

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

المعهد الوطني لعلوم البحر و تهيئة الساحل
INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES DE LA MER ET DE L'AMENAGEMENT DU LITTORAL



MEMOIRE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME
D'INGENIEUR D'ETAT EN SCIENCES DE LA MER

OPTION : Aquaculture

**DETECTION DE SOUCHES
RÉSISTANTES AUX ANTIBIOTIQUES
CHEZ LA MOULE D'ÉLEVAGE
*Mytilus galloprovincialis***

Préparé par : CHIKH Yazid

Présenté devant la commission d'examen formée de :

Président	Mr. ZOUAKH D. E.	Chargé de cours (ISMAL)
Examinatrice	Mme. LARIBI H.	Maitre assistante (Univ. De Blida)
Examineur	Mr. LOURGUIOUI H.	Maitre assistant (ISMAL)
Promotrice	Mlle. ALOUACHE S.	Maitre assistante (ISMAL)

PROMOTION 2007/2008

DÉDICACES

Je dédie ce travail,

À mes chers parents qui grâce à leur réconfort me font supporter le froid de la vie.

À mon frère ABDERAZAK, mes sœurs, mes neveux surtout MEHDI, mes nièces ainsi que l'ensemble de ma famille.

À mes amis ABDELLELAH, HAMIDOU et FATEH.

À Tous mes amis (es) de ma promotion qui ont créé pendant notre cursus une ambiance formidable en formant une petite famille : Abdelhakim, Abderrahmane, Dihia, Djamel, Fériel, Hamza, Mériem, Sabrina et Rima.

REMERCIEMENT

Le travail présenté ici est la concrétisation d'une étroite collaboration entre notre Institut ; Institut National des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral (ISMAL) et le laboratoire de génétique, à la faculté des sciences biologiques, USTHB, dirigé par le Professeur BAKOUR R.

Ce travail n'aurait jamais pu se réaliser sans la contribution de certaines personnes à qui je tiens à présenter mes sincères remerciements :

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur Khoudja, le propriétaire de la ferme conchylicole, qui nous a fourni du matériel biologique « la moule » qui constitue l'ossature de notre étude, ainsi que sa générosité et sa gentillesse.

Ma gratitude et reconnaissance au professeur BAKOUR R., directeur de l'équipe de génétique à la faculté des sciences biologiques, d'avoir laissé les portes de son laboratoire ouvertes à plein temps afin de réaliser ce travail, et ses conseils précieux et objectifs, ainsi qu'à toute son équipe.

Ma gratitude va également à M^{lle} ALOUACHE S., Maître assistante à l'ISMAL, et membre du laboratoire de génétique pour m'avoir proposé ce sujet, m'avoir guidé et assisté tout au long de ce travail et de m'avoir enseigné les notions de la microbiologie alimentaire par le biais de travaux pratiques de la microbiologie et la génétique moléculaire dont je suis profane.

Mes remerciements s'adressent également à :

Monsieur ZEOUAKH D.E., pour avoir bien voulu assurer la présidence du jury d'examen

Monsieur LOURGUIOUI H. qui a bien voulu juger ce travail, qu'il trouve ici l'expression de mes remerciements les plus sincères.

Madame LARIBI. H. qui a bien voulu juger ce travail. Je suis honoré de lui exprimer mes plus vifs remerciements.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	01
--------------------	----

I. GENERALITES

I.1. IDENTITE BIOLOGIQUE.....	02
I.2. HABITAT	03
I.3. VALEUR NUTRITIVE	04
I.4. LA CONCHYLICULTURE EN ALGERIE	05
I.5. LE MODE TROPHIQUE	05
I.6. LES RISQUES SANITAIRES LIES A LA CONSOMMATION DES COQUILLAGES	06
I.6.1. Complexe bactéries/coquillages	07
I.6.1.1. La flore saprophyte	07
I.6.1.2. Les bactéries pathogènes.....	07
I.6.1.3. Les bactéries indicatrices	08
I.6.1.3.1. Les coliformes totaux.....	08
I.6.1.3.2. Les coliformes fécaux.....	08
I.6.1.3.3. <i>Escherichia coli</i>	09
I.6.1.3.4. Streptocoques fécaux.....	09
I.6.1.3.5. <i>Clostridium</i> Sulfito-réducteurs.....	09
I.6.1.3.6. <i>Salmonella</i>	10
I.6.2. Survie des bactéries en milieu marin	10
I.6.3. Contexte réglementaire régissant la production des coquillage.....	10
I.6.4. Règles HACCP	11
I.7. LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES	13
I.7.1. Définition	13
I.7.2. Classification et mode d'action	13
I.7.3. Résistance aux antibiotiques	13
I.7.3.1. Résistance naturelle	14
I.7.3.2. Résistance acquise	14
I.7.3.3. Mécanisme de résistance	14
I.7.3.3.1. L'inactivation de l'antibiotique par la synthèse d'enzymes bactériennes	14
I.7.3.3.2. Diminution de la perméabilité	14
I.7.3.3.3. Modification de la cible	15
I.7.3.3.4. Expulsion des antibiotiques : système d'efflux	15
I.7.3.4. La résistance aux antibiotiques en milieu aquatique	15

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. PRÉSENTATION DE LA ZONE D'ÉTUDE	17
II.2. CONTRÔLE DE LA QUALITÉ MICROBIOLOGIQUE DE LA MOULE ET SON MILIEU D'ÉLEVAGE	18
II.2.1. Analyse des paramètres physico-chimiques	18

II.2.2. Analyse microbiologique	18
II.2.2.1. Prélèvement et transport des échantillons	18
II.2.2.2. Préparation de la moule (homogénat)	19
II.2.2.3. La recherche des germes fécaux par la méthode des NPP (Nombre le Plus Probable)	19
II.2.2.3.1. Recherche des coliformes totaux	20
II.2.2.3.2. Recherche et dénombrement des coliformes thermotolérants– <i>Escherichia coli</i>	21
II.2.2.3.3. Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux	22
II.2.2.4. Recherche et dénombrement des spores de <i>Clostridium</i> sulfitoréducteurs	23
II.2.2.5. Recherche des germes pathogènes : <i>Salmonella</i>	24
II.3. RECHERCHE DES BACTÉRIES RÉSISTANTES ISOLÉES DE LA MOULE	25
II.3.1. Matériel	26
II.3.2. Méthodes	27
II.3.2.1. Identifications bactériennes	28
II.3.2.2. Étude de la résistance aux antibiotiques par Antibiogramme	29
II.3.3. Détection de bêtalactamase à spectre élargi BLSE «test de synergie »	29
II.3.4. Essai de transfert génétique par conjugaison bactérienne	29
II.3.5. Recherche des gènes de BLSE par PCR (Poly Chain Reaction)	30

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.1. CONTROLE DE LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE DE LA MOULE ET DE SON MILIEU D'ELEVAGE	33
III.1.1 Résultats des paramètres physico-chimiques	33
III.1.2. Résultats des analyses bactériologiques des moules et de l'eau de mer	35
III.1.2.1. Dénombrement mensuel des indicateurs de contamination dans l'eau de mer	35
III.1.2.2. Dénombrement mensuel des indicateurs de contamination dans les moules	39
III.1.2.3. Recherche de <i>Salmonella</i> dans l'eau et la moule	40
III.1.2.4. Comparaison entre les résultats de l'eau et des moules	41
III.2. RECHERCHE DES BACTERIES RESISTANTES	42
III.2.1. Isolement et identification des souches résistantes	42
III.2.2. Étude de la résistance aux antibiotiques	42
III.2.3. Production de bêtalactamase à spectre élargi	44
III.2.4. Transfert génétique par conjugaison	45

CONCLUSION	47
-------------------------	----

BIBLIOGRAPHIE	48
----------------------------	----

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : La morphologie interne de la moule	02
Figure 2 : La répartition géographique des bivalves dans le monde	04
Figure 3 : Les différents points de l'HACCP appliquées aux coquillages	12
Figure 4 : Positionnement de la ferme mytilicole et les stations de prélèvements à Aïn Chrob.....	17
Figure 5 : Schéma de la disposition des antibiotiques	28
Figure 6 : Variation mensuelle de la température à la surface	33
Figure 7 : Variation de la salinité à la surface	34
Figure 8 : Variation mensuelle du pH à la surface	34
Figure 9 : Résultats d'analyse bactériologique de l'eau de mer et de la moule (14 avril 2008).....	36
Figure 10 : Résultats d'analyse bactériologique de l'eau de mer et de la moule (13 mai 2008).....	37
Figure 11 : Résultats d'analyse bactériologique de l'eau de mer et de la moule (7 juin 2008).....	38
Figure 12 : Résistance des souches vis-à-vis des antibiotiques	42
Figure 13 : Illustration de la production d'une BLSE	44
Figure 14 : Résultat de la recherche du gène TEM	46
Figure 15 : Résultat de la recherche du gène CTX-M chez les deux souches BLSE	46

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Composition chimique (en %) de la partie comestible de quelques coquillages	04
Tableau 2 : Objectifs de productions tracées par les fermes conchylocoles en Algérie	05
Tableau 3 : Taux de filtration de certains mollusques bivalves	06
Tableau 4 : Principaux indicateurs microbiologiques et principaux microorganismes pathogènes trouvés dans les mollusques bivalves	07
Tableau 5 : Critères microbiologiques des zones de production conchylicole	11
Tableau 6 : Emplacement géographique des stations de prélèvement	17
Tableau 7 : Les étapes à suivre pour la recherche des <i>Salmonelles</i>	24
Tableau 8 : Les différents antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme	26
Tableau 9 : Les amorces utilisées pour la recherche des gènes de résistance	32
Tableau 10 : Antibiotypes des souches vis-à-vis des antibiotiques	43
Tableau 11 : Résultat de transfert génétique par conjugaison	45

Introduction

INTRODUCTION

L'usage intensif des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire présente plusieurs conséquences, parmi elles ; leur impact sur l'environnement, la présence de résidus de molécules actives et la pression de sélection exercée sur les bactéries, ce qui entraîne l'apparition de bactéries antibio-résistantes qui pourraient être en contact permanent et renouvelée avec l'homme.

La résistance bactérienne à ces antibiotiques a augmenté dans des proportions inquiétantes ces dernières années, elle est devenue un problème majeurs de santé publique à l'échelle mondiale, mettant en jeu la validité de l'arsenal thérapeutique.

Ces résistances ont été décrites chez la plupart des souches cliniques d'origine humaine ou animale, tandis que l'on ne dispose pas de beaucoup de données concernant leur devenir une fois que les bactéries sont émises dans l'environnement marin.

Les mollusques bivalves sont des bioaccumulateurs qui peuvent constituer, par la chaîne alimentaire, des vecteurs d'agents infectieux, de biotoxines marines ou de toxiques chimiques.

Dans cet ordre d'idée nous nous sommes intéressés à la recherche des bactéries résistantes aux antibiotiques chez la moule d'élevage « *Mytilus galloprovincialis* ». Pour ce faire nous avons adopté le plan suivant :

- ❖ **Première partie** : Contrôle de la qualité microbiologique de la moule ainsi que de son milieu d'élevage.

- ❖ **Deuxième partie** : Étude de l'antibiorésistance :
 - Isolement des bactéries résistantes.
 - Identification.
 - Étude de la sensibilité aux antibiotiques.
 - Recherche de la production de Béta-lactamase à spectre élargi BLSE.
 - Transfert bactérien.
 - Essai de caractérisation génétique de la résistance.

Généralités

I. GENERALITES

I.1. IDENTITE BIOLOGIQUE

Les mollusques du genre *Mytilus* sont des bivalves marins filtreurs à vie sédentaire grâce à leur byssus (Figure 1). Leur classification taxonomique est (Lamarck 1819) :

Embranchement	: Mollusques
Classe	: Lamellibranche
Ordre	: Fillibranche
Sous ordre	: Anisomyaria
Super famille	: Mytiloidea
Famille	: Mytilidae
Sous famille	: Mytilinae
Genre	: <i>Mytilus</i>
Espèce	: <i>Mytilus galloprovincialis</i>

Le corps de la moule est protégé par une coquille recouverte d'une mince pellicule brune foncée, de nature protéique (Marteil, 1976). Les deux valves sont reliées exclusivement par le ligament.

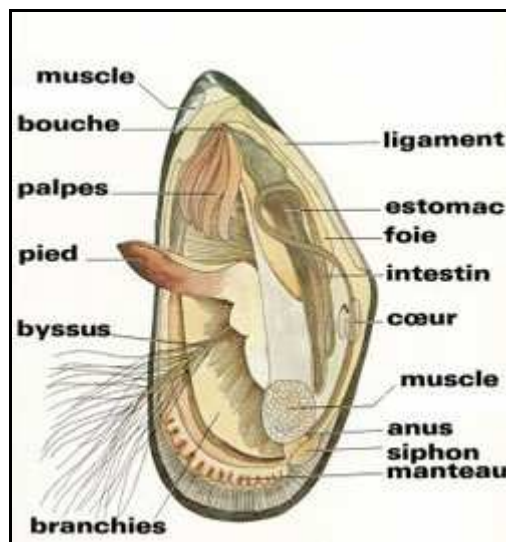


Figure 1 : La morphologie interne de la moule

La moule compte pour sa survie sur six systèmes : **le système digestif** ; représenté par une bouche située à la partie antérieure du corps et l'œsophage très court, débouche sur l'estomac. **Le système circulatoire** ; le cœur, situé sur la face dorsale du corps, comprend deux oreillettes et un ventricule : il est entouré d'une mince membrane transparente : le péricarde. **Le système excréteur** ; comprend deux reins, disposés de chaque côté du corps entre le

péricarde et le muscle adducteur postérieur et des glandes péricardiques auriculaires qui sont particulièrement développées chez la moule et entourent les oreillettes. **Le système nerveux** ; c'est un système rudimentaire représenté par trois paires de ganglions. **Le système reproducteur** ; chez la moule, la glande génitale ou gonade s'étend de façon diffuse dans le manteau, et le **système respiratoire** ; Les branchies sont au nombre de deux. Reliées à la masse viscérale par l'intermédiaire de l'axe branchial, chacune est constituée de deux rangées de filaments aplatis. Ces derniers ont une double fonction : la respiration et l'alimentation, respectivement, le ravitaillement en oxygène dissous et en plancton qu'il soit végétal ou animal. Toutefois, le manteau participe aussi à la respiration grâce à un échange direct de gaz avec l'eau de l'environnement. (Marteil, 1976).

Les moules sont gonochoriques à sexes séparés et présentent plus d'un cycle de reproduction annuel. Le cycle de développement de la moule passe par deux phases : phase planctonique ; où les larves sont capables de nager, sans que la coquille soit formée. Et une phase sédentaire ; la larve, arrivée au moment de sa métamorphose et ayant trouvé un support convenable pour se fixer (Marteil, 1976).

I.2. HABITAT

Les bivalves du genre *Mytilus*, en l'occurrence ; *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis* sont les plus répandus dans toutes les mers du globe y compris dans les océans glacials (Figure 2). En méditerranée, en particulier, sur les côtes algériennes, l'espèce *Mytilus galloprovincialis* est la plus dominante à côté de *Perna perna* et *Mytilus edulis* (Gosling, 2003). Elle est également retrouvée dans les eaux saumâtres des lagunes côtières, comme le cas du lac Mellah. (Gimazane, 1982).

Ces moules sont également capables de se fixer par leur byssus sur des fonds très variés des étages médiolittoral et infralittoral, soit durs (rocheux, graveleux), soit meubles (sableux, vaseux) (Marteil, 1976).

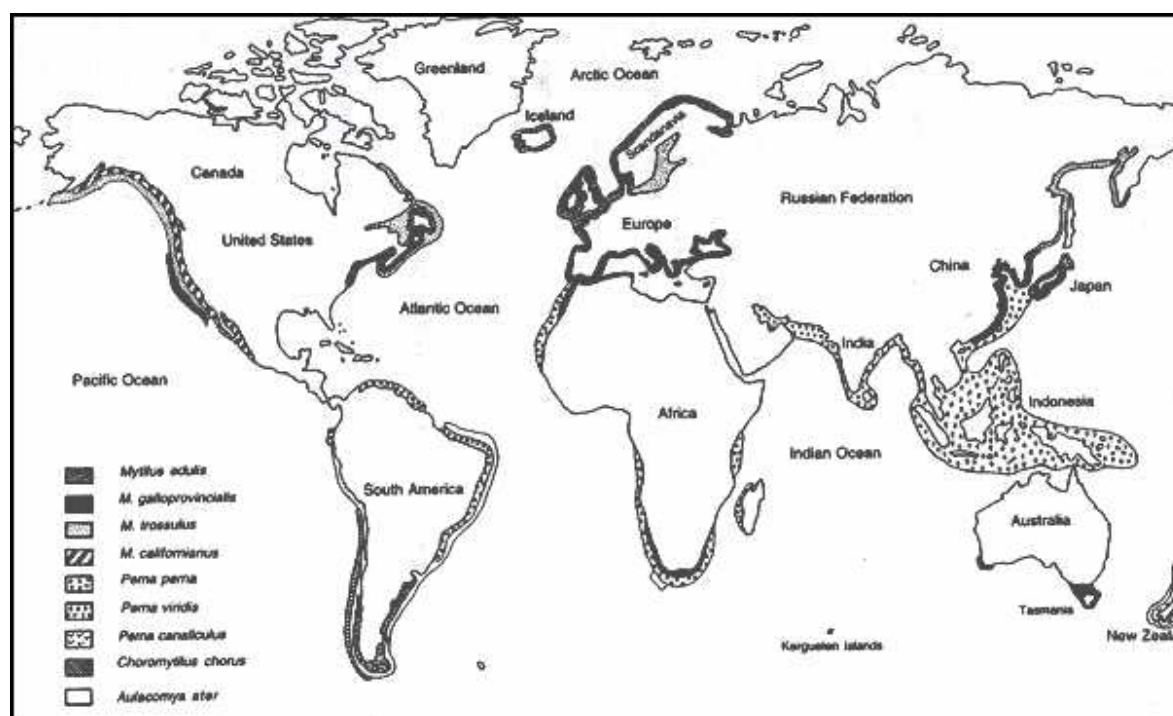


Figure 2 : La répartition géographique des bivalves dans le monde (Gosling, 2003).

I.3. VALEUR NUTRITIVE

Les moules constituent pour l'homme, une source de nourriture ; en raison de leur teneur en protéines, glucides et lipides (Tableau 1). Elles sont riches en sels minéraux : calcium, magnésium, fer, iode, potassium et chlorure de sodium et elles présentent des teneurs intéressantes en vitamine A, B et C (Apfelbaum *et al.*, 2004). Les moules contiennent également des acides gras insaturés comme l'acide docosahexaénoïque (ADH) et l'acide eicosapentaénoïque (AEP) qui sont indispensables au maintien d'une bonne santé (Hulse, 1995)

Tableau 1 : Composition chimique (en %) de la partie comestible de quelques coquillages (Apfelbaum *et al.*, 2004).

<i>Espèces</i>	<i>Eau</i>	<i>Protéines</i>	<i>Lipides</i>	<i>cendres</i>
Palourde	91.8	4.41	0.21	1.97
Huître creuse	85.4	7.86	1.13	1.11
Moule	82.9	11.12	1.98	2.50
Coquille Saint-Jacques	77.8	16.9	0.21	1.79

I.4. LA CONCHYLICULTURE EN ALGERIE

La moule, source alimentaire bien appréciée, a permis le développement de la conchyliculture. Cette activité a connu un essor palpable dans les pays asiatiques comme la Chine et le Japon. L'Algérie s'intéresse à cette activité malgré qu'elle demeure à l'état embryonnaire. Des statistiques reflètent bien la bonne volonté de l'Algérie à *propulser* la mytiliculture (Tableau 2).

Tableau 2 : objectifs de productions tracées par les fermes conchylocoles en Algérie (Ministère de la pêche et des ressources halieutiques, 2007)

Wilayas	Sites	Objectifs de production annuelle
Alger	Ain Chrob	50 T de moule et d'huître
Alger	Ain Chrob	50 T de moule en démarrage
Tipaza	Ain Tagourait	50 T de moule
Tipaza	Gouraya	50 T de moule
Tlemcen	Maârouf	50 T de moule

I.5. LE MODE TROPHIQUE

La filtration est le mode trophique de la moule, elle s'effectue au niveau des branchies. Une fois captées, Les particules (diatomées, dinoflagellés, détritiques organiques, bactéries, flagellés et protozoaires, MES) sont attirées par un courant d'eau créé par les bandes ciliaires et dirigées vers les sillons marginaux ou dorsaux et convoyées vers les palpes labiaux et la bouche. La digestion est presque exclusivement intracellulaire, les éléments non digérés sont rejetés avec les fèces dans le milieu extérieur (Marteil, 1976).

La moule peut filtrer l'eau pendant 18.5 à 24 heures par jours sans interruption avec une vitesse moyenne de 20 l/h. Cependant, la durée et le temps de filtration varient en fonction des différents paramètres à savoir (Marteil, 1976) :

✓ La température

La majorité des bivalves marins tolèrent une large gamme de température qui oscille entre -3 °C et 44 °C (Rosling, 2003). *Mytilus galloprovincialis* trouve une très bonne filtration entre 23 °C et 28 °C. Elle est ralentie en dehors de cet intervalle (Marteil, 1976 ; Riva et Masse, 1983).

✓ **La salinité**

Selon (Ranzoni, 1963 in Marteil, 1976) *Mytilus galloprovincialis* trouve une bonne filtration entre **30 PSU** et **38 PSU**. En dehors de cet intervalle la filtration est ralentie voire même stoppée pour des valeurs inférieures à **15 PSU** ou supérieures à **40 PSU**.

✓ **L'oxygène dissous**

L'oxygène dissous a également une certaine incidence sur la filtration. Chez *Mytilus galloprovincialis*, la filtration nécessite au moins une quantité de 3 mg/l d'oxygène dissous. (Marteil, 1976).

I.6. LES RISQUES SANITAIRES LIES A LA CONSOMMATION DES COQUILLAGES

Les bivalves dans le milieu marin jouent un rôle de « piègeurs » de bactéries en raison de leur capacité de filtration importante d'une part (Tableau 3), et d'autre part ils donnent la chance de survie aux bactéries qu'elles retiennent, quelque soit leur nature. Cette accumulation de bactéries dépend de la nature des germes et de l'état physiologique des bivalves (Guillaud et Romana, 1996).

Tableau 3 : Taux de filtration de certains mollusques bivalves
(Deslous-Paoli *et al.* in Guillaud., Romana., 1996).

Espèces de Bivalves	Volume d'eau filtrée	
	Litre/heure/gramme de chair	Litre/heure/kg d'animal vivant (estimation)
Moules	3.5 à 13	175 à 650
Coques	3.5 à 9	140 à 360
Huîtres creuses	4 à 5.5	100 à 150
Palourdes	~3	~150

Les risques liés à la consommation des coquillages sont essentiellement liés à quelques bactéries, virus et toxines. Dans notre étude, nous nous intéressons uniquement aux problèmes bactériens.

Les coquillages consommés crus ou un peu cuits, peuvent être à l'origine de toxi-infections alimentaires (TIA) sporadique ou épidémique et on parle dans ce dernier cas de Toxi-infections Alimentaires Collectives (TIACs). (Monfort, 2003).

I.6.1. Complexe bactéries/coquillages

I.6.1.1. La flore saprophyte

La composition de la microflore commensale chez les bivalves est conditionnée par les conditions de l'environnement dont la température, la salinité et l'oxygène, sont les paramètres les plus importants. Cette flore saprophyte généralement non pathogène est représentée chez les bivalves par les genres : *Psychrobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Shewanella*, *Flavobacterium*, *Cytophaga* et *Vibrio*. L'exploitation côtière des bivalves reflète les influences terrestres qui engendrent la présence d'autres bactéries d'origine anthropique tels que les entérobactéries et les entérocoques (China *et al.*, 2003).

I.6.1.2. Les bactéries pathogènes

Ces bactéries proviennent généralement d'une pollution anthropique (les rejets urbains et agricoles). Les principales bactéries impliquées dans des cas d'intoxication alimentaire souvent sporadique lors de la consommation des bivalves, sont celles appartenant au genre *Vibrio* (*V. parahaemolyticus*, *V. algineticus* et *V. vulnificus*) et *Clostridium* représenté principalement par *C. botulinum* et *C. perfringens*. (Hackney et Dicharry, 1988. in China *et al.*, 2003). Cependant, plusieurs autres pathogènes comme *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, ... etc. ont également été isolés (Tableau 4) (Elliot et Kvenberg, 2000 ; Rocourt *et al.* 2000. in China 2003).

Tableau 4 : Principaux indicateurs microbiologiques et principaux microorganismes pathogènes trouvés dans les mollusques bivalves (China *et al.*, 2003).

Bactéries		
Indicateurs	Pathogènes principaux	Pathogènes secondaires
<i>Escherichia coli</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Salmonella sp</i>	<i>Vibrio cholerae</i> O1 et O139 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Vibrio vulnificus</i> <i>Clostridium botulinum</i>	<i>Campylobacter jejuni</i> <i>Shigella sp</i> <i>Edwardsiella tarda</i> <i>Plesiomonas shigelloides</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>E. coli</i> O157 :H7 <i>Staphylococcus aureus</i>

I.6.1.3. Les bactéries indicatrices

C'est des germes d'origine fécale qui existent dans le même environnement que les germes pathogènes mais en nombre plus élevé. Ils sont facilement détectables. Les principaux groupes sont :

I.6.1.3.1. Les coliformes totaux

Les coliformes sont utilisés depuis très longtemps comme indicateurs de la qualité microbienne parce qu'ils peuvent être indirectement associés à une pollution d'origine fécale. Les coliformes totaux sont définis par l'organisation internationale de standardisation (ISO), comme étant des bactéries en forme de bâtonnet, non sporogènes, Gram négatifs, oxydase négatif, facultativement anaérobies, capable de croître en présence de sels biliaires ou d'autres agent de surface possédant des activités inhibitrice similaire, et capable de fermenter le lactose (et le mannitol) avec production d'acide et d'aldéhyde en 48heures, à des températures de 35-37 °C. Les principaux genres inclus dans le groupe sont : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* et *Serratia* (Rodier et al., 2005). La presque totalité des espèces sont non pathogènes et ne représentent pas de risque direct pour la santé (OMS, 2000), à l'exception de certaines souches d'*Escherichia coli* ainsi de rares bactéries pathogènes opportunistes.

I.6.1.3.2. Les coliformes fécaux

Les coliformes fécaux, ou coliformes thermotolérants, sont un sous-groupe des coliformes totaux possédants les même caractères cités précédemment et sont capable de fermenter le lactose à une température de 44,5 ° C (Rodier et al., 2005). L'espèce la plus fréquemment associée à ce groupe bactérien est *Escherichia coli* (80-90% des thermotolérants détectés) et, dans une moindre mesure, certaines espèces des genres *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Klebsiella*. Bien en que la présence de coliformes fécaux témoigne habituellement d'une contamination fécale, mais plusieurs coliformes fécaux proviennent des matières organiques tels que les effluents industriels du secteur des pâtes et papiers ou de transformation alimentaire (Barthe et al., 1994 ; OMS, 2000). C'est pourquoi il serait plus approprié d'utiliser le terme générique « coliformes thermotolérants » plutôt que celui de « coliformes fécaux » (OMS, 1994 ; Robertson, 1995). L'intérêt de la détection de ces coliformes, à titre d'organismes indicateurs, réside dans le fait que leur survie dans l'environnement est généralement équivalente à celle des bactéries pathogènes et que leur densité est généralement proportionnelle au degré de pollution produite par les matières fécales (CEAEQ, 2000).

I.6.1.3.3. *Escherichia coli*

Coliforme fécal qui produit de l'indole à partir du tryptophane à $44^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$. La présence d'*Escherichia coli* dans une eau (comme dans un aliment) représente le meilleur indice de contamination fécale d'origine humaine ou animale. En effet, *E. coli* ne fait pas partie de la flore microbienne du sol et des eaux, mais de celle de la partie terminale du tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud. Cependant, il faut considérer que c'est un germe très sensible aux conditions hostiles de l'environnement. Il est considéré comme un très bon indicateur de contamination fécale récente (OMS, 2000 ; Rodier et al., 2005).

I.6.1.3.4. Streptocoques fécaux

La classification générale des streptocoques fécaux a été modifiée dans les années 80 par la création d'un nouveau genre *Enterococcus* parmi les espèces appartenant antérieurement au genre *Streptococcus* de groupe sérologique D de la classification de Lancefield. *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* sont les deux espèces les plus souvent identifiées chez l'humain (Clausen et al., 1977 ; Gleeson et Gray, 1997 in Chevalier, 2003). Quant aux *Streptocoques* du groupe D susceptibles de contaminer les eaux d'approvisionnement, ils sont plutôt typiques des déjections animales, comme *Streptococcus bovis*, *S. gallolyticus* et *S. alactolyticus*.

L'intérêt à l'égard des entérocoques s'explique par le fait que, comparativement aux coliformes (incluant *E. coli*), ils sont plus résistants à des conditions environnementales difficiles et persistent plus longtemps dans l'eau (Chevalier, 2003).

I.6.1.3.5. *Clostridium* Sulfito-réducteurs

Les *Clostridium* sulfito-réducteurs sont souvent considérés comme des témoins de pollution fécale. La forme spore, beaucoup plus résistante que les formes végétatives des coliformes fécaux et des *streptocoques* fécaux, permettrait ainsi de détecter une contamination ancienne ou intermittente. Cependant, il faut considérer les *Clostridium* peuvent être d'origine tellurique. Donc il est important d'identifier les espèces susceptibles d'être d'origine fécale tel que *Clostridium perfringens*, qui est normalement présente dans les fèces, mais en bien moins grand nombre qu'*E. coli*. (Rodier et al., 2005).

I.6.1.3.6. *Salmonella*

Les *Salmonelle* sont des entérobactéries dont le caractère essentiel est de ne pas fermenter le lactose. Ces dernières font partie de la flore commensale des humains et des animaux à sang chaud. Elles sont responsables après pénétration par voie orale, de nombreuses infections (salmonelloses), notamment des fièvres typhoïde et paratyphoïdes, des gastro-entérites et des toxi-infections alimentaires collectives. Elles peuvent être éliminées dans les selles des sujets malades ou porteurs asymptomatiques (sains) (Rodier et al., 2005).

I.6.2. Survie des bactéries en milieu marin

Le concept classique d'auto-épuration bactérienne par l'eau de mer a été longtemps retenu. Il était admis que les bactéries pathogènes d'origine humaine étaient détruites en quelques heures dans l'eau de mer. La plupart des auteurs considèrent la température et la diminution d'intensité lumineuse comme seules responsables des décroissances bactériennes en milieu marin, mais certains n'excluent pas l'intervention d'autres facteurs défavorables tels que la salinité, les carences en éléments nutritifs, la sédimentation, l'antibiose, entre les bactéries et certaines substances antibactériennes produites par les algues ou les bactéries marines. Par contre la présence de matière organique notamment dans les sédiments, favoriserait le processus de survie des *E. coli* et des salmonelles (Stablo, 1998).

Elles peuvent même évoluer plus ou moins rapidement vers un stade viable non cultivable mais en conservant une activité pathogène. Dans ce contexte, la recherche de ces bactéries pathogènes, présentes en faible quantité, est délicate, voire coûteuse. Pour ces raisons, le contrôle de la salubrité microbiologique des bivalves est basé sur la recherche de certains indicateurs de contamination fécale (Monfort, 2003).

I.6.3. Contexte réglementaire régissant la production des coquillages

Selon les normes en vigueur fixées par l'article 7 de l'arrêté du 30 Mars 1997 correspondant au 8 juin 1997 par le ministère de l'agriculture et de la pêche (Tableau 5), les indicateurs de contamination retenus sont les coliformes fécaux, *Escherichia coli* et salmonelle, à raison deux échantillons par an.

Tableau 5 : Critères microbiologiques des zones de production conchylicole
(JORADP N°71, Décret N° 01-139)

Classes	Critères microbiologiques	Significations
Classe A	90% des valeurs < 300 C.F. ou < 230 <i>E.coli</i> / 100g* et jamais > 1000	Zones conchylicoles salubres
Classe B	90% des valeurs < 6000 C.F. ou 4600 <i>E.coli</i> / 100g* et jamais > 60 000 ou 46 000 <i>E.coli</i>	Reparcage 1 à 2 mois ou Purification 24 à 48H
Classe C	90% des valeurs < 60 000 C.F. ou 46 000 <i>E.coli</i> / 100g*	Purification intensive > 48H ou reparcage > 2mois
Classe D	Zones de production ne satisfaisant pas aux conditions exigibles pour un classement A, B ou C, ou n'ayant pas fait l'objet d'une étude de zone : zones portuaires, zones de rejet d'effluents	Exploitation interdite

* par 100 g de chair et de liquide intervalavaire

I.6.4. Règles HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points)

Le principe de l'HACCP est de mettre les différentes phases de préparation des coquillages pour la mise en marché. Elle intervient tout au long des étapes de mise sur le marché des coquillages vivants, de la réception des produits à l'établissement jusqu'à la commercialisation pour la consommation directe (Figure 3) (Le Saux et Pommepuy, 2003).

La prise en compte de ces principaux points critiques est fondamentale pour une bonne purification des coquillages. Et la principale règle de la purification des coquillages est d'entreposer les coquillages en bassin insubmersible alimenté en eau de mer propre ou rendu propre par un traitement bactéricide, durant un temps suffisant pour stimuler l'auto-épuration des coquillages (Le Saux et Pommepuy, 2003).

I.7. LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

I.7.1. Définition

Les antibiotiques sont des substances naturelles produites par les bactéries du sol et certains champignons qui, à faible concentration, agissent sur d'autres bactéries sans être toxiques pour l'homme. Ils peuvent être aussi obtenus par synthèse chimique. Leur action s'exerce sur des sites spécifiques au niveau d'une ou plusieurs étapes métaboliques. Chaque antibiotique est caractérisé par son spectre d'action qui correspond à l'étendue de son activité antibactérienne (Bryskier, 1999).

I.7.2. Classification et mode d'action

Les agents antibactériens peuvent être classés selon leur structure chimique en 16 familles : les bêta-lactamines, la vancomycine, la fosfomycine, les aminosides, les phénicoles, les tétracyclines, les macrolides, les lincosamides, les streptogramines, l'acide fusidique, les sulfamides, les quinolones, les rifamycines, les nitro-imidazoles, les nitrofuranes et les polymixines (Colmen et *al.*, 1994).

Leur classification selon le mode d'action nous permet de déterminer cinq mécanismes d'action qui peuvent toucher soit la structure bactérienne, soit une fonction métabolique ; il s'agit de (Colmen et *al.*, 1994) :

- ✓ Action sur la paroi bactérienne : bêta-lactamines.
- ✓ Action sur la structure de la membrane plasmique : gentamicine.
- ✓ Action sur la synthèse protéique : aminosides, macrolides, lincosamides, cloramphénicol, tétracycline.
- ✓ Action sur les acides nucléiques : quinolones.
- ✓ Interférence avec le métabolisme de la bactérie : exemple sulfamides.

I.7.3. Résistance aux antibiotiques

Elle peut être de type naturel ou acquis, selon le support génétique.

I.7.3.1. Résistance naturelle

C'est une résistance intrinsèque c'est-à-dire propre à toutes les souches d'une même espèce bactérienne. Le déterminisme génétique de cette résistance est chromosomique. On parle alors, de caractère sauvage de la souche. Cette résistance est stable et héréditaire (Jarlier, 1997). C'est le cas de *Klebsiella pneumoniae* qui est résistante naturellement à l'amoxicilline et ticarcilline par la production d'une pénicillinase bas niveau, et de *Citrobacter freundii* et *Enterobacter cloacae* qui possèdent une céphalosporinase inductible qui leur confère la résistance aux pénicillines et céphalosporines de 1^{ère} et de 2^{ème} génération (Vedel, 1994).

I.7.3.2. Résistance acquise

C'est une résistance propre à certaines souches d'une espèce naturellement sensible à l'antibiotique. Elle se manifeste sous l'effet d'une pression de sélection et résulte soit d'une mutation, soit le plus souvent d'un apport de gènes par le biais de plasmides, transposons ou intégrons (Jarlier et al., 1988).

I.7.3.3. Mécanisme de résistance (Vedel, 1994 ; Bryskier, 1999)

Plusieurs mécanismes de résistance aux antibiotiques existent, il s'agit de :

I.7.3.3.1. L'inactivation de l'antibiotique par la synthèse d'enzymes bactériennes

Les bactéries produisent des enzymes qui altèrent chimiquement l'antibiotique ; c'est le cas des bêta-lactamases hydrolysant les bêta-lactamines, les adénylases qui modifient la structure des aminosides...etc

I.7.3.3.2. Diminution de la perméabilité

Il s'agit de l'inhibition de la pénétration de l'antibiotique dans la bactérie. Ce mécanisme existe naturellement chez certaines bactéries comme *Pseudomonas*, mais il peut surgir chez d'autres par des mutations entraînant des modifications quantitatives ou qualitatives des porines nécessaires pour la pénétration de l'antibiotique. La résistance dans ce cas est croisée à plusieurs familles d'antibiotiques (Bryskier, 1999).

1.7.3.3.3. Modification de la cible

Il s'agit dans ce cas de la modification dans la structure ou le nombre des sites d'action de l'antibiotique. C'est le cas des PLP (protéine liant la pénicilline) pour les bêta-lactamines.

1.7.3.3.4. Expulsion des antibiotiques : système d'efflux

Les bactéries produisent souvent des protéines membranaires agissant comme des pompes moléculaires permettant d'expulser l'antibiotique vers l'extérieur et empêchent sans accumulation à l'intérieur de la cellule. Ce mécanisme est rencontré dans le cas de la résistance aux tétracyclines, bêta-lactamines, quinolones ... etc. et il peut être croisé avec la résistance à d'autres agents antimicrobiens comme les métaux lourds.

1.7.3.4. La résistance aux antibiotiques en milieu aquatique

L'usage abusif des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire et dans l'alimentation animale comme facteur de croissance engendre une pression de sélection responsable de l'évolution de l'antibiorésistance (McPhearson et *al.*, 1991 ; Kummemer, 2004). Cette inefficacité de ces produits à pour conséquence des infections très difficiles à traiter et à des prix élevés. L'ampleur du problème augmente significativement par la possibilité du transfert horizontal des gènes de résistances aux antibiotiques et des déterminants de virulence (Pathak et Gopal, 2005).

La chaîne alimentaire constitue le principal véhicule des bactéries pathogènes strictes ou opportunistes entre l'animal et l'homme. En effet, l'apparition de la majorité des épidémies à travers le monde fait impliquer l'alimentation contaminée surtout d'origine animale et l'eau comme source d'infection (McPhearson et *al.*, 1991 ; Lateef, 2005). Ces contaminations peuvent entraîner des taux élevés de mortalité ainsi que des pertes économiques considérables (Levine & Edelman, 1984 ; Carneiro et *al.*, 2006).

Plusieurs travaux ont étudié l'évolution de cette résistance chez des germes isolés d'aliments (Teuber, 1999 ; Therlfall et *al.*, 2000 ; Lateef, 2004 ; Lateef, 2005). Ils ont démontré que les bactéries commensales sont le réservoir des gènes de résistance aux antibiotiques similaire à ceux retrouvés chez les germes pathogènes de l'homme (Perreten et *al.*, 1997), et qu'elles ont un rôle dans la compréhension du maintien et de la dissémination des gènes de résistance dans les populations bactériennes (Levy et Miller, 1989).

La résistance des microorganismes aquatiques résulte de leur exposition à un environnement aquatique pollué. Son émergence est due à la présence de plasmide et de gène de résistance dans le milieu, ce qui est considéré comme un risque thérapeutique pour les poissons et les fruits de mer (Pathak et Gopal, 2005).

Matériel

et

méthodes

II. MATERIEL ET METHODES

Ce travail a pour objectif la recherche de bactéries résistantes aux antibiotiques isolées à partir d'une moule d'élevage « *Mytilus galloprovincialis* ». Il est fractionné en deux parties : la première concerne le contrôle de la qualité microbiologique de la moule ainsi que de son milieu d'élevage, la deuxième partie traite de l'étude de l'antibiorésistance des souches isolées de ces moules.

II.1. PRÉSENTATION DE LA ZONE D'ÉTUDE

Le site de prélèvement « Aïn Chrob » (ex Surcouf) est une plage de la commune de Aïn Taya wilaya d'Alger située en dehors de la baie d'Alger. C'est une plage qui présente une granulométrie de fond de sable grossier et de fin granite, ouverte et soumise à des renouvellements d'eau (Figure 4) (Chebab 1996).

Le site d'élevage se situe à peu près à 800 m de la plage ; il est soumis à l'influence de l'hydrodynamisme sans aucune protection. L'hydrodynamisme de la région intéressant le site est représenté d'une part par la houle qui est essentiellement de direction Nord-Est et Nord-Ouest pouvant dépasser 3,25 m/s en hiver et d'autre part, par les courants, côtiers locaux, les plus importants sont dus à la houle et représentent les courants de dérive et de retour (US Naval Weather Service.SS.M.O, 1991 in Chebab 1996).

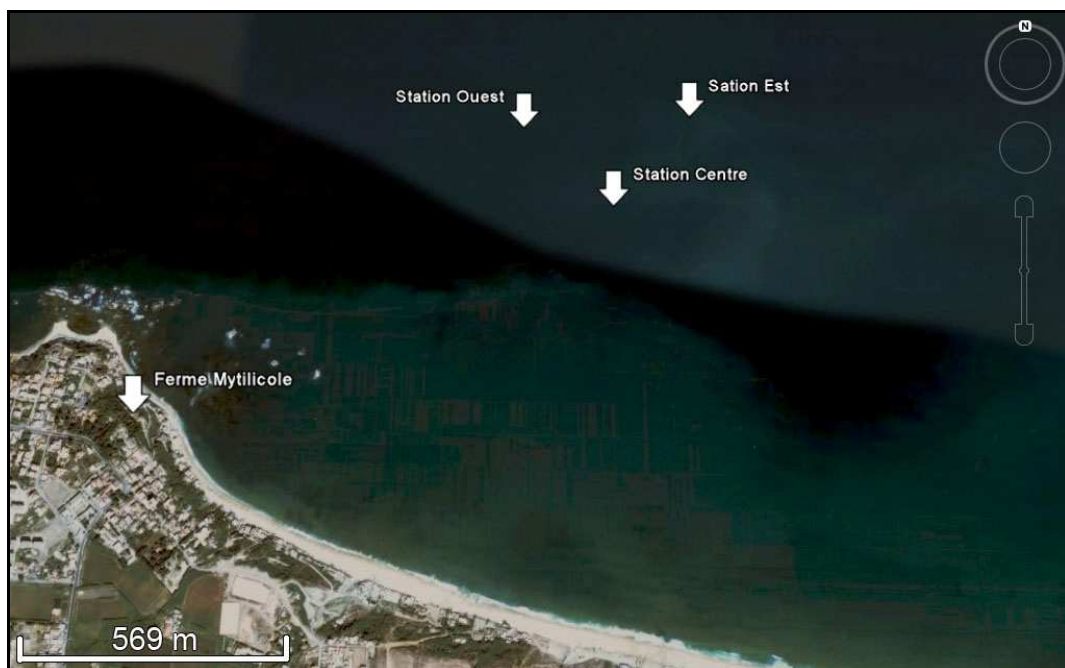


Figure 4 : Positionnement de la ferme mytilicole et les stations de prélèvements à Aïn Chrob (Google Earth, 2008)

II.2. CONTRÔLE DE LA QUALITÉ MICROBIOLOGIQUE DE LA MOULE ET SON MILIEU D'ÉLEVAGE

II.2.1. Analyse des paramètres physico-chimiques

L'analyse nous a permis de mesurer la température, le pH (pH-mètre WTW pH315i/SET) et la salinité (conductimètre WTW315i) sur place. L'analyse de l'oxygène dissous n'a pas été effectuée pour des raisons techniques.

II.2.2. Analyse microbiologique

II.2.2.1. Prélèvement et transport des échantillons

Au niveau du site d'élevage des prélèvements d'eau de mer et de moules ont été réalisés durant 3 mois (Avril - Juin) 2008 à raison d'un prélèvement par mois au niveau de trois stations (figure 4 et tableau 6).

Tableau 6 : Emplacement géographique des stations de prélèvement.

Stations	Coordonnées géographiques	
	Latitude (Nord)	Longitude (Est)
Station Ouest	36°47'55''	3°19'00''
Station Centre	36°47'48''	3°19'09''
Station Est	36°47'56''	3°19'17''

Les prélèvements d'eau sont effectués à 20 cm de la surface en utilisant des flacons stériles de 500ml, alors que les coquillages récoltés sont mis dans des sachets en plastiques à usage unique. Les échantillons sont transportés dans un coffret isotherme (glacière + glaciolo), à température comprise entre +2°C et 15°C au laboratoire où ils sont traités en moins de 24 heures.

II.2.2.2. Préparation de la moule (homogénat) (Delarras, 2003)

L'analyse est effectuée sur la chair et le liquide intervalvaire. Les moules sont traitées comme suit :

- Prendre des coquillages encore vivants et non endommagés.
- Laver soigneusement l'extérieur des coquillages sous eau courante et les brosser de façon à éliminer les souillures externes.
- Désinfecter la moule par l'alcool et la flamber rapidement à la chaleur.
- Ouvrir la moule avec un couteau ou un scalpel stérile. Pour ce faire : introduire la lame dans l'ouverture par où sort le byssus et couper le muscle adducteur postérieur, puis retourner la lame, couper en direction opposée le muscle et ouvrir la moule avec des pinces stériles (OMS, 1995).
- Recueillir le liquide intervalvaire et la chair du coquillage dans un bécher stérile et préalablement taré.
- Peser et ajouter un volume d'eau physiologique égal à deux fois le poids de chair plus le liquide intervalvaire (100g pour les germes fécaux et 25g pour les germes pathogène : *Salmonella*).
- Broyer le contenu recueilli à l'aide d'un robot mixeur stérile pendant 2 min, on obtient une suspension au 1/3 qui constitue la solution mère.
- Laisser reposer pendant 15-20 min la suspension préparée, temps de revivification des germes.

✓ Préparation des dilutions

À partir de la suspension mère au 1/3, préparer une série de deux dilutions (1/10, 1/100) dans deux flacons contenant 45ml d'eau physiologique.

II.2.2.3. La recherche des germes fécaux par la méthode des NPP (Nombre le Plus Probable)

La méthode utilisée pour la détermination des coliformes et des streptocoques est la méthode de fermentation en tubes multiples qui est basée sur l'ensemencement d'une série de trois tubes contenant des milieux de culture liquides, puis sur la détermination du nombre le plus

probable à partir des tubes positifs en se référant à la table de trois tubes des probabilités de Mc Grady (Delarras, 2003 ; Rodier et *al.*, 2005)

II.2.2.3.1. Recherche des coliformes totaux

A. Dans l'eau

➤ **Test présomptif**

La recherche des coliformes totaux a été réalisée par la méthode des NPP utilisant trois séries de tubes de BCP. :

- trois tubes de 10 ml de BCP double concentré :ensemencés par 10 ml d'eau de mer.
- trois tubes de 10 ml de BCP simple concentré :ensemencés par 1 ml d'eau de mer.
- trois tubes de 10 ml de BCP simple concentré :ensemencés par 1 ml de la dilution 10^{-1} .

Incubation de 24-48h à 37°C a été effectuée.

➤ **Lecture**

Une croissance microbienne avec production de gaz dans la cloche de Durham ainsi qu'un virage au jaune de l'indicateur de pH est considérée comme une réaction positive pour la recherche des coliformes totaux.

➤ **Test confirmatif**

La présence des coliformes totaux est confirmée par un passage sur un milieu plus sélectif (BVBL). Elle se manifeste par une croissance avec production de gaz (1/10 volume de la cloche) après une incubation de 24 – 48 h à 37 °C.

Noter le nombre de tubes positifs dans chaque série et le reporter dans la table de NPP pour obtenir le nombre de coliformes totaux présents dans 100ml de l'eau de mer (Rodier et *al.*, 2005).

B. Dans la Moule

La recherche des coliformes totaux a été réalisée par la méthode des NPP dans BVBL (Delarras, 2003).

- trois tubes de BVBL simple concentré :ensemencés par 1 ml de la solution mère.
- trois tubes de BVBL simple concentré :ensemencés par 1 ml de la dilution 10^{-1} .
- trois tubes de BVBL simple concentré :ensemencés par 1ml de la dilution 10^{-2} .

Incubation de 24-48h à 37°C a été effectuée.

➤ **Lecture**

Une croissance microbienne avec production de gaz dans la cloche de Durham est considérée comme une réaction positive pour la recherche des coliformes totaux.

Le nombre de tubes positifs dans chaque série est reporté à la table des NPP spécifique aux coquillages pour obtenir le nombre de coliformes totaux présents dans 100 g de chair et de liquide intervalvaire (Delarras, 2003).

II.2.2.3.2. Recherche et dénombrement des coliformes thermotolérants –*Escherichia coli*

A partir des tubes BCP positifs (eau) et BVBL positifs (moule), on réalise le test de Mackenzie :

- ensemencer un tube de BVBL.
- ensemencer un tube d'eau peptonée exempt d'indole.

La recherche des coliformes fécaux et d'*E.coli* se fait après l'incubation à 44 °C pendant 24 – 48 h.

➤ **Lecture**

Une croissance avec dégagement de gaz dans la cloche de Durham est confirmative de la présence de coliformes fécaux.

La production d'indole qui se traduit par l'apparition d'un anneau rouge, après ajout du réactif de kovac, dans l'eau peptonée exempt d'indole est indicatrice de la présence d'*E.coli*.

Le nombre de tubes positifs est noté, puis reporté à la table du nombre le plus probable NPP, afin de déterminer le nombre de coliformes totaux, fécaux et d'*Escherichia coli* (Delarras, 2003 ; Rodier, 2005).

II.2.2.3.3. Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux

La numérotation des Streptocoques fécaux s'effectue en deux étapes :

➤ Test présomptif

Il s'agit d'ensemencer une série de tubes contenant le milieu de Rothe en simple et double concentration à partir des échantillons de l'eau de mer à analyser et simple concentration pour la solution mère des moules. Le milieu de Rothe contient de l'azide de sodium qui est considéré comme agent sélectif pour la recherche des streptocoques (Delarras 2003).

A. Dans l'eau

1^{ère} série : 3 tubes de 10 ml de Rothe double concentration + 10 ml de l'eau de mer à analyser.

2^{ème} série : 3 tubes de 10 ml de Rothe simple concentration + 1 ml de l'eau de mer à analyser.

3^{ème} série : 3 tubes de 10 ml de Rothe simple concentration + 1 ml de la dilution 10^{-1} .

B. Dans la moule

1^{ère} série : 3 tubes de 10 ml de Rothe + 1 ml de la solution mère.

2^{ème} série : 3 tubes de 10 ml de Rothe + 1 ml de la solution 10^{-1} .

3^{ème} série : 3 tubes de 10ml de Rothe + 1 ml de la solution 10^{-2} .

L'incubation se fait à 37 °C pendant 48 heures, les tubes présentant un trouble sont présomptifs de la présence des streptocoques fécaux.

➤ Test confirmatif

Chaque tube positif est ensemencé sur le milieu de Litsky qui contient non seulement de l'azide de sodium mais également de l'éthyle violet donc plus sélectif pour la mise en évidence les streptocoques fécaux.

L'incubation s'effectue pendant 24 heures à 37 °C. Les tubes présentant un trouble accompagné d'une pastille violette au fond du tube confirmant la présence des streptocoques fécaux. Les résultats sont exprimés en nombre de streptocoques par 100 ml d'eau de mer ou 100 g de la chair et le liquide intervalvaire à analyser en se référant à la table NPP (Delarras, 2003 ; Rodier et *al.*, 2005).

II.2.2.4. Recherche et dénombrement des spores de *Clostridium* sulfitoréducteurs

Pour la recherche et le dénombrement des spores de *Clostridium* sulfitoréducteurs, on utilise l'incorporation en profondeur dans une gélose de viande foie.

➤ Protocole

Traiter 2ml de l'échantillon à analyser (eau de mer, solution mère) au bain marie à 80 ± 2 °C pendant 10 minutes afin d'éliminer toutes les formes végétatives, puis les refroidir brusquement.

Verser doucement 18 ml du milieu viande-foie liquéfié et additionné des additifs ; alun de fer et sulfite de sodium.

Incuber à 37 °C pendant 16 à 24 heures.

➤ Lecture

Des colonies entourées d'un halo noir proviennent de spores de bactéries anaérobies sulfitoréductrices qui se sont développées. Le résultat est exprimé par le nombre de spores par 2 ml de l'échantillon.

II.2.2.5. Recherche des germes pathogènes : *Salmonella*

La recherche des salmonelles a été effectuée dans 100 ml pour l'eau de mer et dans 25 g de chair et de liquide intervalvaire pour la moule. Les étapes sont récapitulées dans le tableau 7.

Tableau 7 : Les étapes à suivre pour la recherche des *Salmonelles*.

Les phases du protocole	Protocole
Préenrichissement	<p>Eau : placer 100 ml d'eau de mer dans 100 ml d'eau peptonée tamponnée.</p> <p>Moule : placer 75 ml de la solution mère des moules (S M) dans 75ml de l'eau peptonée tamponnée.</p> <p>-Incubation à 37 °C pendant 24 heures.</p>
Enrichissement	<p>À partir de la culture précédente on transfère simultanément :</p> <p>10 ml dans un tube bouillon au sélénite-cystine (SFB) double concentration contenant 2 disques de l'additif SFB.</p> <p>1 ml dans un tube bouillon au sélénite-cystine (SFB) simple concentration additionné d'un disque de l'additif SFB.</p> <p>Incubation à 37 °C pendant 18 à 24 heures.</p>
Isolement	<p>À l'aide d'une anse, prélever simultanément : Une goutte de SFB D/C et l'étaler à la surface de la gélose HEKTOEN coulée préalablement en boîte de Pétri.</p> <p>Une goutte de SFB S/C du milieu enrichi et l'étaler à la surface de la gélose HEKTOEN.</p>
Lecture	<p>Les <i>Salmonelle</i> ne fermentant pas ni le lactose ni le saccharose vont apparaître sous forme de colonies bleu vert avec ou sans centre noir. La suspicion de la présence des <i>Salmonelle</i> doit être confirmée par des tests biochimiques et galerie API20E.</p>

II.3. RECHERCHE DES BACTÉRIES RÉSISTANTES ISOLÉES DE LA MOULE

II.3.1. Matériel

✓ Souche étudiée

Dans notre étude nous nous sommes intéressées à la détection de bactéries résistantes aux antibiotiques chez la moule *Mytilus galloprovincialis*. Les bactéries ont été recherchées parmi les coliformes fécaux (BVBL positif) et ont été sélectionnées sur un milieu supplémenté de céfotaxime à une concentration de 32 µg/ml.

➤ Souches de référence

Les souches de références utilisées sont :

-*E. coli* ATCC 25925 : utilisée pour le contrôle de la qualité des antibiotiques.

-*E. coli* K12 NA^R : utilisées comme souches réceptrices lors des essais de transfert par conjugaison.

➤ Antibiotiques

- Antibiotique en poudre

Le céfotaxime, l'acide nalidixique ont été utilisés comme marqueurs de sélections des transconjugants lors des transferts génétiques par conjugaison bactérienne.

- Antibiotiques en disque

Les disques imprégnés d'antibiotiques (Biorad) utilisés dans les tests d'antibiogramme et de synergie sont résumés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Les différents antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme

Famille	Antibiotiques	Charge (µg)	Abréviation
Bétalactames	Amoxicilline + Clavulanate	20+10	AMC
	Ticarcilline	75	TIC
	Ticarcilline + acide clavulanique	75/10	TCC
	Mezlocilline	10	MZ
	Mecillinam	10	MEC
	Aztréonam	30	ATM
	Céfalotine	30	CF
	Céfoxitine	30	FOX
	Cefsulodine	30	CFS
	Céfuroxime	30	CXM
	Cefotaxime	30	CTX
	Ceftazidime	30	CAZ
	Céfépime	30	FEP
	Cefpirome	30	CPO
Aminosides	Kanamycine	30 UI	K
	Tobaramycine	10	TM
	Amikacine	30	AN
	Gentamycine	10 UI	GM
Tétracyclines	Tétracycline	30 UI	TE
Phénicol	Chloramphénicol	30	C
Sulfamides	Sulfamide	200	SSS
	Triméthoprim	5	TMP
	Triméthoprim/Sulfaméthoxazol	1.25/23.75	SXT
Quinolones	Acide nalidixique	30	NA
	Ofloxacine	5	OFX
Rifampicines	Rifampicine	30	RA

II.3.2. Méthodes

II.3.2.1. Identifications bactériennes

➤ Principe

Toutes les souches résistantes ont fait l'objet d'une identification par galeries API20E (Biomérieux). C'est un système d'identification des entérobactéries et d'autres bacilles à Gram négatif, il comporte 20 tests biochimiques standardisés et miniaturisés qui sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue le milieu. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactif (Biomérieux).

➤ Technique

Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.

Retirer la galerie de son emballage individuel et la déposer dans la boîte d'incubation.

Préparer l'inoculum bactérien : prélever 1 à 3 colonies dans de l'eau physiologique stérile.

Inoculer la galerie comme suit :

- ❖ Remplir à l'aide d'une micropipette les tubes et cupules des tests CIT, VP, GEL.
- ❖ Remplir uniquement les tubes des autres tests.
- ❖ Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leur capule d'huile de vaseline.
- ❖ Refermer la boîte d'incubation. et incuber à 33°C pendant 24 heures.

➤ Lecture

Ces galeries API20E sont lues selon les indications du fournisseur. Après codification des réactions en un profil numérique, on se réfère à un catalogue analytique où l'identification est donnée avec un pourcentage et une appréciation.

II.3.2.2. Étude de la résistance aux antibiotiques par Antibiogramme

➤ Principe

L'étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé (CASFM, 2008). Cette technique consiste à déposer des disques imprégnés d'antibiotiques à la surface d'un milieu de culture préalablementensemencé avec une dilution calibrée de la bactérie à tester. Un gradient inversement proportionnel à la distance par rapport aux disques s'établit dans la gélose. La croissance des bactéries dessine des halos d'inhibition au tour du disque. La croissance bactérienne s'arrête en présence de la concentration minimale d'inhibition autour du disque d'antibiotique (Courvalin et *al.*, 1985).

➤ Technique

Selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (2008).

L'inoculum utilisé est ajusté au 0.5 McFarland afin d'obtenir une nappe semi confluente.

- ❖ Diluer l'inoculum au 1/10.
- ❖ A l'aide d'un écouvillon, ensemencer la boîte sur la totalité de la surface gélosée et en tournant la boîte trois fois 60° afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum.
- ❖ Appliquer les disques d'antibiotiques à l'aide d'un distributeur stérile selon le schéma de Vedel (1994) (Figure 5).
- ❖ Laisser diffuser pendant 15minutes
- ❖ Incuber à 33°C pendant 18-24heures.

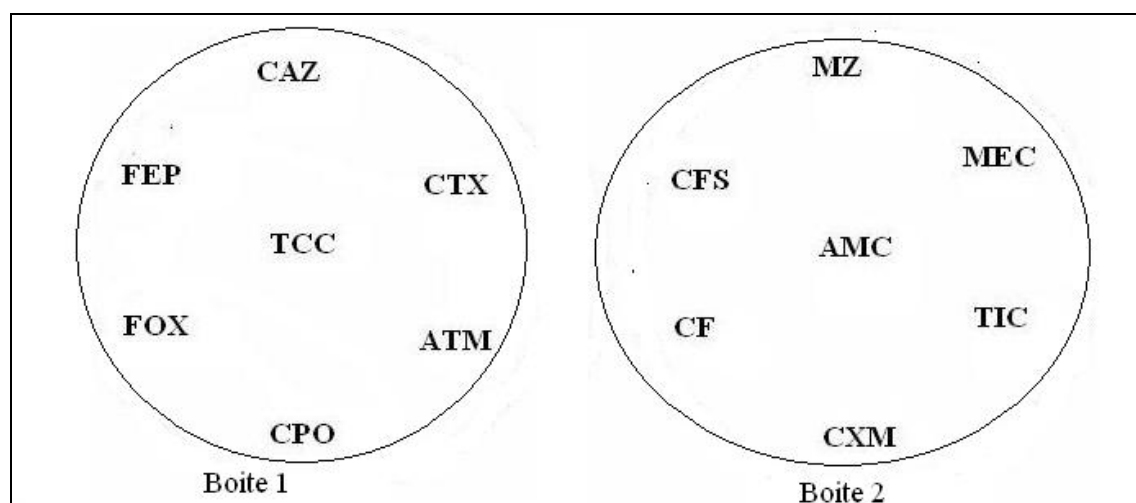


Figure 5 : Schéma de la disposition des antibiotiques (Vedel, 1994).

➤ **Lecture**

- ❖ Mesurer avec précision les diamètres d'inhibition à l'aide d'une règle.
- ❖ Classer les bactéries dans l'une des catégories : sensible, intermédiaire ou résistant selon les valeurs critiques.

II.3.3. Détection de bêta-lactamase à spectre élargi BLSE «test de synergie »

Ce test se base sur la mise à profit d'une synergie entre d'une part, un disque contenant un inhibiteur de bêta-lactamases et d'autre part, un disque indicateur de l'activité BLSE (une céphalosporine de troisième génération (C3G) et/ou l'aztréoname (ATM) placés à 3 cm centre à centre. Cette synergie correspond à une augmentation de la zone d'inhibition de ces antibiotiques du côté du disque contenant l'inhibiteur de bêta-lactamase (Vedel, 1994).

➤ **Technique**

- ❖ Une suspension de 10^7 cellules/ml de la souche à tester estensemencée sur une gélose de Mueller Hinton.
- ❖ Appliquer les disques de céphalosporines de 3^{ème} génération (CTX, CAZ) et/ou d'ATM à 3 cm centre à centre au tour d'un disque d'TCC.
- ❖ Laisser diffuser sur la paillasse durant 15minutes.
- ❖ Incuber à 33 °C pendant 18heures.

➤ **Lecture**

Une souche est dite BLSE s'il y a une augmentation nette de la zone d'inhibition entre au moins un disque indicateur de l'activité BLSE et le disque TCC.

II.3.4. Essai de transfert génétique par conjugaison bactérienne

✓ **Principe**

La mise en évidence de plasmides conjugatifs portants des caractères de résistance aux antibiotiques, se fait par un croisement de la souche sauvage (donatrice) avec une souche réceptrice (*E. coli* K12 NA^R) dépourvue de plasmides et possédant un caractère de résistance chromosomique auquel la donatrice est sensible.

Les bactéries réceptrices ayant acquis le caractère de résistance aux antibiotiques transférables sont sélectionnées et testées par antibiogramme pour déterminer leur profil d'antibiorésistance (courvalin et *al*, 1985).

➤ **Technique**

La conjugaison a été effectuée en milieu solide.

- ❖ Cultiver la souche donatrice et réceptrice à 37 °C pendant 18h sur BHIB.
- ❖ Centrifuger la souche réceptrice et donatrice à 12 000 tours/ min pendant 2 minutes.
- ❖ Récupérer le culot puis le resuspendre dans 100 µl d'eau physiologique.
- ❖ Mélanger 100µl de la réceptrice avec 50 µl de la donatrice.
- ❖ Spoter 50 µl du mélange dans une boîte de gélose MH.
- ❖ Laisser sécher puis incuber à 30 °C pendant 18 h.
- ❖ Racler la culture mixte et la mettre en suspension dans 5 ml d'eau physiologique stérile.
- ❖ Ensemencer en strie sur des boîtes de sélection des transconjugants ainsi que les souches parentales.
- ❖ Vérifier les contrôles : les souches donatrices et réceptrices ne doivent pas pousser.
- ❖ Analyser les transconjugants.

Préparation des boîtes de sélection des transconjugants :

- 1 ml de CTX (concentration finale de 4 µg/ml).
- 1 ml de NA (concentration finale de 50 µg/ml).
- 18 ml de gélose MH.

II.3.5. Recherche des gènes de BLSE par PCR (Poly Chain Reaction)

➤ **Principe**

La PCR est une technique basée sur l'hybridation spécifique des amorces avec le gène recherché, elle permet l'amplification du fragment cible balisé par deux amorces, le processus nécessite la succession d'un certain nombre de cycles (25 - 40), chaque cycle comporte les étapes suivantes :

- ❖ La dénaturation de l'ADN à 94 °C.

- ❖ L'amorçage : hybridation des amorces de part et d'autre du fragment à amplifier (40 – 60 °C).
- ❖ L'élongation : la synthèse d'un brin d'ADN est réalisée par la Taq polymérase à 72 °C.

➤ **Technique**

Extraction de l'ADN totale

- ❖ Préparer l'inoculum bactérien : 3 à 4 colonies dans 50 µl d'eau distillée stérile.
- ❖ Mettre l'inoculum à 100 °C pendant 10 min pour la lyse.
- ❖ Centrifuger à 12000 trs/min pendant 2 min.
- ❖ Récupérer le surnageant.
- ❖ Mettre dans des microtubes 2,5µl du lysat (le surnageant) + 10 µl du Mix.
- ❖ Mettre dans l'appareil à PCR pour l'amplification en appliquant le programme correspondant.

➤ **Réalisation de la PCR**

Utilisation PCR master Mix (Promega) pour un volume de réaction de 12.5µl :

PCR master Mix (2X)	6.25ul.
Amorces 1	0.25µl.
Amorces 2	0.25µl.
H ₂ O	3.25µl.
ADN	2.5µl.

Les deux gènes TEM et CTX-M (tableau 9) ont été recherché par le programme suivant (Kim *et al.*, 2004): 94 °C pendant 10 min, 30 cycles de 94 °C pendant 40 sec, 55 °C pendant 30 sec, et 72 °C pendant 40 sec. Une élongation finale de 10 min à 72 °C.

Les produits d'amplification sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 1.5% sous une tension de 50 V pendant 1 h. La visualisation se fait sous UV en utilisant le bromure d'éthidium (0.5 µg/ml).

Tableau 9 : Les amorces utilisées pour la recherche des gènes de résistance.

Gène	Amorce	Taille du fragment	Température d'hybridation (°C)
TEM	F : ATAAAATTCTTGAAGACGAAA B : GACAGTTACCAATGCTTAATCA	857	52
CTX-M	<i>Up</i> : GGTAAAAAATCACTGCGTC <i>Low</i> : TTGGTGACGATTTTAGCCGC	550	55

Électrophorèse sur gel d'agarose

➤ Principe

C'est une technique standardisée qui assure la séparation, l'identification et la purification des fragments d'ADN chargés négativement. La migration dans un gel d'agarose soumis à un champ électrique dépend de plusieurs paramètres :

- ❖ Le poids moléculaire de l'ADN
- ❖ La concentration d'agarose dans le gel
- ❖ La conformation de l'ADN
- ❖ Le voltage appliqué
- ❖ La composition du tampon d'électrophorèse.

➤ Technique

- ❖ préparation d'un gel d'agarose de 1,5 %.
- ❖ Déposer l'échantillon à analyser.
- ❖ Appliquer un champ électrique à un voltage de 25 V/cm.
- ❖ Visualiser l'ADN sous UV à 254 nm.

Resultats et discussion

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

La moule est un bioaccumulateur de produits toxiques, leur consommation peut causer de nombreux risques sanitaires. A cet effet, nous nous sommes intéressé en premier lieu à la l'analyse de la qualité microbiologique de cet aliment et en deuxième lieu à des bactéries résistantes aux antibiotiques et potentiellement capables de transférer l'antibiorésistance. Le travail a été réalisé durant une période de trois mois (du mois d'avril au mois de juin 2008), à raison d'un prélèvement par mois d'eau et de moule au niveau de trois stations (Est, Centre, Ouest).

III.1. CONTROLE DE LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE DE LA MOULE ET DE SON MILIEU D'ELEVAGE

III.1.1 Résultats des paramètres physico-chimiques

✓ Température

La température joue un rôle très important dans le comportement physiologique de la moule (reproduction, filtration). Les résultats (figure 6) ont montré une homogénéité des valeurs entre les stations ce qui pourrait s'expliquer par la distance non importante entre les stations. Cependant, une augmentation de la température avec le temps (16.7 - 20,6 °C) a été notée, ces valeurs reflètent bien la saison printanière de la région.

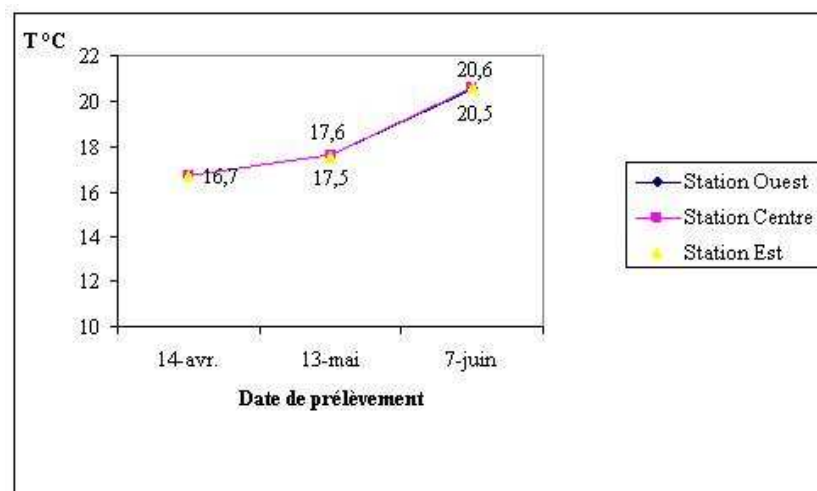


Figure 6 : Variation mensuelle de la température à la surface. (14 avril, 13 mai et 7 juin 2008)

✓ **Salinité**

Les résultats ont montré que la salinité a été relativement stable pour toutes les stations pendant la période de prélèvement (Figure 7). Les valeurs de salinité observées sont comprises entre 36.5 PSU et 37 PSU. Ces valeurs sont caractéristiques de la mer méditerranée et elles sont favorables pour la filtration des moules.

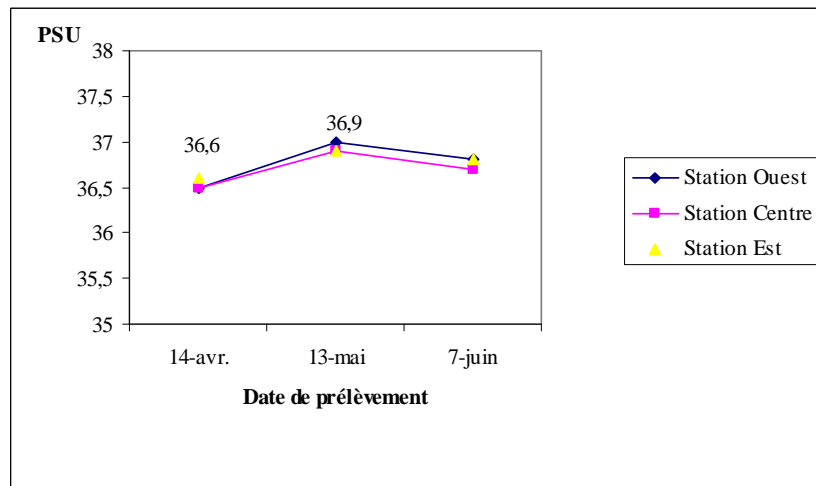


Figure 7 : Variation de la salinité à la surface (14 avril, 13 mai et 7 juin 2008)

✓ **pH (potentiel Hydrogène)**

L'évaluation du pH nous permet de déterminer l'acidité, la basicité d'un milieu et renseigne sur l'état de pollution d'une région. Les résultats ont montré une similitude dans le temps et dans l'espace pour les trois stations (Figure 8) avec des valeurs qui varient entre 8.17 et 8.5.

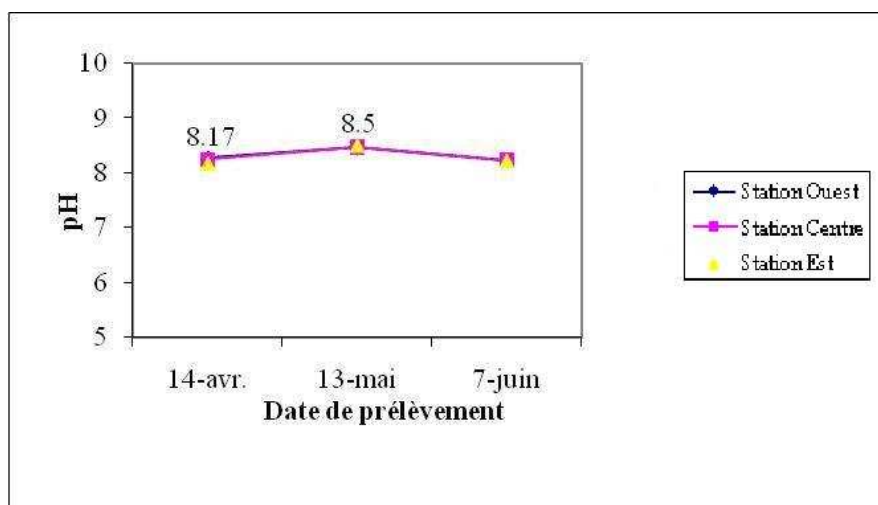


Figure 8 : Variation mensuelle du pH à la surface (14 avril, 13 mai et 7 juin 2008)

III.1.2. Résultats des analyses bactériologiques des moules et de l'eau de mer

III.1.2.1. Dénombrement mensuel des indicateurs de contamination dans l'eau de mer

Les variations mensuelles des coliformes totaux, coliformes fécaux, *E. coli* et Streptocoques fécaux de l'eau d'élevage et de la moule (la chair et le liquide intervalvaire) sont illustrées par les figures (9,10 et 11).

➤ Coliformes totaux

L'appréciation des concentrations en coliformes totaux observées en période d'étude a permis de révéler des variations de 0 à 93 cellules/100 ml. Ces variations en fonction du temps ne sont pas très significatives et restent inférieures à la norme, ceci pourrait être dû soit à la disparition physique (dilution, dispersion) ou bien à la mortalité des bactéries (milieu oligotrophe, compétition, prédation, conditions hostiles). Vu que le risque sanitaire lié aux coliformes totaux est généralement faible et l'origine fécale de ces bactéries est non confirmée il est important de rechercher les coliformes thermotolérants (Chevalier, 2003).

➤ Coliformes thermotolérants (fécaux)

Les concentrations observées en coliformes thermotolérants sont nettement inférieures à celles des coliformes totaux. Elles sont stables dans le temps et l'espace et varient entre 0 et 23 cellules/100ml. Les valeurs les plus faibles ont été observées en mois de juin et avril (0 cellule/100ml).

➤ *Escherichia coli*

Ce germe est considéré le meilleur indicateur de contamination fécale. L'analyse de routine des moules est basée sur le nombre de ce germe. Les valeurs obtenues dans notre études varient de 0 à 23 cellule /ml.

Ce faible nombre dans les échantillons d'eau de mer analysés pourrait s'expliquer, tout simplement par leur fragilité, leur sensibilité et leur durée de vie trop courte dans le milieu marin trop hostile ; selon Mezrioui et Baleux (1992), les faibles températures de l'ordre de 4 °C augmentent la survie bactérienne d'*E. coli*.

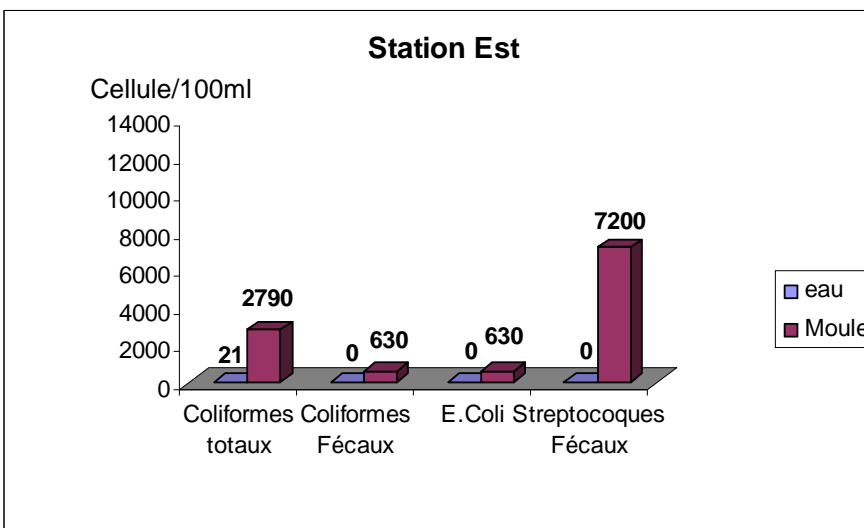
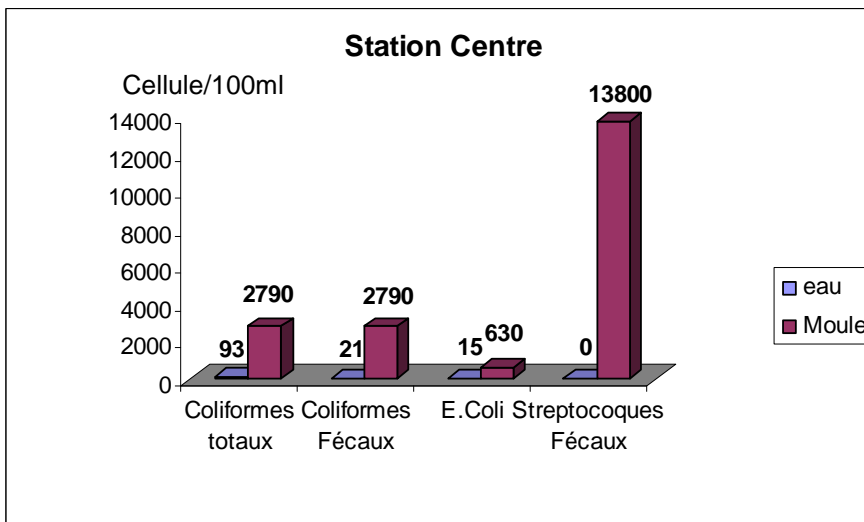
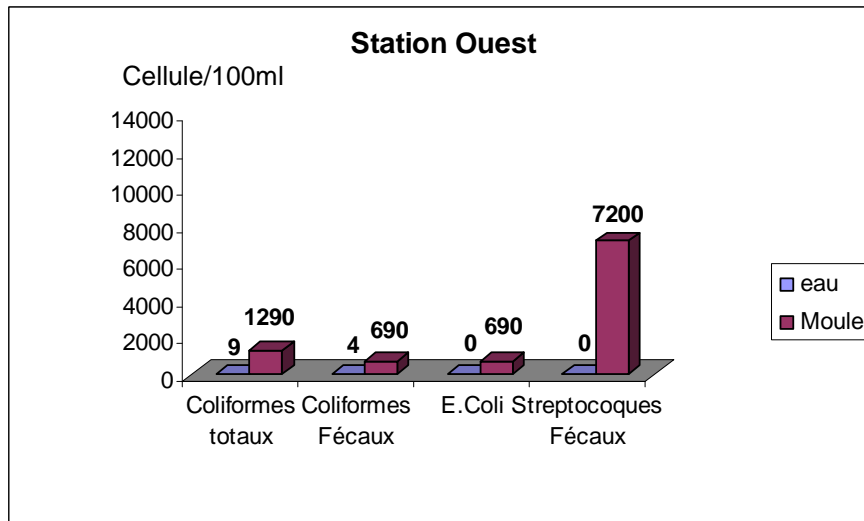


Figure 9 : Résultats d'analyse bactériologique de l'eau de mer et de la moule (14 avril 2008).

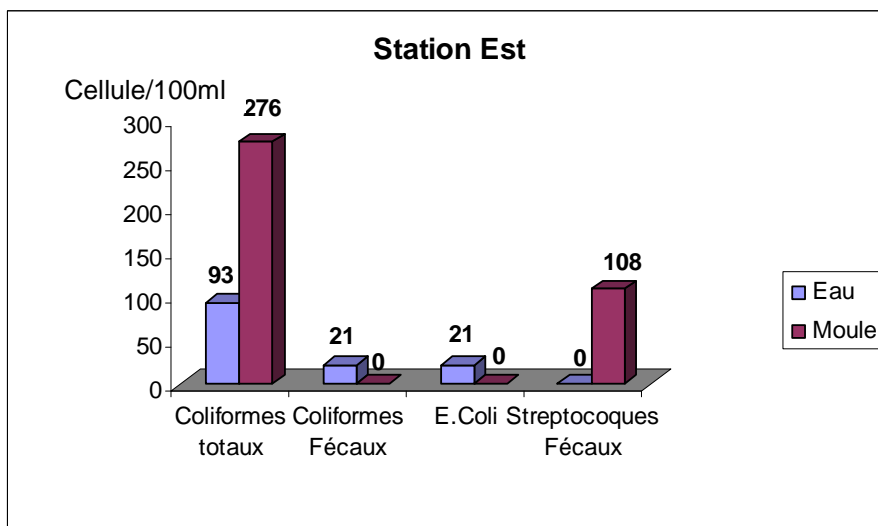
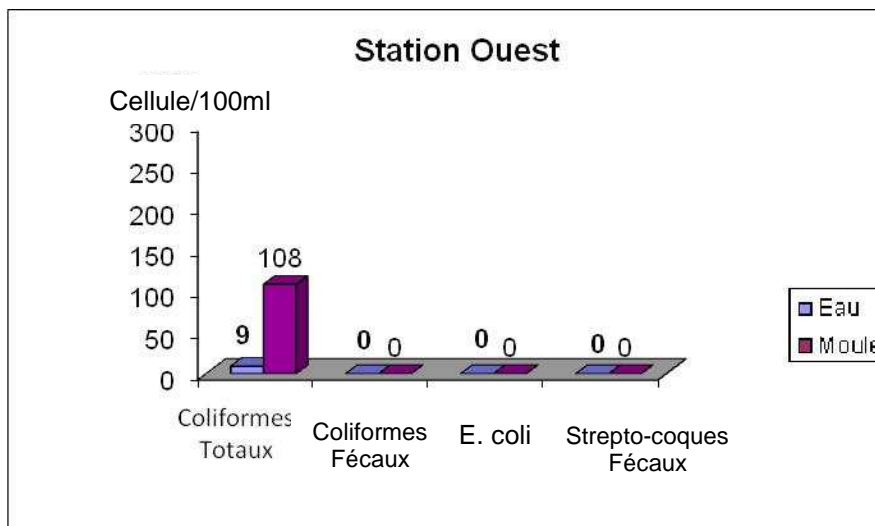
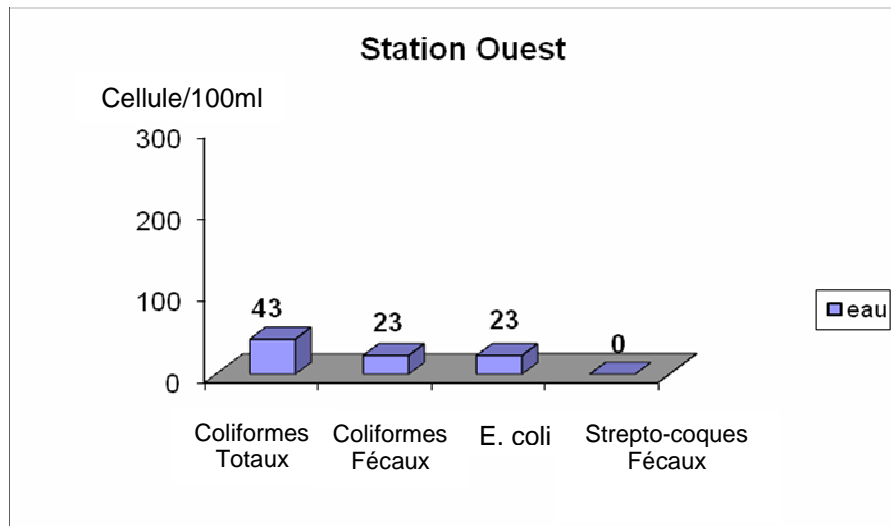


Figure 10 : Résultats d'analyse bactériologique de l'eau de mer et de la moule (13 mai 2008).

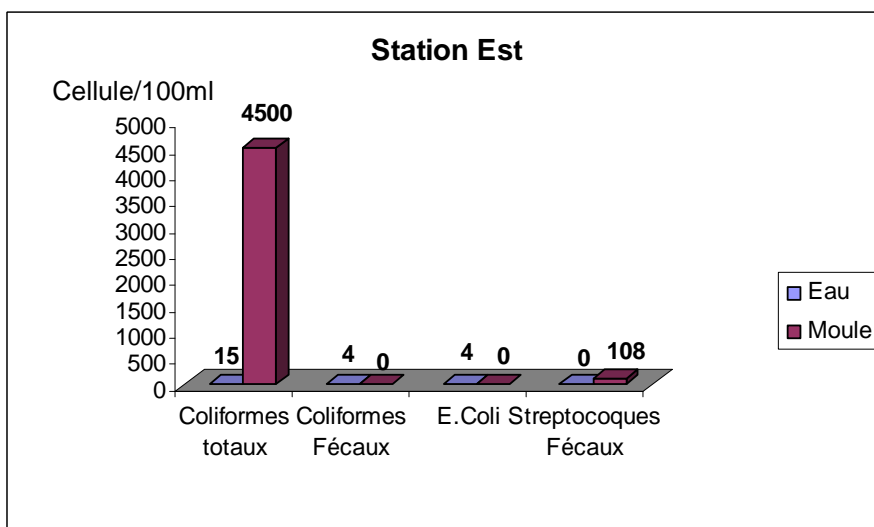
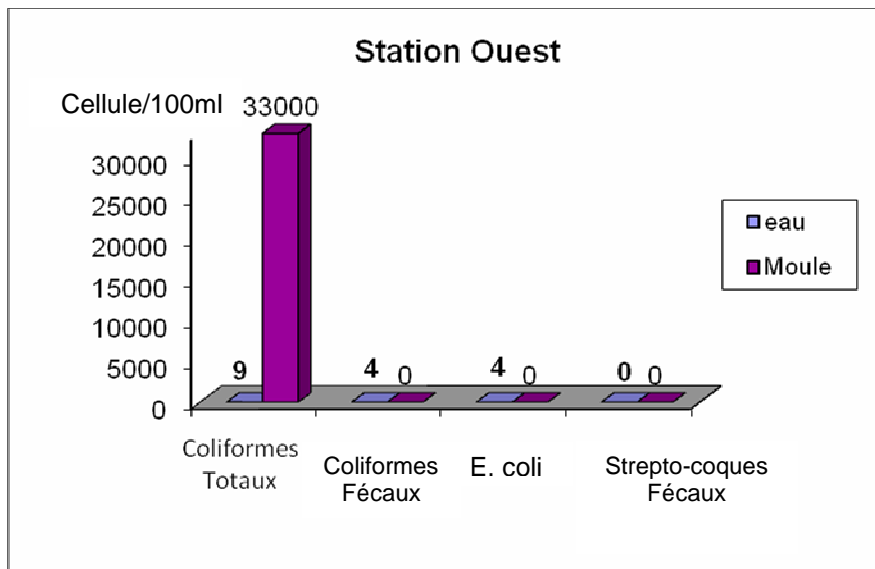
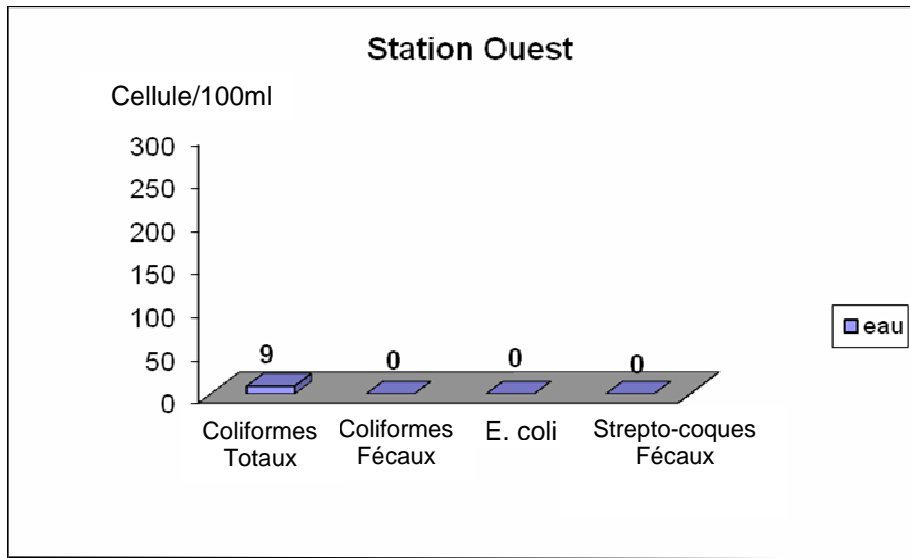


Figure 11 : Résultats d'analyse bactériologique de l'eau de mer et de la moule (7 juin 2008).

➤ **Streptocoques fécaux**

Les résultats ont montré l'absence des *Streptocoques* fécaux dans tous les échantillons d'eau durant la période des prélèvements. Vu que ce germe se caractérise par une bonne résistance aux conditions hostiles, les résultats obtenus ne peuvent prédire que d'une bonne qualité microbiologique de l'eau (Plusquellec et al, 1986, Rodier, 2005).

Les faibles concentrations en germe d'origine fécale (coliformes et streptocoques fécaux) pourraient s'expliquer par le fait que l'emplacement de la ferme conchylicole est situé dans une zone soumise à des renouvellements d'eau (Chebab, 1996).

➤ ***Clostridium* sulfitoréducteur**

La recherche des spores de *Clostridium* sulfitoréducteur s'est révélée négative dans tous les échantillons d'eau prélevés durant notre étude. Ceci ne peut témoigner que de la bonne qualité des eaux d'élevage.

III.1.2.2. Dénombrement mensuel des indicateurs de contamination dans les moules

Les résultats des dénombrements des indicateurs fécaux retrouvés dans 100 ml de chair et de liquide intervalvaire sont représentés dans les figures illustrées ci-dessus (9,10 et 11). Il est à signaler que le nombre d'échantillon a été réduit à deux dans les mois de mai et juin, ceci est dû au fait que la filière Ouest a été déplacée et remplacée par un élevage d'huître.

➤ **Coliformes totaux**

La concentration des coliformes totaux pendant la période des prélèvements a connu des fluctuations telle que la concentration la plus élevée est enregistrée en mois de juin (33 000 cellules/100ml), cependant, la valeur minimale enregistrée est de 108 cellules/100ml en mois de mai.

➤ **Coliformes thermotolérants (fécaux)**

Les valeurs des coliformes fécaux varient dans le temps. En effet, nous avons constaté une valeur nulle durant les mois de mai et juin. Cependant, la valeur la plus élevée (2790 Cellule/100ml) a été observée au mois d'avril. Cette valeur dépasse largement la valeur guide de 300 Cellule/100ml, et elle peut être expliquée par la remise en suspension des bactéries durant les dix jours de mauvais temps observés avant le prélèvement (IFREMER, 2008).

➤ ***Escherichia coli***

Les résultats de la recherche d'*E. coli* ont montré l'absence de ces dernières dans les prélèvements de moule effectués en mois de mai et juin. Cependant, le prélèvement de mois d'avril a présenté des valeurs de l'ordre de 690 cellule/100ml qui dépassent largement la valeur guide de 230 cellules/100ml mais qui reste inférieur à 1000 cellule/100ml (valeur impérative), donc ces moules restent propre à la consommation humaine directe et ce dépassement pourrait s'expliquer par le même constat que les coliformes fécaux ; les mauvaises conditions météorologiques observées durant dix jours avant le prélèvement.

➤ **Streptocoques fécaux**

La recherche des Streptocoques a révélé leur présence au niveau de la station Est durant les mois de mai et juin qui avoisine la valeur guide (100 cellules/ml). Seul le mois d'avril a présenté des valeurs qui oscillent 7200-13800 cellules/ml, ce qui dépasse largement la valeur guide. Ce résultat pourrait être expliqué comme précédemment par la remise en suspension des particules et des bactéries.

➤ ***Clostridium sulfitoréducteur***

Bien qu'il n'y ait aucune norme concernant les spores de *Clostridium*, nous les avons recherchés. Les résultats ont montré la présence de 2 à 9 spores dans 2 ml d'échantillon durant les mois de mai et de juin. Il aurait été intéressant d'identifier ces *Clostridium* (recherche éventuelle de *C. perfringens*) mais malheureusement ça n'a pas été fait par manque de moyens.

III.1.2.3. Recherche de *Salmonella* dans l'eau et la moule

Salmonella est le seul agent pathogène recherché en routine dans les eaux et les produits agroalimentaire. Sa présence n'a pas été observée dans aucun échantillon soit de l'eau de mer (100 ml) soit des moules prélevés (25 g de chair et de liquide intervalvaire).

III.1.2.4. Comparaison entre les résultats de l'eau et des moules

La concentration des bactéries par la moule *Mytilus galloprovincialis*, est importante si elle est comparée avec celle de l'eau environnante. La quantité des germes dans l'organisme des moules est régie par le phénomène de filtration. Ces derniers filtrent un grand volume d'eau, en moyenne de 175 à 650 l/h/kg du poids vif (Guillaud et Romana, 1996). Les particules en suspension sont captées lors de ce transit. Le tri se fait au niveau des palpes labiaux qui rejettent tous les éléments non digérables à cause de leur taille ou de leur nature. Les bactéries ne sont donc pas expulsées, mais plutôt concentrées en forte proportion. D'après les résultats représentés dans les figures (9,10 et 11), nous avons constaté que les valeurs des coliformes dans la moule sont très élevés par rapport à celles observées pour l'eau, ceci est dû au fait que les moules filtrent l'eau et concentrent les germes avec des taux variables (Guillaud et Romana, 1996).

Concernant le premier prélèvement, nous avons constaté des valeurs très concentrées de tous les indicateurs chez la moule par rapport à l'eau avec un facteur de concentration plus élevé pour les *Streptocoques* (Delattre et Delesmont, 1981 *in* Plusquellec et *al.*, 1986). Ces résultats peuvent être expliqués par une filtration très importante favorisée par la remise en suspension des particules durant le mauvais temps. Cependant, la différence dans les facteurs de concentration pourrait s'expliquer par une persistance plus importante des *Streptocoques* fécaux à l'intérieur des bivalves. En effet, Prieur (1981) à signaler l'adaptation de certaines bactéries aux conditions hostiles rencontrées dans le tractus digestif des moules (*in* Plusquellec et *al.*, 1986). Lorsque ces germes sont mis en évidence dans un échantillon d'eau ou de moule, ils sont le signe d'une contamination par les matières fécales qui constitue un véritable danger pour la santé des consommateurs de moules (Plusquellec et *al.*, 1986)

III.2. RECHERCHE DES BACTERIES RESISTANTES

III.2.1. Isolement et identification des souches résistantes

Douze bactéries résistantes ont été isolées parmi les coliformes fécaux sur du Mueller Hinton supplémenté de 32 µg/ml de céfotaxime. Elles ont été récupérées à partir des échantillons de mois d'avril et mois de juin où nous avons observé un maximum de contamination en coliformes. Les résultats de l'identification biochimique de ces souches par galeries API20E ont révélé l'appartenance des souches au genre *Citrobacter freundii* et *Enterobacter cloacae*.

III.2.2. Étude de la résistance aux antibiotiques

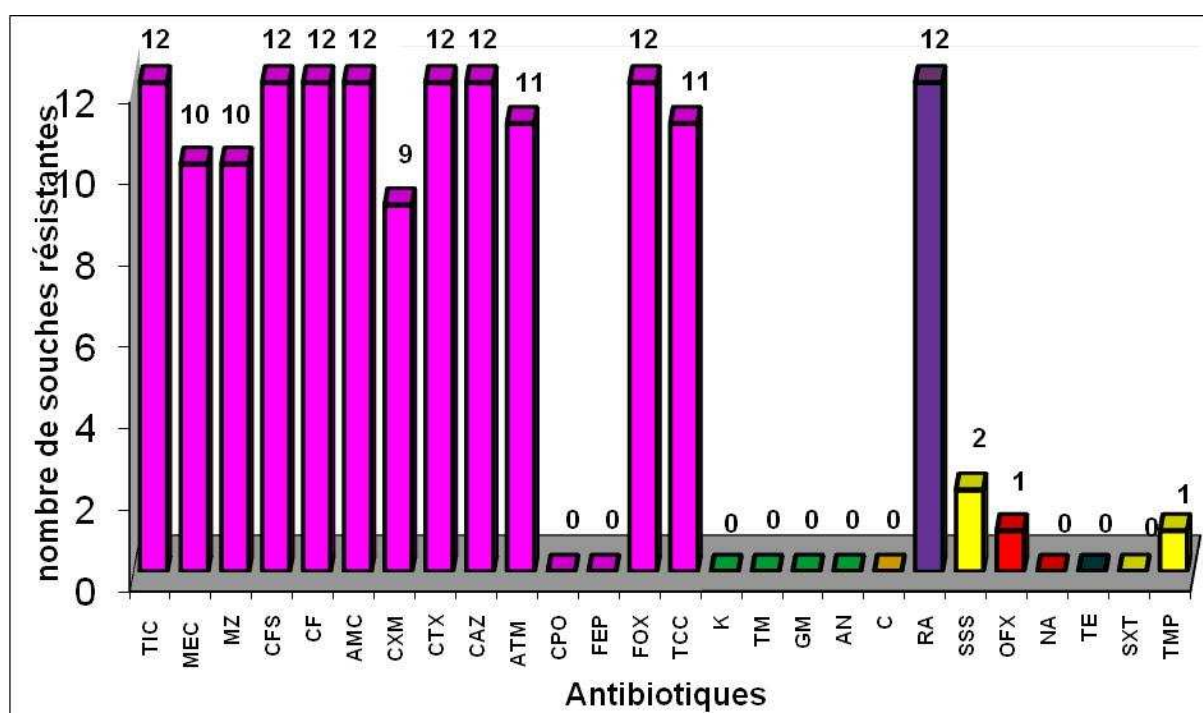


Figure 12 : Résistance des souches vis-à-vis des antibiotiques.

La sensibilité de nos souches vis-à-vis de 26 antibiotiques dont 14 bêta-lactamines a été étudiée par la méthode de diffusion en milieu gélosé (CASFM, 2008). Les résultats illustrés dans la figure 12 montre que :

➤ Les bêta-lactamines

La quasi-totalité des souches a été résistante aux pénicillines (TIC, MEC, MZ), aux céphalosporines de première (CF), deuxième (CXM, CFS) et troisième génération (CTX, CAZ) et au monobactame (ATM). Ces résistances sont de type acquis chez les deux genres

étudiés (*Citrobacter* et *Enterobacter*) (Vedel, 1994). Seules les céphalosporines de quatrième génération restent actives sur nos souches (FEP et CPO). L'acide clavulanique n'a pas restauré l'activité des antibiotiques chez la majorité des souches, ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'acide clavulanique est un inducteur de la céphalosporinase chromosomique présente naturellement chez les deux genres. Cette enzyme pourrait également être responsable de la résistance à la céfoxitine (FOX) (Bonnet et al., 2000).

Le profil de résistance de nos souches vis-à-vis des bêta-lactamines ressemble à celui rencontré chez les souches cliniques algériennes (Touati et al., 2006, Messai et al., 2008) ce qui pourrait expliquer l'origine de ces souches résistantes.

➤ Autres antibiotiques

La plus part des antibiotiques non bêta-lactames ont été efficaces sur nos souches (aminosides, quinolones, tetracyclines), deux souches ont été résistantes aux sulfamides (SSS) un antibiotique très utilisé en médecine vétérinaire. Seule la rifampicine (RA) a été inactive sur toutes nos souches. Ces résultats sont plus en moins rassurants et ceci pourrait être dû au fait qu'il n'y a pas une grande utilisation des antibiotiques comme facteur de croissance. En effet, plusieurs études ont démontré la présence de bactéries résistantes à la tétracycline et aux sulfamides isolées à partir de ferme aquacole (Sarter et al., 2007 ; Hargrave et al., 2008)

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a montré également que nos souches sont multirésistantes (Tableau 10), allant de 12 à 14 molécules d'antibiotiques réparties dans 7 antibiotypes différents.

Tableau 10 : Antibiotypes des souches vis-à-vis des antibiotiques.

Souches	ANTIBIOTYPES	Nombre de R
M1	TIC MZ CFS CF AMC CXM CTX CAZ ATM FOX RA TMP	12
M12 M13	TIC MEC CFS CF AMC CXM CTX CAZ ATM FOX TCC RA	12
M3a M4a M6a	TIC MEC MZ CFS CF AMC CTX CAZ ATM FOX TCC RA	12
M5	TIC MZ CFS CF AMC CXM CTX CAZ FOX TCC RA SSS OFX	13
M1a M2a	TIC MEC MZ CFS CF AMC CXM CTX CAZ ATM FOX TCC RA	13
M10 M11	TIC MEC MZ CFS CF AMC CXM CTX CAZ ATM FOX TCC RA	13
M2	TIC MEC MZ CFS CF AMC CXM CTX CAZ ATM FOX TCC RA SSS	14

III.2.3. Production de bêtalactamase à spectre élargi

La résistance aux bêtalactamines est la plus connue en Algérie vu leur large utilisation en médecine humaine et vétérinaire. Le mécanisme le plus redoutable sur le plan clinique et écologique est la production d'une bêtalactamase à spectre élargi. Ce mécanisme est mis en évidence par l'observation d'une image de synergie caractéristique. Les résultats ont montré la présence d'une image de synergie entre d'une part la TCC et d'autre part FEP et CPO chez 2 souches sur les 12 retenues pour cette étude (Figure 13). Ce qui augure la production d'une bêta-lactamase à spectre élargi chez ces deux souches.

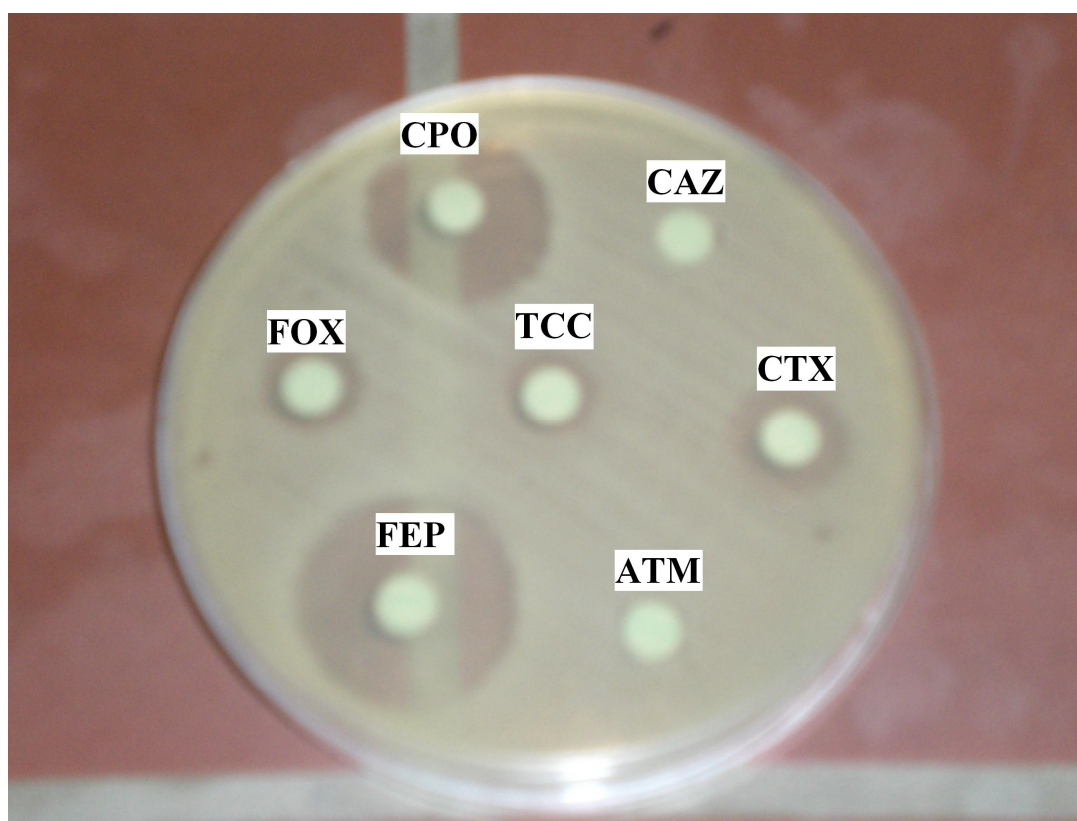


Figure 13 : Illustration de la production d'une BLSE.

Noter la résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération (CTX, CAZ) et l'ATM, l'image de synergie observée entre le TCC et les céphalosporines de 4^{ème} génération CPO et FEP.

III.2.4. Transfert génétique par conjugaison

Des essais de transfert par conjugaison à la souche *E. coli* k12 résistante à l'acide nalidixique ont été réalisés pour les deux souches présentant une image de synergie (tableau 11). Le transfert n'a pas été concluant ce qui suggérait la présence des gènes codants pour ces résistances soit sur le chromosome soit sur un plasmide non autotransférable. Bien que la majorité des gènes de résistance et spécialement ceux des BLSE ont été trouvés à médiation plasmidique, il existe des études qui ont rapporté l'existence de ces gènes sur des transposons ou des plasmides non transférables (Jarlier et *al.*, 1988 ; Messai et *al.*, 2006).

Tableau 11 : Résultat de transfert génétique par conjugaison.

Souches	Antibiotype	Transfert
M2	TIC MEC MZ CFS CF AMC CXM CTX CAZ ATM FOX TCC RA SSS	-
M13	TIC MEC CFS CF AMC CXM CTX CAZ ATM FOX TCC RA	-

III.2.5. Essai de caractérisation des gènes codant pour la bêtalactamase à spectre élargi

La caractérisation des gènes codants pour la résistance aux bêtalactamines été réalisée par PCR (figure 14 et 15) chez toutes les souches pour le gène TEM et uniquement pour les deux souches BLSE pour le gène CTX-M. Ces deux enzymes sont les plus connues et rencontrées en Algérie (Touati et *al.*, 2006 ; Messai et *al.*, 2008). Les résultats ont montré que nos souches ne sont pas productrices de ces deux enzymes. Il est important de continuer la recherche des autres gènes spécialement ceux de la famille des BLSE.

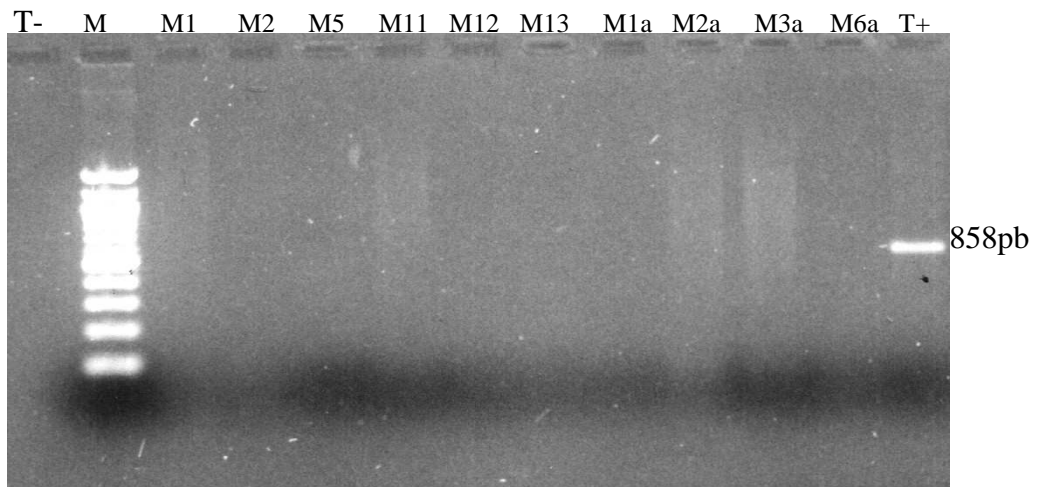


Figure 14 : Résultat de la recherche du gène TEM.

T- : témoin négatif, M : marqueur 100pb, T+ : témoin positif

La migration se fait du haut en bas.

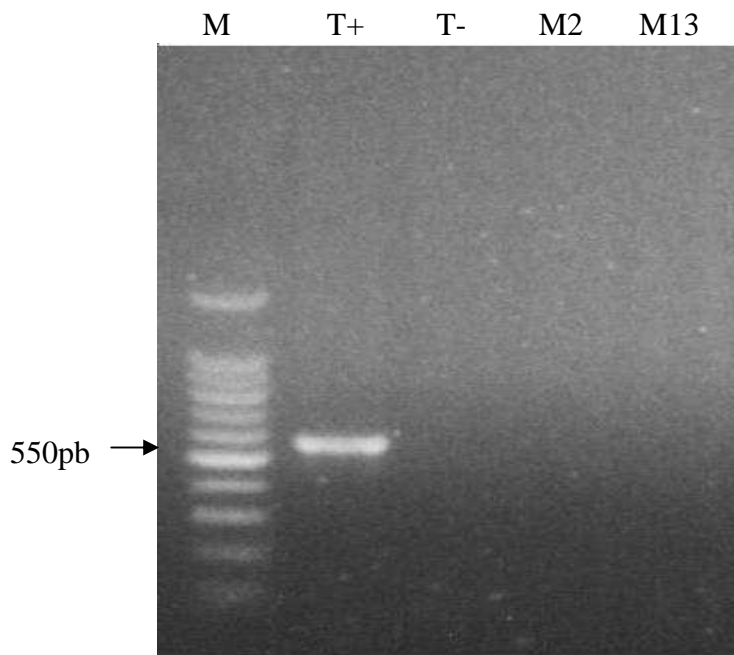


Figure 15 : Résultat de la recherche du gène CTX-M chez les deux souches BLSE.

T- : témoin négatif, M : marqueur 100pb, T+ : témoin positif (bande de 550pb)

La migration se fait du haut en bas.

Conclusion

CONCLUSION

L'objectif de notre travail a été la recherche des bactéries résistantes aux antibiotiques chez la moule d'élevage « *Mytilus galloprovincialis* ». Les résultats obtenus nous ont permis de constater que :

- Le contrôle microbiologique de la moule ainsi que de son milieu d'élevage a montré la qualité satisfaisante de la moule.
- La présence de bactéries résistantes a été retrouvée dans les prélèvements de contamination maximum en coliformes totaux.
- Les bactéries ont été assignées aux espèces *C. freundii* et *E. cloacae*.
- L'évaluation globale de leur résistance a révélé une résistance aux bêtalactamines (TIC, MZ, CF, CFS, CTX, CAZ et FOX) excepté les céphalosporines de quatrième génération (CPO, FEP), ainsi qu'à la rifampicine et une sensibilité aux aminosides, quinolones, chloramphénicol et sulfamides.
- Une synergie entre le TCC et les céphalosporines CPO et FEP a été observée pour 2 souches, augurant la production par celles-ci de bêta-lactamases à spectre élargi.
- Les essais de transfert génétique par conjugaison conduits sur les 2 souches ont été négatifs.
- L'absence des gène de résistance TEM et CTX-M.

D'après ces résultats, nous constatons que la moule concentre et permet le maintien des souches résistantes dans l'environnement. En effet, bien que les bactéries retrouvées ne soient pas pathogènes, cependant elles peuvent servir de vecteur pour le transfert horizontal de l'antibiorésistance à des germes pathogènes. L'acquisition de gènes par les bactéries lui permette de persister dans un environnement aquatique hostile qui est en contact permanent avec l'homme et de disséminer de nombreuses maladies pour lesquelles la résistance peu entraîner un échec thérapeutique.

En perspective, il est important de caractériser génotypiquement les mécanismes de résistance chez ces souches et spécialement les deux souches productrices d'une BLSE afin de comprendre leur mécanisme de dissémination.

Il serait également intéressant de prolonger les analyses durant la période estivale afin de constater l'impact de l'activité récréative sur l'environnement en général et sur la moule en particulier.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

APFELBAUM M., ROMON N., DUBUS M. 2004. Diététique et nutrition. 535p.

BONNET R., SAMPAIO J.L.M., LABIA R., DE CHAMPS C., SIROT D., CHANAL C., SIROT J., 2000. ANOvel CTX-M β -lactamases (CTX-M-8) in cefotaxime resistant Enterobacteriaceae isolated in Brasil. *Antimicrob. Agent. Chemother.*44 (7) : 1936-1942

BRYSKIER A., 1999. Antibiotique agent antibactérien et antifongique.1216p.

CARNEIRO L.A.M., LINS M.C., GARCIA F.R.A., SILVA A.P.S., MAULLER P.M., CASFM., 2008. Communiqué de comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. <http://www.sfm.asso.fr>

CEAEQ., 2000. Recherche et dénombrement des coliformes fécaux ; méthode par filtration sur membrane. Centre d'expertise en analyse environnementale, Gouvernement du Quebec, 24p.

CHEBAB., 1996. Influence sur la reproduction de l'émersion permanente de *Mytilus galloprovincialis*. Thèse de Magister, ISMAL. 150p.

CHEVALIER P., 2003. Coliformes totaux. *Fiches synthèse sur l'eau potable et la santé humaine*, Institut national de santé publique du Québec, 4p.

CHINA B., DE SCHAETZEN M A., DAUBE G. 2003. Les mollusques bivalves, des aliments dangereux ?. *Annales médecine vétérinaire.* 147 : p. 413-422

COLMEN K., ATHALYE M., CLANCEY A., DAVISON M., PAYNE D.J., PERRY C.R., CHOPRA L. 1994. Bacterial resistance mechanisms as therapeutic targets. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 33. p. 1094-1116

COURVALIN P., GOLDSTEIN F.,PHILIPPON A., SIROT J., 1985. L'antibiogramme.

DELARRAS C., 2003. Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux. 269p

GOSLING E., 2003. Bivalve Mollusc: Biology, Ecology and Culture. 433p

GUILLAUD J.F., ROMANA A., 1996. La mer et les rejets urbains. 243p.

HULSE J.H. 1995. Science, agriculture et sécurité alimentaire. 263p

IFREMER, 2008. www.ifremer.fr.

JARLIER V., 1997.Mécanismes de résistance aux antibiotiques.*Médecine thérapeutique*, Hors série n°1 :46-58.

JARLIER V., NICOLAS M., FOURNIER G., PHILIPPON A. 1988. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae : hospital prevalence and susceptibility patterns. *Infection Des.*4(10):143-149

JORADP, 1997. Journal Officiel de la République Algérienne et Populaire.

KIM A., PARK Y., KIM S.I., KANG M.W., LEE S.O., LEE.K.Y., 2004. Nosocomial outbreak by *Proteus mirabilis* producing extended-spectrum β -lactamase VEB-1 in a Korean university hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.54(6). p. 1144-1147.

KUMMEMER K. 2004. Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.54. p. 311-320

LATEEF A., OLOKE J.F., GUEGUIN KANA E B. 2005. The prevalence of bacterial resistance in clinical food, water and some environmental samples in southwest Nigeria. *Environmental Monitoring and assessment* 100. p. 59-69.

LE SAUX J.C., POMMEPUY. 2003. La purification des coquillages. *Risques sanitaire liées aux coquillages*.

LEVINE M. M., EDELMAN R., 1984. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated infant diarrhoea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol. Rev.*6. p. 31-51.

LEVY S.B., MILLER R.V., 1989. Horizontal gene transfer in relation to environmental release of genetically engineered microorganisms. Gene transfer in the environment. McGraw-Hill Publishing Company, New York. p. 405-420.

MARTEIL L., 1976. La conchyliculture française : Biologie de l'huître et de la moule. 319p.

MESSAI Y., BENHASINE T., NAIM M., PAUL G., BAKOUR R., HIABADENE, 2006. Prevalence of beta-actamases Resistance among *Escherichia coli* clinical isolates hom a hospital in Algeria. *Espagnol Quimioterapia*. 19(2). p. 144-151.

MEZRIOUI N., BALEUX B., 1992. Effet de la température, du pH, et du rayonnement solaire sur la survie de différentes bactéries d'intérêt sanitaire dans une eau usée épurée par lagunage. *Revue des sciences de l'eau*.5 (1992). p. 573-591.

MONFORT P., 2003. Microbiologie et coquillages. Laboratoire Environnement Ressources-Concarneau IFERMER. 18p.

PATHAK S.P., GOPAL K., 2005. Occurrence of antibiotic and metal resistance in bacteria from organs of river fish. *Environmental Research*. 98. p. 100-103.

PERRETEN V., SCHWARZ F., CRESTA L., BOEGLIN M., DASEN G., TOUBER M., 1997. Antibiotic resistance spread in food. *Nature*. 389: 801-802.

PLUSQUELLEC A., BEUCHER M., LE GAL., 1984. Deuxième colloque International de bactériologie marine –IFERMER,actes de Colloques n°3. p. 541-548.

RIVA A., MASSE H. 1993. Etude écophysiological de quelques mollusques bivalves. Bases biologiques de l'aquaculture. IFERMER. Acte de colloques n° 1. p. 45-62.

RODIER J., BROUTIN J.P., CHAMBON P., CHAMPSAUR H., RODI L., 2005. L'analyse de l'eau. 8^{ème} Edition, Dunod, Paris. 1383p.

STABLO C., 1998. Conséquence sur la santé de la consommation des coquillages de pêche à pied dans le bassin d'ARCACHON en période estivale. Bull.Soc.Pharm.Bordeaux. 137. p. 91-107.

TEUBER M., 1999. Spread of antibiotic resistance with food- borne pathogens. *Cell. Mol. Life Sci.* 56. p. 755-763.

TOUATI A., BENALLAOUA S., FORTE. 2006. first report of CTX-M-15 and CTX-M-3 β -lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Béjaia, Algeria *Antimicrobial Agent.* p. 1-6.

VEDEL., 1994. La lecture interprétative facteur de maîtrise de l'antibiogramme. *Spectra Biologie.* 16. p. 8-31.

Annexe

Annexe

Tableau 1 : Résultats des analyses physico-chimiques.

Date de prélèvement	Météorologie	Station	Température (T°C)	pH	S (PSU)
14/04/2008	Mer calme Temps dégagé Vent NO	Ouest	16.7	8.28	36.5
		Centre	16.7	8.23	36.6
		Est	16.7	8.17	36.6
13/05/2008	Mer un peu agitée Temps nuageux Vent O	Ouest	17.6	8.46	37.0
		Centre	17.6	8.48	36.9
		Est	17.5	8.50	36.9
07/6/2008	Mer calme Temps dégagé Vent NO	Ouest	20.5	8.23	36.8
		Centre	20.6	8.22	36.7
		Est	20.6	8.22	36.8

Tableau 2 : Résultats de l'antibiogramme

ATB	TIC	MEC	MZ	CFS	CF	AMC	CXM	CTX	CAZ	ATM	CPO	FEP	FOX	TCC	K	TM	GM	AN	C	RA	SSS	OFX	NA	TE	SXT	TMP
	22-18	22-18	21-16	22-17	18-12	21-14	22-15	21-15	21-15	23-17	15-21	15-21	21-15	16-14	17-15	16-14	16-14	17-15	23-19	19-14	17-12	22-25	20-15	19-17	16-10	16-10
M1	9 R	19 I	12 R	0 R	0 R	10 R	0 R	11 R	0 R	13 R	21 I	25 S	0 R	NF	23 S	24 S	25 S	23 S	28 S	0 R	28 S	30 S	21 S	21 S	27 S	0 R
M2	9 R	17 R	12 R	0 R	0 R	10 R	0 R	10 R	0 R	14 R	23 S	25 S	0 R	11 R	24 S	25 S	26 S	24 S	27 S	0 R	0 R	34 S	22 S	20 S	14 S	28 S
M5	11 R	20 I	13 R	0 R	0 R	9 R	0 R	10 R	0 R	18 I	28 S	29 S	0 R	11 R	25 S	27 S	30 S	28 S	30 S	0 R	0 R	10 R	23 S	20 S	20 S	24 S
M10	10 R	17 R	14 R	0 R	0 R	10 R	0 R	0 R	0 R	11 R	27 S	28 S	0 R	11 R	27 S	27 S	28 S	27 S	25 S	0 R	23 S	35 S	25 S	20 S	27 S	24 S
M11	0 R	12 R	12 R	0 R	0 R	9 R	0 R	7 R	0 R	0 R	25 S	30 S	0 R	11 R	28 S	29 S	28 S	28 S	26 S	0 R	25 S	37 S	27 S	18 I	25 S	25 S
M12	0 R	14 R	15 I	0 R	0 R	9 R	0 R	12 R	0 R	10 R	29 S	31 S	0 R	12 R	26 S	28 S	29 S	27 S	26 S	7 R	30 S	36 S	22 S	18 I	24 S	20 S
M13	0 R	12 R	15 I	0 R	0 R	10 R	0 R	0 R	0 R	11 R	27 S	28 S	0 R	11 R	27 S	27 S	28 S	27 S	25 S	0 R	23 S	35 S	25 S	20 S	27 S	24 S
M1a	12 R	17 R	14 R	0 R	0 R	10 R	0 R	12 R	0 R	16 R	24 S	29 S	0 R	11 R	25 S	24 S	25 S	23 S	25 S	0 R	21 S	34 S	28 S	20 S	26 S	28 S
M2a	12 R	11 R	14 R	0 R	0 R	8 R	0 R	14 R	0 R	16 R	25 S	27 S	0 R	12 R	24 S	24 S	25 S	22 S	25 S	0 R	23 S	34 S	22 S	20 S	28 S	26 S
M3a	11 R	17 R	9 R	0 R	0 R	9 R	15 I	14 R	0 R	15 R	28 S	30 S	0 R	11 R	24 S	25 S	25 S	24 S	25 S	12 R	24 S	33 S	25 S	20 S	26 S	30 S
M4a	10 R	17 R	8 R	0 R	0 R	9 R	15 I	14 R	0 R	16 R	28 S	29 S	0 R	12 R	24 S	25 S	27 S	25 S	25 S	12 R	24 S	35 S	25 S	21 S	32 S	29 S
M6a	12 R	17 R	8 R	0 R	0 R	9 R	15 I	14 R	0 R	15 R	25 S	28 S	0 R	11 R	24 S	25 S	26 S	24 S	25 S	12 R	24 S	35 S	35 S	20 S	30 S	26 S