

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر و تهيئة الساحل
École Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER EN SCIENCES DE LA MER**

OPTION: AQUACULTURE

Sujet

***Caractérisation génétique de la résistance aux quinolones
chez des coliformes isolés à partir de la moule (*Mytilus
galloprovincialis*)***

Présenté par:

- ALIOUI IKRAM NADJAH

Soutenu le 24/10/2013 devant le jury suivant :

Mme. MAOUEL Dj.	Maître assistante A (ENSSMAL)	Présidente
Melle. ALOUACHE S.	Maître de conférences B (ENSSMAL)	Promotrice
Mme. AMAR I.	Maître assistante A (ENSSMAL)	Examinatrice
Mme. CHAOU N.	Maître assistante A (ENSSMAL)	Examinatrice

Promotion 2013

Remerciements

C'est avec l'aide de Dieu qu'a vu le jour ce présent travail. Ensuite, il n'aurait pas pu être achevé sans le soutien, les conseils et les encouragements de certaines personnes auxquelles je tiens ici à exprimer mes sincères remerciements.

En premier lieu, j'exprime toute ma gratitude pour
Ma Promotrice, **Melle ALOUACHE S** pour ses précieux conseils, sa disponibilité, sa confiance qu'elle a toujours témoigné et la sollicitude dont elle ma entouré

ma reconnaissance s'adresse également à :

-Madame **MAOUEL Dj.**, maître assistante à l'ENSSMAL d'avoir accepté de présider ce jury,

- madame **AMAR I.**, maître assistante à l'ENSSMAL et madame **CHAOU N.**, maître assistante à l'ENSSMAL d'avoir bien voulu examiner et corriger ce travail malgré leurs nombreuses préoccupations.

Mes remerciements vont également aux membres du laboratoire de génétique **USTHB**, a fin de réaliser la PCR au sein du laboratoire sous la direction de Melle ALOUACHE S, membre du laboratoire.

Je remercie aussi madame REFES Ingénieur du laboratoire de microbiologie à l'ENSSMAL pour sa serviabilité et sa gentillesse.

J'exprime aussi ma profonde reconnaissance au personnel de la bibliothèque de l'ENSSMAL.

J' adresse une pensée particulièrement affective à
Mes amis de l'ENSSMAL.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail,

A ceux qui ont fait tout

*pour moi : ma mère **Radia** à mon père **Maamar** et ma sœur*

el-alia

*Mes grands pères **MOULUD** et **BELKACEM**.*

*Mes grandes mère **KHEIRA** et **FATIHA**.*

*Mes tantes **laalia** .**Karima** et **Rachida***

*A mon oncle **Madjid saari** et sa famille*

*(**Lamia**, **Ghilasse**, **Mouhamed**)*

et à l'ensemble de ma famille.

A tous mes ami,

Sabrina**, **Imane**, **Rahim**, **Chafia**, **Noura

Sommaire

Introduction	1
--------------------	---

Chapitre I : Généralités

I.1. Présentation de <i>Mytilus galloprovincialis</i>	2
I.1.1. Systématique de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i>	2
I.1.2. Morphologie externe.....	2
I.1.2.1 La coquille	3
I.1.2.2 Le manteau	3
I.1.2.3 Le byssus	3
I.1.2.4 Le pied	3
I.1.3. Physiologie de la moule « <i>Mytilus galloprovincialis</i> ».....	4
I.1.3.1. Alimentation	4
I.1.3.2. Excrétion	4
I.1.3.3. Respiration.....	4
I.1.4. Système nerveux	4
I.1.5. Reproduction	4
I.1.6. Ecologie	5
I.1.7. L'utilisation de la moule en biosurveillance environnementale	5
I.1.8. Les germes indicateurs de la salubrité de la moule	5
I.1.8.1. Les coliformes totaux	5
I.1.8.2. Les coliformes fécaux	6
I.1.8.3. <i>Escherichia coli</i>	6
I.2. Transferts horizontaux et supports mobiles de la résistance	8
I.2.1. Transferts de gènes	8
I.2.1.1. La transformation bactérienne	9
I.2.1.2. La transduction	9
I.2.1.3. La conjugaison bactérienne.....	9

I.2.2. Les supports mobiles de la résistance	11
I.2.1. Les plasmides	11
I.2.2. Transposons et intégrons	11
I.3. Les quinolones	11
I.3.1. définition	11
I.3.2. Le mode d'action des quinolones	13
I.3.3. Les mécanismes de résistances aux quinolones	14
I.3. 3.1. Mauvaise affinité de la cible.....	14
I.3.3.2. Protection de la cible	14
I.3.3.3. Acétylation.....	15
I.3.3.4. L'imperméabilité	15
I.3.3.5. Le système d'efflux	15

Chapitre II: Matériel et méthodes

I. Matériel et méthodes.....	16
I.1 Matériel biologique.....	16
I.1.1 Description de la zone d'étude	16
II Méthodes	17
II.1. Identification biochimique bactériennes par galerie API 20 E	17
II.2. Diffusion en milieu gélosé : antibiogramme.....	17
II.3. Recherche des gènes de résistance aux quinolones par PCR.....	19
II.2.2.7. Electrophorèse sur gel d'agarose	22

Chapitre III : Résultats et Discussion

III. Résultats et discussion	23
III.1. Identification bactérienne	23
III.2. Résistance aux antibiotiques	24
III. 3. Caractérisation génétique de la résistance aux quinolones.....	26
III.3.1. Détection de la production des protéines Qnr	26
III.3.2. Détection de la présence du gène <i>qepA</i>	27

III.3.3. Recherche du gène aac-(6')-Ib	27
Conclusion	29
Références bibliographiques	30

La liste des figures :

Figure 1 : Morphologie externe de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i>	3
Figure 2 : système respiratoire chez la moule.....	4
Figure 3 : Les différents pathovars d' <i>Escherichia coli</i>	8
Figure 4 : Représentation schématique des différents mécanismes de transfert de gène.....	9
Figure 5 : Illustration d'un transfert plasmidique chez des bactéries (Gram -).....	10
Figure 6: Mécanisme de conjugaison bactérienne.....	10
Figure7 : Structure de Chloroquine, 7-chloroquinoline et acide nalidixique.....	11
Figure 8 : Structure de l'acide nalidixique et quelques dérivés.....	12
Figure 9 : Structure de base des fluoroquinolones.....	12
Figure 10 : L'interaction entre les quinolones et le complexe ADN-ADN gyrase.....	13
Figure 11 : Effets des fluoroquinolones sur l'interaction Topoisomérases II-ADN (CAM, chloramphénicol ; d'après Drilica et Zhao)	14
Figure 12 : Mécanisme de résistance aux quinolones.....	15
Figure 13 : Schéma de la disposition des antibiotiques des antibiotiques.....	19
Figure 14 : Répartition des 25 souches selon leur identité bactérie.....	24
Figure15 : Taux de résistance des 25 coliformes vis-à-vis des quinolones et des aminosides.....	25
Figure16 : Détection des gènes qnr A,B et S par PCR multiplexe chez des coliformes isolés à partir des moules. M : marqueur 100pb DNA ladder, C- : contrôle négatif, Qnr A, S et B : contrôle positifs. E1 : souche positive pour le gène <i>qnrS</i>	27
Figure 17 : Détection des gènes qnr A,B et S par PCR multiplexe chez des coliformes isolés à partir des moules. M : marqueur 100pb DNA ladder, C- : contrôle négatif, Qnr A, S et B : contrôle positifs. S6 : souche positive pour le gène <i>qnrB</i>	28
Figure 18 : illustration de la recherche du gène QepA par PCR. T- : Témoin négatif, T+ : témoin positif (199pb).....	28
Figure 19 : Recherche du gène aac-(6')-Ib par PCR simplexe chez des coliformes isolés à partir des moules. C- : contrôle négatif, C+ : contrôle positif, : marqueur de taille 100pb DNA Ladder. Taille de l'amplifiat : pb. Sens de migration du haut vers le bas.....	29

La liste des tableaux

Tableau 1 : Les caractéristiques bactériologiques des moules récoltées	16
Tableau 2 : Les différents antibiotiques en disque utilisés pour l'antibiogramme.....	19
Tableau 3 : Les séquences des amorces des gènes recherchés par PCR.....	21
Tableau 4 : Les séquences des amorces utilisées.....	21
Tableau 5 : Profils d'antibio-résistance des 24 <i>E.coli</i> et 1 <i>K .pneumoniae</i> isolés à partir de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i>	25

Introduction

Introduction

Les contaminants issus des utilisations de produits pharmaceutiques sont devenus une préoccupation sociétale au cours de ces dernières années : leur présence avérée dans les eaux de surface et le manque de connaissances sur leur devenir dans l'environnement, sur leurs impacts potentiels sur la santé humaine et sur les écosystèmes sont devenus un sujet d'actualité tant pour les scientifiques et que pour les organismes de réglementation environnementale.

Après utilisation, les médicaments sont éliminés par deux voies majoritaires : par introduction directe lors d'activités récréatives ou indirectement via les eaux usées. En effet, les médicaments après usage thérapeutique sont principalement excrétés par voie urinaire ou fécale.

L'utilisation massive des antibiotiques a généré et continue de générer une libération importante de ces molécules dans l'environnement. Ces résidus actifs exercent une pression de sélection qui a entraîné l'apparition de bactéries résistantes. De plus, la présence des gènes de résistance sur des supports génétiques mobiles (plasmides, intégrons et transposons) facilite la dissémination de la résistance via les transferts horizontaux.

La moule *Mytilus galloprovincialis* est un organisme filtreur qui concentre les substances toxiques : antibiotiques, métaux lourds ainsi que les germes pathogènes et/ou résistants. Ces derniers peuvent atteindre l'homme via la chaîne alimentaire. Ces germes peuvent induire des risques sanitaires lourds à traiter à cause des échecs thérapeutiques observés.

Ce travail s'inscrit dans le cadre de recherche sur l'évaluation de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement aquatique. On s'est intéressée à l'évaluation génétique de la résistance aux quinolones chez des bactéries isolées à partir de la moule « *Mytilus galloprovincialis* » sauvage et d'élevage. Ce manuscrit s'articule autour de trois axes majeurs abordant :

- Identification des bactéries.
- Evaluation de la résistance des souches aux antibiotiques par antibiogramme.
- Caractérisation des gènes codant pour la résistance aux quinolones

Chapitre I

Généralités

I.1. Présentation de *Mytilus galloprovincialis*:

I.1.1. Systématique de la moule *Mytilus galloprovincialis* :

La classification des Mollusques repose sur des critères anatomiques discriminant les grands axes taxonomiques, auxquels s'ajoute la distribution géographique. La forte plasticité morphologique de ces animaux (forme et couleur de la coquille) complique encore les déterminations (**Gagnaire, 2005**). Malgré leurs énormes diversités, les différents groupes de Mollusques présentent des homologies anatomiques. Cela vient du fait qu'au cours de l'évolution, ils sont tous descendus de même ancêtre, que les biologistes appellent affectueusement archimollusque (**Weingerg, 1999**).

Cette classe est représentée par environ 15.000 espèces (**Veron, 2000**). Les lamellibranches sont tous aquatiques généralement fousseurs en grande majorité marin (**Grasse et Doumenc, 1998**). La classification des lamellibranches repose sur les variations de la coquille, de la charnière, des sutures palléales ou des branchies ou plus précisément les caractères structuraux des branchies (**Beaumont et Cassier, 2004**). Cette espèce est un bivalve marin, filibranche (mésobranchiés). Les branchies présentent des simples jonctions interfilamentaires, intergripalliés. A système nerveux typique, anisomyaire, et sont pourvu d'une seule structure palléale (orifice exhalant) (**Beaumont & Cassier, 2004**). La longueur de la coquille de ce bivalve varie de 2 à 10 cm (**Weingerg, 1999**).

La classification de la moule, *Mytilus galloprovincialis* s'établit comme suit (**Turgeon et al, 1998**) :

Règne :	Animal
Sous-règne :	Métazoaires
Phylum :	Mollusques
Classe :	Bivalves
Sous-classe :	Ptériom orphes
Ordre :	Mytiloidés
Famille :	Mytilidés
Genre :	<i>Mytilus</i>
Espèce :	<i>Mytilus galloprovincialis</i> (Lamarck, 1819)

I.1.2. Morphologie externe :

La figure 1 présente la morphologie externe de la moule *Mytilus galloprovincialis*

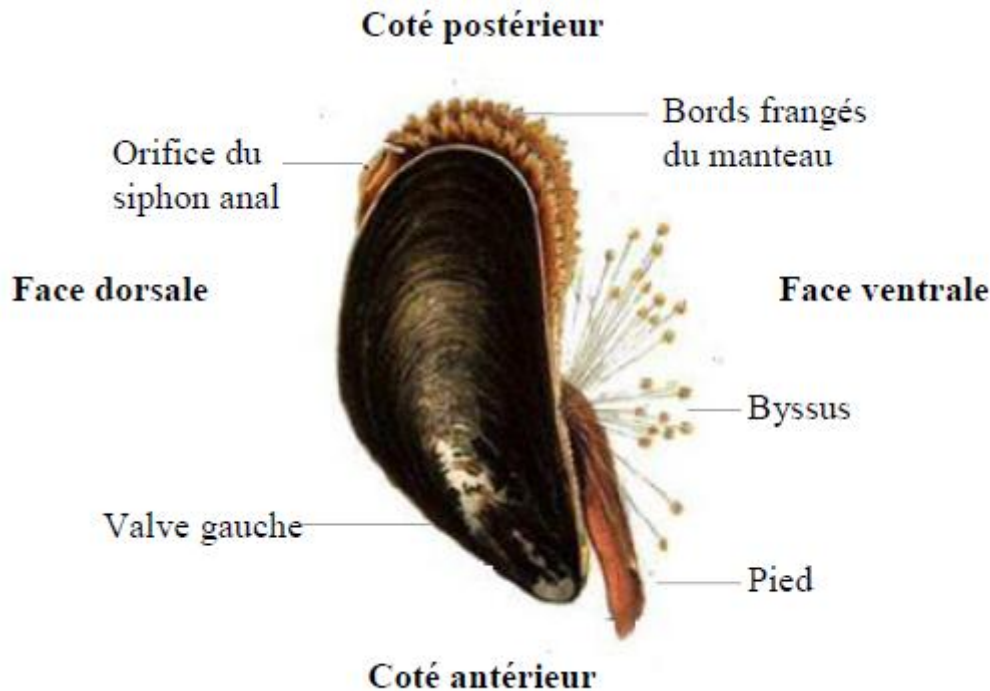


Figure 1 : Morphologie externe de la moule *Mytilus galloprovincialis* (in Rouane-Hacene, 2013).

I.1.2.1 La coquille :

Est composée à 95% de carbonate de calcium (Morgane Bachelot, 2010). Elle est sécrétée par la face extérieure et le bord libre du manteau elle est formée de trois parties distinctes, de l'extérieur vers l'intérieur : le périostracum, la couche des prismes et la nacre (Grasse et Doumenc, 1998). Dans les conditions normales la coquille montre des fines stries d'accroissement concentriques qui se forme en toutes saisons (Gagnaire, 2005). Et toute perturbation externe (température, apports trophiques) ou interne (reproduction) entraîne un arrêt de la croissance qui se manifeste par une discontinuité de la coquille (Gagnaire, 2005).

I.1.2.2 Le manteau :

Il présente deux lobes qui adhèrent étroitement au corps dans la région dorsale, il est d'une couleur qui va du blanc au jaune plus ou moins foncé. Le manteau joue un rôle dans la circulation de l'eau au niveau des branchies, il participe à la respiration, il assure la formation de la coquille, sa calcification et la sécrétion du ligament (Marteil, 1976).

I.1.2.3 Le byssus :

C'est des filaments protéiques qui assurent la fixation, se disposent en faisceau, qui durcit au contact de l'eau et se collent au substrat par leur extrémité élargie en lentille (Beaumont et Cassier, 2004).

I.1.2.4 Le pied :

Le pied est une saillie musculaire située au-dessous de la masse viscérale. Sa grande mobilité est due à l'existence de deux systèmes de faisceaux musculaires (Marteil, 1976).

I.1.3. Physiologie de la moule « *Mytilus galloprovincialis* » :

I.1.3.1. Alimentation :

La moule est un consommateur microphage omnivore. Elle se nourrit de phytobenthos (diatomées), de phytoplancton et de débris organiques (Utting et Millicon, 1997). La moule filtre jusqu'à 100 litres d'eau par jour; elle est capable d'opérer un tri concernant la nature et la taille des particules qu'elle ingère dont le diamètre est comprise entre 3 et 13 micromètres. (Bachelot, 2010).

I.1.3.2. Excrétion :

Comprend deux reins, disposés de chaque côté du corps entre le péricarde et le muscle adducteur postérieur et des glandes péricardiques auriculaires qui sont particulièrement développées chez la moule et entourent les oreillettes.

I.1.3.3. Respiration :

Les échanges d'oxygène se font par l'intermédiaire des branchies. L'eau chargée en oxygène dissous pénètre dans la cavité palléale via le siphon inhalant. Elle est filtrée par les filaments des deux paires de branchies lamelleuses avant d'être évacuée par le courant exhalant. Lorsque la moule se retrouve à l'air libre, elle ferme sa coquille et passe à une respiration anaérobie (Cahen, 2006 ; Rouane-Hacene, 2013).

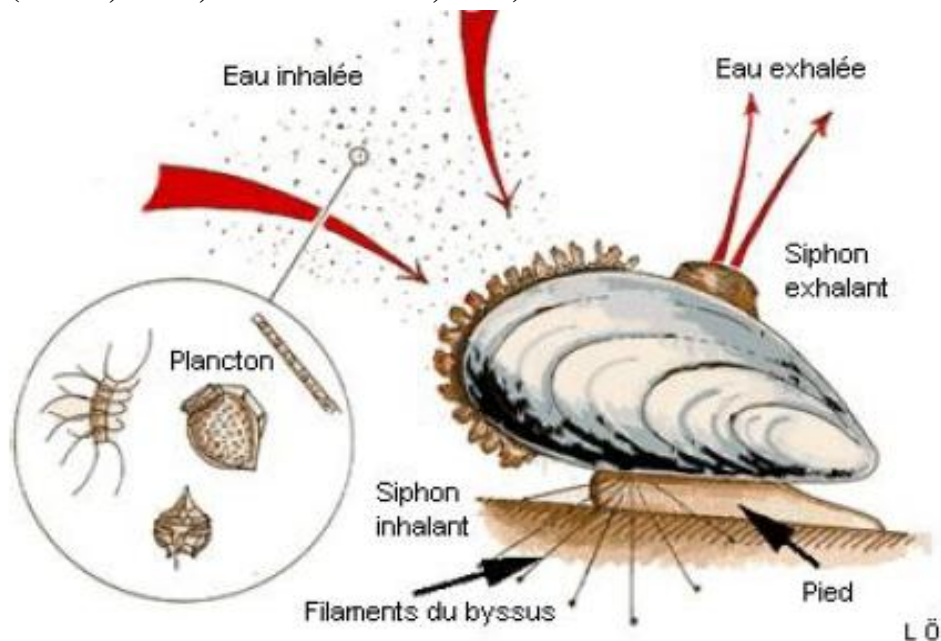


Figure 2 : système respiratoire chez la moule (MPO, 2003 in Rouane-Hacene, 2013)

I.1.4. Système nerveux :

C'est un système rudimentaire représenté par trois paires de ganglions.

I.1.5. Reproduction :

La moule est sexuellement différenciée. Pendant la période de reproduction, les ovules de la femelle sont libérés dans la cavité palléale où ils sont fécondés par les spermatozoïdes. Ces derniers, déversés dans l'eau par les individus mâles, sont entraînés dans la cavité de la

femelle par la circulation d'eau entraînant. La fécondation est donc externe. Donne des œufs très nombreux (environ 500 000). (Cahen, 2006 in Rouane-Hacene, 2013).

I.1.6. Ecologie :

Cet animal grégaire et sessile vit sur le Sable ou les rochers de l'estran ou la sub-surface. Elle résiste aux courants, aux chocs des vagues et à l'arrachement grâce aux solides filaments du byssus qui sont soudés au rocher. Elle est pourtant capable de se déplacer après avoir rompu une partie des filaments du byssus et avoir déposé un peu plus loin sur le rocher de nouveaux filaments grâce auxquels elle se hale. La moule est résistante, elle est capable de supporter une longue émergence grâce à une réserve d'eau entre les deux valves.

I.1.7. L'utilisation de la moule en biosurveillance environnementale :

Les mollusques, en particulier les bivalves sont des modèles d'intérêt estimé la qualité des écosystèmes côtiers dans plusieurs programmes de surveillance. La moule *Mytilus galloprovincialis* présente des caractéristiques lui conférant l'image model d'un bio-indicateur en raison de (Rouane-Hacene, 2013) :

- Leur faculté d'accumuler des contaminants présents dans l'environnement dans un facteur de concentration de l'ordre 10^3 à 10^5 par rapport à l'eau environnante sans subir d'effets létaux ;
- Leur large répartition géographique ;
- Leur mode de vie sessile et euryhalin, ce qui leur permet de filtrer la nourriture et peut accumuler un haut niveau de contaminants.
- Leur tolérance à différents stress ;
- La possibilité de travailler sur différentes classes d'âge car il ya apparition des jeunes individus de 1 à 10 mm durant toute l'année car la reproduction est en continue.
- Faciles à échantillonner et importants du point de vue économique.
- Ils sont exposés aux fluctuations physico-chimiques de l'environnement (T° , Salinité, contaminants chimiques, etc.) sans possibilité de fuite.
- Leur consommation par l'homme les présentes comme vecteurs de contamination. C'est pourquoi les moules sont très largement utilisées dans des programmes de surveillance visant à établir la variabilité spatiale et temporelle des contaminants de l'environnement côtier.

I.1.8. Les germes indicateurs de la salubrité de la moule

I.1.8.1. Les coliformes totaux

Les coliformes sont utilisées depuis très longtemps comme indicateurs de la qualité microbienne parce qu'ils peuvent être indirectement associés à une pollution d'origine fécale.

Les coliformes totaux sont définis par l'organisation internationale de standardisation (ISO), comme étant des bactéries en forme de bâtonnet, non sporogènes, Gram négatifs, oxydase négatifs, facultativement anaérobies, capable de croître en présence de sels biliaries ou d'autres agent de surface possédant des activités inhibitrices similaires, et capable de fermenter le lactose (et le mannitol) avec production d'acide et d'aldéhyde en 48heurs, à des

températures de 35-37°C. Les principaux genres inclus dans le groupe sont : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, et *Serratia*, (Rodier et al, 2005)

I.1.8.2. Les coliformes fécaux

Les coliformes fécaux, ou coliformes thermotolérants, sont un sous-groupe des coliformes totaux possédant les mêmes caractères cités précédemment et sont capables de fermenter le lactose à une température de 44,5°C (Rodier et al, 2005). L'espèce la plus fréquemment associée à ce groupe bactérien est *Escherichia coli* (80-90% des thermotolérants détectés), et dans une moindre mesure, certaines espèces des genres *Citrobacter*, *Enterobacter*, et *Klebsiella*. Bien que la présence de coliformes fécaux témoigne habituellement d'une contamination fécale, mais plusieurs coliformes fécaux proviennent des matières organiques tels que les effluents industriels du secteur des pâtes et papiers ou de transformation alimentaire (Barthe et al, 1994 ; OMS, 2000).

I.1.8.3. Escherichia coli

Le genre *Escherichia* fait partie de la famille des entérobactéries et comprend cinq espèces dont une seule, *Escherichia coli*, est utilisée à titre d'indicateur de la qualité des eaux. La presque totalité des souches d'*E. coli* ne sont pas pathogènes puisque cette bactérie est un hôte normal de l'intestin des mammifères (Rice, 1999). Par ailleurs, parmi les coliformes fécaux, *E. coli* est le seul qui soit sans équivoque toujours d'origine fécale et, à ce titre, il est de plus en plus considéré comme l'organisme indicateur spécifique d'une pollution fécale (Edberg et al, 2000).

Certains *E. coli* sont considérés pathogènes et sont regroupés dans deux grands groupes :

- les *E. coli* intestinales
- les *E. coli* extra intestinales

Parmi les *E. coli* à l'origine de pathologies intestinales, principalement de diarrhées, le CNR (Centre National de Référence) propose la classification suivante :

- les ***E. coli* enterotoxinogènes, ETEC***, dont la pathogénicité est liée à la sécrétion de deux types de toxine, une toxine thermostable ST et une thermolabile LT.
- les ***E. coli* entéropathogènes, EPEC***, dont la pathogénicité est liée aux lésions d'attachement/effacement (AE*), définies par un attachement de ces bactéries sur les cellules intestinales, et par un effacement des microvillosités, consécutif à une altération du cytosquelette.
- les ***E. coli* entérohémorragiques, EHEC***, qui induisent des colites hémorragiques chez l'homme, et qui, particulièrement chez les enfants, peuvent se compliquer en syndrome hémolytique et urémique SHU* (insuffisance rénale sévère pouvant nécessiter une dialyse ou une transplantation rénale)
- les ***E. coli* entéroinvasifs, EIEC***, à l'origine de syndromes dysentériques, et dont la pathogénicité est proche des *Shigella*. Ces *E. coli* ont acquis la capacité à envahir les cellules

épithéliales ce qui provoque des ulcérations de la muqueuse du gros intestin.

- les *E. coli* entéroaggrégatifs, **EAggEC*** caractérisés par un type d'adhésion aggrégative en « brique empilées », à l'origine de nécroses du pôle apical des villosités avec œdème inflammatoire et hémorragique de la sous muqueuse.

- les *E. coli* à adhérence diffuse, **DAEC***, qui ont acquis la capacité d'adhérer aux cellules Hep-2* et qui paraissent uniformément dispersés sur toute la surface des cellules épithéliales. Les *E. coli* à l'origine de pathologies intestinales ont en commun de se multiplier dans l'intestin de leurs hôtes. Ils se retrouveront donc dans les fèces et par la suite dans les effluents qui drainent ces fèces, à savoir :

- en élevage :

* les litières, les fumiers et les lisiers ;

* les eaux de ruissellement des locaux d'élevage, les eaux de ruissellement des pâtures ;

* les eaux de lavage.

A l'abattoir :

* les litières, fumiers et lisiers des parcs de stockage des locaux antemortem ;

* les matières stercoraires, définies comme le contenu du tube digestif des animaux abattus et toutes les eaux de lavage des viscères digestifs ;

* les eaux de lavage.

- pour les effluents d'origine humaine :

* les eaux usées rejetées au tout-à-l'égout en vue d'être traitées en station d'épuration ;

* les eaux des fosses septiques initialement étanches ;

* les eaux souillées qui s'écoulent librement (**Estelle, Marion Kern-Benaibout, 2006**)

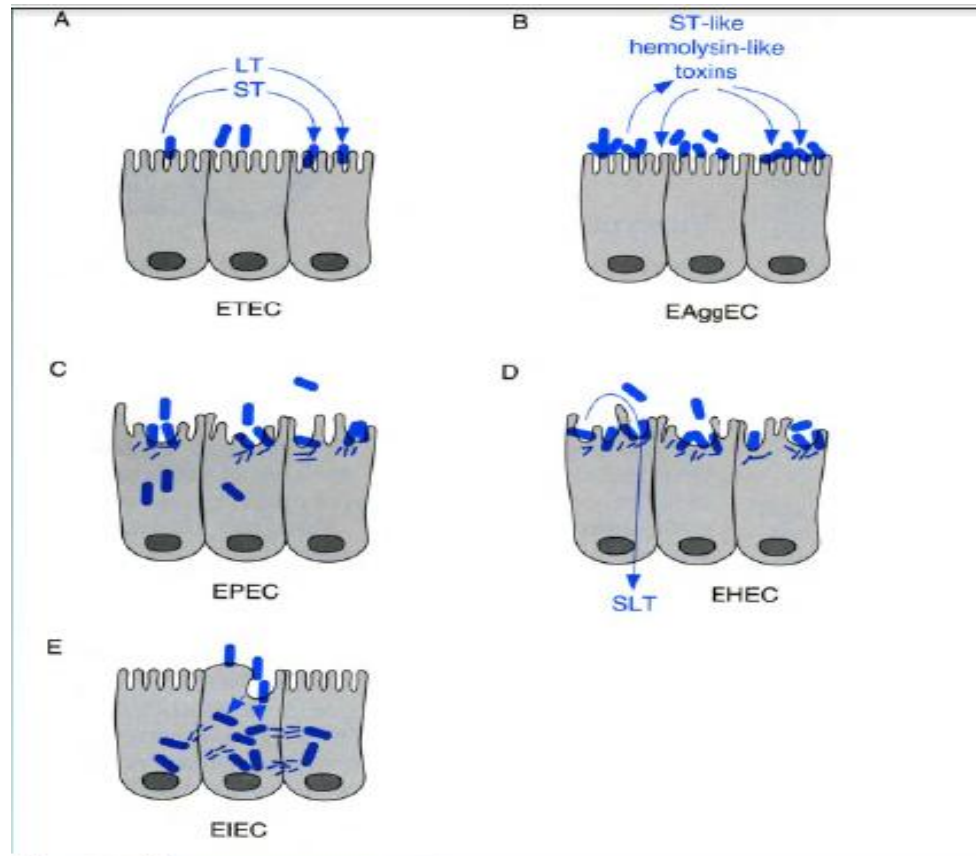


Figure 3: Les différents pathovars d'*Escherichia coli* (Jean-Marc Rolin, 2012)

Les *E. coli* à l'origine de pathologies Extra Intestinales (ExPEC*) ont acquis la capacité à dépasser les défenses immunitaires de leur hôte, et à se propager dans l'organisme. Ils peuvent induire chez leurs hôtes des infections du tractus urinaire (ITU). Ils posent problème autant en médecine humaine, (notamment à cause des multiples résistances acquises portées le plus souvent par des plasmides), qu'en médecine animale du fait des fortes pertes économiques induites, notamment en filière avicole.

I.2. Transferts horizontaux et supports mobiles de la résistance

I.2.1. Transferts de gènes

Les premiers phénomènes de transferts de gènes horizontaux ont été découverts par Griffith (1928) qui démontra expérimentalement qu'en co-injectant à des souris deux souches de pneumocoques (*Streptococcus pneumoniae*), des pneumocoques non virulents avaient acquis la virulence de l'autre souche de pneumocoques (initialement virulents). Le phénomène de transformation fut ensuite clairement identifié par Oswald (1944) comme responsable de ce transfert de gènes. Suivirent ensuite l'identification des transferts médiés par les virus (transduction), d'éléments transposables (transposition) et les plasmides (conjugaison) (Figure 4) (Bonot, 2010).

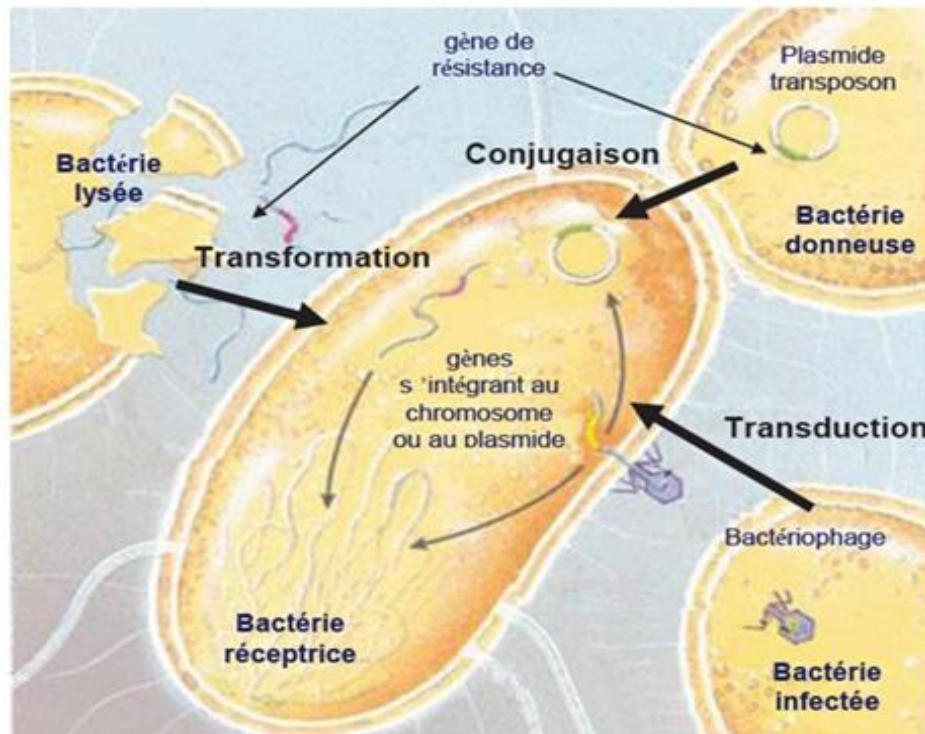


Figure 4 : Représentation schématique des différents mécanismes de transfert de gène
(in Stéphanie, 2009).

I.2.1.1. La transformation bactérienne

La transformation correspond à l'incorporation d'un ADN extracellulaire, linéaire ou circulaire, que la bactérie compétente a acquis dans son environnement proche (Dubnau, 1999). Ces ADN extracellulaires ont été soit libérés par la lyse cellulaire soit de particules virales. L'état de compétence est limité dans le temps et il est induit en réponse à des conditions environnementales spécifiques (stress nutritif, altération des conditions de croissance, densité cellulaire, présence d'antibiotique, ...) variables selon l'espèce et la souche bactérienne considérée (Bonot, 2010).

I.2.1.2. La transduction

La transduction est un phénomène qui a été mis en évidence par Zinder et Lederberg (1952) chez *Salmonella typhimurium*. Elle consiste en l'acquisition de séquences d'ADN par la bactérie suite à une infection par un bactériophage. On distingue la transduction généralisée : c'est l'encapsulation d'un fragment d'ADN lors de la lyse cellulaire et la transduction spécialisée qui concerne les phages tempérés qui en se désintégrant du génome bactérien prennent quelques gènes (Zaneveld *et al.*, 2008).

I.2.1.3. La conjugaison bactérienne

La conjugaison est le mode habituel de transfert des plasmides chez les bactéries à Gram (-) Entre espèces voisines ou différentes. La figure 5 illustre les échanges que l'on peut avoir entre les différents genres bactériens du tube digestif.

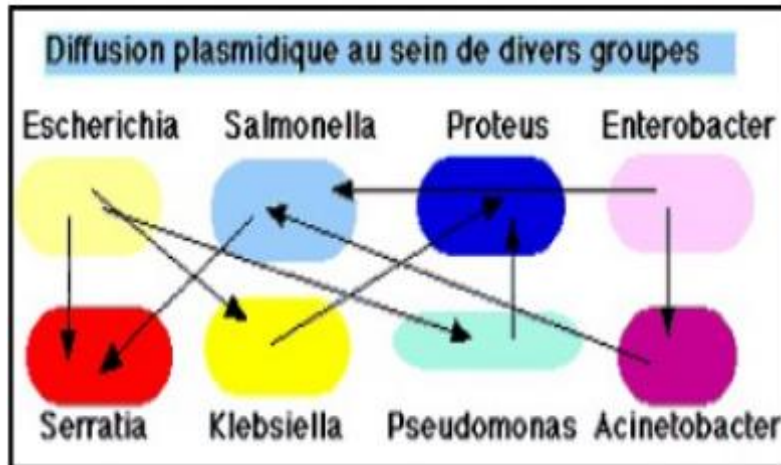


Figure 5 : Illustration d'un transfert plasmidique chez des bactéries (Gram -)
(C.Carrière, 2007)

Parmi tous les mécanismes intervenant dans les transferts horizontaux de gènes entre bactéries, la conjugaison est considérée comme étant le plus important et le plus efficace. La conjugaison est le transfert d'un plasmide d'une souche bactérienne appelée donatrice ou F^+ vers une autre souche bactérienne appelée réceptrice ou F^- , grâce à un pont cytoplasmique formé par le pilus sexuel. La souche donatrice conserve une copie du plasmide et donne une copie à la cellule réceptrice. Le plasmide réceptionné peut rester libre dans la cellule qui deviendra une cellule F^+ ou peut s'intégrer au chromosome de la bactérie qui deviendra Hfr^+ (Figure 6).

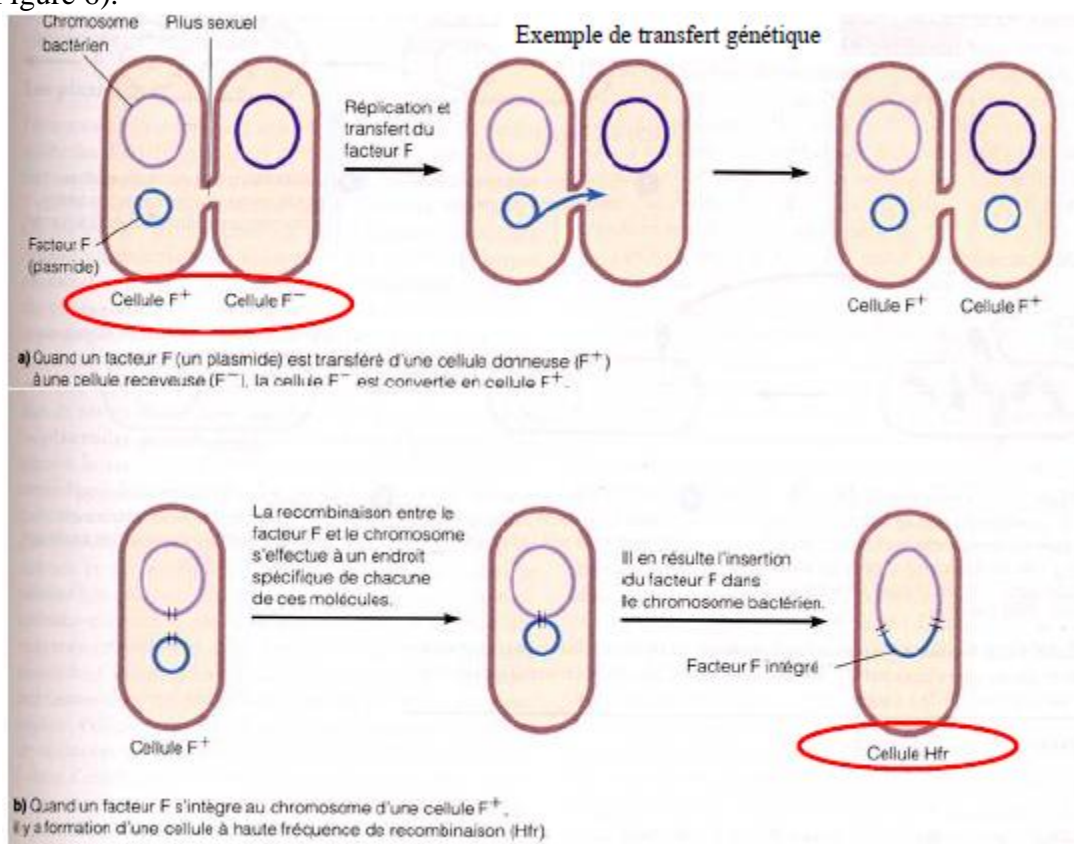


Figure 6 : Mécanisme de conjugaison bactérienne (Stéphanie Corvec, 2009)

I.2.2. Les supports mobiles de la résistance

I.2.1. Les plasmides

Les plasmides sont des molécules d'ADN bicaténaire, circulaires et cytoplasmiques, de petite taille (5 à 4000 fois plus petit que le chromosome), se répliquant d'une manière autonome et non indispensables au métabolisme normal de la cellule-hôte. Leur transmission d'une cellule bactérienne à une autre peut s'effectuer par conjugaison (Tra+) ou transformation.

Le terme de plasmide a été créé en 1952 par Lederberg pour désigner tout élément génétique cytoplasmique, comme le facteur F. Les plasmides de résistance aux antibiotiques ont été découverts en 1956 au Japon à l'occasion d'une épidémie de dysenterie bacillaire (*Shigella dysenteriae*) à bacilles résistant (Prescott *et al.*, 2002).

I.2.2. Transposons et intégrons

Les intégrons, système de 3 éléments : le gène *intI* codant pour une intégrase, un promoteur, et un site de recombinaison *attI* sont considérés comme le support de nombreux gènes de résistance aux antibiotiques (Fluit et Schmitz, 2004 ; Mazel, 2006). C'est un système qui facilite la capture, le transfert et l'expression de cassettes de gènes.

Les transposons sont des éléments qui sont capables de se déplacer d'un réplicon à un autre. Cependant, pour être transférés d'une cellule à une autre, ces éléments doivent être associés à des éléments génétiques mobile (plasmides, les phages, ou les transposons conjugatifs).

Les éléments transposables se composent à minima d'un gène codant pour une transposase (enzyme assurant la transposition de l'élément mobile) et de séquences inversées répétées bordant l'élément en plus de gènes qui peuvent coder pour la résistance aux antibiotiques (Galimand *et al.*, 2005).

I.3. Les quinolones :

I.3.1. définition

Les quinolones sont des antibiotiques de synthèse chimique. En 1962, la première quinolone cliniquement significative, directement dérivée de la 7-chloroquinoline vit le jour : l'acide nalidixique, indiqué pour le traitement des infections du tractus urinaire par certains bacilles à Gram⁻. Par la suite, les chercheurs ont apporté plusieurs modification afin d'augmenter l'activité et d'élargir le spectre d'activité (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2010).

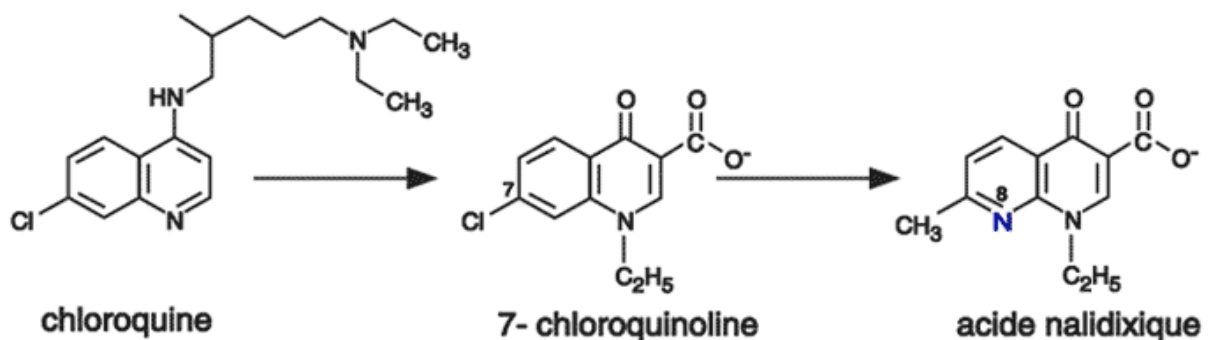


Figure 7: Structure de Chloroquine, 7-chloroquinoline et acide nalidixique (Tillotson, 1996)

L'acide nalidixique présente une substitution de l'atome de carbone en position 8 dans le noyau quinoléine par un atome d'azote, ce qui donne un noyau naphtyridine. Ce n'est que dans les années 80 que virent le jour les fluoroquinolones, après incorporation d'un atome de fluor en position 6 et un retour au noyau de type quinoléine. Ces composés ont montré une activité accrue envers les germes Gram(+).

De nombreux dérivés ont ainsi été développés : la norfloxacin (1986), la ciprofloxacine (1987), l'ofloxacine (1991), l'enoxacin (1992), la lomefloxacine (1992), la levofloxacine (1997), la sparfloxacine (1997), la trovafloxacine (1997), la gatifloxacine (1999), la moxifloxacine (1999), la gemifloxacine (2000)... (Tillotson, 1996).

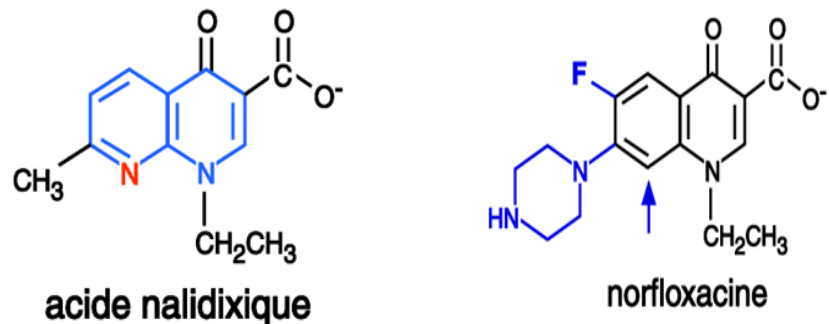


Figure 8 : structure de l'acide nalidixique et quelques dérivés.

La présence d'un atome d'azote au lieu d'un atome de carbone en position 8 (en rouge) transforme le noyau quinoléine en noyau naphtyridine (en bleu). Les fluoroquinolones se sont diversifiés tout en conservant une structure de base qui est soit le noyau quinolone ou le noyau naphtyridine (figure 9):

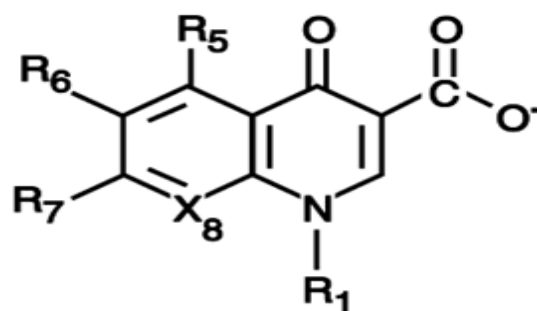


Figure 9 : structure de base des fluoroquinolones (Tillotson, 1996).

La présence d'une fonction acide carboxylique en position 3, ainsi que d'un atome d'oxygène exocyclique en position 4 sont nécessaires à l'activité de l'antibiotique et ces groupement ne sont jamais modifiés, tandis que l'addition d'un fluor en position 6 et d'un cycle diaminé en position 7 accroît très significativement l'activité par rapport aux dérivés originaux (Figure 6) (acide nalidixique).

Les modifications en position 6 donnent les quinolones de deuxième génération ex: norofloxacine, ciprofloxacine et levofloxacine, qui ont un spectre d'action plus large et sont actives sur les Gram+ et les pathogènes atypiques. Les modifications chimiques en position 1,

7, et 8 élargissent l'activité des molécules de 3^{ème} génération (ex moxifloxacine) aux anaérobies et améliorent leur activité contre les Gram+ (**Rodriguez-Martinez *al*, 2010**).

I.3.2. Le mode d'action des quinolones :

Du fait de leur bonne diffusion tissulaire, ces antibiotiques sont largement utilisés en médecine humaine et vétérinaire, notamment dans le cas d'infections urinaires et respiratoires.

Ces antibiotiques inhibent spécifiquement la synthèse d'ADN bactérien en agissant sur les topoisomérases de type II et IV. Les topoisomérases sont des enzymes dont la fonction est de réguler la topologie de l'hélice de l'ADN. La topoisomérase II, ou ADN gyrase est une protéine formée de deux sous unités: GyrA et GyrB. Le site catalytique de la gyrase (coupure et ressoudure de l'ADN) est centré sur la tyrosine en position 122 de GyrA.

La topoisomérase IV est responsable de la séparation des copies de l'ADN circulaire double brins. Elle est formée des sous-unités ParC et ParE (**Cambau, 1997**). Ces enzymes découpent les deux brins d'ADN, passent un autre segment d'ADN à travers la coupure, puis elles le referment (Figure 10) (**Cambau, 1997 ; Rodriguez-Martinez *et al*, 2010**).

Les quinolones ont des effets différents en fonction de leur concentration. A faible concentration, on assiste à un effet bactériostatique par l'inhibition des phénomènes de réplication et de transcription. A haute concentration, on observe un effet bactéricide dû à l'irréversibilité du complexe ADN-topoisomérase-quinolone formé (Figure 10), ce qui conduit à la fragmentation du chromosome bactérien et à l'induction du système de réparation SOS (**Cambau, 1997**).

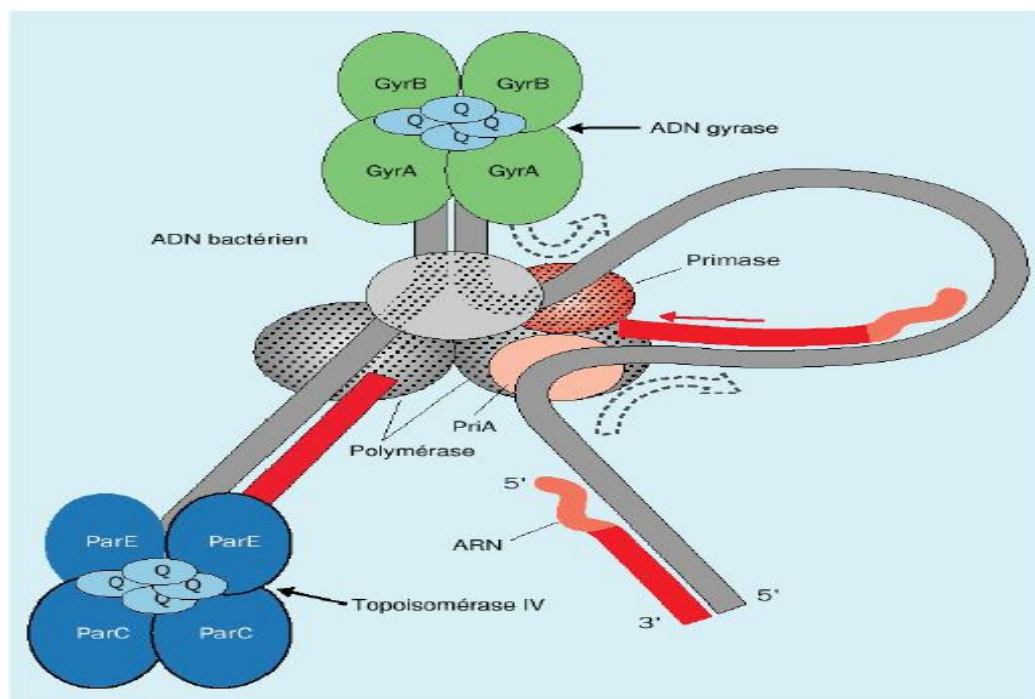


Figure10 : L'interaction entre les quinolones et le complexe ADN-ADN gyrase(**d'après Hooper ,2002.in Raphaël D ,2003**)

A très hautes concentrations, les quinolones pourraient provoquer la dissociation des sous-unités des Topoisomérases II ce qui entraînerait la libération de l'ADN doublement coupé. Cette réaction est insensible au chloramphénicol, n'impliquerait pas de néosynthèse de protéines (CAM-insensible) (Figure 11)

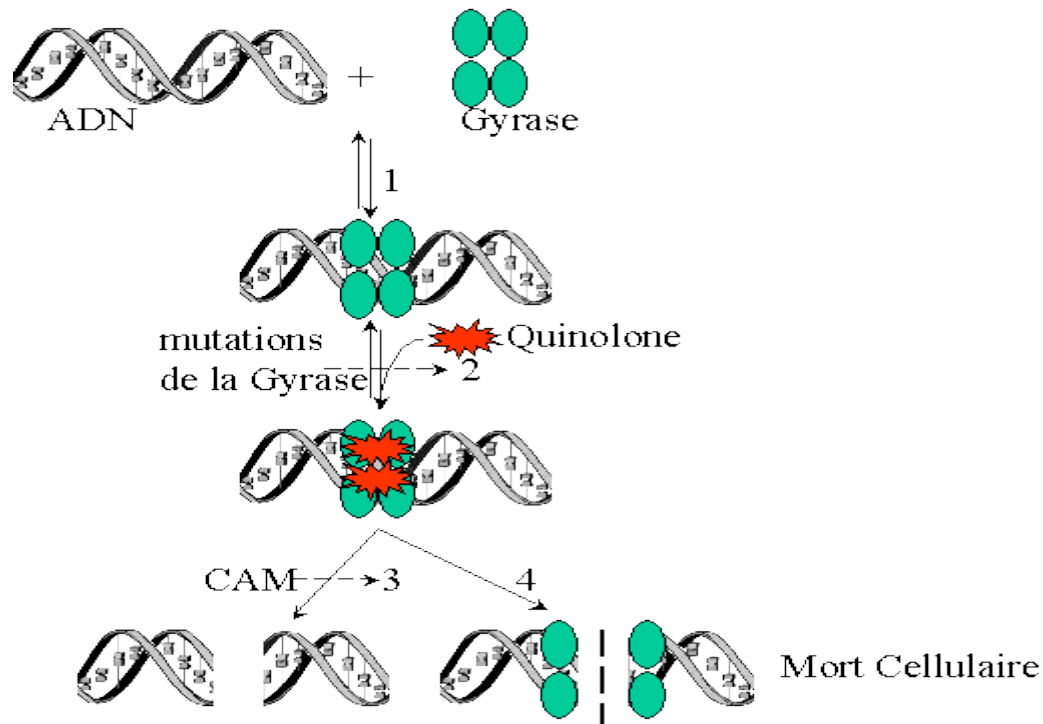


Figure 11: Effets des fluoroquinolones sur l'interaction Topoisomérases II-ADN (CAM, chloramphénicol ; d'après Drilica et Zhao)

I.3.3. Les mécanismes de résistances aux quinolones

Une souche bactérienne est dite résistante lorsqu'elle supporte une concentration d'antibiotique nettement supérieure à celle qui inhibe la majorité des autres bactéries de la même espèce. Elle apparaît suite à une mutation génétique aléatoire ou à un échange de gènes de résistances entre des bactéries (transformation génétique, transduction et conjugaison). Comme n'importe quel autre antibiotique, les bactéries ont développé des mécanismes de résistance (Figure12) (Cambau, 1997):

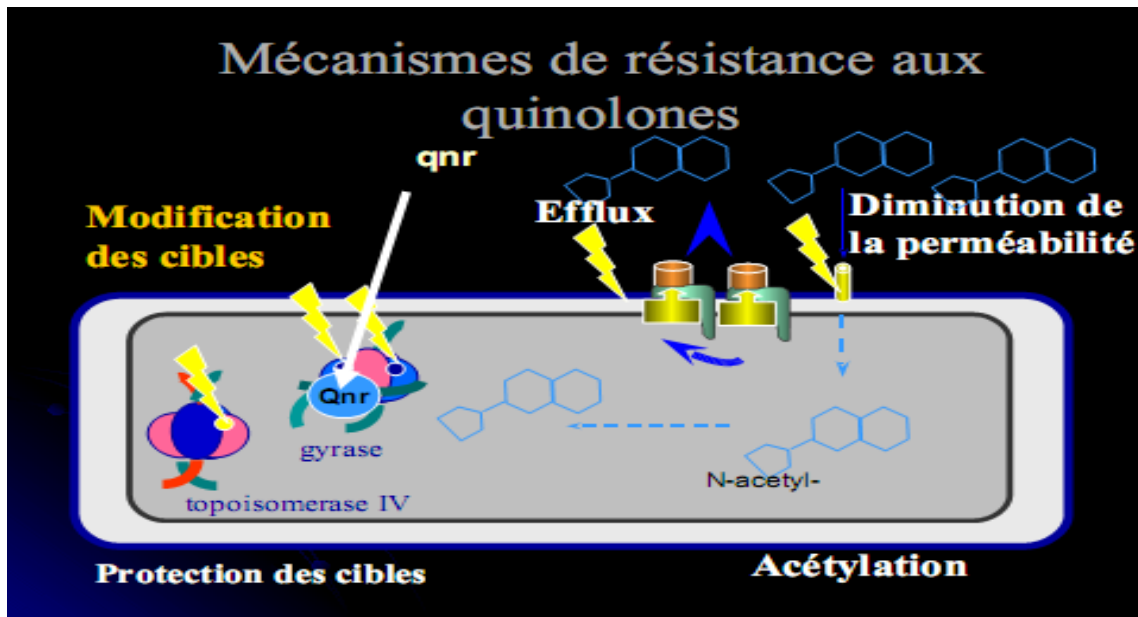


Figure 12: Mécanisme de résistance aux quinolones (Cambau, 2005).

I.3. 3.1. Mauvaise affinité de la cible

Chez les bactéries résistantes aux quinolones, l'ADN Gyrase est mutée et présente une faible affinité pour les quinolones. Ces mutations ne semblent pas perturber l'activité de l'ADN gyrase :

- Les mutations au niveau de GyrA, conférant la résistance aux quinolones sont situées dans un domaine de 40 acides aminés (entre acide aminé 67 et 106) appelé QRDR (quinolone résistance determining région), à proximité de la tyrosine 122 site d'attachement de GyrA à l'ADN.
- Dans la sous unité GyrB, les mutations dans deux acides aminés ont été impliquées dans la résistance aux quinolones : 426 et 447 chez E.coli .Ils existent également les mutations dans la région 23-177de la sous unité ParC et 420-467 dans la sous unité ParE (Cambau, 1997).

I.3.3.2. Protection de la cible :

C'est un mécanisme plasmidique très répandu mondialement. Il consiste en la production de protéine **Qnr** (A, B, S, C et D), protégeant l'ADN gyrase de la fixation des quinolones. (Cambau, 1997). Les protéines qnr appartiennent à la famille des protéines à motifs pentapeptidiques répétés (PRP) protéines constituées de séries de répétition en tandem de cinq aminosides. (Cambau. E & Guillard. T, 2012)

I.3.3.3. Acétylation

Il s'agit de AAC(6)-Ib-cr, un variant d'une aminoglycoside acetyltransferase qui confère en plus de la résistance à la tobramycine, amikacine et kanamycine, la résistance à la ciprofloxacine. Cet allèle diffère des autres AAC(6')Ib-cr par le changement de deux acides

aminés (Trp102Arg et Asp179Tyr). Cette enzyme est capable d'acétyler la ciprofloxacine au niveau de l'azote du noyau piperazine.

L'augmentation de la CMI conférée par AAC(6')Ib-cr est moindre par rapport à celle conférée par les protéines Qnr et elle est spécifique pour la ciprofloxacine et la norfloxacine. Cette enzyme est souvent associée aux autres déterminants génétiques de la résistance aux quinolones (QnrA, QnrB, and QnrS, QepA), aux beta-lactamases (CTX-M-1, CTX-M-14, DHA-1, SHV-12,...etc)...ect **Rodriguez-Martinez et al., 2010**).

L'inactivation des quinolones est un mécanisme qui n'existait pas avant la description du gène aac (6')-Ib-cr codant une aminoside 6'-N acétyltransférase plasmidique bi-fonctionnelle. ce gène est un variant du classique gène aac(6')-Ib qui donne une résistance à certains aminosides. L'enzyme aac-(6')-Ib-cr est caractérisé par deux mutations (Trp104Arg et Asp181Tyr) qui entraînent d'une part une diminution de la résistance aux aminosides mais aussi une résistance à la ciprofloxacine par N-acétylation du groupement amine du cycle pipérazinyl. (**Robicsek et al., 2006**).

I.3.3.4. L'imperméabilité

Plusieurs mécanismes impliquent les éléments de la membrane externe afin d'éliminer la concentration intracellulaire en antibiotiques. Chez *E.coli*, la porine OmpF est déterminante dans la pénétration des quinolones (**Cambau, 1997**).

I.3.3.5. Le système d'efflux

Les systèmes d'efflux sont des mécanismes de transport membranaire qui s'opposent à l'accumulation intracellulaire de divers substrats toxiques dont les antibiotiques. Ces pompes d'efflux sont composées par : un transporteur inséré dans la membrane cytoplasmique, une protéine située dans la membrane externe et une protéine de liaison périplasmique qui relie entre les deux autres protéines. Ce mécanisme d'efflux, qui présente une large spécificité de substrat concerne des classes d'antibiotiques aussi diverses que les tétracyclines, les bêta-lactamines, les quinolones, le chloromphénicol ou les macrolides (**Cavallo et al., 2004**).

En l'an 2002, il a été découvert une pompe d'efflux plasmidique, **QepA**, excréant les fluoroquinolones chez deux souches d'*E. coli* en Belgique et au Japon (**Rodriguez-Martinez et al, 2010**).

Ces mécanismes **plasmidiques** (Qnr, QepA, AAC (6')Ib-cr) confèrent un bas niveau de résistance aux fluoroquinolones, mais leur présence pourrait potentiellement favoriser l'évolution vers un plus haut niveau de résistance par la sélection de mutation dans les topoisomérases de type II. (**Cambau, 1997**).

Chapitre II

Matériel et méthodes

I. MATERIEL ET METHODES

I.1 Matériel biologique

Dans ce mémoire on s'intéresse à la caractérisation génétique de la résistance aux quinolones chez 25 souches de coliformes isolées en 2012 à partir de la moule *Mytilus galloprovincialis* d'élevage et sauvage (Bouich et Radja, 2012).

I.1.1 Description de la zone d'étude

- **La ferme conchylicole « SARL ORCA marine »**

Les moules d'élevage ont été récoltées de la ferme conchylicole ORCA marine précisément de Ain chrob (ex Surcouf) qui se trouve à 800 m au large dans la plage de la commune de Ain Taya wilaya d'Alger située en dehors de la baie d'Alger, à 30 km à l'est d'Alger.

- **Bordj EL Kiffan « Bateau cassé »**

Le site « Bateau cassé » d'où ont été prélevés des moules sauvages, est situé à Ford de l'eau, Bordj EL kiffan, à l'Est de la wilaya d'Alger, c'est une zone d'agglomération qui contient une plage de baignade qui se situe pas loin de l'embouchure de oued-el Hamiz.

Les caractéristiques microbiologiques des échantillons de moules récoltées sont regroupés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Les caractéristiques bactériologiques des moules récoltées (Radja et, Bouich 2012)

Les bactéries ont été isolées à partir du liquide intervallaire des moules leur caractéristiques sont résumées dans le tableau 1

Germe	Moule d'élevage	Moule sauvage	Norme
<i>E.coli</i>	< 90 NPP /100g	< 90 NPP /100g	230 cellules /100g de chair et de liquide intervallaire
Coliformes fécaux	2250 NPP /100g	>72000 NPP /100g	300 cellules et ne doit jamais dépasser 1000 cellules /100g de chair et de liquide intervallaire
Coliformes totaux	33000 NPP /100g	>72000 NPP /100g	-
Salmonella	Absence	Absence	Absence dans 25g de chair et de liquide intervallaire

II Méthodes

II.1. Identification biochimique bactériennes par galerie API 20 E

La galerie API 20E est un système d'identification des entérobactéries et autres bacilles à Gram négatif. Elle comporte 20 tests biochimiques standardisés et miniaturisés. Les milieux desséchés sont réhydratés avec une suspension bactérienne à identifier. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (Biomérieux).

-Technique

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau distillée dans les alvéoles afin de créer une atmosphère humide.
- Retirer la galerie stérile de son emballage et la déposer dans la boîte d'incubation.
- Ecrire nom, référence de la souche et date sur la languette latérale du fond de la boîte.
- Préparer l'inoculum bactérien : mettre 1 à 3 colonies jeunes bien isolées dans 5 ml d'eau distillée stérile,
- Inoculer la galerie comme suit :
 - Remplir à l'aide d'une micropipette les tubes et cupules des tests (CIT, VIP et GEL).
 - Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests.
 - Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LCD, ODC, H₂S, URE en remplissant leur cupule d'huile de vaseline.
- Refermer la boîte d'incubation et la placer dans l'étuve à 37°C pendant 18-24h.
- Le test d'oxydase est réalisé par le dépôt d'un inoculum bactérien sur le disque d'oxydase. La présence du cytochrome oxydase se traduit par l'apparition d'une coloration violette.

- Lecture de la galerie

Après codification des réactions en un profil numérique, l'identification est obtenue en se référant à un catalogue analytique fourni par Biomérieux où l'identification est donnée avec un pourcentage et une appréciation (Biomérieux).

II.2. Diffusion en milieu gélosé : antibiogramme

L'étude de la résistance de nos souches vis-à-vis de 4 antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu solide (Courvalin, 1985 ; CA-SFM, 2011).

-Principe

Cette technique est basée sur l'observation de la croissance bactérienne en présence d'un gradient de concentration d'antibiotiques, obtenu par diffusion à partir des disques d'antibiotiques dans un milieu gélosé (Muller Hinton). Ce gradient est inversement proportionnel à la distance par rapport aux disques. La croissance s'arrête lorsque les bactéries sont en contact avec leur concentration minimale d'inhibition dessinant des halos d'inhibition autour des disques d'antibiotiques (Courvalin et al, 1985).

-Technique

- A partir d'une culture jeune (18-24h), préparer dans 5ml d'eau physiologique stérile une suspension bactérienne de 0,5McFarland (10^8 cellules/ml),
- Ajuster l'inoculum à 10^7 cellules/ml.
- Plonger un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne de 10^7 cellules/ml.
- Ensemencer la boîte en frottant l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée et en tournant la boîte trois fois de 60° afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum.
- Appliquer les disques d'antibiotiques (Tableau8) selon le schéma de la (Figure13).
- Laisser diffuser pendant 15 minutes, à température ambiante,

Incuber à 35°C pendant 18-24h

-Lecture

Mesurer avec précision les diamètres d'inhibition à l'aide d'une règle graduée et classer les bactéries dans l'une des catégories : sensible (S), intermédiaire (I) ou résistant (R) selon les valeurs critiques (CA-SFM, 2011)

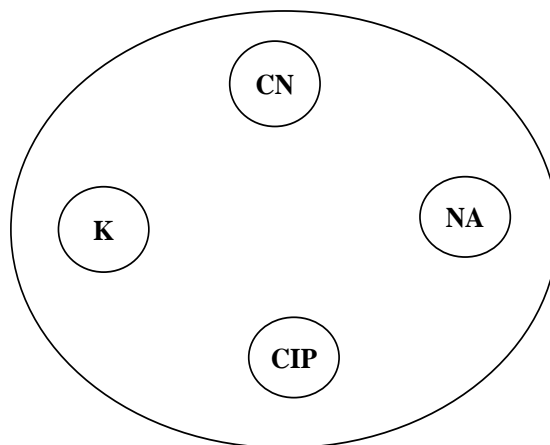


Figure 13 : Schéma de la disposition des antibiotiques des antibiotiques

Tableau 2 : Les différents antibiotiques en disque utilisés pour l'antibiogramme

Famille	Antibiotiques	Charge (µg)	Abréviation
Quinolones	Acide nalidixique	30	NA
	Ciprofloxacine	5	CIP
Aminosides	kanamycine	30 UI	K
	gentamicine	30	CN

II.3. Recherche des gènes de résistance aux quinolones par PCR

Le but de cette étude a été d'évaluer et de caractériser les mécanismes génétiques plasmidique de la résistance aux quinolones retrouvées chez 25 souches isolées à partir d'un site d'élevage et sauvage.

-Principe de la PCR classique :

La **PCR** est une technique basée sur l'hybridation spécifique des amorces avec le gène recherché. Elle permet l'amplification *in vitro* une partie spécifique d'un acide nucléique donné (ADN ou ARN) afin d'en obtenir une quantité suffisante pour détecter le fragment cible balisé par ces deux amorces.

Le processus nécessite la succession d'un certain nombre de cycles (20-40), chaque cycle comporte les étapes suivantes :

- La dénaturation de l'ADN à 94°C.
- L'hybridation : fixation des amorces de part et d'autre du fragment à amplifier (40-60°C).
- L'élongation : la synthèse du brin d'ADN est assurée par la Taq polymérase à 72°C, en respectant la complémentarité des bases.

- Principe de la PCR multiplexe :

Est une technique de biologie moléculaire généralisée pour l'amplification de cibles multiples dans une expérience unique PCR. Dans un dosage de multiplexage, plus d'une séquence cible peut être amplifiée par l'utilisation de plusieurs paires d'amorces dans un mélange réactionnel. Dans le prolongement de l'utilisation pratique de la PCR, cette technique a le potentiel de réaliser des économies considérables en temps et en effort dans le laboratoire sans compromis sur l'utilité de l'expérience.

- Technique

- Extraction de l'ADN total

- Préparer l'inoculum bactérien : 3 à 4 colonies dans 50µl d'eau distillée stérile;
- mettre l'inoculum a 100°C pendant 10mn pour la lyse;
- centrifuger à 12000trs/min pendant 3mn;
- récupérer le surnageant;

- Recherche de la présence des gènes Qnr (A,B,S) par PCR multiplexe

La résistance aux quinolones est de type plasmidique pour les gènes Qnr, les protéines qnr agissant en protégeant les topoisomérase de l'action des quinolones.

- mettre dans des micro tubes 5µl d'ADN additionné de 20µl du mélange réactionnel
- mettre dans l'appareil à PCR pour l'amplification en appliquant le programme Correspondant : 10min à 95°C, 35cycles de 95°C pendant 1min, 54°C pendant 1 min et 72°C pendant 1min. une élongation finale à 72°C pendant 10min.

✓ Le mélange réactionnel (25µl)

PCR master Mix (2X) (promega).....	12.5µl
Amorce QnrAm F	0.4 µl
Amorce QnrAm R	0.4 µl
Amorce QnrBm F.	0.4 µl
Amorce QnrBm R	0.4 µl
Amorce QnrSm F	0.4 µl
Amorce QnrSm R	0.4 µl
H ₂ O.....	5.1µl
ADN.....	5µl

- Recherche d'aac-(6')-Ib par PCR simplexe

La recherche du gène aac-Ib a été effectuée dans un volume réactionnel de 12,5µl :

PCR master Mix (2X) (promega).....	6.25µl
Amorce Aac(6')-Ib F	0.25 µl
Amorce Aac(6')-Ib R	0.25µl
H ₂ O.....	3.25µl
ADN.....	2 µl

Tableau 3 : Les séquences des amorces des gènes recherchés par PCR (**Park et al., 2006**)

Gène	Amorce	Taille du fragment	Température d'hybridation	Référence
<i>aac (6')-Ib</i>	Aac(6')-IbF : TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA Aac(6')-IbR : CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	482pb	94°C /10min 34 cycles : 94°C/45sec 55°C/45sec 72°C/45sec 72°C/10min	Park et al., 2006

- Recherche du QepA par PCR Simplexe

La recherche du gène QepA a été effectuée dans un volume réactionnel de 12,5µl :

PCR master Mix (2X) (promega).....6.25µl
 Amorce Qep F0.25 µl
 Amorce Qep R0.25µl
 H₂O..... 3.25µl
 ADN.....2.5µl

Le programme utilisé est : 96°C for 1 min, 30 cycles de 96°C pendant 1 min, 60°C pendant 1 min, et 72°C pendant 1 min. une élongation finale à 72°C pendant 5 min.

Tableau 4: Les séquences des amorces utilisées (**Cattoir et al., 2007 ; Yamane et al., 2008**)

Gène	Amorce	Taille du fragment	Température d'hybridation
Primers	Sequence 5'-3'	Taille de l'amplifiat	C°
QnrAm-F QnrAm-R	AGAGGATTTCTCACGCCAGG TGCCAGGCACAGATCTTGAC	580pb	54
QnrBm-F QnrBm-R	GGMATHGAAATTCGCCACTG TTTGCYGYCYGCCAGTCGAA	264pb	72
QnrSm-F QnrSm-R	GCAAGTTCATTGAACAGGGT TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	428pb	72
QEPA-F QEPA-R	GCA GGT CCA GCAGCG GGT AG CTT CCT GCC CGAGTA TCG TG	199pb	72

II.2.2.7. Electrophorèse sur gel d'agarose :

Les produits d'amplification sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose (20X10cm) de 2% pour les Qnr et 1% pour le gène QepA et aac-Ib, sous une tension de 90V pendant 20minutes. La visualisation se fait sous UV en utilisant le bromure d'ethidium (0,5µg/ml).

Cette méthode a pour principe la séparation, l'identification et la purification de l'ADN chargé négativement. La migration de l'ADN dans le gel d'agarose, soumis à un champ électrique dépend des paramètres suivants (**Sambrook et al., 1989**) : le poids moléculaire, la concentration d'agarose dans le gel, la conformation de l'ADN, le voltage appliqué et la composition du tampon d'électrophorèse.

Technique

- préparation d'un gel d'agarose(1 ou 2%) dans du tampon TBE 1X, additionné de bromure d'ethidium (0.5µg/ml);
- déposer l'échantillon à analyser dans le gel
- appliquer un champ électrique à un voltage de 5V/cm;
- visualiser l'ADN sous UV a 254nm.

Solution employée :

Tampon TBE 10X (pH 8,3, autoclave et conservé à température ambiante) :

- 890mM de tris base.
- 890mM d'acide borique.
- 19 mM d'EDTA.

Chapitre III

Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

L'origine de la résistance bactérienne aux antibiotiques dans l'environnement est la conséquence d'un usage abusif de ces molécules en médecine humaine et des pratiques vétérinaires. Une fois consommées, ces molécules sont excrétées sous formes peu métabolisées via l'urine et les matières fécales (Christian *et al.*, 2003). Ces bactéries peuvent contaminer par la suite l'homme et l'animal via différents écosystèmes notamment l'eau, et la chaîne alimentaire (Witte, 2000, Kummerer, 2004).

Dans notre travail nous nous sommes intéressés à la caractérisation génétique des mécanismes de résistance plasmidique aux quinolones, une famille d'antibiotiques puissante et un indicateur de la production de mécanismes de résistance acquis, chez des souches isolées à partir de la moule *Mytilus galloprovincialis*.

III.1. Identification bactérienne

Les résultats de l'identification biochimique par galerie API20 E des 25 souches isolées des moules ont révélé (Figure 14) la présence de 24 souches d'*E.coli* et une souche de *K.pneumoniae*. Cette dernière a été isolée à partir de la moule d'élevage. Ces résultats montrent la prédominance du genre *E.coli* par rapport aux autres coliformes chez la moule. Cette bactérie est un indicateur de contamination fécale apprécié dans la contamination microbiologique des zones de production conchylicole (Dominique *et al.*, 2008)

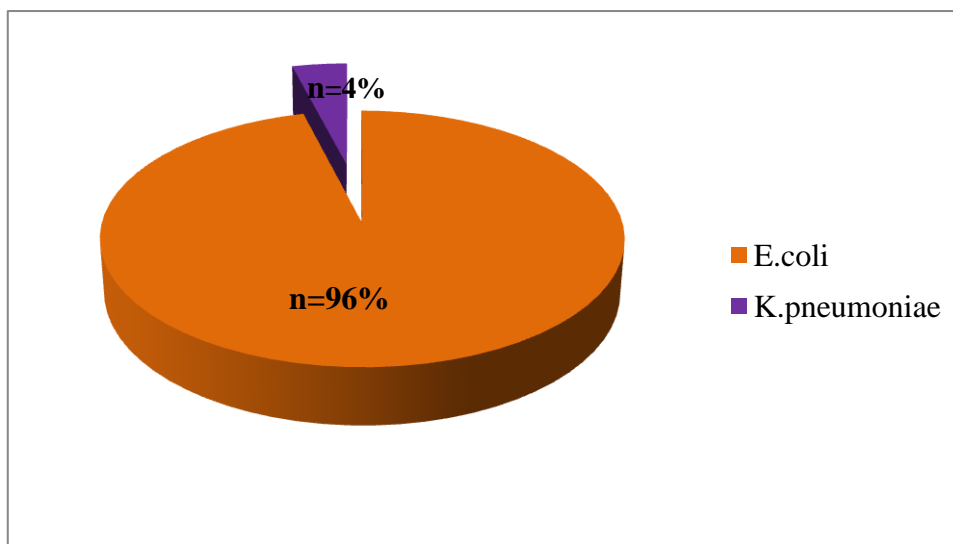


Figure 14 : Répartition des 25 souches selon leur identité bactérie

III.2. Résistance aux antibiotiques

La résistance de nos souches vis-à-vis de 4 antibiotiques dont 2 quinolones et 2 aminosides a été étudiée par la méthode de diffusion en milieu gélosé (CA-SFM, 2011). Les résultats sont illustrés dans les figures (15)

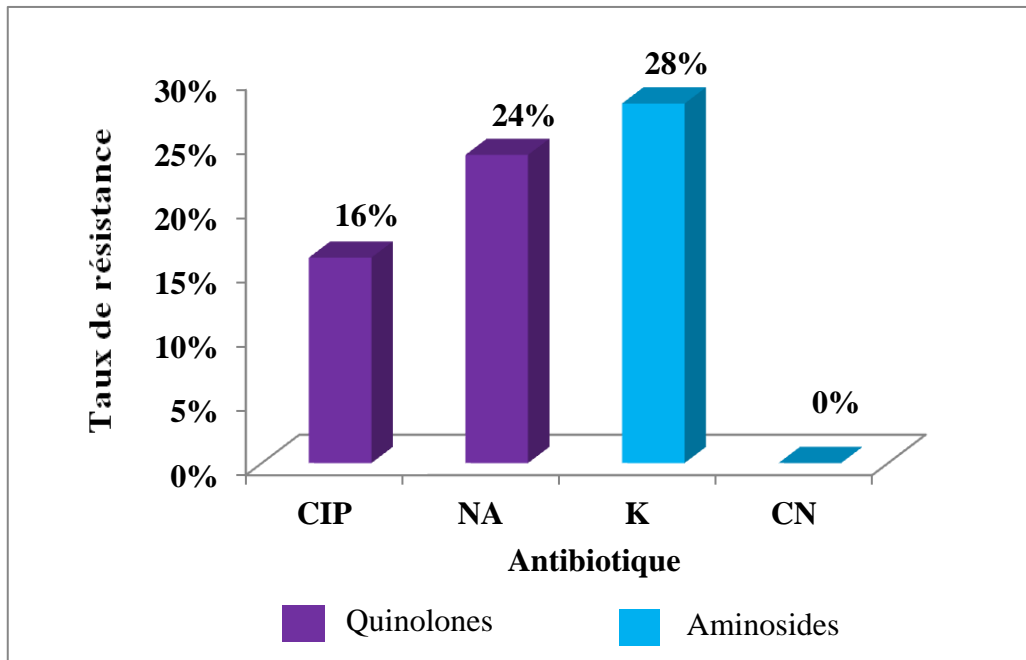


Figure 15 : Taux de résistance des 25 coliformes vis-à-vis des quinolones et des aminosides.

En ce qui concerne les quinolones un taux de résistance de 24% a été observé pour l'acide nalidixique, suivi par un taux de résistance de 16% pour la ciprofloxacine. Ces résistances sont de type acquis, qui apparaît chez des bactéries jusqu'alors sensibles à cette famille d'antibiotique (Cambau, 1997).

Tous les membres de la famille des quinolones ont le même mode d'action : inhibition des enzymes topoisomérase, GyrA et Topoisomérase IV. *E. coli* peut devenir résistante aux quinolones par l'altération des enzymes cibles, par diminution de la perméabilité de la cellule qui inhibe la pénétration des quinolones, ou par efflux actif de l'antibiotique hors de la cellule. Tous ces mécanismes de résistance peuvent jouer un rôle dans la résistance à haut niveau (Webber et Piddock, 2001).

Toutes les quinolones ayant le même mode d'action, la résistance à un antibiotique de cette famille entraîne une sensibilité diminuée à tous les autres antibiotiques de la même

famille. Il faut veiller à ce que les quinolones soient utilisées avec modération et avec pertinence étant donné que des souches d'*E. coli* hautement résistantes peuvent être sélectionnées et passer dans la chaîne alimentaire.

L'analyse des profils de résistance a montré que nos souches ont présenté des profils de résistance allant de 0 à 3 molécules, La majorité des souches sont sensibles à tous les antibiotiques, 4 ont été résistantes aux quinolones (NA et/ou CIP) et kanamycine, 1 résistante à l'acide nalidixique et 2 souches ont été résistantes à la kanamycine et 1 souche a été résistante à l'acide nalidixique et la kanamycine (Tableau 5). Ces profils de résistance acquise confortent l'hypothèse d'apport anthropique des bactéries résistantes aux antibiotiques dans le milieu conchylicole. En effet, des études consacrées à l'évaluation de la résistance ont été réalisées dans la zone de Ain Chrob entre la période de 2008 et 2009, ont rapporté la présence de bactéries multirésistantes et particulièrement la détection d'une *E.coli* productrice d'une BLSE (Chikh, 2008 ; Alouache et al., 2012).

Tableau 5 : Profils d'antibio-résistance des 24 *E.coli* et 1 *K.pneumoniae* isolés à partir de la moule *Mytilus galloprovincialis*.

Souche	Antibiotype	Nombre de résistances
<i>Escherichia coli</i> (E12), (S1), (S3),(S4),(E2), (E7), (E18),(S2),(E1), (E13), (E6), (S6),(E17),(S13),(S9),(S11),(E11)	-	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (E5)	-	0
<i>Escherichia coli</i> (S22)	NA	1
<i>Escherichia coli</i> (S12),(S16)	K	1
<i>Escherichia coli</i> (E11)	NA –K	2
<i>Escherichia coli</i> (E3), (S7),(S21), (E14)	CIP-NA-K	3

III. 3.Caractérisation génétique de la résistance aux quinolones

Afin de détecter la présence des PMQR (plasmid mediated quinolone resistance), on s'est intéressé dans cette étude à la recherche de trois mécanismes plasmidiques, il s'agit de la production des protéines Qnr (A, B, S) qui ont pour rôle de protéger la cible des quinolones qui sont l'ADN gyrase et la topoisomérase IV (**J Clin Microbiol, 2010**), de la présence d'un système d'efflux plasmidique nommé : QepA et la production d'une acétylase AAC-(6')-Ib capable d'inactiver l'antibiotique.

III.3.1. Détection de la production des protéines Qnr

Les résultats de la recherche des protéines qnr (A,B,S) par PCR multiplex ont révélé la présence du gène *qnrB* chez une seule souche d' *E.coli* (S6) (**Figure 17**) et le gène *qnrS* chez une autre souche d'*E.coli* (E1) (**Figure 16**). Ces souches ne présentent pas une résistance marquée aux quinolones, ceci corrobore les données de la littérature qui rapportent que les protéines Qnr ne confèrent pas un niveau très important de résistance aux quinolones mais permettent la sélection des souches résistantes. Ces protéines sont généralement associées à des mutations chromosomiques dans les topoisomérase afin de conférer un taux de résistance important (**Cambau, 1997**). Ce mécanisme de résistance acquis est fréquemment décrit chez les souches cliniques. En Algérie, les protéines qnrB1, B4 et qnrS1 ont été décrits chez les souches cliniques (**Iabadene et al., 2009**) et qnrB1, B19 et qnrS1 chez des souches isolées à partir des eaux usées d'une station d'épuration des eaux usées de Boumerdes et des effluents hospitaliers (**Anssour et al., 2013 ; Alouache et al., 2012 ; Alouache et al., 2013**)



Figure 16: Détection des gènes qnr A,B et S par PCR multiplexe chez des coliformes isolés à partir des moules. M : marqueur 100pb DNA ladder, C- : contrôle négatif, Qnr A, S et B : contrôle positifs. E1 : souche positive pour le gène *qnrS*

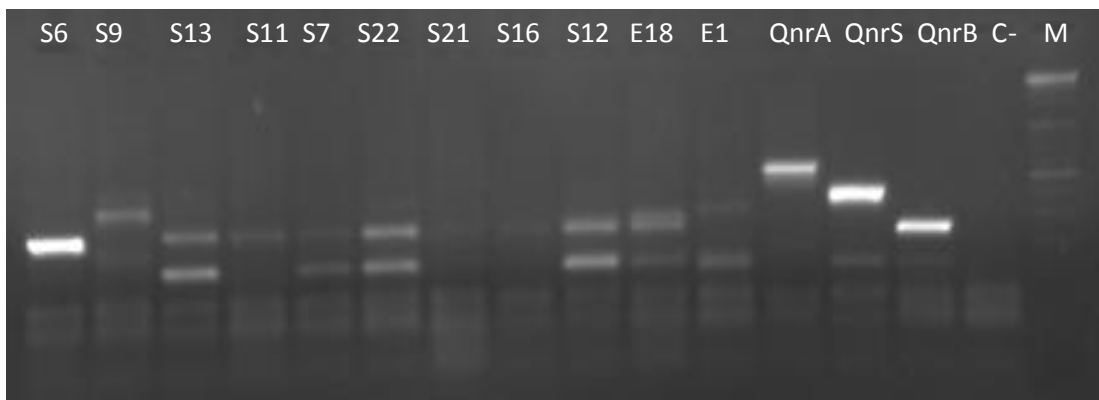


Figure 17: Détection des gènes qnr A,B et S par PCR multiplexe chez des coliformes isolés à partir des moules. M : marqueur 100pb DNA ladder, C- : contrôle négatif, Qnr A, S et B : contrôle positifs. S6 : souche positive pour le gène *qnrB*.

III.3.2. Détection de la présence du gène *qepA*

En ce qui concerne la recherche du gène *qepA*, aucune souche n’a été positive (**Figure 18**). Ce système d’efflux à médiation plasmidique est très rare. Il a été décrit en Belgique et au Japan (**Rodriguez-Martinez et al, 2010**).

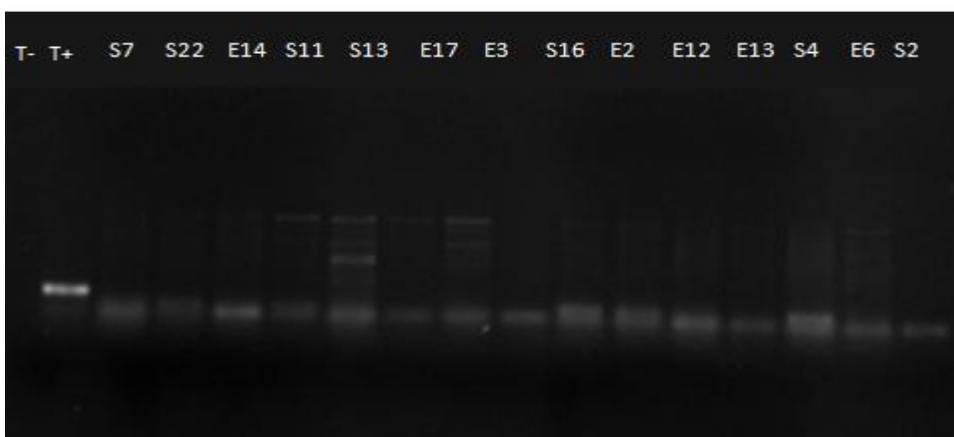


Figure 18 : illustration de la recherche du gène QepA par PCR. T- : Témoin négatif, T+ : témoin positif (199pb).

III.3.3. Recherche du gène *aac*-(6')-Ib

Le gène *aac*-(6')-Ib a été recherché par PCR simplexe chez toutes les souches. Il n'a pas été détecté chez aucune souche (**Figure 19**). Cette enzyme d'acétylation confère la résistance aux aminosides mais grâce à deux mutations supplémentaires détectées par séquençage, son spectre d'action est élargi aux fluoroquinolones. Ce mécanisme de résistance récemment découvert s'est largement propagé, il a été décrit en Algérie chez des souches d'*E.coli* cliniques (**Meradi et al.,**) et dans l'environnement (**Alouache et al., 2013**).

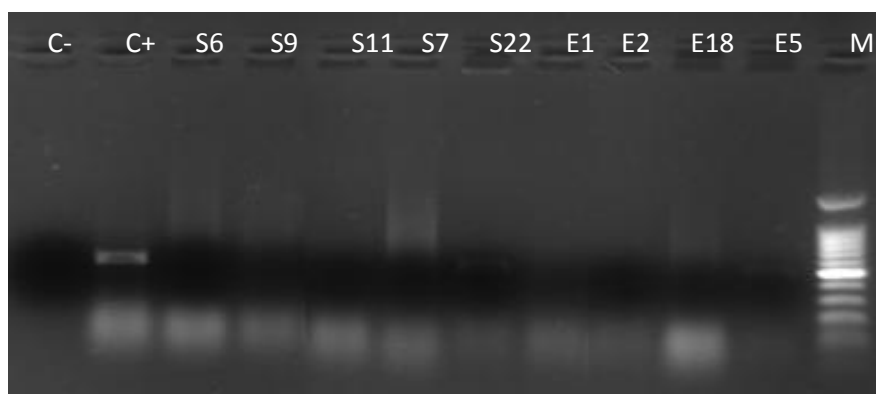


Figure 19 : Recherche du gène *aac*-(6')-Ib par PCR simplexe chez des coliformes isolés à partir des moules. C- : contrôle négatif, C+ : contrôle positif, M : marqueur de taille 100pb DNA Ladder. Taille de l'amplifiat : 100 pb. Sens de migration du haut vers le bas .

L'analyse des résultats obtenus révèle que les souches résistantes aux quinolones ne possèdent aucun PMQR, ceci suggère que le mécanisme de résistance de ces souches est représenté par les mutations au niveau des topoisomérases II et IV. Ce mécanisme est le plus connu chez *E.coli*.

Conclusion

Conclusion :

Le but de cette étude a été la détection des déterminants plasmidiques de la résistance aux quinolones (PMQR) chez 25 coliformes isolés à partir de la moule d'élevage et de la moule sauvage. Les principaux résultats obtenus lors de cette étude ont été :

- Un taux de résistance moyen a été observé vis-à-vis des quinolones, ce qui suggère un risque sanitaire lié au fait que les possibilités de traitement des infections causées par ces microorganismes se trouvent amoindries.
- La caractérisation génétique de la résistance a montré la présence du gène QnrB chez une souche d'*E.coli* isolée de la moule d'élevage et du gène QnrS chez une souche d'*E.coli* isolée du site sauvage. Ces gènes ont été trouvés chez des souches sensibles aux quinolones, ce qui a un rôle dans la sélection de bactéries résistantes.
- Les souches résistantes aux quinolones n'ont présenté aucun PMQR, ce qui suggère que la résistance de ces souches est due à des mutations au niveau des topoisomérases.

Ces résultats révèlent la présence de souches d'*E.coli* avec des mécanisme acquis qui peuvent rendre ce germe pathogène ou difficilement éliminer grâce à la présence de gènes de résistance aux antibiotiques. De plus, ce germes est considéré comme un réservoir de gènes pour d'autres germes pathogènes comme *Salmonella*. Actuellement, la salubrité des moules est estimée par le nombre d'*E.coli* présent dans 100g de chair et de liquide intervalvaire mais, il serait temps de suivre la qualité (antibiotype et pathovar ou encore le fond génétique) de ces souches.

En perspective, il serait intéressant de :

- compléter la caractérisation de ces résistances par la détermination des mutations dans les topoisomérases et de rechercher les allèles des gènes retrouvés.
- déterminer le support génétique de cette résistance afin de comprendre la dissémination de la Résistance.
- Faire un suivi de l'évaluation de la résistance au niveau des deux sites.

Bibliographie

A

Alouache S., 2012 : prévalence et caractérisation de la résistance aux agents antimicrobiens chez des bacilles à Gram négatif isolés de l'environnement. Thèse de Doctorat-USTHB. 164P.

Anssour L., Messai Y., Derkaoui M., Alouache S., Estepa V., Somalo S., Torres C., Bakour R., 2013 : ESBL, plasmidic AmpC, and associated quinolone resistance determinants in coliforms isolated from hospital effluent: first report of qnrB2, qnrB9, qnrB19, and blaCMY-4 in Algeria. J Chemother. 2013 Jul 24. [Epub ahead of print]

Alouache S., Estepa V., Messai Y., Ruiz E., Torres C., Bakour R., 2013 : Characterization of ESBLs and Associated Quinolone Resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates from an Urban Wastewater Treatment Plant in Algeria. Microb Drug Resist. 2013 Aug 17. [Epub ahead of print]

B

Beaumont A., Cassier P., 2004 : Biologie animale : Des protozoaires aux Métazoaires épithélienneuriens, Tome 1.3^{ème} Edt. Dunod. 459 P.

Bachelot M., 2010: Contamination de moules (*Mytilus sp.*) en milieu marin par des substances pharmaceutiques et produits de soin. Thèse de Doctorat Université Montpellier 1. 234 P.

Barthe C., Perron J., 1994 : Guide d'interprétation des paramètres microbiologiques d'intérêt dans le domaine de l'eau potable. Document de travail (version préliminaire), ministère de l'Environnement du Québec, 155 p.

Bonot S., 2010 : Persistance et dissémination du plasmide, vecteur de gènes de résistance aux antibiotiques, dans des biomasses issues de stations d'épuration d'eaux usées urbaines. Thèse de doctorat. Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement).225p.

Bouich et Radja, 2012 : Contrôle de la qualité microbiologique et toxicologique de la moule *Mytilus galloprovincialis* (Larmack, 1819) de Bordj El Kiffan Bateau cassé, et de la ferme ORCA marine (Ain chrob). Mémoire d'ingénieur (option aquaculture). ENSSMAL : 43p .

C

Cahen D., 2006 : Dossier didactique, moule nature, *Muséum des sciences naturelles*.

Cambau E., 1997 : Résistance bactérienne aux quinolones *in* Antibiotiques. Médecine Thérapeutique. Hors série n°1 : 98-107.

Cambau E., Guillard T., 2012 : Antibactériens agissant sur la synthèse et la conformation des acides nucléiques. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 65-76p.

Cavallo J.D., Fabre R., Jelhi F., Rapp C., Garrabe E., 2004 : Béta-lactamines (beta-lactam antibiotics). EMC-Maladies infectieuses. 1 :129-202.

Courvalin P., Goldstein F., Filippon A., Sirot J., 1985 : L'antibiogramme, 1ière édition.MCP édition, Paris.

CA-SFM, 2011 : Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, recommandation 2008.

Cattoir V., Poir L., Rotimt V., Soussy C.J., Nordmann P., 2007: Multiplex PCR for detection of plasmidmediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL producing enterobacterial isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **60** (2), 394-397.

Christian T., Schneider R.J., Färber H.A., Skutlarek D., Meyer M.T., Goldbach H.E., 2003: Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 36–44.

Chikh Y., 2008: Détection de souches résistantes aux antibiotiques chez la moule d'élevage *Mytilus galloprovincialis*. Mém.Ingéniorat.Opt.Aqua.50p.

Corvec S., 2009 : Les transferts génétiques. Laboratoire de bactériologie, UFR de Médecine-Nantes. Power point, 30p.

Carrière C., 2007 : La génétique bactérienne. B3 – Génétique bactérienne. MB7 : Bactériologie. Faculté de Médecine Montpellier – Nîmes.

D

Dominique H.H., Michèle G., Martial C., 2008 : Contamination des coquillages par des bactéries pathogènes pour l'homme / SRM MMN. PI_Contamination_coquillages_par_bactéries_pathogènes_V2_MC 143p.

Dubnau D., 1999.DNA uptake in bacteria, *Annual Revue of Microbiology*, 53:217-244.

E

Edberg S.C., Rice E.W., Karlin R.J., Allen M.J., 2000 : Escherichia coli: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 106S-116S.

F

Fluit A.C., Schmitz F.J., 2004: Resistance integrons and superintegrons, *Clinical Microbiology and Infection*, 10:272-288.

J

Rolain J.M., 2012 : Epidémies d'*Escherichia coli* producteurs de Shiga Shiga-toxines (STEC) : aspects microbiologiques et physiopathologiques. URMITE CNRS-IRD-INSERM UMR 7278.81p.

G

Grasse P.P., Doumenc D., 1998 : Zoologie : invertébrés. 6^{ème} édition de l'Abrégé zoologie Invertébrés. Edt. Masson et éditeurs

Gagnaire B., 2005 : Etude des effets de polluants sur les paramètres hématologiques de l'huître creuse. *Crassostrea gigas*-Interactions entre environnement, mécanisme de défense et maladies infectieuses. Thèse de doctorat. Université de la Rochelle.412p.

Galimand M., Sabtcheva S., Courvalin P., Lambert T., 2005, Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 49:2949-2953.

H

Hooper, D., 2002: Fluoroquinolone résistance among gram-positive cocci. *Lancet Infect Dis* 2 (9), 530-538.

I

Iabadene H., Messai Y., Alouache S., Verdet V., Arlet G., et Bakour R., 2009 : Etude moléculaire de la résistance d'*Enterobacter* sp aux céphalosporine à large spectre et aux quinolones dans les hopitaux d'Alger. 2^{ème} Workshop Biotechnologie en santé humaine 08-10

K

Kummerer K., 2004: Pharmaceuticals in the environment. Sources, fate, effects and risks. (2^{Ed.}), Springer-Verlag, Berlin, 567 p.

M

Marteil L., 1976 : La conchyliculture française ; 2ème partie :biotechnologie de l'huître et de la moule.rev.Trav.Inst. Pêches maritimes,40 (2)p : 149-346.

MPO, 2003 : Ministère des pêches et des Océans, direction des politiques etdes services économiques, Région du Golfe profil de la moule bleue « *Mytilus edulis* », *pêche et Océans Canada*.59P.

Mazel D., 2006 : Intégrons: agents of bacterial évolution, *Nature Reviews Microbiology*,4:608-620

O

OMS., 2000. Bureau régional de l'OMS pour l'Europe.

P

Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., 2002 : Microbiologie .2^{ème} Edition française 1164p.

R

Rouane-Hacene O., 2013 : Biosurveillance de la qualité des eaux côtières du littoral occidental Algérien, par le suivi des incidences biologiques, de la biodisponibilité et la bioaccumulation des métaux lourds (Zn, Cu, Pb et Cd) chez la moule *Mytilus galloprovincialis* et l'oursin *paracentrotus lividus*. Thèse de doctorat. Université d'Oran. 295P.

Rodier J., Bazin C., Broutin J.P., Chambon P., Champsaur H. et Rodi L., 2005 :L'analyse de l'eau, eau naturelle, eau résiduelles, eau de mer. Ed DUNOD, 1383p.

Rice E.W., 1999: *Escherichia coli*. Dans: American Water Works Association Manual of water supply practices: waterborne pathogens.78p.

Robicsek A., Strahilevitz J., Jacoby G.A., Macielag M., Abbanat D., Park C.H., Bush K., Hooper D.C., 2006:Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat. Med.*88 P.

Rodriguez-Martinez J.M., Eliecer Cano M., Velasco C., Martinez-Martinez L., Pascual A., 2010: Plasmid-mediated quinolone resistance: an update 2010 *.J Infect Chemother* .DOI 10.1007/s10156-010-0120-2.

Raphaël D., 2003 : Devenir dans l'environnement dulçaquicole de l'oxytetracycline, l'acide oxolinique et la fluméquine, antibiotiques utilisés en thérapeutique piscicole. Thèse de doctorat. Université de Nantes. (Faculté des Sciences et Techniques).270P .

S

Sambrook J., Fritsh E.F., Maniatis T., 1989: Moléculas cloning: a laboratory manual.Cold Spring Harbor Laboratory Press.N.Y.11p.

Stéphanie F., 2009 : Transfert d'un gène de résistance aux β -lactamines *bla*CTX-M-9 entre *Salmonella* et les entérobactéries de la flore intestinale humaine : impact d'une antibiothérapie. Thèse de doctorat. Université de rennes 1.(Science de la vie et de l'environnement).

T

Turgeon D.D., Quinn J.F., Bogan A.E., Coane V., Hochberg F.G., Lyon W.G., 1998 : Noms communs et scientifiques des invertébrés aquatiques des Etats-Unis et du Canada : Mollusque, 2^{ème} édition. *Publication spéciale 26 de Société Américaine de pêche*. Société américaine de pêche. Bethesda, Le Maryland, Etats-Unis. 526, ISBN : 1-888569-01-8.

Tillotson G.S., 1996: Quinolones: structure-activity relationships and future predictions. *J. Med. Microbiol.* - Vol. 44 (1996), 320-324.

U

Utting S.D., Millicon P.F., 1997: Technique for hatchery conditioning of conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture*, 155p.

V

Veron G., 2000 : Organisation et classification du règne animale. 2^{ème} édition. *Edt . DUNOD*. 144p.

W

Weingerg S., 1999: Découvrir la Méditerranée. *Edt. Nature*. 351p.

Witte W., 2000: Selective pressure by antibiotic use in livestock. *Int. J. Antimicrob. Agents* **16**: S19-S24.

Webber M., Piddock L.J.V., 2001: Quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Article*. 284p.

Y

Yamane K., Wachino J., Suzuki S., Arakawa Y., 2008: Plasmidmediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52** (4), 1564-1566 p.

Z

Zaneveld J.R., Nemergut D.R., Knight R., 2008: Are all horizontal gene transfers created equal? Prospects for mechanism-based studies of HGT patterns, *Microbiology*, 154:115.

Les sites web:

www.med.univ-montp1.fr/enseignement/cycle.../B3-Genetique.pdf

www.microbe-edu.org/etudiant/gene2.html

Annexes

Souches ATB	S16	E17	E2	E12	S13	S6	S7	S15	S22	S3	E14	S11	E13	E1	E3	S21	S4	E6	S2	E18	E11	S1	E7	S9	S12
CIP 22mm-25mm	26	34	38	S	40	26	R	34	32	S	R	40	38	40	R	14	36	34	38	36	24	38	44	40	38
NA 15 mm-20mm	17	24	32	S	28	18	R	25	R	S	R	30	27	27	R	R	28	29	28	28	0	28	30	29	34
K 15 mm-17mm	R	20	28	S	24	18	R	22	26	28	R	20	22	23	R	R	23	23	26	26	R	25	26	30	R
CN 16 mm-18 mm	20	22	22	S	26	19	26	24	28	S	20	20	22	21	20	27	22	21	26	26	26	30	26	28	22

ATB :antibiotique R : résistant S :sensible

TABLEAU DE LECTURE

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
ONPG	2-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0,223	β-galactosidase (Ortho NitroPhényl-βD-Galactopyranosidase)	incoloré	jaune (1)
<u>ADH</u>	L-arginine	1,9	Arginine DiHydrolase	jaune	rouge / orangé (2)
<u>LDC</u>	L-lysine	1,9	Lysine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé (2)
<u>ODC</u>	L-ornithine	1,9	Ornithine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé (2)
<u>[CIT]</u>	trisodium citrate	0,756	utilisation du CITrate	vert pâle / jaune	bleu-vert / bleu (3)
<u>H₂S</u>	sodium thiosulfate	0,075	production d'H ₂ S	incoloré / grisâtre	dépôt noir / fin liseré
<u>URE</u>	urée	0,76	UREase	jaune	rouge / orangé (2)
TDA	L-tryptophane	0,38	Tryptophane DésAminase	<u>TDA / immédiat</u>	
				jaune	marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane	0,19	production d'INDole	<u>JAMES / immédiat</u>	
				incoloré vert pâle / jaune	rose
<u>[VP]</u>	sodium pyruvate	1,9	production d'acétoïne (Voges Proskauer)	<u>VP 1 + VP 2 / 10 min</u>	
				incoloré	rose / rouge (5)
<u>[GEL]</u>	gélatine (origine bovine)	0,6	Gélatinase (GELatine)	non diffusion	diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	1,9	fermentation / oxydation (GLUcose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune / jaune gris
MAN	D-mannitol	1,9	fermentation / oxydation (MANnitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
INO	inositol	1,9	fermentation / oxydation (INOsitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
SOR	D-sorbitol	1,9	fermentation / oxydation (SORbitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
RHA	L-rhamnose	1,9	fermentation / oxydation (RHAmnose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
SAC	D-saccharose	1,9	fermentation / oxydation (SACcharose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
MEL	D-melibiose	1,9	fermentation / oxydation (MELibiose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
AMY	amygdaline	0,57	fermentation / oxydation (AMYgdaline) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
ARA	L-arabinose	1,9	fermentation / oxydation (ARABinose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
OX	(voir notice du test oxydase)		cytochrome-OXYdase	(voir notice du test oxydase)	

Tableau pour la lecture de galerie Api 20E