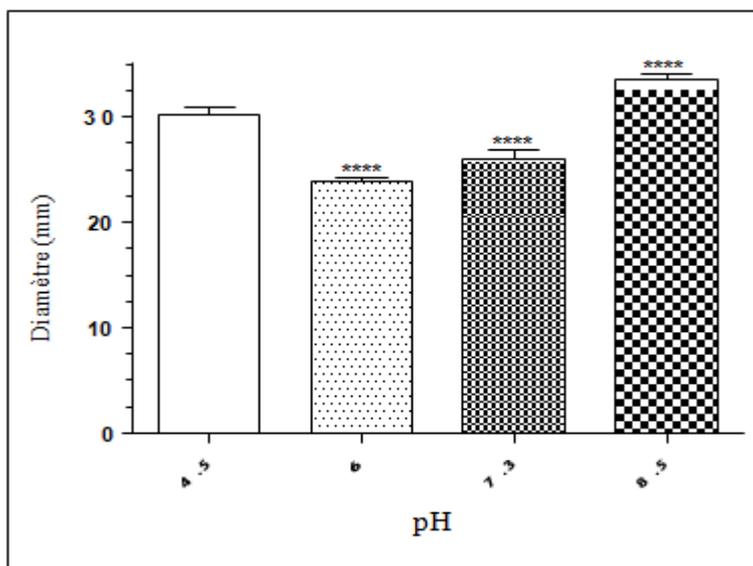
### 2.2. Réponse des bactéries stressées aux antibiotiques

#### 2.2.1. Effet de la Gentamycine

- *Stress appliqué pendant l'antibiogramme*

La figure 25 montre l'effet de la Gentamycine sur la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853 sous stress dû au pH. Le stress est appliqué directement au milieu MH utilisé pour la réalisation de l'antibiogramme. Les pH proches à la neutralité (6 et 7.3) réduisent de façon

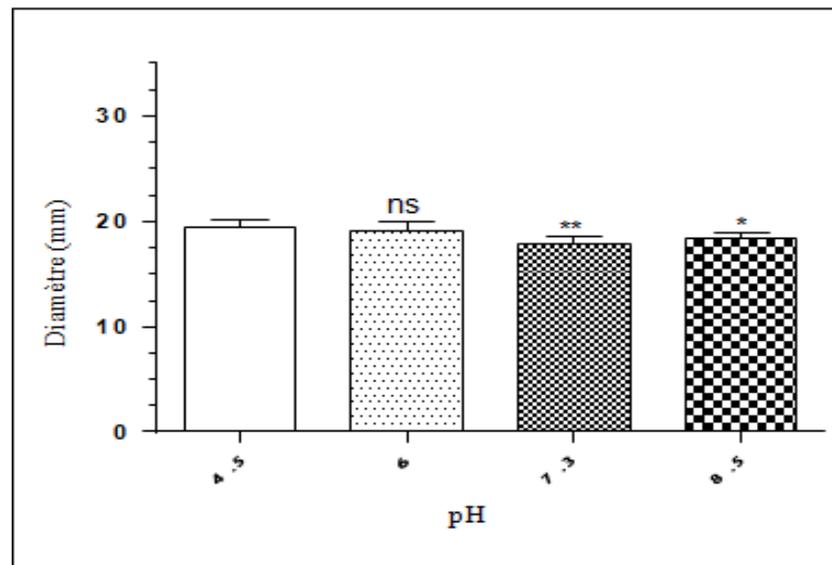
remarquable l'effet de l'antibiotique sur la souche avec des zones d'inhibition de 23.8 et 26 mm de diamètre, respectivement. Cependant, les deux pH extrêmes (4.5 et 8) fragilisent considérablement la souche bactérienne face à la Gentamycine avec des diamètres d'inhibition de 30.16 et 33.5 mm, respectivement.



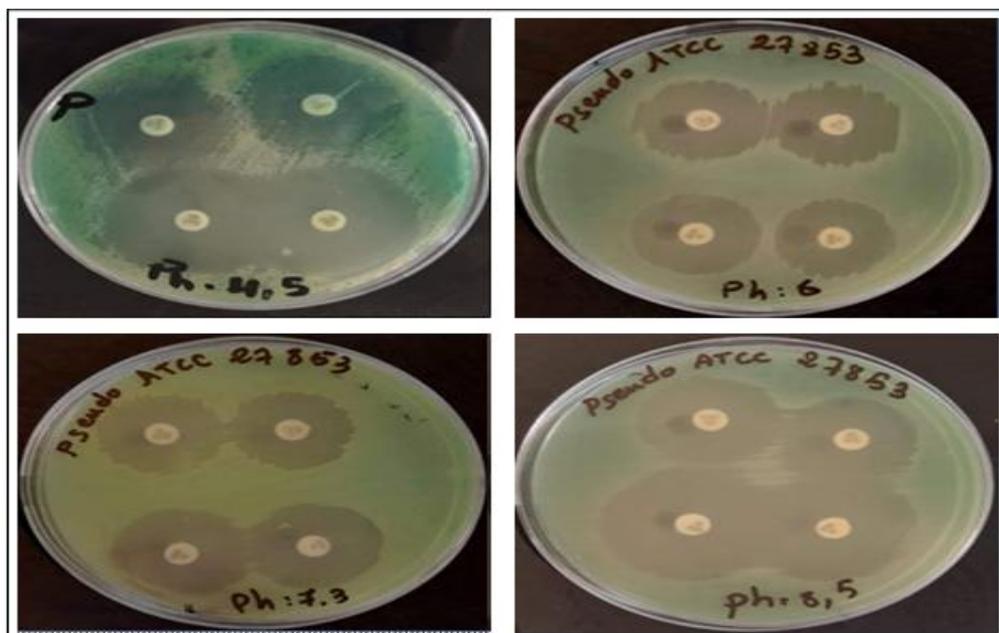
**Figure 25** : Effet de la Gentamycine sur la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853 sous stress dû au pH. Le stress est appliqué directement au milieu MH. \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ) ; \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).

- *Stress précoce appliqué avant l'antibiogramme*

Contrairement au stress appliqué directement à l'antibiogramme, le stress tardif présente un effet moins remarquable sur le comportement de la souche *P. aeruginosa* face à la Gentamycine. Les deux pH 4.5 et 6 ont provoqué un effet statistiquement similaire sur l'interaction bactérie-antibiotique, avec des diamètres d'inhibition de 19.5 et 19 mm, respectivement. Les deux pH 7.3 et 8 ont légèrement modifié l'action de la Gentamycine sur la bactérie étudiée, avec des diamètres d'inhibition de 17.8 et 18.3 mm, respectivement. Les pH neutres et légèrement alcalins ont donc un effet inhibiteur de l'action de la gentamycine contre *P. aeruginosa* ATCC 27853.



**Figure 26** : Effet de la Gentamycine sur la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853 sous stress dû au pH. Le stress appliqué de façon précoce sur la culture bactérienne destinée à la réalisation de l'antibiogramme. \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ) ; \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).

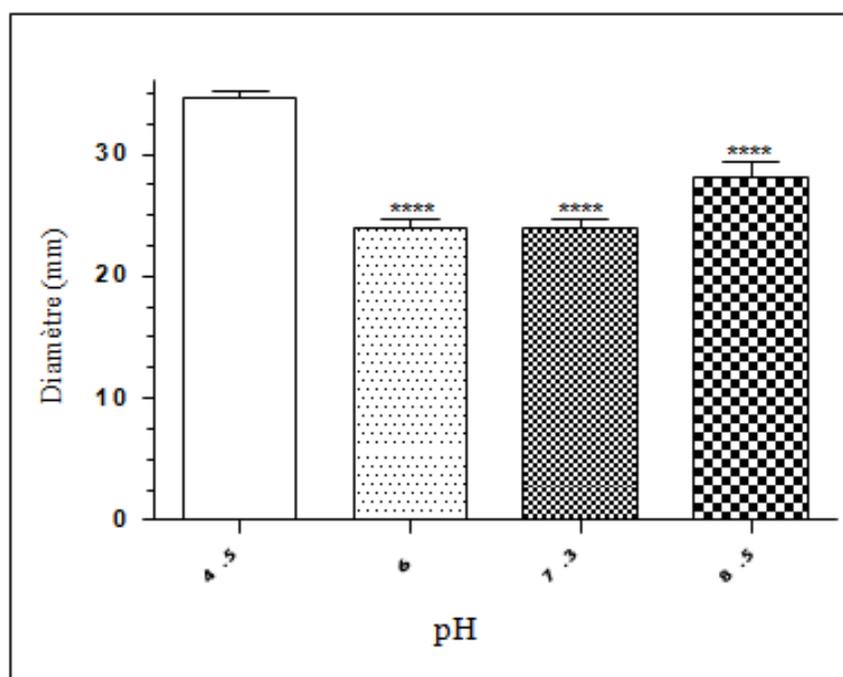


**Figure 27** : Effet de la Ceftazidime et de la Gentamycine sur la souche *P. Aeruginosa* ATCC 27853 sous stress dû au pH. Le stress appliqué directement au milieu MH.

## 2.2.2. Effet de la Ceftazidime

- *Stress appliqué pendant l'antibiogramme*

L'effet de la Ceftazidime sur la souche *P. aeruginosa* en cas de stress lié au pH et appliqué au moment de l'antibiogramme ressemble à celui de la gentamycine. Des diamètres d'inhibition de 34.6, 23.8, 23.8 et 28.16 ont été obtenus sous stress lié à des valeurs de 4.5, 6, 7.3 et 8.5, respectivement. Les pH extrêmes (4.5 et 8.5) ont donc un effet stimulateur de l'effet de l'antibiotique sur la souche. Autrement dit, la souche *P. aeruginosa* est plus faible face à la Ceftazidime dans des environnements acides ou alcalins. Aux pH 6 et 7.3, l'antibiotique a provoqué des zones d'inhibition de 23.8 mm de diamètre (figure 28).

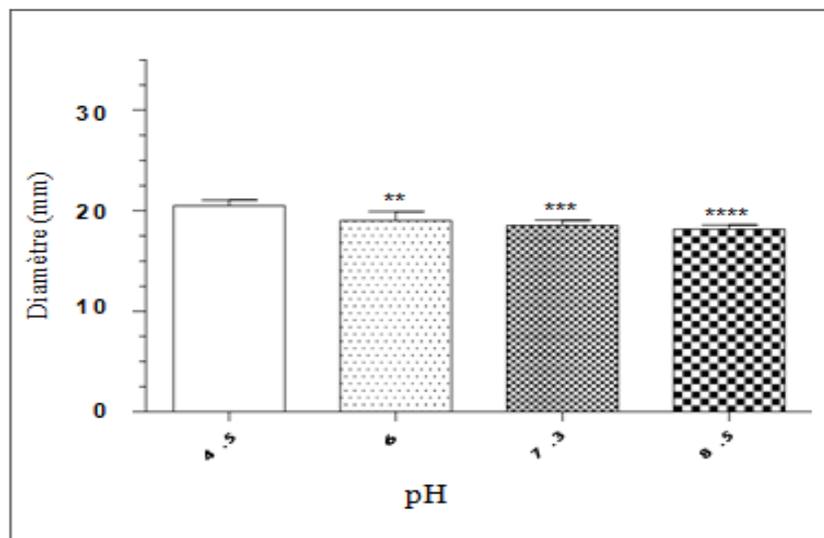


**Figure 28** : Effet de la Gentamycine sur la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853 sous stress dû au pH. Le stress appliqué directement au milieu MH. \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ) ; \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).

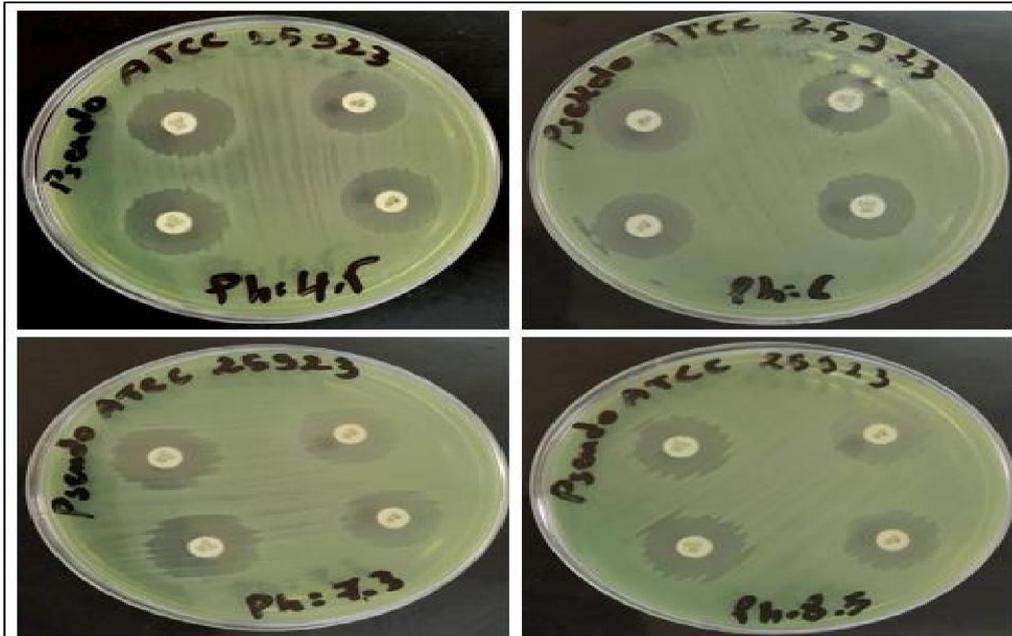
- *Stress précoce appliqué avant l'antibiogramme*

L'effet de la variation du pH, appliquée de façon précoce sur les cultures cellulaires destinées

à l'antibiogramme, est moins remarquable par rapport au même stress appliqué au moment de l'antibiogramme. Ainsi des changements légers dans les diamètres d'inhibition sont constatés dans la figure 30. Un pH acide (4.5) augmente la sensibilité de la souche vis-à-vis de la Ceftriaxone avec un diamètre d'inhibition de 20 mm. Des diamètres d'inhibition de 19, 18.5 et 18.16 mm ont été obtenus avec des cultures soumises à un stress lié à des valeurs de pH 6, 7.3 et 8.5, respectivement.



**Figure 29** : Effet de la Gentamycine sur la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853 sous stress dû au pH. Le stress appliqué de façon précoce sur la culture bactérienne destinée à la réalisation de l'antibiogramme. \* : différence significative ( $p < 0.05$ ) ; \*\* : différence significative ( $p < 0.005$ ) ; \*\*\* différence significative ( $p < 0.001$ ) ; \*\*\*\* différence significative ( $p < 0.0001$ ).



**Figure 30 :** Effet de la Ceftazidime et de la Gentamycine sur la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853 sous stress dû au pH. Le stress appliqué de façon précoce sur la culture bactérienne destinée à la réalisation de l'antibiogramme.

*Chapitre IV*  
*Discussion*

Les deux souches bactériennes, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 sont des bactéries de références largement utilisées dans les laboratoires de contrôle médicamenteux, de recherche et de contrôle de qualité comme témoins. Ces organismes sont utilisés pour les tests de milieux, comme contrôle négatif de la production de toxine et comme souche de contrôle de la qualité, pour l'API, pour l'évaluation des milieux de l'antibiogramme MH, etc. Ce sont des modèles pour les tests de sensibilité aux disques de la néomycine, de la colistine, de la kanamycine, de la céphalexine, des gentamicines, du céfamandole, de la céphalothine, de la tétracycline, de la céphaloridine, de l'acide nalidixique, du chloramphénol etc. (**American Type Culture Collection**).

Comme toutes les autres bactéries, ces deux espèces sont affectées par leurs environnements. La membrane cytoplasmique des organismes est perméable à l'eau, mais rarement aux autres métabolites. Ainsi, un choc hyper ou hypo-osmotique provoque chez la cellule un influx ou un efflux d'eau aboutissant, respectivement, à une augmentation ou une diminution du volume cytoplasmique, ce qui peut provoquer une plasmolyse (**Ghoul, 1990**).

En cas d'exposition de la cellule à une osmolarité élevée, l'activité de l'eau dans le cytoplasme diminue, la conséquence en est une perturbation de l'activité des protéines et d'autres macromolécules et une inhibition d'un grand nombre de processus biologiques comme la synthèse des macromolécules et la réplication de l'ADN. Pour les associations symbiotiques PGPR-plantes, la salinité élevée altère les protéines bactériennes impliquées dans la première étape d'attachement aux racines de la plante hôte et inhibe la nodulation bactérienne et la fixation de l'azote (**Nabti et al., 2010**).

Le pH, comme la salinité, affecte également le fonctionnement et la structure des microorganismes. Les microbes, tels que les bactéries, sont sensibles à la concentration en ions hydrogène qu'ils trouvent dans leur environnement. Les grosses protéines, telles que les enzymes, sont affectées par le pH. Leur forme change (ils se dénaturent) et entraînent très souvent une altération des charges ioniques de la molécule (**Ratzke et Gore, 2018**).

Très peu de travaux ont été réalisés sur le fonctionnement des antibiotiques sur des bactéries stressées. Le stress environnemental n'affecte pas uniquement les bactéries dans le milieu, mais aussi la structure et le fonctionnement de l'antibiotique. Dans ce sens, l'interaction bactérie-antibiotique n'est pas stable. Les résultats de ce travail montrent clairement que les doses, l'environnement d'origine de la souche bactérienne, le mode

d'action de l'antibiotique et la nature de l'environnement d'affrontement entre la bactérie et l'antibiotique sont des facteurs déterminant du résultat final.

Plusieurs études se sont intéressées au comportement des bacilles G- aux variations de la concentration du sel dans le milieu. **Calvin et al. (1992)** ont rapporté que l'une des souches de l'espèce *E. coli*, responsable d'infections urinaires, est capable de croître à des concentrations de sel allant jusqu'à 700 mM NaCl. Quel que soit le type de l'infection, les bactéries doivent tolérer des concentrations de sel leur permettant de survivre au niveau de l'organe cible et qui dépendent des propriétés physicochimiques de cette dernière. A titre d'exemple, les bactéries responsables d'infections urinaires doivent être capables de survivre sous stress salin arrivant jusqu'à 600 mM NaCl (**Imhoff et al., 1984**).

L'halotolérance des Entérobactéries, particulièrement *E. coli*, est un caractère remarquable chez plusieurs souches de l'espèce. Certaines sont à l'origine d'infections sévères dans les environnements hypertoniques de l'organisme tels que les urines (**Kunin et al., 1992-1**). Ce phénomène d'osmotolérance est principalement dû à l'accumulation de molécules osmoprotectrices comme la glycine bêtaïne par la bactérie en cas de stress. Cette propriété a même été proposée par certains chercheurs comme moyen de contourner l'osmotolérance bactérienne à travers des analogues toxiques de la glycine bêtaïne comme molécules substituants aux antibiotiques usuels dans le cas des infections urinaires (**Quéau et al., 2003**).

L'effet du pH sur la plupart des bactéries responsables d'infections humaines est largement étudié. La plupart de ces bactéries préfèrent des valeurs de pH proches de la neutralité. La tolérance des bactéries de l'espèce *E. coli* aux variations de pH a été largement abordée. Dans un travail réalisé sur la souche *E. coli* O157:H7, le pH minimal sur lequel la souche a pu croître a été signalé à 4.5. Pour la même souche, l'optimum du pH a été marqué à 6.9, alors que sa tolérance s'arrête à un pH 9.4 (**Nauta et Dufrenne, 1999**).

Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués dans la résistance de l'espèce *E. coli* aux variations du pH. Entre autres, le gène *rpoS* régule l'expression des gènes mises en œuvre pour la survie des bactéries dans des milieux acides. Il permet la croissance des bactéries des pH inférieure à 2.5 pendant plus de 2 heures (**Waterman et Small, 1996**).

La Gentamycine est une macromolécule agissant sur les bactéries G+ et G-. Il a un large spectre d'action sur la plupart des bactéries infectieuses (à l'exception des cas de

résistance notés) (**Changeur, 1975 ; Simonet, 1988**). La gentamycine appartient à la famille des aminosides. Ce sont des macromolécules dont les oses sont fixés par des liaisons osidiques engageant les hydroxyles portés par les carbones 4 et 6 du désoxy-D-stryptamine (**Rouas, 2010**). Étant donné leur origine naturelle certains aminosides sont utilisés en thérapeutique sous forme de mélange comme c'est le cas pour la gentamycine (**Mignaval et al., 2011 ; Zaoui et Bouleghlimat, 2015**). Cette dernière est un mélange composé de trois éléments ayant sensiblement la même activité (**Anonyme, 2004**).

Dans un travail réalisé par **Coronado et al. (1995)**, plusieurs souches bactériennes ont été testées pour leurs sensibilités aux antibiotiques, incluant la gentamycine, à différentes concentrations de sel. Leurs résultats montrent que la toxicité des substances antibactériennes augmente graduellement sous des concentrations faibles de sel. Dans un autre travail réalisé par (**Ochaia et al., 1999 ; Tsai et al., 2011**), la résistance des *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques, comme la gentamycine, a été testée. Les résultats montrent que les concentrations minimales inhibitrices des antibiotiques testés augmentent avec l'ajout du sel.

Dans le travail de **Begs et Andrews (1976)**, la sensibilité des aminoglycosides au sel et son action sur les deux bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* ont été évalués. Ils ont démontré que, quel que soient les ions utilisés, la protection de *E. coli* contre la gentamycine augmente avec l'augmentation du stress. Ils ont également trouvé que les variations de la force ionique influencent significativement l'efficacité des aminosides contre les deux souches testées.

L'acide nalidixique est un inhibiteur de l'ADN gyrase bactérienne. Cet antibiotique bloque l'action de cette enzyme qui, par son action sur l'enroulement de l'ADN, est essentielle à la réplication de l'ADN et à la transcription. Il est principalement efficace sur les bactéries gram négatives (**Bouck et Adelberg, 1970**). **Goss et al. (1965)** ont démontré que l'acide nalidixique inhibe spécifiquement la synthèse de l'acide désoxyribonucléique (ADN) chez *Escherichia coli*. De légers effets sur la synthèse des protéines et de l'acide ribonucléique (ARN) ont été observés uniquement à des concentrations plus élevées du médicament ou après une incubation prolongée.

L'altération du fonctionnement de l'acide nalidixique vis-à-vis de la souche *E. coli* utilisée dans ce travail est probablement due à la structure de cet antibiotique et à son caractère acide. Elle peut également être la conséquence d'une modification de la structure de

l'ADN gyrase, cible de l'acide nalidixique, suite aux changements du pH ou de la salinité du milieu.

La ceftazidime est un antibiotique antibactérien de la famille des bêta-lactamines du groupe des céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération injectable. Son mécanisme d'action repose sur l'inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne. Comme les autres céphalosporines de troisième génération, il a un large spectre d'activité in vitro contre les bactéries aérobies Gram positives et Gram négatives, particulièrement contre les entérobactéries (y compris les souches bêta-lactamases positives) et est résistant à l'hydrolyse de la plupart des bêta-lactamases. Fait important, la ceftazidime in vitro est actuellement la céphalosporine la plus active disponible contre *Pseudomonas aeruginosa*, raison pour laquelle il a été utilisé dans ce travail (**Richards et Brogden, 1985, Mark et al., 2016**).

L'acide nalidixique fait partie de la famille des Quinolones. Ce sont des molécules obtenues par synthèse chimique à partir du noyau 4-oxo, 3-carbonyl, pyridine. L'utilisation des quinolones classiques (acide nalidixique, acide pipémidique, acide oxalinique et acide piromidique) est limitée aux infections urinaires de l'adulte à entérobactéries en raison de leur spectre étroit, de leurs fortes liaisons aux protéines plasmatiques et leur mauvaise tolérance (**Bryskier, 1999 ; Trystam et al., 2002**).

Les résultats de **Timmers et Sternglanz (1998)** montrent que la liaison de la norfloxacin, analogue d'acide nalidixique, à l'ADN dépend du pH et de la Force ionique ; La liaison de la norfloxacin à l'ADN plasmidique a un pH optimum compris entre 4,5 et 6,5. Elle diminue fortement lorsque le pH augmente ou diminue. La liaison de la norfloxacin est inhibée par l'augmentation de la concentration du sel également. Ces résultats ne sont pas en accord absolu avec les résultats de notre travail.

Le travail d'**Irwin et al. (1995)** traitant l'effet du pH sur l'activité des quinolones, comme l'Acide nalidixique, vis-à-vis du *Proteus mirabilis*, montre que l'élévation du pH du milieu de 5 à 9 a augmenté l'activité bactériostatique de l'acide nalidixique et a également été associée à la perte de l'activité bactéricide. Cependant, Le pH alcalin a augmenté les activités bactériostatiques et bactéricides des antibiotiques testés.

Le travail ouvre un champ large de perspectives afin de démontrer l'effet du stress sur l'effet antibactérien des molécules utilisé en thérapeutique. Il est également important de signaler l'absence d'une corrélation logique entre l'évolution du stress et son effet sur

l'interaction bactérie-antibiotique. Ce qui est peut-être dû à la grande diversité des modes d'action des molécules antibactériens et à la diversité de leurs cibles spécifique.

# *Conclusion*

## Conclusion

Dans le cadre de ce travail, nous avons évalué l'effet du stress environnemental (pH et salinité) sur l'interaction bactérie-antibiotique. Les molécules antibactériennes, étant de nature et de structure chimique différentes, réagissent différemment aux conditions de stress susmentionnées. Les bactéries, elles aussi, tolèrent différemment les variations de salinité et de pH, ceci est dû à leurs modalités d'adaptation et aux mécanismes de leurs réponses aux stress.

L'hétérogénéité des résultats obtenus montre clairement que l'effet de stress sur l'interaction bactérie-antibiotique, bien qu'existant, varie d'une bactérie à une autre, d'un antibiotique à un autre et d'un stress à un autre. Les résultats montrent également qu'une bactérie stressée est probablement un organisme à cible modifiée et qu'un antibiotique agissant dans un environnement de stress est probablement un antibiotique altéré.

D'autres études semblent être primordiales afin de :

- ✓ Confirmer l'effet du stress sur l'interaction bactérie-antibiotique.
- ✓ Évaluer l'effet du stress sur la structure chimique de l'antibiotique.
- ✓ Comprendre les mécanismes de perception et d'adaptation au stress engagés par les bactéries stressées.
- ✓ Réévaluer la notion dose-réponse "*in vivo*" des antibiotiques en prenant en considération les propriétés physicochimiques de l'organe ciblé par le traitement.

*Références  
bibliographiques*

## Références bibliographique

**Achaya T.**(2013). Citrate utilization test: Principle, Procedure, expected results and positive organisms, 4p. [Enligne].<http://microbeonline.com/citrate-utilization-testprinciple-procedure-expected-results-and-positive-organisms/> (Consulté le 22/04/2019).

**AFSSA.** 2010. Agence française de sécurité sanitaire des aliments. Avis du 27 mai 2010 relatif à la pertinence d'une révision de la définition des STEC pathogènes, précisée par l'avis Afssa du 15 juillet 2008. Maisons-Alfort: Afssa 19p.

**Alain R. et Bernard J.** (2002). Entérobactéries. Ed Lavoisier. P:29-38.

**Alaoui A.S., Zouhdi M., Benouda A., Bourjouane M. et Alaoui M.A.** (1999). Infections nosocomiales (à propos d'une enquête bactériologique effectuée en milieu hospitalier privé). *Biologie infectieuse*. Tome V: N°1.

**Alekshun M.N. et Levy S.B.** (1999). The mar regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. *Trends in microbiology*, 7(10), 410-413.

**Alekshun M.N. et Levy S.B.**(2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128(6), 1037-1050.

**Anonyme gentamicine.** 2004, Elsevier 2004.

**Avaron J.L., Bannet J.E., Dolin. et Mandell D.B.** (2009). Principles and practice of infectious diseases. *Sixième édition, Elsevier, Churchill Livingstone éditeurs*, USA. Édition en ligne. <http://www.ppidoon-ine.com>.

**Baudry C. et Brézellec H.** (2006). Microbiologie, immunologie. 2ème édition. Groupe Liaisons, 126p. ISBN(2915585261).

**Beggs W.H. et Andrews F.A.** (1976). Role of Ionic Strength in Salt Antagonism of Aminoglycoside Action on *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Infectious Diseases*, 134(5), 500-504.

**Bennett P.M.**(2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British journal of pharmacology*, 153(S1), S347-S357.

**Benyoub K.** (2011). Isolement de souches de *Pseudomonas* à partir des sols et des nécroses d'oliviers de l'Ouest Algérien : Identification et caractérisation biochimique,

sérotypique et phytopathologique. Recherche de l'antibiorésistance, d'antagonisme (bactériocine) et d'ADN plasmidique. Mém. Magistère : faculté des sciences. Univ. des Sciences et de La Technologie Mohamed Boudiaf, Oran, 130 p.

**Berthelot P., Grattard F., Mallaval F.O., Ros A., Lucht F. et Pozzetto B.** (2005). Épidémiologie des infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* et *Stenotrophomonas maltophilia*. Ed Elsevier. Pathologie Biologie. 53: 341-348.

**Boerlin P. et White D.G.** (2006). Antimicrobial resistance and its epidemiology. In: Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, Fourth Edition. Blackwell Publishing, California, USA, p. 27-43

**Bolla J.M., Alibert-Franco S., Handzlik J., Chevalier J., Mahamoud A., Boyer G., Kiec-Kononowicz K. et Pages J.M.** (2011). Strategies for bypassing the membrane barrier in multidrug resistant Gram-negative bacteria. Federation of European Biochemical Societies Letters. 585, 1682-1690

**Bouck N. et Adelberg E.A.** (1970). Mechanism of action of nalidixic acid on conjugating bacteria. *J. Bacteriol.* 102:688-701

**Bryskier A.** (1999). Antibiotiques et agents antibactériens. Ellipses, Paris; 1999. P71-72, 688, 733.

**Calvin M.K., Hua T.H., Van Arsdale White L. et Villarejo M.** (1992). Growth of *Escherichia coli* in Human Urine: Role of Salt Tolerance and Accumulation of Glycine Betaine. *Journal of Infectious Diseases*, 166(6), 1311-1315.

**Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.** 2019.

**Changeur N. et Marlène C.** (2009). Pharmacologie des aminosides (aminoglycosides). P:J.

**Chopra I., O'Neill A.J. et Miller K.** (2003). The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resistance Updates*, 6(3), 137-145.

**Coronado M.J., Vargas C., Kunte H.J., Galinski E.A., Ventosa A. et Nieto J.J.** (1995). Influence of salt concentration on the susceptibility of moderately halophilic bacteria to antimicrobials and its potential use for genetic transfer studies. *Current Microbiology*, 31(6), 365-371.

**Courvalin P., Denis F., Ploy M.C., garilhe M.P.D., Trieu-Culot P. et Universalis.** (2001). "Antibiotiques. "Retrieved 24 mai, 2013, from <http://www.universalisedu.com/encyclopedie/antibiotiques/>.

**Courvalin P.** (2008). La résistance des bactéries aux antibiotiques: Combinaisons de mécanismes biochimiques et génétiques. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*.

**Cowan S.T.** (1954). Abbreviation of bacterial generic names. *Science*. 120 (3131):1103-1104.

**Davies J.E.** (1997). Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. In *Ciba Found Symp* Vol. 207, pp. 15-27.

**Dellit T.H., Owens R.C., McGowan J.E., Gerding D.N., Weinstein R.A., Burke J.P. et coll.** (2007). Infectious diseases society of America and the society for healthcare epidemiology of America guidelines for developing an institutional program to enhance antimicrobial stewardship. *Clin Infect Dis*. 44, 159-77.

**Delihis N. et Forst S.** (2001). MicF: an antisense RNA gene involved in response of *Escherichia coli* to global stress factors. *Journal of molecular biology*, 313(1), 1-12.

**Doublet B., Bousquet-Mélou A. et Madec J.Y.** (2012). Le concept «One Health» en antibiorésistance et les flux de gènes. *Innovation agronomiques*, 24, 79-90.

**Fabre R., Mérens A., Lefebvre F., Epifanoff G., Cerutti F., Pupin H., Tardif D., Cavallo J.D. et Ternois I.** (2010). Sensibilité aux antibiotiques des *Escherichia coli* isolés d'infections urinaires communautaires. *Médecine et maladies infectieuses*, 40:555-559.

**Fauchère J.L. et Avril J.L.** (2002). Bactériologie générale et médicale. Ed Ellipses. Paris. 365 :367 :520p.

**Faure S.** (2009). *Transfert d'un gène de résistance aux bêta-lactamines bla CTX- M-9 entre Salmonella et les entérobactéries de la flore intestinale humaine: influence d'un traitement antibiotique* (Doctoral dissertation).

**Fluit A.C. et Schmitz F.J.** (2004). Resistance integrons and super-integrons. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(4), 272-288

**Galimand M., Sabtcheva S., Courvalin P. et Lambert T.** (2005). Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(7), 2949-2953.

**Ghoul M.** (1990). Halotolerance d'*Escherichia coli*, Effet des osmoprotecteurs naturels. Thèse de doctorat, université de Rennes I, U.F.R. de PHARMACIE. Soutenue publiquement le : 2 juillet 1990.

**Goss W.A., Deitz W.H. et Cook T.M.** (1965). Mechanism of action of nalidixic acid on *E. coli*. II. Inhibition of DNA synthesis. *J. Bact.* 89:1068–1074.

**Guardabassi L. et Courvalin P.** (2006). Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. In *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin* (pp. 1-18). American Society of Microbiology.

**Hancock R.E.** (1997). The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends in microbiology*, 5(1), 37-42.

**Harbottle H., Thakur S., Zhao S. et White D.G.** (2006). Genetics of antimicrobial resistance. *Anim. Biotechnol.*, 17: 111-124.

**Hervé Jacquier.** (2011). Mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques - Conférence internat – Paris Luxembourg.

**Hooper D.V.** (2002). Emerging Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance. *Emerging Infectious Diseases*. 7, 337-341.

**Imhoff J.F.** (1984). Survival strategies of microorganisms in extreme saline environments. *Adv Space Res* 6(12):299–306.

**Irwin N.J., McCoy C.P. et Carson L.** (2013). Effect of pH on their in vitro susceptibility of planktonic and biofilm-grown *Proteus mirabilis* to the quinolone antimicrobials. *Journal of Applied Microbiology*, 115(2), 382–389.

**Joly B. et Reynaud A.** (2003). Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic. Edition: Lavoisier. Paris. 356p

**Krulwich T.A., Lewinson O., Padan E. et Bibi E.** (2005). Do physiological roles foster persistence of drug/multidrug-efflux transporters? A case study. *Nature Reviews Microbiology*, 3(7), 566.

**Kunin C.M., Hua T.H., Van Arsdale White L. et Villarejo M.** (1992-1). Growth of *Escherichia coli* in Human Urine: Role of Salt Tolerance and Accumulation of Glycine Betaine. *Journal of Infectious Diseases*, 166(6), 1311–1315

**Lambert N.Z.** (1995). Antibiothérapie en pratique clinique. Edition : Bergogne-Berezin P. *Dellamonica*. 33-35 p.

**Lavigne J.P., Sotto A., Merle C., Jourdan J., Soussy C.J. et Sirot D.** (2002). Résistance enzymatique d'*Escherichia coli* aux B- Lactarnines et prévalence en clinique. *Pathol. Bio!.*, 50 :388-93.

**Lavigne J.P.**(2007). Effets des antibiotiques et mécanismes de résistance. *Faculté de Médecine Montpellier–Nîmes*.

**Li X.Z., Mehrotra M., Ghimire S. et Adewoye L.** (2007).  $\beta$ -Lactamresistance and  $\beta$ -lactamases in bacteria of animal origin. *Veterinary microbiology*, 121(3-4), 197-214.

**Madigan M. et Martinko J.** (2007). Biologie de Micro-organismes. Université Carbondale de l'Illinois du sud .11e édition. P 702,705, 711,860, 862.

**Mandell G.L., Banett J.E., Dolin R. et Mandell D.B.** (2009). Principales andparctice of infectious diseases. *Sixieme edition, Elservier, Churchill, Livingstone éditeurs, USA*. Edition en ligne.[http: //www.ppidon-line.com](http://www.ppidon-line.com).

**Mark G. et Papich DVM, MS, DACVCP.** (2016). Ceftazidime. In: *Saunders Handbook of Veterinary Drugs*. Fourth Edition. Elsevier.

**Martinez J.L.** (2009). The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1667),2521-2530.

**Matyara F., Kayab A. et DinçerbS.k.** (2008). Antibacterial agents and heavy resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. *Science of the Total Environment*. 407, 279-285.

**McMurry L., Petrucci R.E. et Levy S.B.** (1980). Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proceedings of the national academy of sciences*, 77(7), 3974-3977.

**Messai A.** (2006). Analyse Critique des Pratiques de L'antibiothérapie en Elevages Avicoles. *Graduation of Magister in Veterinary Medicine, Option Pathology, Specialty Poultry and Avian Pathology, University Mentouri, Constantine, Algeria.*

**Meziani M.** 2012 – Contribution du diagnostic biochimique bactérien dans l'établissement des parentés phylogénétiques : Cas des Entérobactéries et *Pseudomonas*. Mém. Magistère : Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Univ. Mentouri Constantine, 68 p.

**Mignaval F., Fontaine B.P.A., Riché A., Nowak C. Cancel D. et Lemaitre F.** (2011). Prédiction a priori des concentrations en gentamicine au pic : utilisation d'un outil simple et pratique, *Pathologie Biologie* 59 (2011)79–82.

**Mouy D., Fabre R., Cavallo J.D., Arzouni J.P., Baynat M., Bicart S.A., Berges J.L., Bouilloux J.P., Galinier J.L., Garrabé E., Gontier P., Grillet N., Lepargneur J.P., Naepels I. Et Payro G.** (2007). Le réseau AFORCOP!-BIO. Community-acquired urinary.

**Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Landry M.L.** (2007). *Manual of clinical microbiology* vol 1. 9th edition. Washington D.C.: American Society for Microbiology, p 740-741.C

**Nabti E., Sahnoune M., Ghouli M., Fischer D., Hoffmann A., Rothballer M., Schmid M. et Hartman A.** (2010). Restoration of Growth of *Durum* Wheat (*Triticum durum* var. Waha) Under Saline Conditions Due to Inoculation with the Rhizosphere Bacterium *Azospirillum brasilense* NH and Extracts of the Marine Alga *Ulva lactuca*. *J. Plant Growth Regul.* 29:6–22.

**Nauciel C. et Vildé J.L.** (2005). Principales familles d'antibiotiques et leur mode d'action Edition : Masson. Paris .49-56p.

**Nauta M.J. et Dufrenne, J.B.** (1999). Variability in growth characteristics of different *E. coli* O157: H7 isolates, and its implications for predictive microbiology. *Quantitative microbiology*, 1(2), 137-155

**Neuzillet Y., Naber K. G., Schito G., Gualco L. et Botto, H.** (2012). French results of the ARESC study: clinical aspects and epidemiology of antimicrobial resistance in female patients with cystitis. Implications for empiric therapy. *Médecine et maladies infectieuses*, 42(2), 66-75.

**Nikaido H.** 1996. Outer membrane. In: Neidhardt FC, ed. *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology Washington DC: ASM Press:29-47.

**Nikaido H.** (2009). Multidrug resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 119-146.

**Ochiai T.** (1999). Salt-sensitive growth of *Staphylococcus aureus*: stimulation of salt-induced autolysis by multiple environmental factors. *Microbiology and immunology*, 43(7), 705-709.

**OMS.** 2014. Premier rapport de l'OMS sur la résistance aux antibiotiques: une menace grave d'ampleur mondiale 2014. Disponible sur :  
(<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/fr/>).

**OMS.** 2015. Résistance aux antibiotiques. Novembre. Disponible sur :  
(<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/fr/>).

**Pallasch T.J.** (2003). Antibiotic resistance. *Dental Clinics of North America*.47, 623-639.

**Pieboji J.G.** 2007. Caractérisation des bêta-lactamases et leur inhibition par les extraits des plantes médicinales. Centre d'ingénierie des protéines. Université de Liège. Thèse de doctorat. p 1-27.

**Prescott L.M.**(2009). *Microbiology*, 5th edition. The McGraw–Hill Companies, New York, USA, p 675.

**Prescott L.M.**(2018). *Microbiology*, 5th edition. The McGraw–Hill Companies, New York, USA, p396.

**Quéau M., Renault J., Uriac P., Corbel J.C., Travert M.F., Bernard T. et Saadaoui M.** (2003). *La fréquence des bactéries multi résistantes à l'hôpital Hassan ii de Settat* (Doctoral dissertation).

**Ratzke C. et Gore J.** (2018). Modifying and reacting to the environmental pH can drive bacterial interactions. *PloS Biol.* 16(3): e2004, p 248.

**Richards D.M. et Brogden R.N.** (1985). Ceftazidime: a review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic. *Drugs.* 29(2): 105-61.

**Richard C. et Keredjian M.** (1995). Méthodes de laboratoire pour l'identification des bacilles à gram négatif aérobies stricts : *Pseudomonas, Alcaligenes, Flavobacterium, Acinetobacter, Brucella, Bordetella*. Inst Pasteur, 2e édition. 2 : 22-26.

**Rouas C.** (2010). Etude des mécanismes mis en jeu lors d'une exposition à l'uranium appauvri sur le système de detoxification *in vivo* et *in vitro*. Thèse pour l'obtention du grade de docteur de l'université Paris XI.

**Simonet M.** (1988). Structure, mode d'action des antibiotiques et mécanismes de la résistance bactérienne. *BERCHE P, GAILLARD L et SIMONET M. Bactériologie: les bactéries des infections humaines. Paris: Flammarion, 575-92.*

**Singleton P.** (2005). Bactériologie pour la médecine, la biologie et la bactériologie. Edition : Durot .Paris. 100-102p.

**Spratt B.G., Zhang Q.Y., Jones D.M., Hutchison A., Brannigan J.A. et Walsh T.R.** (1989). Combinatorial genetic evolution of multiresistance. *Current opinion in microbiology*, 9(5),476-482.

**Stanley J.T., Gunsalus R.P., Lory S. et Perry J.J.** (2007). Biosynthesis of Monomers, Nitrogen Assimilation. *Microbial Life. Second Edition ed. Sunderland MA: Sinauer Associates Inc, 278-282.*

**Sylvie-Carle.** (2009). La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important. *Pharmactuel. 42 : 6-21.*

**Tigaud S.** (2000). Mécanismes de résistance aux antibiotiques. [http://Lyon-Sud.univ-Lyon1.fr/bacterio.Collège/olrbo.html](http://Lyon-Sud.univ-Lyon1.fr/bacterio/Collège/olrbo.html).

**Trystram D., Grenet K., Cambau E., Péan Y., Fiévet M.H., Jarlier V. et Robert J.** (2002). Évolution de la sensibilité aux quinolones et aux fluoroquinolones des bacilles à Gram négatif aérobies isolés dans un hôpital universitaire (1992–2000). *Pathologie Biologie*, 50(1), 30-37.

**Tsai M., Ohniwa, R.L., Kato Y., Takeshita S.L., Ohta T., Saito S. et Morikawa K.** (2011). *Staphylococcus aureus* requires cardiolipin for survival under conditions of high salinity. *BMC Microbiology*, 11(1), 13.

**Veyssier P.**(1999). Inhibiteurs de la dihydrofolate réductase, nitrohétérocycles et 8-hydroxyquinoléines. In : Bryskier A (Eds.), *Antibiotique, agents antibactériens et antibiotiques*. Ellipses, Paris, pp. 1008-1009.

**Wareham D.W. et Wilson P.** (2002). Chloramphénicol in 21st century. 63, 157-161.

**Walsh T.R.** (2006). Combinatorial genetic evolution of multiresistance. *Current opinion in microbiology*, 9(5),476-482.

**Watrman S.R. et Small P.L.C.**(1996). Characterization of the acide resistance phenotype and *rpoS* alleles of shiga-like toxin-producing *Esherichia coli*. *Infection and immunity*, 64, 2808-2811.

**Yala D., Merad A.S., Mohamedi D. et OuarKorich M.N.** (2001). Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, 91(1), 5.

**Zaoui H. et Bouleghlimat I.** (2015). Etude de la néphrotoxicité induite par la gentamicine: effet préventif d'une plante médicinale endémique à l'ALGERIE «Genista ». Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master du toxicologie etsanté.

# Résumé

## Résumé

Les micro-organismes reflètent tout changement de l'un des paramètres de leur environnement sur le reste des éléments qui la constituent. Ce travail évalue l'interaction bactérie-antibiotique sous stress environnemental dû au pH et à la salinité. Pour ceci, deux souches bactériennes *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ont été utilisées. Elles ont été testées vis-à-vis de deux antibiotiques chacune ; Gentamycine/Acide Nalidixique pour *E. coli* et Gentamycine/Ceftazidime pour *P. aeruginosa*. Le stress a été appliqué directement en modifiant la composition du milieu de culture de l'antibiogramme ou celui utilisé pour préparer l'inoculum (stress précoce). Les résultats obtenus montrent clairement que le stress environnemental affecte sévèrement la réponse bactérienne aux antibiotiques. D'autres études plus détaillées sont nécessaires afin de déterminer les modalités de perception du stress par les bactéries, l'effet du stress sur l'antibiotique sa cible et enfin, une réévaluation de la notion dose-réponse "in vivo" des antibiotiques en prenant en considération les propriétés physicochimiques de l'organe cible.

**Mots clés :** Antibiotique, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, Salinité, pH.

## Abstract

Microorganisms reflect any change in one of their environmental parameters on the rest of their constituting elements. This work evaluates the bacteria-antibiotic interaction under environmental stresses, namely due to pH and salinity. Herein, two bacterial strains *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were used. They were tested against two antibiotics each; Gentamycin / Nalidixic acid for *E. coli* and Gentamycin / Ceftazidime for *P. aeruginosa*. The stress was applied directly by modifying the antibiogram's culture medium composition or by affecting inoculum the inoculum used for the antibiogram (early stress). The results clearly show that environmental stress severely affects bacterial response to antibiotics. More detailed studies are needed to determine how bacteria perceive stress, to study the effect of stress on antibiotics and their target sites, and finally, to re-evaluate the "in vivo" dose-response concept of antibiotics, taking into consideration the target organ's physicochemical-properties.

**Keywords :** Antibiotic, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, Salinity, pH.

## ملخص

الكائنات المجهرية تعكس أي تغيير يطرأ في أحد العوامل البيئية على بقية العناصر المكونة لها. هذا العمل يقيم التفاعل بكتيريا-مضاد حيوي تحت تأثير الإجهاد البيئي المتمثل في درجة الحموضة و الملوحة. من أجل هذه التجربة تم استخدام سلالتين بكتيريتين *Escherichia coli* ATCC 27922 و *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. بعد هذا تم اختبار كل منهما ضد نوعين من المضادات الحيوية جنتاميسين / أسيد ناليديكسيك من أجل *E. coli* و جنتاميسين / سيفتازيديم من أجل *P. aeruginosa*. تم تطبيق الإجهاد مباشرة عن طريق تغيير مكونات الوسط الحيوي للأونتيبيو غرام أو ذلك الذي يستعمل في إعداد العينات البكتيرية ( إجهاد مباشر). تبين النتائج المتوصل إليها أن الإجهاد البيئي يؤثر بطريقة واضحة على الاستجابة البكتيرية للمضادات الحيوية. دراسات أخرى معمقة تعد لازمة من أجل معرفة كيفية استجابة البكتيريا للإجهاد البيئي تأثير هذا الأخير على المضاد الحيوي موقع تأثيره و أخيرا إعادة تقييم مفهوم جرعة-استجابة "في الجسم الحي" للمضادات الحيوية مع الأخذ بعين الاعتبار الخصائص الفيزيائية و الكيميائية للعضو المستهدف.

**الكلمات المفتاحية :** مضاد حيوي، *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa*، الملوحة، الحموضة.