

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
Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



MEMOIRE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE MAGISTER EN SCIENCES DE LA MER

OPTION : Environnement de l'hydrosphère

Thème :

**Evaluation et caractérisation de la résistance aux
antibiotiques chez des bactéries à Gram négatif isolées à
partir de milieux et d'animaux aquatiques**

Présenté par:

Mme TOUAHIR Nawal

La composition du jury de soutenance

Mr	BOULAHID M.	Professeur (ENSSMAL)	Président
Mme	MESSAI Y.	Professeur (USTHB)	Examinatrice
Mr	HEMIDA F.	Professeur (ENSSMAL)	Examinateur
Mr	GRIMES S.	Maitre de conférences A (ENSSMAL)	Examinateur
Mme	ALOUACHE S.	Maitre de conférences A (ENSSMAL)	Promotrice
Mr	BAKOUR R.	Professeur (USTHB)	Co-promoteur

2016-2017

Résumé

L'objectif de cette étude était l'évaluation et la caractérisation de la résistance aux antibiotiques chez des bactéries à Gram négatif isolées à partir de poissons marins ayant différents types d'habitat écologiques (*Sardina pilchardus*, *Mullus surmuletus* et *Mugil cephalus*), capturés dans la baie d'Alger.

L'étude de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries de la flore totale a révélé la présence de taux de résistance assez importants pour l'amoxicilline, suivi des céphalosporines de 3^{ème} génération puis la ciprofloxacine et les tétracyclines. Des faibles taux ont été observés pour l'imipénème et la gentamicine. Par ailleurs, les résultats obtenus chez les coliformes ont montré la présence d'un taux de résistance élevée à l'amoxicilline et une sensibilité aux autres molécules à l'exception des coliformes isolés du *M. cephalus* qui ont présenté des taux de résistance moyens pour l'imipénème, la gentamicine, les tetracyclines et la ciprofloxacine. Bien que nous avons noté quelques différences dans les taux de résistance obtenus dans chaque poisson, l'analyse statistique a révélé qu'il n'ya pas une différence significative entre ces taux de résistance en fonction des habitats écologiques des différents poissons.

L'identification de 62 souches résistantes nous a permis de les assigner aux *Enterobactereaceae*, *Aeromonadaceae*, *Vibrionaceae* et *Pseudomonadaceae*. Ces souches ont présenté des taux de résistance élevé à l'amoxicilline, la céftazidime et le céfoxitine, des taux moyens pour la tetracyclines, pipéracilline, acide nalidixique et des taux faibles pour la gentamicine, l'amikacine et la kanamycine. Ces souches présentaient des profils de multi-résistance allant de 2 à 11 antibiotiques. La caractérisation génétique des mécanismes enzymatique de la résistance aux bêta-lactamines a permis de détecté la présence du gène d'une bêta-lactamase à spectre élargi de type *bla*_{CTX-M} du groupe 1 non transférable chez une *K. pneumoniae* isolée du mulot, du gène *bla*_{TEM} chez 4 *E.coli* et 1 *R. aqualitis* et 1 *K. pneumoniae*, du gène *bla*_{SHV} chez 2 *K. pneumoniae* et le gène d'une céphalosporinase *bla*_{CIT} chez 2 *C. freundii*.

Les résultats de la présente étude suggère que les poissons marins commerciaux provenant de la baie d'Alger, pourraient jouer un rôle en tant que support et/ou réservoir de bactéries résistantes aux antibiotiques, ce qui peut avoir un impact écologique et sanitaire.

Mot clés : antibiorésistance, bactéries, poissons marins, gènes de résistance aux antibiotiques,

Abstract

The aim of this study was to evaluate and characterize antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from marine fishes with different ecological habitats (*Sardina pilchardus*, *Mullus surmuletus* and *Mugil cephalus*), captured in the Bay of Algiers.

The study of antibiotic resistance in bacteria of the total flora revealed the presence of fairly high resistance levels for amoxicillin, followed by cephalosporins, 3rd generation followed by ciprofloxacin and tetracycline. Low levels were observed for imipenem and gentamicin. Furthermore, the results obtained in coliforms showed the presence of a high resistance to amoxicillin and sensitivity to other molecules with the exception of coliforms isolated from *M. cephalus*, which showed average resistance levels to Imipenem, gentamicin, tetracycline and ciprofloxacin. Although, we noted some differences in the resistance rates obtained in each fish, statistical analysis revealed that there is no significant difference between these resistance rates depending on the ecological habitats of the different fish.

The identification of 62 resistant strains belonged to *Enterobactereaceae*, *Aeromonadaceae*, *Vibrionaceae* and *Pseudomonadaceae*. These strains showed high incidence of resistance to amoxicillin, ceftazidime and ceftiofur, mean incidence for tetracycline, piperacillin, nalidixic acid and low levels for gentamicin, amikacin and kanamycin.

These strains showed multi-resistance profiles ranging from 2 to 11 antibiotics. The genetic characterization of the enzymatic mechanisms of beta-lactam resistance detected the presence of the non-transferable beta-lactamase, *bla*_{CTX-M} gene group 1 in a *K. pneumoniae* isolated from *M. céphalus*, gene *bla*_{TEM} in 4 *E. coli* and 1 *R. aquatilis* and 1 *K. pneumoniae*, the *bla*_{SHV} gene in 2 *K. pneumoniae* and the *bla*_{CIT} cephalosporinase gene in 2 *C. freundii*.

These results suggest that commercial marine fish caught in the Bay of Algiers might play a role as carrier/reservoir of antibiotic resistant bacteria, creating a health risk to public health for fish consumers.

Key words : Antibiotic resistance, bacteria, marine fish, antibiotic resistance genes,

Remerciements

Ce travail a été réalisé entre l'ENSSMAL et le laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire- équipe de Génétique de la faculté des Sciences Biologiques (FSB) de l'USTHB. Tout d'abord, Je tiens à remercier **ALLAH le Tout Puissant**, pour le courage et la patience qu'il m'a offert, afin de réaliser ce travail.

Mes remerciements vont particulièrement :

- A **Mme ALOUACHE S.**, Maître de Conférences A à l'ENSSMAL, et membre dans l'équipe de génétique à la FSB (USTHB), d'avoir accepté de diriger ce travail. Je tiens à lui témoigner toute ma reconnaissance pour tous ses précieux conseils, sa disponibilité, ses encouragements, sa patience, sa compréhension, et surtout son soutien moral à tous les instants difficiles de ce travail.
- A **Mr BAKOUR R.**, Professeur et Responsable de l'équipe de Génétique de la FSB (USTHB), pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et d'avoir codirigé ce mémoire.
- A **Mr BOULAHID M.**, Professeur, Responsable de notre post-graduation à l'ENSSMAL, d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire malgré ses nombreuses charges et responsabilités. Merci pour votre grandeur scientifique et votre modestie.
- A **Mme MESSAI Y**, Professeur à l'USTHB, qui nous a fait l'honneur d'examiner ce travail en dépit de ses nombreuses responsabilités.
- A **Mr HEMIDA F**, Professeur à l'ENSSMAL, d'avoir accepté d'examiner ce travail et dont les critiques nous serviront sûrement. Je voudrais le remercier vivement.
- A **Mr GRIMES M**, Maître de Conférences A à l'ENSSMAL, d'avoir accepté d'être présent dans ce jury et d'apporter des critiques pertinentes.
- A tous les ingénieurs de laboratoires à l'ENSSMAL en particulier : **Mme REFES, Mr MATOUK, YASMINE, SORAYA et HOUDA** pour leurs disponibilités, pour leurs précieuses aides, ainsi que pour, et le temps qu'ils ont bien voulu me consacrer.
- Aux membres de l'équipe de génétique que j'ai croisé lors de mon passage à l'USTHB
- A **Ami SAID de la pêche de Alger** qui m'a aidé durant la période d'échantillonnage, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde sympathie.
- A tous mes enseignants à l'ENSSMAL en particulier **Mme AMROUCHE** pour leur aide, encouragement et conseils durant mon cursus pédagogique, merci pour votre soutien attentif et bienveillant.
- Aux personnels de la bibliothèque de l'ENSSMAL pour leurs aides, je les remercie aussi pour leur sympathie et leur humour «ironique».
- A tous mes amis (es) qui m'ont aidés, ou étaient prêts à m'aider, en particulier : (**FATIHA, DJEMAA, BOUCHRA, CHAHINAZ, FAYROZ, KHADRA, CHAHRAZAD, FADHILA, NORA, MEHDIA, ROMAÏSSA, AMINA et MOHAMED**).

Le très grand merci à mes parents, mon mari, pour leurs innombrables sacrifices, à toute ma famille pour leur soutien. Merci de me comprendre même dans les moments les plus difficiles, sans vous je ne serais pas ce que je suis aujourd'hui. Merci une autre fois.

A ma petite fille AMIRA

Liste des tableaux	Pages
Tableau 1: Principales classes d'antibiotiques et quelques exemples (Coates et <i>al</i> 2002).....	29
Tableau 2: Dates et type de prélèvement.....	49
Tableau 3: Liste des antibiotiques en disque utilisés.....	50
Tableau 4: Les concentrations critiques d'antibiotiques utilisées pour la sélection des bactéries résistantes (CA-SFM, 2015).....	53
Tableau 5: Les séquences des amorces utilisées pour la recherche des bêta-lactamases.....	59
Tableau 6: Flore microbienne moyenne/g dénombrée dans les échantillons de poissons étudiées.....	62
Tableau 7: Taux de résistance moyens de la flore mésophile aérobie totale et probabilités calculées en fonction de l'habitat.....	70
Tableau 8: Taux de résistance moyens des coliformes totaux et probabilités calculées en fonction de l'habitat.....	70
Tableau 9 : Analyse de variance des taux de résistance de la flore mésophile aérobie totale au seuil de signification $\alpha= 0,05$	71
Tableau 10: Test de la différence significative (HSD) de Tukey.....	71
Tableau 11: Analyse de variance des taux de résistance des coliformes totaux au seuil de signification $\alpha= 0,05$	72
Tableau 12: Test de la différence significative (HSD) de Tukey.....	72
Tableau 13: Identification de bactéries à Gram négatif résistantes isolées à partir des espèces étudiées.....	73
Tableau 14: Antibiotypes des souches sélectionnées sur amoxicilline.....	77
Tableau 15: Antibiotypes des souches sélectionnées sur céfotaxime.....	79
Tableau 16: Antibiotypes des souches sélectionnées sur ciproflaxacine.....	80
Tableau 17: Résultats de transfert génétique par conjugaison.....	83
Tableau 18: Résultats de la recherche de BLS et BLSE.....	84
Tableau 19 : Résultat de la recherche de céphalosporinases plasmidiques.....	84

Liste des Figures	Pages
Figure 1: Les différentes sources de contamination de l'environnement par les médicaments y compris les antibiotiques ainsi que les bactéries résistantes (Collette-Bregand et al, 2009).....	18
Figure 2: Photo de la sardine commune : <i>Sardina pilchardus</i> Walbaum, 1792.....	19
Figure 3: Répartition spatiale de <i>Sardina pilchardus</i> (Froese et Pauly, 2015)....	20
Figure 4: Photo de rouget barbet de roche : <i>Mullus surmuletus</i> Linnaeus, 1758.....	22
Figure 5: Répartition spatiale de <i>M. surmuletus</i> (Froese et Pauly, 2015).....	23
Figure 6: Photo de Mulet cabot : <i>Mugil cephalus</i> Linnaeus, 1758.....	25
Figure 7: Répartition spatiale de <i>Mugil cephalus</i> (Froese et Pauly, 2015).....	26
Figure 8: Classification des antibiotiques.....	28
Figure 9: Modes d'action des antibiotiques sur une bactérie (Chardon et Bruger, 2014).....	30
Figure 10: Présentation des mécanismes de résistance aux antibiotiques par les bactéries. (D'après Schmieder et Edwards 2012, modifié).....	31
Figure 11: Structure générale des intégrons de classe (Lévesque et al, 1995).....	34
Figure 12: Structure du cycle bêta-lactame (Cavallo et al., 2004).....	35
Figure 13: Représentation schématique de la paroi des bactéries à Gram négatif (Cavallo, 2004).....	36
Figure 14: Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle bêta-lactame (Lagha, 2015).....	38
Figure 15: Structure commune des quinolones (https://pharmacomedicale.org).....	42
Figure 16: Structure commune des tétracyclines (Chopra et Roberts, 2000).....	44
Figure 17: Situation géographique de la baie d'Alger (Global Map Algeria, modifié) (www.worldatlas.com).....	46
Figure 18: Carte de la côte algéroise montrant les principales sources de rejets d'eaux usées dans la baie d'Alger (Houma, 2009).....	47
Figure 19: Schéma de la disposition des diques antibiotiques.....	55
Figure 20 : Taux de résistance aux antibiotiques de la flore mésophile aérobie totale chez <i>Sardina pilchardus</i> (la sardine commune).....	64

Liste des figures	pages
Figure 21 : Taux de résistance aux antibiotiques de la flore mésophile aérobie totale chez <i>Mullus surmuletus</i> (le rouget de roche).....	64
Figure 22: Taux de résistance aux antibiotiques de la flore mésophile aérobie totale chez <i>Mugil cephalus</i> (le mullet).....	64
Figure 23: Taux de résistance aux antibiotiques des coliformes totaux chez <i>Sardina pilchardus</i> (Sardine commune).....	67
Figure 24 : Taux de résistance aux antibiotiques des coliformes totaux chez <i>Mullus surmuletus</i> (rouget de roche).....	67
Figure 25: Taux de résistance aux antibiotiques des coliformes totaux chez <i>Mugil cephalus</i>	67
Figure 26: Résultat de l'identification bactérienne selon l'antibiotique de sélection.....	74
Figure 27 : Prévalence de la résistance aux antibiotiques de 37 souches résistantes isolées à partir des poissons.....	75
Figure 28 : Résistance des souches sélectionnées sur amoxicilline vis-à-vis des antibiotiques.....	76
Figure 29: Résistance des 5 souches sélectionnées sur céfotaxime vis-à-vis des antibiotiques.....	78
Figure 30 : Résistance des 3 souches sélectionnées sur ciprofloxacine vis-à-vis des antibiotiques.....	79
Figure 31 : résultats du test à la cloxacilline pour <i>C. freundii</i> (A) et <i>K. pneumoniae</i> (B).....	81
Figure 32 : Détection de la production d'une bêta-lactamase à spectre élargi par le test de synergie chez <i>Klebsiella pneumoniae</i> (CTX3) isolée à partir du mullet.....	82
Figure 33 : Illustration de la détection du gène <i>bla</i> _{CTX-M} (550pb) (A) et <i>bla</i> _{CTX-M} du groupe 1 (863pb) (B) chez la souche <i>K. pneumoniae</i> CTX3.....	85
Figure 34 : Illustration de la détection du gène <i>bla</i> _{SHV} (925pb) (C) et <i>bla</i> _{TEM} (858pb) (D).....	85
Figure 35 : Illustration de la détection du gène <i>bla</i> _{CTT} (462pb).....	85

Table des matières

pages

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste d'abréviations	
Introduction	13
I-Revue bibliographique	
I. Résistance aux antibiotiques dans l'environnement marin.....	16
II. Présentation des espèces cibles.....	18
II.1. La sardine commune : <i>Sardina pilchardus</i>	18
II.1.1. Position systématique.....	18
II.1.2. Description de l'espèce.....	19
II.1.3. Confusions possibles.....	20
II.1.4. Répartition géographique et bathymétrie.....	20
II. I.5. Alimentation et reproduction.....	21
II.2. Rouget barbet de roche : <i>Mullus surmuletus</i>	21
II.2.1. Position systématique.....	21
II.2.2. Description de l'espèce.....	22
II.2.3. Confusions possibles.....	22
II.2.4. Répartition géographique et bathymétrie.....	23
II.2.5. Alimentation et reproduction.....	23
II.3. Mulet cabot : <i>Mugil cephalus</i>	24
II.3.1. Position systématique.....	24
II.3. 2. Description de l'espèce.....	25
II.3. 3. Confusions possibles.....	25
II.3.4. Répartition géographique et bathymétrie.....	26
II.3.5. Alimentation et reproduction.....	26
III. Les antibiotiques.....	27
III.1. Qu'est-ce qu'un antibiotique ?.....	27
III.2. Classification et mode d'action.....	28
III.3. Résistance des bactéries aux antibiotiques.....	31
III.3.1.Qu'est-ce que la résistance aux antibiotiques ?.....	31
III.3.2. Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	31
III.3.3.Types de résistances.....	32
III.3.3.1.Résistance naturelle.....	32

III.3.3.2. Résistance acquise.....	32
III.3.4. Supports génétiques de la résistance.....	32
III.3.4.1. Le chromosome.....	33
III.3.4.2. Les éléments génétiques mobiles (extra-chromosomiques).....	33
III.3.5. Mécanismes de transfert d'ADN.....	34
IV. Les grandes familles d'antibiotiques.....	35
IV.1. Les bêta-lactamines.....	35
IV.1.1. Classification.....	35
IV.1.2. Mode d'action des bêta-lactamines.....	36
IV.1.3. résistance aux β -lactamines.....	37
IV.1.3.1. Mécanismes non enzymatiques.....	37
IV.1.3.1.1. Imperméabilité membranaire.....	37
IV.1.3.1.2. Système d'efflux.....	37
IV.1.3.1.3. Modification de la cible des bêta-lactamines.....	37
IV.1.3.2. Mécanisme enzymatique.....	38
IV.1.3.2.1. Classification des β -lactamases.....	38
IV.1.3.2.2. Diversité de bêta-lactamases.....	39
IV.1.3.2.2.1. Les pénicillinases.....	39
IV.1.3.2.2.2. Les céphalosporinases.....	39
IV.1.3.2.2.3. Les carbapénèmases.....	40
IV.1.3.2.2.4. Les bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE).....	40
IV.2. Les quinolones.....	42
IV.2.1. Mode d'action.....	43
IV.2.2. Mécanismes de résistances aux quinolones.....	43
IV.2.2.1. Mécanismes de résistances chromosomiques.....	43
Mécanismes de résistance plasmidique (PMQR).....	43
IV.3. Les aminosides.....	43
IV.3.1. Mode d'action.....	44
IV.3.2. Mécanismes de résistances aux aminosides.....	44
IV.4. Les tétracyclines.....	44
Mode d'action.....	45
IV.4.2. Mécanismes de résistances aux tétracyclines.....	45
II- Matériels et méthodes	
I. Présentation de la zone d'étude.....	47

I.1. Choix de la zone d'étude.....	47
II. Matériel.....	49
II.1. Choix des espèces.....	49
II.2. Echantillonnage des poissons.....	49
II.3. Les antibiotiques.....	50
II.4. Les souches de références.....	51
III. Méthodes.....	51
III.1. Préparation des échantillons de poissons pour l'analyse microbiologique...	51
III.2. Recherche et dénombrement de la flore microbienne dans les poissons.....	51
III.2.1. Recherche et dénombrement de la flore mésophile aérobie totale.....	52
III.2.2. Recherche et dénombrement des coliformes (totaux et thermotolérants)...	52
III.2.3. Détection et Prévalence de la résistance aux antibiotiques.....	52
III.3. Identification des bactéries résistantes.....	53
III.4. Etude de la sensibilité aux autres antibiotiques par antibiogramme.....	54
III.5. Détection des bêta-lactamases inductibles : test d'antagonisme.....	55
III.6. Détection des bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE).....	56
III.7. Transfert génétique par conjugaison bactérienne en milieu solide.....	56
III.8. Extraction d'ADN total par la méthode d'ébullition.....	56
III.9. Recherche de gènes de résistance par Réaction de Polymérisation en Chaîne.....	57
III.9.1. Recherche des gènes de bêta-lactamases et bêta_lactamases à spectre élargi par PCR Simplex.....	57
III.9.2. Recherche de gènes de céphalosporinases par PCR multiplexe.....	58
III.10. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	60
IV. Analyse statistique.....	60
III- Résultats et discussions	
I. Analyse microbiologique des différents échantillons de poissons.....	62
II. Prévalence de la résistance aux antibiotiques dans les poisson.....	62
II.1. Prévalence de la résistance aux antibiotiques chez la flore mésophile aérobie totale.....	62
II.2. Prévalence de la résistance aux antibiotiques chez les coliformes.....	66
III. Comparaison des taux de résistance selon l'habitat.....	69
IV. Comparaison des taux de résistance selon les antibiotiques.....	71
V. Identification bactérienne.....	72

VI. Etude de la résistance à d'autres antibiotiques par la méthode de l'antibiogramme.....	74
VII. Profils d'antibiorésistance.....	76
VII.1. Profils d'antibiorésistance des souches sélectionnées sur amoxicilline...	76
VII.2. Profil d'antibiorésistance des souches sélectionnées sur céfotaxime.....	78
VII.3. Profil d'antibiorésistance des souches sélectionnées sur ciprofloxacine.....	79
VIII. Détection de la production de céphalosporinases inductibles.....	81
IX. Détection de la production de bêta-lactamase à spectre élargi.....	82
X. Détermination du support génétique de la résistance.....	82
XI. Recherche des gènes de résistances par PCR.....	83
XI.1. Recherche de bêta-lactamases et bêta-lactamases à spectre élargie (BLSE).	83
XI.2. Recherche de céphalosporinases plasmidiques.....	84
Conclusion	89
Bibliographie	91
Annexes	110

INTRODUCTION

Introduction

Introduction

Les antibiotiques sont utilisés en médecine humaine et vétérinaire, l'agriculture et l'aquaculture à titre curatif, prophylactique et métaphylactique, ainsi que comme additifs alimentaires pour la promotion de croissance des animaux d'élevage (Kümmerer, 2004 ; Kemper, 2008 ; Sapkota et *al.*, 2008; Du et Liu, 2012 ; Cabello et *al.*, 2013). Cette utilisation massive et inopportune conduit à l'émergence de bactéries multi-résistantes par pression de sélection et par échanges et recombinaisons génétiques.

La présence des bactéries résistantes aux antibiotiques dans le milieu marin est une réalité préoccupante, elle est inhérente à l'augmentation des résistances acquises dans les communautés microbiennes (McDaniel et *al.*, 2010). L'environnement marin, notamment la frange côtière, est le réceptacle final des rejets traités ou non traités d'origine domestique, industrielle ou agricole. Ces derniers véhiculent des xénobiotiques tels que les antimicrobiens et des bactéries résistantes dont l'impact sur l'écosystème marin est considérable.

Ainsi, le rejet d'antimicrobiens dans l'eau de mer souvent véhiculés par les eaux usées urbaines, génère une pression de sélection, qui conduit à l'émergence et le maintien des bactéries résistantes dans les eaux côtières et chez les animaux qui y vivent, avec un risque écologique de déséquilibre de l'écosystème et santé publique par la consommation de poissons (Miranda et Zemelman, 2001 ; Matyar et *al.*, 2004 ; Smaldone et *al.*, 2014 et Matyar, 2016). En plus de la pression sélection, les gènes de résistance peuvent circuler et être amplifiés dans l'environnement aquatique (Witte, 2000).

L'acquisition de la résistance aux antibiotiques dans les poissons d'élevage est bien documentée (Aoki et Equasa, 1971 ; Waltman et Shotts, 1986 ; Smith et *al.*, 1994, Jin Jun et *al.*, 2004 et García-Aljaro et *al.*, 2014), alors que peu d'études ont été réalisées sur la résistance aux antibiotiques parmi la flore bactérienne des poissons vivant à l'état sauvage (Alves de Lima et Hofer, 1993 ; Miranda et Zemelman, 2001 ; Matyar et *al.*, 2004 ; Ghosh et Mandal, 2010 ; Smaldone et *al.*, 2014).

Jusqu'à l'heure actuelle, peu d'études ont été effectuées en Algérie sur l'état de la résistance aux antibiotiques dans les poissons marins, alors que ces derniers sont une composante du régime alimentaire de la population algérienne.

Introduction

Dans notre travail, on s'est attelé à l'étude de la résistance aux antibiotiques chez des bactéries de trois espèces de poissons, *Sardina pilchardus*, *Mullus surmuletus* et *Mugil cephalus*, au niveau de la baie d'Alger, caractérisés chacun par un habitat écologique spécifique, pélagique, benthique et benthopélagique, respectivement. La baie d'Alger est fortement contaminée par les eaux usées non traitées contenant des quantités significatives d'antibiotiques et de bactéries résistantes qui peuvent s'établir dans la flore microbienne de poisson. Donc, il est important de vérifier la possibilité que les poissons provenant de cette baie pourraient constituer un réservoir de bactéries résistantes ainsi estimer le risque de transmission à l'homme de la résistance aux antibiotiques à travers la chaîne alimentaire.

Les principaux objectifs de ce travail sont:

- L'évaluation de la résistance de la flore mésophile aérobie totale et des coliformes totaux à différentes familles d'antibiotiques.
- L'étude de l'influence de l'habitat sur la prévalence de la résistance aux antibiotiques retrouvés dans les poissons.
- L'identification phénotypique et génotypique des mécanismes de résistance aux bêta-lactamines.

REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

I

I. Résistance aux antibiotiques dans l'environnement marin

L'utilisation d'antimicrobiens en médecine humaine et vétérinaire entraîne la libération de déchets contenant à la fois des antibiotiques et des bactéries résistantes aux antibiotiques (Silbergeld et *al.*, 2008). Probablement, ces derniers peuvent atteindre l'environnement marin par le biais des égouts, les eaux de ruissèlement, des stations d'épuration et par l'épandage du lisier sur les champs (Pallecchi et *al.*, 2008, Bartoloni et *al.*, 2009). De plus, les fermes aquacoles (piscicultures), où les antibiotiques sont directement introduits dans l'eau *via* l'alimentation des poissons, sont impliquées dans la persistance de gènes de résistance et, plus globalement, dans l'augmentation de l'antibiorésistance dans les sédiments (Agersø et Petersen, 2007; Ndi et Barton, 2011; Tamminen et *al.*, 2011; Gao et *al.*, 2012)(**Fig.1**). L'existence de liens entre ces différents compartiments écologiques nous incite à nous intéresser aux émissions des antibiotiques, des bactéries résistantes et des gènes de résistance dans l'environnement pour étudier leur maintien et leur dispersion chez la communauté bactérienne autochtone, et ainsi estimer le risque d'évolution et de dissémination de la résistance aux antibiotiques vers l'homme *via* la chaîne alimentaire .

Les antibiotiques et leurs métabolites déversés dans les milieux aquatiques, peuvent subir une transformation biotique et abiotique (dégradation), s'adsorber sur les particules en suspension et les sédiments et dans certains cas s'accumuler dans les tissus des organismes aquatiques (Ramirez et *al.*, 2009). Par exemple, l'ampicilline et le sulfaméthoxazole sont peu biodégradables. D'autres se dégradent plus rapidement mais sont aussi considérés comme des polluants persistants car ils sont introduits en continu dans l'environnement, en raison de leur forte consommation (Pan, 2008).

Ces dernières années, de plus en plus d'antibiotiques ont été utilisés et leur présence dans le milieu aquatique est considérée comme un problème environnemental émergent. Une étude récente a par exemple mis en évidence que l'antibiotique amoxicilline induisait une diminution de la photosynthèse chez la cyanobactérie *Synechocystis sp.* Des modifications de la diversité et/ou de l'abondance des microalgues et des cyanobactéries pourraient avoir un effet indirect sur le reste des organismes de la chaîne trophique (Pan, 2008). De nombreuses études, ont ainsi démontré que les antibiotiques qui se trouvent disséminés dans l'environnement peuvent potentiellement exercer une pression importante sur les microorganismes autochtones (Pruden et *al.*, 2006). Il peuvent être considérés comme des polluants importants voir dangereux, puisqu'ils peuvent permettre la sélection de bactéries résistantes et favoriser le transfert de gènes de résistances aux antibiotiques (Martinez et

Revue bibliographique

al., 2009). L'échange naturel de gènes entre bactéries dans l'environnement est un fait connu (Bertolla et *al.*, 2000). Les trois mécanismes de transfert horizontal de gènes identifiés (la conjugaison, la transduction et la transformation) ont été largement étudiés (Demanèche et *al.*, 2000).

Les bactéries résistantes aux antibiotiques sont largement retrouvées dans l'environnement aquatique (Baquero et *al.*, 2008 ; Xi et *al.*, 2009). Comme les entérobactéries (*E.coli*, *Enterobacter*, *Salmonella* et *Klebsiella*), *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas* et *Acinetobacter* retrouvés dans les lacs (Lobova et *al.*, 2008 ; Pontes et *al.*, 2009 ; Poté et *al.*, 2012), les rivières (Ozgumus et *al.*, 2009 ; Servais et *al.*, 2009), les eaux marines (Bouhaddioui et *al.*, 2002 ; Zhang et *al.*, 2006 ; Harakeh et *al.*, 2006), le sédiment marin (Matyar et *al.*, 2008) et les sites aquacoles d'eau douce (Miranda et Zemelman, 2002 ; Iliev et *al.*, 2015) et d'eau marine (Sarter et *al.*, 2007 ; Dang et *al.*, 2009. Scarano1 et *al.*, 2014). Donc, l'environnement aquatique constitue un réservoir potentiel pour les bactéries résistantes aux antibiotiques (Nonaka et *al.*, 2000 ; Seyfried et *al.*, 2010).

L'incidence élevée des bactéries résistantes aux antibiotiques dans les organismes marins est une préoccupation importante, liée à l'utilisation inadéquate de ces médicaments et aux activités anthropiques (Matyar et *al.*, 2004). En effet, ces dernières années, des études ont été consacrées pour évaluer la présence des substances antimicrobiennes et des bactéries résistantes dans les animaux marins (Ryu et *al.*, 2012 ; Smaldone et *al.*, 2014).

La résistance aux antibiotiques a été signalée chez les poissons, les mammifères marins et les oiseaux de mer vivant dans les eaux côtières (Rose et *al.*, 2009). Une prévalence élevée de souches résistantes aux antimicrobiens a été détectée pour les poissons marins exposés aux eaux usées (antibiotiques, bactéries résistantes), avec des possibilités de transfert de leurs déterminants de résistances à des bactéries pathogènes pour l'homme. Par conséquent, le nombre élevé de bactéries résistantes dans les poissons peut créer des conséquences écologiques et sanitaires (Miranda et Zemelman, 2001; Matyar et *al.*, 2004 ; Ghosh et Mandal, 2010 et Smaldone et *al.*, 2014 ; Brahmi, 2016 ; Moremi et *al.*, 2016). Les bactéries résistantes des animaux peuvent alors se transmettre à l'homme à travers les aliments ou transmettre leurs gènes de résistance à la flore microbienne humaine causant des échecs thérapeutiques (Moubareck et *al.*, 2003).

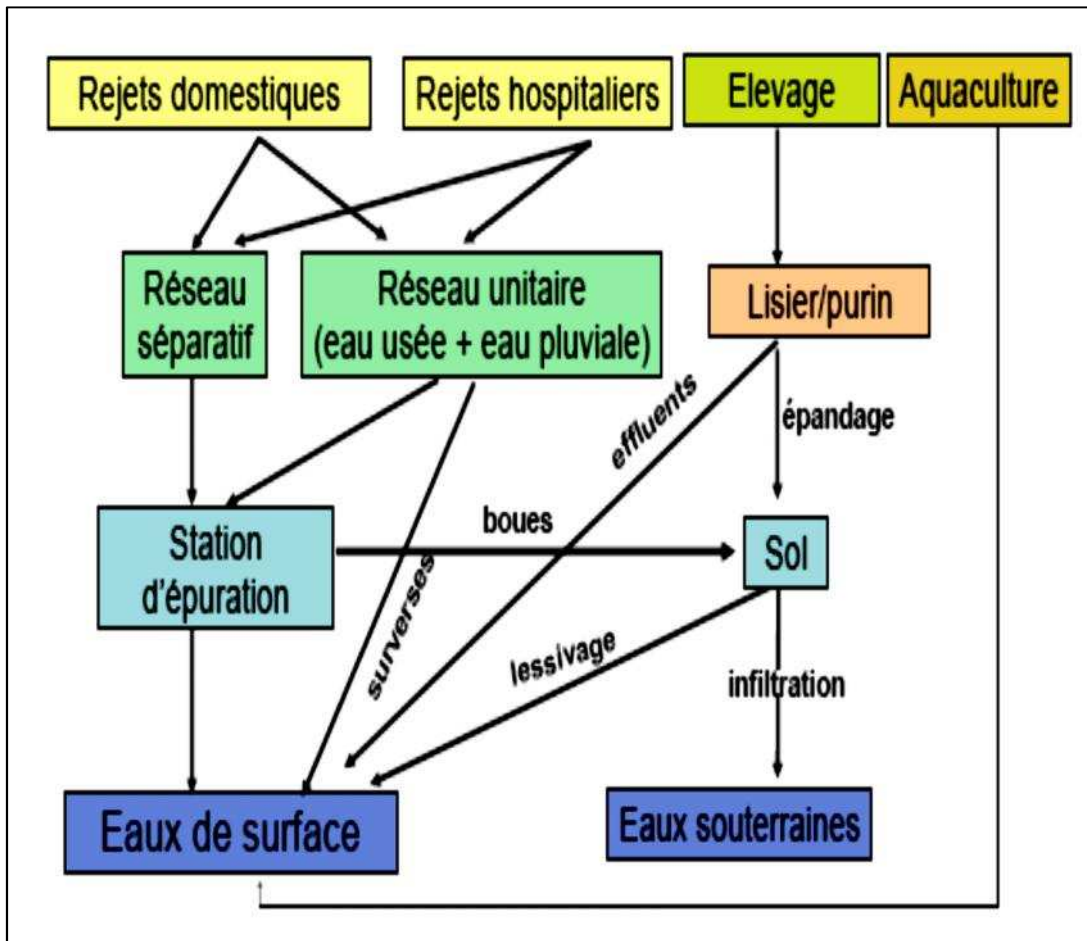


Figure 1 : Les différentes sources de contamination de l'environnement par les médicaments y compris les antibiotiques ainsi que les bactéries résistantes (Collette-Bregand et al., 2009 ; modifié).

II. Présentation des espèces cibles

II.1. La sardine commune : *Sardina pilchardus*

La sardine appartient à la famille des Clupéidés comme le hareng, le sprat et l'aloise. C'est un poisson pélagique c'est-à-dire vivant en plein eau et libre de tout contact avec le fond (Filleul, 2004). En Algérie, le genre *Sardina* comprend qu'une seule espèce, *Sardina pilchardus* (Darley, 1992 ; Djabali et al., 1993).

II.1.1. Position systématique

Pour définir la position systématique des espèces étudiées, nous avons consulté différents ouvrages où l'on peut observer une diagnose exhaustive (Bauchot et Pras, 1980), (Ficher et al., 1987) et ceux plus récents de (Lecointre et Guyader, 2001).

Règne : Eukaryota.

Sous-règne : Métazoa.

Phylum : Chordata.

Sous-phylum : Craniata.

Embrenchement : Vertebrata.

Super-classe : Gnathostoma.

Classe : Osteichthyens.

Sous-classe : Actinoptérygii.

Super-ordre : Teleostei.

Ordre : Clupeiformes.

Sous-ordre : Clupéoidés.

Famille : Clupeidae.

Genre : *Sardina* Antipa 1904.

Espèce : *pilchardus* Walbaum, 1792.

II.1.2. Description de l'espèce

Corps élancé de section ovale ; une série de scutelles sur la face ventrale ; un opercule présentant des stries bien marquées. Les nageoires pelviennes implantées nettement en arrière de l'origine de la nageoire dorsale. Les deux derniers rayons de sa nageoire anale sont plus allongés que les autres. Coloration bleu sombre sur le dos avec des reflets verdâtres ; flancs dorés devenant blanc argenté sur le ventre ; une série de points sombres alignés le long du dos ; avec parfois une deuxième rangée au-dessus. Elle possède une taille maximale de 25cm, mais plus commune de 15 à 20cm (Fischer et *al.*, 1987 ; Louisy, 2002) (Fig.2).

➤ Noms vernaculaires

Noms FAO : Sardine commune (France).

Noms locaux : Serdine.



Figure 2 : Photo de la sardine commune : *Sardina pilchardus* Walbaum, 1792.

II.1.3. Confusions possibles

La sardine peut être confondue avec un petit hareng, un gros sprat ou les jeunes aloses. Elle s'en distingue par : l'opercule strié, les écailles proportionnellement plus grosses et facilement détachables et le plus grand allongement des deux derniers rayons de sa nageoire anale. (Quéro et vayne, 1997 ; Filleul, 2004).

II.1.4. Répartition géographique et bathymétrique

S. pilchardus vit dans les eaux européennes depuis la Manche, le long des côtes de France, d'Espagne et de là jusqu'aux îles Canaries. On la croise aussi près des côtes d'Afrique du Nord, et en Méditerranée, dans l'Adriatique et, exceptionnellement, dans la mer Noire. (Whitehead et *al.*, 1984 ; Stanislav, 1997) (**Fig.3**).

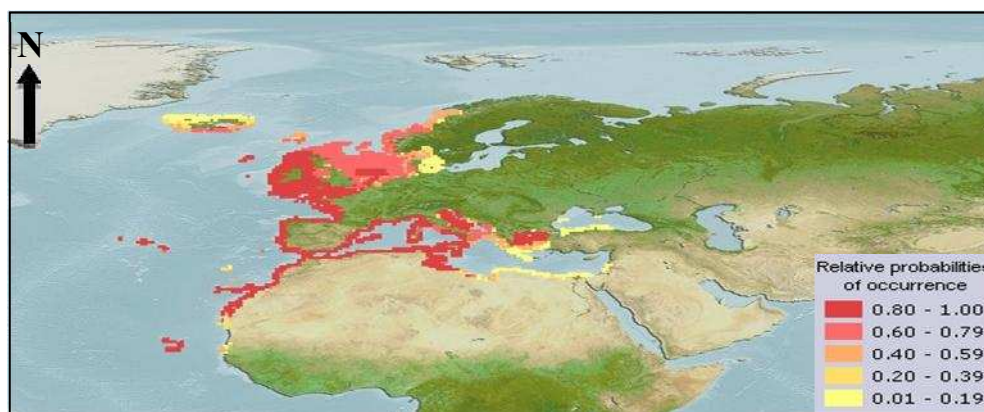


Figure 3 : Répartition spatiale de *Sardina pilchardus* (Froese et Pauly, 2015).

La sardine est un poisson pélagique côtier jusqu'à 180 m de profondeur (Fischer et *al.*, 1987). Elle effectue des migrations soit journalières : elle est plutôt dispersée pendant la nuit entre la surface et 35 m de profondeur, et le jour forme des bancs très denses entre le fond et la surface (25-55m) ; soit des migrations saisonnières de faible amplitude, commandés par la nutrition, la reproduction et les conditions thermiques. Elle migre en automne vers le large et se rapproche de la côte au printemps. Selon la saison, l'âge des individus et leur état sexuel, elle réalise également des déplacements le long de la côte (Lee, 1961; Quéro et vayne, 1997).

II. I.5. Alimentation et reproduction

Les jeunes se nourrissent de phytoplancton ainsi que d'œufs et de larves de petits crustacés. Les adultes sont zooplancophages consomment surtout des crustacés planctoniques (copépodes) (Jemaa et *al.*, 2015), mais également différentes larves présentes dans le zooplancton (crabes, ophiures,..) (Quéro et wayne, 1997).

La période de reproduction varie suivant les régions. Elle a lieu d'avril à novembre en Manche et en Atlantique, de décembre à mai dans le golfe de Gascogne et presque toute l'année en Méditerranée (Stanislav, 1997; Atlas, 2006). Elle se fait entre 20-25 m de profondeur, près du rivage (Whitehead et *al.*, 1984).

II.2. Rouget barbet de roche : *Mullus surmuletus*

Le rouget barbet de roche appartient à la famille des Mullides. C'est un poisson benthique c'est-à-dire vivant à proximité du fond. D'après Djabali et *al.* (1993), il existe deux espèces en Algérie, le rouget barbet de roche (*M. surmuletus* Linnaeus, 1758) et le rouget barbet de vase (*M. barbatus* Linnaeus, 1758).

II.2.1. Position systématique

Règne : Eukaryota.

Sous-règne : Métazoa.

Phylum : Chordata.

Sous-phylum : Craniata.

Embrenchement : Vertebrata.

Super-classe : Gnathostoma.

Classe : Osteichthyens.

Sous-classe : Actinoptérygii.

Super-ordre : Teleostei.

Ordre : Perciformes.

Sous-ordre : percoidés

Famille : Mullidae.

Genre : *Mullus* Linnaeus, 1758.

Espèce : *surmelutus* Linnaeus, 1758.

II.2.2. Description de l'espèce

Son corps est modérément comprimé. Tête à-profil moins abrupt ; une paire de barbillons sous le menton plus longs que les nageoires pectorales. La première nageoire dorsale marquée de bandes jaunes ou brunes. Coloration du dos est rougeâtre avec une bande longitudinale rouge foncé de l'œil à la caudale ; les flancs sont argentés portant trois bandes jaunes horizontales. Sa taille maximale est de 40 cm mais la plus commune est de 10 à 25 cm (Fischer et *al.*, 1987 ; Louisy, 2002) (**Fig.4**).

➤ **Noms vernaculaires:**

Les noms FAO: Rouget barbet de roche (France).

Les noms locaux : Rouget ou rougis, Rocca(Ouest), Soltane el houte, Mlal el Hadjra (Centre) ; El kadi, Boulahya (Est).



Figure 4 : Photo de rouget barbet de roche : *Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758.

II.2.3. Confusions possibles

Avec le rouget barbet de vase. Il existe trois critères principaux de différenciation entre ces deux espèces (Mamuris et *al.*, 1998) : chez *M.barbatus*, le profil de la tête est presque vertical avec absence de bandes jaunes, la première nageoire dorsale incolore et présence de 3 écailles sous l'œil. (Quéro et Vayne, 1997).

II.2.4. Répartition géographique et bathymétrique

Le rouget barbet de roche est rencontré le long des côtes européennes depuis le sud de la Norvège et du suède, le nord de l'Ecosse incluant les îles Féroé jusqu'au détroit de Gibraltar, mais également dans la partie nord- Ouest de l'Afrique, dans le bassin méditerranéen et en mer Noire (Stanislav, 1997). (**Fig.5**).

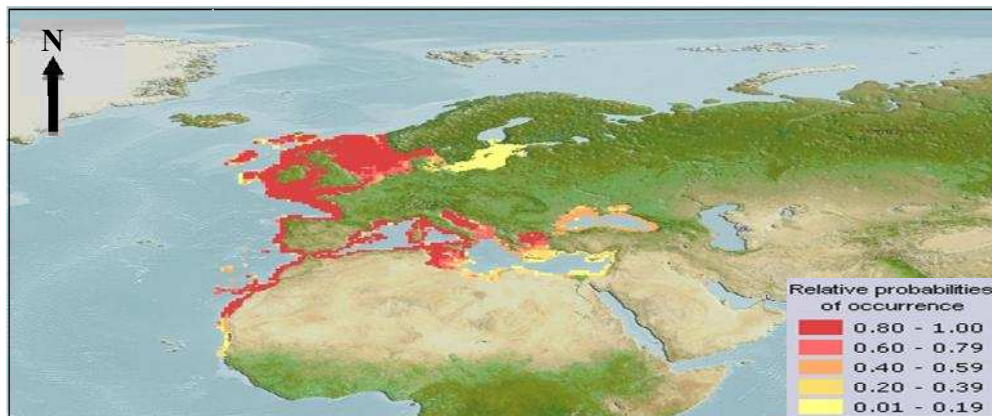


Figure 5 : Répartition spatiale de *M. surmuletus* (Froese et Pauly, 2015).

C'est un poisson benthique et de nature grégaire (vivant en bancs). Il fréquente les fonds sableux, graveleux et rocheux de la côte jusqu'au bord du talus à 300m de profondeur (Djabali et *al.*, 1993). Son maximum d'abondance se situe dans des eaux ayant une profondeur n'excédant pas 100 mètres en Méditerranée, de plus en plus profondément avec l'âge en Atlantique (Bauchot et Pras, 1980 ; Quéro et Vayne, 1997).

II.2.5. Alimentation et reproduction

Le rouget barbet de roche est un poisson carnivore (Cherif et *al.*, 2008). Il se nourrit uniquement d'organismes benthiques (crustacés, surtout crevettes et amphipodes, vers polychètes, mollusques, échinodermes et petits poissons); pendant leur vie pélagique, de larves de crustacés et copépodes (Fisher et *al.*, 1987).

Le régime alimentaire de cette espèce varie avec les saisons et la taille de Poisson mais aucune influence de la sexualité n'a été démontrée (Cherif et *al.*, 2008). En automne et en hiver, l'activité alimentaire du rouget coïncide avec la période de repos sexuel (Cherif et *al.*, 2007). Au printemps, le poisson réduit son alimentation pour laisser la place dans sa cavité abdominale à ses gonades qui devenaient plus volumineuses (Dadzie et *al.*, 2000).

Revue bibliographique

En Méditerranée, la période de ponte de cette espèce a lieu d'avril à juin. Les œufs et les larves sont pélagiques (Quero et Vayne, 1997). En Tunisie, elle est comprise entre le mois d'avril et le mois de juillet (Cherif et *al.*, 2007). En Algérie, elle s'étale de mars à juin avec un pic durant le mois d'avril (Kherraz, 2015).

II.3. Mulet cabot : *Mugil cephalus*

M. cephalus appartient à la famille des Mugilidés. C'est un poisson bento-pélagique (semi-pélagique) c'est-à-dire il est à la fois benthique et pélagique (Froses et Pauly, 2015).

Il existe sept variétés de mulets en Algérie :

1. *Mugil cephalus* Linnaeus, 1758 : Mulet cabot ou Mulet à grosse tête.
2. *Mugil auratus* ou *Liza aurata* (Risso, 1826) : Mulet doré.
3. *mugil saliens* ou *liza saliens* (Risso, 1810) : Mulet sauteur.
4. *Mugil capito* ou *Liza ramada* (Risso, 1827) : Mulet capiton ou mulet-porc.
5. *Mugil chelo* ou *Chelon labrosus* (Risso, 1827) : Mulet lippu ou à grosses lèvres.
6. *Mugil capurrii* (Perugia, 1892) : Mulet sauteur d'Afrique.
7. *Oedalechilus labeo* (Cuvier, 1829) : Mulet labéon.

II.3.1. Position systématique

Règne : Eukaryota.

Sous-règne : Métazoa.

Phylum : Chordata.

Sous-phylum : Craniata.

Embrenchement : Vertebrata.

Super-classe : Gnathostoma.

Classe : Osteichthyens.

Sous-classe : Actinoptérygii.

Super-ordre : Teleostei.

Ordre : Mugiliformes.

Sous-Ordre : Mugiloides.

Famille : Mugilidae.

Genre : *Mugil* Linnaeus, 1758.

Espèce : *cephalus* Linnaeus, 1758.

II.3. 2. Description de l'espèce

Le mullet cabot a le corps cylindrique et robuste. Il a une tête aplati et large dont la largeur dépasse celle de la fente buccale, un museau arrondi. La bouche est petite avec une lèvre supérieure fine. Les yeux sont protégés par une paupière adipeuse bien développée. Deux nageoires dorsales : la première à la moitié du corps, il porte 4 épines ; la seconde, large, est un peu plus longue, avec 8-9 épines ; la nageoire caudale est assez large et fourchue. Il possède une tache noire à la base des pectorales et jaunâtre de l'opercule peu apparente. Sa robe est grise plus ou moins sombre sur le dos et claire sur les flancs (argentée), avec des lignes (6-7) longitudinales grisâtres plus ou moins marquées (Louisy, 2002 ; Atlas, 2006). Le mullet cabot est le plus gros de tous les mullets et il peut atteindre 120 cm (Quéro et vayne, 1997). (Fig.6).

➤ Noms vernaculaires

Noms FAO : Mulet à grosse tête (France).

Noms locaux : Bouri ; mullet.



Figure 6 : Photo de Mulet cabot : *Mugil cephalus* Linnaeus, 1758.

II.3. 3. Confusions possibles

Le mullet cabot peut être confondu avec les autres mullets. Le mullet doré (*Liza aurata*) présente une tache dorée sur l'opercule, le mullet lippu (*Chelon labrosus*) possède une lèvre supérieure très charnue, le mullet porc (*Liza ramada*) montre une tache noire sur l'opercule (Filleul, 2004) et le mullet sauteur (*Liza saliens*) présente plusieurs petites taches dorées sur l'opercule (Bauchot et Pras, 1980).

II.3.4. Répartition géographique et bathymétrique

M. cephalus est très bien représenté en Méditerranée aussi en Atlantique, en Manche et en mer du Nord (Atlas, 2006). Du golfe de Gascogne à l'Afrique de l'ouest et en mer Noire. (Quéro et vayne, 1997). C'est une espèce cosmopolite qui existe dans les mers tropicales et subtropicales, il est introduit dans la mer Caspienne (Whitehead et al., 1986) (Fig.7).

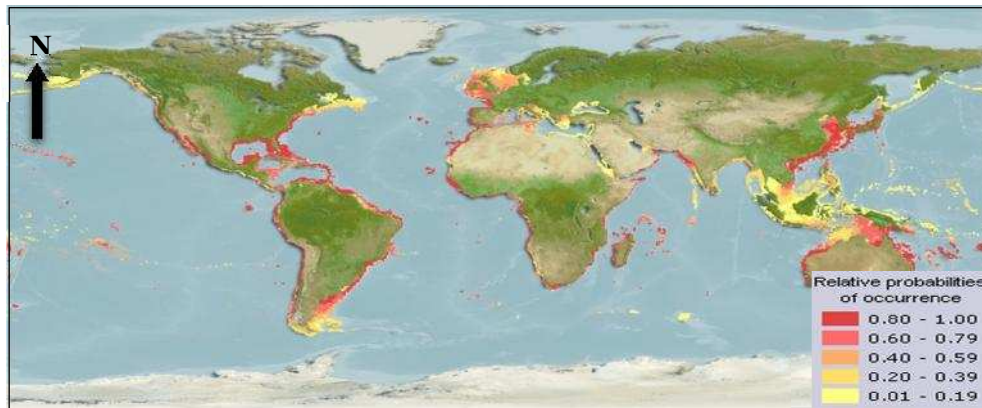


Figure 7: Répartition spatiale de *Mugil cephalus* (Froese et Pauly, 2015).

Il vit surtout dans les zones côtières à forte charge organique (ports, lagunes), et remonte dans les estuaires jusqu'en eau douce (Louisy, 2002). Il préfère les zones peu profondes à fonds sableux ou vaseux, généralement entre 0 et 5 m de profondeur mais il peut atteindre jusqu'au 120 m de profondeur (Louisy, 2002).

Le mullet cabot est de nature grégaire, il vit en banc et se déplace continuellement près des côtes. Il se tient souvent à l'embouchure des rivières ou à l'entrée des ports, ou il pénètre parfois et reste un bon moment ; il va aussi jusque dans les lagunes. C'est un poisson euryhalin c'est-à-dire qui supporte les fortes variations de salinité ce qui lui permet de trouver refuge dans les eaux douces quand de fortes tempêtes font rage en mer (Atlas, 2006).

II.3.5. Alimentation et reproduction

Le mullet à grosse tête est un poisson à alimentation diurne, qui se nourrit uniquement pendant la journée, consommant principalement du zooplancton, des plantes mortes, et des détritiques (Cardona, 2000).

Poisson omnivore, il se nourrit à la fois de végétaux et d'animaux: Annélides marins (gravette et arénicole) et verre de terre, crustacés, petits mollusques, alevins, larves, algues

Revue bibliographique

(Atlas, 2006). Il est généralement considéré comme détritivore, car il ingère la pellicule de surface des sédiments où se mêle débris végétaux, matière organique et petits organismes. Il se nourrit aussi à la surface de la mer où se concentrent insectes et fragments végétaux entraînés par le vent (Harmelin-Vivien et Harmelin, 1991). Il filtre la vase et absorbe les bactéries, les mycéliums et de champignons à chaque fois que sa bouche s'ouvre (Muus et al., 1998). Leurs contenus stomacaux renferment, mélangés à du sable et à de la vase, de nombreuses diatomées, également des cyanophycées, des dinophycées et des chlorophycées (Quéro et Vayne, 1997).

Le mulot à grosse tête est catadrome c'est à dire il passe la plupart du temps dans l'eau douce et se reproduit en milieu marin. En Méditerranée, la période de ponte va de juillet à octobre (Quéro et Vayne, 1997) ; alors les adultes forment des gros bancs, ils redescendent des eaux douces et saumâtres et rejoignent la mer pour le frai (Atlas, 2006). Les juvéniles reviennent dans les estuaires pour effectuer leur croissance (Filleul, 2004).

III. Les antibiotiques

III.1. *Qu'est-ce qu'un antibiotique ?*

Un antibiotique est une substance chimique naturelle produite essentiellement par des bactéries et certains champignons présents dans l'environnement. Il y a aussi des agents antibactériens synthétisés chimiquement au laboratoire. Les antibiotiques ont le pouvoir de détruire (effet bactéricide) ou de ralentir (effet bactériostatique) la croissance des bactéries. (Walsh, 2003). Leur action s'exerce sur des sites spécifiques au niveau d'une ou plusieurs étapes métaboliques indispensable à la vie des bactéries. Cette caractéristique leur permet d'être efficaces à de faibles concentrations sans être toxiques pour l'homme : c'est le principe de la toxicité sélective, (Bryskier, 1999).

III.2. Classification et mode d'action

La classification des antibiotiques repose sur plusieurs critères : L'origine, la structure chimique, le mode d'action et le spectre d'activité (Yala et *al.*, 2001) (**Fig.8**).

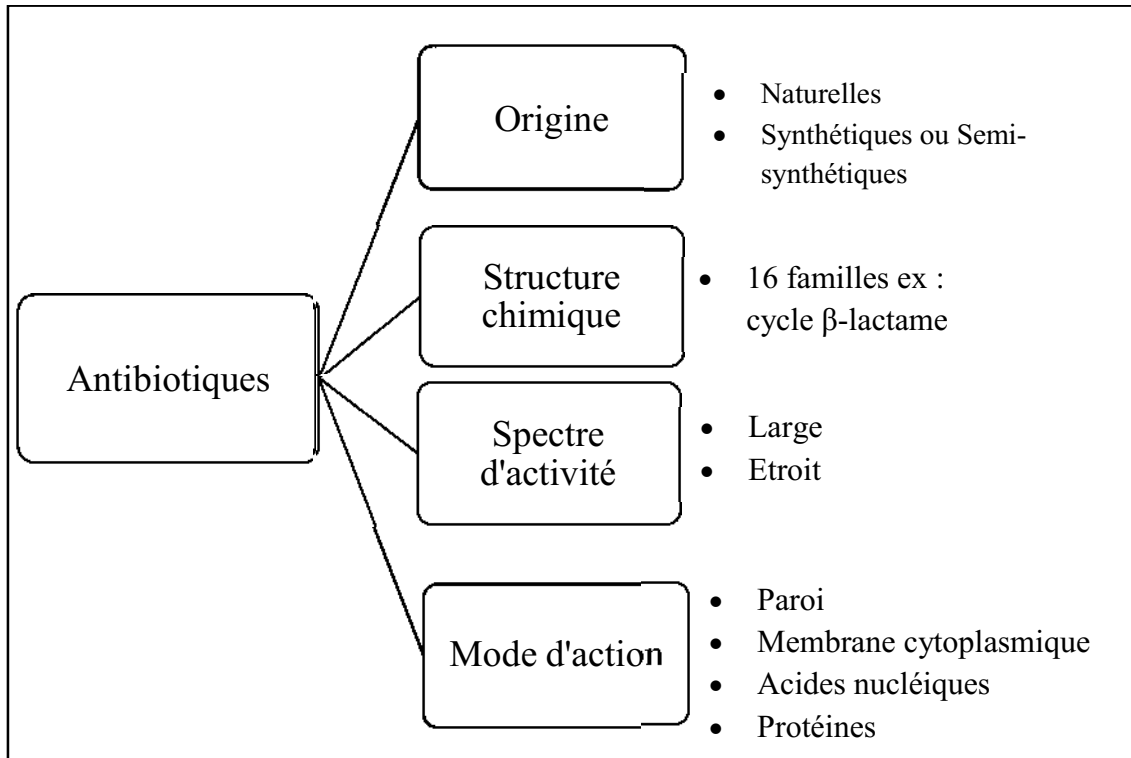


Figure 8 : Classification des antibiotiques.

Revue bibliographique

Tableau 1: Principales classes d'antibiotiques et quelques exemples (Coates *et al.*, 2002).

Classe	Exemples
Béta-lactamines	
Pénicillines	Pénicilline G, pénicilline V, méthicilline, Oxacilline, Ampicilline, Amoxicilline
Céphalosporines	Céphalotine, Céphapirine, Céfamandole, Céfuroxime, Cefotaxime, Ceftizoxime, Cefpirome, Céfépime
Carbapénèmes	Imipénème, Méropénème
Monobactames	Aztréonam
Inhibiteurs des béta-lactamases	Clavulanate, Sulbactame
Aminoglycosides	Streptomycine, Néomycine, Kanamycine, Gentamicine
Tétracyclines	Tétracycline, Chlortétracycline, Déméclocycline
Rifamycines	Rifampicine, Rifapentine, Rifaximine
Macrolides	Erythromycine, Azithromycine, Clarithromycine
Lincosamides	Lincomycine, Clindamycine
Glycopeptides	Vancomycine, Téricoplanine
Streptogramines	Quinupristine, Dalfopristine
Sulphonamides	Sulfanilamide, Sulfadiazine, Sulfisoxazole
Oxazolidinones	Linézolide
Quinolones	Acide nalidixique, Acide oxolinique, Norfloxacin
Autres	Metronidazole, Polymyxine, Triméthoprime

Revue bibliographique

Selon le mode d'action, cinq mécanismes qui peuvent toucher soit la structure bactérienne, soit une fonction métabolique (Tenover, 2006 ; Dzidic et *al.*, 2008) (**Fig.9**) :

1. Action sur la paroi bactérienne : Béta-lactamines et glycopeptides.
2. Action sur la structure de la membrane plasmique : Polymixines.
3. Action sur la synthèse protéique (action sur les sous-unités ribosomales 30S et 50S) : Macrolides, Tétracyclines, aminoglycosides.
4. Action sur les acides nucléiques (ADN et ARN) : Fluoroquinolones, Rifampicine.
5. Interférence avec le métabolisme de la bactérie (blocage de certaines étapes du métabolisme énergétique) : Sulfamides.

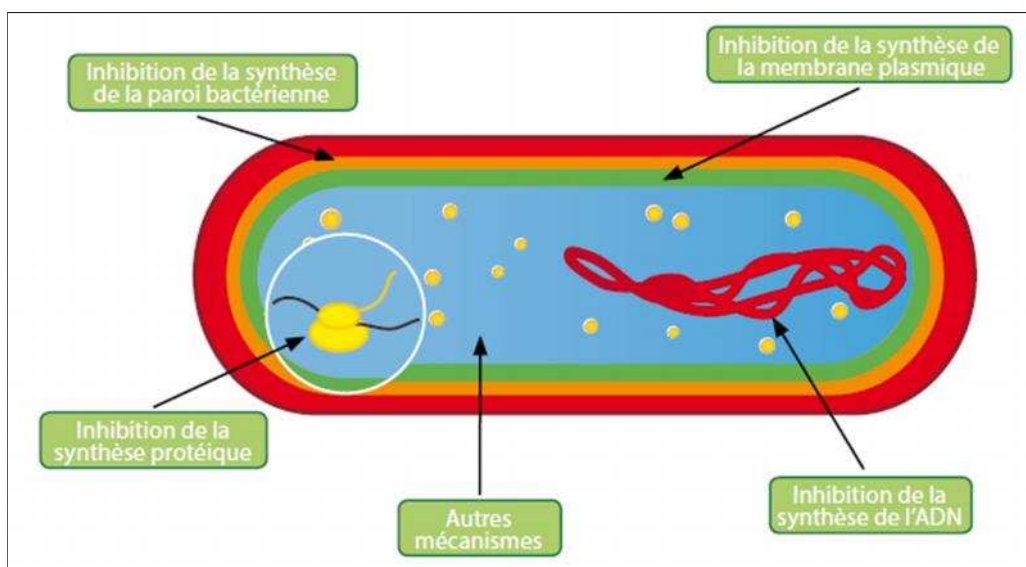


Figure 9 : Modes d'action des antibiotiques sur une bactérie (Chardon et Bruger, 2014).

❖ *Conditions d'actions des antibiotiques*

Pour qu'un antibiotique soit efficace contre des bactéries, trois conditions doivent être disponibles (Dzidic et *al.*, 2008) :

- ✓ Existence d'une cible spécifique à cet antibiotique dans la cellule bactérienne ;
- ✓ Etre en concentration suffisante au niveau de la cible ;
- ✓ Ne pas être inactivé ou modifié.

III.3. Résistance des bactéries aux antibiotiques

III.3.1. Qu'est-ce que la résistance aux antibiotiques ?

D'un point de vue bactériologique, on dit qu'une souche est résistante lorsqu'elle peut croître en présence d'une concentration d'antibiotique plus élevée que la concentration qui inhibe la majorité des souches de la même espèce (Davison et *al.*, 2000).

III.3.2. Mécanismes de résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques peut être provoquée par quatre mécanismes généraux (Wright, 2005) (Fig. 10) :

- ❖ L'inactivation enzymatique ou la modification de l'antibiotique ;
- ❖ La modification génétique de la cible de l'antibiotique (ou la surproduction de la cible) ;
- ❖ La diminution de la perméabilité membranaire en limitant l'entrée de l'antibiotique à l'intérieur de la bactérie ;
- ❖ La sur-activation de pompes à efflux permettant d'expulser l'antibiotique à l'extérieur de la bactérie.

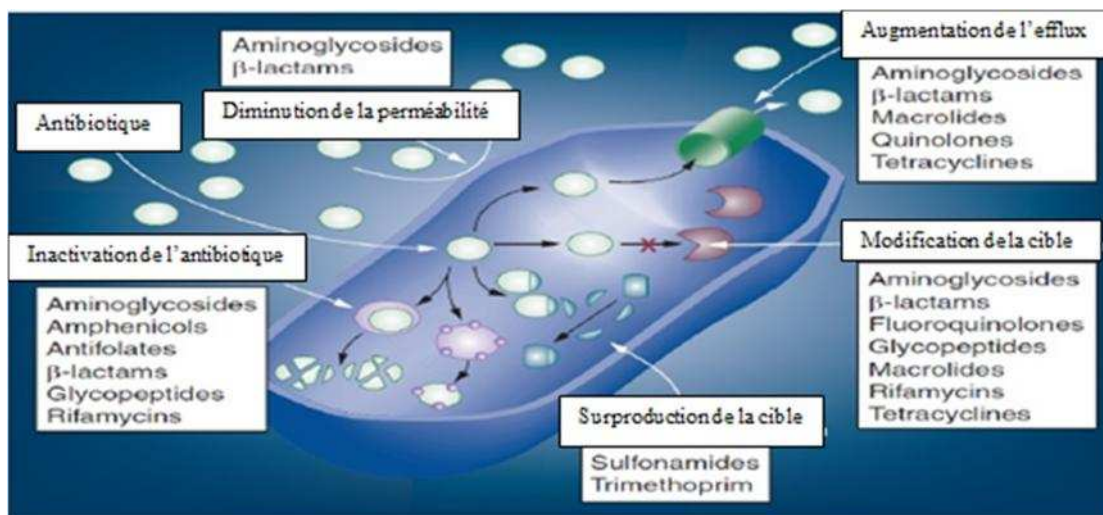


Figure 10: Présentation des mécanismes de résistance aux antibiotiques par les bactéries.

(D'après Schmieder et Edwards 2012, modifié).

III.3.3.Types de résistances

La résistance des bactéries aux antibiotiques résulte soit d'une résistance naturelle ou soit d'une résistance acquise.

III.3.3.1.Résistance naturelle

La résistance naturelle, dont le support génétique est le chromosome bactérien, est une caractéristique qui est présente de façon intrinsèque chez toutes les souches d'une même espèce à un antibiotique. Elle est stable, transmise à la descendance. Elle permet de définir le spectre d'activité des antibiotiques. À titre d'exemples, les entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa* sont naturellement résistants aux macrolides car ceux-ci ne peuvent pas traverser la membrane externe de la paroi de ces bactéries à Gram négatif (Normark et Normark, 2002). *Klebsiella pneumoniae* est naturellement résistante à l'amoxicilline, ampicilline et à la ticarcilline, grâce à une β -lactamase chromosomique naturelle (Pina et al., 2000).

III.3.3.2.Résistance acquise

La résistance acquise n'est présente que chez certaines souches de la même espèce ou du même genre bactérien. Elle est moins stable (Davies, 1994). Elle résulte soit d'une mutation de gènes existants (évolution verticale) (Martinez et Baquero, 2000), soit d'une acquisition de nouveaux gènes provenant d'autres souches ou espèces par transfert horizontal des éléments mobiles y compris les phages, les plasmides, les transposons ou les intégrons (Palmer et al., 2010). la présence de faibles concentrations de l'antibiotique dans l'environnement est le signal clé qui favorise le transfert de gènes (Jetters et al., 2009).

III.3.4.Supports génétiques de la résistance

Le potentiel génétique d'une bactérie est constitué d'une part d'un génophore obligatoire, le chromosome qui définit la résistance chromosomique et d'autre part de un ou de plusieurs génophores facultatifs et extra- chromosomiques tels que : les plasmides, les transposons ou les intégrons qui sont le support génétique de la résistance extra-chromosomique (Davison et al., 2000).

III.3.4.1. Le chromosome

Le chromosome bactérien est porteur des informations génétiques nécessaires à l'existence même de la bactérie et contient aussi les gènes responsables de sa résistance naturelle. La résistance chromosomique acquise résulte d'une mutation qui est stable et transmissible à la descendance (Davison *et al.*, 2000).

III.3.4.2. Les éléments génétiques mobiles (extra-chromosomiques)

La résistance aux antibiotiques acquise par les bactéries est principalement due à la présence de trois types d'éléments extra-chromosomiques portant des gènes de résistance : les plasmides, les transposons et des cassettes de résistances insérées sur un intégron (Walsh, 2006 ; Bennett, 2008 ; Martinez, 2009).

➤ Les plasmides

Les plasmides sont des molécules d'ADN bi-caténaire et généralement circulaires, d'une taille pouvant varier de moins de 2 kb à plus de 100 kb. Ce sont des structures stables, capables de réplication autonome, constituées de quatre modules génétiques. Ils ont une fonction essentielle dans le transfert horizontal car ils peuvent former des co-intégrats avec d'autres plasmides, être intégrés, en totalité ou partiellement, au chromosome bactérien mais surtout peuvent servir de vecteurs de mobilité pour les transposons et les intégrons (Norman *et al.*, 2009). Ce type de résistance est le plus fréquent et il est de plus en plus répandu. Il concerne tous les types d'antibiotiques et peut même se transmettre entre bactéries d'espèces ou de genres différents (Bennett, 2008).

Une bactérie peut acquérir plusieurs plasmides portant chacun un ou plusieurs gènes de résistance à différents types d'antibiotiques. Les plasmides porteurs de résistance multiples sont ainsi transférés à de nombreuses populations (Harbottle *et al.*, 2006 ; Bennett, 2008).

➤ Les transposons

Les transposons sont des segments d'ADN qui ont la capacité de se déplacer et de s'insérer à divers endroits sur un chromosome ou un plasmide par transposition. Ils sont aussi nombreux que diversifiés. Les éléments transposables les plus simples sont les séquences d'insertion (ou séquences IS) (Bennett, 2008).

➤ Les intégrons

De découverte relativement récente (fin des années 1980), les intégrons sont des éléments génétiques complexes. Ils forment un système de recombinaison spécifique de site pouvant capturer des gènes et les réorganiser sous forme de cassettes. Ils sont généralement portés par les plasmides et les chromosomes bactériens. Les intégrons possèdent deux segments conservés, séparés par une région variable, capable d'inclure des gènes de résistance ou d'autres gènes cassettes (**Fig.11**) (Lévesque et *al.*, 1995). Les trois constituants fondamentaux de l'intégron sont le gène *intI* codant pour une intégrase, le site de recombinaison *attI* et un promoteur P permettant la transcription des gènes capturés ou cassettes (Skurnik, 2009).

Les intégrons jouent donc probablement un rôle important dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques au sein du monde bactérien (Skurnik, 2009).

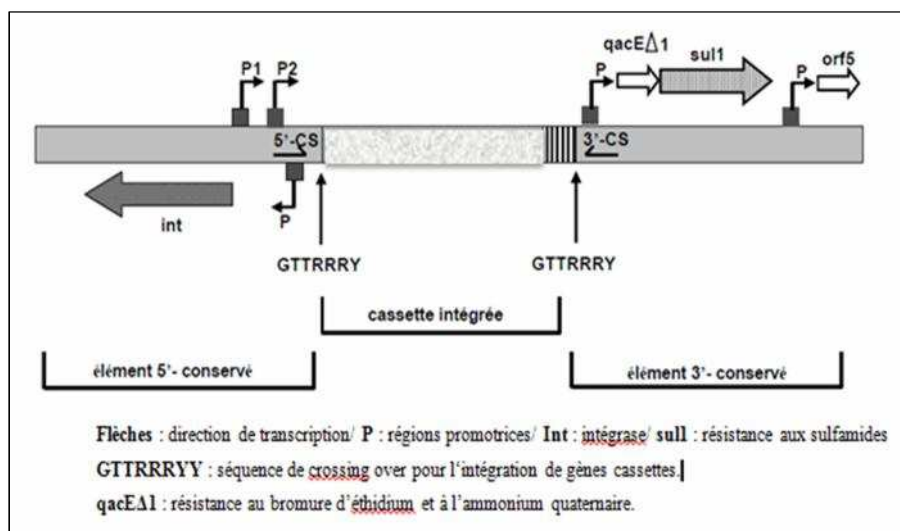


Figure 11 : Structure générale des intégrons de classe 1. Le carré noir rayé représente une cassette intégrée (Lévesque et *al.*, 1995).

III.3.5. Mécanismes de transfert d'ADN

Les gènes de résistance sont échangés dans l'environnement entre des souches bactériennes provenant de la même espèce ou de genres phylogénétiquement éloignés par différents modes de transferts génétiques horizontaux tels que la transformation, la transduction ou la conjugaison (Tenover, 2006):

Revue bibliographique

- **Transformation** : La transformation correspond à la pénétration et l'incorporation d'un ADN libre extracellulaire, linéaire ou circulaire, que la bactérie compétente internalise à partir de son environnement proche (Dubnau, 1999).
- **Transduction** : Elle consiste en l'acquisition de séquences d'ADN par une autre bactérie suite à son infection par un bactériophage (Kelly et *al.*, 2009).
- **Conjugaison** : Les plasmides peuvent se transmettre d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse par l'intermédiaire de pili (Thomas et Nielsen, 2005).

IV. Les grandes familles d'antibiotiques

IV.1. Les bêta-lactamines

Les β -lactamines représentent la plus importante famille d'antibiotiques, aussi bien par le nombre de molécules disponibles et la diversité des molécules utilisables, que par leurs indications en thérapeutique. Cette utilisation importante est due à leur large spectre d'action, à leur efficacité, à leur faible toxicité et à leur faible coût pour de nombreuses molécules (Cavallo et *al.*, 2004).

La pharmacocinétique des antibiotiques de cette famille indique que ces derniers sont sécrétés majoritairement dans les urines et sous une forme chimique encore active. Cependant, l'hydrolyse chimique rapide du noyau bêta-lactame, caractérisant les antibiotiques de cette famille, rend difficile leur détectabilité dans l'environnement aquatique (Corvaglia, 2006).

IV.1.1. Classification

Ces molécules contiennent toutes un noyau bêta-lactame (**Fig.12**) dans leur structure moléculaire, qui est indispensable à l'activité antibiotique. La structure du noyau permet de répartir ces produits en trois grands groupes : (Cavallo et *al.*, 2004)

- Les dérivés de l'acide 6-amino-pénicillanique : Les Pénames, les Carbapénèmes et les Clavames ou Oxapénames. ;
- Les dérivés de l'acide 7-amino-céphalosporanique : les Céphalosporines, les Céphamycines et les Oxacéphèmes ;
- Monobactames : L'aztréonam est le seul produit utilisé actuellement.

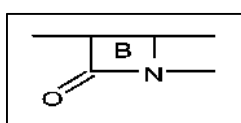


Figure 12: Structure du cycle bêta-lactame (Cavallo et *al.*, 2004).

IV.1.2.Mode d'action des bêta-lactamines

Les bêta-lactamines possèdent un effet bactéricide (Kohanski *et al.*, 2007). Ils inhibent la synthèse de la paroi bactérienne (**Fig.13**). Les cibles des β -lactamines sont les **PLP** (protéines de liaison à la pénicilline) qui interviennent dans la synthèse et le remodelage du peptidoglycane, constituant principal de la paroi bactérienne (Tipper, 1985). Ils sont insérés dans la partie externe de la membrane cytoplasmique bactérienne (Cavallo *et al.*, 2004). Les β -lactamines bloquent la biosynthèse du peptidoglycane (muréine) en inhibant l'activité transpeptidase et carboxypeptidases des PLP. Il s'ensuit un affaiblissement du peptidoglycane et une lyse osmotique qui mène à la mort bactérienne (Wilke *et al.*, 2005). Les carbapénèmes se fixent principalement aux PLP 1 et PLP 2 contrairement aux céphalosporines et aux amino-pénicillines qui se fixent à la PLP 3 (Wolff *et al.*, 2008).

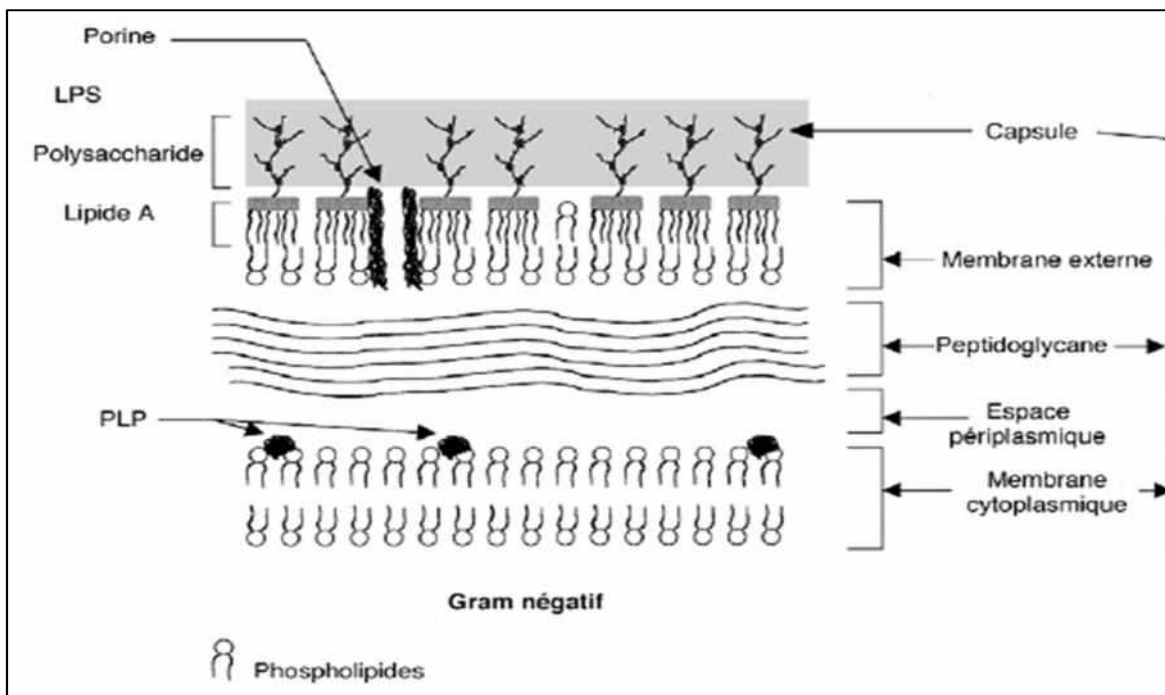


Figure 13: Représentation schématique de la paroi des bactéries à Gram négatif (Cavallo *et al.*, 2004). **LPS** : Lipopolysaccharide ; **PLP** : Protéines de liaison aux pénicillines

IV.1.3. résistance aux β -lactamines

Les mécanismes de résistance aux β -lactamines peuvent être de nature enzymatique ou non enzymatique :

IV.1.3.1. Mécanismes non enzymatiques

Ces mécanismes peuvent résulter d'un défaut de perméabilité des membranes externes, d'une hyper-expression de systèmes d'efflux actif ou d'une modification de la cible.

IV.1.3.1.1. Imperméabilité membranaire

La résistance par diminution de perméabilité de la membrane externe empêche la pénétration de l'antibiotique ou limite fortement sa concentration dans l'espace péri-plasmique. La diminution de la perméabilité d'une bactérie à un antibiotique peut résulter de la diminution du nombre de porines et/ou de l'altération de leur structure suite à des mutations touchant les gènes de structure ou de régulation des porines (Phillipon et *al.*, 1993). Ce mécanisme de résistance n'est présent que chez les bactéries à Gram négatif

IV.1.3.1.2. Système d'efflux

Le mécanisme consiste à expulser les antibiotiques à l'extérieur de la cellule *via* des transporteurs membranaires appelés pompes d'efflux (Aires, 2011). Pour fonctionner, les pompes d'efflux utilisent l'énergie fournie par dissipation d'un gradient de protons et ou d'ions sodium ou encore par hydrolyse d'ATP. Les pompes les plus fréquemment rencontrées sont de type RND comme AcrB chez *Escherichia coli* ou MexB chez *Pseudomonas aeruginosa* (Cattoir, 2004). Ce type de résistance peut affecter plusieurs classes d'antibiotiques y compris les bêta-lactamines et peut aussi être impliqué dans le phénotype de Multi-Drug-Resistance (MDR) (Mesaros et *al.*, 2005).

IV.1.3.1.3. Modification de la cible des bêta-lactamines

Les cibles des antibiotiques sont majoritairement des protéines. Leur mutation peut conduire à une perte de reconnaissance de l'antibiotique qui devient alors inactif. C'est le cas des PLP qui sont ciblées par les β -lactames. La mutation des PLP provoque une diminution de l'affinité pour ces antibiotiques (Hakenbeck et Coyette, 1998). Chez les entérobactéries, des souches de *Proteus mirabilis* résistantes à l'imipénème et au

Revue bibliographique

mécillinam ont été observées suite à une perte d'affinité de la PLP2 et à une diminution de la quantité de PLP1a (Grall et *al.*, 2011).

IV.1.3.2. Mécanisme enzymatique

La destruction des β -lactamines par les β -lactamases est le mécanisme de résistance majeur des bactéries à Gram négatif. Ces enzymes bactériennes qui hydrolysent la fonction amine du cycle β -lactamine, ce qui rend l'antibiotique inactif avant qu'il n'atteigne sa cible (la PLP) (**Fig.14**). Elles peuvent être chromosomiques ou plasmidiques (Livermore, 1995).

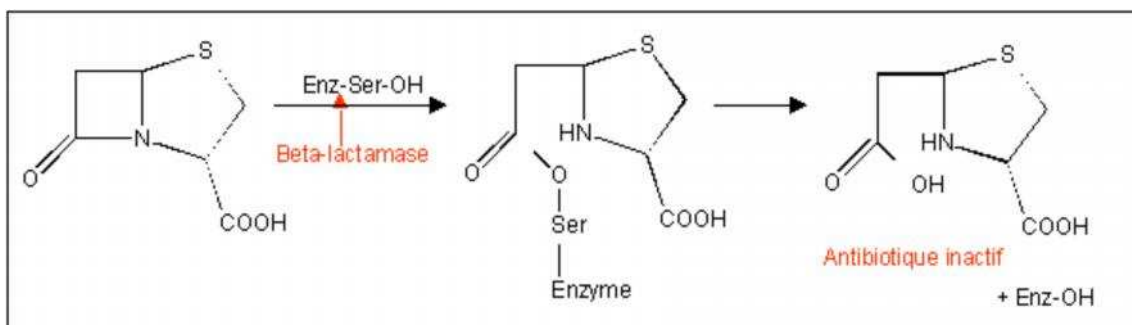


Figure 14: Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle bêta-lactame (Lagha, 2015).

IV.1.3.2.1. Classification des β -lactamases

La classification des β -lactamases est de deux types :

- ✚ Une classification moléculaire basée sur la structure primaire des β -lactamases. (Ambler, 1980). Elle propose quatre classes : A, C et D de type sérine active et classe B de métalloenzymes dont l'activité nécessite des ions métalliques, le zinc (Zn^{2+}) (Cavallo et *al.*, 2004) ;
- ✚ Une classification fonctionnelle reposant sur l'activité hydrolytique et la sensibilité des β -lactamases aux inhibiteurs comme l'acide clavulanique et l'EDTA (Bush et *al.*, 1995). Elle répartit les β -lactamases en trois groupes. C'est la classification la plus récente et la plus complète (Bush et Jacoby, 2010).

IV.1.3.2.2. Diversité de bêta-lactamases

En fonction de la nature du substrat ainsi que le spectre d'activité, les β -lactamases peuvent être regroupées comme suit :

IV.1.3.2.2.1. Les pénicillinases

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. En cas de production à haut niveau de ces enzymes (BLS), les céphalosporines de première et deuxième génération peuvent être hydrolysées à l'exception des céphamycines (Fox). Elles sont inhibées par l'acide clavulanique ou tazobactam (Cavallo et *al.*, 2004 ; Bush et *al.*, 2010). Elles sont le plus souvent portées par des plasmides, mais elles peuvent parfois se situer sur le chromosome et sont alors constitutives dans l'espèce *K. pneumoniae* (SHV-1). (Cavallo et *al.*, 2004).

Ces β -lactamases à large spectre (BLS), en particulier les enzymes de type TEM (TEM-1, TEM-2) ou SHV (SHV-1) sont les principales responsables de la résistance acquise aux pénicillines et aux céphalosporines de première génération chez les entérobactéries. (Cavallo et *al.*, 2004).

IV.1.3.2.2.2. Les céphalosporinases

Les céphalosporinases appartiennent à la classe C de la classification d'Ambler. Elles sont codées par le gène AmpC. Elles hydrolysent préférentiellement les céphalosporines dont les céphamycines, mais aussi les pénicillines et qui résistent à l'action de l'acide clavulanique et du sulbactam ; toutefois certaines sont faiblement inhibées par le tazobactam (Doi et *al.*, 2004). Elles sont décrites chez différentes espèces de bacilles à Gram négatif (Cavallo et *al.*, 2004). On distingue :

- Les céphalosporinases chromosomiques constitutives exprimées à très bas niveau chez *E. coli* ou *Shigellas* pp. De ce fait, elles ne contribuent pas de façon significative à la résistance aux bêta-lactamines chez ces espèces ; les souches restent sensibles aux aminopénicillines et aux céphalosporines de première, deuxième et troisième génération (Cavallo et *al.*, 2004).
- Les céphalosporinases chromosomiques inductibles décrites chez de nombreuses espèces d'entérobactéries (*Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*) ; le caractère inductible est défini par le fait que la synthèse des bêta-lactamases est augmentée temporairement en

présence d'une bêta-lactamine inductrice (Céfoxitine ou Imipénème) et disparaît avec l'arrêt de l'exposition (Hanson, 2003; Cavallo et *al.*, 2004).

- Les céphalosporinases plasmidiques ont été plus récemment individualisées chez des entérobactéries comme *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* ou *Salmonella spp.* Ces enzymes résultent d'un transfert des gènes chromosomiques ampC inductibles aux plasmides. (Cavallo et *al.*, 2004). Elles confèrent à des entérobactéries dépourvues du gène chromosomique ampC, un large spectre de résistance aux β -lactamines, notamment les C3G (Philippon et Arlet, 2006). Les principales céphalosporinases plasmidiques : MIR, ACT, BIL, CMY, LAT, DHA, ACC, FOX, MOX, CFE (Philippon et Arlet, 2006).

IV.1.3.2.2.3. Les carbapénèmases

Les Carbapénèmases sont des β -lactamases avec des capacités hydrolytiques polyvalentes. Elles ont la capacité d'hydrolyser les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames. Elles appartiennent à la classe A (PME, IMI, NMC, GES et KPC), classe D (OXA-23, OXA-24, OXA-48, OXA-58, OXA-143), classe B (VIM, IMP, SPM, GIM, NDM, SIM, DIM, AIM) (Queenan et Bush, 2007 ; Bedenić et *al.*, 2014). Les carbapénèmases de la classe A et D sont inhibées par l'acide clavulanique et le tazobactam (Rasmussen et *al.*, 1996), mais la classe B par l'EDTA (Frere et *al.*, 2005).

Le support peut être chromosomique comme celles retrouvées chez *Serratia marcescens* et *Enterobacter sp.* (SME-1, NMC-A et IMI-1) (Naas et *al.*, 1994) ou plasmidiques détectées chez *K. pneumoniae* (KPC-1) (Nordmann et Carrer, 2010), *Acinetobacter baumannii* (OXA-23) (Scaife et *al.*, 1995) et dans *Pseudomonas aeruginosa* (IMP-1) (Watanabe et *al.*, 1991). Plus récemment des bla_{NDM-1} ont été détectées chez : *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *oxytoca Klebsiella*, et *Morganella morganii* (Wang et *al.*, 2015).

IV.1.3.2.2.4. Les bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE)

les BLSE sont définies comme des enzymes appartenant à la classe A ou D de la classification d'Ambler, capables d'hydrolyser les pénicillines, céphalosporines de première, deuxième, troisième et quatrième génération (C1G, C2G, C3G et C4G) et l'aztréonam. Elles n'hydrolysent pas les carbapénèmes (IMP) et les cyphamycines (FOX).

Revue bibliographique

Elles sont inhibées in vitro par les inhibiteurs des β - lactamases (acide clavulanique, tazobactam et sulbactam) (Livermore, 1995 ; Livermore, 2008).

La majorité des BLSE sont dérivées de mutations ponctuelles dans la séquence génétique codant pour le site actif des β -lactamases (Bradford, 2001).

➤ **Type TEM :** La majorité des BLSE de ce type dérivent par quatre à sept mutations ponctuelles de l'enzyme originale (TEM-1 ou TEM-2). Ces mutations rendent l'enzyme capable d'hydrolyser les céphalosporines de 3^{ème} génération, mais aussi plus vulnérable à l'action des inhibiteurs (acide clavulanique). Ces enzymes sont retrouvées chez *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*, *M. morgani*, *P. mirabilis* et *Salmonella*. A noter que certains dérivés de TEM ne sont pas des BLSE mais présentent une diminution de sensibilité aux inhibiteurs, ce sont les TRI (pour TEM Résistantes aux Inhibiteurs) (Bradford et al., 2001).

➤ **Type SHV :** Les enzymes de type SHV dérivent par mutations ponctuelles de l'enzyme originale SHV-1. Elles ont été détectées parmi de nombreuses entérobactéries (notamment *K.pneumoniae*) mais aussi chez *P. aeruginosa* et *Acinetobacter spp*(Bradford et al., 2001).

➤ **Type CTX-M :** Les CTX-M, principales enzymes des céfotaximases, sont capables d'hydrolyser le céfotaxime et l'aztréonam avec une sensibilité relativement conservée à la ceftazidime. Elles sont inhibées par le tazobactam et l'acide clavulanique (Bonnet, 2004). Ces BLSE ont été retrouvées majoritairement chez *E.coli* et *Salmonella enterica*. Leur émergence parmi d'autres espèces et genres d'entérobactéries est rapide (Bonnet, 2004). La dissémination horizontale des gènes codant pour les enzymes CTX-M s'effectue via des plasmides conjugatifs mais aussi via d'autres éléments génétiques comme les intégrons et les séquences d'insertion IEScp1 (Bradford et al., 2001 ; Bonnet, 2004).

➤ **Type OXA :** Ces enzymes possèdent une grande activité catalytique pour la cloxacilline, l'oxacilline et la méticilline. Elles ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique. En général, elles hydrolysent mieux la ceftazidime que le céfotaxime. Ces enzymes ont été fréquemment observés chez *Pseudomonas aeruginosa* mais aussi chez les entérobactéries. Les BLSE de type OXA sont codées par de gènes portés par des éléments mobiles comme les transposons et les intégrons (Naas et Nordmann, 2005).

Revue bibliographique

➤ **Autres BLSE :** D'autres types plus rares de BLSE, appartenant à la classe A, incluent BES, GES-IBC, VEB, SFO, TLA et PER. Elles sont inhibées par l'acide clavulanique et en général ont le même substrat que TEM et SHV (Bradford *et al.*, 2001). A l'exemple, les enzymes du type GES et PER, VEB et IBC-2, ont été largement retrouvées chez *P. aeruginosa*, *A.baumannii* mais aussi chez les entérobactéries. Les enzymes du type VEB hydrolysent de préférence la ceftazidime et l'aztréonam et ont été retrouvées chez les entérobactéries et chez *A. baumannii* en France (Poirel *et al.*, 2003).

IV.2. Les quinolones

Les quinolones sont des antibiotiques bactéricides très largement utilisés en médecine humaine et vétérinaire. Ces molécules sont généralement classées en générations en fonction de leur spectre d'activité (Cattoir, 2012):

- Quinolones de 1^{ère} génération: acide nalidixique, acide oxolinique, acide pipémidique ;
- Quinolones de 2^{ème} génération: norfloxacine, ofloxacine, péfloxacine, ciprofloxacine;
- Quinolones de 3^{ème} génération: sparfloxacine, lévofloxacine, moxifloxacine ;
- Quinolones de 4^{ème} génération: trovafloxacine, gatifloxacine.

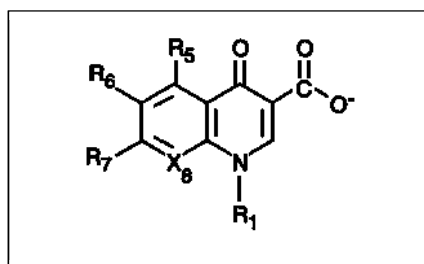


Figure 15: Structure commune des quinolones (<https://pharmacomedicale.org>).

Les antibiotiques de cette famille sont sécrétés sous une forme chimique inchangée, stable et active et sont parmi les substances antimicrobiennes les plus persistantes dans l'environnement (Goñi-Urriza *et al.*, 2000 ; Corvaglia, 2006).

IV.2.1. Mode d'action

Les quinolones inhibent certaines enzymes du métabolisme de l'ADN. Ils agissent par formation d'un complexe ternaire entre ADN et l'ADN gyrase (topoisomérase II) ou les topoisomérase IV. Ces enzymes sont directement impliquées dans les mécanismes de désenroulement et de superenroulement de l'ADN au cours de la réplication afin de faciliter l'action de l'ADN polymérase (Nordmann et Mammeri, 2007).

IV.2.2. Mécanismes de résistances aux quinolones

Plusieurs mécanismes de résistance aux quinolones ont été décrits à ce jour. Ils sont de médiation chromosomique ou plasmidique.

IV.2.2.1. Mécanismes de résistance chromosomiques

Trois mécanismes chromosomiques de résistance aux quinolones ont été rapportés. Il s'agit de (Jacoby, 2005 ; Alouache, 2012):

- modifications de la cible des quinolones ;
- diminution de l'accumulation des quinolones due à l'imperméabilité de la membrane ;
- surexpression des systèmes à efflux.

IV.2.2.2. Mécanismes de résistance plasmidique (PMQR)

La résistance aux quinolones à médiation plasmidique (PMQR, Plasmid-Mediated Quinolones Resistance) est représentée par (Alouache, 2012):

- la production de protéines **Qnr** (A, B, S, C, et B) protégeant les topoisomérase contre l'effet des quinolones ;
- l'inactivation enzymatique de certaines quinolones (*aac-6'-Ib-cr*);
- et plus récemment par la production d'une pompe à efflux codée par le gène *qepA*.

IV.3. Les aminosides

Les aminosides ou aminoglycosides sont des molécules de petite taille, présentent un large spectre, bactéricide, constituées de plusieurs cycles sucrés substitués par des fonctions amines. Ils sont classés d'après la formule chimique du noyau central en trois groupes : streptomycines, désoxystreptamines et fortimicines (Mingeot-Leclercq et *al.*, 1999).

IV.3.1. Mode d'action

Ces antibiotiques sont des inhibiteurs bactéricides de la synthèse protéique. Ils se fixent sur la sous-unité 30S du ribosome et inhibent l'étape d'initiation donnant des protéines tronquées et aberrantes (Mingeot-Leclercq et *al.*, 1999).

IV.3.2. Mécanismes de résistances aux aminosides

Trois mécanismes de résistance ont été identifiés:

- l'altération de la cible ribosomale ;
- la modification du transport ;
- l'inactivation enzymatique des aminosides qui est le mécanisme le plus fréquent (ex : phosphotransférase, nucléotidyltransférase, acétyltransférase) (Mingeot-Leclercq et *al.*, 1999).

IV.4. Les tétracyclines

Les tétracyclines ou les cyclines sont des antibiotiques bactériostatiques à large spectre, largement utilisés en médecine humaine et vétérinaires comme promoteur de croissance. Ce sont des composés de structure polycyclique complexe, lipophiles, substitués par des groupements plus ou moins hydrophiles qui forment des chélates avec les cations divalents (Chopra et Roberts, 2000).

Ces molécules comprennent un noyau naphtacène ou tétracène (4 noyaux benzéniques) (**fig. 16**) dans leur structure moléculaire. Ils sont subdivisés en (Chopra et Roberts, 2000 et N'Guyen, et Baumard, 2012):

- Composés naturels : chlortétracycline et oxytétracycline;
- Composés semi-synthétique (glycylcycline):doxycycline, minocycline, déméclocycline, méhtacyclines et tigecyclines.

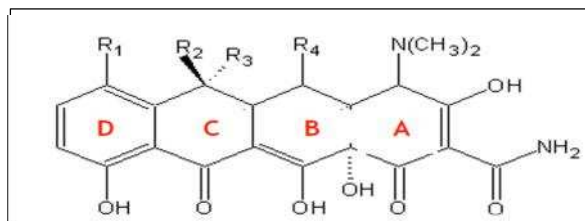


Figure 16 : Structure commune des tétracyclines (Chopra et Roberts, 2000).

IV.4.1. Mode d'action

Les tétracyclines inhibent la synthèse protéique de la cellule bactérienne. Ils pénètrent dans la bactérie par diffusion passive, s'y accumulent selon un gradient de pH transmembranaire et par complexation avec les ions Mg^{2+} se fixent sur les sous-unités ribosomales 30S, en inhibant la phase d'élongation de la traduction de l'ARN messenger en protéines (Chopra et Roberts, 2000).

IV.4.2. Mécanismes de résistances aux tétracyclines

Les principaux mécanismes de résistance des bactéries aux tétracyclines sont (Chopra Roberts, 2000 ; N'Guyen et baumard, 2012):

- la résistance par efflux actif (ex : gène *tet (A)*, *tet (B)*.....) ;
- l'inhibition de leur fixation sur leur site ribosomal (on parle de protection ribosomale) (gène *tet(O)* / gène *tet (M)*) ;
- L'inactivation enzymatique de la tétracycline (gène *tet (X)*).

MATÉRIEL ET
MÉTHODES

II

Matériel et méthodes

I. Présentation de la zone d'étude

Pour réaliser ce travail, nous nous sommes intéressées à l'étude de trois espèces de poissons vivant au niveau de la baie d'Alger.

Cette baie est située dans la région centre de la côte algérienne, de forme semi-circulaire, elle s'inscrit vers le sud en creux dans la plaine de la Mitidja. Sa superficie est approximativement de l'ordre de 180 Km².

La baie d'Alger est délimitée par deux caps (**Fig. 17**): *la Pointe Pescade* (également appelé Rais Hamidou) à l'ouest, et *le cap Matifou* (Bordj El-Bahri) à l'est. Elle est limitée au Nord par la mer Méditerranée avec une longitude Est 03°.14'.50 à 03°.00'.40 et une latitude nord 36°.49'.35 à 36°.49.50 (Leclair, 1972).

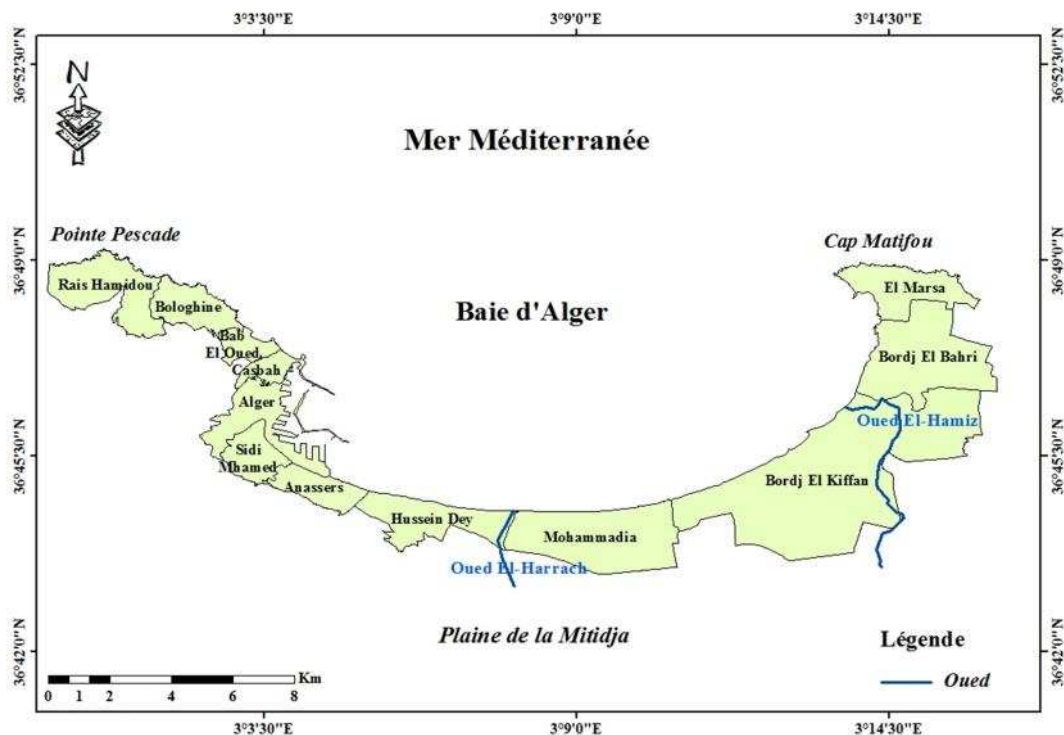


Figure 17 : Situation géographique de la baie d'Alger (Global MapAlgeria modifié)

(www.worldatlas.com)

I.1. Choix de la zone d'étude

Le choix de la baie d'Alger comme zone d'étude n'est pas fortuit, c'est en rapport avec son potentiel halieutique (production des petits métiers, senneurs et chalutiers). En effet, le port de pêche d'Alger fournit l'essentiel de l'effort de pêche de la wilaya et reçoit la quasi-totalité des débarquements. Cette production halieutique a été estimée à 280 tonnes en 2010, avec une répartition relativement égale entre les petits poissons démersaux du port

Matériel et méthodes

(34%), les crustacés (30%) et les petits pélagiques (26%) (CAR/ASP – PNUE/PAM, 2013). Cependant, cette baie est le réceptacle de divers rejets traités ou non traités d'origine urbaine, industrielle et agricole qui menacent cette activité (**Fig.18**). Les principales sources de pollution de cette baie sont :

- **Les émissaires urbains**

Une multitude d'égouts d'eaux usées domestiques et industrielles aboutissent au port ou dans divers endroits de la baie d'Alger, environ soixante-dix points de rejet ont été recensés (**Fig. 18**). Le port reçoit entre 500.000 et 700.000 m³/jour (PAC, 2005). Les autres émissaires urbains les plus importants sont ceux de Bab El Oued, Hussein Dey et Bordj El Kiffan (Bakalem, 2008).

- **Les oueds d'El Harrach et d'El Hamiz**

Ils traversent la plaine de Mitidja, lieu d'une intense activité agricole. Ils drainent vers la mer toutes les eaux usées domestiques, agricoles et industrielles des zones qu'elles traversent. Ces eaux usées chargées sont génératrices d'une pollution organique (Bakalem, 2008).

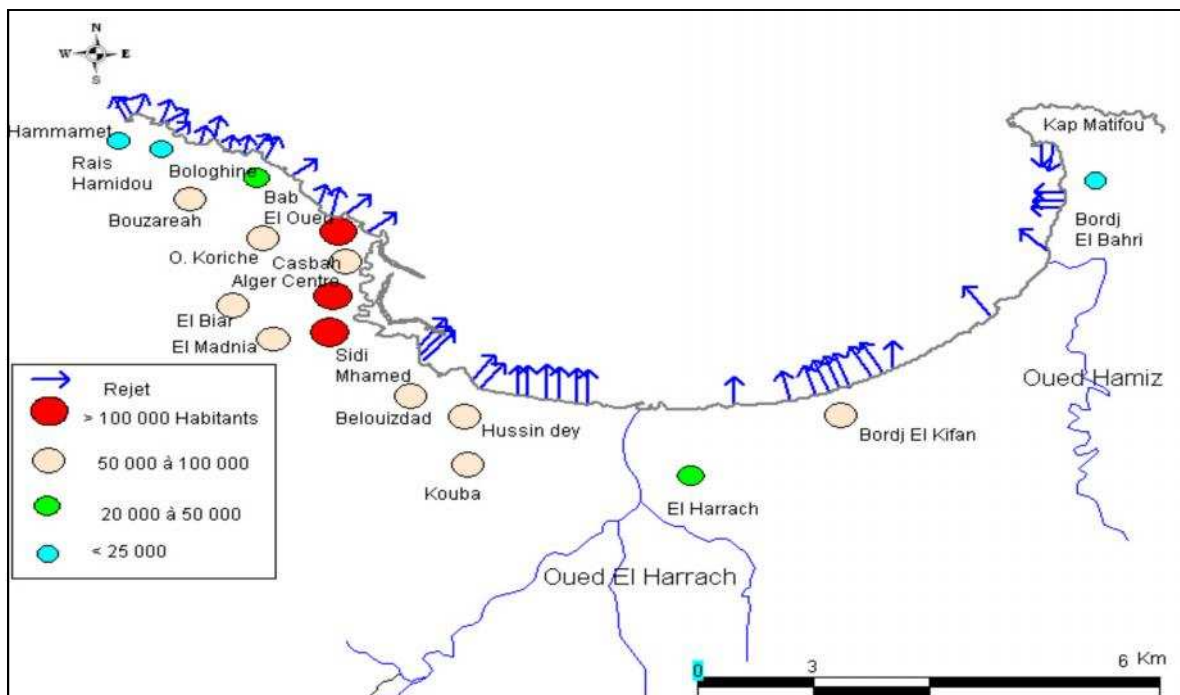


Figure 18 : Carte de la côte algéroise montrant les principales sources de rejets d'eaux usées dans la baie d'Alger (Houma, 2009).

Matériel et méthodes

II. Matériel

II.1. Choix des espèces

Le travail a été réalisé sur trois espèces de poisson, un poisson benthique: *Mullus surmuletus* (rouget de roche), un poisson pélagique : *Sardina pilchardus* (sardine) et un poisson benthopélagique : *Mugil cephalus* (mulet).

Le choix de ces espèces a été motivé par les critères suivants :

- Leur habitat (benthique, pélagique et benthopélagique).
- Leur disponibilité tout au long de l'année.
- Leur consommation par la population.

Dans notre recherche, la taille, le sexe et l'âge des poissons n'ont pas été pris en considération.

II.2. Echantillonnage des poissons

Les échantillons ichtyologiques ont été récoltés au niveau de la pêcherie d'Alger une fois par quinzaine ou par mois, durant une période de 5 mois, allant de Mai à Octobre 2015 (**Tab.2**). Un kilogramme de chaque espèce de poisson a été prélevé aléatoirement, déposé séparément dans des sachets en plastique à usage unique. Les échantillons ont été transportés au laboratoire dans une glacière et traités dans les 6 heures au maximum qui ont suivi le prélèvement.

Tableau 2 : Dates et type de prélèvement.

Dates de prélèvement	Espèces
03.05.2015	Sardine-Rouget-Mulet
19.05.2015	Sardine-Rouget
31.05.2015	Sardine-Rouget-Mulet
09.06.2015	Sardine-Rouget-Mulet
26.08.2015	Sardine-Rouget-Mulet
14.09.2015	Sardine-Rouget-Mulet
12.10.2015	Sardine-Rouget-Mulet

Matériel et méthodes

II.3. Les antibiotiques

Les antibiotiques en poudre ont été utilisés dans deux types d'expérimentation:

- La détermination des concentrations minimales inhibitrices des antibiotiques (CMI), amoxicilline, céfotaxime, ceftazidime, imipénème, ciprofloxacine, gentamicine et tétracycline
- La sélection des transconjugants dans des essais de transfert génétique par conjugaison bactérienne.

Les antibiotiques en disques (bio-analyse) (**Tab. 3**) ont été utilisés pour la réalisation de l'antibiogramme, le test de synergie et le test d'antagonisme.

Tableau 3 : Liste des antibiotiques en disques utilisés.

Famille	Nom de l'antibiotique	Abréviation	Charge
Béta-lactamines	Amoxicilline	AMX	25 µg
	Amoxicilline + acide clavulanique	AMC	10/20 µg
	Pipéracilline	PIP	75 µg
	Céfoxitine	FOX	30 µg
	Céfotaxime	CTX	30 µg
	Céftazidime	CAZ	30 µg
	Céfprome	CPO	30 µg
	Aztréoname	ATM	30 µg
	Imipénème	IMP	10 µg
Aminosides	Kanamycine	K	30 UI
	Gentamicine	GM	10 UI
	Amikacine	AN	30 µg
Tétracyclines	Tétracycline	TE	30 UI
Phénicolés	Chloramphénicol	C	30 µg
Triméthoprimes	Triméthoprim	TMP	5 µg
Sulfamides et associations	Triméthoprim + Sulfaméthoxazole	SXT	1,25 / 23,75 µg
Quinolones	Acide nalidixique	NA	30 µg
	Ciprofloxacine	CIP	5 µg

Matériel et méthodes

II.4. Les souches de référence

Deux souches de référence ont été utilisées:

- *E. coli* ATCC 25922 pour le contrôle de l'antibiogramme et des CMI.
- *E. coli* K12 BM21 résistante à l'acide nalidixique et à l'azide de sodium (NA^RAZ^R) comme réceptrice dans les transferts génétiques par conjugaison.

III. Méthodes

III.1. Préparation des échantillons de poissons pour l'analyse microbiologique

Les échantillons ont été lavés à l'extérieur avec de l'eau distillée stérile pour réduire la contamination potentielle extérieure. La préparation des échantillons a été faite selon les recommandations d'EAS, (2008).

Dans le cas de la sardine et du rouget, 25g du broyat obtenu à partir de 4 à 5 individus ont été dilués dans 225 ml d'Eau Peptonée Tamponnée (EPT). Les suspensions ainsi préparées sont maintenues à température ambiante durant 15-20 min afin de permettre la revivification des microorganismes présents. Chaque suspension correspond à une solution mère (1/10) à partir de laquelle des dilutions décimales successives sont préparées.

Dans le cas du mulot, en raison de son poids qui peut atteindre 1 Kg (gros espèce), nous avons travaillé sur un ou deux individus en procédant à un échantillonnage représentatif (chair, peau, intestin, branchies...). La même procédure utilisée pour la sardine et le mulot a été adoptée pour la préparation de la suspension mère du mulot.

III.2. Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale et des coliformes totaux dans les poissons

Le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale et des coliformes totaux contenus dans les poissons a été effectué par la méthode d'ensemencement en surface en utilisant la gélose Mueller Hinton pour la flore mésophile aérobie totale et la gélose Mac Conkey les coliformes totaux (Miranda et Zemelman, 2001 ; Matyar et *al.*, 2004).

Matériel et méthodes

III.2.1. Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale

Un volume de 100 µl de la suspension mère et de chaque dilution a été étalé à la surface de la gélose Mueller Hinton. L'opération a été réalisée en duplicata et les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 heures.

On retient les deux boîtes de la dilution donnant un nombre compris entre 30 et 300 colonies. Le nombre de colonies trouvées sera exprimé en Unité Formant une Colonie par gramme de poisson (UFC/g).

$$FMAT = \left[\frac{\sum \text{UFC/g}}{2} \right] \times \frac{1}{d}$$

d : facteur de la dilution retenue

III.2.2. Dénombrement des coliformes totaux et thermo-tolérants

Un volume de 100 µl de la suspension mère et de chaque dilution a été étalé à la surface de la gélose Mc Conkey. L'opération a été réalisée en duplicata et les boîtes ont été incubées pendant 24 heures à 37°C pour les coliformes totaux et à 44°C pour les coliformes thermotolérants (fécaux). Le dénombrement des coliformes totaux et thermotolérants se fait par comptage des colonies rouges (lactose positives) entourées d'un halo opaque (précipitation des sels biliaires).

L'expression des résultats se fait de la même manière que pour la flore mésophile aérobie totale.

$$CT \text{ ou } CF \left(\frac{UFC}{g} \right) = \left[\frac{\sum \text{du nombre des colonies des 2 boîtes de la dilution retenue}}{2} \right] \times \frac{1}{d} \times 10$$

III.2.3. Détection et prévalence de la résistance aux antibiotiques

Des aliquotes de 0,1 ml de la suspension mère et des dilutions ont été étalés à la surface des géloses Mueller Hinton (FMAT) et Mac Conkey (CT) additionnées de l'un des antibiotiques suivants: amoxicilline (AMX), céfotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), imipénème (IMP), ciprofloxacine (CIP), gentamicine (GM) et tétracycline (TE). Les concentrations critiques d'antibiotiques utilisées sont mentionnées dans le tableau 4.

Matériel et méthodes

Tableau 4: Les concentrations critiques d'antibiotiques utilisées pour la sélection des bactéries résistantes (CA-SFM, 2015).

Antibiotiques	Concentration µg/ml
Amoxicilline (AMX)	8
Céfotaxime (CTX)	2
Céftazidime (CAZ)	4
Imipénème (IMP)	8
Ciprofloxacine (CIP)	1
Gentamicine (GM)	4
Tétracycline (TE)	2

Le taux de bactéries résistantes a été déterminée par le rapport du nombre de bactéries obtenues sur gélose Mac Conkey et Mueller Hinton additionnée d'antibiotique sur le nombre de de coliformes totaux et de bactéries mésophiles aérobies totales obtenus sur milieu sans antibiotique, respectivement (Miranda et Zemelman, 2001; Alouache et *al.*, 2012).

$$\text{Prévalence de résistance \%} = \left[\frac{\text{Nombre de bactéries sur milieu avec antibiotique}}{\text{Nombre de bactéries sur milieu sans antibiotique}} \cdot 100 \right] \cdot 100$$

III.3. Identification des bactéries résistantes

Les souches ayant présenté une résistance aux antibiotiques AMX, CTX, CAZ, IMP, CIP, GM et TE ont fait l'objet d'un ré-isolément sur une gélose Mueller-Hinton supplémenté de l'antibiotique approprié afin de confirmer leur résistance, d'une identification par galeries API 20E (Bio Mérieux) et d'une conservation en gélose de conservation en tube.

Le système API 20E d'identification des entérobactéries et autres bacilles à Gram négatif comporte 20 tests biochimiques standardisés et miniaturisés.

Les milieux déshydratés sont reconstitués avec une suspension bactérienne préparée dans 5 ml d'eau physiologique (0.9% NaCl) à partir de 1 à 3 colonies pures d'une culture jeune (18h). Les réactions produites pendant la durée d'incubation (24-48 h à $35 \pm 2^\circ\text{C}$) se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La codification des réactions en un profil numérique permet, en se référant à un catalogue analytique fourni par le fabricant, de déterminer l'identification des souches bactériennes.

Matériel et méthodes

Le test de l'oxydase a été réalisé en déposant quelques colonies de la bactérie à identifier sur un disque contenant l'oxalate de diméthyl-paraphénylène-diamine qui est incolore (commercialisé prêt à l'emploi). L'apparition d'une coloration violette est indicative de la présence de l'oxydase.

III.4. Etude de la sensibilité aux autres antibiotiques par antibiogramme

➤ Principe

L'étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques est réalisée selon la méthode de diffusion des antibiotiques en disques en milieu gélose (Courvalin *et al.*, 1985; CA-SFM, 2015). Celle-ci est basée sur l'observation de la croissance bactérienne en présence d'un gradient de concentration d'antibiotique obtenu par diffusion des antibiotiques à partir des disques. Ce gradient est inversement proportionnel à la distance par rapport aux disques. La croissance bactérienne s'arrête lorsque les bactéries sont en contact avec une concentration inhibitrice autour du disque d'antibiotique.

➤ Technique

A partir d'une culture de 18-24 h sur milieu gélosé non sélectif (Mueller Hinton), une suspension bactérienne en eau physiologique (0.9% NaCl) est réalisée afin d'atteindre une turbidité équivalente à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de Mc Farland. Cet inoculum est ensemencé par écouvillonnage sur la surface d'une gélose de Mueller-Hinton préalablement séchée. Après une pré-diffusion des antibiotiques à température ambiante pendant 15 min et incubation pendant 18-24 h à $35\pm 2^\circ\text{C}$, la lecture des boîtes de culture est faite en mesurant avec précision les diamètres d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.

Les résultats sont interprétés selon les diamètres d'inhibitions indiquées dans les communiqués du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie de 2013 et 2015.

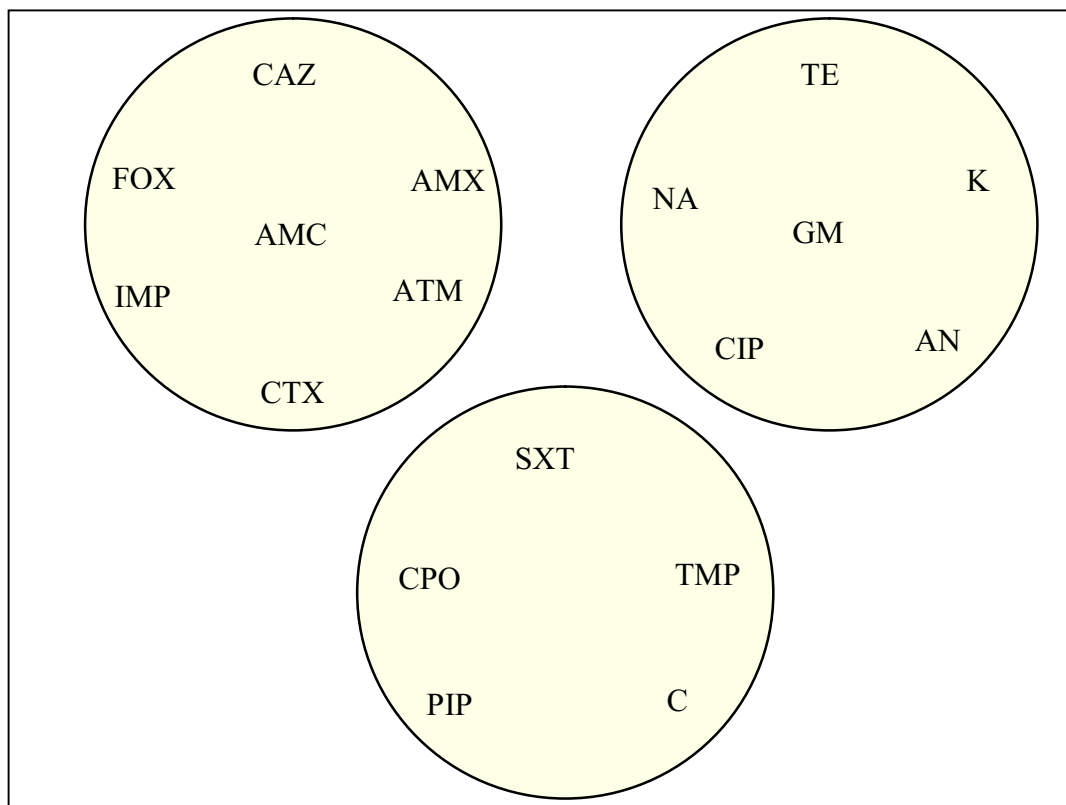


Figure 19 : Schéma de la disposition des disques d'antibiotiques.

III.5. Détection des céphalosporinases inductibles: test d'antagonisme

La production des céphalosporinases inductibles est mise en évidence par l'apparition d'une image d'antagonisme entre un antibiotique inducteur (céfoxitine ou imipénème) et un antibiotique actif (céphalosporines de 3^{ème} ou 4^{ème} génération), qui se traduit par la diminution de l'activité de la bêta-lactamine initialement active (Vedel, 1997).

Un inoculum de 10^8 cellule/ml est utilisé pour l'ensemencement d'une gélose de Mueller-Hinton préalablement séchée. Les disques de CAZ ou CTX sont déposés à 3 cm d'un inducteur de céphalosporinase (IMP ou FOX). Après une pré-diffusion des antibiotiques à température ambiante pendant 15 min, les boîtes sont incubées à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 18 à 24 h. Une souche est dite productrice de céphalosporinase inductible s'il y a une diminution significative du rayon d'inhibition de l'antibiotique indicateur du côté du disque de l'inducteur.

III.6. Détection des bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE)

La production d'une BLSE peut être détectée par la mise en évidence d'une synergie entre des céphalosporines de 3^{ème} ou 4^{ème} génération (céfotaxime, ceftazidime, céfépime) et un inhibiteur de cette enzyme tel que l'acide clavulanique. Les disques des antibiotiques indicateurs et celui de l'inhibiteur (ex. amoxicilline+clavulanate, AMC) sont déposés à une distance de 30 mm. La présence d'une BLSE se traduit par l'apparition d'une image de synergie du côté de l'inhibiteur. Toutefois, si les isolats testés sont aussi producteurs d'autres mécanismes de résistance aux β -lactamines comme l'hyperproduction de céphalosporinase, la détection de l'image de synergie peut être facilitée par la réalisation du test en présence de la cloxacilline (250 mg/l) qui est un inhibiteur de la céphalosporinase (Jarlieret *al.*, 1988; Vedel, 1997).

III.7. Transfert génétique par conjugaison bactérienne en milieu solide

A partir de cultures de 18 heures sur bouillon Brain Heart Infusion Agar (BHIB), un volume de la souche donatrice et deux volumes de la souche réceptrice sont mélangés et centrifugés à 12000 rpm pendant 2 minutes. Le culot est remis en suspension dans 100 μ l d'eau physiologique stérile, lesquelles sont utilisées pour l'ensemencement d'une gélose Mueller Hinton à l'aide de spot de 20 μ l. Après une incubation de 24 h à 37°C, la culture mixte est mise en suspension dans de l'eau physiologique stérile et ensemencé sur une gélose de Mueller Hinton supplémentée d'Azide de Sodium (250 μ g/ml) et de l'un des antibiotiques, céfotaxime (2 μ g/ml) ou amoxicilline (8 μ g/ml), ou céfoxitine (8 μ g/ml) ou imipénème (8 μ g/ml). Après incubation à 37°C pendant 24 h, les souches réceptrices ayant acquis le caractère de résistance à l'un des antibiotiques (clones transconjugants) sont réisolées à partir des boîtes de sélection. Les transconjugants sont analysés par antibiogramme pour déterminer leur profils de résistance (Bakour et *al.*, 1983; Courvalin et *al.*, 1985).

III.8. Extraction de l'ADN total bactérien

L'ADN a été extrait selon la méthode de Feria et *al.* (2002). A partir d'une culture de 18h sur gélose MH, 4 à 5 colonies bactériennes sont mises en suspension dans 200 μ l d'eau distillée stérile qui sont porté à ébullition pendant 10 min. Le lysat obtenu est ensuite centrifugé à 12000 tours/minute à 4°C pendant 2 min et le surnagent contenant l'ADN est

Matériel et méthodes

récupéré dans un eppendorf stérile et conservé à -20°C. Cet extrait a été utilisé comme matrice pour la réalisation des PCR.

III.9. Recherche de gènes de résistance par PCR

➤ Principe

La Réaction de Polymérisation en Chaîne (de l'anglais Polymerase Chain Reaction ou PCR) est une technique d'amplification de l'ADN *in vitro*. Elle permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie. Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes : une dénaturation de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins qui le composent, une hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée, puis une élongation grâce à l'action d'une ADN polymérase thermophile (Markoulatos et *al.*, 2002).

III.9.1. Recherche des gènes de bêta-lactamases et bêta-lactamases à spectre élargi par PCR Simplex

La PCR simplex a été programmée pour la recherche des gènes de bêta-lactamases et des bêta-lactamases à spectre élargi (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{VEB}, *bla*_{PER} et *bla*_{GES}) ont été recherchés par PCR. Les réactions ont été réalisées dans un volume final de 12.5 µl comprenant :

PCR master Mix (2X).....	6.25µl.
Amorce forward 0.25 µM	0.25µl.
Amorce reverse 0.25µM	0.25µl.
H ₂ O.....	3.25µl.
ADN.....	2.5µl.

Les séquences des amorces et les programmes utilisés sont décrits dans le tableau 5.

Les produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.

Matériel et méthodes

III.9.2. Recherche de gènes de céphalosporinases

La PCR multiplex utilise des paires multiples d'amorces pour amplifier simultanément un grand nombre de séquences contrairement à une PCR simple où une paire d'amorces est utilisée. Elle a été utilisée dans l'identification des gènes de céphalosporinases plasmidiques telles que : MOX, FOX, CIT, EBC, ACC et DHA. Les réactions ont été réalisées dans un volume final de 25 µl comprenant:

PCR master Mix (2X).....	12.5µl.
FOX-MF 0.4 µM	0.4µl.
FOX-MR 0.4 µM	0.4µl.
MOX-MF 0.6 µM	0.6µl.
MOX-MR 0.6 µM	0.6µl.
CIT-MF 0.6 µM	0.6µl.
CIT-MR 0.6 µM	0.6µl.
DHA-MF 0.6 µM	0.6µl.
DHA-MR 0.6 µM	0.6µl.
ACC-MF 0.5 µM	0.5µl.
ACC-MR 0.5 µM	0.5µl.
EBC-MF 0.5 µM	0.5µl.
EBC-MR 0.5 µM	0.5µl.
H ₂ O.....	1.1µl.
ADN	5µl.

Les séquences des amorces et les programmes utilisés sont décrits dans le tableau 5.

Les produits d'amplification ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 2%.

Matériel et méthodes

Tableau 5: Les séquences des amorces utilisées pour la recherche des bêta-lactamases.

Gène	Séquences des amorces 5'-3'	Taille (pb)	Programme	Référence
<i>bla</i> _{TEM}	Up : ATGAGTATTCAACATTTCCG Low : CCAATGCTTAATCAGTGAGG	858	94°C/10min 30 cycles : 94°C/40sec 52°C/30sec 72°C/40sec 72°C/10min	Yates et al., 2003.
<i>bla</i> _{SHV}	Up : TTATCTCCCTGTTAGCCACC Low : GATTTGCTGATTTGCTCGG	795	94°C/10min 30 cycles : 94°C/40sec 50°C/30sec 72°C/40sec 72°C/10min	Weill et al., 2004.
<i>bla</i> _{CTX-M}	Up : GGTTAAAAAATCACTGCGTC Low : TTGGTGACGATTTTAGCCGC	550	94°C/10min 30 cycles : 94°C/40sec 55°C/30sec 72°C/40sec 72°C/10min	Kim et al., 2004.
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	Up : GGTTAAAAAATCACTGCGTC Low : TTGGTGACGATTTTAGCCGC	863		
<i>bla</i> _{PER}	PER F : AATTTGGGCTTAGGGCAGAA PER B : ATGAATGTCATTATAAAAGC	925		
<i>bla</i> _{VEB}	VEB-F : CGACTTCCATTTCCCGATGC VEB-B : GGACTCTGCAACAAATACGC	643	94°C/10min 30 cycles : 94°C/40sec 55°C/30sec 72°C/40sec 72°C/10min	
<i>bla</i> _{GES}	Up : ATGCGCTTCATTCACGCAC Low : CTATTTGTCCGTGCTCAGG	846		
<i>amp</i> _{MOX}	MOX-MF : GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT MOX-MR: CACATTGACATAGGTGTGGTGC	520	94°C/3min 25 cycles : 94°C/30sec 64°C/30sec 72°C/1min 72°C/7min	Pérez-Pérez et Hanson, 2002.
<i>amp</i> _{CIT}	CIT-MF : TGGCCAGAACTGACAGGCAAA CIT-MR: TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	462		
<i>amp</i> _{DHA}	DHA-MF : AACTTTCACAGGTGTGCTGGG T DHA-MR: CCGTACGCATACTGGCTTTGC	405		
<i>amp</i> _{ACC}	ACC-MF : AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA ACC-MR : TTCGCCGCAATCATCCCTAGC	346		
<i>amp</i> _{EBC}	EBC-MF : TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG EBC-MR : CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	302		
<i>amp</i> _{FOX}	FOX-MF : AACATGGGGTATCAGGGAGAT G FOX-MR: CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	190		

Matériel et méthodes

III.10. Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une technique qui permet de séparer les molécules chargées selon leur taille respective. Sous l'action d'un champ électrique, les acides nucléiques étant chargés négativement, vont migrer vers l'anode plus ou moins rapidement en fonction de leur poids moléculaire et leur conformation (Sambrook et *al.*, 1989).

Les produits des PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (12x20 cm) à 1% pour les produits des PCR simplex et 2% pour ceux des PCR multiplex, additionné de bromure d'éthidium à 0,5µg/ml, dans le tampon TBE 1X, sous un voltage de 50V pendant 1h.

Les amplifiats sont additionnés d'une solution de dépôt (Glycérol 50%, EDTA-Na₂ 100mM, pH=8, et bleu de bromophénol 0.2%, SDS 3%.) à raison de 1µl pour 5µl d'ADN. Après l'électrophorèse, les bandes d'ADN sont visualisées à l'aide d'un transilluminateur à UV. La taille des produits d'amplification a été déterminée en utilisant le marqueur 100pb DNA Ladder (Proméga).

- **Tampon TBE 10X** (pH: 8.3): 890 mM de Tris Base, 890 mM d'acide borique, 19mM d'EDTA.

IV. Analyse statistique

L'analyse de variance (ANOVA) à l'aide du logiciel STATISTICA 5.1 a été utilisée, pour étudier l'effet de l'habitat sur les taux de résistance, ainsi que la variation des taux de résistance selon les molécules d'antibiotiques.

Cette méthode d'analyse consiste à chercher les moyennes qui diffèrent significativement les unes des autres. Les différences sont considérées comme significatives lorsque la probabilité calculée P est inférieure à la probabilité théorique $P= 0.05$ ($P<0.05$). La comparaison des moyennes a été effectuée à l'aide du test de la différence significative (HSD) de Tukey.

RÉSULTATS ET
DISCUSSION

III

Résultats et discussion

I. Analyse microbiologique des différents échantillons de poissons

Les résultats de l'analyse microbiologique de la flore mésophile aérobie totale, et des coliformes totaux et thermo-tolérants sont représentés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Flores microbiennes dénombrées dans les échantillons de poissons (UFC/g).

Type de poisson	Type de flore	Echant. du 03/05/15	Echant. du 19/05/15	Echant. du 31/05/15	Echant. du 09/06/15	Echant. du 26/08/15	Echant. du 14/09/15	Echant. du 12/10/15	Moyenne
Sardine	FMT	75000	30650	42000	144000	340000	400000	15000	$1.5 \cdot 10^5$
	CT	40	2300	2310	2840	7900	7000	1000	$0.33 \cdot 10^4$
	CF	30	215	1335	110	1080	80	20	$0.41 \cdot 10^3$
Rouget	FMT	26000	75500	18800	47300	107500	400000	19000	$0.99 \cdot 10^5$
	CT	0	100	3330	1600	800	20000	3000	$0.41 \cdot 10^4$
	CF	0	10	2540	0	10	450	50	$0.44 \cdot 10^3$
Mulet	FMT	18700	/	77000	100000	210000	350000	35500	$1.32 \cdot 10^5$
	CT	1900	/	19000	80000	150000	300000	9000	$9.33 \cdot 10^4$
	CF	105	/	9120	3050	1500	10000	4000	$4.63 \cdot 10^3$

FMT : flore mésophile aérobie totale, CT : coliformes totaux, CF : coliformes fécaux ou thermotolérants, / : non déterminé.

- La flore mésophile aérobie totale correspond à des bactéries indicatrices de l'état d'hygiène, son dénombrement permet d'apprécier la qualité microbiologique du poisson et l'application des bonnes pratiques d'hygiène (Anihouvi et al., 2009).

La flore mésophile totale va de $1.5 \cdot 10^4$ UFC/g en mois d'Octobre à $4 \cdot 10^5$ UFC/g en mois de Septembre pour la sardine, avec une plus grande charge en période d'été (Juin à Septembre). Les mêmes constatations ont été notées pour la FMT du rouget, les valeurs vont de $1.88 \cdot 10^4$ à $4 \cdot 10^5$ UFC/g avec une grande charge en périodes en Aout et Septembre. Pour le mullet, les valeurs de $1.87 \cdot 10^4$ UFC/g au mois de Mai à $3.5 \cdot 10^5$ UFC/g au mois de Septembre ont été retrouvées, avec une charge élevée entre les mois de Juin et Septembre.

- Les coliformes sont des bactéries commensales de l'intestin de l'homme et des animaux. Elles sont témoins d'une contamination fécale. Leur recherche permet d'apprécier l'état de l'environnement des poissons et de suivre l'hygiène observée par les manipulateurs (Bornert, 2000). Les résultats des coliformes totaux montrent des valeurs allant de 40 à 7900 UFC/g pour la sardine avec un maximum en période d'été (Aout –Septembre), de 0 à $2 \cdot 10^4$ UFC/g pour le rouget avec un maximum au mois de Septembre et de 1900 à $3 \cdot 10^5$ UFC/g pour le mullet avec un maximum en période d'été (Aout –Septembre). Pour les coliformes thermotolérants qui sont des indicateurs encore plus spécifique d'une

Résultats et discussion

contamination fécale, des valeurs allant de 20 à 1335 UFC/g ont été retrouvées pour la sardine avec un maximum au mois de Mai (S3), de 0 à 2540 UFC/g pour le rouget avec un maximum toujours au mois de Mai (S3) et de 105 à 10^5 UFC/g pour le mullet avec un maximum aux mois de Mai (S3) et Septembre.

La concentration moyenne en coliformes totaux et thermotolérants est faible chez le rouget ($0.41 \cdot 10^4$ UFC/g et $0.44 \cdot 10^3$ UFC/g) et la sardine ($0.33 \cdot 10^4$ UFC/g, $0.41 \cdot 10^3$ UFC/g). Par contre, elle est plus élevée chez le mullet ($9.33 \cdot 10^4$ UFC/g et $63 \cdot 10^3$ UFC/g) (**Tab. 6**). Ceci peut s'expliquer par le fait que ce poisson vit à proximité des zones polluées par les eaux usées riches en matières fécales (embouchure, port).

La forte contamination des poissons par les coliformes thermotolérants peut constituer un risque sanitaire par la production d'histamine, une amine biogène résistante à la chaleur et toxique pour l'homme (Sitti, 2001). L'autre risque sanitaire tient au fait que ces bactéries sont prédictives de la présence associées à des bactéries pathogènes comme les salmonelles, shigelles et vibrio (Guiraud, 1998).

II. Prévalence de la résistance aux antibiotiques dans les poissons

Les poissons qu'on a récolté au niveau de la pêcherie d'Alger (à savoir la sardine commune, le rouget de roche et le mullet cabot), ont fait l'objet : d'une étude de la prévalence de la résistance aux antibiotiques parmi la flore mésophile aérobie totale et des coliformes totaux vis-à-vis de sept molécules d'antibiotiques: amoxicilline, céfotaxime, céftazidime, imipénème, ciprofloxacine, gentamicine et tétracycline.

II.I. Prévalence de la résistance aux antibiotiques chez la flore mésophile aérobie totale

L'évaluation de la résistance aux antibiotiques chez la flore mésophile aérobie totale isolée des poissons a été effectuée sur des échantillons collectés entre les mois de Mai et Octobre 2015. Les résultats sont représentés dans les figures **20, 21 et 22**.

Résultats et discussion

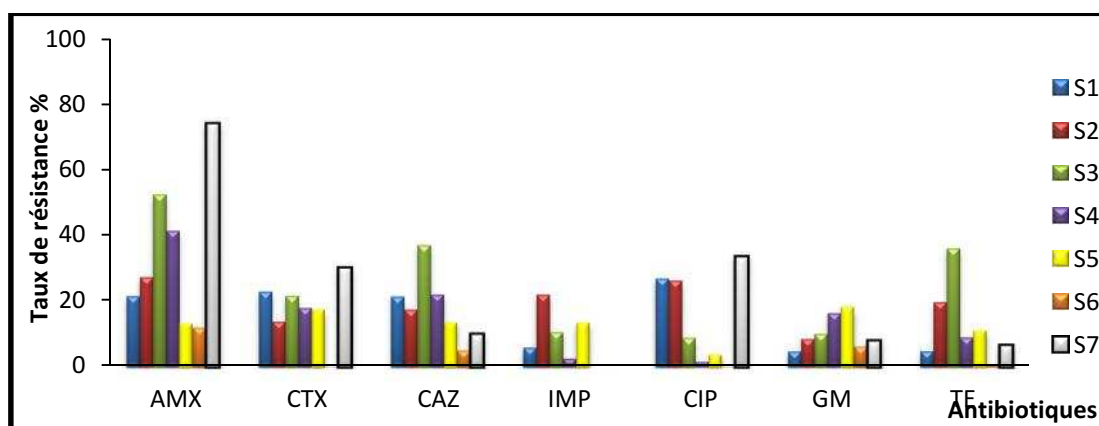


Figure 20 : Taux de résistance aux antibiotiques de la flore mésophile aérobie totale chez *Sardina pilchardus* (la sardine commune).

AMX: amoxicilline ; *CTX* :céfotaxime ; *CAZ*: céftazidime; *IMP*: imipénème; *CIP*: ciproflaxacine; *GM*: gentamicine; *TE*: tétracycline

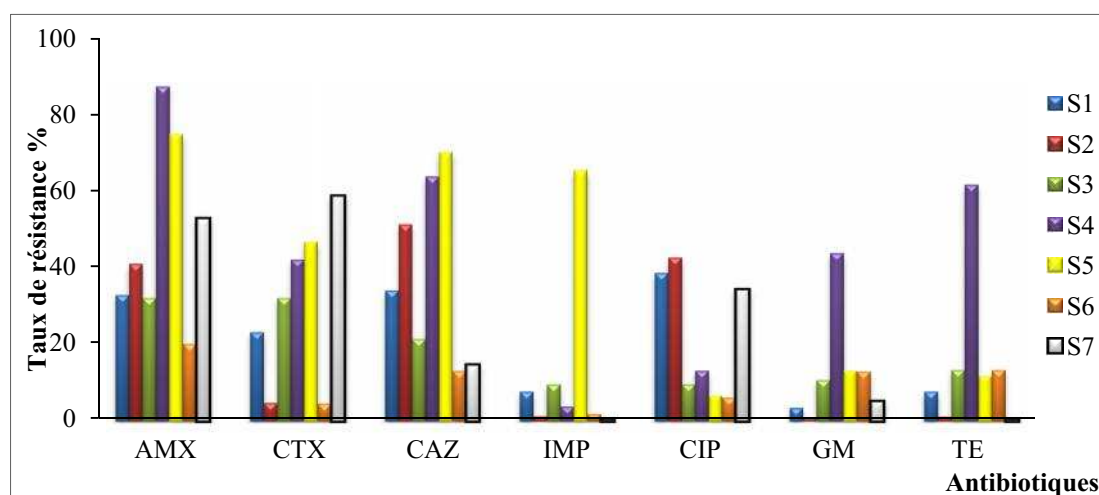


Figure 21: Taux de résistance aux antibiotiques de la flore mésophile aérobie totale chez *Mullus surmuletus* (le rouget de roche).

AMX: amoxicilline ; *CTX* :céfotaxime ; *CAZ*: céftazidime; *IMP*: imipénème; *CIP*: ciproflaxacine; *GM*: gentamicine; *TE*: tétracycline

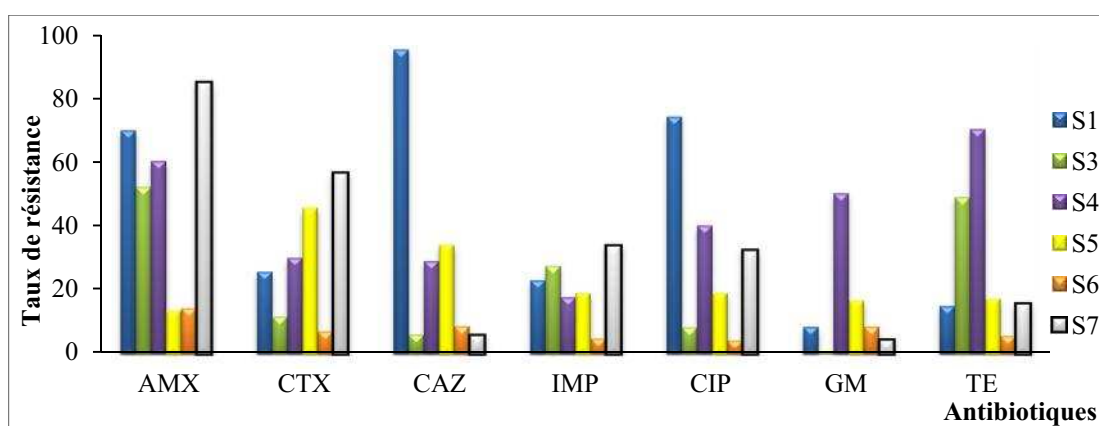


Figure 22: Taux de résistance aux antibiotiques de la flore mésophile aérobie totale chez *Mugil cephalus* (le mullet).

AMX: amoxicilline ; *CTX* : céfotaxime ; *CAZ*: céftazidime; *IMP*: imipénème; *CIP*: ciproflaxacine; *GM*: gentamicine; *TE*: tétracycline.

Résultats et discussion

• Taux de résistance de la flore mésophile aérobie totale chez la sardine commune

Les résultats représentés dans la figure 20 montrent des taux de résistance élevés de la flore mésophile aérobie totale vis-à-vis de l'amoxicilline notamment aux mois de Mai et Octobre avec 51,9% et 73,3%, respectivement. Des pourcentages moyens ont été observés pour le céfotaxime, céftazidime et ciprofloxacine pour les échantillons prélevés au cours des 7 sorties (CTX : 22.7%, 13.7%, 21.4%, 17.8%, 17.4%, 0% et 30%), (CAZ : 21.2%, 17.3%, 36.7%, 21.9%, 13.4%, 5% et 10%) et (CIP : 26.7%, 26,7%, 8.8%, 1.5%, 3.8%, 0% et 33.3%). L'imipénème, la gentamicine et la tétracycline ont été actifs sur la majorité des souches (IMP : 5.8%, 10.5%, 2.5%, 13.4%, 0%, et 0%), (GM : 4.7%, 8.5%, 10%, 16.3%, 18.1%, 6.23% et 8%) et (TE : 4.8%, 19.6%, 9%, 11%, 0% et 6.7%), à l'exception du mois de Mai où les taux de résistance à l'imipénème et à la tétracycline ont été moyens (IMP : 21.9% et TE : 35.7%).

• Taux de résistance de la flore mésophile aérobie totale chez le rouget de roche

Les taux de résistance de la flore mésophile aérobie totale isolée du rouget de roche au cours des sept sorties sont représentés dans la figure 21. Ils ont été élevés vis-à-vis de l'amoxicilline (32.7%, 40.8%, 31.9%, 86.7%, 74.4%, 20%, 52.6%), suivi de ceux de la ceftazidime avec 33.9%, 51%, 21.3%, 63.4%, 69.8%, 13%, 14.7% et du céfotaxime avec 23.1%, 4.8%, 31.9%, 41.9%, 46,5%, 4.6%, 58.4%. Des taux moyens (38.5%, 42.4%, 34.2%) à faibles (13.1%, 6.7%, 6.1%) ont été enregistrés pour la ciprofloxacine.

Par contre, Les taux ont été globalement faibles pour l'imipénème (IMP : 7.69%, 1.32%, 9.6%, 3.8%, 65.12%, 1.88% et 0.53%), la tétracycline (TE : 7.69%, 1.19%, 13.3%, 61.3%, 11.8%, 13.3% et 0.53) et la gentamicine (GM : 3.5%, 0.8%, 10.6%, 43.6%, 13.1%, 12.9% et 5.3%), à l'exception des échantillons S5 pour l'IMP et S4 pour TE et GM pour les lesquels des taux de résistance élevés ont été observé pour l'IMP ainsi que pour TE et GM dans les échantillons S5 et S4, respectivement.

Taux de résistance de la flore mésophile aérobie totale chez le mulot cabot

La figure 22 représente les taux de résistance de la flore mésophile aérobie totale chez le mulot cabot pour les six échantillonnages.

Les taux de résistance ont été globalement assez importants pour l'amoxicilline (AMX : 69.5%, 52%, 60%, 13.5%, 14.3% et 84.5%). Pour le céfotaxime, la céftazidime, la

Résultats et discussion

ciprofloxacine et la tétracycline, les taux ont été significativement importants (56.3% , 94,7; 73,8%; 70%), moyens CTX (25,7%; 30%; 45,5%), CAZ (29%; 34%), CIP (40%; 32,4%) et TE (48,3%) ou faibles : CTX (7,1%; 11,7%), CAZ (6,1%; 8,8%; 5,9%), CIP (8,31%; 19,1%; 4.3%) et TE (14,9%; 17,3%; 5,7%; 15,8%).

Des prévalences moyens à faibles ont été observés pour l'imipénème (IMP: 23%; 27,4%; 33,8%; 17,7%; 19,1%; 4,9%) et faibles pour la gentamicine (GM : 8,6%; 0,78%; 16,8; 8,6%; 4,5%), à l'exception du mois de Juin où un taux de 50% a été observé.

II.2. Prévalence de la résistance aux antibiotiques chez les coliformes

La résistance des coliformes totaux aux antibiotiques a été aussi investiguée. Ce groupe bactérien est utilisé comme indicateur de la qualité microbienne parce qu'ils peuvent être indirectement associés à une pollution d'origine fécale (Bornert, 2000). Les coliformes sont caractérisés par leur acquisition fréquente de mécanismes de résistance aux antibiotiques et ils sont les plus souvent impliqués en pathologie infectieuse humaine surtout en milieu hospitalier (Cohen et *al.*, 2016).

Les taux de résistance aux antibiotiques chez les coliformes totaux sont représentés pour chaque type de poisson dans les figures 23, 24 et 25.

• Taux de résistance des coliformes totaux chez la sardine commune

La figure 23 montre que les coliformes isolés à partir de la sardine ont présenté des sensibilités à la plupart des antibiotiques utilisés à l'exception de l'amoxicilline (S2: 100%; S4: 28,2%; et S5: 25,3%), et l'imipénème et la tétracycline pour l'échantillon du mois de Septembre S5 (IMP: 7,59%; TE: 12,7%).

• Taux de résistance des coliformes totaux chez le rouget de roche

Les taux de résistance chez les coliformes isolés à partir du rouget de roche ont été globalement élevés vis-à-vis de l'amoxicilline, à l'exception des échantillons S1, S3 et S6 (0%, 100%, 12.01%, 100%, 100%, 0%, 100%). Une sensibilité a été observée pour le reste des molécules testées (céfotaxime, céftazidime, imipénème, gentamicine, tétracycline et ciprofloxacine), à l'exception des deux mois de Mai (S3) et Septembre (S6) pour lesquels la ciprofloxacine a présenté des taux relativement faibles, de l'ordre de 15% et 1%, respectivement (**fig. 24**).

Résultats et discussion

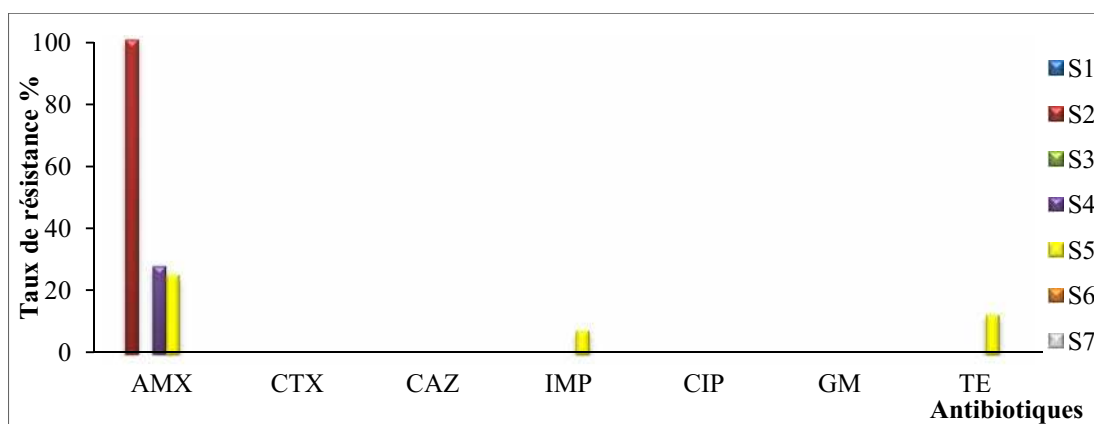


Figure 23: Taux de résistance aux antibiotiques des coliformes totaux chez *Sardina pilchardus* (sardine commune).

AMX: amoxicilline; **CTX :** céfotaxime; **CAZ:** céftazidime; **IMP:** imipénème; **CIP:** ciprofloxacine; **GM:** gentamicine; **TE:** tétracycline.

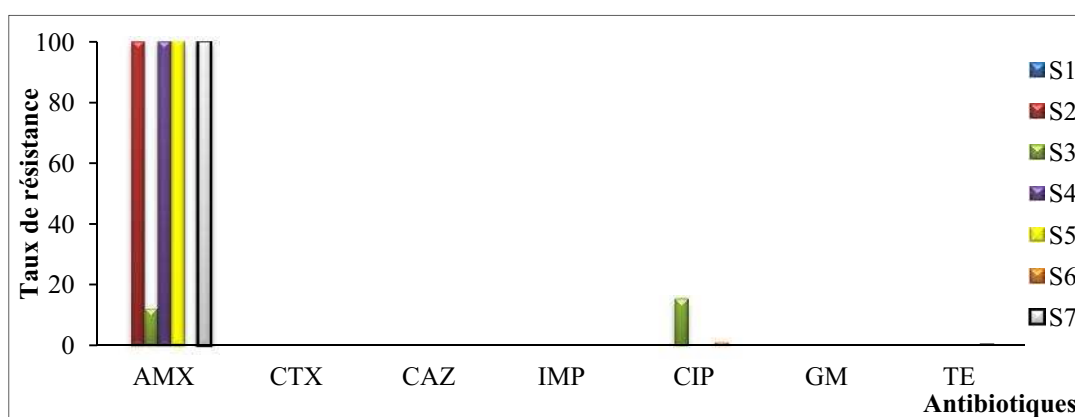


Figure 24: Taux de résistance aux antibiotiques des coliformes totaux chez *Mullus surmuletus* (rouget de roche).

AMX: amoxicilline ; **CTX :** céfotaxime ; **CAZ:** céftazidime; **IMP:** imipénème; **CIP:** ciprofloxacine; **GM:** gentamicine; **TE:** tétracycline.

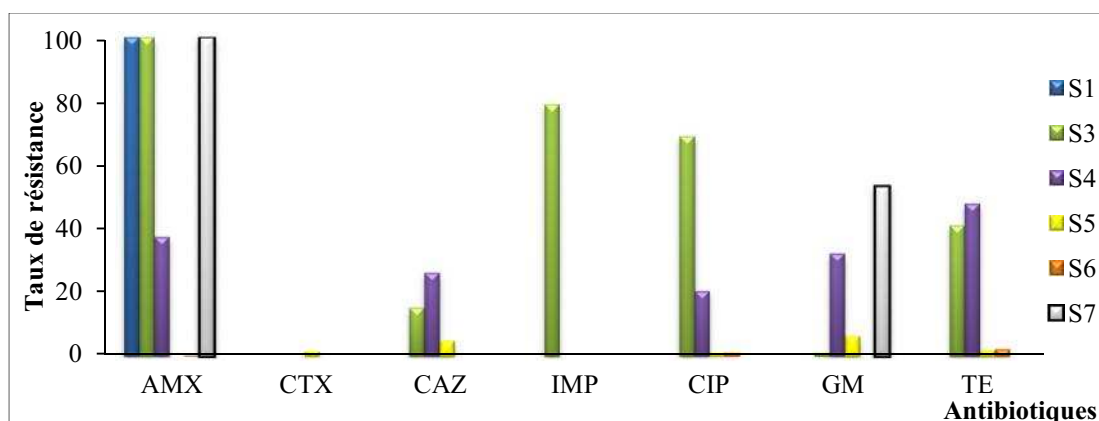


Figure 25: Taux de résistance aux antibiotiques des coliformes totaux chez *Mugil cephalus* (mulet).

AMX: amoxicilline ; **CTX :** céfotaxime ; **CAZ:** céftazidime; **IMP:** imipénème; **CIP:** ciprofloxacine; **GM:** gentamicine; **TE:** tétracycline.

Résultats et discussion

• Taux de résistance des coliformes totaux chez le mullet cabot

Les résultats obtenus chez les coliformes isolés du *M. cephalus* ont montré des taux de résistance majoritairement élevés pour l'amoxicilline (100%, 100%, 37,5%; 0%, 0,3%; 100% , 100%), suivi de ceux pour la ciprofloxacine (0%, 68.9%, 20.5%, 1.2%, 1.2%, 0%), la gentamicine (0%, 1.05%, 32.3%, 6.4%, 0%, 53.3%) et la tétracycline (0%, 41.1%, 47.9%, 2%, 2.3%, 0%). Des taux faibles ont été observés pour la ceftazidime (0%, 15.3%, 26,3%, 4.9%, 0.03%, 0%) et nuls pour le céfotaxime (à l'exception de S5 : 1.5%) et l'imipénème (à l'exception de S3: 78.9%) (**fig. 25**).

En résumé, l'évaluation de la résistance aux antibiotiques parmi la flore mésophile aérobie totale a révélé la présence de taux de résistance assez importants pour l'amoxicilline, suivi des céphalosporines de 3^{ème} génération, la ciprofloxacine et enfin la tétracycline. De faibles taux ont été observés pour l'imipénème et la gentamicine. Pour les coliformes, on a noté un taux de résistance élevé à l'amoxicilline et une sensibilité aux autres molécules, à l'exception des coliformes isolés du *M. cephalus* qui ont présenté des taux de résistance moyens à faibles à l'imipénème, la gentamicine, la tétracycline et la ciprofloxacine.

Des fluctuations des taux de résistances selon les périodes d'échantillonnage ont été observées, cela est probablement aux conditions météorologiques qui redistribuent la répartition des microorganismes par les effets de décantation et de remise en suspension.

Des résistances à la tétracycline, au chloramphénicol et aux aminosides (streptomycine) dans les poissons vivant à l'état sauvage ont été rapportées (Miranda et Zemelman, 2001; Matyar et al., 2004; Ghosh et Mandal, 2010). Ces antibiotiques sont largement utilisés en élevage et en aquaculture. Hormis l'ampicilline, la résistance aux bêta-lactamines, notamment à large spectre (céfotaxime, céftazidime et imipénème), a été très peu étudiée (Moremi et al., 2016). Dans notre étude, nous avons axé sur cette famille d'antibiotiques, car c'est la classe majeure en clinique, elle peut nous orienter vers une pollution anthropique et des mécanismes de résistance acquise.

Les taux de résistance élevés observés chez la flore des poissons sont en accord avec ceux rapportés par Alves de Lima et Hofer (1993); Miranda et Zemelman (2001); Matyar et al. (2004) et Ghosh et Mandal (2010), qui, en même temps, ont établi une corrélation entre la pollution et la résistance aux antibiotiques dans les poissons marins. Ghosh et Mandal. (2010) ont signalé des taux de résistance élevés vis-à-vis de l'ampicilline et la

Résultats et discussion

streptomycine chez des entérobactéries isolées des branchies et des viscères de poissons dans la baie de Bengale (Inde). Matyar et *al.* (2004) ont aussi trouvé des taux élevés de résistance à l'ampicilline, la streptomycine et la tétracycline dans les branchies de *Mullus barbatus* (21,1%; 11,4% et 12,8%) et de *Liza ramada* (22%; 6,5% et 14,1%) à Adana en Turquie où l'influence des apports anthropiques a été établi.

Les eaux usées non traitées véhiculent des bactéries commensales et saprophytes, mais aussi des pathogènes pour l'homme et l'animal, et font généralement émerger par la pression de sélection des germes résistants aux antibiotiques (Miranda et Zemelman, 2001; Cabello, 2003; Sorum, 2006; Alouache et *al.*, 2014). Smaldone et *al.* (2014) ont montré que des poissons sauvages capturés dans le golfe de Salerne en Italie, contenaient des bactéries résistantes aux antibiotiques provenant des effluents hospitaliers et qu'ils pourraient être une source de dissémination vers l'homme de la résistance aux antibiotiques.

La présence de bactéries résistantes aux antibiotiques dans nos échantillons de poissons soulève la question de leur origine. Elles peuvent être exogènes, comme aussi endogènes aux poissons (Matyar et *al.*, 2004). La pression de sélection et les échanges génétiques horizontaux *in-situ* sous l'influence de facteurs biotiques et abiotiques, favorisent la dissémination de la résistance aux antibiotiques (Bushman, 2002 ; Agersø et Guardabassi, 2005 et Casas et *al.*, 2005). Il a été démontré que la résistance des bactéries aux antibiotiques dans les sédiments marins augmente avec l'augmentation de la contamination par des apports anthropiques de métaux lourds (Mc Arthur et Tukfield, 2000).

III. Comparaison des taux de résistance selon l'habitat

Il est connu que la sardine, le rouget et le mullet occupent évoluent dans des espaces écologiques marins qui leurs sont propres, pélagique, benthique et benthopélagique, respectivement. Ceci nous a conduit à analyser les résultats selon l'habitat des espèces, à l'aide de la méthode ANOVA en utilisant le logiciel STATISTICA 5.1. (**Tab. 7 et 8**)

Résultats et discussion

Tableau 7 : Taux de résistance moyens de la flore mésophile aérobie totale et probabilités calculées en fonction de l'habitat.

Habitat		Pélagique	Benthique	Bentho-pélagique	
Espèce		<i>Sardina pilchardus</i>	<i>Mullus surmuletus</i>	<i>Mugil cephalus</i>	
Nombre total de bactéries x10 ⁵ (UFC/g)		1,5	0,99	1,32	Probabilité calculée
Pourcentage de FMAT résistantes selon l'antibiotique (%)	Amoxicilline (8 µg/mL)	34,24	48,45	48,97	0,49
	Céfotaxime (2 µg/mL)	17,58	30,16	29,39	0,33
	Ceftazidime (4 µg/mL)	17,93	38,15	29,74	0,31
	Imipénème (8 µg/mL)	7,73	12,85	20,97	0,33
	Ciprofloxacine (1 µg/mL)	14,34	12,51	29,64	0,36
	Gentamicyne (4 µg/mL)	10,25	12,82	14,86	0,82
	Tétracycline (2 µg/mL)	12,50	15,59	28,77	0,32

Tableau 8: Taux de résistance moyens des coliformes totaux et probabilités calculées en fonction de l'habitat.

Habitat		Pélagique	Benthique	Bentho-pélagique	
Espèce		<i>Sardina pilchardus</i>	<i>Mullus surmuletus</i>	<i>Mugil cephalus</i>	
Nombre total de bactéries x10 ⁴ (UFC/g)		0,33	0,41	9,33	Probabilité calculée
Pourcentage de CT résistantes selon l'antibiotique (%)	Amoxicilline (8 µg/mL)	21,93	58,86	56,31	0,28
	Céfotaxime (2 µg/mL)	0	0	0,26	0,32
	Ceftazidime (4 µg/mL)	0	0	7,75	0,06
	Imipénème (8 µg/mL)	1,08	0	13,16	0,35
	Ciprofloxacine (1 µg/mL)	0	2,29	15,3	0,18
	Gentamicyne (4 µg/mL)	0	0	15,51	0,06
	Tétracycline (2 µg/mL)	1,81	0,07	15,54	0,08

L'analyse montre que les probabilités calculées pour la flore totale et les coliformes totaux et pour chaque antibiotique chez les trois types de poissons, sont supérieures au seuil de $P=0,05$, ce qui indique l'absence d'une différence significative entre les taux de résistance selon les poissons. Par conséquent, l'habitat n'a pas d'influence sur la prévalence des bactéries résistantes. Dans le même sens, Miranda et Zemelman (2001) sont arrivés à la même conclusion dans une étude sur la résistance des bactéries (ampicilline,

Résultats et discussion

streptomycine, tétracycline et chloramphénicol) chez les poissons démersaux et pélagiques (*Sarda chilensis*, *Engraulis ringens*, *Merluccius gayi*...) de la baie du chili.

IV. Comparaison des taux de résistance selon les antibiotiques

Une étude statistique a été réalisée pour montrer la différence entre les taux de résistance enregistrés parmi la flore mésophile aérobie totale et les coliformes totaux vis-à-vis des différents antibiotiques. Les résultats sont présentés dans les tableaux 9 et 10 pour la flore mésophile aérobie totale et les tableaux 11 et 12 pour les coliformes totaux.

La probabilité calculée des taux de résistance de la flore mésophile aérobie totale vis-à-vis est inférieur au seuil de signification $\alpha=0,05$, donc la différence est significative (**Tab.9**). De ce fait, un autre test est recommandé afin de chercher l'antibiotique qui est à l'origine de cette différence, il s'agit du test post-hoc de Tukey. Les résultats dans le tableau 10 montrent que l'amoxicilline présente une différence significative ($P_{cal}<0.05$) par rapport aux autres antibiotiques (IMP, CTX, CIP, GM, TE et CAZ).

Tableau 9 : Analyse de variance des taux de résistance de la flore mésophile aérobie totale au seuil de signification $\alpha= 0,05$.

Effets significatifs marqués à P < .05000								
Source de la fluctuation	Effet SC	Effet dl	Effet MC	Erreur SC	Erreur dl	Erreur MC	F	P
Antibiotiques	14098.32	6	2349.72	49512.29	133	372.27	6.31	0.000007

Tableau 10 : Test de la différence significative (HSD) de Tukey.

Antibiotiques	AMX	IMP	CTX	CIP	GM	TE	CAZ
AMX							
IMP	0.00004						
CTX	0.04732	0.43268					
CIP	0.00513	0.85124	0.99420				
GM	0.00003	0.67795	0.99902	0.90711			
TE	0.00075	0.98357	0.90999	0.99902	0.92243		
CAZ	0.00008	0.17119	0.99892	0.90711	0.08133	0.64765	

La même démarche a été adoptée pour les taux de résistance parmi les coliformes totaux. L'analyse a montré une différence significative ($\alpha= 0,05$) (**tab. 11**). Le test post-hoc de Tukey a montré que l'amoxicilline présente une différence significative ($P_{cal}<0.05$) par rapport aux autres aux antibiotiques (IMP, CTX, CIP, GM, TE et CAZ) (**tab. 12**).

Résultats et discussion

Tableau 11 : Analyse de variance des taux de résistance des coliformes totaux au seuil de signification $\alpha=0,05$.

Effets significatifs marqués à $p < .05000$								
Source de la fluctuation	Effet SC	Effet dl	Effet MC	Erreur SC	Erreur dl	Erreur MC	F	p
Antibiotiques	29938.58	6	4989.76	60838.8	133	457.43	10.91	0.000007

Tableau 12 : Test de la différence significative (HSD) de Tukey.

Antibiotiques	AMX	IMP	CTX	CIP	GM	TE	CAZ
AMX							
IMP	0.000026						
CTX	0.000026	0.99591					
CIP	0.000026	0.99999	0.986371				
GM	0.000026	1	0.993882	1			
TE	0.000026	0.99999	0.98729	1	1		
CAZ	0.000026	0.99995	0.99989	0.99935	0.99987	0.99943	

La différence des taux de résistance entre l'amoxicilline et les autres antibiotiques parmi la flore mésophile aérobie totale et les coliformes totaux peut s'expliquer par sa très large utilisation en thérapeutique en milieu hospitalier et en communauté, et par la résistance naturelle de nombreuses bactéries de l'environnement, en particulier les bacilles à Gram négatif non-fermentaires (Barthelot et *al.*, 2005; Vedel, 2005).

V. Identification bactérienne

L'identification biochimique par galerie API 20E a concerné 62 souches à Gram négatif prises au hasard dont 43 résistantes à l'amoxicilline, 16 résistantes au céfotaxime et 3 résistantes à la ciprofloxacine. Il est à noter que 10 souches ont été isolées de la sardine, 8 du rouget et 44 du mullet (**Tab. 13**).

Résultats et discussion

Tableau 13 : Identification des bactéries à Gram négatif résistantes isolées à partir des trois espèces de poisson (n=60).

Poisson	Espèces bactériennes (n)					Total
	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	N.I	
Sardine	5	2	0	3	0	10
Rouget	6	0	0	2	0	8
Mulet	27	0	1	7	9	44
Total	38	2	1	12	9	62
Pourcentage %	61	3	2	19	15	100

N.I : bactéries non identifiées.

Les résultats de l'identification bactérienne (**Tab. 13**) ont révélé l'appartenance de la plupart des bactéries résistantes à la famille des *Enterobacteriaceae* (61%), suivi de des espèces *Aeromonas hydrophila* (19%), *Vibrio fluvialis* (3%) et de *Pseudomonas aeruginosa* (2%). Miranda et Zemelman. (2001) et Matyar et al. (2004) ont rapporté que la plupart des bactéries résistantes isolées à partir des poissons marins étaient des *Enterobacteriaceae* et des *Vibrionaceae*, avec une faible proportion de bactéries non fermentaires. Sugita et al. (1985) ont montré que le groupe *Vibrio-Aeromonas* était la principale composante du tractus intestinal de la carpe, alors que d'autres études ont montré que les *Vibrionaceae* étaient les bactéries intestinales dominantes dans divers poissons (Newman et al., 1998). Silvia et al. (1987) ont rapporté que *E. coli*, *Aeromonas hydrophila* et *Pseudomonas fluorescens* étaient les bactéries résistantes aux antibiotiques les plus fréquemment retrouvées dans l'eau de mer et les crustacés dans la baie du Chili.

L'identification des bactéries selon l'antibiotique de sélection a montré: **(i) Amoxicilline** : *E. coli* (n=7), *Citrobacter braakii* (n=6), *Aeromonas hydrophila* (n=6), *Klebsiella oxytoca* (n=3), *Enterobacter cloacae* (n=3), *Raoutella terrigena* (n=2) et *Vibrio fluvialis* (n=2). Les espèces *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter asburiae*, *Raoutella ornithinolytica*, *Serratia odorifera*, *Serratia fonticola*, *Moellerella wisconsensis*, *Leclercia adecarboxylata*, *Pasteurella pneumotropica* et *Pseudomonas aeruginosa* sont représentées chacune par une seule souche; **(ii) Céfotaxime** : *Aeromonas hydrophila* (n=6), *Citrobacter freundii* (n=2), *Klebsiella pneumoniae* (n=1); **(iii) Ciprofloxacine**: *E. coli* (n= 2) et *Klebsiella pneumoniae* (n= 1) (**fig. 26**).

Résultats et discussion

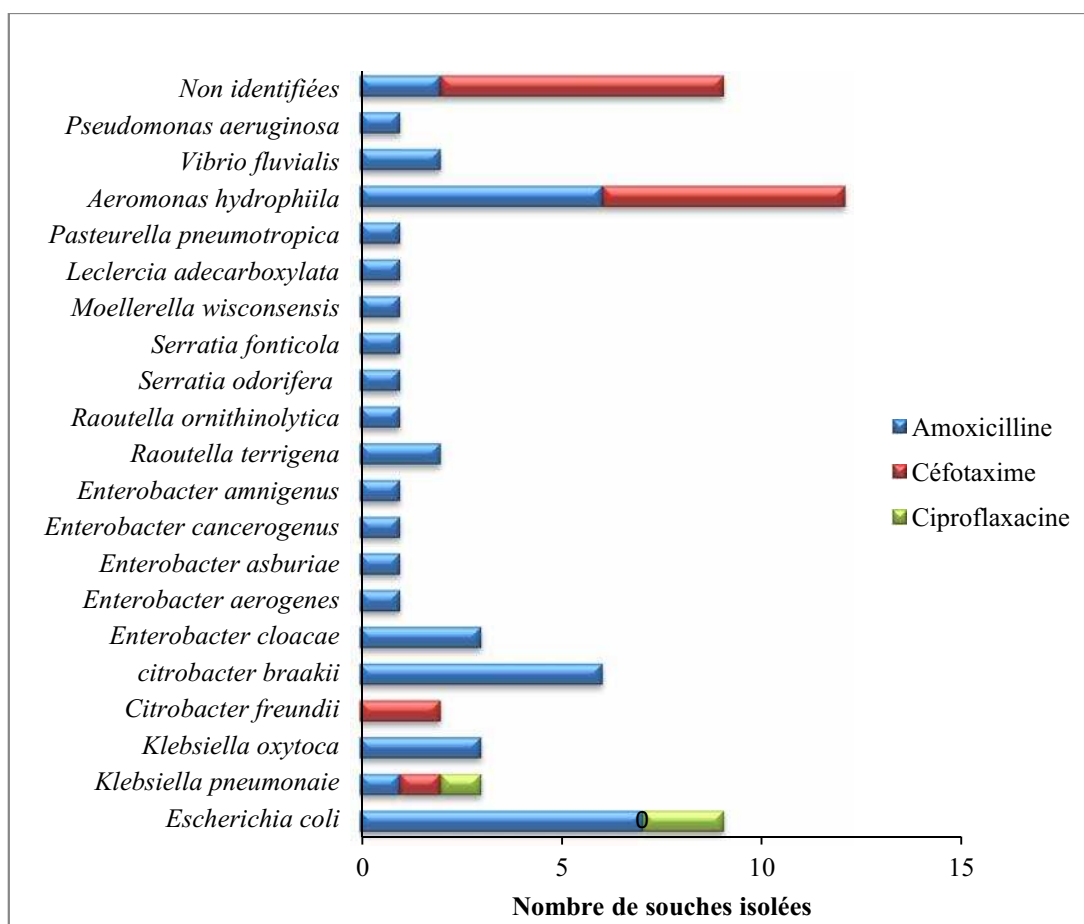


Figure 26 : Résultat de l'identification bactérienne selon l'antibiotique de sélection.

VI. Etude de la résistance à d'autres antibiotiques par la méthode de l'antibiogramme

Trente-sept (37) souches résistantes sélectionnées sur trois antibiotiques: l'amoxicilline (AMX), céfotaxime (CTX) et ciprofloxacine (CIP) ont fait l'objet d'une évaluation globale de leur sensibilité vis-à-vis de 17 antibiotiques dont 8 β -lactamines. Parmi ces souches, 6 ont été isolées de la sardine, 5 du rouget et 26 du mulot. Les résultats illustrés par la figure 27 montrent que pour:

Résultats et discussion

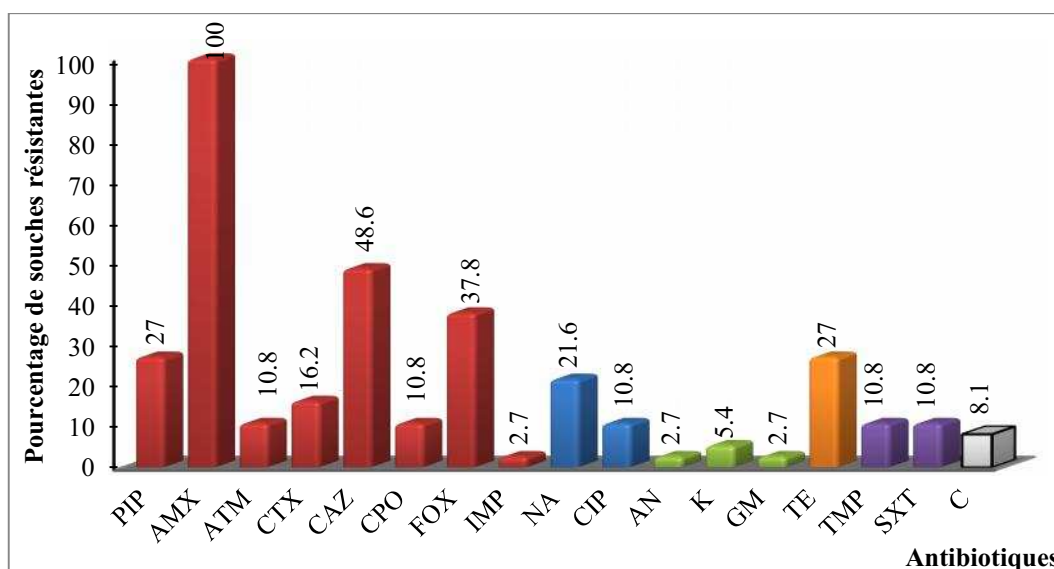


Figure 27 : Prévalence de la résistance aux antibiotiques de 37 souches résistantes isolées à partir de poissons.

PIP : pipéracilline ; *AX* : amoxicilline ; *ATM* : aztreonam ; *CTX* : céfotaxime ; *CAZ* : céftazidime ; *CPO* : ceftpirome ; *FOX* : céfoxitine ; *IMP* : imipénème ; *NA* : acide nalidixique ; *CIP* : ciproflaxacine ; *AN* : amikacine ; *K* : kanamycine ; *GM* : gentamicine ; *TE* : tétracycline ; *TMP* : triméthoprime ; *SXT* : Co-trimoxazole ; *C* : Chloramphénicol.

➤ Les bêta-lactamines :

La totalité des souches a été résistante à l'amoxicilline, des taux de résistance significatifs à la céftazidime, céfoxitine, et pipéracilline avec 48.6%, 37.8% et 27%, respectivement; alors que le céfotaxime, l'aztréoname, le ceftpirome et l'imipénème ont été très actifs avec des proportions de résistance faibles, 16.2%, 11%, 10.8% et 2.7%, respectivement.

Des études ont également rapporté l'isolement de bactéries résistantes aux bêta-lactamines et aux non bêta-lactamines chez des bacilles à Gram négatif isolés de poissons marins (Miranda et Zemelman, 2001 ; Matyar et *al.*, 2004 ; Ghosh et Mandal, 2010 ; Smaldone et *al.*, 2014; Matyar, 2016).

Parmi les non bêta-lactamines, la résistance à la tétracycline est la plus étudiée, cet antibiotique est massivement utilisé en médecine vétérinaire et comme additif pour la promotion de la croissance animale (Chopra et Roberts, 2001).

Résultats et discussion

VII. Profils d'antibiorésistance

VII.1. Profils d'antibiorésistance des souches sélectionnées sur amoxicilline

L'évaluation de la sensibilité de 29 souches sélectionnées sur amoxicilline vis-à-vis de 17 antibiotiques a été effectuée par antibiogramme. Les résultats sont représentés dans la figure 28 et le tableau 14.

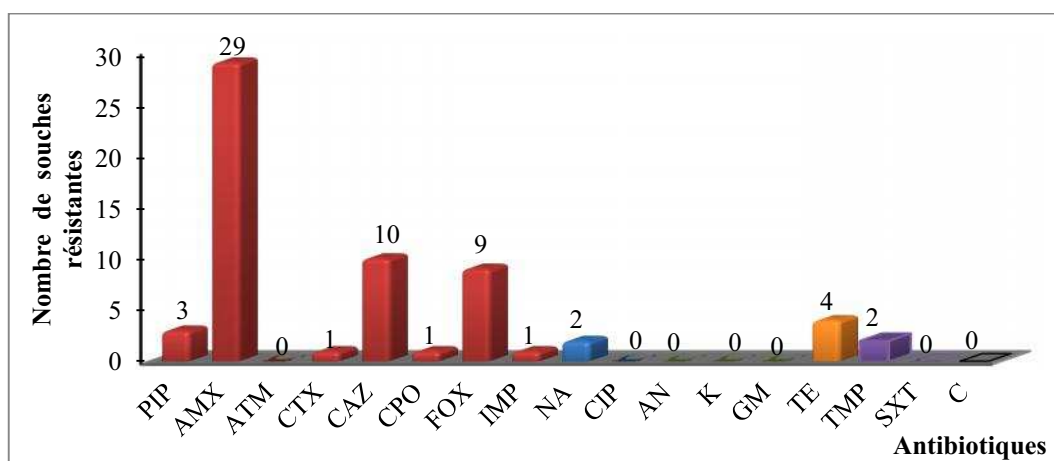


Figure 28: Résistance des souches sélectionnées sur amoxicilline vis-à-vis des antibiotiques.

➤ Les bêta-lactamines

Parmi les 29 souches sélectionnées sur amoxicilline, 10 souches ont été résistantes à la céftazidime, 9 à la céfoxitine et 3 à la pipéracilline. La résistance au céfotaxime, le ceftiprome et l'imipénème n'a concerné qu'une souche. L'aztréoname a montré une activité totale sur ces souches.

➤ Les non bêta-lactames :

La plupart des antibiotiques non bêta-lactames ont été actifs sur ces souches (CIP, AN, K, GM, SXT, et C), quatre souches ont été résistantes à la tétracycline et deux à l'acide nalidixique et au triméthoprim.

Un total de 21/29 souches sélectionnées sur amoxicilline ont été multirésistantes (**Tab. 14**), avec 10 profils différents comprenant 2 à 9 antibiotiques. La lecture interprétative des profils de résistance nous oriente vers une résistance naturelle à la céfoxitine et à l'amoxicilline chez la plupart des souches à l'exception d'*E. coli* et *V. fluvialis* (Vedel, 1997).

Résultats et discussion

Tableau 14: Antibiotypes des souches sélectionnées sur amoxicilline.

Souches	Identification	Origine	Antibiotypes	Nombre de résistance
AX1	<i>A. hydrophila</i>	Sardine	AMX	1
AX4	<i>L. adecarboxylata</i>	Sardine		
AX12	<i>E. amnigenus</i>	Rouget		
AX16	<i>R. ornithinolytica</i>	Mulet		
AX19 AX21	<i>E. coli</i>	Mulet		
AX24	<i>K. oxytoca</i>	Mulet		
AX25	<i>M. wisconsensis</i>	Mulet		
AX3	<i>S. fonticola</i>	Sardine	AMX-FOX	2
AX5	<i>C. braakii</i>	Sardine		
AX14	<i>P. aeruginosa</i>	Mulet		
AX22	<i>E. cloacae</i>	Mulet		
AX8	<i>C. braaki</i>	Rouget	AMX-CAZ	
AX9		Rouget		
AX10	<i>K. pneumoniae</i>	Rouget		
AX11	<i>S. odorefira</i>	Rouget		
AX15	<i>R. terrigena</i>	Mulet		
AX17	<i>K. oxytoca</i>	Mulet		
AX20	<i>E. coli</i>	Mulet		
AX23	<i>K. oxytoca</i>	Mulet		
AX26 AX28 AX29	<i>E. coli</i>	Mulet	AMX-TE	
AX2	<i>C. braakii</i>	Sardine	AMX-CAZ-FOX	3
AX7	<i>A. hydrophila</i>	Sardine	AMX-PIP-FOX	
AX13	<i>E. cloacae</i>	Mulet	AMX-FOX-NA	
		Mulet		
AX27	<i>E. coli</i>	Mulet	AMX PIP- -TE	
AX18	<i>E. aerogenès</i>	Mulet	AMX-CAZ-FOX-NA	4
AX6	<i>V. fluvialis</i>	Sardine	AMX-PIP-ATM-CTX CAZ-CPO-FOX-IMP-TMP	9

Résultats et discussion

VII.2. Profil d'antibiorésistance des souches sélectionnées sur céfotaxime

La résistance des 5 souches sélectionnées sur céfotaxime est représentée dans la figure 29 et le tableau 15.

➤ Les bêta-lactamines :

Les aminopenicillines (AMX), les uréidopénicillines (PIP) et les céphalosporinases de 3^{ème} génération (CTX et CAZ) ont été inactives sur ces souches. Il y avait présence de la résistance vis-à-vis de l'ATM (n=4) et de CPO et FOX (n=3). Aucune résistance à l'IMP n'a été observée.

➤ Les non bêta-lactames

Trois souches sur les cinq ont été résistantes vis-à-vis de l'acide nalidixique, la tétracycline et le Co-trimoxazole. La résistance à la ciprofloxacine, la gentamicine, le triméthoprime et le chloramphénicol n'a concerné qu'une seule souche. Les 5 souches ont été sensibles à l'amikacine et la kanamycine.

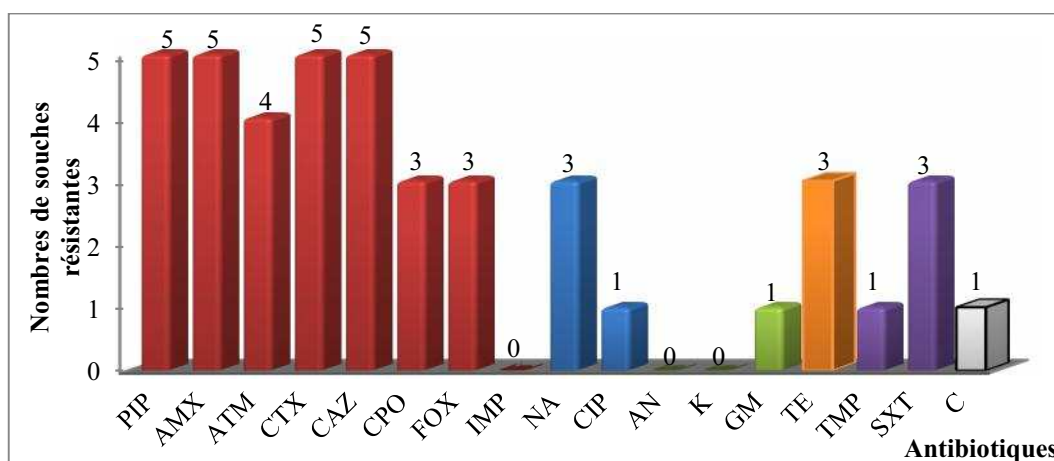


Figure 29 : Résistance des 5 souches sélectionnées sur céfotaxime vis-à-vis des antibiotiques.

Les antibiogrammes des souches sélectionnées sur céfotaxime sont décrits dans le tableau 15, ils couvrent 6 molécules pour les bêta-lactamines et de 1 à 5 pour les non bêta-lactames. Ces profils de résistance nous orientent vers des mécanismes de résistance acquis principalement pour *K. pneumoniae* et *C. freundii*.

Résultats et discussion

Tableau 15: Antibiotypes des souches sélectionnées sur céfotaxime (n=5).

Souches	Identification	Origine	Profil d'antibiorésistance	Nombre de résistances
CTX4 CTX5	<i>C. freundii</i>	Mulet	PIP-AMX-ATM-CTX-CAZ-FOX-NA	7
CTX1	<i>A. hydrophila</i>		PIP-AMX-CTX-CAZ-CPO-FOX-TE-SXT	8
CTX2	<i>A. hydrophila</i>		PIP-AMX-ATM-CTX-CAZ-CPO-NA-TE-SXT-C	10
CTX3	<i>K. pneumoniae</i>		PIP-AMX-ATM-CTX-CAZ-CPO-CIP-GM-TE-TMP-SXT	11

VII.3. Profil d'antibiorésistance des souches sélectionnées sur ciprofloxacine

La figure 30 représente la résistance des souches sélectionnées sur ciprofloxacine vis-à-vis des antibiotiques.

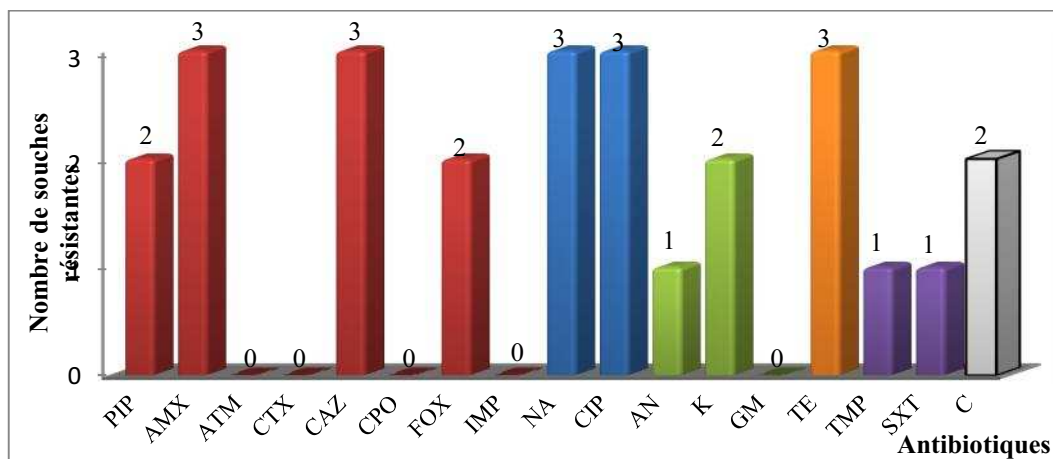


Figure 30 : Résistance des 3 souches sélectionnées sur ciprofloxacine.

➤ Les bêta-lactamines :

Les 3 souches étaient sensibles aux céphalosporines (CTX et CPO), monobactames (ATM) et carbapénèmes (IMP). Par contre, une souche a été résistante vis-à-vis de la piperacilline, l'amoxicilline, la céftazidime et la céfoxitine.

➤ Les non bêta-lactames :

Les quinolones (NA et CIP) et les tétracyclines (TE) et la gentamicine ont été inactives sur nos souches. Deux souches ont été résistantes à K et C et une souche à AN, TMP et SXT.

Résultats et discussion

Les profils de résistance de trois souches sont récapitulés dans le tableau 16. Les souches ont présenté 2 à 4 résistances aux bêta-lactamines et 5 à 6 résistances aux non bêta-lactames. Ces résistances sont de type acquis.

Tableau 16: Antibiotypes des souches sélectionnées sur ciprofloxacine (n=3).

Souche	Identification	Origine	Antibiotypes	Nombre de résistances
CIP2	<i>E. coli</i>	Mulet	AMX-CAZ-NA-CIP-TE-TMP-SXT	7
CIP1	<i>E. coli</i>		AMX-PIP-CAZ-FOX-NA-CIP-K-TE-C	9
CIP3	<i>K.pneumoniae</i>		AMX-PIP-CAZ-FOX-NA-CIP-AN-K-TE-C	10

Les profils de multi-résistance observés couvraient 2 à 11 antibiotiques (Tab. 14, 15, 16). Le même constat de multirésistance sur les poissons marins a été fait par plusieurs auteurs (Miranda et Zemelman, 2001; Matyar et al., 2004; Ghosh et Mandal, 2010).

Les bactéries isolées de l'espèce *Mugil cephalus* ont montré des niveaux de multi-résistance plus élevés que celles isolées de *Sardina pilchardus* et *Mullus surmuletus*. Cette différence peut être attribuée à son biotope et son comportement trophique qui l'exposent plus aux bactéries et aux xénobiotiques (Miranda et Zemelman, 2001).

L'utilisation massive des antibiotiques dans les hôpitaux d'Alger et en communauté pourrait être la raison de l'émergence de bactéries multirésistantes dans les poissons résidant dans les eaux réceptacles des rejets anthropiques. Ce phénomène de multi-résistance pourrait être aussi le résultat d'apports de bactéries résistantes allochtones à l'écosystème marin (Miranda et Zemelman, 2001), celles-ci hébergeant des plasmides de résistance aux antimicrobiens (Chandrasekarn et al., 1998), pourraient interagir avec les bactéries autochtones en transférant des gènes de résistance (Zhang et al., 2009).

Dans une étude effectuée sur les poissons et les mollusques marins du golfe de Salerne en Italie, Smaldone et al. (2014) ont rapporté que des *Vibrio* sp. étaient résistants à une gamme de 4 à 9 antibiotiques, *Shewanella putrefaciens* à 6 antibiotiques et *Aeromonas* spp. à 4 antibiotiques. Kumar et al. (2005) ont signalé aussi cette multi-résistance au sein de souches d'*E. coli* isolées de fruits de mer à Mangalore en Inde.

Résultats et discussion

VIII. Détection de la production de céphalosporinases inducibles

Nous avons recherché chez les trente-sept souches étudiées, la présence de céphalosporinases chromosomiques AmpC inducibles en utilisant l'imipénème ou la céfoxitine comme inducteurs.

Aucune image d'antagonisme n'a été constatée sur nos souches. Ceci pourrait s'expliquer soit par l'absence connue d'une céphalosporinase inducible chez certaines souches (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*...), soit par l'hyperexpression de celle-ci surtout chez les souches présentant la résistance à la céfoxitine (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Aeromonas*) (Vedel, 2005 ; Mérens et al., 2011).

Cependant, l'activité des bêta-lactamines (CAZ et FOX) a été restaurée en présence de la cloxacilline, un inhibiteur de céphalosporinase, chez 2 souches de *C. freundii* et une souche de *Klebsiella pneumoniae* (CIP3), ce qui suggère une hyperproduction de cette enzyme chez ces souches.

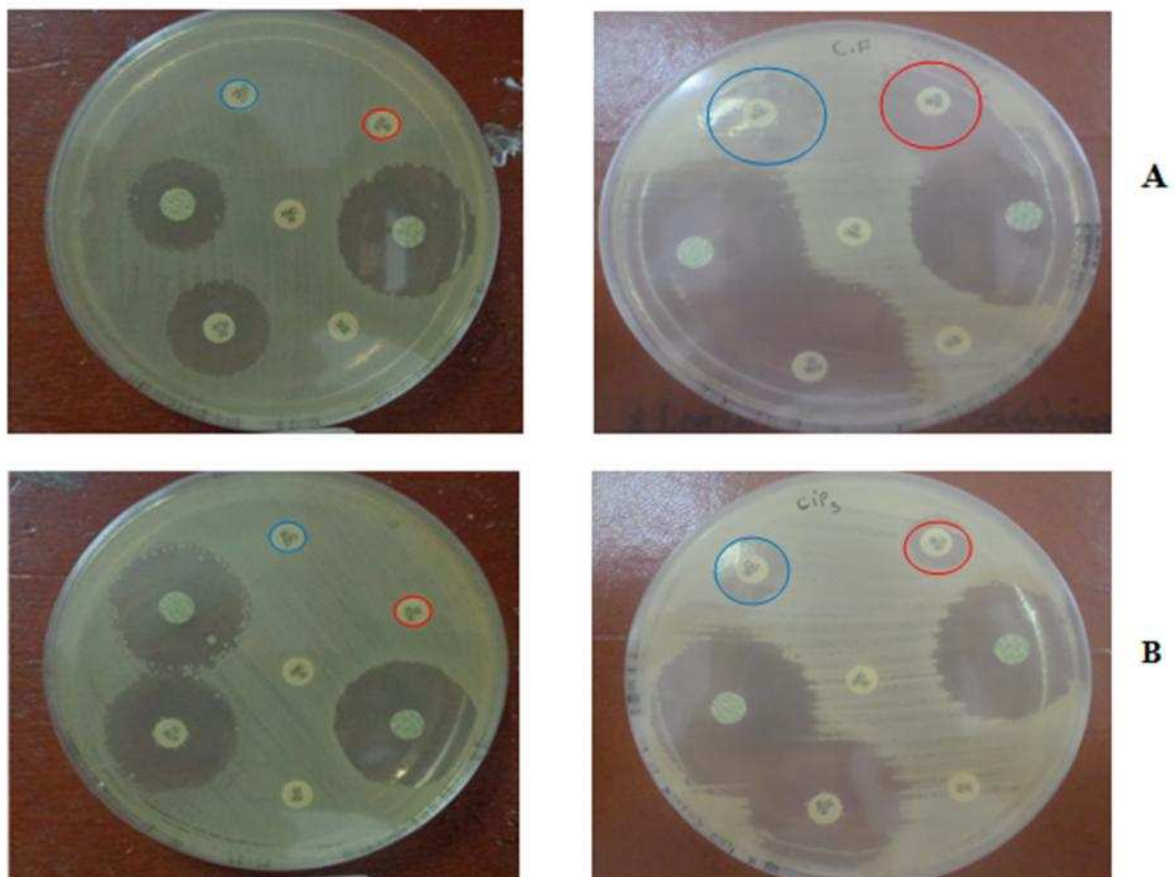


Figure 31 : Résultat du test à la cloxacilline pour *C. freundii* (A) et *K. pneumoniae* (B).
A gauche : antibiogramme sans cloxacilline/ Adroite : antibiogramme avec cloxacilline.

Résultats et discussion

VIII. Détection de la production de bêta-lactamases à spectre élargi

Le test de synergie a été positif pour une souche sur les 37 testées. Il s'agit de *Klebsiella pneumoniae* (CTX3) résistante au céfotaxime et isolée du mulet (**Fig. 32**). Ce résultat augure de la production d'une bêta-lactamase à spectre élargi. Ce résultat conforte les conclusions de la première partie qui dit que le mulet est contaminé par des apports anthropiques car ce mécanisme est un mécanisme acquis retrouvé principalement chez les bactéries cliniques (Messai et *al.*, 2008). Il a été cependant décrit dans des eaux de baignade à Ain chrob (Alouache et *al.*, 2012) et au port d'Alger (Alouache, 2012).

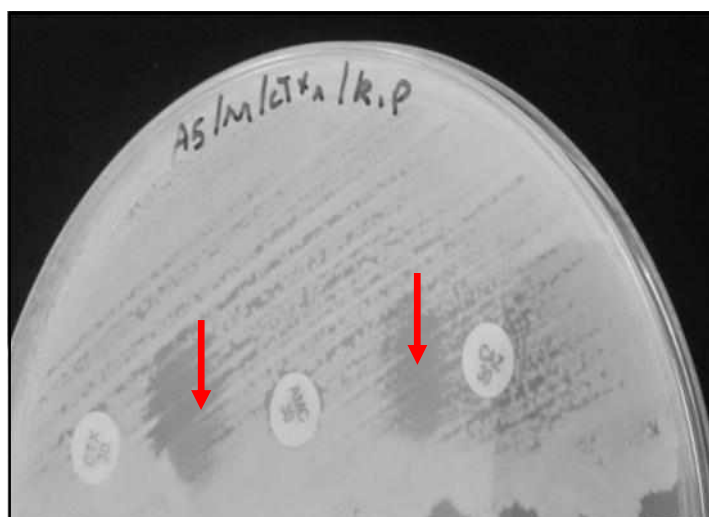


Figure 32: Détection de la production d'une bêta-lactamase à spectre élargi par le test de synergie chez *Klebsiella pneumoniae* (CTX3) isolée du mulet.

Les flèches indiquent l'augmentation de la zone d'inhibition des disques de céfotaxime (CTX) et ceftazidime (CAZ) du côté du disque contenant l'inhibiteur de bêta-lactamase (acide clavulanique).

IX. Détermination du support génétique de la résistance

Des essais de transfert génétique par conjugaison des phénotypes de résistance vers souche *E. coli* K12 BM21 ont été réalisés pour les souches décrites dans le tableau 17. Il est à noter que ces souches possèdent des profils de résistance représentatifs des antibiotiques testés.

Résultats et discussion

Tableau 17 : Résultats du transfert génétique par conjugaison.

Souches	Identification	Antibiotypes	Transfert
AX19	<i>E .coli</i>	AMX	négatif
AX21	<i>E .coli</i>		
AX23	<i>K. oxytoca</i>		
AX20	<i>E .coli</i>	AMX-CAZ	
AX26	<i>E .coli</i>	AMX-TE	
AX28	<i>E .coli</i>		
AX29	<i>E .coli</i>		
AX27	<i>E.coli</i>	AMX-PIP-TE	
CTX1	<i>A. hydrophila</i>	AMX-PIP -CTX-CAZ-CPO-FOX-TE-SXT	
CTX3	<i>K. pneumoniae</i>	AMX-PIP-ATM-CTX-CAZ-CPO-CIP-GM-TE-TMP-SXT	
CTX4	<i>C. freundii</i>	AMX-PIP-ATM-CTX-CAZ-FOX-NA	
CTX5			
CIP1	<i>E. coli</i>	AMX-PIP-CAZ-FOX-NA-CIP-K-TE-C	
CIP2	<i>E. coli</i>	AMX-PIP-CAZ-NA-CIP-TE-TMP-SXT	
CIP3	<i>K. pneumoniae</i>	AMX-PIP-CAZ-FOX-NA-CIP-AN-K-TE-C	

Le transfert génétique réalisé sur 15 souches isolées du mulot n'a pas été concluant (**Tab. 17**), ce qui suggère soit une résistance plasmidique non transférable, ce qui est le cas pour *K. pneumoniae* BLSE+ en raison de la localisation des BLSEs sur de petits plasmides non-autotransférables, ou de grands plasmides déficients en opéron de transfert. (Messai et al., 2006), soit une résistance chromosomique qui reste la plus plausible pour les autres espèces testées.

X. Recherche des gènes de résistance par PCR

X.1. Recherche des bêta-lactamases

La recherche des gènes codants pour la résistance aux bêta-lactamines (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTXM}, *bla*_{CTXM-1}, *bla*_{VEB}, *bla*_{GES} et *bla*_{PER}) a été effectuée par PCR simplex chez les souches présentant des profils de résistance potentiellement acquis. Il est à noter que ces souches ont été isolées à partir de l'espèce *Mugil cephalus*.

L'examen des profils d'amplification après électrophorèse sur gel d'agarose a permis de noter la présence du gène *bla*_{TEM} chez 6/15 souches, *bla*_{SHV} chez 2 souches et *bla*_{CTXM} du groupe 1 uniquement chez *K. pneumoniae* (CTX3) (**Tab. 18 et Fig. 32**). Les gènes *bla*_{VEB}, *bla*_{GES} et *bla*_{PER} n'ont pas été détectés.

Tableau 18 : Résultats de la recherche des bêta-lactamases

Souches	Identification	TEM	SHV	CTX-M	CTX-M du groupe 1	VEB	GES	PER
AX19	<i>E. coli</i>	-	-					
AX20	<i>E. coli</i>	-	-					
AX21	<i>E. coli</i>	-	-					
AX23	<i>K. oxytoca</i>	-	-					
AX26	<i>E. coli</i>	+	-					
AX27	<i>E. coli</i>	+	-					
AX28	<i>E. coli</i>	+	-					
AX29	<i>E. coli</i>	+	-					
CTX1	<i>A. hydrophila</i>	-	-	-	-	-	-	-
CTX3	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	+	-	-	-
CTX4	<i>C. freundii</i>	-	-					
CTX5	<i>C. freundii</i>	+	-			-	-	-
CIP1	<i>E. coli</i>	-	-			-	-	-
CIP2	<i>E. coli</i>	-	-					
CIP3	<i>K. pneumoniae</i>	-	+			-	-	-

X.2. Recherche de céphalosporinases plasmidiques

Les souches présentant une résistance à la céfoxitine et positives au test de la cloxacilline et donc suspectées d'être productrices de céphalosporinases ont été analysées par PCR multiplex pour la recherche des gènes codant les céphalosporinases plasmidiques de type MOX, FOX, CIT, EBC, ACC et DHA.

Les résultats ont montré l'absence des céphalosporinases plasmidiques MOX, DHA, ACC, EBC et FOX; tandis que le gène *bla*_{CIT} a été détecté chez deux souches de *C. freundii*.

Tableau 19 : Résultats de la recherche des céphalosporinases plasmidiques.

souches	Identification	MOX	DHA	ACC	EBC	FOX	CIT
CIP3	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-
CIP1	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-
CTX4	<i>C. freundii</i>	-	-	-	-	-	+
CTX5		-	-	-	-	-	+
CTX1	<i>A. hydrophila</i>	-	-	-	-	-	-

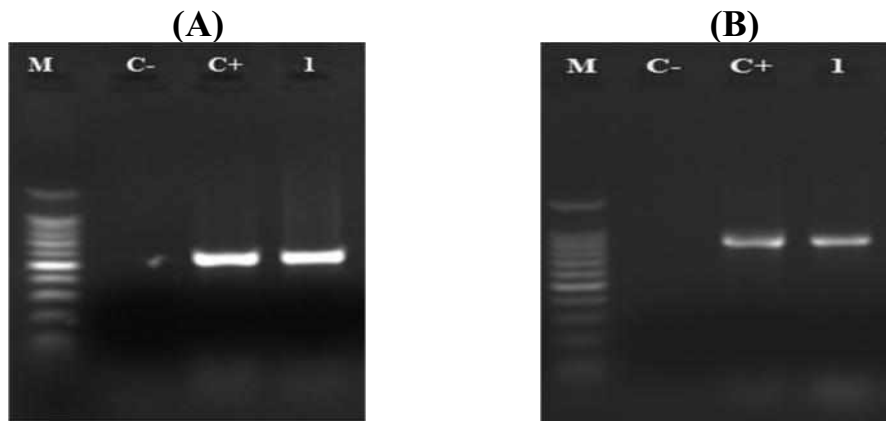


Figure 33: Illustration de la détection du gène *bla*_{CTX-M} (550pb) (A) et *bla*_{CTX-M} du groupe 1 (863pb) (B) chez la souche *K. pneumoniae* CTX3.

M : marqueur 100 pb, **C-** : contrôle négatif, **C+**: contrôle positif, **1** : *K. pneumoniae*.

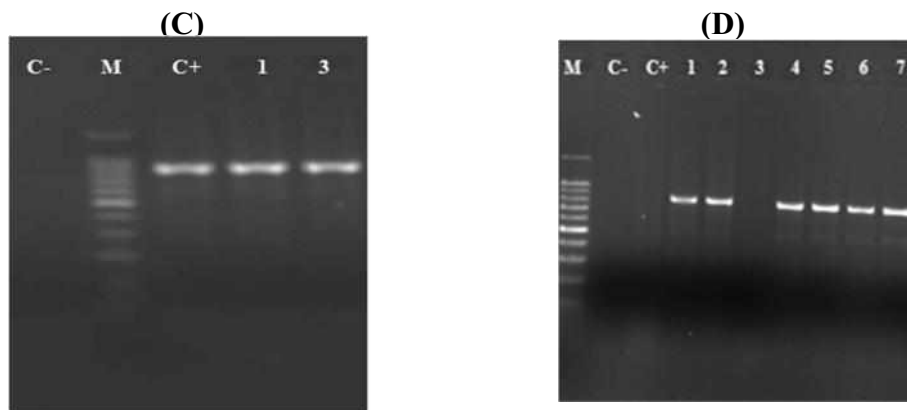


Figure 34 : Illustration de la détection du gène *bla*_{SHV} (925 pb) (C) et *bla*_{TEM} (858 pb) (D).

M : marqueur 100 pb, **C-** : contrôle négatif, **C+**: contrôle positif, **1** : *K. pneumoniae* (CTX3), **2** : *E. coli* (AX26), **3**: *K. pneumoniae* (CIP3), **4**: *E. coli* (AX27), **5**: *E. coli* (AX28), **6**: *E. coli* (AX29), **7** : *C. freundii* (CTX5).



Figure 35: Illustration de la détection du gène *bla*_{CIT} (462pb).

M : marqueur 100pb, **C-** : contrôle négatif, **C+**: contrôle positif, **3** : *K.pneumoniae* (CIP3), **7** : *C. freundii* (CTX5), **8** : *C. freundii* (CTX4).

Résultats et discussion

La caractérisation moléculaire par PCR de la résistance a permis de mettre en évidence la présence de gènes de bêta-lactamases chez des souches d'entérobactéries, ce mécanisme est généralement de nature "acquis" (Cohen et *al.*, 2016).

Quatre souches d'*E. coli*, une de *C. freundii* et une de *K. pneumoniae* étaient porteuses du gène *bla*_{TEM}. Celui-ci confère une résistance à bas niveau aux bêta-lactamines, qui peut devenir de haut niveau suite à une hyperproduction ou à la survenue de mutations ponctuelles (Cavallo et *al.*, 2004). Ce type d'enzyme est fréquemment retrouvées chez *E. coli* et *K. pneumoniae* (Sinha et *al.*, 2007; Nasehi et *al.*, 2010).

Deux souches de *K. pneumoniae* ont été positives pour le gène *bla*_{SHV}. C'est une enzyme naturelle chez cette espèce, elle lui confère une résistance naturelle à bas niveau aux pénicillines. Par ailleurs, cette enzyme peut conférer des résistances de haut niveau par hyperproduction ou mutation (Bradford et *al.*, 2001). Ces enzymes sont couramment décrites en milieu hospitalier et dans l'environnement, parfois en association avec TEM (Bradford, 2001).

Une souche de *K. pneumoniae*, isolée du mulet, a été trouvée productrice d'une bêta-lactamase à spectre élargi du groupe 1 de la famille CTX-M, non transférable par conjugaison. Ce type d'enzymes est prédominant en Algérie et de par le monde (Canton et Coque, 2006). Il a été retrouvé chez *K. pneumoniae* d'origine clinique à Alger (Messai et *al.*, 2008) et d'origine environnementale au niveau des eaux usées et des eaux traitées d'une station d'épuration des eaux usées (Boumerdes) (Alouache et *al.*, 2014). Il a également été rapporté chez *E. coli* isolée des eaux de baignades à Ain Chrob (Alger) (Alouache et *al.*, 2012). Peu d'études ont concerné l'environnement et le poisson sauvage, Moremi et *al.* (2016) ont rapporté une première étude sur l'épidémiologie et la prédominance de CTX-M-15 dans l'environnement et les poissons du lac Victoria (Tanzanie). La présence du gène TEM chez cette même souche est en accord avec les très nombreux travaux en clinique qui ont signalé la coexpression de CTX-M et TEM, ainsi que d'autres phénotypes de résistance, telle que la résistance aux aminosides, quinolones et sulfamides (Peirano and Pitout, 2010; Amaya et *al.*, 2011). Les enzymes CTX-M sont caractérisées par une prédominance et une dissémination massive chez les entérobactéries (Canton et Coque, 2006). Actuellement, c'est le type de BLSE le plus distribué chez *E. coli* d'origine clinique (Brigante et *al.*, 2005 ; Hopkins et *al.*, 2006 ; Fam et El-Damarawy, 2008 ; Song et *al.*, 2009 ; Isaiah et *al.*, 2011) et animale (Li et *al.*, 2007; Machado et *al.*, 2008). La présence de ce mécanisme de résistance chez une entérobactérie isolée du mulet

Résultats et discussion

conforte l'hypothèse d'une contamination du milieu aquatique par des apports anthropiques domestiques ou hospitaliers (Alouache et al., 2012 ; Moremi et al., 2016) ainsi qu'un probable transfert horizontal des gènes de résistance à partir de souches cliniques vers des souches autochtones chez les poissons qui se trouvent dans les eaux qui reçoivent des eaux usées traitées ou non (Kümmerer, 2009; Blaak et al., 2014) cela semble être le cas pour le mullet qui vit près des embouchures.

Deux souches de *C. freundii* contenaient le gène *ampC* de type CIT, associé au gène *bla_{TEM}* chez une souche. Les céphalosporinases de type CIT ont été détectées chez *C. freundii* en milieu clinique (Kao et al., 2010), ainsi que dans les effluents hospitaliers en Algérie (Anssour et al., 2014).

La présence de gènes de résistance aux antibiotiques chez des bactéries isolées à partir des poissons d'élevage a été rapportée, souvent associés à l'utilisation d'antimicrobiens (Furushita et al., 2003; Jin Jun et al., 2004). Dans ce sens, des souches de *Vibrio* spp. isolées à partir de poissons de fermes marines en Espagne, étaient porteuses d'un élément mobile SXT (Rodríguez-Blanco et al., 2012; García-Aljaroet al., 2014). Chez les poissons sauvages, Moremi et al. (2016), ont montré que le Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) provenant du lac Victoria (Tanzanie) avait le gène CTX-M-15, ainsi que d'autres gènes codant la résistance aux tétracyclines, sulfamides, aminoglycosides, fluoroquinolones et triméthoprime. Brahmi et al (2015), ont détecté le même gène chez des souches d'*E. coli*, isolées à partir de poissons du golf de Bejaia. Une autre étude, qui a été faite dans la même zone, sur *Pagellus acarne*, des souches d'*Acinobacter baumannii* avaient le gène OXA 23 (Brahmi et al., 2016).

Bien que l'étude statistique ait révélé une différence non significative quant à l'influence de l'habitat sur la prévalence de la résistance aux antibiotiques, nous remarquons que le mullet a été contaminé par des souches qui comportent des gènes de résistance acquis dont l'origine peut être clinique, ce qui souligne le rôle des apports anthropiques dans l'émergence de la résistance dans les réceptacles environnementaux naturels (Alouache et al., 2012; Brahmi et al., 2015 ; Brahmi et al., 2016 ; Moremi et al., 2016). La détection des gènes de résistance tels que TEM, SHV, CTX-M et CIT dans nos poissons peut être révélateur d'un risque écologique et/ou sanitaire. La présence de ces gènes de résistance en milieu aquatique peut être prédictive de difficultés thérapeutiques dans la prise en charge d'éventuelles zoonoses.

CONCLUSION

Conclusion

Conclusion

L'objectif du travail était l'évaluation et la caractérisation de la résistance aux antibiotiques des bactéries isolées à partir de poissons marins (la sardine commune, le rouget de roche et le mullet cabot) caractérisés par des biotopes spécifiques. Ces poissons ont été pêchés au niveau de la baie d'Alger qui est le réceptacle de rejets anthropiques importants.

Les résultats de l'étude ont montré :

- Des taux de résistance aux antibiotiques élevés parmi la flore mésophile aérobie totale et les coliformes totaux isolés des différents poissons.
- L'analyse statistique des taux de résistance de la flore mésophile aérobie totale et des coliformes totaux, en fonction des espèces étudiées, suggère que l'habitat écologique n'influe pas sur la prévalence de cette résistance.
- Les souches résistantes sont majoritairement des entérobactéries, puis on retrouve à une moindre fréquence les genres *Aeromonas*, *Vibrio* et *Pseudomonas*. La résistance était multiple avec des profils de 2 à 11 antibiotiques. Les mécanismes mis en jeu sont aussi bien naturels chromosomiques que acquis. La caractérisation génétique de la résistance aux bêta-lactamines chez des souches isolées de *Mugil cephalus* a révélé la présence des gènes bla_{TEM} , bla_{SHV} , bla_{CTX-M} du groupe 1 et bla_{CIT} .

Cette étude a mis en évidence l'impact des apports pollués (xénobiotiques et bactéries, notamment résistantes) dans l'émergence et l'établissement de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement marin. La colonisation des poissons, notamment commerciaux, par des bactéries résistantes allochtones, et la possibilité de transfert de cette résistance vers des bactéries autochtones et endogènes des poissons posent un double problème, d'abord sanitaire et ensuite écologique.

En perspective à ce travail :

- ❖ Elargir l'étude à d'autres poissons pour mieux cerner l'effet de l'habitat ;
- ❖ Étendre l'étude à d'autres zones de pêche ;
- ❖ Compléter la caractérisation des mécanismes de résistance des autres familles d'antibiotiques en dehors des bêta-lactamines.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- AGERSO, Y., and GUARDABASSI, L. (2005).** Identification of *Tet 39*, a novel class of tetracycline resistance determinant in *Acinetobacter spp* of environmental and clinical origin. *Journal Antimicrobial and Chemotherapy*. Vol, 55, pp. 566-569.
- AIRES, J. (2011).** Les systèmes d'efflux actifs bactériens : caractérisation et modélisation pour quelles perspectives ?. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*. Vol, 164, pp, 265-270.
- ALOUACHE, S. (2012).** Prévalence et caractérisation de la résistance aux agents antimicrobiens chez les bacilles à Gram négatif isolés de l'environnement. Thèse doctorat. Microbiologie. Alger : USTHB, 135 p.
- ALOUACHE, S., KADA, M., MESSAI, Y., and al. (2012).** Antibiotic resistance and extended-spectrum β -lactamases in isolated bacteria from sea water of Algiers beaches (Algeria). *Microbes and environments*. Vol, 27, pp, 80-86.
- ALOUACHE, S., ESTEPA, V., MESSAI, Y., and al. (2014).** Characterization of ESBLs and associated quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from an urban wastewater treatment plant in Algeria. *Microbiology Drug Resistance*. Vol ,20, pp, 30-38.
- ALVES DE LIMA, S. A., and HOFER, E. (1993).** Resistance to antibiotics and heavy metals in *Escherichia coli* from marine fish. *Environment Toxicology Water Quality*. Vol, 8, pp, 1-11.
- AMBLER, R. P. (1980).** The structure of β lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B. Biological Sciences*. Vol, 289, pp, 321-331.
- ANDREMONT, A. (2015).** What to do about resistant bacteria in the food-chain?. *Bulletin World Health Organisation*. Vol, 93, pp, 217-218.
- ANIHOUI, V. B., SAKYI-DAWSON, E., AYERNOR, G.S, and al. (2009).** Biochemical changes and aroma development during the spontaneous fermentation of cassava fish intolanhouin and their influence on product acceptability. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. Vol, 18, pp, 370-384.
- ANSSOUR, L., MESSAI, Y., DERKAOU, M., and al. (2014).** ESBL, plasmidic AmpC, and associated quinolone resistance determinants in coliforms isolated from hospital effluent : first report of qnrB2, qnrB19, and CMY-4 in Algeria. *Journal of chemotherapy*. Vol, 26, pp, 74-79.
- AOKI, T., and EQUASA, S. (1971).** Drug sensitivity of *Aeromonas liquifaciens* isolated from freshwater fishes. *Bulletin of Japanese Society for Science of Fish*. Vol, 37, pp, 19-28.

Bibliographie

- ATLAS PRATIQUE, (2006).** Poissons et méthodes de pêche : caractéristiques des poissons, stratégies de pêche et les habitats. Paris: Atlas, 224 p.
- AYAMA, E., REYES, D., VILCHEZ, S., and al. (2011).** Antibiotic resistance patterns of intestinal *Escherichia coli* isolates from Nicaraguan children. *Journal of Medical Microbiology*. Vol, 60, pp, 216-222.
- BAKALEM, A. (2008).** Contribution à l'étude des peuplements benthiques du plateau continental algerien. Thèse doctorat. Océanographie. Alger : USTHB, 678 p.
- BAKOUR, R., LAROCHE, Y., and CORNELIS, G. (1983).** Studies of the incompatibility and replication of the 70Kb virulence plasmids of *Yersinia*. *Plasmid*. Vol, 10, pp, 279-289.
- BAQUERO, F., MARTÍNEZ, J. L., and CANTÓN, R. (2008).** Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*. Vol, 19, pp, 260-265.
- BARTHELOT, P., GRATTARD, F., MALLAVAL, F.O., et al. (2005).** Épidémiologie des infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* et *Stenotrophomonas maltophilia*. *Pathologie Biologie*. Vol, 53, pp, 341–348.
- BARTOLONI, A., PALLECCHI, L., and RODRÍGUEZ, H. (2009).** Antibiotic resistance in a very remote Amazonas community. *International Journal and Antimicrobial Agents*. Vol, 33, pp, 125-129.
- BAUCHOT, M. L., et PRAS, A. (1980).** Guide des poissons marins d'Europe. Paris : Delachaux et Niestlé, 427 p.
- BEDENIC, B., SARDELIC, S., VRANIC-LADAVAC, M., and al. (2014).** Carbapenemases of gram-negative bacteria. *Lijecnicki Vjesnik*. Vol, 136, pp, 94-103.
- BENNETT, P. M. (2008).** Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*. Vol, 153 pp, 347 357.
- BERTOLLA, F., PEPIN, R., PASSELEGUE-ROBE, E., and al. (2000).** Plant genome complexity may be a factor limiting in situ the transfer of transgenic plant genes to the phytopatogen *Ralstonia solonacearum*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol, 66. pp, 4161-4167.
- BLAAK, H., DE KRUIJF, P., HAMIDJAJA, R. A., and al. (2014).** Prevalence and characteristics of ESBL-producing *E. coli* in Dutch recreational waters influenced by waste water treatment plants . *Veterinary Microbiology*. Vol, 171, pp, 448–459.
- BONNET, R. (2004).** Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol, 48, pp,1-14.

Bibliographie

BORNER, G. (2000). Intérêt et limites des analyses microbiologiques des denrées dans une stratégie de maîtrise de la sécurité des aliments : cas de la restauration collective. *Bulletin Vétérinaire de France*. Vol, 153, pp, 433-442.

BOUHADDIOUI, B., BEN SLAMA, K., GHARBI, S., and al. (2002). Epidemiology of clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Annals of Microbiology*. Vol, 5, pp ,223-235.

BRADFORD, P. A. (2001). Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol, 14, pp, 933-951.

BRAHMI, S ., TOUATI, A ., CADIÈRE, A ., and al. (2016). First Description of Two Sequence Type 2 *Acinetobacter baumannii* Isolates Carrying OXA-23 Carbapenemase in *Pagellus acarne* Fished from the Mediterranean Sea near Bejaia, Algeria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol, 60, pp, 2513-2515.

BRAHMI, S., DUNYACH-REMY, C ., TOUATI, A ., and al . (2015). CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone O25b-ST131 isolated from wild fish in Mediterranean. *Sea Clinical Microbiology and Infection*. Vol, 21, pp, 18-20.

BRIGANTE, G., LUZZAROA, F., PERILLI, M., and al. (2005). Evolution of CTX-M-type β -lactamase in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol, 25, pp, 157-162.

BRYSKIER, A. (1999). Antibiotique agent antibactérien et antifongique. Paris : Ellipses marketing, 1216 p.

BUSH, K., and JACOBY, G. A. (2010). Updated functional classification of beta lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol, 54, pp, 969 76.

BUSH, K., JACOBY, G. A. and MEDEIROS, A. A. (1995). A functional classification scheme for beta lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol, 39, pp, 1211 33.

CABELLO, F. C. (2003). Antibiotics and aquaculture. An analysis of their potential impact upon the environment, human and animal health in Chile. *Fundacion Terram. Analisis de Politicas*. Vol, 17, pp, 1-16.

CABELLO, F. C., GODFREY, H. P., TOMOVA, A., and al. (2013). Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health . *Environment Microbiology*. Vol, 15, pp, 1917–1942.

Bibliographie

- CANTON, R., and COQUE T. M. (2006).** The CTX-M β -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*. Vol, 9, pp, 466-475.
- CAR/ASP – PNUE/PAM, (2013).** Étude socio-économique de l'activité de pêche et identification des mécanismes de participation des acteurs locaux concernés par l'AMP pilote de Réghaia (Est algérois). Alger : CAR/ASP Projet MedMPAnet, 56 p.
- CARDONA, L. (2000).** Effects of salinity on the habitat selection and growth performance of Mediterranean flathead grey mullet *Mugil cephalus* (Osteichthyes Mugilidae). *Estuarine Coastal and Shelf Science*. Vol, 50 pp, 727-737.
- CASAS, C., ANDERSON, E. C., OJO, K. K., and al. (2005).** Characterization of pRAS1-like plasmids from atypical North American psychrophilic *Aeromonas salmonicida*. *FEMS Microbiology Letters*. Vol, 242, pp, 59-63.
- CA-SFM, (2013).** Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. [consulté le 30 /04/2015] disponible sur le site web ([Http : //www.sfm-microbiologie.org](http://www.sfm-microbiologie.org).)
- CA-SFM, (2015).** Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. [consulté le 25 /02/2015] disponible sur le site web ([Http : //www.sfm-microbiologie.org](http://www.sfm-microbiologie.org).)
- CATTOIR, V. (2004).** Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathologie Biologie*. Vol, 52, pp, 607-616.
- CATTOIR, V. (2012).** Quinolones : de l'antibiogramme aux phénotypes de résistance. *Revue Francophone des Laboratoires*. Vol, 42, pp, 79-87.
- CAVALLO, J. D., FABRE, R., JELHI, F., et al. (2004).** Béta-lactamines. *EMC-Maladies infectieuses*. Vol, 1, pp, 129-202.
- CHANDRASEKARAN, S., BALAKRISHNAN, V., and LALITHAKUMARI, D. (1998).** Transfer and Expression of a Multiple Antibiotic Resistance Plasmid in Marine Bacteria. *Current Microbiology*. Vol, 37, pp, 347-351.
- CHARDON, H., et BRUGER, H. (2014).** Usage des antibiotiques en élevage et filières viandes. Cahiers sécurité sanitaire santé animale. Paris: Centre d'Information des Viandes, 34 p.
- CHERIF, M., GHARBI, H., JARBOUI, O., et al. (2007).** Le rouget de roche (*Mullus surmuletus* L, 1758) des côtes nord Tunisiennes : Reproduction, sexualité et croissance. *Bullettin de Institut National des Sciences et Technologie de la Mer de Salammbô*. Vol, 34, pp, 9-19.
- CHERIF, M., SELMI, S., GHARBI, H., et al. (2008).** Régime alimentaire de rouget de roche (*Mullus surmuletus* L, 1758) des côtes nord Tunisiennes. *Bullettin de Institut National des Sciences et Technologie de la Mer de Salammbô*. Vol, 35, pp, 39-47.

Bibliographie

- CHOI, S., CHU, W., BROWN, J., and al. (2003).** Application of *enterococci* antibiotic resistance patterns for contamination source identification at Huntington Beach, California. *Marine Pollution Bulletin*. Vol, 46, pp, 748-755.
- CHOPRA, I., and ROBERTS, M. (2001).** Tetracycline antibiotics : mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol, 65, pp, 232-260.
- COATES, A., HU, Y., BAX, R., and al. (2002).** The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nature Reviews Drug Discov*. Vol, 1, pp, 895-910.
- COHEN, J., POWDERLY, G. W., and OPAL, S. (2016).** Infectious Diseases. 4^{ème} Ed. Paris : Elsevier, 2016 p.
- COLLETTE-BREGAND, M., JAMES, A., MUNSHY, C., et al. (2009).** Contamination des milieux aquatiques par les substances pharmaceutiques et cosmétiques. Etats des lieux et perspectives. Paris: Ifremer, 44 p.
- CORVAGLIA, A. R. (2006).** Rôle des résidus d'antibiotiques dans l'environnement hydrique sur la sélection et la diffusion de bactéries résistantes des genres "*Aeromonas*", "*Acinetobacter*" et "*Legionella*". Thèse de doctorat. Science. Genève, 379 p.
- COURVALIN, P., GOLDSTEIN, F., PHILIPPON, A. et al. (1985).** L'antibiogramme.. Paris : MPC Videom, 343 p.
- DADZIE, S., ABOU-SEEDO, F., and AL-QATTAN, E., (2000).** The food and feeding habits of the silver pomfret, *Pampusargenteus* (Euphrasen) in Kuwait waters. *Journal of Applied Ichthyology*. Vol, 16, pp, 61-67.
- DANG, H., ZHAO, J., SONG, L., and al. (2009).** Molecular characterizations of chloramphenicol and oxytetracycline-resistant bacteria and resistance genes in mariculture waters of China. *Marine Pollution Bulletin*. Vol, 58, pp, 987-994.
- DAVIES, J. (1994).** Inactivation of antibiotics and dissemination of resistance genes. *Science*. Vol.,264, pp, 375-382.
- DAVISON, H. C., LOW, J.C., and WOOLHOUSE, E. J. (2000).** What is antibiotic resistance and how can we measure it?. *Trends in Microbiology*. Vol, 8, pp, 554-559.
- DEMANÈCHE, S., JOCTEUR-MONROZIER, L., QUIQUAMPOIX, H., and al. (2000).** Evaluation of Biological and Physical Protection against Nuclease Degradation of Clay-Bound Plasmid DNA. *Applied Environmental Microbiology*. Vol, 67, pp, 293-299.

Bibliographie

- DJABALI, I.F., BRAHIM, B., et MAMMASSE, M. (1993).** Pelagos, « Poissons des côtes algériennes. Alger : Bulletin de l'Institut des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral. I.S.M.A.L, 215 p.
- DOI, Y., WACHINO, J. I., ISHIGURO, M., and al. (2004).** Inhibitor sensitive AmpC β -lactamase variant produced by an *Escherichia coli* clinical isolate resistant to oxyimino cephalosporins and cephamycins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol, 48, pp, 2652-2658.
- DOLEJSKÁ, M., BIEROSOVÁ, B., KOHOUTOVÁ, L., and al. (2009).** Antibiotic resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended spectrum β -lactamases in surface water and sympatric blackheaded gulls. *Journal of Applied Microbiology*. Vol, 106, pp, 1941-1950.
- DU, L., and LIU, W. (2012).** Occurrence, fate, and ecotoxicity of antibiotics in agroecosystems. *A review Agronomy of Sustainable Development*. Vol, 32, pp, 309–327.
- DUBNAU, D. (1999).** DNA uptake in bacteria. *Annual Review of Microbiology*. Vol, 53, pp, 217-244.
- DZIDIC, S., SUSKOVIC, J., and KOS, B. (2008).** Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technology and Biotechnology*. Vol, 46, pp, 11-21.
- EAS, (2008).** East African Standard. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination-Part 1-4: Specific rules for the preparation of fish and fishery products, 11 p.
- FAM, N. S., and EL-DAMARAWY M. M. (2008).** CTX-M-15 Extended-Spectrum Beta-lactamases Detected from Intensive Care Unit of an Egyptian Medical Research Institute. *Research Journal of Medicine and Medical Sciences*. Vol, 3, pp, 84-91.
- FILLEUL, A. (2004).** Tout savoir sur les poissons de mer. France: Larivière, 125 p.
- FRERE, J. M., GALLEN, M., BUSH, K., and al. (2005).** Is it necessary to change the classification of β -lactamases?. *Journal Antimicrobial and Chemotherapy*. Vol, 55, pp, 1051-1053.
- FROESE, R., and PAULY, D. (2015).** FishBase. World Wide Web electronic publication. Editors. www.fishbase.org, version (10/2015).
- FURUSHITA, M., SHIBA, T., MAEDA, T., and al. (2003).** Similarity of Tetracycline Resistance Genes Isolated from Fish Farm Bacteria to Those from Clinical Isolates. *Applied And Environmental Microbiology*. Vol, 69, pp, 5336–5342.

Bibliographie

- GARCIA-ALJARO, C., RIERA-HEREDIA, J., and BLANCH, A.R. (2014).** Antimicrobial resistance and presence of the SXT mobile element in *Vibrio* spp. Isolated from aquaculture facilities. *New Microbiologica*. Vol, 37, pp, 339-346.
- GHOSH, K. and MANDAL, S. (2010).** Antibiotic Resistant Bacteria in Consumable Fishes from Digha coast, West Bengal, India. *Proceedings of zoological Society*. Vol, 63, pp, 13–20.
- GONI-URRIZA, M., CAPDEPUY, M., ARPIN, C., and al. (2000).** Impact of an Urban Effluent on Antibiotic Resistance of Riverine Enterobacteriaceae and *Aeromonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol, 66, pp, 125-132.
- GRALL, N., ANDREMONT, A., et ARMAND-LEFEVRE, L. (2011).** Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse ?. *Journal des Anti-infectieux*. Vol, 10, pp, 10-16.
- Guiraud J. P., 1998.** Microbiologie alimentaire. Paris : Dunod, 652p.
- HAKENBECK, R., and COYETTE, J. (1998).** Resistant penicillin-binding proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Vol, 54, pp, 332-340.
- HANSON, N. D. (2003).** AmpC b-lactamases: what do we need to know for the future?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol, 52, pp, 2-4.
- HARAKEH, S., HADI, Y., and EL-FADEL, M. (2006).**Antimicrobial-resistant patterns of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains in the aquatic Lebanese environments. *Environmental Pollution*. Vol, 143, pp, 269-277.
- HARBOTTLE, H., THAKUR, S., ZHAO, S., and al. (2006).** Genetics of antimicrobial resistance. *Animal Biotechnology*. Vol, 17, pp, 111-124.
- HARMELIN-VIVIEN, M., et HARMELIN, J.G. (1991).** Guide des poissons de la méditerranée. Vie, mœurs et principaux peuplements des espèces littorales. Paris : Délachaux et niestlé, 144p.
- HOPKINS, K. L., BATCHELOR, M. J., LIEBANA, E., and al. (2006).** Characterisation of CTX-M and *AmpC* genes in human isolates of *Escherichia coli* identified between 1995 and 2003 in England and Wales. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol, 28, pp, 180-192.
- HOUMA, F. (2009).** Modélisation et cartographie de la pollution marine et de la bathymétrie à partir de l'imagerie satellitaire. Thèse doctorat. Sciences de l'Univers et Environnement. Paris: VMP XII, 232 p.

Bibliographie

- ILIEV, I., MARHOVA, M., GOCHEV, V., and al. (2015).** Antibiotic resistance of Gram-negative benthic bacteria isolated from the sediments of Kardzhali Dam (Bulgaria). *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. Vol, 29, pp, 274-280.
- ISAIAH, I. N., NCHE, B. T., NWAGU, I. G., and al. (2011).** Incidence of temonera, sulphuhydryl variables and cefotaximase genes associated with β -lactamase producing *Escherichia coli* in clinical isolates. *North American Journal Medical Sciences*. Vol, 3pp, 557-561.
- JACOBY, G.A. (2005).** Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clinical of Infection Diseases*. Vol, 41, pp, 120-126.
- JARLIER, V., NICOLAS, M., FOURNIER, G., and al. (1988).** Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Review of Infection Diseases*. Vol, 4,pp, 143-149.
- JEMAA, S., DUSSENE, M., CUVILIER, P., et al. (2015).** Composition du régime alimentaire de l'anchois (*Engraulis encrasicolus*) et de la sardine (*Sardina pilchardus*) en Atlantique et en Méditerranée. *Lebanese Science Journal*. Vol, 16, pp, 7-22.
- JETERS, RT., WANG, GR., MOON, K., and al. (2009).** Tetracycline-associated transcriptional regulation of transfer genes of the Bacteroides conjugative transposon CTnDOT. *Journal of Bacteriology*. Vol, 191, pp, 6374-6382.
- JIN JUN. L., BUM JEONG, J., HUH, M.D., and al. (2004).** Detection of tetracycline-resistance determinants by multiplex polymerase chain reaction in *Edwardsiella tarda* isolated from fish farms in Korea. *Elsevier*. Vol, 240, pp, 89-100.
- KAO, C.C., LIU, M.F., LIN, C.F., and al. (2010).** Antimicrobial susceptibility and multiplex PCR screening of AmpC genes from isolates of *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens*. *Journal of Microbiology Immunology and Infection*. Vol,43, pp,180-187.
- KELLY, B. G., VESPERMANN, A., and BOLTON, D. J. (2009).** Gene transfer events and their occurrence in selected environments. *Food and Chemical Toxicology*. Vol, 47, pp 978-983.
- KEMPER, N. (2008).** Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment . *Ecological Indicators*. Vol, 8. pp,1–13.
- KHERRAZ, A. (2015).** Biologie et dynamique de la population exploitée du rouget de roche *Mullus surmuletus* (Linné, 1758) pêché dans la région de Mostaganem. Thèse de

Bibliographie

Doctorat. Evaluation et gestion des ressources halieutiques. Algérie : Université d'Oran Ahmed Ben Bella 1, 109p.

KIM, J., PARK, Y. J., KIM, S. I., and al. (2004). Nosocomial outbreak by *Proteus mirabilis* producing extended-spectrum β -lactamases VEB-1 in Korean university hospital. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*. Vol, 54 ,pp,1144-1147.

KOHANSKI, M. A., DWYER, D. J., HAYETE, B., and al. (2007). A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cellular*. Vol, 130, pp, 797-810.

KUMAR, H. S., PARVATHI, A., KARUNASAGAR, I., and al. (2005). Prevalence and antibiotic resistance of *Escherichia coli* in tropical sea food. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol, 21, pp, 619-623.

KÜMMERER, K. (2004). Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol, 54, pp, 311- 320.

KÜMMERER, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment. *A review-Part II. Chemosphere*. Vol, 75, pp, 435-441.

LAGHA, N. (2015). Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) isolées de l'hôpital de Laghouat. Thèse doctorat. Science. Alger : UABBT, 63 p.

LECLAIRE, L. (1972). La sédimentation holocène sur le versant Méridional du bassin Algéro-Baléares (Précontinent Algérien). Tome XXIV. France : Muséum, 391 p.

LECOINTRE, G., et LE GUYADER, H. (2001). Clacification phylogénique du vivant. France : Belin, 543 p.

LEE, J.Y. (1961). La sardine du golf de lion. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches maritimes*. Vol, 25, pp, 418-513.

LÉVESQUE, C., PICHÉ, L., LAROSE, C., and al. (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol, 39 ,pp, 185-191.

Li, X.Z., Mehrotra, M., Ghimire, S., and al. (2007). β -lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin. *Veterinary Microbiology*. Vol, 121, pp, 197-214.

LIVERMORE, D. M. (1995). β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Revue*. Vol, 8, pp, 557-584.

LIVERMORE, D. M. (2008). Defining an extended-spectrum β -lactamase. *Clinical Microbiol and Infection*. Vol, 14, pp, 3-10.

Bibliographie

- LOBOVA, T. I., BARKHATOV, Y. V., SALAMATINA, O. V., and al. (2008).** Multiple antibiotic resistance of heterotrophic bacteria in the littoral zone of Lake Shira as an indicator of human impact on the ecosystem. *Microbiological Research*. Vol, 163, pp, 152-160.
- LOUISY, P. (2002).** Guide d'identification des poissons marins Europe et Méditerranée. Paris : Ulmer, 430 p.
- MACHADO, E., COQUE, T. M., CANTON, R., and al. (2008).** Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum β -lactamases among *Enterobacteriaceae* isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol, 62, pp, 296-302.
- MACHADO, E., COQUE, T.M., CANTÓN, R., and al. (2009).** Leakage into Portuguese aquatic environments of extended-spectrum-bêta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*. *Journal Antimicrobial and Chemotherapy*. Vol, 63, pp, 616-618.
- MAMURIS, Z., APOSTOLIDIS, A. P, et TRIANTAPHYLLIDIS, C., (1998).** Genetic protein variation in red mullet (*Mullus barbatus*) and striped mullet (*M. surmuletus*) populations from the Mediterranean sea. *Marine Biologie*. Vol, 130, pp, 353-360.
- MARKOULATOS, P., SIAFAKAS, N., and MONCANY M.(2002).** Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. Vol,16, pp,47-51.
- MARTINEZ, J. L. (2009).** Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*. Vol, 157, pp, 2893-2902.
- MARTINEZ, J. L. (2009).** The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proceedings Biological Sciences*. Vol, 276, pp, 2521-2530.
- MARTINEZ, J. L., and BAQUERO, F. (2000).** Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol, 44, pp, 1771-1777.
- MATYAR F. (2016).** Isolation, identification and antibacterial agents resistance among *enterobacteriaceae spp*. In fish of the eastern mediterranean. The 2016 WEI International Academic Conference Proceedings. Spain, pp, 18-20.
- MATYAR, F., DINÇER, S., KAYA, A., and al. (2004).** Prevalence and resistance to antibiotics in Gram negative bacteria isolated from retail fish in Turkey. *Annals of Microbiology*. Vol, 54, pp, 151-160.
- MATYAR, F., KAYA, A., and DINÇER, S. (2008).** Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. *Science of the Total Environment*. Vol, 407, pp, 279-285.

Bibliographie

- MCARTHUR, J. V., and TUCKEFIELD, R. C. (2000).** Spatial patterns in antibiotic resistance among stream bacteria: Effect of industrial pollution. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol, 66, pp, 3722-3726.
- MCDANIEL, L. D., JEUNE, E., DELANEY, J., and al. (2010).** High Frequency of Horizontal Gene Transfer in the Oceans. *Science*. Vol, 330, 50 p.
- MERENS, A., DELACOUR, H., PLESIAT, P., and al. (2011).** *Pseudomonas aeruginosa* et résistance aux antibiotiques. *Revue Francophone des Laboratoires*. Vol, 435, pp, 49-62.
- MESAROS, N., VAN BAMBEKE, F., GLUPCZYNSKI, Y., et al. (2005).** L'efflux des antibiotiques: un mécanisme ubiquitaire conduisant à la résistance. État de la question et implications microbiologiques et cliniques. *Louvrain médical*. Vol, 8, pp, 308-320.
- MESSAI, Y., BENHASSINE, T., NAIM, M., and al. (2006).** Prevalence of beta-lactams resistance among *Escherichia coli* clinical isolates from a hospital in Algiers. *Revista Espanola de Quimioterapia*. Vol, 19, pp, 144-151.
- MESSAI, Y., IABADENE, H., BENHASSINE, T., and al. (2008).** Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). *Pathologie Biologie*. Vol, 56, pp, 319-325.
- MINGEOT-LECLERCQ, M. P., GLUPCZYNSKI, Y., and TULKENS, P. M. (1999).** Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol, 43, pp, 727-737.
- MIRANDA, C. D., and ZEMELMAN, R. (2001).** Antibiotic Resistant Bacteria in Fish from the Concepción Bay, Chile. *Marine pollution bulletin*. Vol, 42, pp, 1096-1102.
- MIRANDA, C. D., and ZEMELMAN, R. (2002).** Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. *The Science of the Total Environment*. Vol, 293, pp, 207-218.
- MOREMI, N., MANDA, E. V., FALGENHAUER, L., and al. (2016).** Predominance of CTX-M-15 among ESBL Producers from Environment and Fish Gut from the Shores of Lake Victoria in Mwanza, Tanzania. *Frontiers in Microbiology*. Vol, 7, pp, 1-11 .
- MOUBARECK, C., BOURGEOIS, N., et DOUCET POPULAIRE, F. (2003).** L'utilisation des antibiotiques en pratiques vétérinaire et ses risques pour la santé humaine. *Environnement, Risques et Santé*. Vol, 2, pp, 97-104.
- MUUS, B. J., NIELSEN, J. G., DAHLSTRÖM, P., et al. (1998).** Guide des poissons de mer et de peche. Biologie, peche, importance économique. Paris : Delachaux et Niestlé, 335 p.

Bibliographie

- N'GUYEN, Y., et BAUMARD, S. (2012).** Tétracyclines, Glycylcyclines. EMC-AKOS *Traité de Médecine*. Vol, 7, pp, 1-6.
- NAAS, T., and NORDMANN, P. (2005).** OXA-type β -lactamases. *Current Pharmaceutical Design*. Vol, 5, pp, 865–879.
- NAAS, T., VANDEL, L., SOUGAKOFF, W., and al. (1994).** Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol, 38, pp, 1262-70.
- NASEHI, L., SHAHCHERAGHI, F., NIKBIN, V. S, and al. (2010).** PER, CTX-M, TEM and SHV Beta-lactamases in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Tehran, Iran. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. Vol, 13, pp, 111-118.
- NEWMAN, J. T., COSENZA, B. J., and BUCK, J. D. (1972).** Aerobic microflora of the blue fish (*Pomatomis saltatrix*) intestine. *Journal of Fish Research Board of Canada*. Vol, 29, pp, 333-336.
- NORDMANN, P., et MAMMERI, H. (2007).** Résistance plasmidique aux quinolones. *Antibiotiques*. Vol, 9, pp, 246-53.
- NORDMANN, P., and CARRER, A. (2010).** Carbapenemases in enterobacteriaceae. *Archives de Pédiatrie*. Vol, 17, pp, 154-162.
- NORMAN, A., HANSEN, L. H., and SORENSEN. S. J., (2009).** Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. Vol, 364, pp, 2275-2289.
- NORMARK, B. H, and NORMARK, S. (2002).** Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*. Vol, 252, pp, 91-106.
- OLIVEIRA, A. J. F. C., FRANCA, P. T. R., and PINTO, A. B. (2010).** Antimicrobial resistance of heterotrophic marine bacteria isolated from sea water and sands of recreational beaches with different organic pollution levels in south eastern Brazil: evidences of resistance dissemination. *Environmental Monitoring Assessment*. Vol, 169, pp, 375-384.
- OZGUMUS, O. B., SANDALLI, C., SEVIM, A., and al. (2009).** Class 1 and Class 2 Integrons and Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance in Coliforms Isolated from Ten Rivers in Northern Turkey. *The Journal of Microbiology*. Vol, 47, pp, 19-27.
- PAC, (2005).** Protection des sites sensibles naturels marins du secteur Cap Djinet au Mont de Chenoua. Impact des activités anthropiques. Rapport. Programme d'Aménagement Côtier (PAC) « Zone Côtière Algéroise », 88p.

Bibliographie

- PALLECCHI, L., BARTOLONI, A., PARADISI, F., and al. (2008).** Antibiotic resistance in the absence of antimicrobial use: mechanisms and implications. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. Vol, 6, pp,725-732.
- PALMER, K. L, KOS, V. N, and GILMORE, M. S. (2010).**Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*. Vol, 13, pp, 632-639.
- PAN, X., DENG, C., ZHANG, D., and al. (2008).** Toxic effects of amoxicillin on the photosystem II of *Synechocystis sp* by variety of in vivo chlorophyll fluorescence tests. *Aquatic Toxicology*. Vol, 89, pp, 207-213.
- PEIRANO, G., and PITOUT, J. D. (2010).** Molecular epidemiology of Escherichia coli producing CTX-M β -lactamases: the world wide emergence of clone ST131 O25:H4. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol, 35, pp, 316-321.
- PÉREZ-PÉREZ, F. J., and HANSON, D. N. (2002).** Detection of plasmid-mediated AmpC β -Lactamase genes in clinical isolates by using Multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*. Vol, 40, pp, 2153-2162.
- PHILIPPON, A., ARLET, G., and SCHLEMMER, B. (1993).** Bêta-lactamines (I). Encyclopidie Medico-chirurgicale. Paris : Elsevier, N, 8, 25 p.
- Philippon, A., et Arlet, G. (2006).** β -Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel !. *Annales de Biologie Clinique*. Vol, 64, pp, 37-51
- PINA, P., PANGON, B., RIO, Y., et al. (2000).** Sensibilité des Entérobactéries aux antibiotiques en Unités de soins intensifs. *Journal of Pathology and Biology*. Vol, 48, pp, 485-489.
- POIREL, L., MENUTEAU, O., AGOLI, N., and al. (2003).**Outbreak of extended-spectrum β -lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol, 41, pp, 3542-3547.
- PONTES, D. S., PINHEIRO, F. A., LIMA-BITTENCOURT, C. I., and al. (2009).**Multiple antimicrobial resistance of gram-negative bacteria from natural oligotrophic lakes under distinct anthropogenic influence in a tropical region. *Microbial Ecology*. Vol, 58, pp, 762-772.
- POTÉ, J., THEVENON, F., et WILDI, W. (2012).** Les indicateurs de bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques dans les sédiments du Léman. *Archives des Sciences*. Vol, 65, pp,1-11.

Bibliographie

- PRUDEN, A., PEI, R., STORTEBOOM, H., and al. (2006).** Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: Studies in Northern Colorado. *Environmental Science and Technology*. Vol, 40, pp, 7445-7450.
- QUEENAN, A. M., and BUSH, K. (2007).** Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol, 20, pp, 440–458.
- QUERO, J. C., et VAYNE, J. J. (1997).** Les poissons de mer des pêches françaises. Paris: Delachaux et Niestlé, 304 p.
- RASMUSSEN, B. A., BUSH, K., KEENEY, D., and al. (1996).** Characterization of IMI-1 β -lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol, 40, pp, 2080-2086.
- RICHMOND, M. H. (1972).** Some environmental consequences of the use of antibiotics 'Or what's up must come down'. *Journal Applied Bacteriology*. Vol, 35, pp, 155-176.
- RODRIGUEZ-BLANCO, A., LEMOS, M. L., and OSORIO, C. R. (2012).** Integrating Conjugative Elements as Vectors of Antibiotic, Mercury, And Quaternary Ammonium Compound Resistance in Marine Aquaculture Environments. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol, 56 , pp, 2619–2626.
- SAMBROOK, J., FRISTSH, E. F., and MANIATIS, T. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual. 2^{ème} ed. Neu Yourk: Cold spring Harbor, 1120 p.
- SANDERS, P., BOUSQUET-MELOU, A., CHAUVIN, C., et al. (2011).** Utilisation des antibiotiques en élevage et enjeux de santé publique. *INRA Productions animales*. Vol, 24, pp, 199-204.
- SAPKOTA, A., SAPKOTA, A. R., KUCHARSKI, M., and al. (2008).** Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities. *Environment International*. Vol, 34, pp, 1215–1226.
- SARTER, S., NGUYEN, H. N. K., HUNG, L. T., and al. (2007).** Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from farmed catfish. *Food Control*. Vol, 18, pp, 1391-1396.
- SCAIFE, W., YOUNG, H. K., PATON, R. H., and al. (1995).** Transferable imipenem-resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. *Journal Antimicrobial and Chemotherapy*. Vol, 36, pp, 585-586.
- SCARANO, C., SPANU, C., ZIINO, G., et al. (2014).** Résistance aux antibiotiques de *Vibrio* espèces isolées de *Sparus aurata* élevés de la mariculture italienne. *New microbiologica*. Vol, 37, pp, 329-337.

Bibliographie

SCHMIEDER, R., and EDWARDS, R. (2012). Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. *Future Microbial*. Vol,7, pp,73-89.

SERVAIS, P., and PASSERAT, J. (2009). Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France). *Science of the Total Environment*. Vol, 408, pp, 365-372.

SEYFRIED, E. E., NEWTON, R. J., RUBERT K. F., and al. (2010). Occurrence of Tetracycline Resistance Genes in Aquaculture Facilities with Varying Use of Oxytetracycline. *Microbial Ecology*. Vol, 59, pp, 799-807.

SILVA, J., ZEMELMAN, R., MONDACA, M. A., and al. (1987). Antibiotic-resistant Gram negative bacilli isolated from sea water and shell fish. Possible epidemiological implications. *Revista Latino Americana de Microbiologia*. Vol, 29, pp, 165-169.

SIMÕES, R. R., POIREL, L. P. M., COSTA, D. A, and al. (2010). Seagulls and beaches as reservoirs for multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*. Vol, 16, pp, 110-112.

SINHA, M., SRINIVASA, H., and MACADEN, R. (2007). Antibiotic resistance profile and extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production in *Acinetobacter* species. *Indian Journal of Medical Research*. Vol, 126, pp, 63-70.

SITTI, A. H. (2001). Contribution à l'étude de l'évolution de la qualité bactériologique des produits de la pêche de 1997-2000. Thèse de doctorat. Vétérinaire. Dakar : EISMV, 17 p.

SKURNIK, D. (2009). Les intégrons : structure et épidémiologie. *Antibiotiques*. Vol, 11, p p, 116-129.

SMALDONE, G.,MARRONE, R., CAPPIELLO, S., and al. (2014). Occurrence of antibiotic resistance in bacteria isolated from seawater organisms caught in Campania Region: preliminary study. *BMC Veterinary Research*. Vol,10, pp, 1-7.

SMITH, P., HINEY, M. P., and SAMUELSEN, O. B. (1994). Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming : A critical evaluation of method and meaning. *Annual Review of Fish Diseases*. Vol, 4, pp, 273-313.

SONG, W., LEE, H., LEE, K., and al. (2009). CTX-M-14 and CTX-M-15 enzymes are the dominant type of extended-spectrum β -lactamase in clinical isolates of *Escherichia coli* from Korea. *Journal of Medical Microbiology*. Vol, 58, pp, 261-266.

STANISLAV, F. (1997). Poissons de mer. Paris: Gründ, 224 p.

Bibliographie

- STEWART, K. R., and KODITSCHKEK, L. (1980).** Drug-resistance transfer in *Escherichia coli* in New York Bight sediment. *Marine Pollution Bulletin*. Vol, 11, pp,130-133.
- SUGITA, H., USHIOKA, S., KIHARA, D., and al. (1985).** Changes in the bacterial composition of water in a carp-rearing tank. *Aquaculture*. Vol, 44, pp, 243-247.
- TENOVER, F. C. (2006).** Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine*. Vol, 119, pp, 3-10.
- TERNES, T. A. (1998).** Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Resources*. Vol, 32, pp, 3245-3600.
- THOMAS, C. M. and NIELSEN, K. M. (2005).** Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews of Microbiology*. Vol, 3, pp, 711-721.
- TIPPER, D. J. (1985).** Mode of action of beta-lactam antibiotics. *Pharmacology and Therapeutics*. Vol, 27, pp,1-35.
- TOUATI, A., BENALLAOUA, S., FORTE, D., and al. (2006).** First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Bejaia, Algeria. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol, 27, pp, 397-402.
- VEDEL, G. (1997).** La lecture interprétative facteur de maîtrise de l'antibiogramme. *Spectra Biologie*. Vol, 16, pp, 465-478.
- VEDEL, G. (2005).** Simple method to determine β -lactam resistance phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* using the disc agar diffusion test. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*. Vol, 56, pp, 657-664.
- VEDEL, G. (2005).** Simple method to determine β -lactam resistance phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* using the disc agar diffusion test. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol, 56, pp, 657-664.
- WALSH, C. (2003).** Where will new antibiotics come from?. *National Reviews of Microbiology*. Vol,1, pp, 65-70.
- WALSH, T. R. (2006).** Combinatorial genetic evolution of multiresistance. *Current Opinion in Microbiology*. Vol, 9, pp, 476-82.
- WALTMAN, W. D., and SHOTTS, E. B. (1986).** Antimicrobial susceptibility of *Edwardsiella tarda* from the United States and Taiwan. *Veterinary Microbiology*. Vol, 12, pp, 277-282.

Bibliographie

Wang, X., Chen, G., Wu, X., and al. (2015). Increased prevalence of carbapenem resistant Enterobacteriaceae in hospital setting due to cross-species transmission of the *bla*_{NDM-1} element and clonal spread of progenitor resistant strains. *Frontiers in Microbiology*. Vol, 6, pp, 595.

WATANABE, M., IYOBE, S., INOUE, M., and al. (1991). Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol, 35, pp, 147-151.

WEIL, F. X., DEMARTIN, M., TANDE, D., and al. (2004). SHV-12-like extended-spectrum- β -lactamase-producing strains of *Salmonella enterica* serotypes Babelsberg and Enteritidis isolated in France among infants adopted from Mali. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol, 42, pp, 2432-2437.

WHITEHEAD, P. J. P., BAUCHOT, M. L., HUREAU, J. C., and al. (1984). Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean. Paris: Unesco. Vol, I. 510 p.

WHITEHEAD, P. J. P., BAUCHOT, M. L., HUREAU, J. C., and al. (1986). Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean. Paris: Unesco. Vol. III, pp, 1015-1473.

WILKE, M. S., LOVERING, A. L., and STRYNADKA, N. C. (2005). Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology*. Vol, 8, pp, 525-533.

WITTE, W. (2000). Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora environment. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol, 14, pp, 321-325.

WOLFF, M., JOLY-GUILLOU, M. L., et PAJOT, O. (2008). Le point sur les carbapénèmes. *Reanimation*. Vol, 17, pp, 242-250.

WRIGHT, G. D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Vol, 57, pp, 1451-1470.

Xi, C., Zhang, Y., and Marrs, C. F. (2009). Prevalence of antibiotic resistance in drinking water treatment and distribution systems. *Applied Environmental Microbiology*. Vol, 75, pp, 5714-5718.

YALA, D., MERAD, A. S., MOHAMEDI, D., et al. (2001). Classification et mode d'action des antibiotiques. *Medicine du Maghreb*. Vol, 1, pp, 5-12.

YATES, C. M., BROWN, D. J., EDWARDS, G. F. S. and al. (2003). Detection of TEM-52 in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolated in Scotland. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*. Vol, 53, pp, 407-408.

Bibliographie

YOUNG, H. K. (1993). Antimicrobial resistance spread in aquatic environments. *Journal Antimicrobial and Chemotherapy*. Vol, 31, pp, 627-635.

ZHANG, X. X., ZHANG, T., and FANG, H. H. P. (2009). Antibiotic resistance genes in water environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol, 82, pp, 397-414.

ZHANG, X. X., ZHANG, T., and FANG, H.H.P. (2009). Antibiotic resistance genes in water environment. *Applied of Microbiology and Biotechnology*. Vol, 82, pp, 397-414.

ANNEXES



Tableau 1 : Résultats d'antibiogramme des souches isolées à partir de *Sardina pilchardus*.

Souches	PIP	AMX	ATM	CTX	CAZ	CPO	FOX	IMP	NA	CIP	AN	K	GM	TE	TMP	SXT	C
AX1 <i>A.hydrophila</i>	24	0 R	48 S	44 S	27 S	35 S	26 S	36 S	39 S	40 S	28 S	37 S	26 S	30 S	27 S	22 S	35 S
AX2 <i>C.braakii</i>	26 S	0 R	36 S	36 S	18 R	29 S	0 R	29 S	23 S	31 S	25 S	34 S	24 S	20 S	28 S	25 S	25 S
AX3 <i>Ser.fonticola</i>	28 S	0 R	36 S	36 S	23 I	30 S	0 R	31 S	28 S	42 S	23 S	31 S	24 S	25 S	31 S	25 S	27 S
AX4 <i>Led.adecarboxylata</i>	32 S	15 R	40 S	38 S	26 S	32 S	23 S	30 S	29 S	38 S	22 S	30 S	20 S	28 S	29 S	26 S	31 S
AX5 <i>C.braakii</i>	26 S	0 R	32 S	32 S	22 I	30 S	7 R	29 S	28 S	36 S	23 S	32 S	20 S	25 S	29 S	25 S	27 S
AX6 <i>V.fluvialis</i>	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	11 R	28 S	30 S	30 S	31 S	27 S	22 S	10 R	19 S	21 S

Tableau 2 : Résultats d'antibiogramme des souches isolées à partir de *Mullus surmelutus*.

Souches	PIP	AMX	ATM	CTX	CAZ	Cfp	FOX	IMP	NA	CIP	AN	K	GM	TE	TMP	SXT	C
AX7 <i>A.hydrophila</i>	14 R	0 R	36 S	40 S	32 S	40 S	0 R	42 S	46 S	S	32 S	46 S	30 S	38 S	30 S	24 S	40 S
AX8 <i>C.braakii</i>	25 S	9 R	36 S	38 S	20 R	31 S	25 S	36 S	26 S	46 S	28 S	27 S	26 S	23 S	28 S	25 S	29 S
AX9 <i>C.braaki</i>	26 S	0 R	36 S	38 S	19 R	30 S	22 S	32 S	28 S	41 S	23 S	21 S	21 S	28 S	30 S	27 S	27 S
AX10 <i>K.pneumoniae</i>	24 S	0 R	32 S	34 S	20 R	30 S	23 S	30 S	25 S	30 S	20 S	28 S	20 S	25 S	29 S	25 S	30 S
AX11 <i>Ser.odorifera</i>	20 S	0 R	35 S	38 S	20 R	25 S	21 S	35 S	24 S	35 S	23 S	30 S	21 S	27 S	29 S	26 S	25 S

Tableau 3: Résultats d'antibiogramme des souches isolées à partir de *Mugil cephalus*.

Souches	PIP	AMX	ATM	CTX	CAZ	CPO	FOX	IMP	NA	CIP	AN	K	GM	TE	TMP	SXT	C
AX12 <i>E.amnigenus</i>	20 S	0 R	42 S	36 S	26 S	30 S	24 S	38 S	31 S	46 S	24 S	32 S	31 S	29 S	36 S	30 S	31 S
AX13 <i>E.cloacae</i>	18 I	0 R	37 S	36 S	23 I	26 S	0 R	27 S	0 R	23 S	24 S	30 S	24 S	25 S	32 S	25 S	27 S
AX14 <i>P.aeruginosa</i>	26 S	0 R	S	35 S	26 S	45 S	10 R	42 S	S	S	S	S	S	S	38 S	28 S	40 S
AX15 <i>R.terrigena</i>	24 S	0 R	36 S	36 S	20 R	32 S	20 S	30 S	30 S	34 S	25 S	32 S	22 S	28 S	30 S	20 S	28 S
AX16 <i>R.ornithinolytica</i>	25 S	10 R	36 S	36 S	23 I	30 S	20 S	31 S	26 S	38 S	24 S	34 S	25 S	20 S	24 S	24 S	30 S
AX17 <i>K.oxytoca</i>	21 S	0 R	33 S	37 S	17 R	29 S	21 S	31 S	26 S	36 S	25 S	32 S	22 S	27 S	30 S	27 S	30 S
AX18 <i>E.aerogenès</i>	25 S	0 R	33 S	36 S	20 R	30 S	0 R	26 S	0 R	27 S	26 S	36 S	25 S	21 S	28 S	25 S	23 S
AX19 <i>E.coli</i>	26 S	0 R	36 S	42 S	22 I	30 S	26 S	35 S	29 S	36 S	23 S	30 S	21 S	27 S	32 S	27 S	30 S
AX20 <i>E.coli</i>	27 S	0 R	34 S	36 S	20 R	29 S	24 S	31 S	25 S	36 S	23 S	30 S	21 S	25 S	30 S	27 S	26 S
AX21 <i>E.coli</i>	30 S	16 R	38 S	40 S	25 I	32 S	25 S	35 S	29 S	40 S	25 S	34 S	24 S	26 S	31 S	27 S	27 S
AX22 <i>E.cloacae</i>	26 S	0 R	35 S	35 S	24 I	29 S	0 R	30 S	27 S	40 S	24 S	32 S	25 S	23 S	33 S	30 S	25 S
AX23 <i>K.oxytoca</i>	20 S	0 R	44 S	36 S	36 S	32 S	22 S	30 S	24 S	32 S	22 S	30 S	21 S	20 S	0 R	26 S	20 S
AX24 <i>K.oxytoca</i>	22 S	0 R	35 S	36 S	25 I	32 S	26 S	30 S	26 S	36 S	22 S	27 S	21 S	26 S	34 S	28 S	32 S
AX25 <i>Moell.wisconsensis</i>	34 S	16 R	40 S	40 S	26 S	32 S	26 S	28 S	28 S	35 S	28 S	32 S	26 S	26 S	36 S	32 S	30 S
AX26 <i>E.coli</i>	17 I	0 R	38 S	32 S	22 I	30 S	25 S	34 S	26 S	36 S	24 S	30 S	23 S	0 R	25 S	21 S	26 S
AX27 <i>E.coli</i>	16 R	0 R	38 S	32 S	24 I	29 S	21 S	32 S	26 S	36 S	20 S	28 S	21 S	0 R	20 S	20 S	27 S
AX28 <i>E.coli</i>	17 I	0 R	32 S	34 S	22 I	30 S	19 S	30 S	26 S	36 S	21 S	28 S	20 S	0 R	21 S	20 S	27 S
AX29 <i>E.coli</i>	17 I	0 R	32 S	35 S	23 I	27 S	22 S	32 S	27 S	38 S	20 S	28 S	22 S	0 R	21 S	20 S	27 S

Souches	PIP	AMX	ATM	CTX	CAZ	CPO	FOX	IMP	NA	CIP	AN	K	GM	TE	TMP	SXT	C
CTX1 <i>A.hydrophila</i>	16 R	0 R	28 S	0 R	0 R	14 R	0 R	33 S	39 S	45 S	27 S	34 S	17 S	11 R	17 I	11 R	32 S
CTX2 <i>A.hydrophila</i>	13 R	0 R	0 R	0 R	0 R	10 R	20 S	31 S	0 R	21 S	25 S	23 S	20 S	14 R	20 S	9 R	15 R
CTX3 <i>K.pneumoniae</i>	0 R	0 R	18 R	13 R	0 R	0 R	23 S	30 S	17 I	17 R	20 S	24 S	8 R	0 R	0 R	0 R	27 S
CTX4 <i>C.freundii</i>	11 R	0 R	20 R	18 R	0 R	20 I	0 R	28 S	0 R	30 S	22 S	30 S	21 S	28 S	28 S	24 S	26 S
CTX5 <i>C.freundii</i>	11 R	0 R	20 R	18 R	0 R	20 I	0 R	28 S	0 R	26 S	26 S	35 S	24 S	27 S	33 S	28 S	30 S
CIP1 <i>E.coli</i>	14 R	0 R	25 S	28 S	11 R	22 I	0 R	28 S	0 R	0 R	22 S	14 R	20 S	0 R	20 S	17 S	14 R
CIP2 <i>E.coli</i>	17 I	0 R	32 S	34 S	20 R	28 S	24 S	32 S	0 R	13 R	22 S	30 S	22 S	0 R	0 R	0 R	29 S
CIP3 <i>K.pneumoniae</i>	14 R	0 R	26 S	26 S	0 R	21 I	0 R	27 S	0 R	0 R	21 R	12 R	20 S	0 R	20 S	17 S	14 R

Tableau 4 : Antibiogramme avec cloxacilline.

Souches	FOX	CTX	CAZ
CTX4 <i>C.freundii</i>	0	18	0
	20	38	22
CIP3 <i>K.pneumoniae</i>	0	26	0
	13	35	15