

UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Biologiques



Mémoire de Master Académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie

THEME

***Echappement des bactéries Gram négatif
au système de complément***

Présenté par :

M^{elles} SENOUSSE Narimane et Ben Abbes Khawla

Soutenu publiquement :

Le 09/07/2019

Devant le jury :

Mme KHALLEF Sakina.

M. KERBOUA Kheireddine

Mme BOUDJENAH Saliha

M. BOURICHA M'hmed

Président

Promoteur

Co- Promoteur

Examineur

MC -B- UKMOuargla

MAHU. UKMOuargla

Professeur UKMOuargla

MC -B- UKMOuargla

Année Universitaire 2018/ 2019

Remerciement

Tout au long de ce cycle universitaire après de gros efforts et de persévérance de la part de tous ceux qui nous ont accompagné, aidé, encouragé et encadré, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et remerciements à :

Dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté pour réaliser ce travail.

*Nous tenons particulièrement à adresser nos remerciements à Dr **Kerboua Kheïreddine** notre promoteur, pour avoir dirigé ce travail et accepter de nous encadrer, conseiller et de nous orienter dans cette démarche scientifique.*

*Nous tenons à remercier chaleureusement Madame **Boudjnah Salîha** en tant que co-encadreur de ce mémoire, pour son aide, ses encouragements et surtout son soutien moral.*

*Nous remercions également Madame **khellaf sakîna** d'avoir Acceptée la présidence du jury de notre travail, C'est également un grand honneur pour nous d'être jugé par vous.*

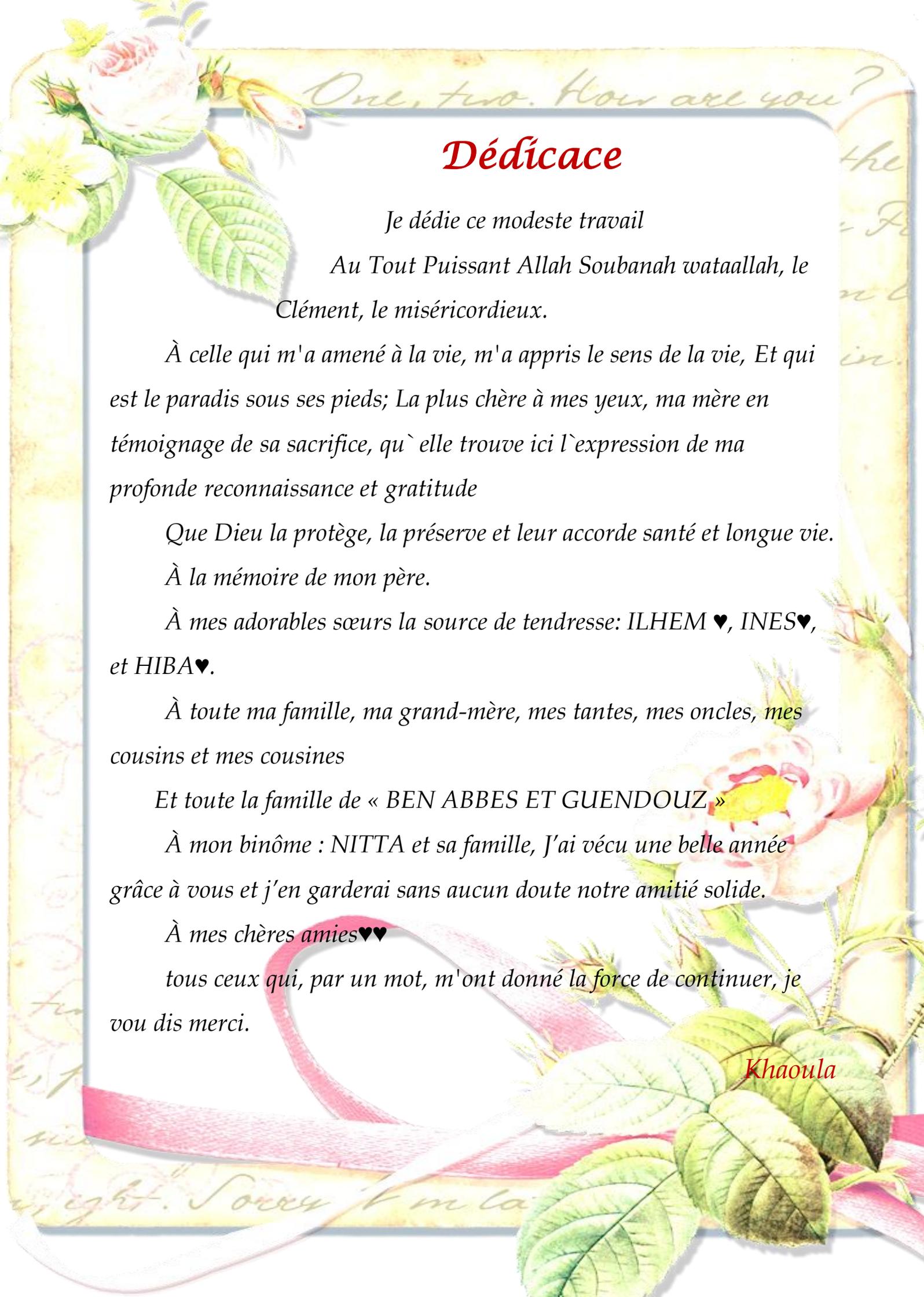
*Nous tenons à exprimer notre reconnaissance envers Mr **Bourîcha M'hamed** d'avoir accepté d'examiner notre mémoire. Nous aimerions exprimer notre gratitude et nos remerciements à tous les membres de jury.*

Nous voulons exprimer nos remerciements les plus sincères à : Tout le staff de l'EPH de Ouargla, de Ghardaïa, de touggourte et de laboratoire El Amel

Nous remercions aussi l'ensemble du personnel travaillant au laboratoire du département de Biologie, à nos enseignants qui nous ont accompagnés pendant notre cursus universitaire.

Nous tenons à remercier également tous le personnel de l'Université de Kasdi Merbah-Ouargla.

Que dieu le tout puissant nous procure une longue vie et beaucoup de santé pour continuer notre noble mission.



One, two. How are you?

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

*Au Tout Puissant Allah Soubanah wataallah, le
Clément, le miséricordieux.*

*À celle qui m'a amené à la vie, m'a appris le sens de la vie, Et qui
est le paradis sous ses pieds; La plus chère à mes yeux, ma mère en
témoignage de sa sacrifice, qu` elle trouve ici l`expression de ma
profonde reconnaissance et gratitude*

Que Dieu la protège, la préserve et leur accorde santé et longue vie.

À la mémoire de mon père.

*À mes adorables sœurs la source de tendresse: ILHEM ♥, INES♥,
et HIBA♥.*

*À toute ma famille, ma grand-mère, mes tantes, mes oncles, mes
cousins et mes cousines*

Et toute la famille de « BEN ABBES ET GUENDOUZ »

*À mon binôme : NITTA et sa famille, J'ai vécu une belle année
grâce à vous et j'en garderai sans aucun doute notre amitié solide.*

À mes chères amies♥♥

*tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer, je
vou dis merci.*

Khaoula

might. Sorry I'm la



One, two. How are you?

Dédicace

*the
- Pa
n l
in.*

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, que je dédie mon travail à ma très chère mère qui m'a soutenu tout au long de ma vie et contribué pleinement dans l'aboutissement et la Réussite de mon parcours scolaire.

Je dédie également ce travail à la mémoire de mon cher et ma chère défunte père et grand-mère que Dieu ait leur âmes et L'accueillent en Son Vaste Paradis.

Mes dédicaces s'adressent également à mon très cher frère Mohamed Labri, ma très chère sœur Manel

je dédie ce travail à ma chère grand-mère, oncles, tantes, ainsi, mes cher (es) cousin(es), amies et mes collègues de Classe

À mon binôme : KHALWA et sa famille .

A tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer.....

A toute la famille : Senoussi et kafi

Narimane

*the
est
ni
right. Sorry I'm la*

Liste des abréviations

ADH : Arginine **dé**hydrolase

AP100 :Activité bactérienne sur la voie alterne du complément

BGN: Bacterie à **G**ram **n**egatif

E. cloacae : *Enterobacter cloacae*

E. coli : *Escherichia coli*

ECB de Pus :Examen Cyto-bacteriologique de pus

ECBU :Examen Cyto-bacteriologique des urines

EPH MB :Etablissement **p**ublic **h**ospitalier **M**ohammed **B**oudiaf

EPH TI: Etablissement **p**ublic **h**ospitalier **T**erichin **I**brahim

GN : **G**élose **n**utritif

GSC : **G**élose au sang **c**uit

H₂S : Sulfure d'hydrogène

K.oxytoca : *Klebsiella oxytoca*

K.pneumoniae: *Klebsiella pneumoniae*

LDC : Lysine **dé**carboxylase

LPS : lipo-polysaccharide

ME :Membrane **e**xterne

MI :Membrane **i**nterne

ODC : Ornithine **dé**carboxylase

ONPG : Orthonitrophényl-β-D-galactopyranoside

P. mirabilis : *Proteus mirabilis*

P.aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

PBS : Phosphate **b**uffered **s**aline

PHN : Plasma **H**umain **N**ormal

PV : Prélèvement **v**aginale

RM : Rouge de **M**éthyle

S.marcescens: *Serratia marcescens*

SC : Système du **C**omplément

TDA : Tryptophane **dé**saminase

TSI : Triple **S**ucre à **I**dentifié

VAC : Voie **a**lterne du **c**omplément

VCC : Voie **C**lassique du **c**omplément

VLC : Voie des **l**ectines du **c**omplément

VP: Voges-**P**roskauer

Liste des Annexes

Annexe 01 : Dénombrement par le logiciel « **ImageJ**© »

Annexe 02 : Tableau de lecture des résultats de la galerie api 20 E

Annexe 03 : Exemple des mesures des zones d'hémolyse

Annexe 04 : Arbre phylogénétique

Annexe 05 : Milieux de culture (Composition en g / l d'eau distillée)

Annexe 06 : Réactifs et solutions

Annexe 07 : Composition et préparation des tampons PBS, EGTA.

Annexe 08 : Répartition des bactéries isolées

Annexe 09 : Identification des bactéries par galerie **API20E**

Liste des Tableaux

Tableau 01: Classification des Entérobactéries	5
Tableau 02: Caractères bactériologiques de certaines bactéries à Gram négatif	6
Tableau 03: Taxonomie de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Benabid, 2009).	14
Tableau 04: Milieux de culture et réactifs	35
Tableau 05: Répartition de l'échantillon étudié	50
Tableau 06: Identification des bactéries par Galerie API 20E	62

Liste des Figures

Figure 01: Voies effectrices du système du Complément.....	21
Figure 02: Régulateurs solubles et membranaires de système de complément.....	23
Figure 03: Les stratégies d'évasion des bactéries au système de complément.....	27
Figure 04: Structure des LPS des bactéries Gram négatif.....	31
Figure 05: Schéma récapitulatif de la technique « AP100 ».....	47
Figure 06: Shéma récapitulatif des principales étapes de l'étude.....	48
Figure 07: Répartition de l'échantillon selon l'espèce identifiée.....	51
Figure 08: Complement residuel (PHN%) en fonction des sites de prélèvement.....	65
Figure 09: Activité bactérienne sur la VAC selon le type de prélèvement.....	66
Figure 10: Degré de la mort bacterienne (log10 kill) en fonction de l'âge des patients.....	66
Figure 11: Degré de la mort bacterienne en fonction du sexe des patients.....	67
Figure 12: Consommation de la voie alterne du complément en fonction des genres bactériens.....	67
Figure 13: Répartition des genres bactériens selon le pouvoir d'échappement.....	68
Figure 14: Répartition des genres bactériens selon l'activité bactériennes sur la VAC.....	69
Figure 15: Répartition des bactéries à fort pouvoir d'échappement selon la capsule.....	69
Figure 16: Répartition des bactéries encapsulées a fort pouvoir d'échappement et de consommation.....	70
Figure 17: Résultat de suivie de l'activité bactérienne sur la voie alterne du complément.....	71
Figure 18: Pouvoir d'activation de la VAC en fonction du degré de la mort bactérienne.....	72

Liste des Photos

Photo 01: Aspect des six souches sur GN	52
Photo 02: Aspect des colonies sur milieu GSC.....	53
Photo 03: Coloration de la capsule.....	54
Photo 04: Bacilles à Gram négatif (coloration de Gram)	55
Photo 05: Test de catalase positive.....	55
Photo 06: Test d'oxydase	56
Photo 07: Aspect du milieu TSI.	57
Photo 08: Aspect du milieu mannitol-mobilite	58
Photo 09: Aspect du milieu citrate de Simmons.	59
Photo 10: Aspect du milieu urée-indole.	59
Photo 11: Aspect du test de production d'Indole	60
Photo 12: Aspect de test TDA -.....	60
Photo 13: Test ONPG.....	61
Photo 14: Test VP-RM.....	61
Photo 15: Production de pigment	62
Photo 16: E. coli par galerie API20E	62
Photo 17: Résultat de l'Activité hémolytique de la voie alterne de complément sur les bactéries isolées (AP100).....	63
Photo 18: Survie bactérienne suite à l'effet bactéricide complément-dépendant	64

Remercîment

Dédicace

Listes des abréviations

Liste des annexes

Listes des tableaux

Listes des figures

Listes des photos

Table des matières

Introduction.....1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I: Généralité sur les bactéries à Gram négatif

1. Les Entérobactéries	4
1.1. <i>Serratia marcescens</i>	7
1.1.1. Définition	7
1.1.2. Caractères bactériologiques	7
1.1.3. Facteurs de pathogénicité.....	7
1.2. <i>Klebsiella sp</i>	8
1.2.1. Définition	8
1.2.2. Caractères bactériologiques	8
1.2.3. Facteur de pathogénicité	8
1.3. <i>Escherichia coli</i>	9
1.3.1. Définition	9
1.3.2. Caractères bactériologiques	9
1.3.3. Facteurs de pathogénicité.....	9
1.4. <i>Proteus mirabilis</i>	11
1.4. 1. Définition	11
1.4.2. Caractères bactériologiques :	11
1.4. 3. Facteurs de pathogénicité.....	11
1.5. <i>Enterobacter cloacae</i>	
1.5.1. Définition	12
1.5.2. Caractères bactériologiques :	13
1.5.3. Facteurs de pathogénicité.....	13

2. Les bacilles à Gram négatif non fermentaires	13
2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
2.1.1. Définition	14
2.1.2 . Caractères bactériologiques	14
2.1.3. Facteurs de pathogénicité.....	14

Chapitre II : Système du complément

1. Voies d'activation	19
1.1. Voie classique	19
1.2. Voie des lectines	19
1.3. Voie alterne.....	20
2. Voies effectrices du système du Complément	20
2.1. Voie d'amplification	20
2.2. Voie finale commune.....	21
3. Maladie liée au complément	23
3.1. Hypo-activation de système de complément	23
3.2. Hyper-activation de systèmes de complément : La transplantation des organes	24
3.3. Complément et leur double rôle dans le cancer.....	24

Chapitre III : Echappement des BGN au système du complément

1. Imitation des protéines régulatrice du complément	27
2. Inactivation des protéines du complément par dégradation enzymatique (sécrétion des protéases)	28
3. Acquisition de régulateurs de complément de l'hôte.....	29
4. Expression de petites molécules d'évasion au complément.....	30

PARTIE PRATIQUE

Matériels et Méthodes

1. Lieu et durée du stage.....	35
2. Echantillonnage	35
3. Méthodes	36

Résultats et Interprétation

1. Analyse descriptive de l'échantillon	50
1.1 Nombre d'échantillon collecté selon le site de prélèvement	50
1.2 Répartition selon le site	50

Table des matières

1.3 Répartition selon l'âge.....	50
1.4 Répartition selon le sexe des patients	50
1.5 Répartition des souches identifier selon l'espèce	51
1.6. Répartition de l'échantillon selon type de prélèvement	51
2. Analyse bactériologique.....	51
2.1. Etude macroscopique.....	51
2.2. Etude microscopique	54
2.2.1. Etat frais	54
2.2.2. Coloration de la capsule.....	54
2.2.3. Coloration de Gram	54
2.3. Etude biochimique 2.3.1. Identification par la galerie classique.....	55
2.3.2. Identification par la galerie API 20 E	62
3. Etude de l'interaction « Bactérie-Voie alterne du complément ».....	63
3.1. Activité hémolytique de la voie alterne de complément sur les bactéries.....	63
3.2. Dosage de l'activité bactéricide de complément	63
3.2. 1. Dosage de degré de la mort bactérienne (\log_{10} kill) :	63
4 Analyse statistique des résultats.....	64
4.1 Selon le site de prélèvement	64
4.2 Selon le type de prélèvement.....	64
4.3 Analyses-en sous groupe (échantillon scindé).....	64
4.4 Selon l'âge	66
4.5 Selon le sexe	66
4.6 Selon la consommation de la voie alterne du complément	67
4.7 Répartition des genres Selon la survie après contact avec la VAC.....	68
4.8 Répartition des genres bactériens selon l'activité bactériennes sur la VAC	68
4.9 Répartition des bactéries à fort pouvoir d'échappement à la VAC selon la capsule.....	69
4.10 Suivie chronologique de l'activité bactérienne sur la voie alterne du complément	70
4.11 Lien entre la consommation du complément et la mort bactérienne.....	72
4.12 Selon la relation phylogénétique	72
Conclusion.....	79
Références bibliographiques	
Annexes	
Glossaire	
Résumé	

INTRODUCTION

Les bactéries à Gram négatif constituent une menace majeure pour la santé humaine en milieu communautaire et hospitalier et dont les infections posent un véritable problème de santé publique du fait de leur fréquence, leur gravité et leur coût socioéconomique (**Heesterbeek *et al.*, 2019**). Leur pathogénicité dépend de plusieurs paramètres y compris le contrôle du système immunitaire dans le contexte de l'interaction hôte-pathogène qui détermine l'issue de l'infection. L'hôte assure le maintien de son intégrité en éliminant ces constituants étrangers grâce à son système immunitaire. 99% de agents infectieux sont éliminés par l'immunité innée axée essentiellement sur le système du complément et les cellules phagocytaires. Les bactéries à Gram négatif sont caractérisées par leur lipopolysaccharide, un puissant PAMP (Pathogen Associated Microbian Pattern) activateur de la voie alterne. Sur le plan chronologique de la réponse antibactérienne la voie alterne du complément est la première composante immune qui s'active à la surface bactérienne pour aboutir à une mort par lyse osmotique et par la facilitation de la phagocytose grâce à opsonine C3b (**Lambris *et al.*, 2008**).

Cependant, Au cours de l'évolution des espèces microbiennes par de nombreuses interactions hôtes-agents infectieux ; de nombreuses bactéries se sont dotées de mécanismes de contrôle de la réponse immune leurs permettant d'échapper à la lyse complément-dépendante afin d'assurer une survie plus longue (**Lambris *et al.*, 2008**).

Comprendre les mécanismes d'échappement de ces bactéries à la voie alterne du complément permet de dénouer la complexité de l'interaction BGN-VAC qui explique la pathogénicité de ces bactéries et qui pourrait constituer une avancée dans le développement de thérapies antibactériennes ciblant le contrôle bactérien de la VAC (**Ootes, 2014**).

Notre étude visait dans cette recherche fondamentale et appliquée à comprendre les interactions hôte-pathogène par l'étude de certains mécanismes d'échappement des bactéries à Gram négatif à la voie alterne du complément, de caractériser et d'évaluer le comportement des différents genres des BGN et leur activité sur ce système de défense .

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I

Les entérobactéries et les bacilles à Gram négatif non fermentaires occupent une place très importante en pathologie humaine infectieuse. Cette importance s'explique aussi bien par la variété des espèces bactériennes qui les composent que par leur incidence au niveau de la santé des populations.

Les familles des entérobactéries et des bacilles à Gram négatif non fermentaires comptent actuellement plus de 100 espèces bactériennes. Mais dans les laboratoires ne sont isolées, avec une certaine fréquence, qu'une vingtaine d'espèces bactériennes qui peuvent présenter un intérêt médical, voir même être potentiellement pathogènes. (Fauchère *et al.*, 2002)

1. Les Entérobactéries

Famille de bactéries usuellement rencontrées en bactériologie médicale. La plupart des espèces sont des hôtes commensaux ou pathogènes du tube digestif de l'homme et des autres mammifères. Des genres plus récemment décrits sont plutôt des bactéries de l'environnement. Les espèces les plus communément isolées en bactériologie clinique appartiennent à 12 genres: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* et *Yersinia*. (Carbonnelle *et al.*, 1987)

En fait, les *Enterobacteriaceae* ont une définition bactériologique, ce sont des bactéries (Trystram, 2003 ; Bousseboua, 2005).

- Bacilles ou coccobacilles à Gram négatif (2 à 4 μ de long sur 0,4 à 0,6 μ de large);
- Mobiles avec ciliature préritrice ou immobiles;
- Non exigeants poussant sur des milieux de culture ordinaires ;
- Aérobie - anaérobie facultatif ;
- Fermentant le glucose avec ou sans production de gaz ;
- Nitrate réductase positive (réduisant les nitrates en nitrites) ;
- Oxydase négatif;
- Catalase positif à l'exception de *Shigella dysenteriae*
- Non sporulés. (Denis *et al.*, 1998)

Des subdivisions hiérarchiques quant à la classification des entérobactéries et ce, comme le soulignent Boone *et al.*, (2001) à travers le **Tableau 1**.

Tableau 01: Classification des Entérobactéries

Rangs taxonomiques	Classification
Domaine	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Enterobacteriales</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>

Le tableau ci-dessous englobe les caractères bactériologiques de certaines bactéries Gram négatif. (Winn *et al.*, 2005 ;Grimont et Grimont, 2006 ;Paterson, 2005 ;Pickering *et al.*,2009 ; Bergan, 1984 ;Clave, 2012 ; Hart, 2006 ;Leclerc, 1983 ; Maryse, 2004 ;Avril *et al.*, 2000 ;Avril, 1992 ; El Fertas-Aissani *et al.*, 2012 ; Hart, 2006 ; Holt, 1994 ; Lefrere, 2000 ; Maryse et Danielle, 2004 ; Oulymata, 2007 ; Srinivasan *et al.*, 2012)

	<i>*Serratia marcescens</i>	<i>*Klebsiella pneumoniae</i>	<i>*Klebsiella oxytoca</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>*Enterobacter cloacae</i>	<i>**Pseudomonas aeruginosa</i>
Forme	bacille	bacilles	bacilles	Bacille ou coccobacille	Bacille	Bacille	Bacille
Taille	5-0.8 µm de diamètre 0.9-2 µm de longueur	/	/	2 à 4µ de long sur 0,4 à 0,6 µ de large	0,4 à 0,8 µm de diamètre sur 10 µm à 80 µm de longueur	0,6 à 1 µm de diamètre et 1,2 à 3 µm de longueur	0.5 à 0.8 µm de diamètre sur 1 à 3µm de long
Mobilité	+ (ciliature péritriche)	immobiles	immobiles	+ (ciliature péritriche)	++	+ flagelle péritriche et pilis de classe 1	+ ciliature monotriche
Spore	-	-	-	-	-	-	-
Capsule	-	+ 95%	+ 80-75%	+/-	+ 80%	+	-
Exigence	-	-	-	-	-	-	-
Oxydase	-	-	-	-	-	-	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
VP	+	+	+	-	-	+	/
ONPG	+	+	+	+	+		/
ODC				+/-			/
LDC				90% +		-	/
ADH	-			+/-			+
TDA	-				+		-
H2S	-	-	-	-	+		-
Uréase	-	+	+	+/-	+		/
Type respiratoire	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF		AS
Enzymes	Lipase+ gélatinase + Dnase+	Lipase+ gélatinase + Dnase+	Lipase+ gélatinase + Dnase+	Gélatinase -	/	Lipase- Dnase-	
Indole		-	+	+		-	/
RM		-	-	+	+	-	/
Citrate		+	+	-			-
Nitrate réductase				+	+		+
Sucre	/	Sorbose(-)	Sorbose(+)	Glucose(+), lactose(+), mannitol(+), sorbitol(+)	Glucose(+)	Glucose(+)	/

Tableau 02: Caractères bactériologiques de certaines bactéries à Gram négatif

AAF : aérobie anaérobie facultatif

AS : aérobie stricte

* : Elles font partie du groupe "KESH" (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* et *Hafnia* mais rare.) (Richard et al., 1992).

** : *Pseudomonas aeruginosa* produit deux types de pigments (fluorescents ou non) qui servent à son identification. Ils peuvent être mis en évidence dans le milieu de King B et King A.

- Pyoverdine : pigment jaune-vert fluorescent, soluble dans l'eau, insoluble dans le chloroforme.
- Pyocyanine (phénazinique) : pigment bleu-vert non fluorescent soluble dans l'eau et le chloroforme. Cette espèce est la seule à le produire. (Delarras, 2007).

Par ailleurs Denis (2007) signale trois types de colonies qui peuvent être observés simultanément ou de manière isolée sur milieux solides :

- Colonies larges "la" de 2 à 3 mm de diamètre à bord irrégulier rugueuses une partie centrale bombée présentant des reflets métalliques.
- Colonies plus petites lisses "S" bombées à bord régulier.
- Colonies muqueuses "M" bombées coalescentes, filantes.

1.1. *Serratia marcescens*

1.1.1. Définition

S. marcescens est une espèce ubiquitaire qui se trouve dans la nature (eau, sol, plantes, insectes, animaux et aliments), dans l'environnement hospitalier (sol, air, eau ou siphons des éviers) et le matériel médical (matériel d'aérosols, appareillage d'endoscopie, matériel et solutés de perfusion) (Avril, 1992; Tanaka *et al.*, 2004; Mahlen, 2011).

Cette bactérie est considérée comme pathogène opportuniste, elle touche le personnel hospitalier ou les patients au niveau de certaines muqueuses telles que le nez, la gorge et le tube digestif (Christensen *et al.*, 1982; Byrne *et al.*, 2001).

1.1.2 Caractères bactériologiques (tableau 02)

1.1.3. Facteurs de pathogénicité

Serratia marcescens est capable de produire plusieurs facteurs de pathogénicité (Mahlen *et al.*, 2011).

1.1.3.1. Produits extracellulaires

Mis à part, la production de la marcescesine qui est une bactériocine (Nasu, 1981), *S.marcescens* sécrète la chitinase extracellulaire, une nucléase et une lipase (Hines *et al.* 1988), elle produit également beaucoup d'autres enzymes, telles que les métalloprotéases, la gélatinase et la protéase

alcaline (Matsumoto, 2004, Pinna *et al.*, 2011), la chloroperoxydase, une protéine extracellulaire appelée, HasA (Hejazi and Falkiner, 1997) et de l'hémolysine (Shimuta *et al.*, 2009).

1.1.3.2. Adhérence et hydrophobicité

L'adhésion bactérienne est généralement reconnue comme étant la première étape de la formation d'un biofilm, la capacité d'une bactérie d'adhérer est un facteur certain de virulence. Les pilis ont un facteur déterminant de l'adhérence microbienne aux surfaces épithéliales (Reid and Sobel, 1987), *S. marcescens* possède des pili et adhère aux cellules uroépithéliales (Yamamoto *et al.* 1985). Deux classes d'adhésines ont été suggérées à *S. marcescens*; pili dites «sensibles au mannose» (MS), car elles sont inhibées par l'addition du mannose, et pili dites «résistantes au mannose» (MR) qui agglutinent les érythrocytes en présence de mannose.

1.1.3.3. Lipopolysaccharide

Les lipopolysaccharides (LPS) sont des composants essentiels de la paroi bactérienne des bactéries à Gram négatif y compris de *S. marcescens*. Sur le plan immunologique, les lipopolysaccharides sont des lipides complexes auxquels sont attachés des polysaccharides qui sont responsables de la spécificité antigénique de l'antigène O. Sur le plan physiopathologique, ils sont extrêmement toxiques, ils représentent l'endotoxine des bactéries à Gram négatif y compris *S. marcescens* (Oxley and Wilkinson, 1989 ; Hejazi and Falkiner, 1997).

1.2. *Klebsiella sp*

1.2.1. Définition

Selon Brisse (2004), *Klebsiella sp* est une bactérie pathogène opportuniste. On distingue sept espèces : *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella terrigena* et *Klebsiella ornitholytica* (Fauchere *et al.*, 2002). *Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella oxytoca* sont les plus répandues dans la nature (Leon *et al.*, 1989). Elles sont fréquemment rencontrées dans les eaux de surface, le sol, le bois et les végétaux (El Fertas-Aissani *et al.*, 2012).

1.2.2. Caractères bactériologiques (tableau 02)

1.2.3. Facteur de pathogénicité

1.2.3.1. Capsule

Leur capsule a été le premier facteur de virulence décrit (Hennequin *et al.*, 2012 ; Hsieh, 2012). Elle confère à *Klebsiella* un fort pouvoir invasif en protégeant les bactéries contre la phagocytose, contre l'action bactéricide du sérum ; elles s'opposent à la pénétration des

antibiotiques (**Spicer, 2000**). C'est une véritable enveloppe de nature polysaccharidique présentant un antigène K (**Hennequin et al., 2007**).

Parmi les 77 sérotypes capsulaires K 1, K2, K21 et K55 sont associés aux souches les plus virulentes. Le lipo-polysaccharide protège la bactérie du pouvoir bactéricide du sérum (**Joly et Reynaud, 2002**).

1.2. 3.2. Facteurs d'adhésion

Les facteurs d'adhésion produits par la majorité des souches dont deux types ont été mis en évidence chez des souches pathogènes pour l'Homme : les pili de type 1 et de type 3 qui permettent l'adhérence de la bactérie à la face baso-latérale des cellules trachéales et bronchiques et une adhésine non filamenteuse qui permet l'adhérence de la bactérie aux cellules intestinales et uro-épithéliales (**Joly et Reynaud, 2002 ;Hennequin et al., 2007**).

Klebsiella pneumoniae peut produire des fimbriae de type 1 qui semblent être impliquées dans l'attachement aux cellules ciliées de l'appareil respiratoire et aux cellules vésicales . Elle peut également produire des fimbriae de type 3 (**Stahlhut, 2012 ; Aartsen, 2012**).

1.3. *Escherichia coli*

1.3.1. Définition

E. coli est une espèce commensale du tube digestif de l'homme et des animaux. (**Avril et al., 2000**).

À ce jour les différents pathotypes d'*E. coli* sont classés en sept groupes concernant les pathogènes intestinaux (InPEC): les *E. coli* adhérent-invasive (AIEC), *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC), *E. coli* entérohémorragiques (EHEC), *E. coli* entérotoxinogènes (ETEC), *E. coli* entéroinvasives (EIEC), *E. coli* à adhérence diffuse (DAEC), *E. coli* entéroaggrégatives (EAEC). Le dernier groupe comprend les *E. coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC). Les pathotypes EIEC et EAEC sont décrits comme présents uniquement chez l'humain, tandis que les autres infectent aussi les animaux (**Kaper et al., 2004, Palaniappan et al., 2006**).

1.3.2. Caractères bactériologiques (tableau 02)

1.3.3. Facteurs de pathogénicité

Les facteurs associés à la virulence des *E. coli* sont très nombreux et regroupent des fimbriae, des flagelles, des polysaccharides de surface (capsule et lipopolysaccharides), des systèmes

d'acquisition du fer (sidérophores), des auto-transporteurs et des toxines (**Ronald, 2008 ; Jaureguy, 2009**).

1.3.3. 1. Systèmes d'acquisition du fer

Le fer est un élément essentiel à la survie de la plupart des micro-organismes. Ce métal de transition est impliqué dans beaucoup de réactions métaboliques comme la biosynthèse de l'ADN ou la régulation génique. Comme barrière contre le développement des micro-organismes, l'hôte séquestre le fer afin de le rendre moins disponible. (**Dho-Moulin et al., 1999 ; Simon et al., 2003 ; Wiles et al., 2008 ; Garénaux et al., 2011**).

Les bactéries ont développé de petites molécules d'acquisition du fer nommées sidérophores. En raison de leur très forte affinité pour le Fe^{+3} , les sidérophores peuvent «extraire» le fer lié aux ferroprotéines de l'hôte (transferrine, lactoferrine, etc..). Cela permet aux bactéries de coloniser des niches biologiques où le fer est peu disponible, dont le tractus urinaire. (**Simon et al., 2003 ; Faraldo et al., 2003 ; Wiles et al., 2008**).

1.3.3. 2 Flagelles

Les flagelles servent à la motilité des bactéries. Ils mesurent 20 nm de largeur et ont une longueur qui varie de 2 à 3 fois la taille de la cellule. Ils se composent d'un corps basal, d'un crochet et d'un filament flagellaire composé de flagélline (antigène H). De cinq à dix flagelles peuvent être observés, répartis autour de la bactérie et plus de quarante gènes sont impliqués dans la production de ceux-ci (**Macnab, 2003**). Ils permettent aux bactéries de se déplacer d'un milieu à un autre. La direction empruntée par la bactérie est donnée par chimiotactisme. C'est-à-dire que les bactéries sont capables de détecter les variations de leur milieu, telles la quantité de nutriment ou la toxicité.

Différents signaux sont émis via l'intermédiaire de protéines membranaires, incitant la production de flagelles. Ainsi la bactérie peut se diriger vers une source de nourriture ou encore fuir un environnement trop hostile (**La Ragione et al., 2002**). Chez les uropathogènes *Escherichia coli* (UPEC), les flagelles ne sont pas essentiels à la colonisation du tractus urinaire. Cependant ils confèrent un sérieux avantage en leur permettant de migrer de l'urètre à la vessie puis vers les reins. Ils leur permettent de coloniser une plus grande partie du tractus urinaire (**Lane et al., 2005**).

1.3.3. 3. *Hémolysine*

L'hémolysine est toxique pour un grand nombre de types cellulaires . Elle provoque la lyse des érythrocytes et donc une inflammation et un affaiblissement des défenses immunitaires . Il existe trois types d'hémolysines.

l' α -hémolysine est représentée chez plus de 50% des UPEC (**Beutin, 1991, J R Johnson, 1991**).L' α -hémolysine forme des pores dans la membrane plasmique des érythrocytes . Cela induit notamment la lyse des cellules et un relargage de nutriments dans le milieu .cette toxine détruit les cellules de l'urothélium et crée une hémorragie . Cela permet à la bactérie d 'atteindre le système sanguin et de causer une septicémie (**Macnab, 2003**).

1.3.3. 4. *Fimbriae*

Les fimbriae (ou pili) servent à l'attachement des bactéries aux cellules de l 'hôte. . Un flux constant d'urine est présent dans la vessie , les bactéries doivent pouvoir y faire face afin de ne pas être expulsée . Elles doivent pouvoir« se coller aux cellules» en dépit de la pression de l'environnement. Un fimbriae efficace dans un organe ne le sera pas forcément dans l'autre (**Hacker et al., 2000, Lobel et al., 2007**). Les fimbriae les plus importants pour la colonisation chez les UPEC sont les fimbriae de type 1, P et FIC (**Kaper et al., 2004, Ronald, 2008**).

1.4. *Proteus mirabilis*

1.4. 1. Définition

Le genre *Proteus* est classiquement placé dans la tribu des *Proteae*. Actuellement, ce genre rassemble cinq espèces. Ce sont des bacilles à Gram négatif, mobiles qui sont largement répandus dans la nature et sont isolées du sol, de l'eau, de l'intestin de l'homme et de nombreuses espèces animales. *Proteus mirabilis* est l'espèce la plus fréquemment isolée de prélèvements cliniques. C'est la bactérie la plus souvent isolée des urines et elle est à l'origine d'infections graves et parfois mortelles (**Sougakoff et al., 2003**).

1.4.2. Caractères bactériologiques : (tableau 02)

1.4. 3. Facteurs de pathogénicité

Proteus mirabilis est une bactérie bien adaptée à l 'hôte. La colonisation du tractus urinaire est accomplie grâce à l 'expression de plusieurs facteurs de virulence . Ces facteurs sont liés aux

processus d'adhésion, à la toxicité, à l'évasion et à la motilité. De nouveaux génomes de cette bactérie ont été séquencés (**Cristiani et al., 2014**),

Proteus mirabilis est très virulente et contient de nombreuses caractéristiques qui l'aident dans sa pathogénicité. Elle possède un flagelle qui est nécessaire pour la motilité et qui est impliqué dans l'apparition des infections. Cette bactérie produit également de l'uréase, qui est responsable des calculs rénaux à la suite de l'hydrolyse de l'urée en ammoniac. En outre, l'hémolysine que la bactérie sécrète est cytotoxique pour les cellules épithéliales des voies urinaires qui sont soumis à l'invasion par les *Proteus* (**Misra et al., 1984**).

1.4.3.1. Uréase

Proteus présente une activité uréase lors d'un contact avec l'urée. L'uréase provoque la décomposition de ce dernier en ammoniac et en dioxyde de carbone (**Mclean et al., 1988**). Donc l'ammoniac augmente le pH et provoque la précipitation des minéraux dans l'urine, ce qui peut conduire à des calculs de la vessie et du rein. Ainsi que la formation de biofilms cristallins le long d'un cathéter (**Jones et Mobley, 1991**). Cette modification du pH est importante lors de la colonisation de *Proteus* de cathéter, ce qui facilite l'adhérence bactérienne (**Nicholson et al., 1991**).

1.4.3.2. Hémolysine

L'hémolysine est une toxine qui s'insère dans les membranes cellulaires des eucaryotes. L'activité hémolytique est communément retrouvée chez les bactéries à Gram - et Gram +. La fonction hémolytique est de former des pores dans les cellules hôtes cibles, ce qui permet au *Proteus* de se propager dans les reins lors de l'infection (**Cocker et al., 2000**). Ceci est probablement médité par la capacité accrue des cellules hémolytiques de cette bactérie à envahir les tissus de l'hôte (**Peebooms et Verwrij, 1984**). Cette hémolysine n'est pas aussi active au cours de l'infection in vivo où l'activité d'autres facteurs de virulence masquent sa contribution (**Mobley et al., 1991**). D'autres études ont indiqué également que les souches qui n'ont pas une activité hémolytique sont moins virulentes (**Peebooms et Verwrij, 1983**).

5. *Enterobacter cloacae*

1.5.1. Définition

Enterobacter cloacae est une espèce qui appartient à la famille des entérobactéries. Elle a pris ces dernières années une importance croissante du fait de son implication dans les infections nosocomiales et de sa capacité à acquérir des mécanismes de résistance (**Lakhal et al., 2010**).

Lefrère, (2000) signale que ces bactéries telluriques sont présentes respectivement dans l'environnement, fréquemment retrouvées dans les eaux de surface, le sol et les végétaux, mais également dans le tube digestif de l'homme et des animaux. C'est une bactérie pathogène opportuniste responsable en milieu hospitalier d'infections urinaires, de bactériémies, de méningites ou de suppurations diverses (**Iabadene et al., 2010**).

1.5.2. Caractères bactériologiques : (tableau 02)

1.5.3. Facteurs de pathogénicité

Leurs mécanismes pathogènes sont mal compris. A l'instar de certaines souches de *Klebsiella*, elles expriment des fimbriaes de types 1 et 3. La plupart des souches expriment également un système d'absorption du fer par l'aérobactine mais généralement associé à des agents pathogènes bactériens extra-intestinaux. Les souches peuvent produire une hémolysine ressemblant à l' α -hémolysine produite par les souches d'*E. coli*. Ainsi qu'une protéine de la membrane externe, appelée OmpX qui peut être un facteur de pathogénicité pour les souches de *E. cloacae*. Cette protéine semble réduire la production de porines, entraînant une diminution de la sensibilité aux antibiotiques β -lactamines, et pourrait jouer un rôle dans l'invasion des cellules hôtes. (**Chart, 2012**).

Certaines souches d'*E. cloacae* possèdent une entérotoxine de bas poids moléculaire, thermostable et thermolabile, suffisante pour provoquer une diarrhée (**Klipstein et Engert, 1976**). Il a été démontré que certaines souches d'*E. cloacae* se sont avérées posséder une toxine II de type Shiga (SLT-II) et étaient associées à un cas de syndrome hémolytique et urémique (SHU), (**Paton et Paton 1996**).

2. Les bacilles à Gram négatif non fermentaires

Les bacilles à Gram négatif non fermentants sont des bactéries ubiquitaires retrouvées dans l'environnement (sols, eaux...) et pouvant 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**).

Ces bactéries, cultivent sur milieux ordinaires et possèdent un métabolisme respiratoire strict (utilisation de l'oxygène comme accepteur terminale d'électrons). A noter que certains genres peuvent utiliser les nitrates comme accepteur terminal d'électrons en anaérobiose (**Denis et al., 2007**).

Environ 15 % de tous les bacilles à Gram négatif se développant en aérobiose, isolés dans les laboratoires de bactériologie médicale, sont des non fermentaires. Deux espèces : *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter* représentent jusqu'à 75 % de ces isollements.

Les bacilles à Gram négatif non fermentaires sont à l'heure actuelle mieux classées grâce à de nombreuses études génétiques ADN-ADN ou ARN-ADN.

Schuster, (2001) distingue un certain nombre de genres ; il s'agit principalement de :

- *Pseudomonas* - *Burkholderia*- *Ralstonia*- *Comamonas*- *Brevundimonas* *Sphingomonas*- *Stenotrophomonas*- *Chryseomonas*- *Flavimonas*- *Shewanella* - *Acinetobacter*- *Chryseobacterium*- *Flavobacterium*- *Weeksella*- *Alcaligenes*- *Sphingobacterium*- *Agrobacterium*.

2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

2.1.1. Définition

Pseudomonas aeruginosa, autrement connu sous le nom de bacille pyocyanique. (**Spicer, 2000**). C'est une bactérie Gram -négatif opportuniste vivant normalement à l'état saprophyte dans l'eau, les sols humides et les végétaux, mais qui peut également vivre à l'état commensale sur la peau ou à l'intérieur du système digestif de divers animaux (**Sabin, 2006**).

Pseudomonas aeruginosa est l'espèce type de *Pseudomonas*, également composé de 12 autres membres (**Yeterian, 2010**). La taxonomie de *Pseudomonas aeruginosa* est représentée dans le **tableau 7**

Tableau 03: Taxonomie de *Pseudomonas aeruginosa* (**Benabid, 2009**).

Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Prokaryota</i>
Division	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Pseudomonadales</i>
Famille	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genre	<i>Pseudomonas</i>
Espèce	<i>Aeruginosa</i>

2.1.2 . Caractères bactériologiques : (tableau 02)

2.1.3. Facteurs de pathogénicité

Pseudomonas aeruginosa est invasive en raison de la production de facteurs de virulence de surface (qui lui permettent de s'attacher, de coloniser et d'envahir les tissus), et secrétés (qui

endommagent les tissus et déclenchent de s processus inflammatoires). Il est souvent difficile de distinguer entre colonisation et invasion pathogène en l'absence d'outil diagnostique adéquat (Mesaros *et al.*, 2007).

2.1.3. 1. Facteurs de virulence de surface

Les facteurs de virulence de surface incluent le flagelle, le pili, les LPS....

- **Flagelle**

Pseudomonas aeruginosa possède un seul flagelle polaire qui est responsable de la mobilité (Kohler *et al.*, 2000). Le flagelle serait également impliqué dans l'adhérence aux cellules épithéliales re spiratoires (Feldman *et al.*, 1998). Ce flagelle participe aussi à la virulence en induisant une réponse inflammatoire par interaction avec les récepteurs Toll , TR5 et TR2, ce qui a pour conséquence la production d'IL-8, d'IL-6 et de mucine (Adamo *et al.*, 2004).

- **Pili de type IV**

Le pili de type IV est la principale adhésine de *Pseudomonas aeruginosa* responsable de l'adhésion aux cellules épithéliales (Hahn, 1997).

- **Lipopolysaccharide (LPS)**

P. aeruginosa est capable de synthétiser deux formes de LP S A et B (Lam *et al.*, 1989). Selon que l'antigène O est présent ou absent sur le cœur oligosaccharidique , on parle respectivement de phénotype lisse ou rugueux . Le phénotype lisse a été souvent décrit comme plus virulent qu'un mutant isogénique po ssédant un phénotype rugueux (Cryz, 1984). De plus, les souches "rugueuses" de *Pseudomonas aeruginosa* sont lysées par le sérum humain , alors que les souches possédant un LPS lisse sont résistantes au sérum (Dasgupta *et al.*, 1994).

2.1.3.2. Facteurs de virulence sécrétés

Au cours de la phase d'adhésion, *Pseudomonas aeruginosa* est capable de produire un grand nombre des facteurs de virulence pour provoquer une lésion tissulaire (Guery *et al.*, 2009).

- **Pyocyanine**

La pyocyanine est un pigment bleu sécrété par la bactérie , qui est impliqué dans de nombreux mécanismes pathogènes (Kipnis *et al.*, 2004). Elle réprime la réponse immunitaire de la cellule hôte, induit l'apoptose des neutrophiles et augmente la production d'interleukine IL-8. La pyocyanine a un rôle crucial dans la virulence de *Pseudomonas aeruginosa*.

- **Protéase alcaline**

La protéase alcaline est une protéase qui dégrade la fibrine . Elle est sécrétée par le système de sécrétion de type I (**Guzzo *et al.*, 1991**). Son rôle pathogène est documenté dans les infections cornéennes comme toutes les protéases produites chez *Pseudomonas aeruginosa*. Elle participe aussi dans la physiopathologie des pneumopathies aiguës (**Kipnis *et al.*, 2004**).

Chapitre II

Les mécanismes de l'immunité innée entrent en jeu immédiatement après la pénétration du pathogène à travers la barrière épithéliale dans les tissus. L'un des premiers composants de l'immunité innée à être activé est le système du complément. Les protéines du complément étant ubiquitaires dans le sang et la lymphe. L'activation du complément représente un mécanisme de défense utilisable dès le début de l'infection. (**Parham, 2003**) Le système du complément (SC) a été découvert à la fin des années 1890. Il est alors décrit comme un composant thermolabile du sérum, qui possède des propriétés antimicrobiennes, capable de compléter l'action des anticorps. Depuis, les connaissances ont évolué et il est désormais établi que ce système fait partie intégrante du système immunitaire inné. (**Daugan et al., 2017**).

1. Système du complément

Le système du complément est un ensemble complexe des protéines sériques et membranaires interagissant entre elles de façon régulée. (**Rosain et al. 2014**), il fonctionne principalement comme une première ligne de défense de l'hôte contre les infections des pathogènes. Plus de 30 composants et des régulateurs qui sont identifiés distribués dans la circulation et dans les tissus. Malgré le manque de spécificité comme dans le système immunitaire acquis, le complément reconnaît sélectivement les agents pathogènes étrangers et les cellules endommagées de l'individu, en utilisant les molécules de reconnaissance des voies classiques, des lectines et alternatives (**Noris et Remuzzi 2013**)

Le complément est un élément important du système immunitaire inné qui est crucial pour la défense contre les infections microbiennes et pour l'élimination des complexes immunitaires et des cellules infectées. (**Noris et Remuzzi 2013**), Ainsi il joue un rôle central dans la surveillance immunitaire, l'élimination des matières toxiques, l'activation de la réponse immunitaire adaptative et la défense contre l'infection. (**Ricklin et al., 2017**). Au cours des dernières années, d'autres fonctions importantes du complément ont été découvertes, y compris la régulation de la réponse immunitaire adaptative, la promotion de la régénération des tissus et de l'angiogenèse, la mobilisation des cellules souches, le bon développement du système nerveux central, et le contrôle de l'implantation embryonnaire. (**Noris et Remuzzi 2013**)

L'activation du complément permet l'opsonisation des agents pathogènes par le C3b qui favorise la phagocytose et facilite le recrutement des phagocytes vers le site d'infection, l'inflammation via les anaphylatoxines C3a et C5a et la clairance des complexes immuns et des cellules apoptotiques (**Rosain et al. 2014 ; Laabei et Ermert 2019**)

Le complément activé génère trois principaux types d'effecteurs :

- **les anaphylatoxines** (C3a et C5a), qui sont de puissantes molécules pro-inflammatoires qui attirent et activent les leucocytes
- **les opsonines** (C3b, iC3b, et C3d), qui décorent les surfaces cibles à travers la liaison covalente pour faciliter le transport et favoriser l'élimination des cellules cibles ou des complexes immunitaires ;
- **le complexe d'attaque membranaire terminal** (MAC C5b-9) qui lyse directement les pathogènes ciblés (opsonisés) ou cellules endommagées de soie. (Noris et Remuzzi 2013)

2.1. Voies d'activation

On distingue 3 voies d'activation de système de complément ; la voie classique, la voie lectine et la voie alterne. Toutes ces voies ont pour but de former le C3 convertase ; élément central de la cascade du complément. La plupart des protéines du complément ont la particularité de circuler dans le plasma sous forme inactive et de s'activer en cascade par des clivages successifs. Les produits de clivage sont désignés par "a" pour le petit fragment et "b" pour le fragment le plus lourd (sauf pour la fraction C2 pour laquelle le C2a désigne le gros fragment et le C2b désigne le petit fragment). (Rosain *et al.*, 2014).

2.1.1. Voie classique

L'activation de la voie classique (VCC) commence par la reconnaissance et la liaison des surfaces microbiennes par les immunoglobulines, IgM et/ou IgG. (Laabei et Ermert 2019) .La protéine C1q reconnaissant le fragment Fc des anticorps (d'isotype IgG1, IgG2, IgG3, ou IgM) liés à un antigène, ce qui conduit à l'activation des sérines estérases C1r et C1s (Rosain *et al.* 2014).

En plus de l'activation par les complexes immunitaires IgG et IgM, C1q peut également être activé par les cellules apoptotiques, nécrotiques et par des protéines en phase aiguë telle que la protéine C-réactive. (Noris et Remuzzi 2013)

2.1.2. Voie des lectines

La voie des mannoses ou voie des lectines utilise la protéine MBL (*mannose binding-lectin*) capable de se lier aux polysaccharides des pathogènes ainsi que les sérines protéases MASP1 et MASP2 (*mannose-associated serine protease*), les ficolines (1-3) et la collectine-11. Les sérines estérases clivent alors le C4 et le C2 pour former la C3 convertase

classique (C4b2a) qui, après clivage du C3 en C3b forme la C5 convertase classique (C4b2a, C3b) qui acquiert la capacité de cliver le C5. (Rosain *et al.*, 2014 ; Laabei et Ermert, 2019)

La voie des lectines (VLC) est très analogue au CP et son activation entraîne également la formation de C4b2a (Rooijackers et van Strijp, 2007)

2.1.3. Voie alterne

Contrairement à la voie classique et celle des lectines, la voie alterne (VAC) représente un système constitutivement actif. (Laabei et Ermert, 2019). Bien que les voies classiques et les voies lectines sont en général activées lors de la reconnaissance des matières exogènes, la voie alterne est tout le temps active à faibles niveaux dans l'hôte normal. On y fait souvent référencé comme mécanisme de basculement et permet au système de rester prêt pour une activation rapide et robuste. (Noris et Remuzzi, 2013) L'hydrolyse spontanée de C3, également connue sous le nom de «*tick-over*», le C3 (H₂O) peut se lier au facteur B, qui est clivé par le facteur D pour former la première C3 convertase de voie alterne (C3 (H₂O) Bb). Ce complexe commence à convertir/cliver le C3 en C3b et C3a. Dans la plupart des cas, ce C3b est rapidement inactivé; cependant, certains C3b peuvent se lier aux surfaces activant le complément et s'associer au facteur B qui, encore une fois, dans le complexe avec C3b, peut être clivé par le facteur D, formant le C3 convertase de voie alterne (C3bBb). La stabilité de cette convertase est renforcée par la liaison de properdine. Le C3 convertase clive plus des C3 et initie une boucle d'amplification, générant plus de C3b pouvant créer de nouvelles convertases C3 alternatives et la C5 convertase (C3bBbC3b) (Lambris *et al.*, 2014)

Malgré son nom, la VAC peut représenter jusqu'à 80–90% de l'activation totale du complément, même lorsqu'elle est initialement déclenchée par la VCC ou la VLC. (Ricklin *et al.*, 2010).

2.2. Voies effectrices du système du Complément

2.2. 1. Voie d'amplification

Le composant C3 est la protéine du complément la plus abondante dans le plasma, présente à la concentration de 1,2 mg ml⁻¹, en grand excès par rapport à la concentration de C4. Cette concentration du substrat à chaque molécule du composant C4b fixé par le pathogène de produire en grand nombre des molécules C3b liées au même pathogène. Les actions combinées de C4 et C3 amplifient la liaison covalente des fragments du complément à la surface du pathogène. Après fixation le C3 convertase s'assemble, ce qui amplifie le clivage du C3b (Parham, 2003)

Les trois voies d'activation aboutissent à la formation des C5-convertases classique et alterne. Ces C5-convertases clivent le C5 circulant en C5a (une anaphylatoxine) et C5b qui s'ancre dans la membrane cible et sert de site de fixation pour tous les composants suivants de la cascade. Le C5b recrute les autres protéines de complément. Ainsi un complexe C5b-C6-C7-C8-(C9(n)) appelé complexe d'attaque membranaire se forme et induit un passage de liquide extra-cellulaire aboutissant à la lyse osmotique du micro-organisme cible. (Owen *et al.*, 2014)

2.2. 2. Voie finale commune

Toutes ces 03 voies aboutissent à la voie finale commune utilisant les fractions C5, C6, C7, C8 et C9 avec formation du complexe d'attaque membranaire (C5b-C9) capable de s'insérer dans la membrane de la cellule ou du microorganisme cible et d'entraîner la lyse osmotique. (Rosain *et al.*, 2014) La voie du complément terminal est la dernière étape cytolytique de la cascade du complément. La molécule "tueuse" est le complexe d'attaque membranaire (MAC), un assemblage lytique de C5b, C6, C7, C8 et plusieurs molécules de C9.

Le MAC tue directement les organismes Gram-négatifs qui ont une membrane lipidique externe. Cependant, les bactéries à Gram positif résistent à cette attaque par le simple fait que leur membrane cellulaire est protégée par une épaisse paroi cellulaire (Rooijackers et van Strijp 2007)

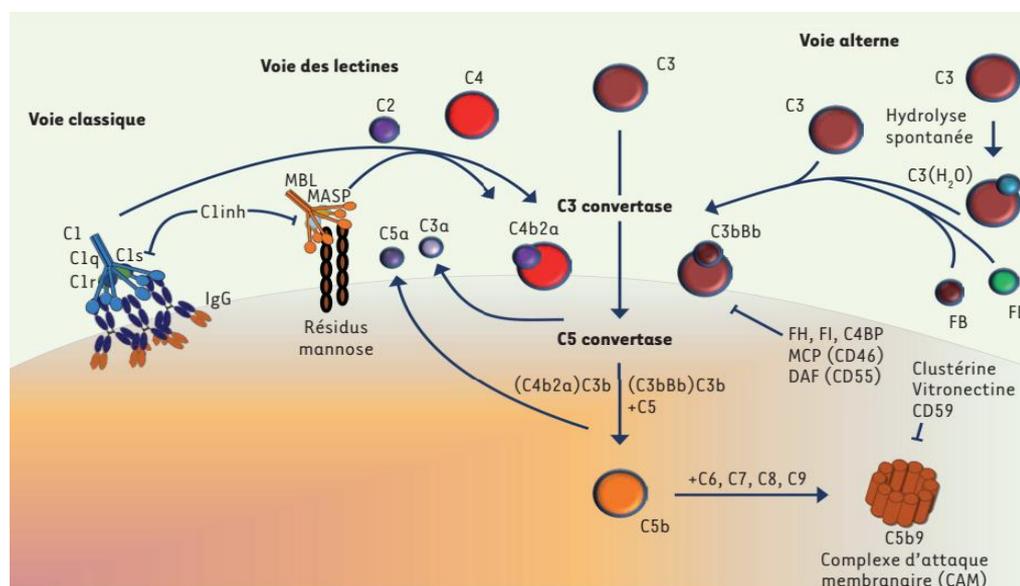


Figure 01: Voies effectrices du système du Complément (Daugan *et al.*, 2017)

Pour éviter les effets indésirables sur le tissu de soi, l'activation du complément est étroitement contrôlée par un ensemble de régulateurs solubles et liés à la membrane. (Abreu et Barbosa, 2017). Les protéines de contrôle régulent le complément à trois niveaux principaux: elles

peuvent inhiber l'activité de protéase des protéines impliquées dans la cascade d'activation, faciliter la décomposition et la destruction des convertases, et de contrôler MAC formation. (**Lambris et al ., 2014**).

Les régulateurs de complément sont traditionnellement regroupés en deux catégories ; régulateurs solubles et régulateurs liés à la membrane. On trouve au moins six régulateurs du complément sous forme soluble dans le plasma: l'inhibiteur de C1, facteur I, la protéine de liaison au C4b (C4BP), facteur H, vitronectine (protéine S) et clusterine (SP40,40).

L'inhibiteur de C1 appartient à la famille des inhibiteurs de la protéase de la sérine qui inactive C1r, C1s, et MASP-2 (Davis *et al.*, 2008) Le facteur I coupe et inactive les molécules C4b et C3b. C4BP est une protéine oligomère hétérogène qui contrôle la voie classique du complément. (Józsi et Zipfel, 2008)

Dans l'AP, l'activation est principalement contrôlée par le facteur H (FH) et son homologue "protéine de type facteur H 1" (FHL-1). FH agit principalement sur les C3 convertases de voie alterne, soit éliminer de manière compétitive le Bb du complexe C3bBb (c'est-à-dire l'accélération de la décroissance) ou un cofacteur pour la dégradation de C3b induite par la FI. (**Ricklin et al., 2010**)

L'activation du complément est également contrôlée par des régulateurs membranaires ; *membrane-bound complement regulatory proteins* (mCRPs). Quatre sont connues à savoir, facteur accélérant la désintégration (DAF ou CD55), protéine cofacteur membranaire (MCP ou CD46), récepteur du complément 1 (CR1 ou CD35) et CD59 (protectin) (**Hovingh et al., 2016**) Le (CR1; CD35) est exprimé par les érythrocytes, les neutrophiles, les éosinophiles, les monocytes, les cellules dendritiques folliculaires, les podocytes glomérulaires, les lymphocytes B et certains lymphocytes T ; il fonctionne comme un cofacteur pour le facteur I- qui clive le C3b et C4b et accélère la désintégration de la convertase classique et alterne. Le CD46 est indiqué dans la plus part des cellules (sauf les érythrocytes) et agit en tant que facteur cofacteur du facteur I dans le clivage C3b / C4b . (**Pio et al ., 2014**).

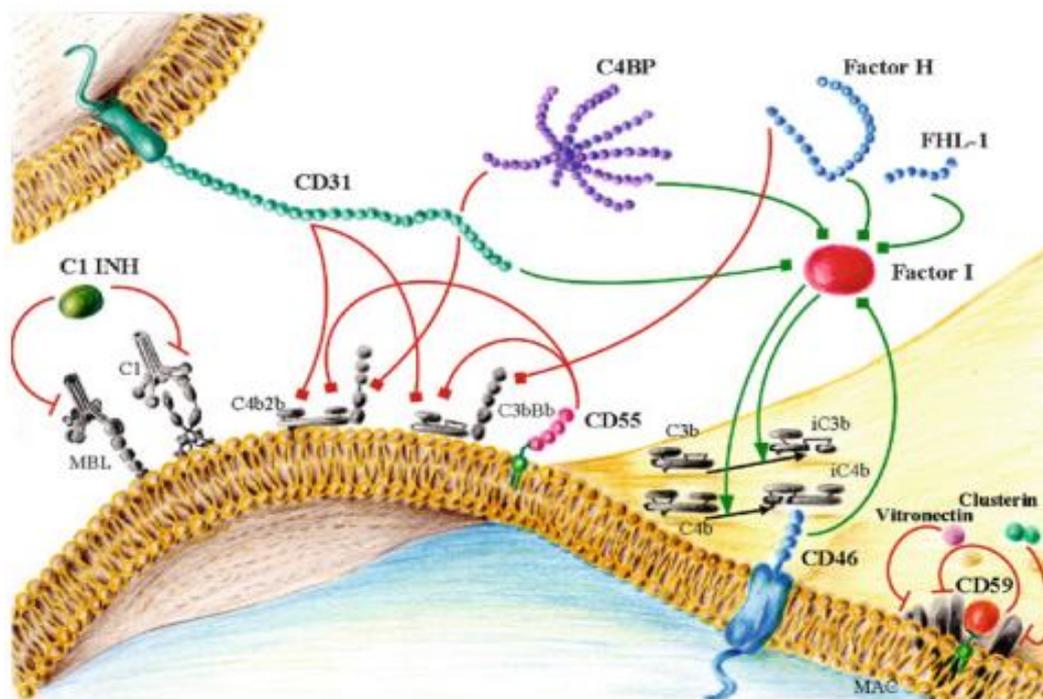


Figure 02: Régulateurs solubles et membranaires de système de complément (Pio *et al.* , 2014).

2.3. Maladie liée au complément

Compte tenu des importantes fonctions de défense de la cascade du complément, une intervention pharmacologique peut sembler peu judicieuse. Malheureusement, la vulnérabilité à une activation erronée et à une dysrégulation font du système du complément un facteur de risque important pour de nombreuses maladies. (Harris *et al.*, 2012)

Les actions normalement bénéfiques du complément visant à éliminer les complexes immuns, les cellules apoptotiques et les débris peuvent entraîner des effets indésirables lorsque les débris ou la plaque ne peuvent plus être éliminés, entraînant une activation constante du complément contribuant à un microenvironnement inflammatoire. Des exemples marquants de ce principe sont les troubles liés à l'âge, tels que la maladie d'Alzheimer et l'athérosclérose. De plus, une clairance insuffisante des cellules apoptotiques et / ou des complexes immuns en raison de carences en composants du complément précoce est considérée comme un facteur contribuant aux maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux systémique (SLE). (Ricklin *et al.*, 2017) .

2.3.1. Hypo-activation de système de complément

La voie commune et terminale du complément permettant la formation du complexe d'attaque membranaire, les déficits de cette voie vont impliquer une fréquence augmentée d'infection à germes habituellement éliminés par ce complexe. Bien que les explications ne

soient pas encore données à l'heure actuelle, il a été observé cliniquement que seules les infections à *Neisseria meningitidis* avaient une fréquence augmentée chez ces sujets, pointant le rôle primordial de cette voie et du complexe d'attaque membranaire dans le contrôle de *Neisseria meningitidis*. (OMS ,2015)

Les déficits complets en fraction C3 et en protéines de la voie alterne (facteurs H, I, D et B) sont associés à un risque accru d'infections bactériennes, *Neisseria meningitidis* et *Neisseria gonorrhoeae*, les déficits en protéines activatrices empêchent la formation de la C3 convertase alterne et la production des opsonines(C3b) .

2.3.2. Hyper-activation de systèmes de complément : La transplantation des organes

L'activation du système immunitaire est un facteur limitant important dans le processus de transplantation. Dans le cadre de cet environnement pro-inflammatoire, le système du complément est déclenché. L'activation du complément joue un rôle clé dans le processus de transplantation, comme le montre le nombre d'études menées sur les lésions d'ischémie-reperfusion (IRI) et le rejet aigu, chronique et cellulaire. Ces études indiquent que l'activation du système du complément commence déjà chez le donneur et que l'activation systémique du complément peut entraîner une inflammation locale du greffon potentiel. À la suite d'une inflammation, les organes (donneurs) sont endommagés. (Ricklin *et al.*, 2017; van Zanden *et al.*, 2019).

2.3.3. Complément et leur double rôle dans le cancer

Le système du complément est un composant du système immunitaire inné qui joue un rôle clé dans l'élimination des pathogènes et dans l'homéostasie. Le rôle anti-tumoral du complément semblait acquis depuis plusieurs années en raison de son activité lytique, de ses propriétés de chimiotactisme et d'opsonisation des cellules stressées. Cependant, de récentes études semblent contredire ce paradigme en montrant que le système du complément peut être relié à des effets pro-tumoraux. L'expression anormale de protéines du complément a été révélée dans de nombreux types de tumeurs. Parmi ces protéines, le C1q, le C1s, le C3, le C4, les anaphylatoxines C3a et C5a, et leurs récepteurs, ainsi que les protéines régulatrices comme le facteur B, facteur H, facteur I, CD46, CD55 et CD59, sont le plus souvent surexprimées et agissent en effet à différents niveaux de la progression tumorale, que ce soit au sein des cellules tumorales, sur l'angiogenèse ou sur le microenvironnement immunitaire . (Ricklin et Lambris ,2007;Daugan *et al.*, 2017).

Chapitre III

Pour survivre dans l'hôte, les agents pathogènes bactériens exploitent plusieurs mécanismes d'échappement pour empêcher la détection et la destruction par le système immunitaire. Acteur majeur de la défense immunitaire, le système du complément reconnaît et détruit les bactéries via différents mécanismes effecteurs. (Doorduyn *et al.*, 2016). La capacité à échapper à la machinerie complexe du système immunitaire humain est un facteur déterminant de la virulence des agents pathogènes.

En effet, les stratégies d'évasion immunitaire sont souvent centrées sur le système du complément, qui est un élément central de l'immunité innée et est généralement considéré comme la première ligne de défense contre les microorganismes pathogènes. (Lambris, Ricklin, et Geisbrecht 2008). Les bactéries, les virus, les champignons et les parasites peuvent s'échapper d'un ou plusieurs des voies de systèmes de complément simultanément par différentes stratégies. (Abreu et Barbosa 2017).

Par ailleurs, Lambris, *et al.*, (2008) signalent que le fonctionnement de ces mécanismes d'échappement au niveau moléculaire a considérablement augmenté ces dernières années. Cependant pour leurs survie, les micro-organismes doivent éviter la destruction par les fonctions opsoniques, chimiotactiques et lytiques de la cascade du complément. Par conséquent, l'évasion du complément peut être médiée à différentes étapes de la cascade. (Figure 01). L'évasion peut se produire à la surface de l'organisme car (a) la cascade du complément n'est pas activée, (b) la cascade est bloquée avant la formation de C5b-9, ou (c) la formation du complexe C5b-9 est non fonctionnelle et non lytique (Joiner, 1998).

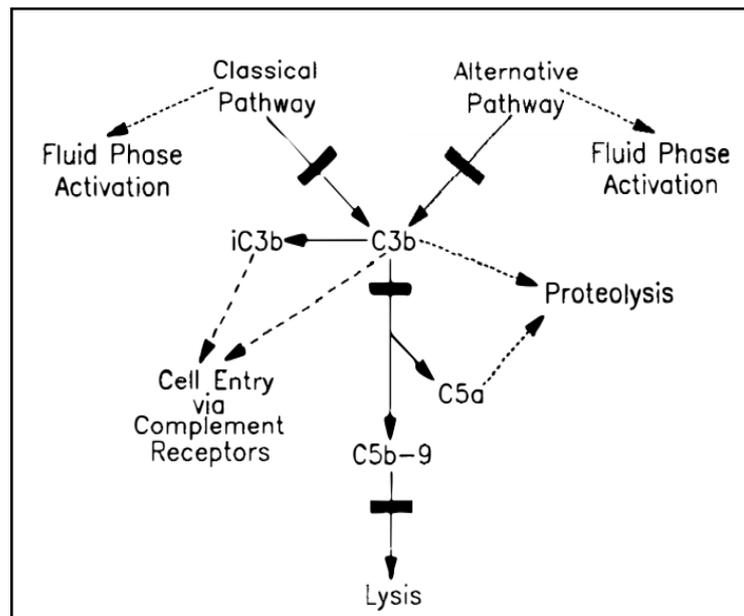


Figure 03: Les stratégies d'évasion des bactéries au système de complément (Joiner.1998)

Hovingh, van den Broek, et Jongerius (2016) rapportent que les mécanismes d'échappement au système de complément peuvent être classés selon trois mécanismes bien distincts :

Le premier mécanisme d'évasion de complément correspond à l'imitation des protéines régulatrices du complément.

Un deuxième mécanisme que les bactéries utilisent pour se soustraire, le système du complément est l'expression de protéases qui peut cliver des composants du complément, les microbes sont capables également de lier les régulateurs solubles à leur surface pour limiter l'activation du complément sur leur membrane (l'acquisition de régulateurs de complément de l'hôte).

Enfin, un dernier mécanisme dont les bactéries peuvent exprimer de petites molécules d'évasion qui inhibent le système du complément.

III. Mécanismes d'échappement des BGN au système du complément

III.1. Imitation des protéines régulatrices du complément

La seule bactérie connue à utiliser ce mécanisme est *Borrelia burgdorferi*. C'est une bactérie à Gram négatif et l'agent responsable de la maladie de Lyme qui est l'une des principales infections émergentes transmises par les arthropodes dans le monde (Hengge *et al.*, 2003). *B. burgdorferi* exprime sur sa membrane une protéine "CD59-like" qui se lie à C8b et C9 en complexe et inhibent la formation de MAC (Pausaet *al.*, 2003). Avec un poids moléculaire de 80 kDa, cette protéine est beaucoup plus grande que le CD59 humain, mais il existe quelques similitudes

structurelles puisque l'anticorps polyclonal anti-CD59 était capable de reconnaître le type CD59. Bien que CD59- comme *B. burgdorferi* est le seul exemple de régulateur du complément mimétisme par les bactéries, ce mécanisme est largement utilisé par les virus. **(Hovingh, van den Broek, et Jongerius 2016)**.

III.2. Inactivation des protéines du complément par dégradation enzymatique (sécrétion des protéases)

La sécrétion de protéases qui clivaient et inactivaient les protéines du complément a été décrite comme une stratégie d'évasion immunitaire pour plusieurs agents pathogènes humains. Il est intéressant de noter que les protéases dérivées de pathogènes ciblent un large éventail de substrats, y compris la molécule C3 du complément central, les protéines impliquées dans l'initiation en cascade, telles que C1q et les immunoglobulines, ainsi que les composants terminaux, tels que C5. **(Fraga et al. 2014)**

Pseudomonas aerogenosa sécrète deux protéases puissantes, l'élastase (PaE) et une protéase alcaline (AprA), qui dégradent les composants du système du complément humain **(Merle et al. 2015)**, essentiellement le C3 et le C1q. le ciblage de C3 en tant que molécule centrale du complément entraîne une altération fonctionnelle des trois voies d'activation du complément, interférant en fin de compte avec la formation de MAC et facilitant la survie des bactéries. AprA interfère également avec l'opsonisation des bactéries avec C3b, bloquant essentiellement la phagocytose et la destruction de *P. aeruginosa* par les neutrophiles humains, et peut réduire la formation de C5a **(Laarman et al., 2012)**. Ce dernier est accompli par un clivage efficace de C2 par AprA, ce qui contourne les voies classiques et les voies de la lectine sans affecter la voie alternative. **(Merle et al., 2015)**

Les protéases produites par *E. coli* ont les propriétés d'inhiber le système du complément, Pic, un autotransporteur est sécrété par différents pathogènes de la famille des Enterobacteriaceae, est capable de cliver C2, C3/C3b, et C4/C4b et travaille en synergie avec le facteur humain I et le facteur H (FH), ce qui favorisent l'inactivation du C3b. La sérine-protéase extracellulaire P, une sérine-protéase de *E. coli* entérohémorragique (EHEC), régule négativement l'activation du complément par clivage de C3/C3b et C5. **(Abreu et Barbosa 2017)**

Plus récemment des études ont montré que *E. coli* produit une protéase périplasmique appelée Prc ou Tsp (Tail-specific protéase), cette protéase s'est révélée capable de contribuer à l'évasion du complément d'*E. coli* en interférant avec l'action de l'activation des voies classiques. **(Abreu et Barbosa 2017)**

Parmi les trois enzymes protéolytiques produites par *Serratia marcescens*, la protéase 56K semble être la plus importante pour la virulence, car elle possède le plus large spectre d'activité protéolytique. La protéase est capable de dégrader les IgG et IgA, le lysozyme et d'autres molécules du système immunitaire. De plus, il a été démontré que la protéase 56K inactive l'activité hémolytique du système du complément humain. La dégradation de ces facteurs de complément C3 et C5 peut entraîner l'inhibition de la formation de MAC et altérer l'activité lytique du complément. **(Rooijackers et van Strijp 2007, Potempa et Potempa 2012).**

La protéase PgtE de *Salmonella enterica* dégrade les C3, C4 et C5, protégeant ainsi la bactérie au cours de sa phase extracellulaire transitoire **(Blom, Hallström, et Riesbeck 2009).**

III.3. Acquisition de régulateurs de complément de l'hôte

Le système du complément est étroitement contrôlé par des régulateurs, pour protéger les cellules des effets inflammatoire et lytique résultant de l'activation du complément. Un certain nombre d'agents pathogènes ayant recruté ces derniers pour s'assurer leur survie et diffuser dans l'hôte. **(Abreu et Barbosa 2017)**

Des exemples bien décrits sont les protéines de surface bactériennes qui lient le C4BP humain et le FH/FHL-. Ces régulateurs sont capturés de telle manière qu'ils sont toujours capables d'interagir avec les C3convertases et fonctionnent comme cofacteurs dans le clivage du facteur I de C3b/C4b. **(Rooijackers et van Strijp 2007).**

Neisseria gonorrhoeae capture le C4BP par l'intermédiaire de sa membrane externe porine (Por) et par l'intermédiaire du pili type IV. Les deux isoformes de Por, Por1A et Por1B, se lient au C4BP. De façon similaire *Moraxella catarrhalis* interagit avec le C4BP via les protéines de surface ubiquitaires A1 et A2 (UspA1 et UspA2) **(Nordstrom et al., 2004).**

P. aeruginosa lie le facteur H et la protéine apparentée au facteur H à sa surface par l'intermédiaire d'un facteur d'élongation protéique Tuf, ce qui entraîne la dégradation du C3b. **(Mishra et al., 2015)**

La protéine A de la membrane externe (OmpA) est une protéine abondante et hautement conservée chez *E. coli*, et il a été démontré qu'elle contribue à la résistance sérique d'*E. coli* de la méningite néonatale (NMEC). **(Abreu et Barbosa 2017).** La liaison de la protéine A de 35 kDa de *E. coli* K1 au C4BP humain protège cette bactérie de la disposition de C3b et l'activation des protéines du complément. **(Rooijackers et van Strijp, 2007).**

Le facteur de virulence prédominant exprimé par *Yersinia enterocolitica* est l'adhésine A (YadA), qui permet la fixation bactérienne aux cellules hôtes et à la matrice extracellulaire et en outre l'acquisition de facteurs sériques solubles. Il a été démontré que le facteur H, la protéine de liaison au C4b (C4BP) et le C3 se lient au domaine de la tige de YadA et inhibent ainsi la lyse par le complément. (Mühlkamp *et al.*, 2017).

Plus récemment, la protéine W de la membrane externe (OmpW), une protéine présente dans un grand nombre de bactéries Gram-négatives, où il a été démontré que OmpW se lie au Facteur H, le principal régulateur soluble de la voie alternative de complément (40).

Escherichia coli et *Bordetella pertussis* en sont des exemples des agents pathogènes qui recrutent et utilisent le C1-INH pour échapper au complément (Lathem *et al.*, 2004 ; Marr *et al.*, 2007). C1-INH a été découvert comme un inhibiteur du complexe C1 (C1qr2s2 : C1q et ses associés protéases), mais elle cible également les complexes de LP composés de pattern recognition molecules(MPR). et les MASP. Ainsi, si un agent pathogène manipule le C1-INH, il va probablement perturber les deux voies si elles sont actives. (Rosbjerg *et al.*, 2017)

III.4. Expression de petites molécules d'évasion au complément

En plus les mécanismes d'évasion décrite au paravent les bactéries gram négatif peuvent s'échapper au système de complément par l'intermédiaire de divers structures cellulaire .

III.4.1. Lipopolysaccharides

En tant que composant majeur de la paroi cellulaire des Gram négatif, les lipopolysaccharides (LPS) jouent un rôle important dans la stabilité de la membrane externe et la protection contre l'environnement extérieur. Le système immunitaire inné reconnaît la partie A du LPS lipidique via le récepteur Toll-like 4 (TLR4), qui est exprimé sur diverses cellules immunitaires et réagit lors de la détection du LPS lors de l'activation cellulaire et de la production des cytokines (Doorduyn *et al.*, 2016). Les variations de la structure du lipide A affectent considérablement la capacité du lipide A à stimuler le TLR4. De plus, les modifications du lipide A pourraient éventuellement influencer sur l'interaction avec le facteur de régulation négatif H du complément de l'hôte, comme observé pour *Neisseria gonorrhoeae* *K. pneumoniae* (Lewis *et al.*, 2010 & Llobet *et al.*, 2015).

Chez plusieurs bactéries à Gram négatif, d'autres modifications du LPS ont entraîné des modifications de la résistance du sérum (Schiller et Joiner, 1986). Ces modifications du LPS comprennent l'élongation et les modifications de la composition en polysaccharide de la chaîne

latérale de l'antigène O. L'antigène O est très variable et est reconnu par les anticorps car cette partie du LPS est exposée à la surface.

Les souches de *K. pneumoniae* avec un antigène O long produisent un LPS de poids moléculaire élevé (phénotype lisse), tandis que les souches dépourvues de chaînes latérales de l'antigène O ont un LPS de faible poids moléculaire (phénotype rugueux). En général, les souches avec LPS rugueux sont plus susceptibles de tuer le sérum que les souches avec LPS lisse ;

L'élargissement des chaînes latérales de l'antigène-O conduit à un dépôt de C3b plus éloigné de la surface ; Cela empêche une déposition correcte du MAC sur la membrane bactérienne, entraînant une réduction de la formation de pores et une destruction des bactéries. (Doorduijn *et al.*, 2016). Ce mécanisme de résistance du sérum est similaire à celui décrit pour d'autres souches portant de longues chaînes latérales de LPS O, telles que certaines souches de *S. minnesota* et *E. coli*.(Schiller et Joiner 1986)

K. pneumoniae peut bloquer la formation du MAC par deux mécanismes, soit en empêchant stériquement le MAC d'atteindre la membrane externe, soit en inhiber le dépôt de complément en bloquant les épitopes des molécules de surface reconnues par les anticorps ou par C1q directement. (Doorduijn *et al.*, 2016).

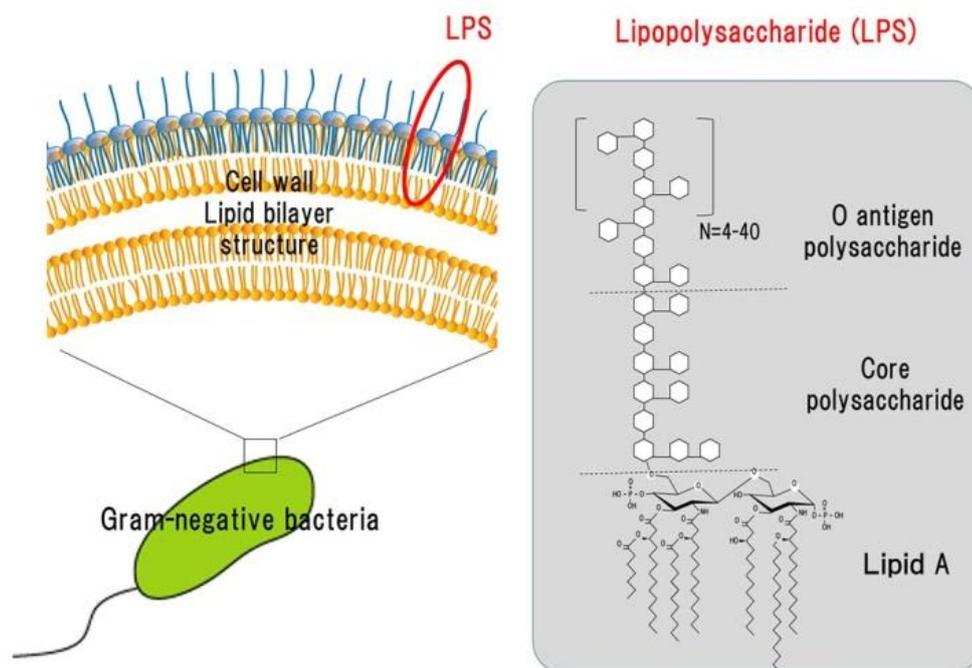


Figure 04: Structure des LPS des bactéries Gram négatif

III.4.2. Capsule

Les polysaccharides capsulaires sont essentiels à la virulence bactérienne. Puisqu'ils sont impliqués dans d'importants processus biologiques y compris l'adhésion et la résistance aux réponses immunitaires de l'hôte. La résistance à la phagocytose et au système de complément. Des études Précédent ont montré que les polysaccharide capsulaire K1 est crucial pour la survie d'*E. coli* dans le sang ce qui provoque des niveaux élevées de bactériémie, conduisant à l'invasion méningéale, ce qui peut être attribués à leur capacité à échapper aux mécanismes de défense de l'hôte. (Abreu et Barbosa 2017). Ce K1 d'*E. coli* est composé de l'acide sialique. Il est bien connu que le FH, le principal régulateur soluble de l'activité de voie alterne, lie les polyanions tels que l'acide sialique (13). En conséquence, une inhibition de la voie alterne se produit et peut protéger les bactéries encapsulées de l'attaque du complément. L'augmentation de la production de la capsule K1 est corrélée à la virulence d'*E. coli* par la réduction de l'activation et de l'opsonisation du complément (14).

Plusieurs études ont montré que la capsule de *K. pneumoniae* constituait une barrière efficace pour empêcher la destruction bactérienne via le MAC. Dans les isolats cliniques, la capsule est protégée contre la destruction du sérum et le dépôt de C3b via les trois différentes voies d'activation du complément. Le dépôt de C3b dépend de l'épaisseur de la capsule de *K. pneumoniae*, (Doorduijn *et al.*, 2016)

Certaines capsules bactériennes interrompent la liaison de C3b à la surface bactérienne en agissant sur des protéines régulatrices, telles que les facteurs B et H (Loos, 1985; Cross, 1999). 1990). Les capsules qui exercent un tel mécanisme de défense contiennent généralement du l'acide N-acétylneuraminique. (Neu5Ac) car il contient un site de liaison au facteur H. La stimulation de H-C3b, diminue de manière correspondante l'amplification convertase C3bBb, entraînant une défaillance de la complément en cascade (Moxon & Kroll, 1990). Certaines capsules ne peuvent pas se lier au facteur B, donc provoquant davantage de formation de H-C3b (Winkelstein, 1981). Des souches telles que *E. coli* K1, *E. coli* K92, *N. méningitidis* de types B et C et de polysaccharides de ont des capsules qui inhibent l'activation alternative du complément par ces mécanismes. (Cress *et al.*, 2014).

Partie pratique

Matériels et méthodes

1. Lieu et durée du stage

Notre étude a été réalisée dans différentes entités du secteur de la santé, représentées respectivement par le laboratoire central de l’hôpital civil de Ouargla "Mohammed Boudhief" précisément au service de bactériologie, le laboratoire de l’hôpital civil de Ghardaïa « Tirichine Ibrahim » outre du laboratoire de bactériologie de la maternité de Touggourt, le laboratoire privé « El Amel» de Ouargla .

Les analyses et les tests figurants dans ce travail ont été réalisées dans le laboratoire d’immunologie, Faculté de médecine Ouargla.

La présente étude s’est étalée sur une période de deux mois, entre le 12.fevrier et le 14 avril 2019.

2. Echantillonnage

Durant toute la période de stage, 44 isolats de bactéries Gram négatifs ont été effectués.

I. PARTIE MICROBIOLOGIQUE

Tableau 04: Milieux de culture et réactifs

Milieux de culture			Tests biochimiques	Réactifs
Milieu de culture liquide	Milieu de culture solide	Milieu de conservation		
-Bouillon nutritif (BN)	-Gélose Hektoen -Gélose au sang -Gélose nutritive(GN)	-Gélose nutritive -Glycérol	<ul style="list-style-type: none"> - Eau oxygénée à 10 volumes - Milieu TSI (Triple Sugar Iron) - Milieu urée indole - Milieu citrate de Simmons - Milieu Clark et Lubs - Milieu mannitol mobilité - Milieu King A - Milieu King B - Disqued’oxydase - Disqued’ONPG. - API20E 	<ul style="list-style-type: none"> - Violet de Gentiane - Lugol - Alcool 90° - Fuschine - Réactif de Kovacs - Rouge de méthyle - VP1, VP2 ; - Huile de parafine TDA

3. Méthodes

✓ **Prélèvements** : Différents types de prélèvements ont été effectués :

- Examen cytobactériologique des urines (ECBU)
- Examen cytobactériologique de pus (ECB de pus)
- Hémoculture (Hemoc)
- Coproculture (COPRO)
- Prélèvements vaginales (PV)

✓ **Isolement et purification**

L'isolement est réalisé sur trois milieux de culture : gélose nutritive, gélose Hektoen et gélose au sang cuit à 37°C pendant 24 à 48 heures. Afin de confirmer la pureté des souches, nous avons effectué des repiquages successifs en alternant milieu liquide (bouillon nutritif) et milieu Hektoen.

- **Gélose nutritive GN**: c'est un milieu qui convient à la culture des germes qui ne présentent pas d'exigences particulières.
- **Hektoen**: c'est un milieu sélectif pour les bactéries à Gram négatif.
- **Gélose au sang cuit (GSC)** : ce milieu est très riche et non sélectif permet l'isolement des bactéries exigeantes mais aussi les bactéries non exigeantes.

✓ **Conservation des souches**

Les souches sont conservées dans des tubes à hémolyse contenant de la gélose nutritive à une température ambiante. Ainsi dans des tubes Ependorff contenant le bouillon nutritif auquel est additionné le glycérol à une température -4°C (ces bactéries sont placées dans un état de vie ralentie ou momentanément suspendue dans des conditions peu favorables pour leur multiplication).

✓ **Identification bactérienne**

L'identification des souches étudiées est entreprise à l'aide de tests biochimiques et par les galeries miniaturisées API 20E

✓ **Etude macroscopique**

L'étude macroscopique permet d'apprécier l'aspect des colonies , leur couleur, leur taille , leur forme, leur consistance, ainsi que leur capacités à fermenter le lactose.

✓ **Ensemencement**

Nous avons appliqué la méthode la plus classique , en l'occurrence celle des trois cadrans . Elle consiste à diviser une boîte de pétri en deux parties égales (50 % et 50 %), puis de diviser de nouveau par deux une moitié afin d'obtenir 3 cadrans de 50 %, 25 % et 25 %.

Sur le plus grand cadran , deux gouttes de l'échantillon sont déposées puis étalées à l'aide d'une pipette Pasteur. Ensuite on retourne la boîte afin d'étaler les bactéries sur un cadran plus petit, puis on retourne afin d'ensemencer le dernier petit cadran . Les stries doivent être serrées et la pipette doit être flambée entre chaque cadran pour de meilleurs résultats . L'incubation se fait pendant 24 h à 37 C°.

✓ **Etudes microscopique**

1. Etat frais

→ Principe et technique :

C'est un examen de mise en œuvre très simple et qui a lieu au microscope optique à l'objectif x 40. Il permet d'apprécier la mobilité des bactéries.

Le principe se résume comme suit :

- Sur une lame porte objet stérile , déposer une goutte d'eau physiologique et une colonie trop dense .
- Homogénéiser et recouvrir d'une lamelle en évitant d'emprisonner les bulles d'air.

→ Lecture : Examiner la préparation au microscope à l'objectif x 40.

2. Coloration de bleu de méthylène

→ Principe et technique

La coloration au bleu de méthylène (BM) est une coloration très simple qui permet d'observer les bactéries et les cellules qui sont en général mieux conservées qu'avec la coloration de Gram. Elle permet de renseigner sur la forme des bactéries, la taille et le mode de regroupement

- Réaliser un frottis et le fixer.
- Recouvrir la lame de bleu de méthylène-phéniqué, 1 à 2 minutes.
- Rincer à l'eau distillée.
- Sécher la lame entre 2 feuilles de papier absorbant.

➔ **Lecture** : Observer à l'objectif x100 à l'immersion dans l'huile et à pleine lumière.

3. Coloration de la capsule

➔ Principe et technique

L'encre de Chine, suspension de particules de carbone, sert de contrastant. (on peut utiliser le rouge kongo)

- Déposer sur une lame propre, soit une goutte de culture en milieu liquide, soit une goutte d'eau distillée dans laquelle on dissociera une parcelle de colonie.
- Déposer à côté une petite goutte d'encre de Chine.
- Recouvrir d'une lamelle (les deux gouttes se mélangent).

➔ Lecture

Examiner la préparation à l'objectif x 40, en particulier dans la zone où l'encre de Chine est diluée sans trop l'être (contraste adéquat). La capsule apparaît comme un halo clair autour des corps bactériens

4. Coloration de Gram

➔ Principe et technique

La coloration de Gram est la coloration de base de la bactériologie . C'est une coloration double qui permet de différencier les bactéries non seulement d'après leur forme et leur mode de regroupement, mais surtout d'après leur affinité pour les colorants liés à la structure générale de la paroi.

Le principe de cette méthode, mis au point de façon empirique par le médecin danois Gram en 1884, est le suivant :

- ❖ Réaliser un frottis et le fixer.
- ❖ Plonger la lame dans le violet de gentiane (ou cristal violet) pendant 1 minute.
- ❖ Laver la lame à l'eau.
- ❖ Plonger la lame dans une solution de lugol pendant 1 minute
- ❖ Laver à l'eau
- ❖ Décolorer dix secondes à l'alcool.
- ❖ Rincer immédiatement à l'eau
- ❖ Plonger la lame dans la safranine (ou la fuchsine) pendant 1 minute
- ❖ Laver la lame à l'eau.
- ❖ Sécher la lame en la tamponnant avec du papier Joseph ou bien papier absorbant.

→ Lecture

La lecture se fait au grossissement x 100 avec une goutte d'huile à immersion et à pleine lumière. Les bactéries à Gram positif apparaissent colorées en violet, alors que les bactéries Gram négatifs sont roses.

5. Etude biochimique

5.1. Recherche de la catalase

→ Principe

La catalase est un enzyme ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) avec dégagement d'oxygène selon la réaction suivante



→ Technique

Sur une lame et à l'aide d'une pipette Pasteur, on dépose une colonie bactérienne à laquelle on ajoute de l'eau oxygénée (à 10 volumes).

→ Lecture

-Catalase(+) : effervescence. - Catalase (-) : pas d'effervescence.

5.2. Recherche de l'oxydase

→ Principe

Le test de l'oxydase est fondé sur la production bactérienne d'une enzyme oxydase intracellulaire. En présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C, cette enzyme oxyde le réactif pour former un composé coloré en violet « l'indophénol ».

→ Technique

Sur un papier filtre stérile, déposer un disque d'oxydase imprégné de diméthyl-para-phénylènediamine. Humidifier le disque avec quelques gouttes d'eau distillée stérile. Un excès d'eau peut nuire à la lecture. À l'aide d'une anse de platine prendre une colonie de la bactérie à identifier et la déposer sur le disque.

→ Lecture

Apparition immédiate d'une coloration violette : la souche est dite oxydase positive.

6. Identification par galeries classique :

On pratique une galerie biochimique classique contenant les milieux suivants : Le milieu TSI (milieu triple sucres), Mannitol-Mobilité, Clark et Lubs, Citrate de Simmons, Urée-indole.

6.1. Milieu TSI

→ Principe

Le milieu Triple-Sugar-Iron est un milieu d'identification rapide pour les entérobactéries, permet de mettre en évidence la fermentation du glucose (avec ou sans dégagement gazeux), du lactose, du saccharose et la production de H₂S.

→ Technique

Elle consiste à ensemencer à l'aide d'une pipette Pasteur en stries serrées la pente de la gélose puis par piqûre centrale le culot, la lecture se fait après 24 h d'incubation à 37°C.

→ Lecture

- la fermentation du glucose se traduit par le virage au jaune du culot, et la production de gaz se traduit par la formation de bulles de gaz dans la gélose ou le décollement de celle-ci.
- la fermentation du lactose et/ou du saccharose se traduit par le virage au jaune de la pente.
- Production H₂S par noircissement du milieu.

6.2. Milieu mannitol-mobilité

→ Principe

Le milieu mannitol -mobilité est utilisé pour la différenciation rapide des Entérobactéries . Il permet de déceler la dégradation du mannitol et la mobilité de la bactérie.

→ Technique

L'ensemencement se fait au moyen d'une pipette Pasteur par une simple piqure centrale jusqu'au fond du tube, la lecture se fait après 24 h d'incubation à 37°C.

→ Lecture

- La fermentation du mannitol se traduit par un virage de couleur du rouge au jaune.
- La présence des bactéries au -delà de l'axe central signifie qu'elles sont mobiles ; cependant leur présence uniquement au niveau de la piqure centrale signifie qu'elles sont immobiles.

6.3. Milieu citrate de Simmons

→ Principe

Le milieu citrate de sodium (Simmons) est utilisé pour l'identification des bacilles Gram négatifs. Il permet de rechercher l'utilisation de citrate de sodium comme seule source de carbone.

→ Technique

L'ensemencement se fait au moyen d'une pipette Pasteur par des stries longitudinales de la pente, la lecture se fait après 24 h d'incubation à 37°C.

→ Lecture

L'utilisation du citrate de sodium se traduit par un virage de couleur du vert au bleu qui signifie qu'il y a eu une alcalinisation du milieu et que la bactérie possède une citrate perméase.

6.4. Milieu urée-indole

→ Principe

Le milieu urée-tryptophane appelé improprement milieu urée-indole est un milieu complexe qui fournit un ensemble de résultats utiles pour la différenciation des entérobactéries. Il permet de rechercher :

- présence d'une uréase
- présence d'une tryptophanase
- présence d'une tryptophane désaminase (TDA)

✓ L'uréase

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

→ Technique

Ensemencer avec quelques gouttes de suspension bactérienne ou avec une colonie prélevée à l'anse sur un milieu solide le milieu urée-indole dans un tube. La lecture de test uréase se fait après 24 h d'incubation à 37°C.

→ Lecture

L'hydrolyse de l'urée se traduit par un virage de la couleur de l'orange vers le rouge ou le rose violet signifie qu'il y a eu une alcalinisation du milieu et que la bactérie possède une uréase.

➤ Pour les deux autres tests (Indole et TDA)

Après avoir effectué la lecture, séparer le milieu urée indole en deux (prélever une partie du milieu et le transvaser dans un tube à hémolyse propre) puis réaliser les tests suivants

✓ Production d'indole

→ Technique

Pour la recherche de la production d'indole : Ajouter 3 gouttes du réactif de Kovacs dans le tube à hémolyse et effectuer la lecture sans agiter le milieu

→ Lecture

La dégradation de L-tryptophane par les bactéries possédant une tryptophanase s'accompagne d'une production d'indole, révélée au moyen du réactif de Kovacs : en cas de réaction indole positive, un anneau rouge apparaît en surface du bouillon

✓ **La tryptophane-désaminase(TDA)**

La désaminase agit sur le L -tryptophane en donnant l'acide pyruvique. Ce dernier donne avec le perchlorure de fer (FeCl₃) une coloration brune.

➔ **Technique**

Ajouter 3 gouttes du réactif (= chlorure de fer III en solution acide) et effectuer la lecture

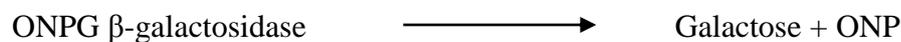
➔ **Lecture**

Après adition du réactif TDA , l'apparition d'une coloration brun foncé montre que la bactérie est TDA positive (possèdent le tryptophane désaminase)

6.5. Test ONPG

➔ **Principe**

Le test ONPG consiste à rechercher la présence de β -galactosidase. On utilise comme substrat, non pas le lactose , mais un autre β -galactoside: l'ortho-nitro-phényl-galactoside (ONPG) qui possède une structure analogue au lactose ; et qui présente l'avantage d'être hydrolysé en l'orthonitrophénol: ONP qui est responsable de la coloration jaunâtre de milieu selon la réaction suivante:



➔ **Technique**

Préparer une suspension dense d'une culture bactérienne à étudier dans un tube à essai stérile contenant 0.5ml d'eau physiologique, puis y ajouter un disque ONPG. Incuber au bain- marie à 37°C pendant un temps variant entre 15 à 30 minutes et jusqu'à 24h au maximum.

➔ **Lecture**

La lecture se fait à des intervalles de temps différents : après 15mn, 30mn, 1 heure, 6 heures et 24 heures. Le test ONPG est positif lorsque la suspension bactérienne se colore en jaune.

6.6. Milieu Clark et Lubs: test RM et VP

➔ **Principe**

Le milieu de Clark et Lubs permet l'étude des produits de fermentation du glucose : différenciation entre les fermentations « acides mixtes » et « butylène glycolique » .

✓ **Test RM (rouge de méthyle)**

Ce test permet la mise en évidence , grâce au rouge de méthyle , de la fermentation acide mixte par acidification d'un milieu glucosé après fermentation du glucose.

✓ **Test VP (Vosges-Proskauer)**

Ce test permet la mise en évidence de la production d'acétoïne (ou 3-hydroxy-butanone) au cours de la fermentation butylène-glycolique : en présence d'une base forte (soude ou potasse) et d'anaphtol, l'acétoïne donne une coloration rouge en milieu très oxygéné.

→ Technique

Une colonie de la souche à étudier est ensemencée sur le milieu Clark et Lubs puis incubée à 30°C pendant 24 à 48 heures. Après l'incubation, diviser le milieu dans deux tubes stériles, verser quelques gouttes de VP I et quelques gouttes de VP II dans l'un des tubes, et dans l'autre, ajouter quelques gouttes de réactif RM.

→ Lecture

- **Test RM:** Coloration rouge: RM (+) Coloration jaunâtre : RM (-)
- **Test VP:** Coloration rouge: VP (+) Coloration jaunâtre: VP (-)

6.7. Production des pigments :

→ Principe

Des espèces des *Pseudomonas* produisent des pigments dont les deux principaux (pyocyanine et pyoverdine) peuvent être mis en évidence sur les géloses King A et King B. Le milieu est ensemencé par strie sur la pente, incubation à 37°C pendant 24h.

✓ King A

La gélose King A est utilisée pour la caractérisation des *Pseudomonas* par la mise en évidence de la production de pyocyanine. La production de pyocyanine se caractérise par une pigmentation bleue.

✓ King B

La gélose King B permet la production de fluorescéine (ou pyoverdine), pigment jaune vert fluorescent sous lumière ultra-violette, par certains *Pseudomonas*.

7. Identification des bactéries par la galerie API 20 E

La galerie API 20E est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif. C'est une technique de routine très utilisée en milieu professionnel pour le diagnostic in vitro et le contrôle microbiologique. Une galerie se compose de 20 micro-tubes contenant un substrat déshydraté pour réaliser 20 tests biochimiques miniaturisés. On inocule chaque tube avec la suspension bactérienne à identifier. Certains des puits auront des changements de couleur résultants des différences de pH qui se traduisent par des virages colorés ; d'autres produisent des sous-produits qui doivent être identifiés avec des réactifs. Un numéro de profil est déterminé d'après la série de tests (+ et -), qui permet d'identifier l'espèce (Derafa, 2012).

→ Technique

Après-développement de la bactérie en colonies isolées sur milieu gélosé,

- **Préparation la suspension bactérienne**

- Introduire quelques ml d'eau distillée stérile (avec une pipette Pasteur) dans un tube à vis stérile, avec la pipette Pasteur, prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé.
- Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu.

- **l'inoculation de la galerie API20 E**

- Il faut remplir à l'aide d'une pipette Pasteur les tubes et les cupules des tests CIT, VP et GEL avec la suspension bactérienne, et pour les autres tests; on va remplir uniquement les tubes (et non les cupules) avec la création d'une anaérobiose dans les tests: ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leur cupule par l'huile de vaseline stérile. Enfin, on incube à 37 °C pendant 18-24 heures.

→ **Lecture**

Les réactifs appropriés sont ajoutés aux compartiments :

- ❖ 1 goutte de réactif de Kovac à l'IND (faire la lecture dans les minutes qui suivent).
- ❖ 1 goutte de réactif de VP1 et VP2 (une réaction positive peut prendre jusqu'à 10 minutes).
- ❖ 1 goutte de réactif TDA.

Les résultats sont notés en comparant les réactions avec le tableau de différenciation (Annexe2).

II. Test de l'activité bactérienne sur le VAC

- ✓ **Les souches bactériennes et les conditions de croissances**

La culture des bactéries se fait en GSC pendant 24 h à 37°C. On a réalisé une suspension bactérienne dans le PBS, mesuré et ajusté les densités optiques à DO = 0.08-0.1 à 625 nm. Cette DO 0.08-0.1 correspond à 0.5 McFarland pour une concentration de $1,5 \approx 2 \cdot 10^8$ cellule/ml (OMS, 2005).

- ✓ **Dosage de l'activité bactéricide de complément**

- a. Mesure de degré de la mort.**

- **Etape 01**

Le PHN provenant de volontaires appariant sains a été prélevé, aliquoté et stocké à -24 °C (utilisation en deux semaines au maximum). Les suspensions bactériennes dans le PBS à 1×10^8 ufc/ml.

Une aliquote de bactéries (150 µl) a été mélangée dans un tube à hémolyse stérile avec une quantité égale de volume de PHN dilué à 10 % dans PBS et incubé à 37°C pendant 60 min sous agitation.

À titre de contrôle, un volume de 150 µl de bactéries ont été mélangées avec 150 µl de PHN dilué à 10 % inactivé à la chaleur (56°C, 30 min) et incubé aux mêmes conditions (témoin).

Une série des dilutions de mélanges ont été préparés et l'UFC a été déterminée par culture sur gélose nutritif incubé à 37°C pendant 24 h.

Le dénombrement des boîtes incubées se fait par le logiciel « **Image J©** »

- **Etape 02**

Le degré de la mort des cellules bactériennes par VAC a été quantifié suivant la méthode de Joiner (1988). Les résultats ont été exprimés en \log_{10} kill, calculé comme \log_{10} ufc/ml des bactéries survivant dans le PHN_{décomplémenté} moins \log_{10} ufc/ml des bactéries survivant dans le PHN_{normal}.

$$\text{Log}_{10} \text{ kill} = \log_{10} \text{ ufc/ml de PHN}_{\text{décomplémenté}} - \log_{10} \text{ ufc/ml survivant dans le PHN}_{\text{normal}}$$

- b. La viabilité bactérienne (UFC/ml) :**

Cette méthode décrite par (Berends,2015), consiste à mesurer la survie des bactéries dans le PHN. Les conditions et les étapes de cette technique sont similaires à celle de la mesure de la mort bactérienne (étape 01) sauf que la technique de Berends utilise pour la mesure de la viabilité le dénombrement des bactéries après contact avec PHN normal.

- ✓ **Dosage fonctionnel de la voie alterne de complément (AP100) :**

« L'Alternative Pathway 100 » (AP100) est la technique modifiée de AP50, permet de mesurer la concentration ou le temps nécessaire pour lyser 100% des globules rouges (érythrocytes) de poulet non sensibilisés via la voie alterne et la voie terminale. L'activité en pourcentage suit la même logique. (Vialle, 2012 ;Rosain, 2014)

- Principe**

Le dosage de l'activité du système du complément se fait par des tests fonctionnels. Ces tests reposent tous sur un même principe: la capacité des fractions du complément présent dans l'échantillon (à savoir le plasma à tester) à lyser des particules par formation du complexe d'attaque membranaire. Cette lyse s'accompagne d'une modification de la texture et la couleur des boîtes AP100 par formation des zones de lyse.

On a effectué cette technique avec trois répétitions.

- Technique**

- Préparation du tampon EGTA/Mg⁺⁺**

Dans un tube stérile mettre 9,8 ml de tampon(EGTA) à 56°C.

- Préparation des érythrocytes du poulet**

Centrifuger le sang du poulet à 2500 tours/min pendant 10 min. Avec une micropipette prendre 200 µl de globules rouge au fond de tube. Puis lavez cette quantité (le culot) 2 fois avec le tampon de lavage. Après lavage ajouter 2,1 ml de tampon interne (tampon de lavage) et mettre la suspension cellulaire au bain Marie à température de 45 °C.

➤ Préparation du gel d'agarose

Avec la balance peser 0,24 g de poudre de gel d'agarose. Ajouter 12,25 ml de tampon de lavage (85 °C) puis ramener la température du gel à 45°C (sonde de température).

➤ Préparation des boîtes d'AP100

Mélanger le tampon EGTA/Mg⁺⁺ (9,8 ml) et le gel puis laissé refroidir à 45 °C. Ajouter la suspension de globules rouges du poulet préparée précédemment à 45 °C, et mélanger doucement. Couler le gel dans les boîtes de pétrie, laisser refroidir à 4 °C pendant 10 min en laver le point en utilisant la pipette Pasteur pour creuser des puits espacés de 1.5 cm.

➤ Mise en contact des bactéries et PHN

Après décongélation de PHN diluer ce dernier à 10 % .Mélanger 150µl de PHN avec 150µl de la suspension bactérienne de DO=0.08-0.1 à analyser. Incuber à 37°C pendant 10 min Puis mettre 50 µl du mélange à tester de chaque bactérie au centre des puits .

À titre de contrôle 50 µl PHN(E1) est déposé au niveau du puit central comme une référence afin d'obtenir une courbe d'étalonnage ; 50µl de PHN à 50% (E2) et de 25% (E3) sont mises dans les puits.

Les boîtes AP100 ont été placées dans une chambre humide à une température ambiante 25°C pour développer les zones de lyse pendant 74h avec un suivi.

➔ Lecture :

Les diamètres des zones de lyse de chaque puit ont été mesurés de trois façons : verticale, horizontale et incliné en utilisant le logiciel « Image J© » et le pied à coulisse.

Les diamètres sont mesurés à six temps (18h ,24h,42h,48h,72h,74h).

On a calculé la surface de la zone d'inhibition ($\pi *r^2$) .l'AP 100 est calculé par l'équation graphique de la courbe d'étalonnage de 74h .

✓ Analyses statistiques

Toutes Les fiches ont été saisies sur Excel 2007 puis importer sur le logiciel SPSS Version 23 qui nous a permis de faire l'étude statistique descriptive et analytique.

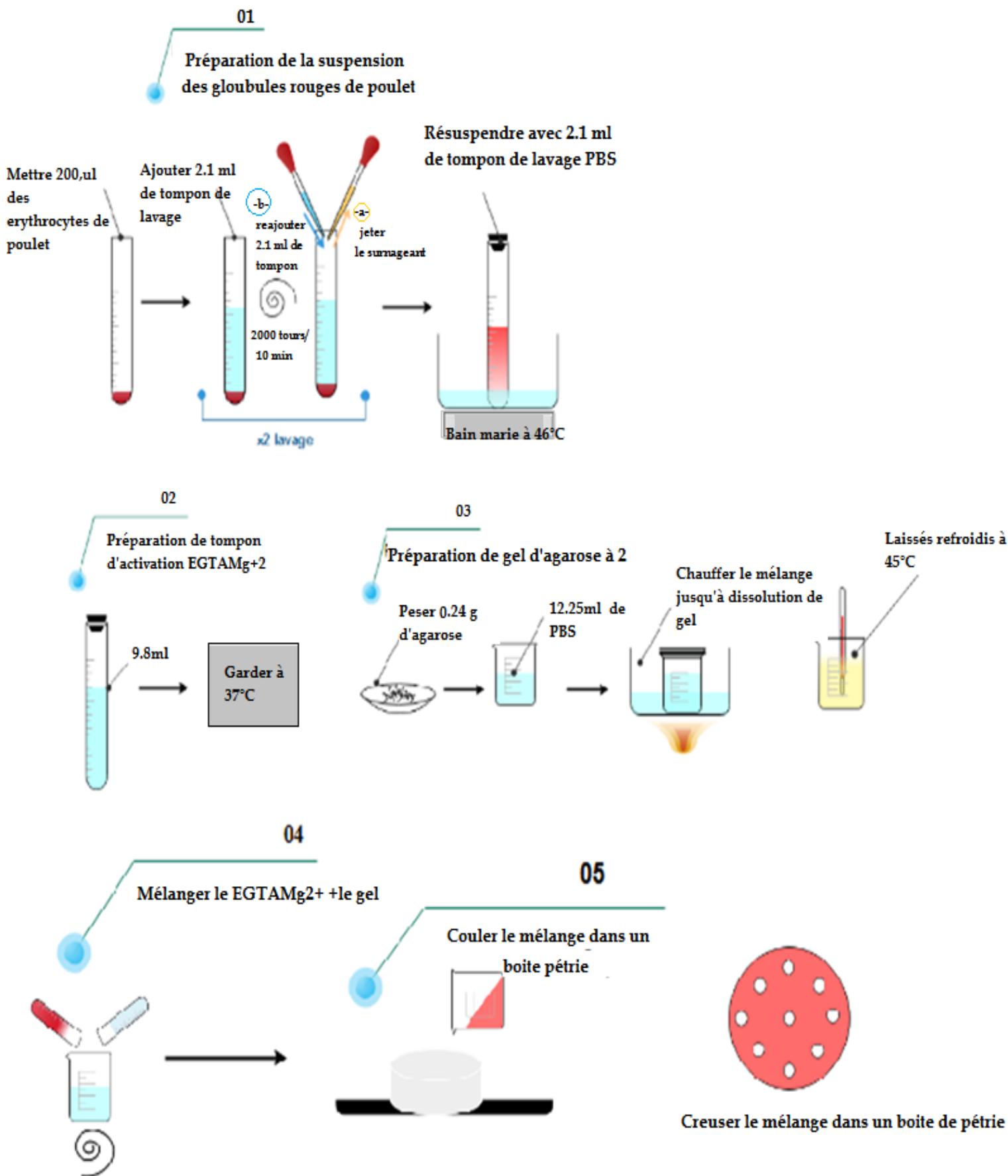


Figure 05: Schéma récapitulatif de la technique « AP100 »

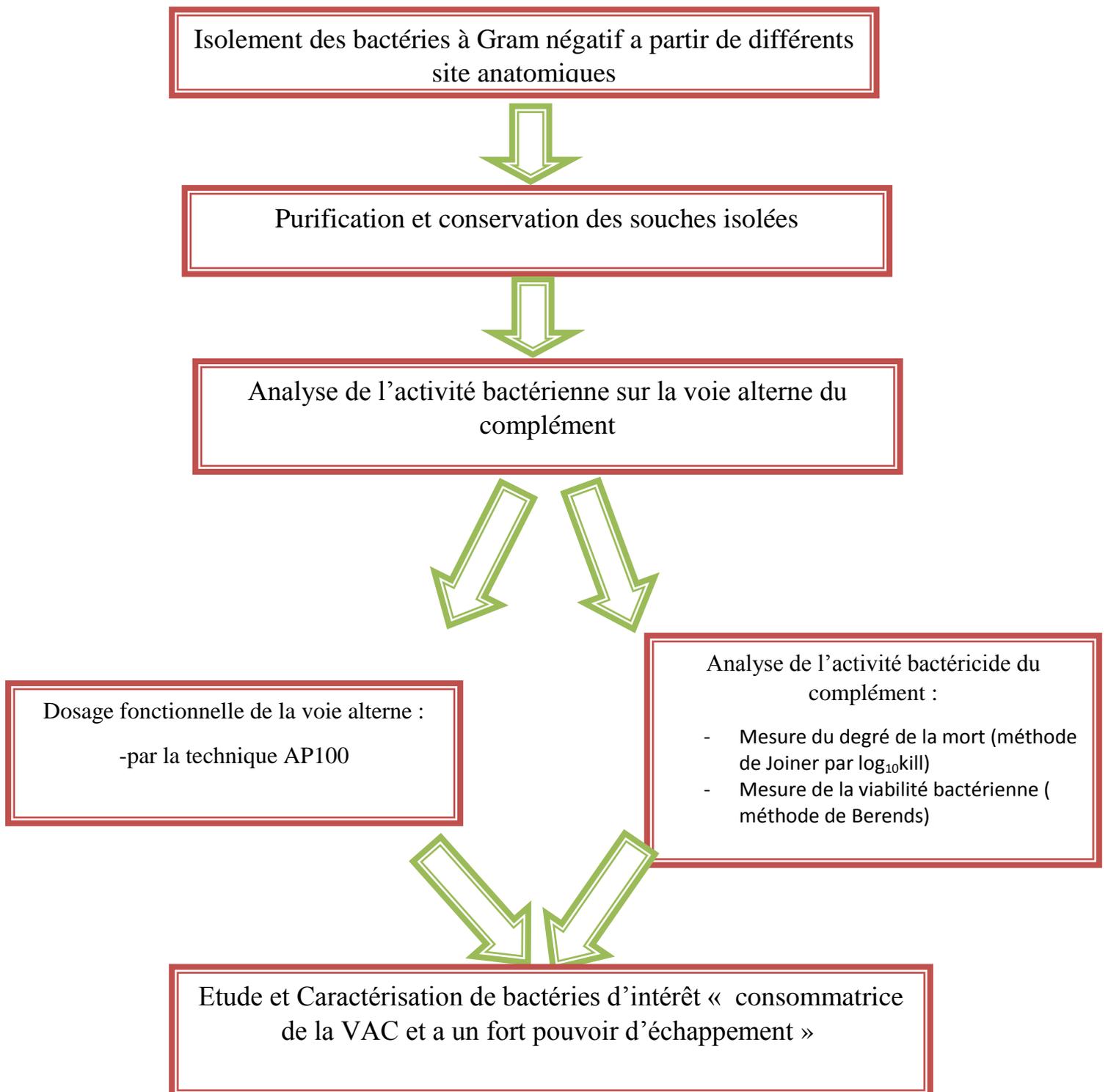


Figure 06: Shéma récapitulatif des principales étapes de l'étude

Résultats et interprétation

1. Analyse descriptive de l'échantillon

1.1 Nombre d'échantillon collecté selon le site de prélèvement

Notre étude a été réalisée à l'établissement public de l'Hôpital Mohamed Boudiaf (MB), le laboratoire privé « EL Amel » de "Ouargla", l'Hôpital Terichin Ibrahim (TI) de Ghardaïa et le Laboratoire de Bactériologie de la maternité de Touggourt, qui s'est étalée sur une période de deux mois du 12 Février au 14 Avril 2019.

Tableau 05: Répartition de l'échantillon étudié

		Site de prélèvement				Total	Pourcentage (%)
		Hôpital d'Ouargla	Hôpital de Ghardaïa	Maternité de Touggourt	Laboratoire privé « Amel»		
Type de prélèvement	ECBU	07	10	01	10	28	63,64
	ECB de pus	02	4	00	00	06	13,64
	Hémoculture	01	00	00	00	01	2,27
	Prélèvement vaginale	00	00	04	00	04	9,09
	coproculture	00	05	00	00	05	11,36
Nombre de prélèvement		10	19	05	10	44	100
Sexe du patient	Femme	07	13	05	08	43	77,27
	Homme	03	06	00	01	10	22,73
Age de patient	Adulte(>16ans)	18	09	05	09	41	93,18
	Enfant(<16ans)	01	01	00	01	03	6,82

1.2 Répartition selon le site

Sur les 44 prélèvements effectués dans quatre sites différents, 19 cas se sont avérés positifs dans l'EPH de Ghardaïa ; et 10 cas positifs à part égale dans l'EPH de Ouargla et de laboratoire « El Amel » et de 5 cas de la Maternité de Touggourt (**tableau 05**).

1.3 Répartition selon l'âge

Sur une totalité des 44 bactéries isolées à partir des produits pathologiques, 41 prélèvements de patients adultes avec un pourcentage de 93% et 03 patients sont des enfants avec un pourcentage de 7 % (**tableau 05**).

1.4 Répartition selon le sexe des patients

Au total 44 patients de notre échantillon dont (77,3 %) était de sexe féminin et (22,7%) était de sexe masculin (**tableau 05**).

1.5 Répartition des souches identifier selon l'espèce

parmi les 44 bactéries qui nous avons étudié. Les bactéries identifiées par ordre de fréquence étaient : *E coli* (n=21=47%), *Enterobacter cloacae* (n=6=14%), *Serratia marcescens* (n = 5=11%) *Pseudomonas aeruginosa* (n= 4= 9%), *Proteus mirabilis* (n=4 =9%), *Klebseilla oxytoca*(n =2 =5%) et *Klebseilla pneumoniae*(n=2 = 5%).

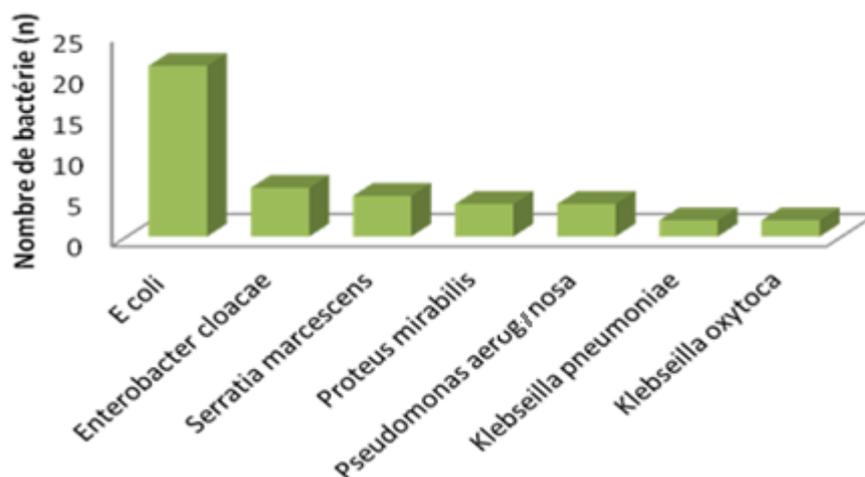


Figure 07: Répartition de l'échantillon selon l'espèce identifiée

1.6. Répartition de l'échantillon selon type de prélèvement

Sur les 44 souches des *BGN* isolées, 63,6% des prélèvements ont été diagnostiquées dans les urines, 13,6% proviennent des prélèvements de pus, 11,4% dans les selles, 9,4% de prélèvement vaginale et 2,3% du sang (**tableau 05**).

Analyse bactériologique

2.1. Etude macroscopique

Les résultats de notre étude montrent que :

- Sur milieu GN
 - ✓ *Escherichia coli* apparait en colonies de 1-3 mm de diamètre généralement bombés, brillante, opaques, blanchâtres et bien rondes à surface lisses. (**Photo 1.1**)
 - ✓ *Klebsiella pneumoniae* : apparait en colonies de 3-4 mm de diamètre bombés, grasses, large, luisantes, très muqueuses et ayant tendance à la confluence. (**Photo 1.2**)
 - ✓ *Proteus mirabilis* : apparait sous forme d'un envahissement de la gélose en voile montrant des vagues successives, avec une odeur désagréable. (**Photo 1.3**)

✓ *Enterobacter cloacae* : apparaît en colonies rondes avec un diamètre de 2 à 3 mm et légèrement plates avec des bords irréguliers. **(Photo 1.4)**

✓ *Serratia marcescens*: apparaît en colonies de 1 à 3 mm diamètre, opaques et circulaires . **(Photo 1.5)**

✓ *Pseudomonas aeruginosa* : apparaît en Colonies plus petites lisses bombés à bord régulier, muqueuses et verdâtres . **(Photo 1.6)**

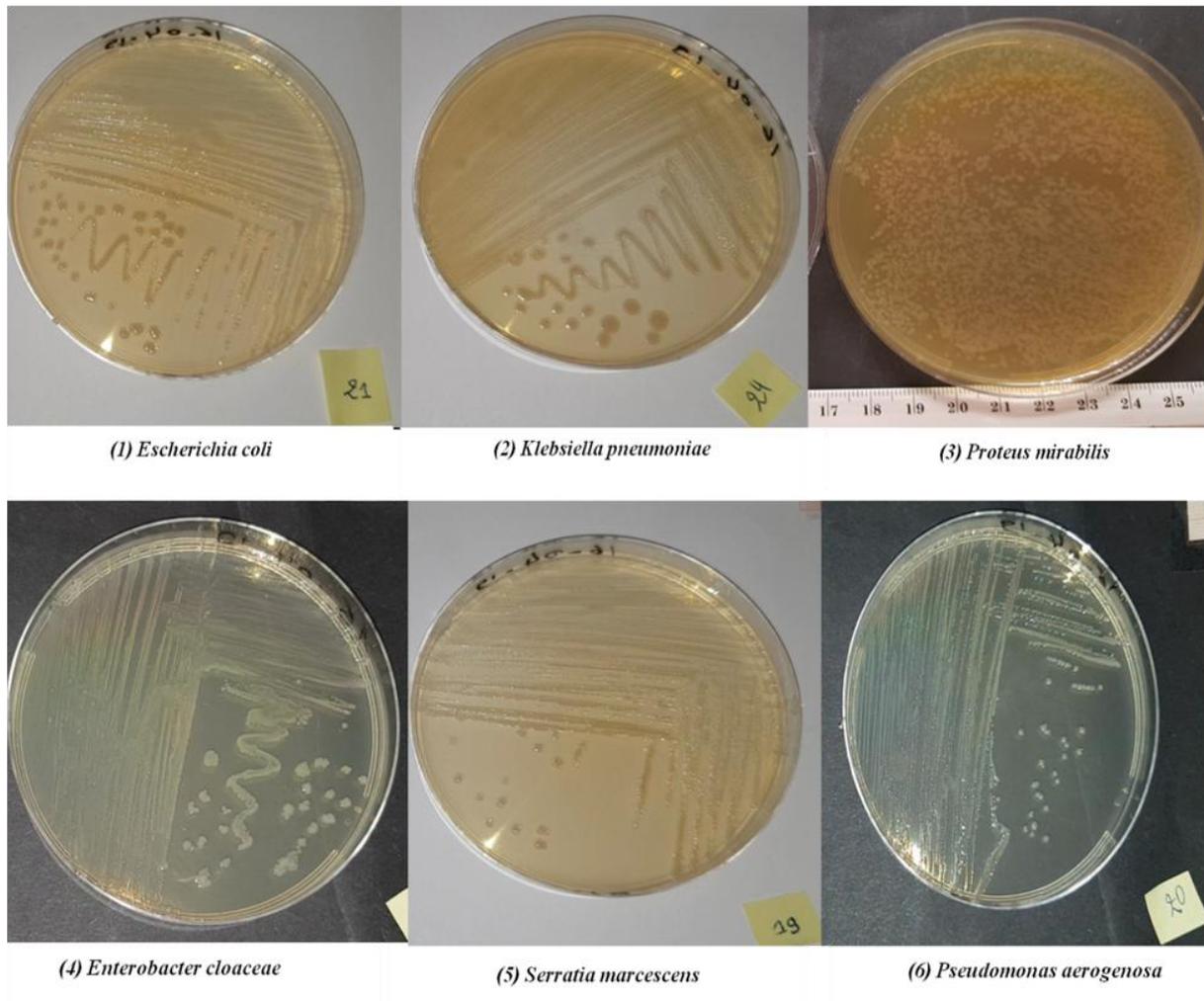
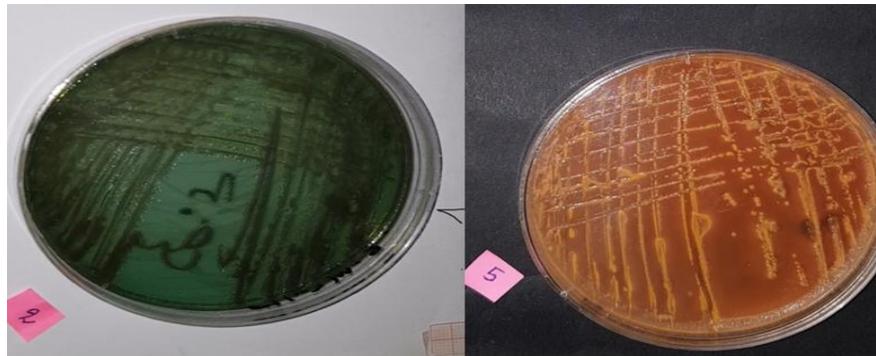


Photo 01: Aspect des six souches sur GN

- Sur milieu Hektoen

L'aspect des colonies sur milieu Hektoen est en relation de la capacité des micro -organismes à fermenté le lactose mis dans le milieu . Cela conduit à une production d 'acide qui abaisse le pH et modifie l'indicateur de pH placé dans le milieu qui vire du vert au jaune -orogé (saumon) **(figure 02)**.

Donc les souches qui sont lactose positif : *Escherichia coli* , *Klebsiella sp* , *Serratia marcescens* et *Enterobacter cloacae* et les souches lactose négatif sont : *Proteus mirabilis* et *Pseudomonas aeruginosa* .



Souche lactose (-)

Souche lactose (+)

Photo02:Aspect des colonies sur milieu Hektoen.

- Sur milieu GSC

Après incubation à 37°C pendant 24h, L'aspect des colonies sur milieu GSC sont de tailles moyennes parfois petites de couleur grisâtres ou beige.



Photo 02: Aspect des colonies sur milieu GSC.

2.2. Etude microscopique

2.2.1. Etat frais

L'observation microscopique montre que :

- *Escherichia coli* se présente sous forme de bacilles polymorphes, elle est mobile.
- *Klebsiella pneumoniae* donne des bacilles immobiles courts.
- *Proteus mirabilis* donne des bacilles sous forme bâtonnées, très polymorphes et mobiles.
- *Enterobacter cloacae* se présente sous forme de bacilles mobiles
- *Serratia marcescens* se présente sous forme de bacilles mobiles.
- *Pseudomonas aeruginosa* donne des bacilles très mobiles

2.2.2. Coloration de la capsule

Les résultats obtenus par observation microscopique après coloration par ancre de chine, montrent que les trois souches : *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, et *Enterobacter cloacae* présentent une couche polysaccharidique, la présence d'un halo clair et réfringent, donc se sont des bactéries encapsulées contrairement au *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Serratia marcescens* qui sont des bactéries acapsulées .

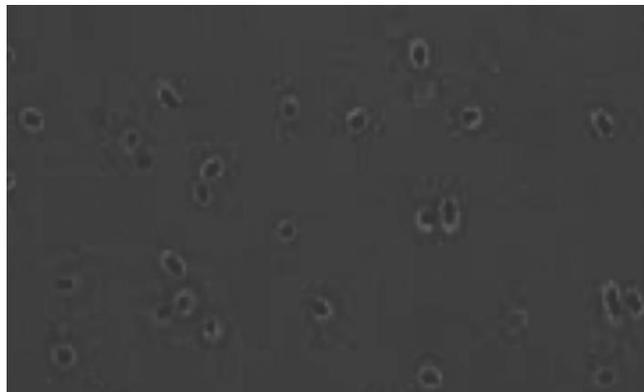


Photo 03: Coloration de la capsule

2.2.3. Coloration de Gram

Les résultats obtenus par observation microscopique après coloration de Gram, montrent que les six souches se présentent sous forme de bacilles ou coccobacilles colorées en rose . Donc ce sont des bacilles à Gram négatif.

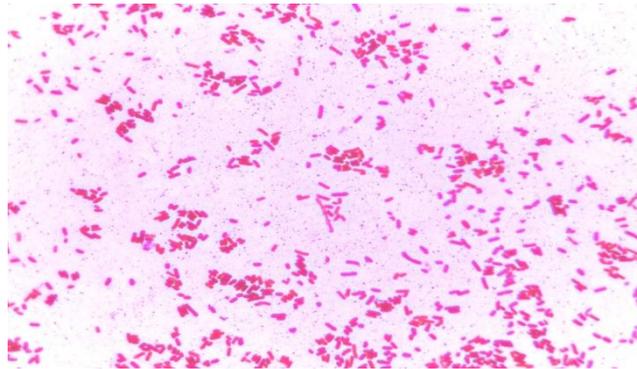


Photo 04: Bacilles à Gram négatif (coloration de Gram)

2.3. Etude biochimique

2.3.1. Identification par la galerie classique

- **Recherche de la catalase**

Des colonies sont met en contact avec de l'eau oxygéné (à 10 volumes). Une effervescence dû à un dégagement de dioxygène est apparait , signe la présence d 'une catalase. Les résultats obtenus étaient les suivants : Toutes les souches isolées sont des catalases positives

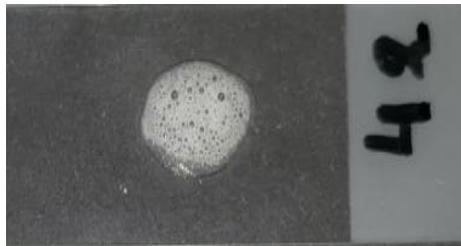


Photo 05: Test de catalase positive

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), produit toxique du métabolisme, en H_2O et $1/2 O_2$.

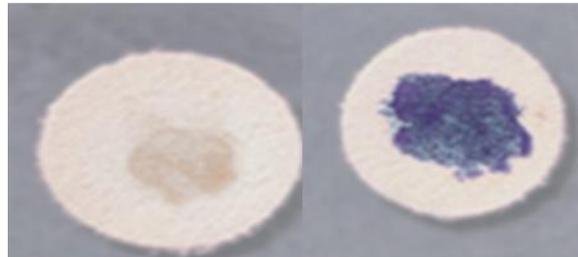
- **Recherche de l'oxydase**

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

Nos souches *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* et *Klebsiella sp* ,*Serratia marcescens* et *Enterobacter cloacae* étaient dépourvues d'oxydase et il n'y a pas eu de coloration , donc elles sont

oxydase négative . Par contre ,la souche de *Pseudomonas aeruginosa* présente une coloration violette ,donc elle est oxydase positive.

La cytochrome oxydase ou oxydase est une enzyme de la chaîne respiratoire bactérienne essentielle pour les bactéries aérobies stricte (*Pseudomonas aeruginosa*).



(1) Oxydase négatif (2) Oxydase positif

Photo 06: Test d'oxydase

- **Milieu TSI**

Dans la littérature, l'utilisation de l'un des sucres contenus dans le milieu se traduit par une acidification (virage au jaune du rouge de phénol). La gélose TSI fournit quatre renseignements principaux :

- Fermentation de glucose**

Si le culot est de couleur rouge orange (couleur inchangé), cela veut dire que la bactérie n'a pas fermenté le glucose et si la couleur du culot devient jaune on comprend donc que le glucose a été fermenté par la bactérie

- **Fermentation du lactose et/ou du saccharose**

- Pente inclinée rouge : lactose et saccharose non fermentés

- Pente inclinée jaune : lactose et/ou saccharose fermenté(s)

- **Production de gaz**

Apparition de gaz dans le culot.

- **Formation d'H₂S**

Formation d'une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la piqûre.

Après l'incubation, on a remarqué que pour *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, et *Enterobacter cloacae* il y a eu une acidification dans la pente et le culot, d'où le virage du rouge de phénol au jaune avec présence des bulles d'air et absence de noircissement donc les quatre souches sont: lactose et saccharose(+), glucose (+), gaz(+), H₂S (-) (**photo 9.2**)

Alors que pour *Serratia marcescens* et *Proteus mirabilis* il y a eu une acidification que dans le culot, avec présence des bulles d'air et absence de noircissement ; mais certaines souches de *Proteus* ont présentés un noircissement ; donc la bactérie est : lactose et saccharose (-), glucose (+), gaz (+), H₂S (-/+).(**photo 9.1 et 3**)



(1) *Serratia marcescens*



(2) *E. coli*



(3) *Proteus mirabilis*

Photo 07: Aspect du milieu TSI.

- **Milieu mannitol-mobilité**

- Fermentation du mannitol**

- Milieu jaune : Acidification du milieu révélée par un virage de l'indicateur de pH à sa teinte acide, la bactérie fermente le mannitol donc elle est dite mannitol+

- Milieu rouge : Absence d'acidification du milieu, la bactérie ne fermente pas le mannitol, elle est dite bactéries mannitol-

- **Mobilité**

- Diffusion des bactéries dans la gélose : Déplacement des bactéries dans le milieu (gélose semi-molle), les bactéries sont mobiles Mobilité +

- Culture uniquement au niveau de la piqûre centrale : Pas de déplacement des bactéries dans le milieu, les bactéries sont probablement immobiles

Les résultats qu'on a obtenu montrent que pour toutes les souches il y a eu une acidification du milieu, d'où le virage du rouge de phénol au jaune, donc toutes les souches sont mannitol(+), sauf *Proteus mirabilis*

En ce qui concerne la mobilité, les bactéries mobiles ont diffusé à partir de la ligne verticale d'ensemencement en créant un trouble, ce qui a été observé pour *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus mirabilis*. Alors que *Klebsiella sp* pousse uniquement le long de la strie d'ensemencement donc elle est immobile.



(1): mannitol-mobilite (-)

(2): mannitol-mobilite (+)

Photo 08: Aspect du milieu mannitol-mobilite

- **Milieu citrate de Simmons**

Présence de culture bactérienne [Milieu bleu] : Les bactéries utilisent le citrate comme seule source de carbone avec alcalinisation du milieu, Les bactéries possèdent un citrate perméase elles sont dites citrate +

- Présence de culture bactérienne [Milieu inchangé (vert)] : Les bactéries utilisent le citrate comme seule source de carbone sans alcalinisation du milieu, Les bactéries possèdent un citrate perméase elles sont dites citrate +

- Absence de culture bactérienne [Milieu inchangé (vert)] : Les bactéries n'utilisent pas le citrate comme seule source de carbone, Les bactéries ne possèdent pas de citrate perméase elles sont dites citrate -

Après incubation on a remarqué qu'il y a eu une alcalinisation du milieu, d'où le virage du bleu de bromothymol du vert au bleu, c'est ce qui a été observé pour *Klebsiella sp*, *Proteus*

mirabilis , *Enterobacter cloacae* et *Pseudomonas aeruginosa* qui sont citrate(+),ce qui n'est pas le cas pour *Escherichia coli* et *Serratia marcescens* qui sont citrate(-).

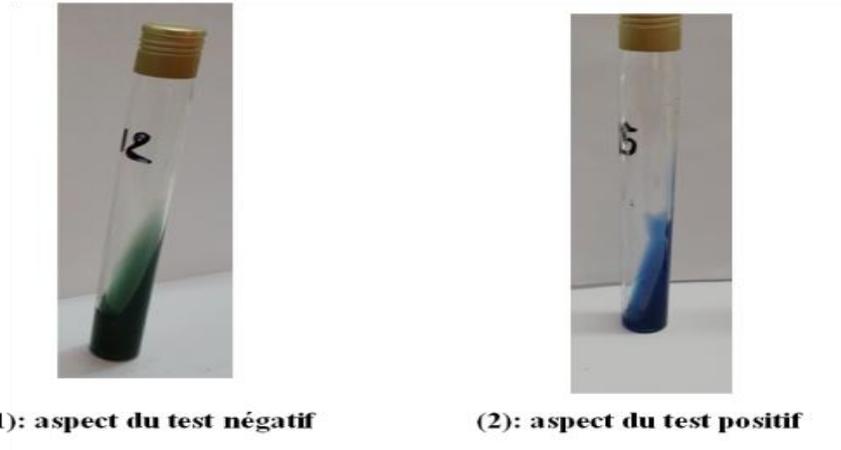


Photo 09: Aspect du milieu citrate de Simmons.

- **Milieu urée-indole**

- a- **Test d'uréase**

Concernant l'hydrolyse de l'urée , les souches *Klebsiella sp* , *Proteus mirabilis* et *Serratia marcescens* étaient urée (+) car il y a eu une alcalinisation du milieu d'où le virage de couleur de l'orange vers le rouge, par contre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter cloacae* étaient urée (-) car il n'y a pas eu un virage de couleur.

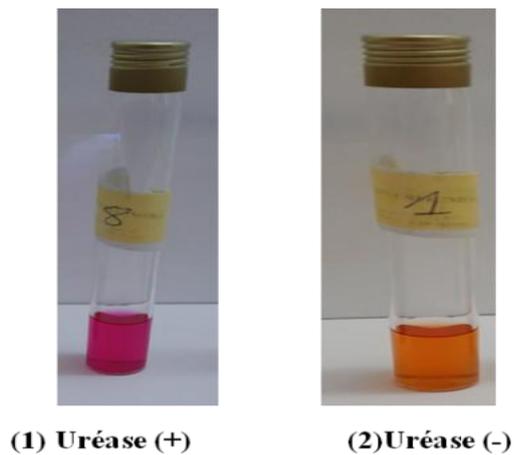


Photo 10: Aspect du milieu urée-indole.

b- Test de production d'indole

Après l'addition du réactif de Kovac's, nous avons remarqué l'apparition d'un anneau rouge que pour *Enterobacter sp* et *Serratia sp*, donc elles sont indole (+). Mais pas pour les autres bactéries, donc elles sont indole(-).

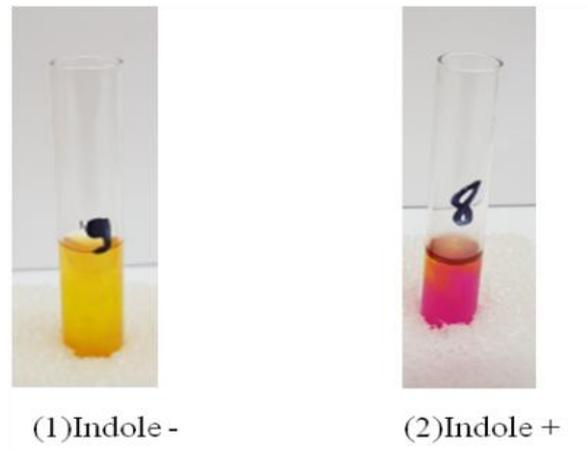


Photo 11: Aspect du test de production d'Indole

c- Test de TDA

Après l'addition du réactif TDA, on a remarqué l'apparition d'une coloration brun foncé pour *Proteus mirabilis* qui montre que la bactérie est TDA (+). Alors que les autres souches étaient TDA (-).



Photo 12: Aspect de test TDA -

- **Production de la β -Galactosidase (test ONPG) :**

Les souches d'*Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* sont Pourvues de la β - Galactosidase, elles ont donné un résultat positif c'est-à-dire ONPG (+) où le milieu utilisé devient jaune. Alors que la souche de *Proteus mirabilis* et *Pseudomonas aeruginosa* ont donné un résultat négatif avec le test ONPG c'est-à-dire le milieu restait incolore.

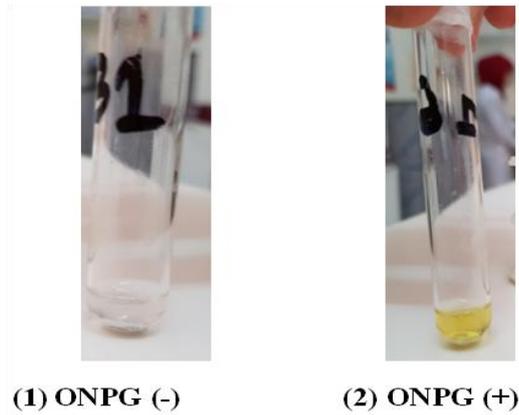


Photo 13: Test ONPG

- Tests RM-VP

Les souches d'*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* et *pseudomonas aeruginosa* sont VP négatifs car après ajouts des réactifs VP 1 et VP2 il n'y a pas eu de réaction . Par contre la souche de *Klebsiella sp*, *Enterobacter cloacae* ,*Serratia marcescens* ont donnés un résultat positif VP (+) (Coloration rose à rouge).

Concernant le test RM, les souches d'*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus mirabilis* sont RM positif car le milieu est devenu rouge après l'addition du réactif de rouge de méthyle, contrairement à *Klebsiella pneumoniae*,*Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* sont RM négatifs car aucune réaction ne s'est produite.

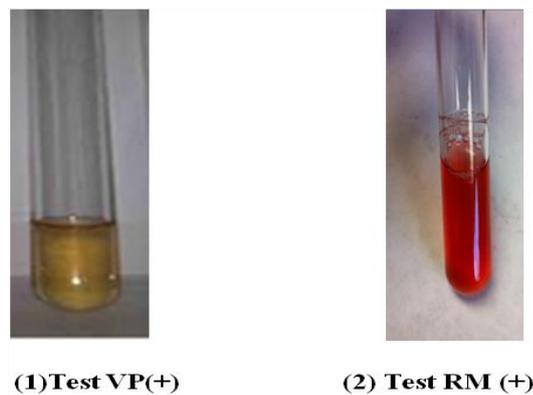


Photo 14: Test VP-RM

- **Production des pigments : King A et King B**

Après incubation à 37°C, les résultats montrent que les deux milieux King A et King B nous ont permis de mettre en évidence la pyocyanine et la pyoverdine (produites par les souches de *Pseudomonas aeruginosa*) qui colorent le milieu de culture.



Photo 15: Production de pigment

2.3.2. Identification par la galerie API 20 E

- *Escherichia coli* (13)(5144572)



Photo 16: *E. coli* par galerie API20E

Tableau 06: Identification des bactéries par Galerie API 20E

Tests	<i>E.coli</i>	<i>P.mirabilis</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>E.cloacae</i>	<i>S.marcescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>
ONPG	+	+	+	+	+	+	-
ADH	-	-	-	-	+	-	+
LDC	+	-	+	+	-	+	-
ODC	+	+	-	-	+	+	-
CIT	-	+	+	+	-	+	+
H2S	-	+	-	-	-	-	-
URE	-	+	-	+	-	+	-
TDA	-	+	-	-	-	-	-
IND	+	+	-	+	+	+	-
VP	-	-	+	+	-	-	+
GEL	-	+	-	-	-	+	+
GLU	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+	-
INO	-	+	+	+	+	-	-
SOR	+	+	+	+	-	+	-
RHA	+	+	+	+	+	+	-
SAC	+	+	+	+	+	+	-
MEL	+	+	+	+	+	+	+
AMY	-	+	+	+	+	-	-
ARA	+	+	+	+	+	+	-

3. Etude de l'interaction « Bactérie-Voie alterne du complément »

3.1. Activité hémolytique de la voie alterne de complément sur les bactéries

Après l'incubation, on obtient des zones ou des domaines des hémolyses avec un diamètre qui est peut être soit inférieure ou supérieure au diamètre de la zone de lyse de PHN (le contrôle positif). La lyse de globule rouge et l'apparition de la zone hémolytique reflète l'activation de la cascade du complément conduit à la formation du MAC.

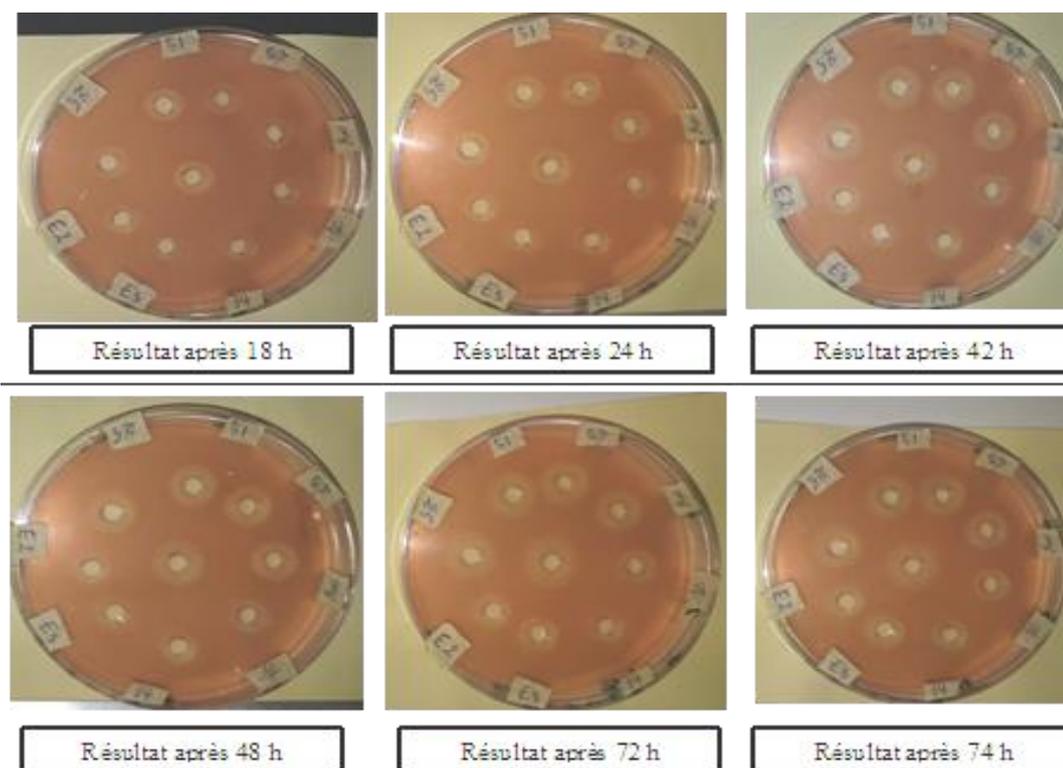


Photo 17: Résultat de l'Activité hémolytique de la voie alterne de complément sur les bactéries isolées (AP100)

3.2. Dosage de l'activité bactéricide de complément

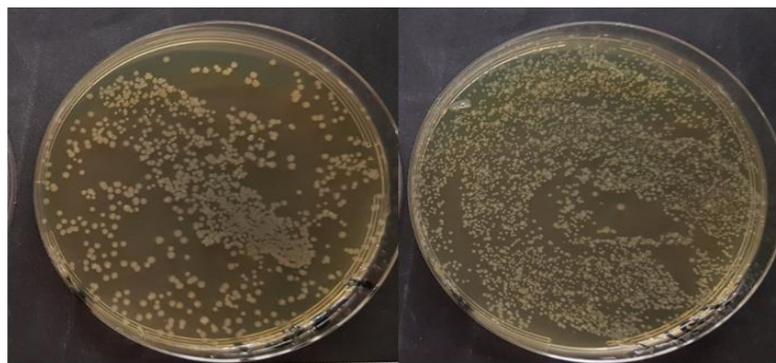
3.2.1. Dosage de degré de la mort bactérienne (\log_{10} kill) :

Après incubation à 37°C pendant 24h, Le nombre des colonies appariaient sur la gélose montre qu'il y a une différence entres les boites après contact avec le PHN normale et celle avec le PHN décomplementé.

Exemple de la La concentration bactérienne (CB) de la souche n°1 est de :

$$CB_{\text{PHN normale}} = 651840 \text{ UFC/ml}, \quad CB_{\text{PHN décomplementé}} = 3403520 \text{ UFC/ml}$$

$$\text{Log}_{10} (651840)_{\text{décomplementé}} - \text{log}_{10}(3403520)_{\text{complementé}} = 0,73 .\text{Log}_{10}\text{kill} = 0.73$$



(1) Souche n° 1-PHN normale

(2) Souche 1- PHN décomplémenté

Photo 18: Survie bactérienne suite à l'effet bactéricide complément-dépendant

4 Analyse statistique des résultats

4.1 Selon le site de prélèvement

Nos isolats étaient collectés à partir de différents sites: l'EPH de Ouargla, EPH de Ghardaïa ; le service de maternité de Touggourt et le laboratoire d'analyse privé El-AMEL à Ouargla. Afin d'étudier l'éventuelle association entre le site de prélèvement sur l'activité de complément, nous avons comparé les moyennes par le test de Kruskal-Wallis. Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a aucune différence statistiquement significative ($p > 0.05$).

4.2 Selon le type de prélèvement

Nous nous sommes intéressés à étudier l'effet des types de prélèvements (le site anatomique) sur la voie alterne de complément. Pour cela nous avons utilisé le test de comparaisons de moyennes par Kruskal-Wallis entre : AP100, complément résiduelle, complément consommé, le pouvoir de l'interaction bactérie-VAC (mesurée par l'aire sous la courbe de la cinétique « AUC »), le degré de la mort bactérienne en fonction de type de prélèvement pour toutes les bactéries.

Aucune différence statistiquement significative observée entre les isolats provenant de différents sites anatomiques et leur activité bactérienne sur la voie alterne de complément ($p = 0.569$), ni avec le degré de la mort bactérienne ($p = 0.403$) ni avec la vitesse d'activation de la VAC ($p = 0.216$).

4.3 Analyses-en sous groupe (échantillon scindé)

Afin de confirmer les résultats précédents, nous avons procédé à une analyse statistique d'échantillon scindé en deux selon l'activité microbienne sur complément. De ce fait on réfère à

l'échantillon bactéries consommatrices de la voie alterne du complément par le terme « Bactéries Consommatrices » et au deuxième échantillon qui contient les bactéries qui n'ont marqué aucune consommation voir même une hémolyse plus grande que la valeur obtenue dans les puits du PHN par le terme « Bactéries Non Consommatrices ».

Donc a fin de justifier les résultats, on a scindé notre échantillon selon la consommation ou non de la voie alterne :

- Cette approche a révélé une différence statistiquement significative selon le complément résiduelle entre l'EPH de Ouargla et le service de maternité de Touggourt dans le groupe d'inhibiteur ($m_{\text{EPH de Ouargla}} = 8.27 \pm 03.53$; $m_{\text{maternités}} = 17.18 \pm 9.48$; $p = 0.035$). Ceci signifie que les bactéries prélevées de la maternité de Touggourt consomment plus du complément par rapport aux bactéries provenant de l'EPH de Ouargla. (**Figure 08**)

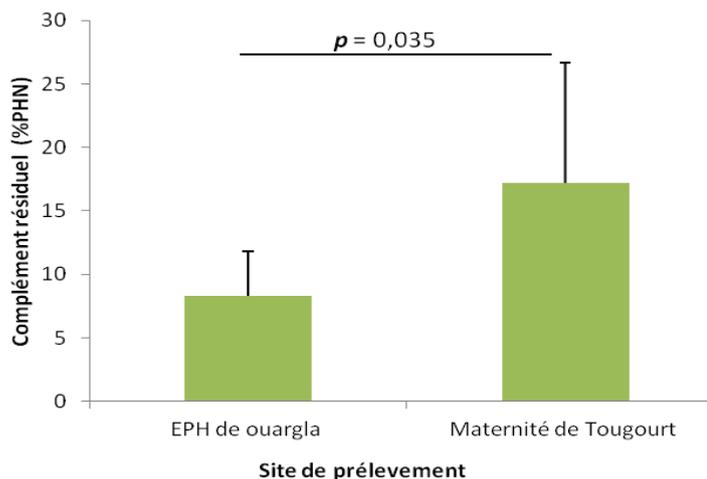


Figure 08: Complement residuel (PHN%) en fonction des sites de prélèvement

- Cette opération nous a permis de trouver une différence statistiquement significative entre l'activité des bactéries provenant du pus, coproculture ou prélèvement vaginale(PV).

Nous avons constaté que l'interaction bactérie-VAC mesurée par l'AUC est plus importante chez les bactéries prélevées de type coproculture par rapport à celles prélevées de pus ($p = 0.02$ avec un $m_{\text{pus}} = 76.7 \pm 11.57$ et $m_{\text{coproculture}} = 85.2 \pm 15$) tandis que selon l'activité bactérienne sur VAC ($m_{\text{pus}} = 2.14 \pm 0.0007$, $m_{\text{PV}} = 2.17$ avec un $p = 0.019$). (**Figure 09**)

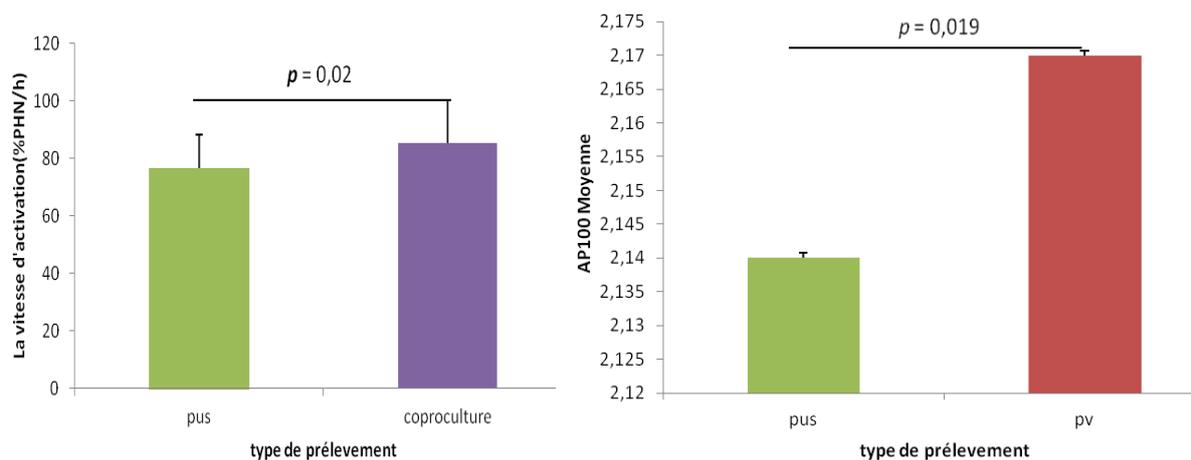


Figure 09: Activité bactérienne sur la VAC selon le type de prélèvement

4.4 Selon l'âge

A fin d'étudier la relation entre l'âge du patient et l'activité bactérienne sur le système de complément, nous avons réalisé un test de comparaison de moyenne entre les paramètres suivants : Activité bactérienne sur VAC, complément consommée, complément résiduelle, le degré de la mort bactérienne (\log_{10} kill), avec un intervalle de confiance de 95%.

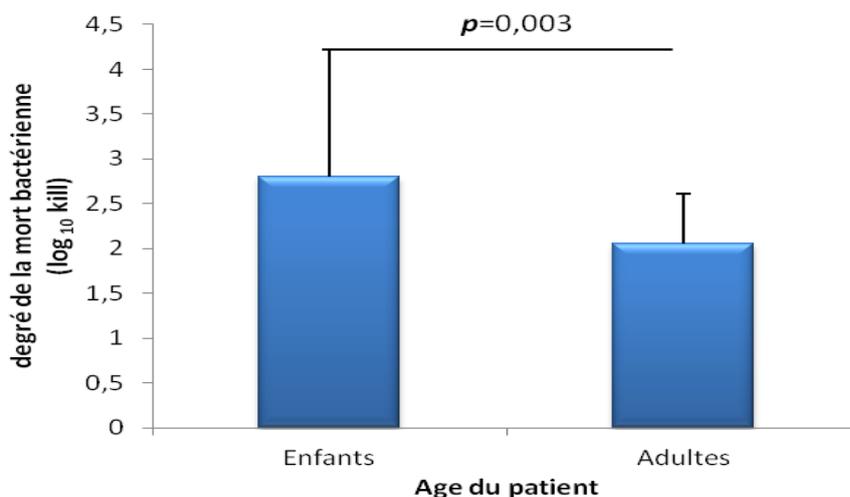


Figure 10: Degré de la mort bactérienne (\log_{10} kill) en fonction de l'âge des patients

Nos résultats montrent qu'il y a une association entre l'âge du patient et le degré de la mort bactérienne (\log_{10} kill) ($m_{adulte} = 2.06 \pm 0.55$; $m_{enfant} = 2.82 \pm 1.42$) avec le $p=0,003$

4.5 Selon le sexe

Pour tester l'association du sexe des patients sur l'activité bactérienne sur la voie alterne de complément, nous avons comparé les moyennes de la mort bactérienne du groupe des bactéries consommatrices de la VAC et le degré, en utilisant le test de Kruskal-Wallis.

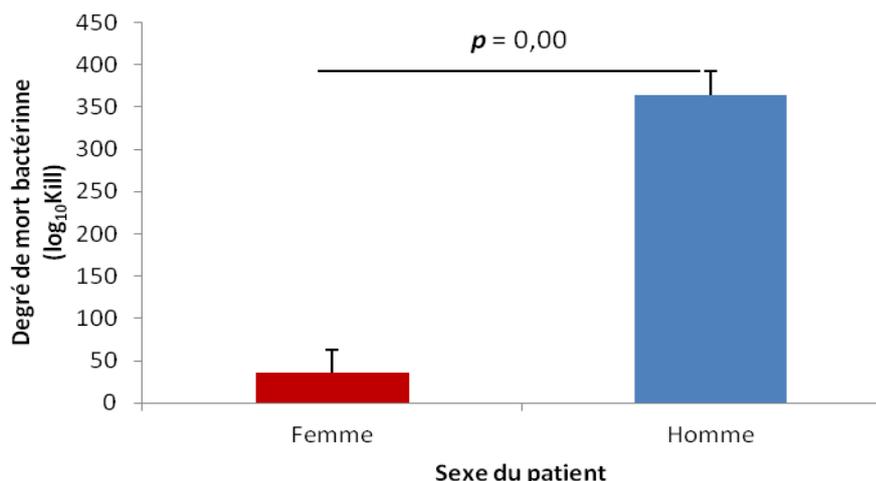


Figure 11: Degré de la mort bactérienne en fonction du sexe des patients

Les résultats montrent qu'il existe une différence statistiquement significative de la mort bactérienne selon le sexe du patient . (mF= 35.5± 27.98 ; mH =364.27) avec un $p = 0,00$. (**Figure11**)

4.6 Selon la consommation de la voie alterne du complément

L'analyse des résultats de la technique AP100 nous montre le taux de la répartition des souches de notre échantillon selon la diminution fonctionnelle de la voie alterne du complément.

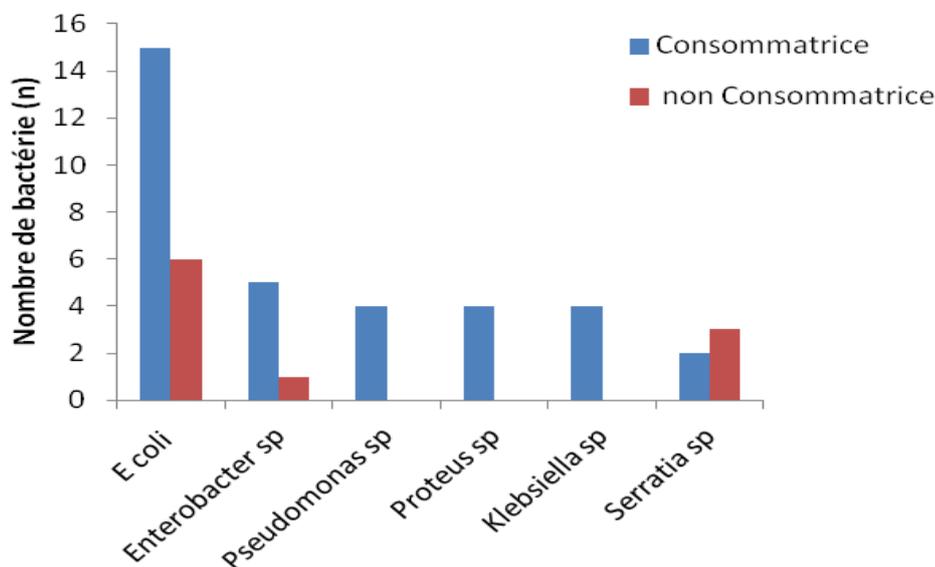


Figure 12: Consommation de la voie alterne du complément en fonction des genres bactériens

Toutes les souches appartiennent au genre d'*E coli* (15/44) , (5/44) d'*Enterobacter sp* , alors que (4/44) de *Proteus sp* ,*Klebsiella sp* et *Pseudomonas sp* et seulement (2/44) de *Serratia sp*. consomment la VAC(**Figure12**)

4.7 Répartition des genres Selon la survie après contact avec la VAC.

Vu que notre travail s'intéresse à l'échappement bactérien contre l'attaque de la voie alterne du complément nous avons défini un paramètre qui reflète ce phénomène d'échappement et qui consiste à caractériser nos bactéries en fonction de la mort lente ou rapide. le premier « bactérie à mort lente » réfère les bactéries avec un bon pouvoir d'échappement alors que le terme « bactéries à mort rapide » réfère les bactéries à faible pouvoir d'échappement. A fin d'étudier ce phénomène d'échappement nous avons fixé une valeur seuil basée sur le dénombrement bactérien après interaction avec la VAC. Cette valeur est fixée entre à 10^6 car on a pas de survie dépassant le 10^7 ni de mort inférieur à 10^5 et constitue une valeur $\pm \log_{10}$ de ces deux bornes.

Les bactéries survécues sont celles qui présentent un seuil de **viabilité** $\geq 10^6$; **$\log_{10}kill$** ≥ 6 et celles qui présentent un seuil de **viabilité** $< 10^6$; **$\log_{10}kill$** < 6 sont des bactéries mortes

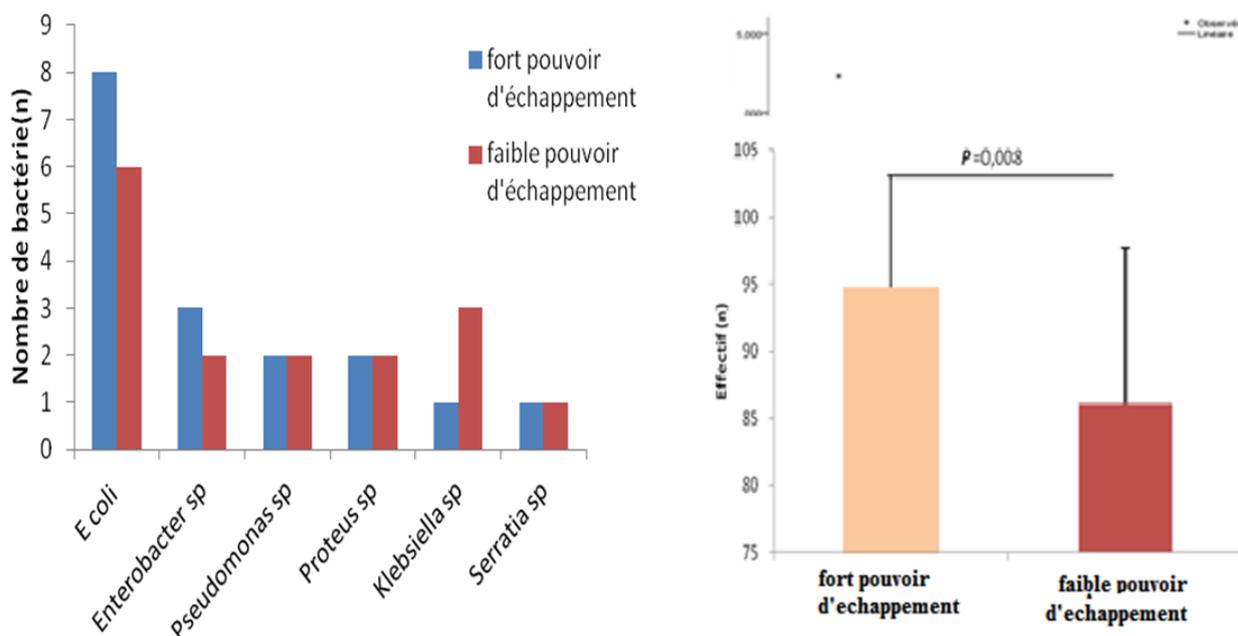


Figure 13: Répartition des genres bactériens selon le pouvoir d'échappement .

4.8 Répartition des genres bactériens selon l'activité bactériennes sur la VAC

Pour approfondir cette interaction bactérie-VAC nous nous sommes intéressés à étudier le groupe des « bactéries consommatrices » qui sont caractérisées par le faible complément résiduel après leur interaction avec plasma humain normal. Nous avons pu identifier 17 bactéries à fort pouvoir d'échappement avec un faible complément résiduel

D'après les résultats précédents de la viabilité bactérienne ,AP100 et la consommation de la VAC ;nous avons pu vérifier le pouvoir de résistance de système de complément des bactéries isolées .Les bactéries considérées comme à fort pouvoir d'échappement au VAC sont celles qui consomment les protéines du complément et survivent après incubation avec le PHN à 1 :10. Nous proposons le paramètre « taux de résistance » défini par le nombre des bactéries consommatrices à fort pouvoir d'échappement de la VAC par rapport au nombre totale des bactéries isolée (**Figure 14 .**)

Nous avons décrit ce groupe de bactéries ayant un fort pouvoir d'échappement et une consommation importante du complément selon ses six genres pour le bien caractériser :

(8/17) d' *E.coli* , (3/17) d'*Enterobacter sp* , (2/17) de *Pseudomonas sp* , (2/17) *Proteus sp* (1/17) de *Klebsiella sp* , (1/17) de *Serratia sp*.

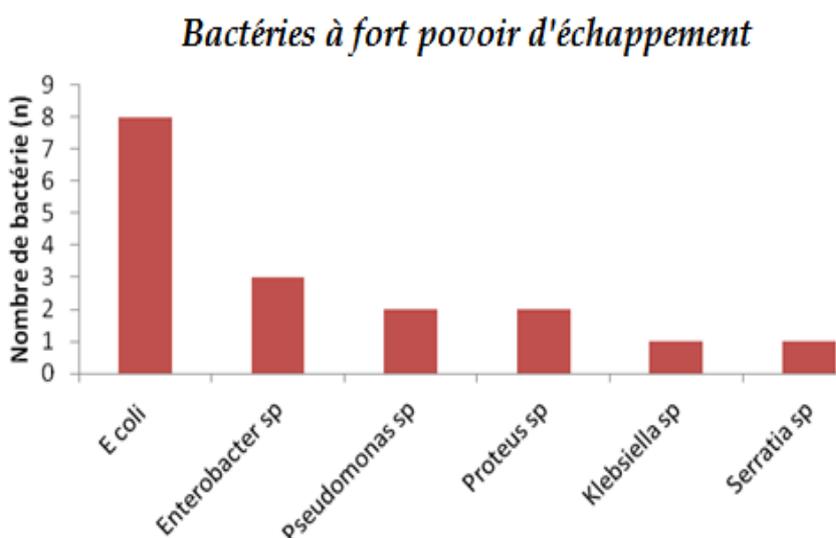


Figure 14: Répartition des genres bactériens selon l'activité bactériennes sur la VAC

4.9 Répartition des bactéries à fort pouvoir d'échappement à la VAC selon la capsule.

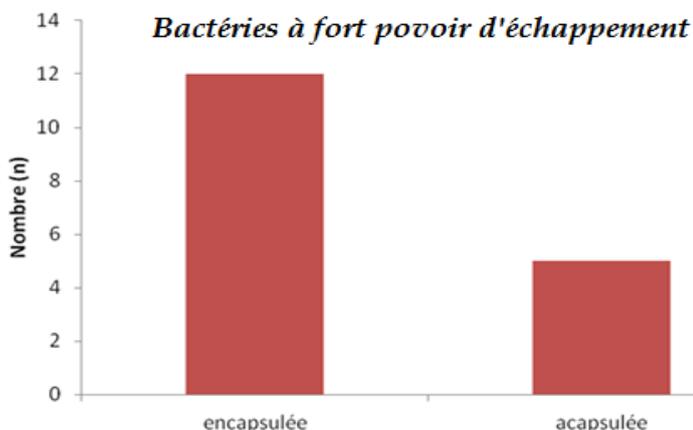


Figure 15: Répartition des bactéries à fort pouvoir d'échappement selon la capsule

Notre groupe d'intérêt « bactéries consommatrices à fort pouvoir d'échappement » a été caractérisé encore une fois selon la présence ou absence de capsule. Nous notons que la majorité de ces bactéries (12/17) possèdent la capsule (**Figure15**).

La forte association de la capsule avec le groupe de « bactéries consommatrice à fort pouvoir d'échappement » nous a poussé à comparer étudier le complément résiduel chez les bactéries encapsulées en fonction de leur pouvoir d'échappement. Nous avons constaté que la consommation de complément est plus importante chez les bactéries encapsulées à faible pouvoir d'échappement par rapport à celles à fort pouvoir d'échappement ($p=0.007$) (**Figure 16**)

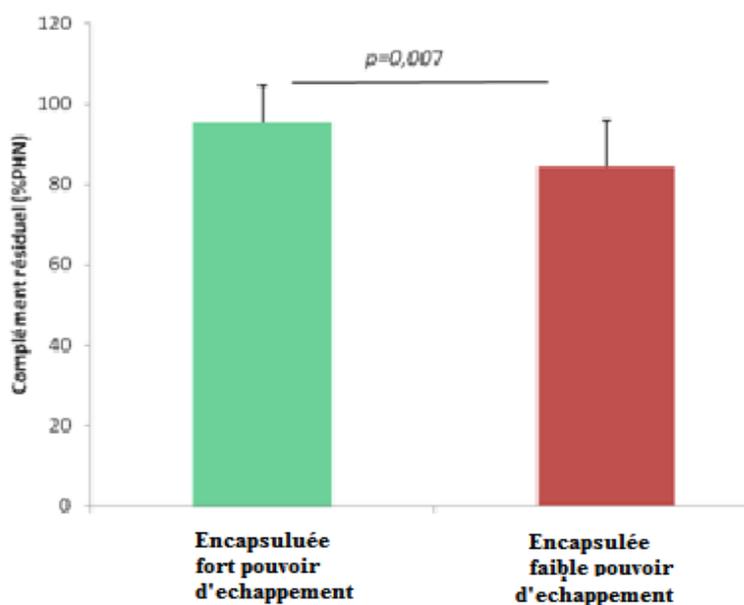


Figure 16: Répartition des bactéries encapsulées a fort pouvoir d'échappement et de consommation

4.10 Suivre chronologique de l'activité bactérienne sur la voie alterne du complément

Les bactéries ayant un fort pouvoir d'échappement sont comparées en fonction de leur interaction avec la voie alterne en utilisant la mesure chronométrique de 74 heures de l'AP100 avec une référence de la valeur 2 comme 100% de la fonction de la voie alterne du complément.

(1)- Le suivie de l'activité bactérienne sur la VAC nous montre que les deux souches échappement de *Proteus mirabilis* se caractérisent par un fort pouvoir inhibiteur. On remarque que la variation de l'AP100 est constante de 18h-72h pour la souche 33 et de 18h -48h pour la souche 42 puis augmente faiblement pour les deux souches. on note aussi que les deux souches de *Proteus mirabilis* ont une faible vitesse d'inhibition.

(2) -La souche 2 d'*E.coli* présente une activité bactérienne constante sur la voie alterne de complément avec un $R^2 = 0,9765$ et une faible vitesse d'accélération($\alpha = 0,0073$) alors que l'AP100 de la souche 1 augmente de 18h -48h puis se stabilise.

(3)-Les deux souches de *Pseudomonas aeruginosa* présentent une activité inhibitrice similaire .De 18h-42h AP100 de la souche 31 augmente plus que la souche 35.de 48h-74h l'activité des deux souches redevient stable.

(4) -L'activité bactérienne sur la VAC de la souche 16 *Serratia marcescens* augmente de 18h-48h après cet intervalle de temps elle consomme la VAC de48h-72h puis elle augmente de nouveau légèrement.

(5) - *Klebsiella sp* présente une activité constante durant 72h puis son activité augmente d'une façon exponentielle.

(6)- La souche 9 d'*Enterobacter cloacae* présente une activité stable de 18h-74h alors que les deux autres souche 20 et 32 présentent une faible différence de l'activité qui augmente faiblement dans les 2 premiers jours puis elle se stabilise jusqu'à 74h .

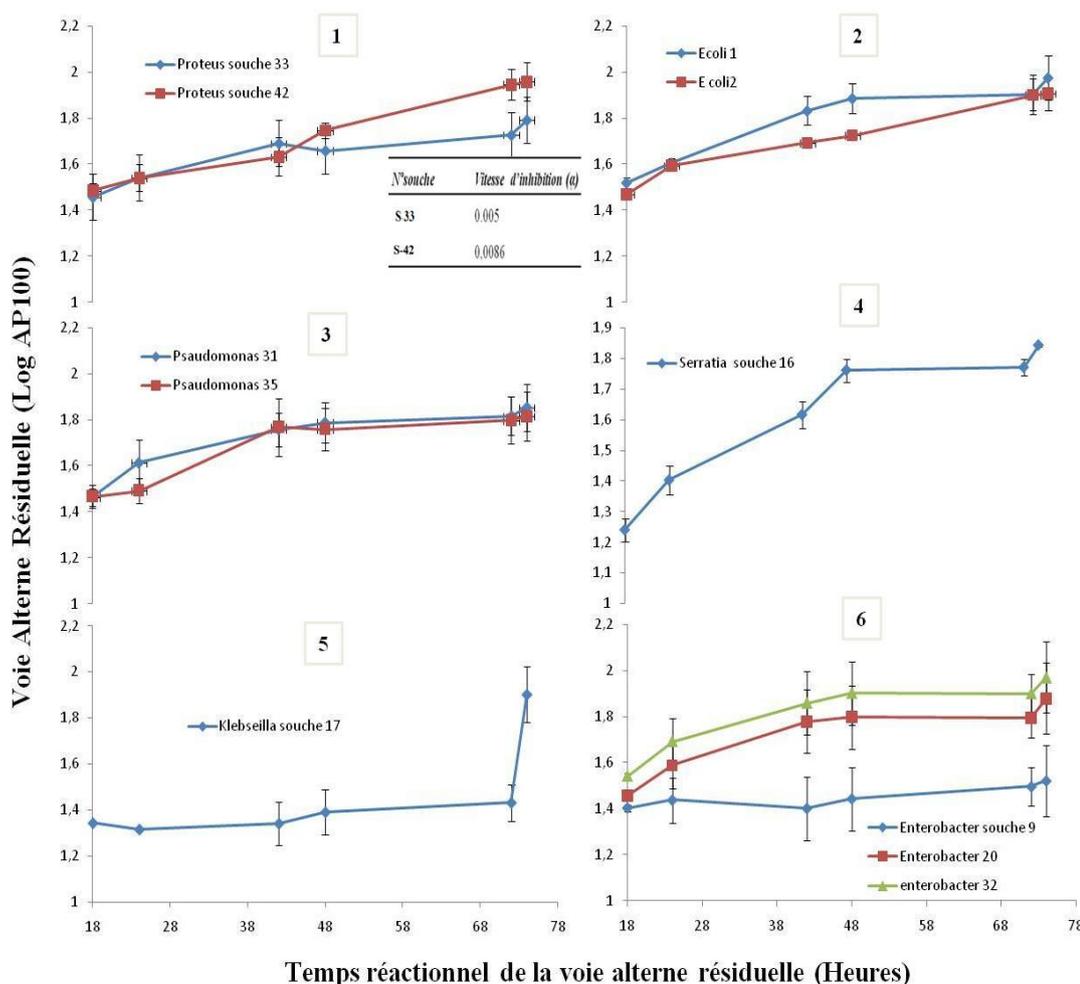


Figure 17: Figure 17 : Résultat de suivi de l'activité bactérienne sur la voie alterne du complément

4.11. 4.11 Lien entre la consommation du complément et la mort bactérienne

Nous avons cherché le lien entre le degré de la mort bactérienne et l'activité bactérienne sur la voie alterne de complément. La première étape était d'utiliser le test de corrélation bivariée qui a montré que l'activité bactérienne sur la voie alterne de complément est inversement proportionnelle au degré de la mort avec un coefficient $r_{\text{Pearson}} = -0.350$ et $p=0.0023$. En second lieu, la régression linéaire par estimation de courbe a montré que la consommation des protéines de la voie alterne du complément explique à 12,2% les variations de la mort bactérienne après interaction de 60 minutes à 37°C ($R^2=0.122$).

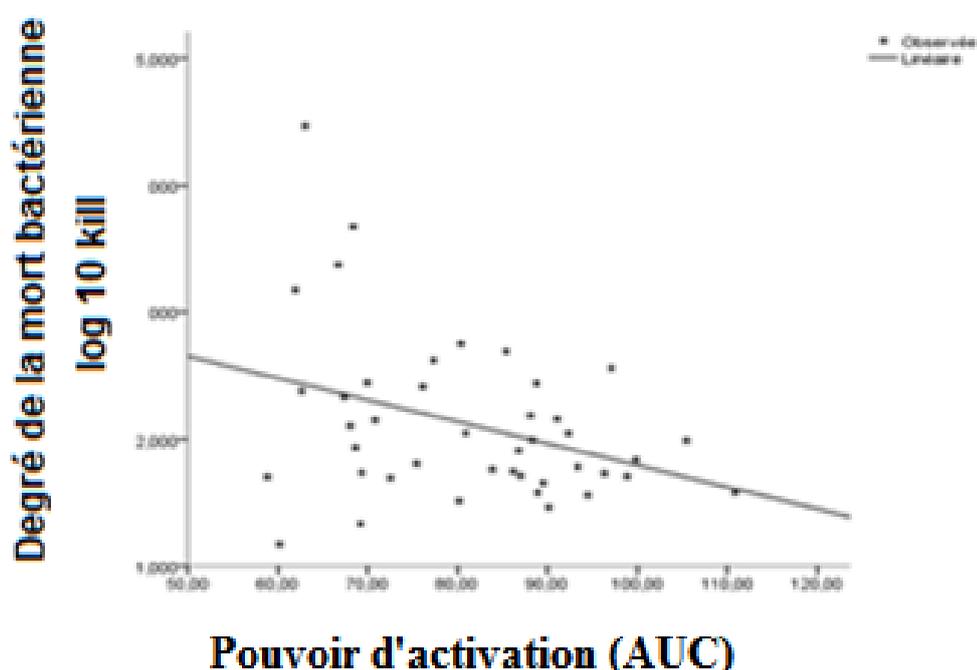


Figure 18: Pouvoir d'activation de la VAC en fonction du degré de la mort bactérienne

4.12 Selon la relation phylogénétique

Pour vérifier si l'histoire évolutive commune et les liens phylogénétiques entre les bactéries isolées jouent un rôle sur l'activité bactérienne de la VAC, pour cela nous avons utilisé le test de corrélation entre le nombre moyen de changement par position(Annexe04) et l'activité bactérienne et le degré de la mort bactérienne. Sur le plan phylogénétique nous n'avons pas trouvé de corrélation entre l'activité bactérienne sur la voie alterne de complément et le nombre moyen de changement par position ($r_{\text{pearson}} = -0.105$ et $p = 0.521$) ni avec le degré de la mort bactérienne ($r_{\text{pearson}} = -1.56$; $p = 0.349$) malgré que leur relation était inversement proportionnelle.

Discussion

La propriété antibactérienne du sérum, rapportée pour la première fois par Nuttall en 1888, (**Rowley et Wardlaw 1958**) a attiré de nombreux chercheurs et une littérature abondante s'est accumulée durant le 20^{ème} siècle. D'après le nombre total de recherches bibliographiques que nous avons menées sur la science de l'interaction hôte-bactérie, nous avons constaté que la plupart des chercheurs se limitent à l'étude de l'activité bactéricide de système de complément mesurée par le degré de la mort (\log_{10} kill) ou la viabilité bactérienne (UFC/ml). De ce fait, notre étude se veut comme une première étude qui s'intéresse à cette interaction en évaluation son issu sur les deux acteurs, voie alterne du complément et viabilité bactérienne. Nous avons réalisé non seulement la technique de la survie bactérienne mesurée par le \log_{10} Kill mais également par la mesure de l'activité fonctionnelle de la voie alterne de complément (AP100) .

Dans la présente étude, nous avons pu caractériser certaines souches de bactéries à Gram négatif isolées à partir de différents prélèvements pathologiques, selon leur pouvoir consommateurs ou non des protéines de la VAC. L'analyse de la contribution de l'activité lytique du MAC sur les érythrocytes dans l'AP100 en contact avec les bactéries au cours du temps nous a permis d'expliquer l'activité bactérienne sur VAC. Cela se traduit par l'apparition des zones d'hémolyse de diamètres nettement différents selon les genres et les espèces. (**Photo 18**).

La quantification de la fonction résiduelle de la VAC par la technique AP100 nous a permis de caractériser et de distinguer nos bactéries en deux groupes ; un groupe consommateur (77%) et l'autre non consommateur de la voie alterne du complément (23%). La consommation des protéines de la VAC est expliquée , par un fonctionnement normale du système de complément ; la formation du complexe d'attaque membranaire qui aboutit à une lyse cellulaire rapide après fixation à la surface bactérienne ,ces bactéries sont caractérisées par un faible pouvoir d'échappement (**Abreu et Barbosa 2017**), ou bien par un disfonctionnement de ce système qui conduit à la mort lente des bactéries ,ces dernières présentent un fort pouvoir d'échappement .

Notre étude sur les 44 souches indique que la sensibilité bactérienne au sérum, dans un milieu réactionnel favorisant uniquement l'activation de la voie alterne du complément, peut différer pour les bactéries appartenant à la même espèce. Ceci est illustré par les souches qui présentent un fort pouvoir d'échappement à la VAC ,on trouve (8/21) *E. coli* , (3/6)*Enterobacter cloacae* , (2/4)pour *Proteus mirabilis*, (2/4) *Pseudomonas aeruginosae* , , (1/2) *klebsiella oxytoca* et (1/5) de *Serratia marcesces* , leur sensibilité à la VAC semblait être vraiment distincte. Cela peut être expliqué par la différence dans la composition de l'enveloppe cellulaire entre ces souches (**Mee-Jung et al., 2012; Studier et al., 2009**) et que par conséquent certaines souches pourrait être

plus susceptibles aux conditions de stress déclenché par ce types de manipulations (**Mee-Jung et al., 2012**).

La capacité de s'échapper au système de complément a été attribué à plusieurs composants et stratégies distincts des bactéries. La présence d'une capsule a été impliquée dans la virulence de nombreuses bactéries à Gram négatif (**Makela et al., 1980; Robbins et al., 1980**). Le polysaccharide capsulaire, rendant plus difficile l'attribution sans équivoque de rôles particuliers à la capsule. Ce mimétisme moléculaire confère à la bactérie une certaine résistance au système immunitaire inné, (**Roberts, Saunders, et Boulnois 1989**). Nos résultats confirment le rôle important de la capsule dans l'échappement au système de complément. (12/17) des bactéries à fort pouvoir d'échappement sont encapsulées (**figure15**). Ces résultats s'accordent avec l'étude de **Leying et Suerbaum** sur *E coli* K1 en 1990. Grace aux résultats combinée (**figure15 et 16**) on peut spéculer que les bactéries encapsulées utilisent un mécanisme de régulation additionnel pour contrôler l'activité de complément à leur surface.

Dans cette étude on s'est intéressé à l'étude de la vitesse de consommation de la VAC, les résultats obtenus expliquent la présence de deux types d'interactions des bactéries à Gram négatif aux protéines du complément, soit les bactéries présentent un échappement par la destruction des protéines de complément et la non réversibilité du fonctionnement au cour du temps que nous avons observé chez la souche -09- d'*Enterobacter cloacae* et de *Proteus mirabilis*. (**figure17**). Soit un échappement par blocage de molécules de complément sans affecter le fonctionnement de la cascade de complément (**figure17**), nos résultats sont concordants avec ceux de **Berends, 2015** qui a démontré que le MAC peut tuer les bactéries à des vitesses différentes.

Plusieurs mécanismes et stratégies d'échappement des BGN au système de complément ont été décrits par les scientifiques ; dans notre travail nous avons trouvé que certaines souches de *Pseudomonas aeruginosa* résistent à la destruction du complément cela peut être due par la sécrétion d'une protéase puissante, l'élastase (PaE), qui dégrade les composants du système du complément humain essentiellement le C3 (**Merle et al. 2015**) ou par la liaison au facteur H et facteur H-I à sa surface par l'intermédiaire d'un facteur d'élongation protéique Tuf. (**Mishra et al. 2015**). L'échappement d' *E. coli* peut être traduit, par la production des protéases qui ont les propriétés d'inhiber le système du complément, est capable de cliver C2, C3/C3b, et C4/C4b et travaille en synergie avec le facteur humain I et le facteur H (FH) (**Abreu et Barbosa 2017**) ou par la liaison de la protéine A (ompA) au C4BP humain. (**Rooijackers et van Strijp 2007**) (**figure17**).

K. pneumoniae peut échapper au complément par les modifications du lipide A du LPS qui pourraient éventuellement influencer sur l'interaction avec le facteur H (**Llobet et al. 2015**) ou par la production des LPS de poids moléculaire élevé (**Doorduyn et al. 2016**). *Serratia marcescens* peut sécréter des protéases qui inactive le C3 et C5 ce qui entraîne l'inhibition de la formation de MAC et altère l'activité lytique du complément. (**Potempa et Potempa 2012**) (**figure17**).

Bien que les chercheurs ne puissent pas expliquer le processus de mise à mort plus lent des bactéries, Berends 2015, a spéculé trois théories possibles ;

La première explication possible de la mort complément dépendante consiste en une perturbation simultanée des membranes interne (MI) et externe (ME) en une étape. Cela ne serait possible qu'à certains endroits de l'enveloppe cellulaire où les deux membranes se rencontrent, à savoir les jonctions de Bayer (**Bayer, 2004**).

Le deuxième scénario propose un modèle en deux étapes dans lequel complément perturbe la ME, après quoi d'autres composants du sérum ou protéines MAC supplémentaires ont accès au MI, causant un effet mortel (**Berends et al., 2014**). Un mécanisme en une étape pourrait potentiellement tuer les Gram-négatifs plus rapidement par rapport à un Modèle en 2 étapes .

La troisième théorie proposée par **Berends** est issue de la non compréhension de l'induction de la mort des bactéries par le complément. Il se peut que la perte de viabilité soit un processus actif et que lors de la formation du MAC, une voie d'auto-mort soit activée, semblable à celle décrite pour la liaison des protéines de reconnaissance des peptidoglycanes (PGRP) de mammifères à la surface bactérienne (**Kashyap et al. 2011**). Cette explication constitue une belle compréhension de la différence de temps de mort entre les bactéries après leur interaction avec le complément.

La destruction des bactéries dans le sérum a toujours été considérée comme étant causée par le MAC, L'utilisation du test de corrélation nous a montré que l'activité bactéricides de la voie alterne ne peut expliquer que 12,2% de l'activité bactéricides totale du sérum, ceci explique que les bactéries «sensibles au sérum» ne sont pas nécessairement tuées par le MAC. ces résultats sont en parfaite concordance avec ceux de **Berends 2015**.(**figure18**)

Par ailleurs, (**figure 11**) montre que l'activité bactéricide de complément est élevée chez les hommes, que les chez femmes donc nos résultats sont en concordance à celle effectuée par (**Kotimaa et al., 2016**) et (**Gaya et al., 2018**) D'après les résultats indiqués dans la (**Figure 10**)le degré de la mort bactérienne est fréquent chez les enfants alors que chez les adulte. selon **Gaya et al., 2018**, La différences du taux d'infection ne s'appliquent pas nécessairement au groupes d'âge.

L'âge et le sexe sont connus pour influencer la réponse immune contre un pathogène. Les femmes et les hommes ont une réponses immunitaires innées et adaptatives distinctes .Les différences immunologiques liées au sexe peuvent être trouvées dans diverses espèces. En général, la réponse du système immunitaire semble être plus forte chez les femmes que chez les hommes. On pense que ces différences immunologiques entre les sexes due aux hormones, facteurs génétiques et facteurs environnementaux. Ces facteurs pourrait donner un aperçu de l'épidémiologie des maladies auto-immunes et infectieuses (**Gaya et al., 2018**).

Au même titre que le *Porphyromonas gingivalis* qui agit comme un agent pathogène clé qui exploite la fonction du complément pour orchestrer la dysbiose et précipiter la parodontite. Et active le complément dans la flore gingivale nous avons pu mettre en évidence un phénomène similaire dans la flore vaginale et digestive (**Olsen et al., 2017**) (**figure09**).

D'autres études sont souhaitables pour renforcer les résultats et les conclusions obtenus dans ce travail.

Les limites : l'étude a connu des insuffisances liées :

- A la difficulté d'évaluer les complexes composants de système de complément en raison des outils d'étude limités.
- aux conditions expérimentales, le nombre de l'échantillon étudié (taille de la population) est moins représentatif, la durée de l'essai est insuffisante (période limité), le nombre limité de facteurs étudiés.

Conclusion

Conclusion

Le complément est un système complexe de protéines sériques, il contribue à la défense de l'hôte par le biais de multiples mécanismes. L'importance de l'étude des mécanismes de la résistance à l'action bactéricide du système du complément joue probablement un rôle dans la pathogenèse de certaines infections de bactéries à Gram négatif.

Les bactéries pathogènes ont développé des stratégies pour contrôler et moduler le système du complément et échapper aux défenses immunitaires de l'hôte. Au terme de différentes analyses de dosage fonctionnel et l'activité bactéricide réalisée, nous avons pu vérifier notre hypothèse de départ. La consommation des molécules du complément dû soit à la formation de MAC conduisant à la perforation des cellules et à la mort bactérienne rapide, soit à l'échappement de ces bactéries au système du complément. Notre étude permet également, de caractériser et d'évaluer le comportement des différents genres de bactéries à Gram négatif vis-à-vis de la voie alterne du complément et de connaître l'interaction de ces pathogènes envers ce système complexe.

La poursuite des études sur ces mécanismes d'évasion immunitaire et d'inhibition du complément ne devrait pas seulement aider à mieux comprendre ces interactions hôte-pathogène, mais aussi à fournir des informations essentielles sur de meilleures stratégies de traitement pour de nombreux types de maladies inflammatoires et infectieuses. On sait que la membrane externe est une barrière majeure de perméabilité pour la plupart des antibiotiques, les mécanismes par lesquels le complément perturbe les enveloppes de cellules à Gram négatif peuvent contenir des informations cruciales pour l'élaboration de stratégies antimicrobiennes contre les bactéries à Gram négatif résistantes. Ainsi des études récentes semblent s'intéresser à développer des molécules pro- et anti-inflammatoires qui ciblent et contrôlent spécifiquement l'activité du complément.

Finalement, au point de vue perspective, nous espérons que les futurs travaux éclairciront les interactions hôte -pathogènes (complément -bactérie Gram négatif) en termes purement moléculaires et génétiques.

Références bibliographiques

A

- Aartsen J J., Stahlhut S G., Harrison EM., Crosatti M., Ou H-Y., Krogfelt K A., Struve C and Rajakumar K. 2012. Characterization of a novel chaperone/usher fimbrial operon present on KpGI-5, a methionine tRNA gene-associated genomic island in *Klebsiella pneumoniae*. van Aartsen et al. BMC Microbiology 2012, 12:59.
- Abreu, Afonso G., et Angela S. Barbosa. 2017. « How *Escherichia Coli* Circumvent Complement-Mediated Killing ». Frontiers in Immunology 8 (avril). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00452>.
- ADAMO R., SOKEL S., SOONG G., GOMEZ MI. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialo GM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. Am J Respir Cell Mol Biol; 30 : 627-34.
- Avril J-L., Dabernat H., Denis F. et al. (2000). Bactériologie Clinique. Ellipses. 3^{eme} Edition. 511p.

B

- BENABID D .2009. Rôle de l'élastase du neutrophile dans les infections pulmonaires à *Pseudomonas aeruginosa*. Université de Reim Champagne -Ardenne. Thèse de doctorat en Immunologie. P161.
- Berends, Evelien T.M., Annemarie Kuipers, Marietta M. Ravesloot, Rolf T. Urbanus, et Suzan H.M. Rooijackers. 2014. « Bacteria under Stress by Complement and Coagulation ». FEMS Microbiology Reviews 38 (6): 1146-71. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12080>.
- Bergan T. 1984. Methods in Microbiology. Academic Press ; 14: 228 .
- BIOMERIEUX SA. Api 20 NE Réf. 20 050. Système d'identification des bacilles à Gram négatif 2004 :1-4
- Blom, Anna M., Teresia Hallström, et Kristian Riesbeck. 2009. « Complement Evasion Strategies of Pathogens—Acquisition of Inhibitors and Beyond ». Molecular Immunology 46 (14): 2808-17. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.04.025>.
- Boone D.R., Garrity G., et al. (2001). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. 2nd Edition. 721p.
- Bousseboua H. (2005). Element de microbiologie. Edition Campus-Club. 2eme Edition. 304p.
- Brisse S., Duijkeren E V. 2004. Identification and antimicrobial susceptibility of 100 *Klebsiella* animal clinical isolates. Veterinary Microbiology 105(2005) 307-312.
- Byrne AH, Herra CM, Aucken H, Keane CT. 2001. Rate of carriage of *Serratia marcescens* in patients with and without evidence of infection. Scand J Infect Dis 33: 822-826.

C

- CARBONNELLE B., DENIS F., MARMONIER A., PINON G., VARGUES R. Bactériologie Médicale : Techniques usuelles. SIMEP SA, Paris, 1987 : 121-137 ; 146-155.
- Christensen GD, Korones SB, Reed L, Bulley R, McLaughlin B, Bisno AL. 1982. Epidemic *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit: importance of the gastrointestinal tract as a reservoir. *Infect Control* 3: 127-133.
- Cress, Brady F., Jacob A. Englaender, Wenqin He, Dennis Kasper, Robert J. Linhardt, et Mattheos A.G. Koffas. 2014. « Masquerading Microbial Pathogens: Capsular Polysaccharides Mimic Host-Tissue Molecules ». *FEMS Microbiology Reviews* 38 (4): 660-97. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12056>.
- CRYZ SJ., PITT TL., FURER E., GERMANIER R.1984.Role of lipopolysaccharide in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* ; 44 : 508-13

D

- DASGUPTA T., KIEVIT TR., MASOUD H., ALTMAN E., RICHARDS JC., SADOVSKAYA I.1994.Characterization of lipopolysaccharide-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* derived from serotypes O3, O5, and O6. *InfectImmun*1994 ; 62 : 809-17.
- DELARRAS C.2007.Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Lavoisier, Paris .P476
- DENIS F., DABERNATH, MONTEIL H. AVRIL J. L. Bactériologie clinique Editionmarketing, Paris, 1998 ; 144-145
- DENIS F., M-C POLY., C MARTIN., E BINGEN., RQUENTIN.2007.Bactériologie médicale, techniques usuelles .MASSON, Cedex. P333-335.
- Doorduijn, Dennis J., Suzan H.M. Rooijackers, Willem van Schaik, et Bart W. Bardoel. 2016. « Complement Resistance Mechanisms of *Klebsiella Pneumoniae* ». *Immunobiology* 221 (10): 1102-9. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2016.06.014>.
- Doorduijn, Dennis J., Suzan H.M. Rooijackers, Willem van Schaik, et Bart W. Bardoel. 2016. « Complement Resistance Mechanisms of *Klebsiella Pneumoniae* ». *Immunobiology* 221 (10): 1102-9. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2016.06.014>.

E

- El Fertas-Aissani R., Messai Y., Alouache S., Bakour R. 2012. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. PATBIO-3048; No. of Pages 8.
- Euzéby JP, 2005. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire.

F

- FAUCHERE J.L., AVRIL J.L., Bactériologie générale et médicale Ellipses Edition marketing, 2002, 237- 53p.
- Fauchère JL, Avril JL. Bactériologie générale et médicale. France : Ed Ellipses ; 2002
- FELDMAN M., BRYAN R., RAJAN S., SCHEFFLER L., BRUNNERT S., TANG H. 1998. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun* ; 66 : 43-51.
- FLANDROIS J-P. 1997. Bactériologie médicale. Presse universitaire de Lyon, Lyon. P207.
- Fraga, Tatiana Rodrigues, Daniella dos Santos Courrol, Mónica Marcela Castiblanco-Valencia, Izaura Yoshico Hirata, Sílvio Arruda Vasconcellos, Luiz Juliano, Angela Silva Barbosa, et Lourdes Isaac. 2014. « Immune Evasion by Pathogenic *Leptospira* Strains: The Secretion of Proteases That Directly Cleave Complement Proteins ». *The Journal of Infectious Diseases* 209 (6): 876-86. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit569>.

G

- Gaya da Costa, Mariana, Felix Poppelaars, Cees van Kooten, Tom E. Mollnes, Francesco Tedesco, Reinhard Würzner, Leendert A. Trouw, et al. 2018. « Age and Sex-Associated Changes of Complement Activity and Complement Levels in a Healthy Caucasian Population ». *Frontiers in Immunology* 9 (novembre): 2664. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02664>.
- Giefing-Kröll C, Berger P, Lepperdinger G, Grubeck-Loebenstien B. How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination. *Aging Cell* (2015) 14:309–21. doi: 10.1111/accel.12326 (Giefing,2015)
- Grimont F. et Grimont P.A.D. 2006. The Genus *Enterobacter*. *Prokaryotes*; 6:197– 214.

Bibliographia

- Guentzel MN. Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter, and Proteus. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 26. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8035/>
- GUZZO J., PAGES JM., DUONG F., LAZDUNSKI A., MURGIER M. 1991. Pseudomonas aeruginosa alkaline protease : evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. J Bacteriol ; 173 : 5290-7.

H

- HAHN HP. 1997. The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of Pseudomonas aeruginosa. Gene; 192 : 99-108.
- Hart, C. A. (2006). Klebsiella, Citrobacter, Enterobacter and Serratia spp.. In S. H. Gillespie, & P. M. Hawkey (Eds.), Principles and practice of Clinical Bacteriology (2nd ed., pp. 377- 386). England, UK: John Wiley and Sons Ltd.
- Hejazi A, Keane CT, Falkner FR. 1997. The use of RAPD-PCR as a typing method for Serratia marcescens. J Med Microbiol 46: 913-919.
- Hennequin C., Robin F., Cabrolier N., Bonnet R., et Forestiera C. 2012. Characterization of a DHA-1-Producing Klebsiella pneumoniae Strain Involved in an Outbreak and Role of the AmpR Regulator in Virulence. 0066-4804/12/\$12.00 Antimicrobial Agents and Chemotherapy p. 288–294.
- Hennequin C., Forestier C. 2007. Influence of capsule and extended-spectrum beta-lactamases encoding plasmids upon Klebsiella pneumoniae adhesion. Research in Microbiology 158(2007) 339-347.
- Hines DA, Saurugger PN, Ihler GM, Benedik MJ. 1988. Genetic analysis of extracellular proteins of Serratia marcescens. J Bacteriol 170: 4141-4146.
- Hovingh, Elise S., Bryan van den Broek, et Ilse Jongerius. 2016. « Hijacking Complement Regulatory Proteins for Bacterial Immune Evasion ». Frontiers in Microbiology 7 (décembre). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02004>.
- Hsieh P-F., Lin TL., Yang FL., Wu M-C., Pan YJ., Wu S H., Wang J T. 2012. Lipopolysaccharide O1 Antigen Contributes to the Virulence in Klebsiella pneumoniae Causing Pyogenic Liver Abscess. March 2012 | Volume 7 | Issue 3 | e33155.
- <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.06.011>.
- Husson MO, Hamze M, Verhille S, Izard D. Pseudomonas et Burkholderia. Précis de bactériologie clinique. Paris: Freney J éd. ESKA; 2000 : 1259-83

J

- Jean-Jacques Lefrere. 2000. Transfusion sanguine: une approche securitaire, Montrouge, France: J. Libbey Eurotext.
- John G Holt. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9 Edition.
- Joiner, K A. s. d. « Complement Evasion by Bacteria and Parasites », 30.
- Joly B et Reynaud A. 2002. Entérobactéries. Systématique et méthodes de diagnostic. P : 79-80-83.

K

- KIPNIS E., GUERY BP., TOURNOYS A., LEROYT X., ROBRIQUE L., FIALDES P.2004. Massive alveolar thrombin activation in Pseudomonas aeruginosa induced acute lung injury. Shock ; 21 : 444-51.
- KOHLER T., CURTY LK., BARJA F., VAN DELDEN C., PECHERE JC. 2000. Swarming of Pseudomonas aeruginosa is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. J Bacteriol; 182 : 5990-6.
- Kotimaa, Juha, Ngaisah Klar-Mohammad, Faikah Gueler, Geurt Schilders, Aswin Jansen, Helma Rutjes, Mohamed R. Daha, et Cees van Kooten. 2016. « Sex Matters: Systemic Complement Activity of Female C57BL/6J and BALB/CJ Mice Is Limited by Serum Terminal Pathway Components ». Molecular Immunology 76 (août): 13-21. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2016.06.004>.

L

- Lai KK. Enterobacter sakazakii infections among neonates, infants, children, and adults. Case reports and a review of the literature. Medicine (Baltimore). 2001 Mar; 80(2): 113-22.
- Lakhal E., Hammami S., Kammoun A., Ghozzi R., Saidani M., Miled D., Boutiba-Ben Boubaker I. et Slim A. 2010. Suivi des Enterobacter cloacae producteurs de β - lactamases à spectre étendu à l'hôpital Charles Nicolle de Tunis (2000-2009). Revue Tunisienne d'Infectiologie; 4 (1): 23-24.
- Lambris, John D., Daniel Ricklin, et Brian V. Geisbrecht. 2008. « Complement Evasion by Human Pathogens ». Nature Reviews Microbiology 6 (2): 132-42. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1824>.
- LECLERC H., Microbiologie générale, 2ème édition, 1983, 95p.
- Lefrère J.-J. 2002. Transfusion sanguine: une approche sécuritaire. John Libbey Eurotext. p 450.

Bibliographia

- LEON LE MINOR , MICHEL VERON , Bactériologie Médicale 2 eme Edition Paris, 1989, 396-795p.
- Lewis, Lisa A., Jutamas Ngampasutadol, Ruth Wallace, Jane E. A. Reid, Ulrich Vogel, et Sanjay Ram. 2010. « The Meningococcal Vaccine Candidate Neisserial Surface Protein A (NspA) Binds to Factor H and Enhances Meningococcal Resistance to Complement ». Édité par H. Steven Seifert. PLoS Pathogens 6 (7): e1001027. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001027>.
- Llobet, Enrique, Verónica Martínez-Moliner, David Moranta, Käthe M. Dahlström, Verónica Regueiro, Anna Tomás, Victoria Cano, et al. 2015. « Deciphering Tissue-Induced Klebsiella Pneumoniae Lipid A Structure ». Proceedings of the National Academy of Sciences 112 (46): E6369-78. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508820112>.
- LYNN WA., GOLENBOCK DT .1992.Lipopolysaccharide antagonists . Immunol Today; 13 : 271-6.GUEREY B., E KIPNIS ., G BERAUD ., K FAURE.2009 Pneumonie à Pseudomonas aeruginosa aspects thérapeutiques. MAPAR.P206-215.

M

- Mahlen SD. 2011. Serratia infections: from military experiments to current practice. Clin Microbiol Rev 24: 755-791.
- Martha Embrey Paul Hunter, Jane Sellwood, Peter Wyn-Jones, Steven L. Percival, Rachel Chalmers. 2004. Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks, Elsevier.
- Mastellos, Dimitrios C., Edimara S. Reis, Daniel Ricklin, Richard J. Smith, et John D. Lambris. 2017. « Complement C3-Targeted Therapy: Replacing Long-Held Assertions with Evidence-Based Discovery ». Trends in Immunology 38 (6): 383-94. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.03.003>.
- Matsumoto K. 2004. Role of bacterial proteases in pseudomonal and serratial keratitis. Biol Chem 385: 1007-1016.
- Meri S, Pangburn MK. Regulation of alternative pathway complement activation by glycosaminoglycans: specificity of the polyanion binding site
- Merle, Nicolas S., Remi Noe, Lise Halbwachs-Mecarelli, Veronique Fremeaux-Bacchi, et Lubka T. Roumenina. 2015. « Complement System Part II: Role in Immunity ». Frontiers in Immunology 6 (mai). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00257>.
- Merle, Nicolas S., Remi Noe, Lise Halbwachs-Mecarelli, Veronique Fremeaux-Bacchi, et Lubka T. Roumenina. 2015. « Complement System Part II: Role in Immunity ». Frontiers in Immunology 6 (mai). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00257>.

Bibliographia

- MESAROS N., NORDMAN P., PLESIAT P. 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect* 2007 ;13(6):560-78.
- Mühlkamp, Melanie C., Teresia Hallström, Ingo B. Autenrieth, Erwin Bohn, Dirk Linke, Janina Rinker, Kristian Riesbeck, et al. 2017. « Vitronectin Binds to a Specific Stretch within the Head Region of *Yersinia Adhesin A* and Thereby Modulates *Yersinia Enterocolitica* Host Interaction ». *Journal of Innate Immunity* 9 (1): 33-51. <https://doi.org/10.1159/000449200>.
- Mühlkamp, Melanie C., Teresia Hallström, Ingo B. Autenrieth, Erwin Bohn, Dirk Linke, Janina Rinker, Kristian Riesbeck, et al. 2017. « Vitronectin Binds to a Specific Stretch within the Head Region of *Yersinia Adhesin A* and Thereby Modulates *Yersinia Enterocolitica* Host Interaction ». *Journal of Innate Immunity* 9 (1): 33-51. <https://doi.org/10.1159/000449200>.

N

- Nasu M. 1981. Bacteriocin (marcescin) typing of clinically isolated *Serratia marcescens*. *Tohoku J Exp Med* 133: 33-43.

O

- Olsen, Ingar, John Lambris, et George Hajishengallis. 2017. *Porphyromonas gingivalis* disturbs host-commensal homeostasis by changing complement function. Vol. 9. <https://doi.org/10.1080/20002297.2017.1340085>.
- Olsen, Ingar, John Lambris, et George Hajishengallis. 2017. *Porphyromonas gingivalis* disturbs host-commensal homeostasis by changing complement function. Vol. 9. <https://doi.org/10.1080/20002297.2017.1340085>.
- on factor H. *Biochem Biophys Res Commun* (1994) 198:52–9. doi:10.1006/bbrc.1994.1008
- Organisation Mondiale de la Santé. Méningites à Méningocoques. 2015. Aide-mémoire n°141. [en ligne] [consulté le 11/04/19] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs141/fr/>
- Oxley D, Wilkinson SG. 1989. Structures of neutral glycans isolated from the lipopolysaccharides of reference strains for *Serratia marcescens* serogroups O16 and O20. *Carbohydr Res* 193: 241-248.

P

- Paterson, D. L., Rossi, F., Baquero, F., Hsueh, P. R., Woods, G. L., Satishchandran, V., Snyder, T. A., Harvey, C. M., Tepler, H., & DiNubile, M. J. (2005). In vitro susceptibilities of aerobic and

Bibliographia

- facultative Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide: the 2003 Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55 (6), 965.
- Pilet C, Bourdon JL, Toma B, Marchal N, Balbastrec. Les entérobactéries. *Bactériologie médicale : Systématique bactérienne*. Doins, 2eme Paris, 2 1979 : 109-87
 - Pinna A, Usai D, Sechi LA, Carta A, Zanetti S. 2011. Detection of virulence factors in *Serratia* strains isolated from contact lens-associated corneal ulcers. *Acta Ophthalmol* 89: 382- 387.
 - Pio, Ruben, Leticia Corrales, et John D. Lambris. 2014. « The Role of Complement in Tumor Growth ». In *Tumor Microenvironment and Cellular Stress*, édité par Constantinos Koumenis, Ester Hammond, et Amato Giaccia, 772:229-62. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5915-6_11.
 - Pio, Ruben, Leticia Corrales, et John D. Lambris. 2014. « The Role of Complement in Tumor Growth ». In *Tumor Microenvironment and Cellular Stress*, édité par Constantinos Koumenis, Ester Hammond, et Amato Giaccia, 772:229-62. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5915-6_11.
 - Potempa, Michal, et Jan Potempa. 2012. « Protease-Dependent Mechanisms of Complement Evasion by Bacterial Pathogens ». *Biological Chemistry* 393 (9). <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0174>.
 - Potempa, Michal, et Jan Potempa. 2012. « Protease-Dependent Mechanisms of Complement Evasion by Bacterial Pathogens ». *Biological Chemistry* 393 (9). <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0174>.
 - Potvin Éric ., 2007. Présentation de *Pseudomonas aeruginosa* . Collection mémoires et thèses électroniques. Université Laval.

R

- Reid G, Sobel JD. 1987. Bacterial adherence in the pathogenesis of urinary tract infection: a review. *Rev Infect Dis* 9: 470-487.
- Richard C, Keredjian M. Méthodes de laboratoire pour l'identification ème
- RICHARD Cl. et GRIMONT F . *Klebsiella, Enterobacter, Hafnia, Serratia*, In : LE MINOR (L). *Bactériologie médicale*, Paris : Flammarion, 1992, 427-31p.
- Ricklin, Daniel, et John D Lambris. 2007. « Complement-Targeted Therapeutics ». *Nature Biotechnology* 25 (11): 1265-75. <https://doi.org/10.1038/nbt1342>.

Bibliographia

- Ricklin, Daniel, et John D Lambris. 2007. « Complement-Targeted Therapeutics ». *Nature Biotechnology* 25 (11): 1265-75. <https://doi.org/10.1038/nbt1342>.
- Ricklin, Daniel, et John D. Lambris. 2013. « Progress and Trends in Complement Therapeutics ». In *Complement Therapeutics*, édité par John D. Lambris, V. Michael Holers, et Daniel Ricklin, 735:1-22. Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4118-2_1.
- Ricklin, Daniel, George Hajishengallis, Kun Yang, et John D Lambris. 2010. « Complement: A Key System for Immune Surveillance and Homeostasis ». *Nature Immunology* 11 (9): 785-97. <https://doi.org/10.1038/ni.1923>.
- Roberts, I. S., F. K. Saunders, et G. J. Boulnois. 1989. « Bacterial Capsules and Interactions with Complement and Phagocytes ». *Biochemical Society Transactions* 17 (3): 462-64. <https://doi.org/10.1042/bst0170462>.
- ROCHETTA HL., BURROWS LL., LAM JS.1999.Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev*; 63 : 523-53.
- Rooijackers, Suzan H. M., Fin J. Milder, Bart W. Bardoel, Maartje Ruyken, Jos A. G. van Strijp, et Piet Gros. 2007. « Staphylococcal Complement Inhibitor: Structure and Active Sites ». *The Journal of Immunology* 179 (5): 2989-98. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.5.2989>.
- Rooijackers, Suzan H.M., et Jos A.G. van Strijp. 2007. « Bacterial Complement Evasion ». *Molecular Immunology* 44 (1-3): 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.06.011>.
- ROSAIN, Jérémie, NGO, Stéphanie, BORDEREAU, Pauline, et al. Déficiences en protéines du complément et pathologies humaines. *Annales de Biologie Clinique*. 2014 ; 72(3) : 271-280.
- Rosbjerg, Anne, Ninette Genster, Katrine Pilely, et Peter Garred. 2017. « Evasion Mechanisms Used by Pathogens to Escape the Lectin Complement Pathway ». *Frontiers in Microbiology* 8 (mai). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00868>.
- Rowley, D., et A. C. Wardlaw. 1958. « Lysis of Gram-Negative Bacteria by Serum ». *Journal of General Microbiology* 18 (2): 529-33. <https://doi.org/10.1099/00221287-18-2-529>.

S

- Schiller', Neal L, et Keith A Joiner. 1986. « Interaction of Complement with Serum-Sensitive and Serum-Resistant Strains of *Pseudomonas Aeruginosa* ». *INFECT. IMMUN.* 54: 6.
- Schmidt, Christoph Q., John D. Lambris, et Daniel Ricklin. 2016. « Protection of Host Cells by Complement Regulators ». *Immunological Reviews* 274 (1): 152-71. <https://doi.org/10.1111/imr.12475>.
- Schuster C. *Pseudomonas* et apparentés. *Syst. Microbiol* : 2001 : 1-6

Bibliographia

- Shimuta K, Ohnishi M, Iyoda S, Gotoh N, Koizumi N, Watanabe H. 2009. The hemolytic and cytolytic activities of *Serratia marcescens* phospholipase A (PhlA) depend on lysophospholipid production by PhlA. *BMC Microbiol* 9: 261.
- Sougakoff W., Trystram D. (2003). Résistances aux β -lactamines. Université Pierre et Marie Curie . Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière. p. 31-46.
- SOULEY LIE MOUSTAPHA F S . 2002. Sensibilité et évolution de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques à l'hôpital du point G . Université de BAMAKO Thèse présenté pour obtenir le grade de docteur en pharmacie. P95.
- SPICER J W ., Pratique clinique en bactériologie , mycologie et parasitologie : Flammarion, 2000, 42-3p.
- Srinivasan V B., Vaidyanathan V., Mondal A., Rajamohan G.2012. Role of the Two Component Signal Transduction System CpxAR in Conferring Cefepime and Chloramphenicol Resistance in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044. *April 2012 | Volume 7 | Issue 4 | e33777*.
- Stahlhut S G., Struve C., Krogfelt K A et Reisner A.2012. Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65 (2012) 350–359.
- Studier et al., 2009
- Summaries of Infectious Diseases. (2009). In L. Pickering, C. J. Baker, D. W. Kimberlin & S. S. Long (Eds.), *RED BOOK: 2009 REPORT OF THE COMMITTEE ON INFECTIOUS DISEASES* (28th ed.). Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics. Retrieved from

T

- Tanaka T, Takahashi H, Kobayashi JM, Ohyama T, Okabe N. 2004. A nosocomial outbreak of febrile bloodstream infection caused by heparinized-saline contaminated with *Serratia marcescens*, Tokyo, 2002. *Jpn J Infect Dis* 57: 189-192.
- Trystram D . (2003). Bactériologie. Université PARIS -VI Pierre et Marie Curie . Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière. p. 61-72.

U

- UPBM© [en ligne] [consulté le 04/04/19] <https://lab.upbm.org>

V

- Vermeulen C, Cross A, Byrne WR, Zollinger W. Quantitative relationship

Bibliographia

between capsular content and killing of KI-encapsulated *Escherichia coli*. *Infect Immun* (1988) 56:2723–30

- VIALLE, Jean-Michel. Exploration du système du complément en 2012 [en ligne] [consulté le 16/03/19] <http://www.labovialle.com/index.php/archives/141-articles-parus-en-2012/470-exploration-dusysteme-du-complement-en-2012>

W

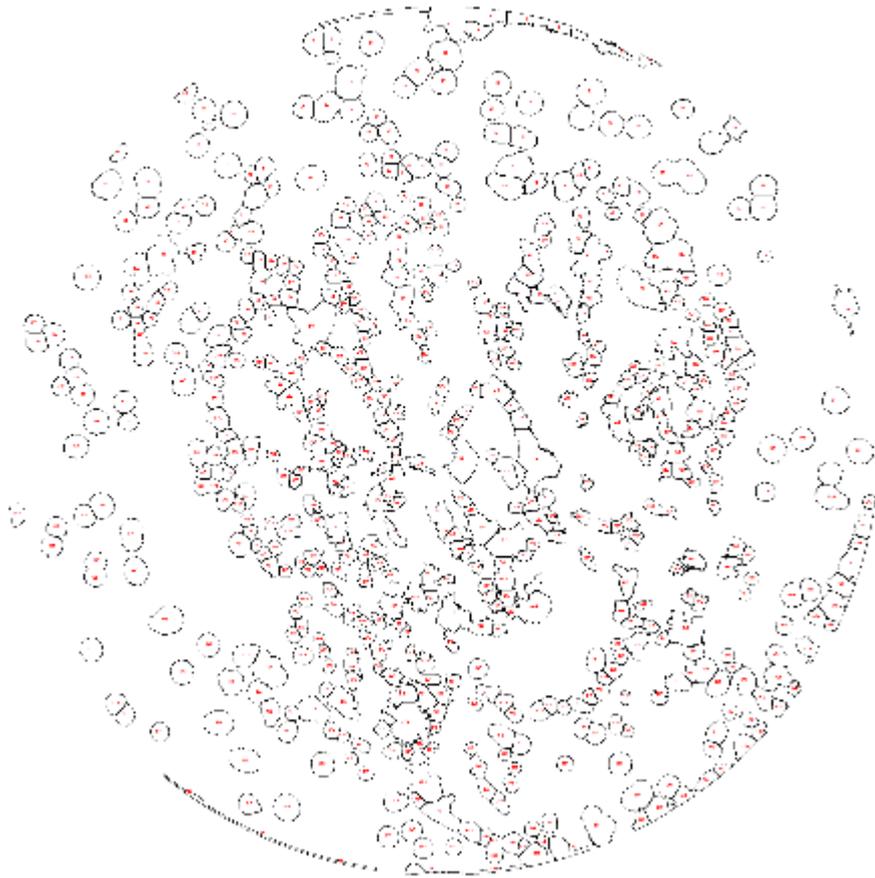
- Wang, HongBin, Daniel Ricklin, et John D. Lambris. 2017. « Complement-Activation Fragment C4a Mediates Effector Functions by Binding as Untethered Agonist to Protease-Activated Receptors 1 and 4 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (41): 10948-53. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707364114>.
- Washington C.Winn, Stephen D.Allen, Stephen Allen, William M Janda, Elmer W.Koneman. 2005. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 6 ed., Lippincott Williams & Wilkins.

Y

- Yamamoto T, Ariyoshi A, Amako K. 1985. Fimbria-mediated adherence of *Serratia marcescens* strain US5 to human urinary bladder surface. *Microbiol Immunol* 29: 677-681.
- YETERIAN E .2010.Base moléculaire de la maturation et de la sécrétion de la pyoverdine chez *Pseudomonas aeruginosa*. Université Strasbourg Thèse de doctorat p.11.

Annexes

Annexe 01 : Dénombrement par le logiciel « ImageJ© »



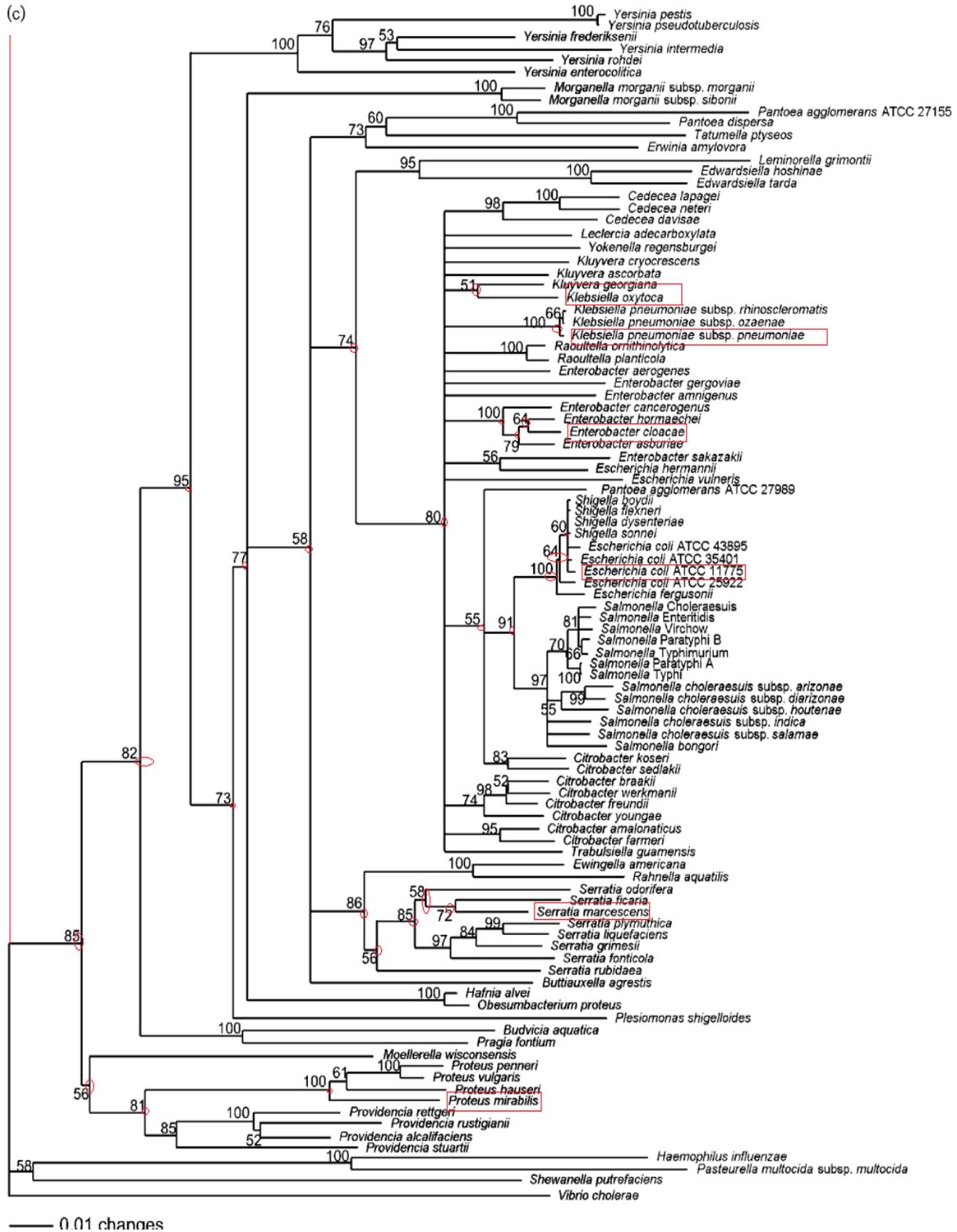
Annexe 02: Tableau de lecture des résultats de la galerie api 20 E

Tests et réactifs	Réactions/ enzymes	Résultats négatifs	Résultats positifs
ONPG	β -galactosidase	Incolore	Jaune
ADH	Arginine-dihydrolase	Jaune	Rouge/ orange
LDC	Lysine-décarboxylase	Jaune	Rouge/ orange
ODC	Ornithine- decarboxylase	Jaune	Rouge/ orange
CIT	Citrate utilisation	Vert pâle/jaune	Bleu-vert/bleu
H ₂ S	H ₂ S production	Incolore/ grisâtre	Dépôt noir/ fin liseré
URE	Uréase	Jaune	Rouge/ orange
TDA TDA/immédiat	Tryptophane- désaminase	Jaune	Marron-rougeâtre
IND	Indole production	Incolore	Rose
Kovacs/immédiat		Vert-pâle/jaune	
VP			
VP 1+ VP 2 / 10 min	Acétoïn production	Incolore	Rose/rouge
GEL	Gélatinase	Aucune diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	Glucose fermentation/oxydation	Bleu / bleu-vert	Jaune/ jaune gris
MAN	Mannitol fermentation/oxydation		
INO	Inositol fermentation/oxydation		
SOR	Sorbitol fermentation/oxydation		
RHA	Rhamnose fermentation/oxydation		
SAC	Saccharose fermentation/oxydation	Bleu / bleu-vert	Jaune
MEL	Melibiose fermentation/oxydation		
AMY	Amygdalin fermentation/oxydation		
ARA	Arabinose fermentation/oxydation		

Annexe 03 : Exemple des mesures des zones d'hémolyse

18H			
N° de souche	Mesure 1 	Mesure 2 	Mesure 3 
PHN	9,62	10,1915	9,723
23	12,071	12,2095	11,5535
24H			
PHN	10,7425	11,2055	10,9795
23	12,496	12,6155	12,342
42H			
PHN	13,2275	13,308	12,799
23	16,0315	15,945	16,1215
48H			
PHN	13,293	13,4485	12,6635
23	16,2795	15,4675	15,451
72H			
PHN	14,845	14,689	14,6715
23	16,527	15,7695	16,398
74H			
PHN	14,97765	14,925	14,9035
23	16,642	15,9855	16,6605

Annexe 04 : Arbre phylogénétique (Paradis,2013)



Annexe 05: Milieux de culture (Composition en g / l d'eau distillée)

➤ **Gélose nutritive**

Extrait de viande.....	01g.
Extrait de levure.....	02g.
Peptone.....	05g.
Chlorure de sodium.....	05g.
Agar.....	15g.

pH = 7,4

➤ **Gélose Hektoen Protéase**

peptone.....	12g.
Extrait de levure.....	03g.
Lactose.....	12g.
Saccharose.....	12g.
Salicine.....	02g.
Citrate de fer III et d'ammonium.....	1,5g.
Sels biliaries.....	09g.
Fuchsine acide.....	0,1g.
Bleu de bromothymol.....	0,065g.
Chlorure de sodium.....	05g.
Thiosulfate de sodium.....	05g.
Agar.....	14g.

pH = 7,5

➤ **Mannitol-Mobilité-Nitrate**

Hydrolysats tryptique de caséine.....	10g.
Mannitol.....	7,5g.
Rouge de phénol.....	0,04g.
Nitrate de potassium.....	01g.
Agar.....	3,5g.

pH = 7,6

➤ **Milieu TSI**

Peptones de caséine.....	15g.
Peptones de viande.....	05g.
Extraits de viande.....	03g.
Extrait de levure.....	03g.
Chlorure de sodium.....	05g.
Lactose.....	10g.

Annexes

Saccharose.....	10g .
Glucose.....	01g.
Citrate de fer III et d'ammonium.....	0,5g.
Thiosulfate de sodium.....	0,5g.
Rouge de phénol.....	0,024g.
Agar.....	12g.

pH = 7,4

➤ Milieu citrate de Simmons

Citrate de sodium.....	02g.
Bleu de bromothymol.....	0,08g.
Chlorure de sodium.....	05g.
Sulfate de magnésium.....	0,2g.
Hydrogénophosphate de potassium.....	01g.
Dihydrogénophosphate d'ammonium.....	01g.
Agar.....	15g.

pH = 6,9

➤ Bouillon Clark et Lubs

Peptone tryptique ou poly peptone.....	05 à 07g.
Glucose.....	05g.
Hydrogénophosphate de potassium.....	05g.

pH = 7,5

➤ Bouillon nitraté

Infusion cœur-cerveille.....	25g.
Nitrate de sodium.....	10g.

pH = 7,2

➤ Milieu urée-indole

L-tryptophane	03g.
Urée	20g.
Monohydrogénophosphate de potassium	01g.
Dihydrogénophosphate de potassium	01g.
Chlorure de sodium	05g.
Éthanol à 95 °.....	10ml.
Rouge de phénol en solution à 1%.....	2,5ml.

pH = 6,8



Annexe 06: Réactifs et solutions

❖ **Eau physiologique**

Chlorure de Sodium	9g
Eau distillée	1000 mL

❖ **Réactifs de la coloration de Gram**

-Violet de gentiane

Phénol	2.0 g
Violet de gentiane.....	1.0 g
Éthanol à 90	10 ml
Eau distillée	100 ml

-Lugol

Iodure de potassium	2.0 g
Iode métalloïde.....	1.0 g
Eau distillée.....	300 ml

-Fuschine de ziehl

Fuchine basique.....	1.0g
Phénol.....	5.0 g
Éthanol à 90.....	10 ml
Eau distillée	100 ml

❖ **Réactif de Kovac's**

P-dimethyl aminobenzaldéhyde	7g/l
Alcool amylique	75ml
Acide chlorhydrique concentré	20ml

❖ **Réactif de Voges-Proskauer**

VP I Hydroxyde de Potassium	40g/l
Eau	100ml
VP II α -naphtol.....	6 g/l
Ethanol	100ml

❖ **Réactif TDA**

Perchlorure de fer	3,4g/l
Eau distillée stérile.....	100ml



Annexe 07: composition et préparation des tampons PBS, EGTA.

Tampon	préparation
Tampon phosphate salin (PBS)	Commencer avec 800ml d'eau distillée , ajouter 08 g de NaCl , 0.2 de KCl , 1.44g de Na_2HPO_4 et 0.24g de KH_2PO_4 .ajuster le pH à 7.4 avec HCl .puis ajouter de l'eau distillée pour un volume total de 1 litre .
Acide éthylène glycol tétra acétique (EGTA), 0,1 M	Ajouter 7,6 g d'EGTA à 100 ml de l'eau dans un bécher en verre. En remuant vigoureusement, ajoutez 4 ml NaOH goutte à goutte jusqu'à ce que le pH devient $7,35 \pm 0,05$ (l'EGTA se dissoudra à pH 7,0 ; surveiller le pH avec soin afin qu'il ne dépasse pas 7,4). Ajouter 200 ml d'eau. Conserver à 4°C (plusieurs mois) si la solution devient trouble il faut la rejeter.

Annexe 08 : Répartition des bactéries isolées

n° souche	Bactéries	site de prélèvement	Type de prélèvement	Age du patient	Sexe du patient
1	<i>E .coli</i>	EPH TI	ECBU	ADULTE	FEMME
2	<i>P.aeruginosa</i>	EPH MB	PUS	ADULTE	FEMME
3	<i>Proteus mirabilis</i>	EL-AMEL	ECBU	ADULTE	FEMME
4	<i>S. marcescens</i>	EPH MB	PUS	ADULTE	FEMME
5	<i>S.marcescens</i>	EL-AMEL	ECBU	ADULTE	FEMME
6	<i>klebsiella pneumonia</i>	EPH TI	PUS	ADULTE	FEMME
7	<i>E .coli</i>	EL-AMEL	ECBU	ADULTE	FEMME
8	<i>E .coli</i>	EPH TI	ECBU	ADULTE	FEMME
9	<i>Enterobacter cloacae</i>	EL-AMEL	ECBU	ADULTE	FEMME
10	<i>Proteus mirabilis</i>	EL-AMEL	ECBU	ADULTE	FEMME
11v	<i>Enterobacter cloacae</i>	EL-AMEL	ECBU	ADULTE	FEMME
11org	<i>E .coli</i>	EL-AMEL	ECBU	ADULTE	FEMME
12	<i>E .coli</i>	EPH MB	ECBU	ADULTE	HOMME
13	<i>E .coli</i>	EPH MB	ECBU	ADULTE	HOMME
15	<i>S. marcescens</i>	EL-AMEL	ECBU	ADULTE	HOMME
16	<i>S.marcescens</i>	EL-AMEL	ECBU	ENFANT	FEMME
17	<i>Klebseilla oxytoca</i>	EL-AMEL	ECBU	ADULTE	FEMME
18	<i>E coli</i>	EPH MB	ECBU	ADULTE	FEMME
19	<i>E .coli</i>	EPH MB	HEMOC	ADULTE	HOMME

Annexes

20	<i>Enterobacter cloacae</i>	EPH MB	ECBU	ADULTE	FEMME
21	<i>E .coli</i>	EPH MB	ECBU	ENFANT	FEMME
22	<i>E .coli</i>	EPH MB	ECBU	ADULTE	FEMME
23	<i>E .coli</i>	EPH MB	ECBU	ADULTE	FEMME
24	<i>P.aerugenosa</i>	EPH TI	ECBU	ADULTE	FEMME
25	<i>S. marcenescens</i>	EPH TI	ECBU	ADULTE	FEMME
26	<i>Enterobacter cloacae</i>	EPH TI	COPRO	ADULTE	HOMME
27	<i>E .coli</i>	EPH TI	COPRO	ADULTE	FEMME
28	<i>E .coli</i>	EPH TI	COPRO	ADULTE	HOMME
29	<i>E .coli</i>	EPH TI	COPRO	ADULTE	FEMME
30	<i>E .coli</i>	EPH TI	PUS	ADULTE	HOMME
31	<i>P.aerugenosa</i>	EPH TI	PUS	ADULTE	HOMME
32	<i>Enterobacter cloacae</i>	EPH TI	ECBU	ADULTE	FEMME
33	<i>Proteus mirabilis</i>	EPH TI	COPRO	ADULTE	HOMME
34	<i>E .coli</i>	EPH TI	ECBU	ADULTE	FEMME
35	<i>P. aerugenosa</i>	EPH TI	PUS	ADULTE	HOMME
36	<i>E .coli</i>	EPH TI	ECBU	ADULTE	FEMME
37	<i>E .coli</i>	EPH TI	ECBU	ADULTE	FEMME
38	<i>Enterobacter cloacae</i>	EPH TI	ECBU	ADULTE	FEMME
39	<i>E .coli</i>	EPH TI	ECBU	ENFANT	FEMME
40	<i>klebsiella pneumonia</i>	MT	PV	ADULTE	FEMME
41	<i>E .coli</i>	MT	PV	ADULTE	FEMME
42	<i>Proteus mirabilis</i>	MT	PV	ADULTE	FEMME
43	<i>E .coli</i>	MT	PV	ADULTE	FEMME
44	<i>Klebseilla oxytoca</i>	MT	ECBU	ADULTE	FEMME

Annexe 09 : Identification des bactéries par galerie API20E

- *Proteus mirabilis* (42)(1776773)



- *Klebsiella pneumoniae*(6)(5205773)



- *Klebsiella oxytoca*(44)(5255773)



- *Enterobacter cloacae* :(26) (3144373)



- *Serratia marcescens* :(15) (5356572)



Annexes

- *Pseudomonas aeruginosa*:(24) (2207044)



Glossaire

- **Aérobactine** : est un agent chélateur du fer bactérien (sidérophore) présent dans *E. coli*. C'est un facteur de virulence qui permet à *E. coli* de séquestrer le fer dans des environnements pauvres en fer tels que les voies urinaires. L'aérobactine est biosynthétisée par l'oxydation de la lysine, catalysée par l'enzyme aérobactine synthase, qui est ensuite couplée à l'acide citrique.
- **Angiogenèse** : est le processus physiologique par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins se forment à partir de vaisseaux préexistants. Ceci est distinct de la vasculogenèse, qui est la formation de novo de cellules endothéliales à partir de précurseurs de cellules du mésoderme.
- **Athérosclérose**: processus d'épaississement et de durcissement progressifs des parois des artères de taille moyenne à grande, résultant de dépôts de graisse sur la paroi interne de celles-ci. Les facteurs de risque d'athérosclérose comprennent des taux élevés de «mauvais» cholestérol, une pression artérielle élevée (hypertension), le tabagisme, le diabète et des antécédents génétiques familiaux de maladie athéroscléreuse .
- **Bactériocines** : sont définies comme des protéines / peptides antibactériens synthétisés par le ribosome qui tuent ou inhibent la croissance de bactéries étroitement apparentées.
- **Invasion méningéale** : est une conséquence d'une interaction étroite des méningocoques avec les cellules endothéliales du cerveau. Cette interaction, médiée par les pili de type IV, est responsable de la formation de microcolonies à la surface apicale des cellules.
- **Syndrome hémolytique et urémique (SHU)** : est une affection qui affecte le sang et les vaisseaux sanguins. Il en résulte une destruction des plaquettes sanguines (cellules impliquées dans la coagulation), une faible numération des globules rouges (anémie) et une insuffisance rénale due à une lésion des très petits vaisseaux sanguins des reins. D'autres organes, tels que le cerveau ou le cœur, peuvent également être affectés par des lésions de très petits vaisseaux sanguins.
- **Tick-over** : ce dit à un système qui tourne au ralenti, il continue de fonctionner mais ne progresse que très peu.



Résumé

Résumé :

Le système immunitaire humain est doté de cascades plasmiques pour faire face aux intrus microbiens. En raison de sa capacité à reconnaître et à éliminer rapidement les micro-organismes, le système du complément constitue la composante principale de cette machinerie plasmique. Toutefois plusieurs bactéries Gram négatif (BGN) ont développé des moyens d'échapper à l'attaque de ce système grâce à différents mécanismes. Notre travail visait à étudier et caractériser l'activité des bactéries Gram négatif sur la voie alterne du complément (VAC).

Nous avons procédé à isoler 44 échantillons de BGN à partir d'une série de patients atteints de maladies infectieuses que nous avons mises en interaction *in vitro* avec les protéines de la VAC humaine. L'évaluation de cette interaction hôte-bactérie a été faite par le dosage fonctionnel de la VAC résiduelle par la technique AP₁₀₀ d'un coté et de l'autre coté l'appréciation de la viabilité bactérienne mesurée en UFC/ml.

Nous avons identifié 17 souches consommatrices de la VAC à fort pouvoir d'échappement. Egalement, les bactéries encapsulées à fort pouvoir d'échappement consomment moins de VAC comparativement à celles à faible pouvoir d'échappement ($p=0,007$). Le test de la régression linéaire nous a montré que la consommation de la VAC explique à 12,2% les variations en survie bactérienne ($p=0,002$).

Nos résultats ajoutent une pièce supplémentaire dans la compréhension du model de l'interaction BGN-VAC monté grâce aux travaux de *Keith A. Joiner* et *Evelien TM. Berends* en conjuguant la consommation de la VAC à la survie bactérienne. D'autres travaux utilisant notre approche sont souhaitables afin de bien élucider cette interaction « Hôte-pathogène ».

المخلص :

يحتوي جهاز المناعة البشري على أنظمة بلازمة لمواجهة الميكروبات الدخيلة , نظراً لقدرته على التعرف على الكائنات الحية الدقيقة والقضاء عليها بسرعة ، فإن نظام المتمم هو المكون الرئيسي لهذه الآلية الدفاعية. ومع ذلك ، فإن العديد من البكتيريا سالبة القرام طرقاً للتفادي هجوم هذا النظام من خلال آليات مختلفة. يهدف عملنا إلى دراسة وتوصيف نشاط البكتيريا سالبة القرام على المسار المتناوب لجهاز المتمم.

قمنا بعزل 44 عينة GNB من مجموعة من المرضى الذين يعانون من أمراض معدية التي تم اختبار تفاعلها مع بروتينات المتمم في المختبر. تم إجراء تقييم تفاعل "جسم مضيف- البكتيريا" بواسطة الفحص الوظيفي لبروتينات المسلك المتمم المتبقية بواسطة تقنية API100 وتم تقييم درجة حيوية البكتيريا المقاسة ب (وت م) من خلال هذه الدراسة حددنا 17 سلالة مستهلكة لبروتينات المتمم ذات قدرة عالية للتفادي هذا الجهاز تم اثبات ان البكتيريا المغلفة ذات قدرة كبيرة للتفادي تستهلك بنسبة اقل بروتينات المسلك المتناوب (احتمال الخطأ = 0.007). ولقد أظهر اختبار الانحدار الخطي أن استهلاك هذه البروتينات يمثل 12.2% من التغيرات في البقاء على قيد الحياة للبكتيريا. (احتمال الخطأ = 0.002).

مكتنتا دراستنا باضافة قطعة إضافية في فهم نموذج التفاعل بين "الجسم مضيف- بكتيريا" المقترحة من طرف العالمين *كايت جوينر* و *انجيلين بيراندز* من خلال الجمع بين البروتينات للمسلك المتناوب المستهلكة و حيوية البكتيريا. من المستحسن القيام دراسات اخرى بنفس المنهجية المتبعة في عملنا .

الكلمات المفتاحية : البكتيريا سالبة القرام, تفادي المناعة , المسار المتناوب للمتمم, التفاعل " الجسم المضيف – بكتيريا", قوقعة GNB.

Abstract:

The human immune system has plasmatic cascades to face microbial intruders. Because of its ability to rapidly recognize and eliminate microorganisms, the complement system is the main constituts of this plasmatic machinery. However several Gram-negative bacteria (GNB) have acquired ways to escape the attack of this system through different mechanisms. Our work aimed to study and characterize the Gram-negative bacteria effect on the alternative complement pathway (ACP).

We isolated 44 GNB samples from a series of patients with infectious diseases that had been interacted *in vitro* with human ACP proteins. Host-bacteria interaction was assessed by the functional assay of the residual ACP by the AP₁₀₀ assay on one side and on the other side by the bacterial viability expressed by UFC / ml.

We identified 17 strains consuming ACP with high escape ability. Furthermore, encapsulated bacteria with high escape ability consume less ACP protiens compared to those with lower evasion effect ($p=0.007$). The linear regression test has shown us that the consumption of ACP could explain 12.2% of the variations in bacterial survival ($p=0.002$). Our findings add an additional piece to the understanding of the GNB-ACP interaction model shaped through *Keith A. Joiner* and *Evelien TM Berends* works by combining the consumption of ACP with bacterial survival. Other works using our approach are needed to elucidate this host-pathogen interaction.

Key words : Gram negative bacteria, Evasion, Alternative complement pathway, Host-pathogen interaction, Capsule.