



Stage d'insertion en milieu professionnel

Période du stage :

Du 18/03/2017 Au 29/03/2017.

Lieu du stage :

Institut Pasteur d'Algérie,
laboratoire des entérobactéries et
autres bactéries apparentées.

Stagiaire :

AISSAOUI Mohamed Amine. Année d'étude : 4ème année.

LEFOUILI Messaoud

Année universitaire : 2017/2018

| Sommaire | |
|--|----|
| I-Introduction générale | 5 |
| I-1.Description du stage | 5 |
| II-Description des tâches effectuées dans le stage | 6 |
| II-1.Coproculture | 6 |
| II-2.Galerie classique | 9 |
| II-3.Galerie miniaturisée API 20 ^E | 11 |
| II-4.Sérotypage | 13 |
| II-5.Antibiogramme | 14 |
| II-6.Coloration gram | 16 |
| III-Conclusion..... | 16 |
| Référence..... | 16 |

Liste des abréviations:

ADH : l'arginine désaminase.
CIN :Cefsulodine Irgasan Novobiocine.
Col: colonies.
EPA : eau peptonée alcaline.
GN: gélose nutritive.
GNAB : Gélose nutritive Alcaline Biliée.
Lac: lactose.
LDC : lysine décarboxylase.
ODC: ornithine décarboxylase.
ONPG: ortho-nitro-phényl-galactoside.
SFB : bouillon au sélénite acide de sodium.
TSI: triple sugar iron.

Liste des tableaux :

| | |
|---|----|
| Tableau 1. Milieux utilisés dans la coproculture..... | 6 |
| Tableau 2. Milieux d'enrichissement utilisé pour la coproculture..... | 6 |
| Tableau 3. Lecture de la galerie miniaturisé API 20 ^E | 12 |
| Tableau 4. Résultats et interprétation d'antibiogramme..... | 15 |

Liste des figures :

| | |
|---|---|
| Figure 01. Schéma général représente les étapes de coproculture..... | 7 |
|---|---|

Remerciement

Dr BENAMROUCHE et Dr HAMROUCHE

Nous vous remercions de bien avoir voulu nous accueillir pour effectuer le stage de perfectionnement au niveau de votre service.

Nous tenons également à exprimer tous nos gratitudes et nos reconnaissances à remercier vivement Mme BELKADER Chafika, pour son aide et son accueil. Bénéficier de vos compétences et de votre disponibilité fut un réel privilège. Nous remercions également toute l'équipe pour leur accueil, leur esprit d'équipe, en particulier Mr KIAS Farid, Mme RABIA Nadia et Dr ZEMAM Sihem, qui nous ont beaucoup aidés.

Nous souhaitons en dernière lieu exprimer nos gratitudes envers les responsables de l'école nationale supérieure de biotechnologie notamment le chef de département Mr Adel Mohamed kechekar de nous donne la chance d'avoir ce stage.

I-Introduction Générale

Durant la période du 18/03/2017 au 29/03/2017, nous avons effectué un stage au sein de laboratoires des entérobactéries au niveau de l'institut pasteur d'Algérie à Delly Brahim, sous le nom de stage d'insertion dans le milieu professionnel et qui a un but de nous permettre d'élargir et de renforcer nos connaissances sur les réalités techniques et économiques du milieu professionnel et nous permet ainsi de mettre en pratique nos connaissances acquises lors de notre formation au niveau de l'école nationale supérieure de biotechnologie. Notre choix de ce laboratoire a été mené par notre désir d'approfondir nos connaissances liées à la microbiologie et ainsi de s'habituer à la bonne pratique de laboratoire lors des manipulations et qui peut nous servir dans notre spécialité « biotechnologie microbienne ».

I-1.Description du stage :

On a fait notre stage au niveau du laboratoire des Entérobactéries et **Autres Bactéries Apparentées** précisément au niveau de l'unité de Salmonelle et Shigelle, où on a effectué essentiellement des coprocultures qui incluent : l'isolement, l'identification biochimique, le sérotypage et l'antibiogramme.

II-Description des tâches effectuées au sein du stage

II-1 coproculture

C'est l'examen cytotubériologique des selles, afin d'isoler les germes pathogènes du tube digestif. Le but de la coproculture consiste à isoler, au sein d'une flore complexe, un nombre limité d'espèces réputées pathogènes. Au niveau du service des entérobactéries les bactéries recherchées sont : *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Vibrio spp*, *Yersinia enterocolitica* et *Yersinia pseudotuberculosis*, *Campylobacter spp* et *Escherichia coli* enteropathogène *EPEC* (pour les enfants moins de 2 ans).

1^{er} jours

- ❖ réception des prélèvements de selles et leur enregistrement sur le registre de paillasse.

La fiche de renseignement accompagnant le prélèvement doit contenir : le Nom, prénom, l'Age les signes cliniques.

- ❖ Examen macroscopique : noter l'aspect de la selle
- ❖ Examen microscopique : un frottis colorie au bleu de méthylène ou au Gram
- ❖ Préparation des suspensions de selles : on met une noix de selle dans un tube contenant 10 ml d'eau physiologique stérile puis bien agiter pour avoir la suspension
- ❖ Mise en culture : On Ensemence la suspension préparée sur 04 types des milieux sélectifs (tableau 01):

Tableau 1. Milieux utilisés dans la coproculture

| Milieux de culture | Hecktoen | GNAB (Gélose nutritive Alcaline Biliée) | CIN (Cefsulodine-Irgasan-Novobiocine) | Skirrow |
|--------------------|--|---|---------------------------------------|--------------------------|
| Bactérie ciblée | <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> et - <i>Escherichia coli</i> | <i>Vibrio cholerae</i> | <i>Yersinia spp</i> | <i>Campylobacter spp</i> |
| Incubation | à 37°C, 24h. | | à 30°C, 24h. | à 37°C, 48h. |

- ❖ L'enrichissement : on ensemence une demi-pipette Pasteur dans des milieux liquides (Tableau 02):

Tableau 2. Milieux d'enrichissement utilisés pour la coproculture

| Milieux d'enrichissement | SFB (bouillon au sélénite acide de sodium) | EPA (eau peptonée alcaline) | MCconkey | Priston |
|--------------------------|--|-----------------------------|-----------------|-------------------------------|
| Bactérie ciblée | <i>Salmonella spp</i> | <i>Vibrio cholerae</i> | <i>Yersinia</i> | <i>Campylobacter spp</i> |
| Incubation | à 37°C, 24h | | +4°C, 10jours | 37°C, 48h, en microaérophilie |

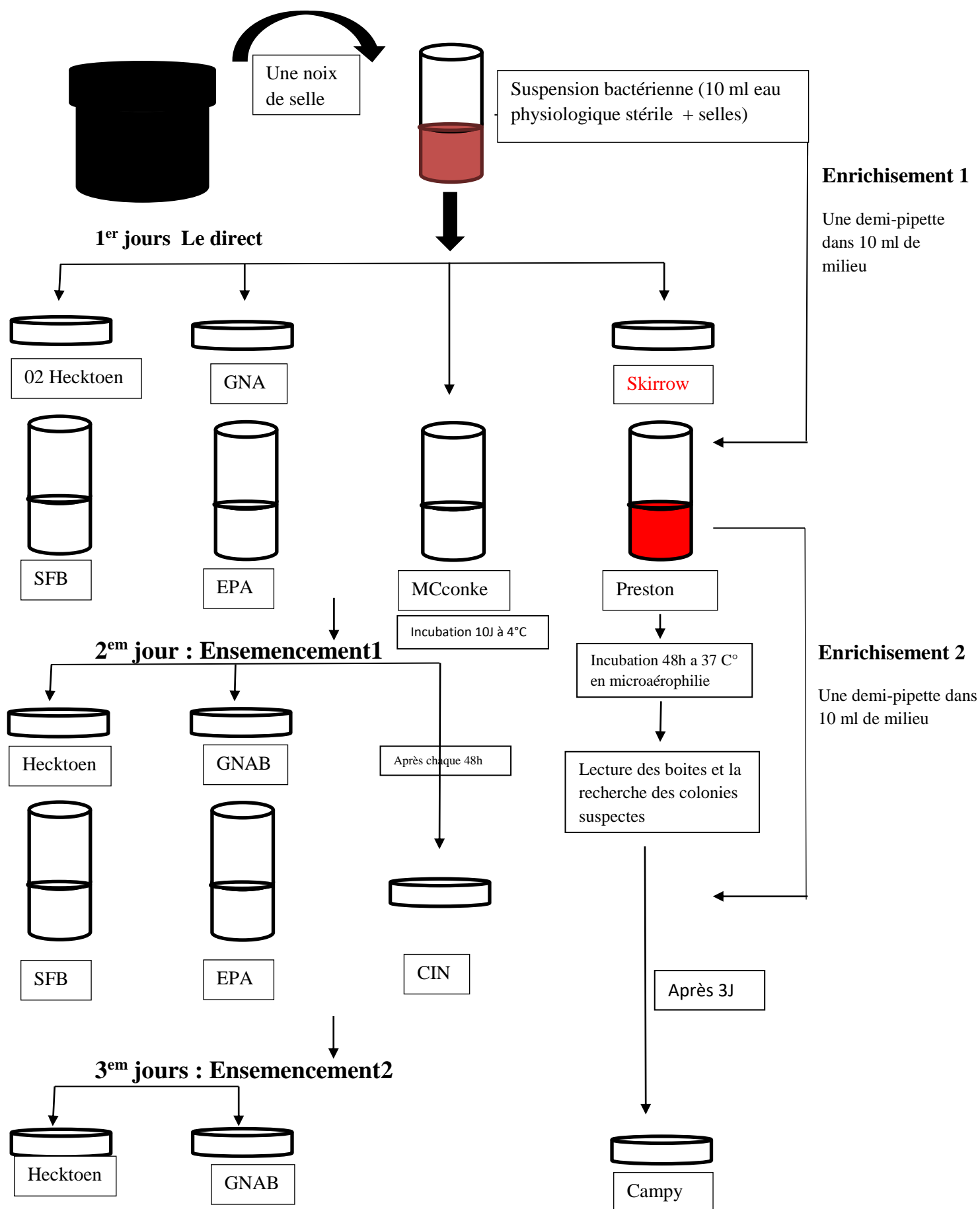


Figure 01. Schéma général représente les étapes de coproculture.

2ème jours (après 24 h d'incubation)

Après 24 h d'incubation, on fait la lecture des boîtes à la recherche des colonies suspectes.

Sur milieu Hecktoen : les col lac + sont oranges et les col lac – sont vertes

- Pour Salmonelle : petites col lac – vertes qui sont H₂S + ou –
 - Pour Shigelle : grandes col lac – vertes qui sont H₂S- toujours
 - Pour Vibrio : colonie suspectes
 - Pour E .coli : col lac+ orange H₂S – sèche à contour régulier
-
- Pour les malades nourrissons (<2ans) on cherche en plus les colonies lac +, plates et sèches suspect d'être E.coli.

Toutes colonies suspectes sont repiquées sur milieu TSI et sur milieu urée -indol

3em jour la lecture des boîtes I et les TSI :

Aspect de Salmonelle sur TSI :

- Glu +
- La surface rouge (lac-/sac -)
- Production du gaz+
- Couleur noir (H₂S+), ou H₂S-

Pour les suspects on doit effectuer une Galerie API 20E

Aspect de Shigelle :

- Glu +
- La surface rouge (lac-)
- Pas du gaz et H₂S-

On doit faire un repiquage dans le Citrate de Christensen (couleur vert) :

Il sert à différencier E.coli et *Shigella*

On fait les mêmes étapes le 2èm jour pour la lecture des boîtes des enrichissements 1 et 2.

II-2 La galerie classique

Des tests enzymatiques (biochimiques)

a- Les Acides Aminés : La Mise en évidence de:

- ADH : l'arginine désaminase
- LDC : lysine décarboxylase
- ODC: ornithine décarboxylase

Ces enzymes, dont l'action est favorisée en milieu acide, forment des substances alcalines à partir des acides aminés.

- La décarboxylation de la lysine produit de la cadavérine,
 - la L-ornithine est décarboxylée en putrescine
 - l'arginine est décarboxylée en agmatine puis hydrolysée en putrescine.
- Les tubes ne contiennent qu'un seul acide aminé (lysine, ornithine ou arginine), du glucose, des extraits de levure, du chlorure de sodium et un indicateur de pH. La recherche de ces enzymes n'est effectuée que pour des bactéries à métabolisme fermentatif (on utilise l'huile de vaseline pour la mise en anaérobiose et aussi pour empêcher l'échappement de CO₂).
- Dans un premier temps, les bactéries fermentent le glucose et les milieux s'acidifient (virage au jaune du Pourpre de Bromocrésol). À pH acide, la synthèse des décarboxylases est favorisée et ces enzymes présentent une activité maximale.
- Dans un second temps, la production éventuelle d'une décarboxylase conduit à la formation de composés alcalins et à l'alcalinisation du milieu ce qui provoque le virage au pourpre du pourpre de bromocrésol.
- on utilise le milieu de Moeller comme Témoin : contient que de glucose +un indicateur de PH ; Pourpre de Bromocrésol), ou le PH initial est alcalin : la dégradation de glucose va rendre le milieu acide qui va donner un couleur jaune.

b-Test d'urée : nous permettre de mettre en évidence 3 enzymes :

Uréase, Tryptophane désaminase et Tryptophanase.

La réaction se déroule comme ça: Substrat+ Enzyme → Produit

1/Urée + **Uréase** → Ammoniaque (test +: rose fuchsia, test - : intact)

2/Tryptophan + **tryptophane désaminase** → Indolpyroviq (on ajoute quelques gouttes de l'additif TDA : test + : marron, test - : intacte).

3/tryptophane + **Tryptophanase** → Indole (on ajout quelques gouttes de réactif de Kovacs : test+ : anneau rouge, test- : pas d'anneau).

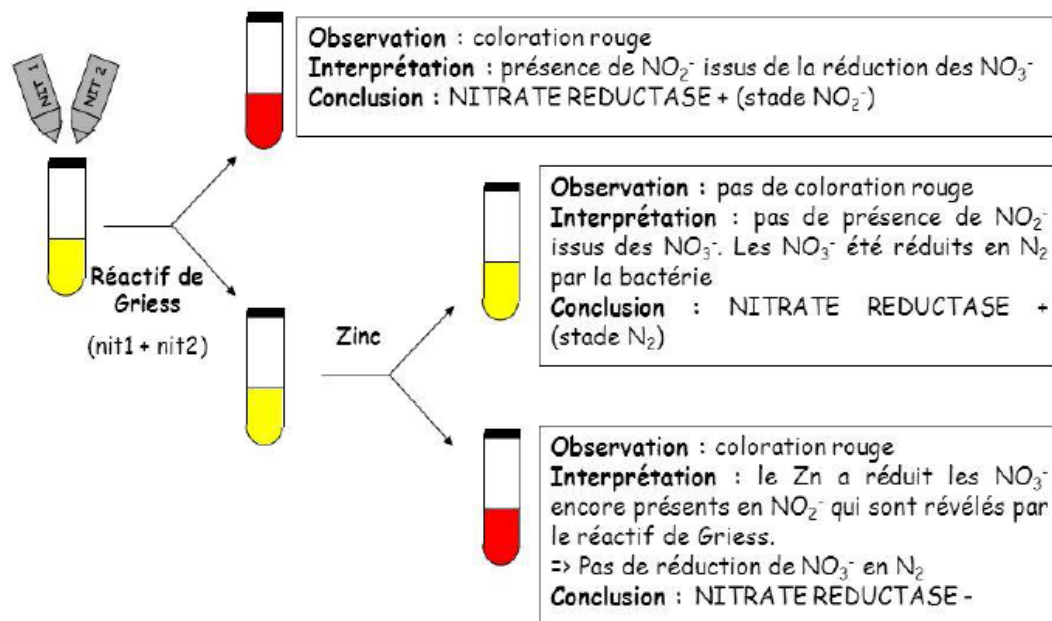
b- La Béta-galactosidase

Pour ce test, on utilise un substrat synthétique : l'ortho-nitro-phényl-galactoside (=ONPG) incolore, de structure proche du lactose et capable de pénétrer dans la bactérie sans perméase. → Si la bactérie possède la β -galactosidase, on obtient du galactose et de l'ortho-nitro-phénol (= ONP) de couleur jaune.

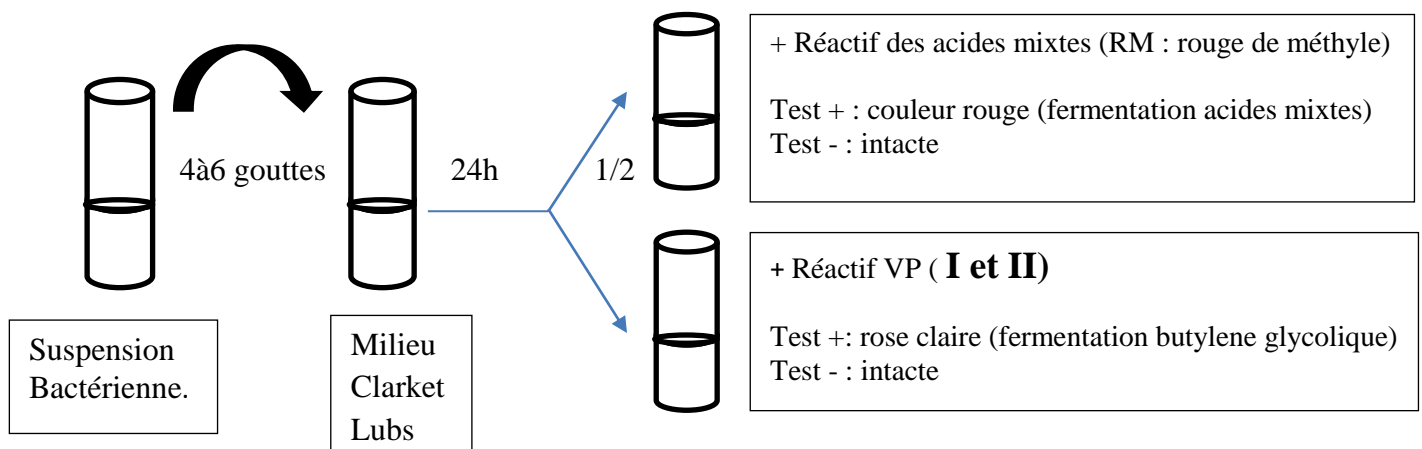
Sur une suspension de la souche ajout d'un disque 'ONPG'

Après incubation, couleur jaune + ne change pas –

c- Bouillon de nitrate : recherche de nitrate réductase

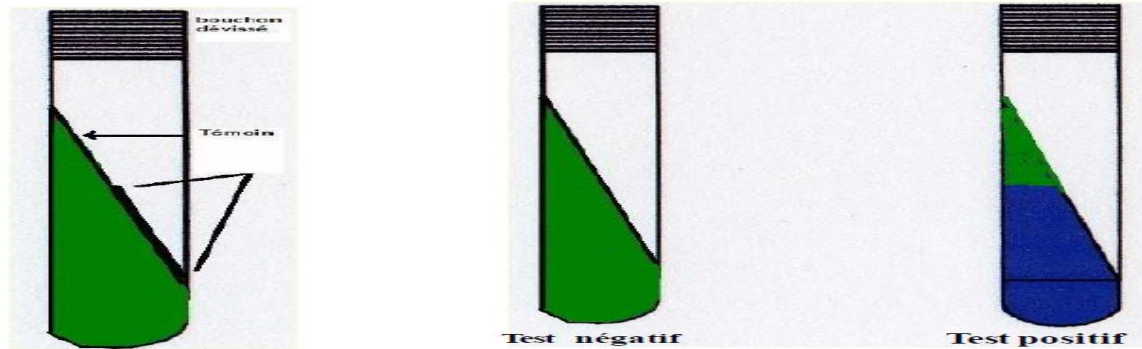


d-Bouillon de Clark et Lubs : permet d'avoir la voie d'attaque des glucides :



e-Citrate de Christiansen et de Simmons : Permet de mettre en évidence la Citrate perméase :

Pour l'ensemencement de ces deux milieux on laisse toujours la partie supérieure non ensemencer pour l'utiliser comme témoins.



Remarque : les caractères biochimiques essentiels de la salmonelle sont: Lac -, H₂S + (à l'exception de salmonelle typhi), uréase, TDA -, Indole -, ONPG – sauf salmonelle arizonae) et LDC + (sauf salmonelle pratyphi A).

II-3 Galerie biochimiques complète API 20^E

C'est une Galerie de 20 microtubes prêts à l'emploi permettant de réaliser 23 **tests biochimiques standardisés et miniaturisés** afin d'identifier des bacilles Gram – appartenant à la famille des *ENTEROBACTERIACEAE*

Les microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée.

- Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux.

Les réactions produites pendant le période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs

1- Préparation de l'inoculum

- Prélever à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée une colonie parfaitement isolée.
- 2- Dissocier soigneusement la colonie dans un tube contenant 5ml d'eau physiologique.




























3- Inoculation de la galerie :

Introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile ouverte, pointe appuyée à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation de bulles

- ❖ Lorsque le sigle du test est encadré, ce qui est le cas des tests CIT, VP et GEL, la suspension doit remplir le tube et la cupule → mise en aérobiose.
- ❖ Lorsque que le sigle du test est souligné (ADH, LDC, ODC, URE, H₂S), la suspension doit remplir uniquement le tube. Après ensemencement complet de la galerie, la cupule sera secondairement remplie d'huile de paraffine
- ❖ Lorsque le sigle du test n'est ni encadré ni souligné, la suspension doit remplir uniquement le tube.
- ❖ On Referme la boîte d'incubation, On écrit les références du prélèvement sur la languette du fond de la boîte et on place la boîte à 37 °C durant 18 à 24 heures.

4- Lecture de la galerie : VOIR LE TABLEAU

Tableau 3. Lecture de la galerie miniaturisé API 20^E.

| TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISÉE API 20E | | | | | | |
|--|--|---|-----------------------|---|---|---|
| <u>Microtube</u> | Substrat : | Caractère recherché | Révéléateur | Lecture directe ou indirecte Test (si nécessaire) | Résultat - | Résultat + |
| ONPG | ONPG = Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside | Béta galactosidase | | Lecture directe |  |  |
| <u>ADH</u> <u>LDC</u> <u>ODC</u> | Arginine Lysine Ornithine | Arginine Dihydrolase Lysine Décarboxylase Ornithine Décarboxylase | Rouge de phénol | Lecture directe |  |  |
| CIT | Citrate | Utilisation du citrate | BBT | Lecture directe |  |  |
| <u>H₂S</u> | Thiosulfate de sodium | Production d'H ₂ S | Fe III | Lecture directe |  |  |
| <u>URÉ</u> | Urée | Uréase | Rouge de Phénol | Lecture directe |  |   |
| TDA | Tryptophane | Tryptophane désaminase | | Lecture indirecte Ajouter une goutte de réactif chlorure de Kovacs |  |   |
| IND | Tryptophane | Tryptophanase ou production d'indole | | Lecture indirecte Ajouter une goutte de réactif IND |   |   |
| VP | Pyruvate de sodium | production d'acétoïne (3-hydroxybutanone) | | Lecture indirecte Ajouter 1 goutte de VP1 et VP2 Attendre 10 minutes |  |   |
| GEL | Gélatine | gélatinase | Particules de charbon | Lecture directe |  |  |
| GLU à ARA = zymogramme | Substrat carboné (glucide) | Utilisation de substrats carbonés (glucides) | BBT | Lecture directe |  |  |
| NO ₂ / N ₂ | Nitrates (NO ₃ ⁻) | Nitrate réductase | | Lecture indirecte Ajouter 1 goutte de NIT1 et NIT2 et zinc éventuellement |  |  |

II-4 Sérotypage : identification antigénique

Principe : réaction d'agglutination sur lame entre un anticorps présent dans un sérum test et un antigène porté par le germe isolé.

Le sérotypage de salmonelle est basé sur le tableau de **KAUFFMANN-WHITE** Le sérotype est constitué de deux antigènes : l'un est somatique de paroi(O) et l'autre flageller (H) regrouper en deux phases (1et2).

Technique

- L'identification de l'antigène O (AgO) est effectuée à partir de tube de TSI (parce que le Ag somatique est de nature polysaccharidique)
- L'identification de l'antigène H (AgH) est effectuée à partir de l'eau de condensation de GN inclinée.
- Déposer une goutte d'antisérum sur une plaque ou lame de verre parfaitement propre
- Emulsionner à la pipette Pasteur ou avec un bâtonnet jetable un peu de culture bactérienne de façon à obtenir un trouble homogène dans la goutte
- Agiter la lame par mouvements lents et circulaires
- Observer l'apparition d'agglutinats fins, granulaires et difficiles à dissocier (s'aider éventuellement d'un fond noir pour une meilleure visualisation des agglutinats)

CONDUITE DU SÉROTYPAGE

➤ **Test en eau physiologique.**

Tester la souche en eau physiologique.

- S'il n'y a pas agglutination, la souche **n'est pas auto-agglutinable** et on peut poursuivre le sérotypage.
- S'il y a agglutination, la souche est **auto-agglutinable**. On arrête

➤ **détermination du groupe par identification des antigènes O majeurs**

- Tester d'abord les antisérums O mélanges: OMA et OMB.
 - Si agglutination dans OMA (inutile de tester OMB si l'agglutination est franche): conclure que la souche appartient à l'un des groupes O:2(A), O:4(B), O:9(D), O:3(E), O:21(L).
 - Si absence d'agglutination dans OMA, tester OMB: une agglutination avec OMB permet de conclure que la souche appartient à l'un des groupes O:8(C), O:11(F), O:13(G), O:6,14(H).

Tester ensuite les antisérums mono- ou divalents par ordre de fréquence des groupes.

➤ Détermination du sérotype par identification des antigènes H

Tester les antisérums H adaptés au groupe déterminé précédemment en testant la phase 1 puis la phase 2 (phase 1 la plus fréquente) :

Une bactérie présente ses antigènes H sous une seule phase, 1 ou 2; mais au sein d'une culture pure, il peut y avoir des bactéries en phase 1, d'autres en phase 2 (la phase 1 est plus fréquente que la phase 2).

Lorsqu'une phase n'est pas représentée, il est nécessaire de réaliser une inversion de phase afin de l'obtenir en quantité suffisante. Cela consiste à faire cultiver la salmonelle dans une gélose molle, additionnée d'anticorps de la phase à éliminer et de recueillir, à distance du dépôt, les salmonelles mobiles qui possèdent des flagelles de la phase non agglutinée par les anticorps du milieu: c'est le test de Sven-Gard.

II-5 Antibiogramme

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'une bactérie à un ou plusieurs antibiotique dans une optique essentiellement thérapeutique. il sert également :

-à la surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne.

-à l'identification bactérienne par la mise en évidence de résistance naturelle.

a- Méthode

On utilise la méthode d'écouvillonnage en milieu gélosé (selon les normes CLSI):

- A partir d'une culture jeune de GN incliné préparé à partir de TSI1 et à l'aide d'une pipette pasteur stérile gratter de surface des colonies et le mettre en suspension (l'eau physiologique).
- Vortexer bien le tube et passer au Densimètre (il faut que la densité égale à $0.5 \text{ Mc Farland} = 150 \times 10^6 \text{ cellules/ml}$).
- Plonger l'écouvillon dans la suspension et éliminer l'excès de liquide en tournant l'écouvillon sur les parois du tube.
- Ensemencer toute la surface de boîte en stries très serrées (3 passages à orientation décalée de 90° pour la boîte et l'écouvillon).
- Mettre les disques d'antibiotiques avec un applicateur de 16 disques
- Pour assurer le contact disque-milieu et on utilisant une pince appuyer sur les disques.
- En parallèle ensemencer une boîte GN de même suspension comme Témoin qui permette la vérification en cas de contamination de boîte d'antibiogramme.
- Passer à l'incubation 24 h à l'étuve (37°C).

b-lecture

On mesure les diamètres d'inhibition de croissance qui correspondent à chaque antibiotique.

Selon un tableau des valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour les entérobactéries on effectue la lecture pour dire si la souche est résistante, sensible ou intermédiaire.

3/Résultat et discussion:

Tableau 4. Résultats et interprétation d'antibiogramme.

| L'antibiotique testé | Le diamètre d'inhibition | interprétation |
|----------------------|--------------------------|----------------|
| Amoxicilline | <6 | R |
| Ampicilline | <6 | R |
| Ticarcilline | <6 | R |
| Piperacilline | 15 | R |
| Cefazoline | 20 | I |
| Colistine | 13 | S |
| Augmentin | 10 | R |
| Cefoxitine | 24 | S |
| Ceftazidime | 27 | S |
| Cefotaxime | 34 | S |
| Ceftriaxone | 35 | S |
| Aztréonam | 34 | S |
| Imipenem | 29 | S |
| Céfépime | 36 | S |
| Meropenem | 30 | S |
| Ertapenem | 32 | S |

R : résistante, S : sensible, I : intermédiaire

II-5 Coloration Gram

Après fixation des bactéries sur une lame (par passage de la lame dans la flamme) :

- la lame est inondée pendant 60 secondes dans un premier colorant, le violet de gentiane. Le violet de gentiane est un colorant puissant. Il traverse les parois et les membranes des bactéries et se fixe dans leur cytoplasme. Ainsi à cette étape toutes les cellules sont colorées en violet.
- la lame est ensuite traitée au lugol en solution pendant 60 secondes qui sert de mordant. Le lugol renforce le violet de gentiane contenu dans le cytoplasme des bactéries.
- on chasse ensuite le violet avec une solution d'éthanol, qui détermine quelles bactéries sont à Gram négatif ou à Gram positif.

Le principe est le suivant : les bactéries à Gram positif possèdent une paroi riche en peptidoglycane, composant qui empêche l'alcool d'emporter le violet de gentiane, qui reste donc dans le cytoplasme : la bactérie n'est pas décolorée (restées violets). Les bactéries Gram négatif possèdent une paroi pauvre en peptidoglycane, composant qui en raison de sa faible quantité va permettre à l'alcool d'emporter le violet de gentiane, celui-ci disparaissant du cytoplasme. La bactérie est donc décolorée.

- la lame est rincée puis plongée brièvement dans un deuxième colorant, la fuchsine. Les bactéries colorées en violet sont dites « Gram + » et celles colorées en rose « Gram - » ;
- la lame est ensuite récupérée, rincée et séchée, puis observée au microscope optique.

III- Conclusion

Le stage effectué au sein de l'Institut Pasteur d'Algérie précisément au niveau du laboratoire des entérobactéries a répondu favorablement aux objectifs fixés. Il nous a donné l'occasion de nous familiariser avec différents techniques microbiologiques et d'avoir une approche réelle du monde de travail. Il nous a aidé à comprendre tous les étapes de coproculture dès le début jusqu'à la fin.

Ce stage a apporté un plus, à notre formation initiale. Il a été d'une grande utilité dans notre domaine de formation en tant que futur biotechnologue et surtout dans notre master de biotechnologie microbienne, car les tâches effectuées dans le laboratoire des entérobactéries étaient très enrichissantes et en rapport direct avec les connaissances acquises à l'École Nationale Supérieure de Biotechnologie « Taoufik Khaznadar » de Constantine.

Référence

- <http://www.microbiologie-medicale.fr/systematiquebacterienne/serotypagesalmonella.htm>
- montpellier.fr/biotechnologies/sites/sti3/files/microbiologie/le_serotypage.pdf