

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



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

**OPTION: AQUACULTURE**

**Sujet**

*Evaluation et caractérisation de la résistance aux  
antibiotiques chez des coliformes isolés à partir de la  
moule (*Mytilus galloprovincialis*)*

**Présenté par:**

- ALIOUI IKRAM NADJAH
- ZEBILA IMANE

**Soutenu le 04/07/2013 devant le jury suivant :**

<b>Mr. LOURGUIOUI H.</b>	<b>Maître assistant A (ENSSMAL)</b>	<b>Président</b>
<b>Mlle. ALOUACHE S.</b>	<b>Maître de conférences B (ENSSMAL)</b>	<b>Promotrice</b>
<b>Mme AMAR I.</b>	<b>Maître assistante A (ENSSMAL)</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>Mme BOUFROUCHE F.</b>	<b>Maître assistante A (USTHB)</b>	<b>Examinatrice</b>

**Promotion 2013**

## *Dédicaces*

*On dédie ce travail,*

*A mon cher et regretté papa ZEBILA HACHANI qui est partie  
à jamais, tu as laissé un grand vide derrière toi tu nous manques  
tellement*

*Repose en paix*

*Je t'aime papa*

*À nos très, très chères mamans Radia et Yamina, source  
d'amour et d'affection qui grâce à leur réconfort nous font  
supporter le froid de la vie.*

*A nos grands parents Mouloud Nouar et Mohamed Nouar  
Kharhachi qui sont à dieu*

*A mes frères Ala El-Dinne, Hamza, Mohamed El-Nadhir  
et Laid... Et nos sœurs El-Alia, Samira, Sana et Somaia,*

*A nos oncles Amar, Aboubakr, et Madjid saari*

*A tous nos amis Mokhtar, Sbrina, Chafia, Aicha, Sara et  
Fatima.*

## Remerciements

*On remercie Allah Le tout puissant qui nous a donné la santé, le courage et la patience nécessaire pour achever ce travail dans les meilleures conditions.*

*Tout d'abords nous tenons en premier lieu à remercier Madame Alouache.S maître de conférences B à l'ENSSMAL et membre du laboratoire de génétique (USTHB), pour avoir accepté de nous encadrer, pour sa disponibilité et son aide, son savoir faire sa patience et surtout sa gentillesse et sa simplicité.*

*Ce travail a été réalisé en collaboration entre l'Enssmal et le laboratoire de biologie cellulaire et Moléculaire de la faculté des Sciences biologiques de l'USTHB (Equipe de génétique). Il n'aurait pu être effectué sans l'accord, le soutien et l'aide de plusieurs personnes auxquelles on tient à exprimer ici notre gratitude et notre reconnaissance.*

*Nos remerciements vont également à :*

*Mr Louguioui H. maître assistant de classe A à l'ENSSMAL d'avoir accepté de présider le jury.*

*Mme Boufrouche F. maître assistante de classe A à l'USTHB et Mme Amar.I maître assistante de classe A à l'ENSSMAL d'avoir bien voulu examiner et corriger ce travail.*

*Nos remerciements s'adressent également aux Ingénieurs de l'ENSSMAL particulièrement Mme Refes N. et Mr Matouk Y.*

*Notre gratitude et reconnaissance s'expriment à toutes les personnes ayant contribué, chacune à sa manière, pour le bon déroulement de notre formation, ainsi qu'à la réalisation de ce modeste travail.*

# Sommaire

Introduction .....	1
--------------------	---

## Chapitre I : Généralités

I.1 Historique de la conchyliculture en Algérie .....	2
I.2. Généralités sur la moule .....	3
I.2.1. Présntation et systématique de la moule <i>Mytillus galloprovincialis</i> .....	3
I.2.2. Morphologie de la moule .....	4
I.2.3. Anatomie interne de la moule .....	5
I.2.4. Les principaux systèmes de la moule .....	6
I.2.5 Cycle de reproduction . .....	7
I.2.6 Régime alimentaire. ....	7
I.2.7 Valeur nutritive .....	8
I.2.8 Les risques sanitaires liés à la consommation des coquillages.....	9
I.2.8.1 Devenir des bactéries dans l'eau de mer.....	9
I.2.8.1.1 Facteurs influençant la teneur microbiennes globale .....	10
I.2.8.1.2 Les bactéries pathogènes .....	10
I.2.8.1.2.1 <i>Salmonella</i> .....	11
I.2.8.1.2.2 <i>Clostridium perfringens</i> .....	11
I.2.8.1.2.3 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	11
I.2.8.1.3. Les indicateurs de contamination fécale ..	11
I.2.8.1.3.1 Les coliformes .....	11
I.2.8.1.3.2 Les coliformes totaux .....	11
I.2.8.1.3.3 Les coliformes fécaux. ....	12
I.2.8.1.3.4 <i>Escherichia coli</i> . ....	12
I.2.8.1.3.5 <i>Enterococcus</i> ..	12
I.2.8.1.4 Contexte reglementaire régissant la production des coquillages.....	13
I.3 La resistance aux antibiotiques en millieu aquatique .....	14
I.3.1 Origine de la résistance aux antibiotiques en milieu aquacole. ....	14
I.3.2 Résistance bactériennes aux antibiotiques .....	15
I.3.2.1 Définition d'un antibiotique .....	15
I.3.2.2 Classification et mode d'action .....	15
I.3.2.3 Les béta-lactamines. ....	16
I.3.2.3.1 Structure et classification .....	16
I.3.2.3.2 Mécanismes d'action des béta-lactamines.....	18

I.3.2.4 Résistance aux antibiotiques .....	19
I.3.2.4.1 Mécanisme de résistance aux bêta-lactamines .....	19
I.3.2.4.2 Les bêta-lactamases .....	20
I.2.3.4.2.1 La classification des bêta-lactamases .....	20
I.2.3.4.2.2 Bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) .....	21

## Chapitre II: Matériel et méthodes

I. Matériel et méthodes.....	22
I.1 Matériel biologique .....	22
I.1.1.Présentation du site .....	22
II.Méthodes .....	23
II.1.Identification biochimiques bactériennes par galerie API 20.....	23
II.2.Diffusion en milieu gélosé: antibiogramme .....	23
II.3.Détection de bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE):Test de synergie .....	25
II.4.Détection de céphalosporinases inductibles: test d'antagonisme. ....	26
II.5.Recherche de gènes BLSE par PCR (Polymerase Chain Reaction).....	26
II.6. Electrophorèse sur gel d'agarose .....	27
II.7. Transfert génétique par conjugaison bactérienne .....	27

## Chapitre III : Résultats et Discussion

III.Résultats et discussion .....	29
III.1.Identification des souches résistantes .....	29
III.2.Sensibilité aux antibiotiques des souches étudiées. ....	29
III.3.Production de bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) .....	34
III.4.Production de céphalosporinases inductibles .....	34
III.5.Transfert génétique par conjugaison bactérienne .....	35
III.6.Caractérisation des gènes de bêta-lactamases. ....	37
Conclusion.....	40
Références bibliographiques.....	41

## La liste des figures :

<b>Figure 1:</b> <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	4
<b>Figure 2 :</b> Schéma représentant la face interne de la moule, valve gauche.....	5
<b>Figure 3 :</b> Anatomie interne de la moule .....	6
<b>Figure 4 :</b> Les différentes sources de contamination des milieux aquatiques par les substances pharmaceutiques.....	15
<b>Figure 5 :</b> Structure des pénicillines (1) et des céphalosporines (2).....	17
<b>Figure 6:</b> Structure chimique de certaines molécules de bêta-lactamines.....	18
<b>Figure 7 :</b> Schéma de la disposition des antibiotiques.....	24
<b>Figure 8:</b> Répartition des 30 coliformes isolés à partir de la moule « <i>Mytilus galloprovincialis</i> » sauvages et d'élevages.....	29
<b>Figure 9 :</b> Taux de résistance aux antibiotiques des 30 coliformes isolés à partir de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> d'élevage et sauvage.....	30
<b>Figure 10 :</b> Comparaison de la résistance aux antibiotiques bêta-lactamines chez les souches isolées à partir de la moule sauvage (n=15) et à partir de la moule d'élevage (n=15).....	32
<b>Figure 11 :</b> Comparaison de la résistance aux antibiotiques non bêta-lactamines chez les souches isolées à partir de la moule sauvage (n=15) et à partir de la moule d'élevage (n=15).....	32
<b>Figure 12 :</b> Illustration d'une image de synergie chez <i>Klebsiella pneumoniae</i> (E5).....	34
<b>Figure 13 :</b> Illustration d'une image d'antagonisme chez <i>Enterobacter cloacae</i> (E9).....	35
<b>Figure 14 :</b> Illustration d'un transfert positif par conjugaison bactérienne de la souche <i>E.coli</i> (S13).....	36
<b>Figure 15 :</b> Illustration d'un transfert du phénotype BLSE de la souche de <i>K.pneumoniae</i> vers la <i>E.coli</i> K12.....	36
<b>Figure 16 :</b> Illustration de la détection du gène <i>bla</i> <sub>TEM</sub> .....	38
<b>Figure 17 :</b> Illustration de la détection du gène <i>bla</i> <sub>SHV</sub> .....	38
<b>Figure 18 :</b> Illustration de la détection du gène <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> chez la souche <i>K.pneumoniae</i> (E5) et ses transconjugants (TC1, TC2).....	38



## La liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Production des moules en tonnes dans le lac d'El Mellah (El Kala).....	2
<b>Tableau 2 :</b> Objectifs de productions tracées par les fermes conchylicoles en Algérie.....	3
<b>Tableau 3 :</b> Systématique de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	3
<b>Tableau 4 :</b> Taux de filtration de certains mollusques bivalves.....	8
<b>Tableau 5 :</b> La valeur nutritive d'environ 100 g de moule.....	8
<b>Tableau 6 :</b> Critères microbiologiques des zones de production conchylicole.....	13
<b>Tableau 7 :</b> Les caractéristiques bactériologiques des moules récoltées.....	22
<b>Tableau 8 :</b> Les différents antibiotiques en disque utilisés pour l'antibiogramme.....	25
<b>Tableau 9 :</b> Les séquences des amorces des gènes recherchés par PCR.....	27
<b>Tableau 10 :</b> Profils d'antibio-résistance des 30 coliformes isolés à partir de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	33
<b>Tableau 11 :</b> Antibiotypes des souches aux transferts positifs et de leurs transconjugants .....	37
<b>Tableau 12 :</b> Tableau récapitulatif des souches avec résistance, gènes présents, gènes transférés, et résistance transférée.....	39

# **Introduction**

### Introduction

La résistance bactérienne aux antibiotiques a augmenté dans des proportions inquiétantes ces dernières années, elle est devenue un problème majeur 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. Leur consommation crue peut engendrer des problèmes d'intoxications sévères surtout si le germe incriminé présente des résistances aux antibiotiques. Les coliformes et particulièrement *E.coli* sont les principaux indicateurs de la salubrité des moules. De plus, ils sont considérés comme un réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques qui peuvent atteindre *via* les échanges génétiques, des germes pathogènes comme *Salmonella*. Ces derniers peuvent atteindre l'homme à travers la chaîne alimentaire.

Les antibiotiques et les bactéries résistantes retrouvées dans l'environnement marin proviennent majoritairement des activités anthropiques *via* les eaux usées traitées, les rejets non traités qui proviennent de l'agriculture et des élevages où nous trouvons l'aquaculture comme une activité qui est directement responsable de l'introduction des antibiotiques et des bactéries résistantes dans le milieu marin. En effet, comme dans les autres secteurs de la production animale, des antibiotiques sont utilisés en aquaculture, tant pendant la production (facteurs de croissance) qu'au stade de la transformation, tant pour prévenir que pour traiter les maladies. Les antibiotiques ont aussi été recommandés et utilisés comme désinfectants dans la manutention du poisson mais cette pratique s'est révélée peu efficace et n'est généralement pas approuvée par les services d'inspection. Les antibiotiques n'ont pas toujours été utilisés à bon escient en aquaculture, et cela n'est pas sans risque sur la santé du consommateur.

Devant cette absence de barrière entre les différents compartiments (eau, animal, homme), il est important de connaître l'état de la résistance dans l'environnement et les facteurs qui jouent dans son maintien et sa dissémination.

Dans cette étude nous nous sommes intéressées à l'évaluation de la résistance aux antibiotiques chez des coliformes isolés à partir de la moule « *Mytilus galloprovincialis* » récoltée à partir d'un site d'élevage et d'un site sauvage.

Pour ce faire nous avons adopté le plan suivant :

- Identification des bactéries.
- Etude de la sensibilité aux antibiotiques.
- Détection de la production de bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE)
- Détection de la production de céphalosporinases inductibles
- Transfert bactérien par conjugaison
- Caractérisation génétique de la résistance aux bêta-lactamines

# Chapitre I

## Généralités

## Généralités :

### I.1. Historique de la conchyliculture en Algérie (Boutouchent et Milla, 2005)

- L'aquaculture est de pratique ancienne en Algérie; elle a démarré en 1880 par des essais d'ostréicultures menées à Mars El-Kabir (w. Oran) et l'oued Sebao (w. Tizi Ouzou).
- En 1921, une station expérimentale pour l'aquaculture et la pêche est construite à Bou Ismail afin de déterminer les meilleures techniques et les meilleurs sites pour l'élevage de moules et des huîtres.
- Dans les années 70, un programme de collaboration avec la FAO (dans le cadre de la réintroduction des moules et des huîtres, ainsi que l'implantation de tables conchylicoles) a été réalisé au lac El Mellah (El-Kala). Des résultats encourageants ont été obtenus jusqu'à la fin des années 80. À partir de 1991, trois professionnels algériens se sont lancés dans la mytiliculture en mer ouverte ; deux se sont installés à Ain Taya (w. Alger) et un autre à Ain Tagourait (W. Tipaza).
- En 2004, le Ministère de la Pêche et des Ressources Halieutiques et à travers le CNRDPA, projette de réaliser un centre pilote de conchyliculture pour subvenir aux attentes de nombreux professionnels qui souhaiteraient se lancer dans ce domaine d'activité, très promoteur et rentable.

En plus de nos 1200 km de côtes, le littoral algérien bénéficie de l'influence du courant atlantique concentré en pigments chlorophylliens et en phytoplancton, de la nourriture variée, pour les coquillages filtreurs. Par ailleurs, la conchyliculture représente aussi une solution pour protéger nos ressources marines. Face aux pressions constatées, exercées par l'homme sur le littoral et aux dégradations de l'environnement marin, la conchyliculture littorale constitue un des outils de gestion intégrée de la bande côtière et des ressources littorales les plus performantes (Ministère de la pêche et des ressources halieutiques, 2007). Le MPRH (Ministère de la Pêche et des Ressources Halieutiques) Algérien a donné en 2007, des prévisions pour la production conchylicole, cependant jusqu'à l'heure actuelle, ces objectifs n'ont jamais été atteints.

### I.2. Généralités sur la moule (*Mytilus galloprovincialis*)

#### I.2.1 Présentation et systématique de la moule *Mytilus galloprovincialis*

*Mytilus galloprovincialis* est un mollusque appartenant à la classe des Bivalves (Tableau 3). Les moules font partie de la famille des mytilidés caractérisées par des valves égales, un ligament presque toujours externe, une charnière sans dents (ou avec des dents très réduites), des branchies à filaments séparés, deux muscles adducteurs (l'antérieur est rarement absent), un pied allongé et un byssus. Le genre *Mytilus* extrêmement répandu dans le monde renferme plusieurs espèces dont *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819).

**Tableau 3 :** Systématique de la moule *Mytilus galloprovincialis* (source : www.zipcodezoo.com)

Embranchement	Mollusques
Classe	Lamellibranches
Ordre	Fillibranches
Sous Ordre	Anisomyaria
Super famille	Mytiloidea
Famille	Mylinindae
Sous famille	Mytilinae
Genre	Mytilus
Espèce	<i>Mytilus galloprovincialis</i>

(Lamarck, 1819).

Les caractères systématiques de l'espèce ont été décrits par Pallary (1921) in Djediat, 1993) :

- La forme générale est en fer de hache très caractéristique,
- La coloration de l'intérieur des valves est d'un bleu ardoisé très foncé, presque noir vers le bord postérieur et presque blanc sous les crochets,
- La charnière se compose de trois dents conico-manchonnées apparentes sur chaque valve. Elle est de type dysodonte. Il y a disparition des dents cardinales du type hétérodonte,
- La musculature comporte deux muscles adducteurs d'inégale importance. L'impression musculaire postérieure forme un 6 (Figure1), spécifique de l'espèce, l'autre est résiduel: *Mytilus galloprovincialis* est un dimyaire hétéromyaire.

### 1.2.2 Morphologie de la moule

#### • Aspect extérieur

La coquille plus ou moins renflée, possède une extrémité pointue et l'autre arrondie. Elle comprend deux valves unies par un ligament. La couleur, généralement bleu noir, peut toute fois être brune, voir jaune (Figure 1). On peut observer de fines stries concentriques qui sont des stries d'accroissement représentant les étapes de la croissance de l'animal (Figure 2) (Marteil, 1976).

La taille commune de la moule varie entre 5 et 8 cm ; avec un maximum de 15 cm (Boudjama et Ourari, 2005).

#### • Aspect intérieur : coulisse

La coloration de l'intérieur de la valve est bleu ardoisé très foncé ; presque noir vers les Bords postérieurs, et presque blanc sous les crochets (Figure 1) (Djediat, 1993).

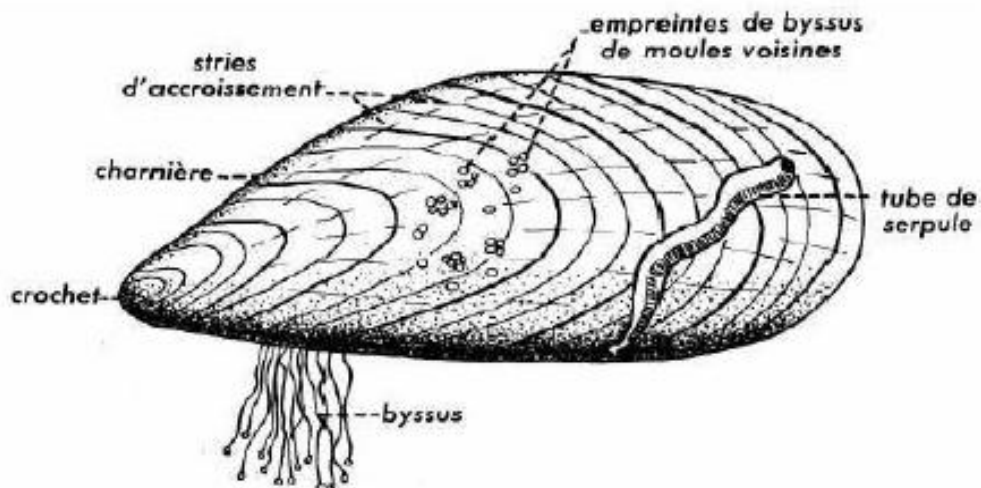


(A)

(B)

**Figure 1** : *Mytilus galloprovincialis*.

**A** : vue extérieur des coquilles, **B** : vue intérieur des coquilles,  
**C** : empreinte musculaire en forme de 6.



**Figure 2** : Schéma représentant la face interne de la moule, valve gauche (Villeneuve, 1965)

### I.2.3. Anatomie interne de la moule

L'intérieure de la moule est constituée de plusieurs organes (Figure 3) nous distinguons :

✓ **Charnière et ligament**

La charnière est réduite et l'union des valves est assurée à peu près exclusivement par le ligament. Ce dernier est essentiellement formé de conchyoline (substance apparentée à la chitine) (Marteil, 1976).

✓ **Le corps**

Le corps est constitué du :

- **Manteau**

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

- **Muscles adducteurs**

Deux muscles adducteurs dont l'un, l'antérieur, est réduit s'opposent à l'action mécanique du ligament : par leur contraction ils ferment la coquille (Marteil, 1976).

- **Pied**

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

- **Branchies**

Deux branchies qui sont reliées à la masse viscérale par l'intermédiaire de l'axe branchial, chacune est constituée par deux rangées de filaments aplatis.

Leur rôle principal est de retenir les particules en suspension dans l'alimentation, ce sont aussi les organes de la respiration, car c'est à leur niveau que la majeure partie du sang s'oxygène ; de plus qu'elles créent le courant d'eau sans lequel le mollusque ne peut vivre (Marteil, 1976)

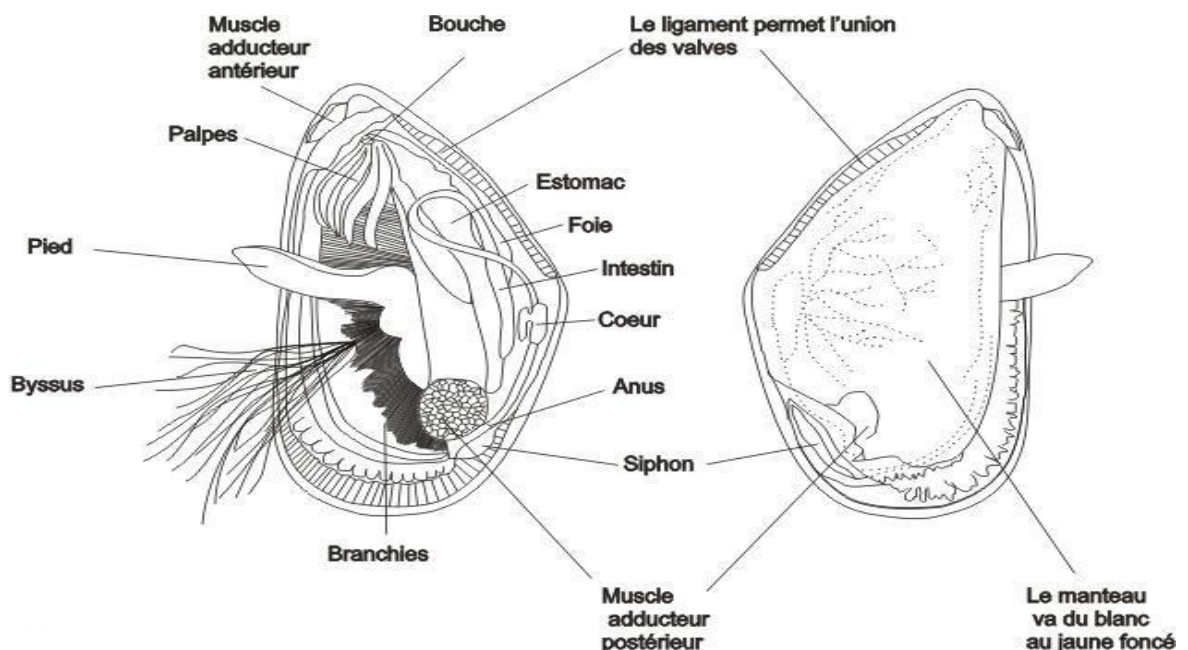


Figure 3 : anatomie interne de la moule (Marteil, 1976).

## I.2.4. Les principaux systèmes 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 (membrane séreuse, formé de deux feuillets, qui enveloppe le cœur).

### ✓ 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.

### ✓ 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).

## I.2.5. Cycle de reproduction

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 ne 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.2.6. Régime alimentaire

Comme tous les filtreurs, la moule vit, pour l'essentiel, aux dépens des particules en suspension dans l'eau (Dardignac-Corbeil, 1989).

Elle se nourrit de petits éléments (phytoplancton, zooplancton, bactérie, fragment d'algues, des détritits, vase...etc), qu'elles tamisent avec leurs branchies.

La qualité des aliments en suspension joue un rôle important. Si l'eau contient une grande proportion d'éléments sans valeur nutritive (grain de sable ou des particules de vase), la moule est obligée de filtrer des quantités très importantes pour récupérer les particules nutritives dont elle a besoin ; elle peut avoir bien du mal à assurer sa ratio journalière. Sa croissance est alors ralentie, voire stoppée (MPRH, 2001).

La moule peut filtrer l'eau pendant 18.5 à 24 heures par jour sans interruption avec une vitesse moyenne de 20 l/h (Tableau 4). Cependant, la durée et le temps de filtration varient en fonction des différents paramètres de température, de salinité et d'oxygène (Marteil, 1976).

**Tableau 4** : Taux de filtration de certains mollusques bivalves (Deslous-Paoli et al. in Guillaud et Romana, 1996).

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

### I.2.7.Valeur nutritive

Les moules constituent pour l'homme, une source de nourriture ; en raison de leur teneur en nutriments importants : Phosphore, Fer, Zinc, Sélénium, Vitamine B1 (thiamine), Vitamine B2 (riboflavine) et Vitamine B12 (Une portion de 100 g de moules comble dix fois les besoins quotidiens en Vitamine B12) ainsi qu'en éléments moins importants : Cuivre, Vitamines B3 (niacine), Acide folique, Manganèse, Iode et Acide pantothénique (Vitamine B5) (Saoudi, 2009).

Elles présentent aussi des teneurs intéressantes en protéines, glucides et lipides (Tableau 5).

**Tableau 5** : La valeur nutritive d'environ 100 g de moule (Anonyme 1, 2005).

Poids / Volume	Moules bleues, bouillies ou vapeur, 100g (environ 12 moules moyennes)
Calories	172
Protéines	23.8g
Glucides	7.4 g
Lipides	4.5 g
Fibres alimentaires	0.0 g

### I.2.8. Les risques sanitaires liés à 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, 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).

Les germes de contamination se concentrent non seulement dans le liquide intervalvaire, mais aussi dans les différents segments du corps, à savoir l'hépatopancréas, les branchies, les muscles adducteurs des valves et le manteau (Brisou et *al.*, 1962).

L'ingestion des coquillages insalubres peut représenter un danger pour la santé de l'homme. Ces accidents d'origine bactérienne ou virale résultent soit par la contamination directe des coquillages dues aux eaux polluées dans lesquelles ils vivent, soit lors du transport, de la manutention ou de la préparation du fruit de mer en vue de la consommation, ils peuvent provoquer des diarrhées et des hépatites, ce sont d'ailleurs les manifestations les plus fréquentes des toxi-infections alimentaires. Le premier cas d'intoxication a été signalé en 1793 en Colombie anglaise, où plusieurs membres d'un équipage ayant consommés des moules recueillies dans un port, furent pris quelques heures après des troubles, entraînant la mort de certains d'entre eux (Cerbom, 1964).

En 1990, plus de deux cents cas ont été enregistrés en France à la suite de la consommation de moules importées du Danemark (Vivares, 1991). De plus dans la même année, les produits de la mer ont été incriminés dans 29 des 225 cas de toxi-infections alimentaires collectives pour lesquels l'aliment en cause avait pu être retrouvé (Pignault et *al.*, 1991 in Poggi et Le Gall, 1995).

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.

### **I.2.8.1. Devenir des bactéries dans l'eau de mer**

Le milieu marin fait l'objet d'importantes contaminations dues aux rejets des eaux usées, les réseaux d'égouts, les déchets des hôpitaux et des usines sans traitement au préalable. L'un des risques le plus important est dû aux bactéries pathogènes (Poggi, 1991).

Le mouvement de l'eau provoqué par les vagues et les courants de surface permet la dilution, la diffusion des rejets chargés en bactéries. Ces dernières survivront plus longtemps lorsqu'elles sont piégées dans les sédiments. Ces micro-organismes évoluent vers un état de dormance et de survie, mais leur pouvoir pathogène est conservé (Colwell, 1987).

#### **I.2.8.1.1. Facteurs influençant la teneur microbienne globale**

##### **✓ Facteurs physiques**

- La marée, tout au moins sur les côtes qui la subissent, est un élément important qui intervient pour entraîner les contaminants vers le large. De même pour la mer agitée qui permet la remise en suspension des microorganismes.
- L'éclairement participe, grâce aux radiations ultraviolettes, aux phénomènes d'épuration mais seulement dans la couche d'eau superficielle.
- Quant à la température, son influence est difficile à mettre en évidence en milieu ouvert. Il en est autrement en milieu confiné. (Maurin, 1974).

##### **✓ Facteurs chimiques**

L'action de l'oxygène dissous dans le processus d'épuration est connue. Les séries d'analyses sur le littoral atlantique ont montré, au point de rejet des effluents, une teneur faible ou nulle en oxygène, qui augmente au fur et à mesure qu'on s'en éloigne, tandis que la microflore entérique diminue. Il est naturellement difficile d'établir une relation de cause à effet dans le cas d'un tel milieu où d'autres phénomènes interviennent simultanément (Mazières, 1963).

##### **✓ L'autoépuration des coquillages**

L'autoépuration des coquillages est un phénomène physiologique qui met en œuvre le processus de « drinking », comme les mollusques ont la propriété de filtrer des grandes quantités d'eau à travers leurs appareils digestifs, il est possible de les placer dans des eaux propres, ou ayant subit déjà une désinfection par des moyens physiques et/ou chimiques et leur permet de s'auto-épurer (plusquellec, 1990).

### **I.2.8.1.2. Les bactéries pathogènes**

Ces germes proviennent le plus souvent des côtes polluées par les égouts, les effluents et d'autres sources de pollution. Ils peuvent également être natifs du milieu marin.

Les bivalves peuvent être des vecteurs de nombreux germes pathogènes dont les plus fréquents peuvent engendrer des infections et des maladies épidémiques ou sporadiques tel que *Vibrio* (*V. Parahaemolyticus*, *V.alginiticus* et *V.vulnificus*) et *Clostridium* représenté principalement par *C.botulinum* et *C.perfringens*. (Hackney et Dicharry, 1988. In china et *al.*, 2003). Cependant, plusieurs d'autres pathogènes comme *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*,...etc, ont également été isolés (Elliot et Kvenberg, 2000 ; Rocourt et *al.*2000 . in China 2003).

#### **I.2.8.1.2.1 *Salmonella***

Les *Salmonelles* 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 toxi-infections (Salmonelloses), notamment des fièvres typhoïdes 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.2.8.1.2.2. *Clostridium perfringens***

Les clostridium sulfitoréducteurs peuvent être considérés comme des germes fécaux, ce sont aussi des germes telluriques. Dans une telle optique d'interprétation il y a intérêt à rechercher les espèces pathogène, en particulier *Clostridium perfringens* qui sont des bâtonnets anaérobies, Gram (+), sporulant et qui réduisent les sulfites en sulfures en 24 à 48 heures (PNUE/OMS, 1977 ; Rodier et *al.*, 1996).

#### **I.2.8.1.2.3. *Staphylococcus aureus***

Les staphylocoques sont des cellules sphériques de 0.5 à 25 µm généralement regroupées en amas, ils sont immobiles et ne forment pas de spores ; ils sont aérobies ou anaérobies facultatifs, Gram (+), catalase (+), fermentent les sucres en produisant de l'acide lactique (Leclerc et *al.*, 1995).

L'espèce pathogène de *Staphylococcus aureus* ou « staphylocoque doré » possède toutes ces caractéristiques, ajoutant à cela qu'elle est coagulase (+), il est à noter que les staphylocoques sont ubiquistes, très largement distribués dans l'environnement. Il est responsable des toxi-infections alimentaires collectives (Leclerc et *al.*, 1995).

### **I.2.8.1.3. Les indicateurs de contamination fécale**

#### **I.2.8.1.3.1. Les coliformes**

Ce groupe est constitué de deux catégories de bactéries : les coliformes totaux et les coliformes fécaux (Rodier et *al.*, 2005).

#### **I.2.8.1.3.2. Les coliformes totaux (CT)**

Les coliformes totaux sont définis par l'organisation internationale de standardisation (ISO), comme étant des bactéries en forme de bâtonnet, non sporogène, à Gram négatifs, oxydase négatif, facultativement anaérobies, capables de croître en présence de sels biliaires ou d'autres agent de surface possédant des activités inhibitrices similaires, et capable de fermenter le lactose et (mannitol) avec production d'acide et d'aldéhyde en 48heures, à des températures de 35-37. Les principaux genres inclus dans le groupe sont *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* (Rodier et al., 2005).

#### **I.2.8.1.3.3. Les coliformes fécaux**

Les coliformes fécaux ou coliformes thermo-tolérants correspondent à un sous-groupe des coliformes qui présentent les mêmes propriétés après incubation à une température de 44° C. La recherche des coliformes fécaux est très importante car un très grand nombre d'entre eux vivent en abondance dans les matières fécales des animaux à sang chaud et de ce fait, constituent de très bons indicateurs de la pollution fécale. Leurs densité est proportionnelle au degré de la pollution.

#### **I.2.8.1.3.4. *Escherichia coli***

Elle appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*, cellules isolées ou par paires, habituellement mobiles (flagelles péritriches), anaérobie facultative avec un métabolisme respiratoire lorsque les conditions sont aérobies, et une fermentation ou une respiration nitrique en anaérobiose. Fermentent le glucose *via* la fermentation acide mixte (Singleton, 2002).

Elle produit de l'indole à partir de tryptophane à 44° C  $\pm$  0,2. *Escherichia 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 a sang chaud (Rodier et al., 2005).

#### **I.2.8.1.3.5. *Enterococcus***

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 *Streptocoques* du 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 *S. bovis*, *S. gallolyticus* et *S. alactolyticus*.

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

Buttiaux (1958) a souligné l'intérêt de l'association « *Escherichia coli*- *Enterococcus faecalis* » dans la recherche des contaminations alimentaires. Ces germes, hôtes habituels

de l'intestin de l'homme et des animaux, constituent un excellent indice de contamination fécale. L'entérocoque a une durée de vie nettement plus longue que les coliformes.

**I.2.8.1.4. Contexte réglementaire régissant la production des coquillages**

Selon les normes en vigueur fixées par l'article 7 de l'arrêté du 3 Safar 1418 correspondant au 8 juin 1997 par le ministère de l'agriculture et de la pêche (Tableau 6), les indicateurs de contamination retenus sont les coliformes fécaux, *Escherichia coli* et *Salmonella*.

Les valeurs représentées dans le tableau 6, représentent les valeurs guides et impératives pour chaque germe.

**Tableau 6:** Critères microbiologiques des zones de production conchylicole (JORADP N°71, Décret N° 01-139,1997)

<b>Classes</b>	<b>Critères microbiologiques</b>	<b>Condition et modalités</b>
<b>Zone A</b> Salubre	90% des valeurs < 300 C.F. Ou < 230 <i>E. coli</i> / 100 g* et jamais > 1000	Les coquillages vivants sont récoltés et consommés directement sans passage par un centre de purification.
<b>Zone B</b> Peu contaminée	90% des valeurs < 6000 C.F. Ou 4600 <i>E. coli</i> /100 g* et jamais > 60000 ou 46000 <i>E.coli</i>	Les coquillages vivants doivent subir un reparcage dans une zone salubre pendant 1 à 2 mois ou bien on les mit dans un centre de purification pendant 24 à 48h.
<b>Zone C</b> Fortement contaminée	90% des valeurs < 60 000 C.F ou 46 000 <i>E. coli</i> / 100g*	Les coquillages vivants sont mis au centre de purification pendant plus de 48h ou bien dans une zone salubre pendant 2 mois.
<b>Zone D</b> Interdite	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.	Les coquillages ne doivent pas être récoltés ni consommés (Exploitation interdite).

\*par 100 g de chair et de liquide intervalvaire.

### I.3. La résistance aux antibiotiques en milieu aquatique

#### I.3.1. Origine de la résistance aux antibiotiques en milieu aquacole

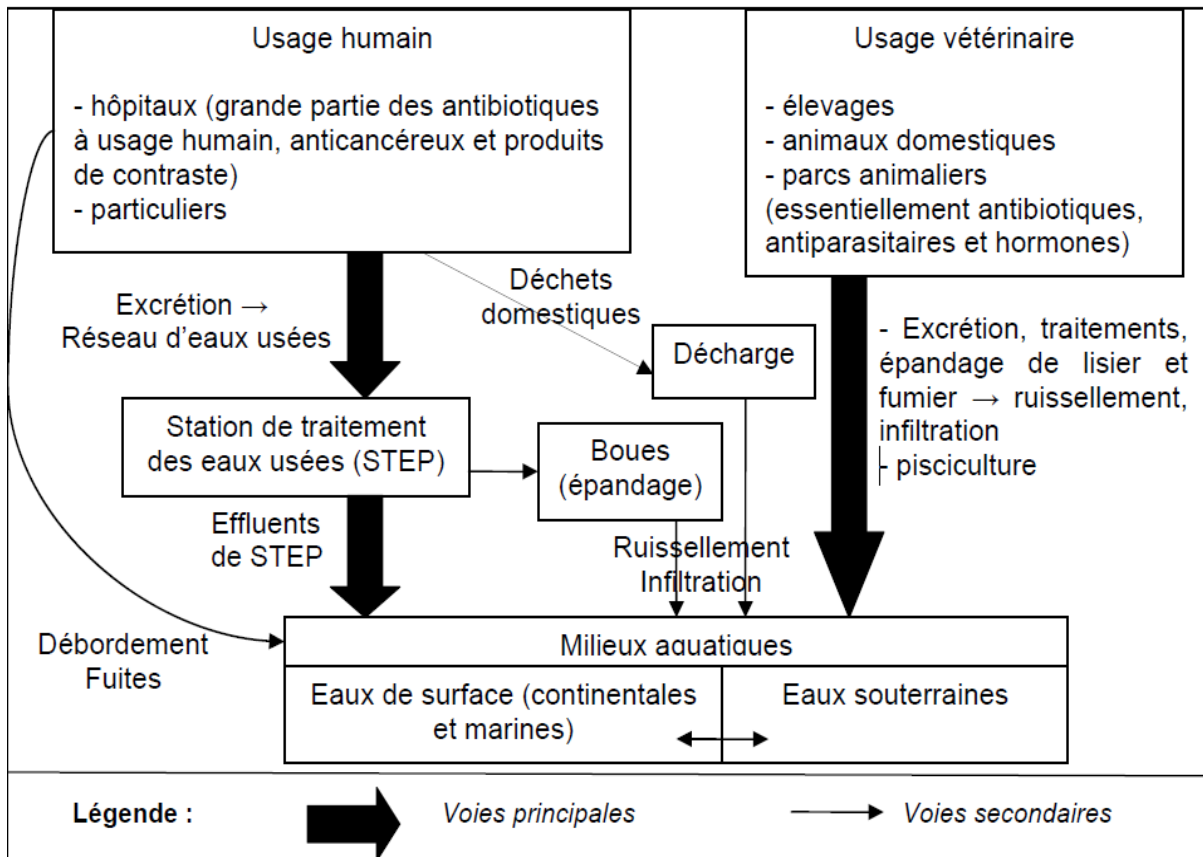
Les antibiotiques sont utilisés en médecine humaine mais également intensivement en médecine vétérinaire et ont aussi été utilisés comme compléments alimentaires dans l'élevage. On rencontre couramment des bactéries résistantes aux antibiotiques dans les milieux où les antibiotiques sont utilisés mais également dans divers environnements comme le milieu aquatique (Witte, 2000 ; Romestaing, 2006).

Les médicaments (substances pharmaceutiques) sont des substances ou des mélanges possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales. Les principes actifs utilisés, les voies d'administrations, les modes d'action et le devenir dans l'environnement et dans les organismes sont très divers.

Certaines de ces molécules seraient suspectées d'exercer des effets sur l'équilibre des écosystèmes ou sur la santé humaine par une exposition prolongée à de faibles concentrations. Parmi les effets préoccupants figurent les troubles du développement et de la reproduction ainsi que l'apparition de résistances bactériennes aux antibiotiques ([www.archimer.ifremer.fr](http://www.archimer.ifremer.fr)).

La voie principale de contamination des milieux aquatiques par les médicaments à usage humain est constituée par les rejets d'eaux usées dans le milieu récepteur. Elles contiennent les molécules qui ont résisté au passage dans l'organisme, les réseaux de collecte et les stations d'épuration (Romestaing, 2006).

La contamination des sols due aux décharges, à l'épandage de boues et à l'utilisation pour l'irrigation d'eau traitée provenant des stations d'épuration (STEP) peut induire une contamination des milieux aquatiques *via* le ruissellement et l'infiltration de l'eau qui transporte les substances pharmaceutiques en solution. Dans l'utilisation en agriculture, les eaux usées et les boues sont dans un premier temps transférées sur les sols, dont la communauté biologique active participe aux processus de biodégradation, avant que les processus de transfert vers les eaux interviennent, alors que l'eau usée rejetée par les systèmes d'assainissement est directement déversée dans le milieu aquatique (Petrovic et Barcelo, 2007).



**Figure 4 :** Les différentes sources de contamination des milieux aquatiques par les substances pharmaceutiques. (Anonyme 2, 2011).

### I.3.2. Résistance bactérienne aux antibiotiques

#### I.3.2.1. Définition d'un antibiotique

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.3.2.2. 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 polymyxines (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 : béta-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 : sulfamides.

### I.3.2.3. Les Béta-lactamines

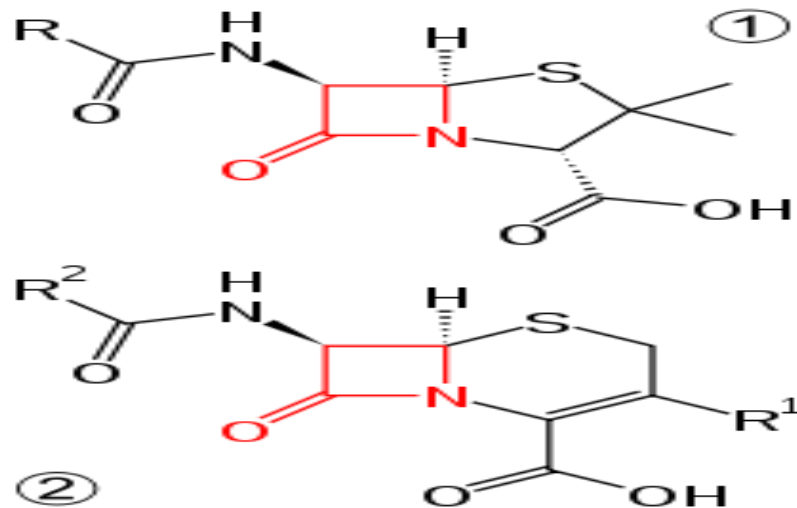
Les béta-lactamines constituent une grande famille d'antibiotiques, la plus importante par le nombre et la diversité des molécules et par ses indications les plus larges que l'on puisse attribuer à une famille d'antibiotiques. Ce sont des molécules d'origine naturelle (ex : pénicilline G) ou synthétique (ex ; céphalosporines), agissant spécifiquement sur une étape essentielle du métabolisme des bactéries soit par inhibition de leurs croissance (pouvoir bactériostatique) ou, en causant directement leur mort (pouvoir bactéricide) (Bryskier,1999).

Toutes ses molécules sont caractérisées par la présence constante du cycle béta-lactame indispensable à l'activité antibiotique, associé ou pas à des cycles et chaînes latérales.

Ces antibiotiques ont une faible toxicité associée à un fort mode d'action sur des protéines membranaires dénommées protéines liant la pénicilline (PLP) (Cavallo et *al.*, 2004).

#### I.3.2.3.1. Structure et Classification

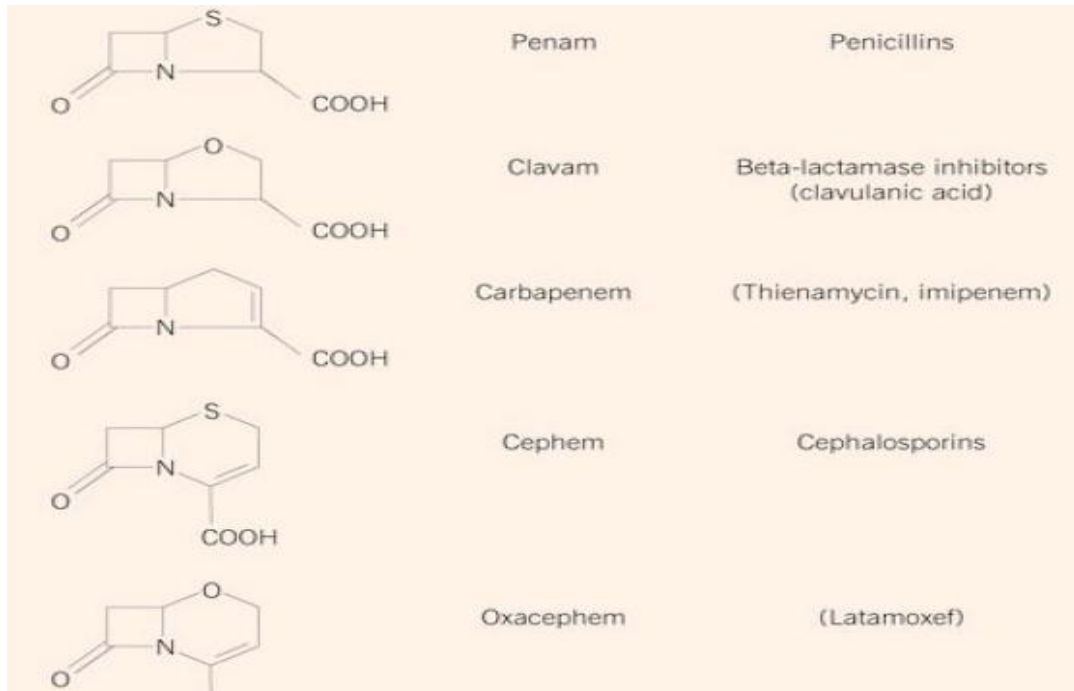
Les béta-lactamines se composent de quatre groupes de molécules : pénames, pénèmes, céphèmes et mono lactames. A ces quatre groupes, il faut ajouter les inhibiteurs de béta-lactamases dont certaines structures sont incluses dans ces groupes. Sur le plan structural, toutes les molécules de cette famille possèdent un cycle béta-lactame, responsable de l'activité antibactérienne associé ou non à un hétérocycle (figure 5), qui peut être un cycle thiazolidine qui représente la structure de base des pénicillines (pénames, pénèmes), ou un cycle dihydrothiazines à l'origine des céphalosporines. Le noyau béta-lactame peut être fonctionnel seul : monobactame (Byskier, 1999).



**Figure 5:** Structure des pénicillines (1) et des céphalosporines (2). Le cycle bêta-lactame est en rouge

- ✓ **Les pénames :** Ils renferment les pénicillines, les oxa-1-pénames et les carbapénames. Ces composés sont constitués de trois parties, un noyau thiazolidine fixé sur un cycle bêta-lactame et une chaîne latérale sur le C6 qui permet de les différencier. On distingue 7 groupes dont les aminopénicillines (ampicilline), les ureidopénicillines (pipéracilline) et les carboxypénicillines (ticarcilline) (Figure 6) (Bryskier, 1999).
- ✓ **Les pénèmes :** Le groupe des pénèmes renferme des molécules synthétiques. Il se caractérise par la présence d'un cycle thiazolidine attaché au cycle bêta-lactame. Selon l'atome présent en position 1 (soufre, radical CH2 ou oxygène), on distingue respectivement : les pénèmes, les carbapénèmes et les oxapénèmes (Figure 6). Les carbapénèmes possèdent un large spectre antibactérien incluant les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Bryskier, 1999).
- ✓ **Les céphèmes :** Ils sont constitués d'un noyau bêta-lactame auquel est accolé un hexacycle insaturé (dihydrothiazine). Il existe plusieurs classifications des céphèmes : chimique, microbiologique et pharmacologique. Chimiquement, les céphèmes peuvent être divisés en trois groupes en fonction de l'atome en position 1 du cycle hexaatomique : soufre (céphalosporines), méthylène (carbaccéphèmes) ou oxygène (oxa-1-céphèmes) (figure 6). Chaque groupe peut être subdivisé en fonction de la présence ou non en 7 d'un groupement methoxy : les céphamycines (céfoxitine) et les céphalosporines vraies. Les céphalosporines sont traditionnellement divisées en première, deuxième, troisième et quatrième génération (Bryskier, 1999).
- ✓ **Les monobactames :** Les monobactames se caractérisent par une structure monocyclique (noyau bêta-lactame) (Figure 6). Les monobactames naturels sont de faibles agents antibactériens mais ils se caractérisent par une très bonne stabilité à l'action des bêta-lactamases. Le premier monobactame développé et utilisé en clinique est l'aztréonam qui dérive d'un monobactame naturel isolé de *chromobactérium*

*violaceum* et possède une activité primaire sur les bactéries à Gram négatif (Brykier, 1999).



**Figure 6** : Structure chimique de certaines molécules de bêta-lactamines

(Anonyme3,2010)

### I.3.2.3.2. Mécanismes d'action des bêta-lactamines

Les bêta-lactamines sont des inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne (synthèse de peptidoglycane) par une inactivation des principaux enzymes impliqués dans cette synthèse, regroupées sous le terme de PLP (Protéines liant les pénicillines) qui jouent le rôle de transpeptidases et de carboxypeptidases.

En mimant la structure tridimensionnelle de la séquence D-Ala-D-Ala, les bêta-lactamines se comportent comme des inhibiteurs de la transpeptidase, enzyme essentielle à la synthèse de la paroi bactérienne. Elles forment un lien covalent avec l'enzyme et empêchent donc toute activité de cette dernière, les bêta-lactamines sont des substrats-suicides. L'inhibition des transpeptidase fait accumuler des précurseurs du peptidoglycane qui activent le système autolytique de la bactérie (la muréine-hydrolase), entraînant ainsi sa lyse (Cavallo, 2004 ; Zomahoun, 2004).

Deux étapes importantes pour l'activité antibactérienne des bêta-lactamines :

- Pénétration des bêta-lactamines : la cible des bêta-lactamines se trouve au niveau de la face externe de la membrane plasmidique. Chez les bactéries à Gram négatif, ces molécules sont obligées de traverser la membrane externe qui constitue une barrière hydrophobe. Cette pénétration se fait grâce à des porines (Omp C et Omp F). Leur passage et la vitesse de pénétration étant fonction de la taille et de charge de la molécule (Nikaido, 1992).

- Attachement aux protéines cibles : qui sont les PLP. Celle-ci ancrées dans la membrane cytoplasmique, sont des enzymes (transpeptidases, carboxypeptidases) impliqués dans la synthèse du peptidoglycane. Il existe une grande variété de PLP suivant les espèces.

#### I.3.2.4. Résistance aux antibiotiques

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

##### ✓ 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 la 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 première et de deuxième génération (Vedel, 1994).

##### ✓ 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.3.2.4.1. Mécanisme de résistance aux bêta-lactamines (Vedel, 1994 ; Bryskier, 1999)

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

###### ➤ L'inactivation de l'antibiotique

Par la synthèse de l'enzyme bactérienne : 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.

###### ➤ Diminution de la perméabilité

Il s'agit de l'inhibition de la pénétration de l'antibiotique dans la bactérie. Ces mécanismes existent 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).

➤ **Modification de la cible**

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

➤ **Expulsion des antibiotiques : synthèse d'efflux :**

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

#### **I.3.2.4.2. Les Béta-lactamases**

Les béta-lactamases sont des enzymes capables d'hydrolyser les antibiotiques en ouvrant le cycle béta-lactame. Ceci va conduire à la production de dérivés inactifs (les pénicillines sont dégradées en acide pénicilloïque et les céphalosporines en acide céphalosporoïque). Ces enzymes sont localisées au niveau de l'espace périplasmique chez les bactéries Gram négatif.

Le support génétique des béta-lactamases peut être chromosomique ou plasmidique avec une expression inductible ou constitutive (Livermore, 1995; Charlier et *al.*, 1998).

##### **I.2.3.4.2.1. La classification des béta-lactamases**

Plusieurs classifications ont été proposée pour les béta-lactamases mais actuellement les deux classifications qui sont adoptées sont : la classification fonctionnelle de Bush et *al.* (2010) et la classification structurale d'Ambler (1980).

✓ **La classification d'Ambler**

C'est une classification qui reflète la structure fondamentale de l'enzyme. Elle est basée sur la séquence peptidique du site enzymatique ou sur la séquence totale du gène codant la béta-lactamase ; elle propose quatre classes A, C et D comprenant une sérine dans le site actif, d'où leur appellation de sérine enzymes, tandis que la classe B regroupe des metallo-enzymes qui nécessitent l'ion zinc comme co-facteur (Cavallo et *al.*, 2004).

✓ **La classification de Bush, Jacoby et Medeiros**

La classification fonctionnelle de Bush-Jacoby-Medeiros, plus complète et plus récente, reflète le spectre d'activité de l'enzyme et répartit les béta-lactamases en trois groupes (Bush et *al.*, 2010) : un 1<sup>ier</sup> groupe qui regroupe les céphalosporinases (AmpC), le 2<sup>ème</sup> groupe regroupe les béta-lactamases à sérine (classe A et D d'ambler) et le 3<sup>ème</sup> groupe qui contient les metallo-enzymes (classe B d'ambler).

### I.2.3.4.2.2. Béta-lactamases à spectre élargi (BLSE)

Les BLSE (enzymes de classe A) sont inhibées, in vitro, par l'acide clavulanique. Elles hydrolysent la majorité des béta-lactamines y compris les céphalosporines à large spectre (3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> génération). Par contre, les BLSE sont sensibles aux céphamycines (céfoxitine) ainsi qu'aux carbapénèmes. Une co-résistance avec les aminosides, les tétracyclines et les fluoroquinolones est fréquente. Les bactéries possédant des BLSE sont dites multirésistantes (Arlet et Philippon, 2003).

Les première BLSE décrites dérivait de pénicillinase chromosomique « TEM ou SHV » (Arlet et philippon, 2003). Elles sont le plus souvent retrouvées chez *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*, cependant elles ont été retrouvées chez *Proteus sp.*, *Providencia sp.*, et autres genre d'entérobactéries (Bradford, 2001). Leur apparition s'explique par la survenue d'une à quatre mutations ponctuelles dans les gènes de structure codants pour TEM et SHV (Jacoby et Medeiros, 1991).

Dans les années 1990, il ya eu l'émergence d'un nouveau type de BLSE, les CTX-M qui confèrent un niveau élevé de résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération particulièrement le céfotaxime et leur présence dans des éléments mobiles. Certaines variantes de ces enzymes (CTX-M15, 19,16), hydrolysent également le ceftazidime efficacement, ce qui peut compliquer leur identification phénotypique (Padmini, 2007). C'est BLSE sont inhibées de façon plus importante par le tazobactam que par l'acide clavulanique (Barrial et Scotet, 2006).

# Chapitre II

## Matériel et méthodes

## I-MATERIEL ET METHODES

### I.1 Matériel biologique

Le travail a concerné 30 souches de coliformes isolées en 2012 à partir de moules « *Mytilus galloprovincialis* » récoltées à partir d'un site d'élevage (Ain Chrob) et d'un site sauvage situé à bateau cassé. Sur les 30 souches, 15 ont été isolées de la moule d'élevage et 15 souches ont été isolées de la moule sauvage.

#### I.1.1 Présentation du site

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

Le site de Ain Chrob (ex Surcouf) se trouve à 800m au large dans la plage de la commune d'Ain taya wilaya d'Alger située en dehors de la baie d'Alger, à 30 Km à l'est d'Alger.

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

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

Les caractéristiques microbiologiques des échantillons de moules récoltées sont regroupés dans le tableau 7.

**Tableau 7 :** Les caractéristiques bactériologiques des moules récoltées (Radja et, Bouich 2012)

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

## II Méthodes

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

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

#### -Technique

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau distillée dans les alvéoles afin de créer une atmosphère humide.
- Retirer la galerie stérile de son emballage et la déposer dans la boîte d'incubation.
- Ecrire nom, référence de la souche et date sur la languette latérale du fond de la boîte.
- Préparer l'inoculum bactérien : mettre 1 à 3 colonies jeunes bien isolées dans 5 ml d'eau physiologique stérile,
- Inoculer la galerie comme suit :
  - Remplir à l'aide d'une micropipette les tubes et cupules des tests (CIT, VIP et GEL).
  - Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests.
  - Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LCD, ODC, H<sub>2</sub>S, URE en remplissant leur cupule d'huile de vaseline.
- Refermer la boîte d'incubation et la placer dans l'étuve à 37°C pendant 18-24h.
- Le test d'oxydase est réalisé par le dépôt d'un inoculum bactérien sur le disque d'oxydase. La présence du cytochrome oxydase se traduit par l'apparition d'une coloration violette.

#### - Lecture de la galerie

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

### II.2. Diffusion en milieu gélosé : antibiogramme

L'étude de la résistance de nos souches vis-à-vis de 21 antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu solide (Courvalin, 1985 ; CA-SFM, 2011).

### -Principe

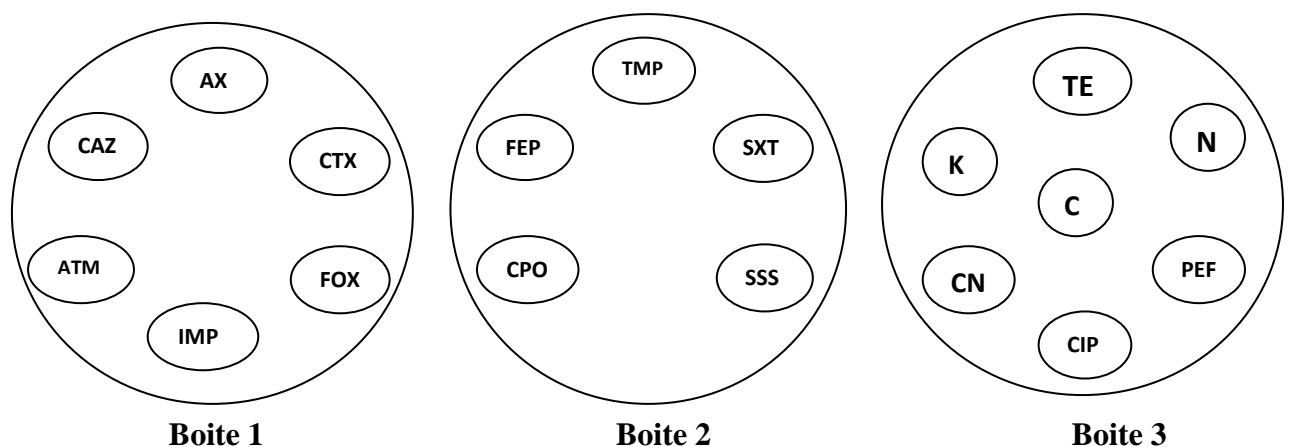
Cette technique est basée sur l'observation de la croissance bactérienne en présence d'un gradient de concentration d'antibiotiques, obtenu par diffusion à partir des disques d'antibiotiques dans un milieu gélosé (Muller Hinton). Ce gradient est inversement proportionnel à la distance par rapport aux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

### -Technique

- A partir d'une culture jeune (18-24h), préparer dans 5ml d'eau physiologique stérile une suspension bactérienne de 0,5McFarland ( $10^8$  cellules/ml),
- Ajuster l'inoculum à  $10^7$  cellules/ml.
- Plonger un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne de  $10^7$  cellules/ml.
- Ensemencer la boîte en frottant l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée et en tournant la boîte trois fois de  $60^\circ$  afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum.
- Appliquer les disques d'antibiotiques (Tableau8) à l'aide d'un distributeur stérile selon le schéma de la (Figure7).
- Laisser diffuser pendant 15 minutes, à température ambiante,
- Incuber à  $35^\circ\text{C}$  pendant 18-24h.

### -Lecture

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



**Figure 7 :** Schéma de la disposition des antibiotiques

**Tableau 8** : Les différents antibiotiques en disque utilisés pour l'antibiogramme

Famille	Antibiotiques	Charge ( $\mu\text{g}$ )	Abréviation	
Bétalactamines	Pénicilline	Amoxiciline	25	AX
	Monobactames	Aztréonam	30	ATM
	Céphalosporines de 3 <sup>ème</sup> génération	Céfoxitine	30	FOX
		Céfotaxime	30	CTX
		Ceftazidime	30	CAZ
	Céphalosporines de 4 <sup>ème</sup> génération	Céfépime	30	FEP
		cefpirome	30	CPO
Carbapénème	Imipénène	30	IPM	
Tétracyclines	Tétracycline	30 UI	TE	
Phénicoles	Chloramphénicol	30	C	
Sulfamides	Sulfamide	200	SSS	
	Triméthoprim	5	TMP	
	Triméthoprim/ Sulfaméthoxazol	1.25/23.75	SXT	
Quinolones	Acide nalidixique	30	NA	
	Pefloxacin	5	PEF	
	Ciprofloxacine	5	CIP	
Aminosides	kanamycine	30 UI	K	
	gentamicine	30	CN	

### II.3 Détection des $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE) : test de synergie

La détection d'une BLSE a été réalisée en parallèle avec l'antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu solide. Ce test est basé sur la mise à profit d'une image de synergie entre au moins une céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération (C3G) et/ou l'aztréonam et un inhibiteur de  $\beta$ -lactamase tel que l'acide clavulanique.

Cette synergie se traduit par une augmentation nette de l'activité des C3G et/ou l'aztréonam du côté de l'inhibiteur (acide clavulanique) (Jarlier et *al.*, 1988).

#### II.4. Détection des $\beta$ -lactamases inductibles : test d'antagonisme :

Ce test permet de mettre en évidence la production d'une céphalosporinase inductibles. Ces dernières sont mises en évidence par l'apparition d'une image d'antagonisme entre un antibiotique inducteur (céfoxitine ou imipénème) et un antibiotique actif (une céphalosporine de 3<sup>ème</sup> ou 4<sup>ème</sup> génération). Cet antagonisme se traduit par la diminution de l'activité de la  $\beta$ -lactamine initialement active grâce à la production d'une céphalosporinase inductible (Nadal et Vongraeventiz, 1993 ; Vedel, 2005).

#### II.5. Recherche de gènes BLSE par PCR (Polymerase Chain Reaction)

##### -Principe

La PCR est une technique basée sur l'hybridation spécifique des amorces avec le gène recherchée. Elle permet l'amplification du fragment cible balisé par ces deux amorces. Le processus nécessite la succession d'un certain nombre de cycles (20-40), chaque cycle comporte les étapes suivantes :

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

##### -Technique

- ✓ Préparer l'inoculum bactérien : 3 à 4 colonies dans 50 $\mu$ l d'eau distillée stérile.
- ✓ Mettre l'inoculum à 100°C pendant 10min pour la lyse.
- ✓ Centrifuger à 12000trs/min pendant 3min.
- ✓ Récupérer le surnageant.
- ✓ Mettre dans des microtubes, un volume final de 12,5 $\mu$ l composé du master mix 1X (Promega), d'amorce sens et antisens 0,25 $\mu$ M (Sigma) et de 2,5 $\mu$ l d'ADN.
- ✓ Mettre dans des l'appareil à PCR pour l'amplification en appliquant le programme correspondant.

Trois gènes de béta-lactamases (TEM, CTX-M et SHV) ont été recherchés par le programme suivant (Kim et al, 2004) : 94°C pendant 10 min, 30 cycles de 94°C pendant 40sec, 55°C (TEM et CTX) et 50°C (SHV) pendant 30sec, et 72°C pendant 40 sec et une élongation finale de 10 min à 72°C. Les amorces utilisées sont représentés dans le tableau 9.

**Tableau 9 :** Les séquences des amorces des gènes recherchés par PCR (Kim et al, 2004 ; Weill et al, 2004).

Gène	Amorce	Taille du fragment	Température d'hybridation
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	Up : ATGAGTATTCAACATTTCCG Low : CCAATGCTTAATCAGTGAGG	858pb	55
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	Up : GGT TAAAAAATCACTGCGTC Low : TTGGTGACGATTTTAGCCGC	550pb	55
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	F : GATTTGCTGATTTTCGCTCGG R : TTATCTCCCTGTTAGCCACC	795pb	50

## II-6 Electrophorèse sur gel d'agarose

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

Les produits d'amplification sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 1%, dans une cuve de 20cm x 25cm sous une tension de 90 volts. La taille des produits d'amplification (tableau 9) à été déterminée en utilisant un marqueur de taille : 100pb DNA ladder (proméga).

Le tampon de migration a été le TBE (Tris 45mM, Borate 45mM, EDTA 1mM). La visualisation se fait sous UV en présence du Bromure d'éthidium incorporé préalablement dans le gel à une concentration de 0,5µg/ml.

### Bleu de dépôts

- ✓ Glycérol 50%
- ✓ EDTA-NA<sub>2</sub> 100mM pH : 8
- ✓ Bleu de bromophénol 0,2%
- ✓ Sodium dodécyl sulfate (SDS) 3%

## II.7. Transfert génétique par conjugaison bactérienne

### -Principe

Le transfert génétique permet la mise en évidence de plasmides conjugatifs portants des caractères de résistance aux antibiotiques. Il se fait par un croisement de la souche sauvage (donatrice) avec une souche réceptrice (K12 *E.coli* BM21 NA<sup>R</sup> AZ<sup>R</sup>) dépourvue de plasmide et possédant dans ce cas, un caractère de résistance obtenu par mutation chromosomique (acide nalidixique ou l'azide de sodium), auquel la donatrice est sensible.

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

#### **-Technique**

- ✓ La conjugaison a été effectuée en milieu solide (Courvalin et *al.*, 1985),
- ✓ Cultiver les souches donatrice et réceptrice dans un bouillant BHIB pendant 18h à 37°C, à partir d'une culture jeune
- ✓ Un volume de la donatrice a été mélangé à 2V de la réceptrice,
- ✓ Spoter 50µl du mélange dans une boîte de gélose M.H,
- ✓ Laisser sécher puis incuber à 37°C pendant 18h,
- ✓ Racler la culture mixte et la mettre en suspension dans 5 ml d'eau physiologique stérile, Agiter au vortex.
- ✓ Ensemencer les boîtes de sélection par la suspension bactérienne contenue dans l'eau physiologique ainsi que les souches parentales,
- ✓ Après une incubation pendant 24h à 35°C, vérifier les boîtes de sélection où seules les transconjugants doivent pousser,
- ✓ Trois transconjugants ont récupéré et analysé par antibiogramme et PCR.

Les boîtes de sélection ont été préparées de la sorte : La gélose de Muller Hinton maintenue en surfusion a été additionnée d'amoxicilline à 50µg/ml et l'Azide de sodium à 250µg/ml.

# Chapitre III

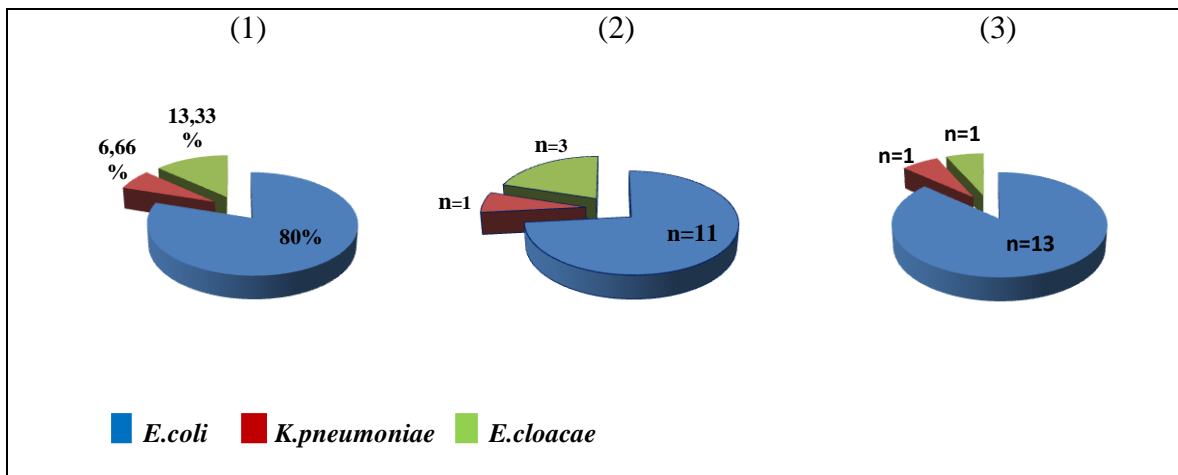
## Résultats et discussion

### III Résultats et discussion

Les bivalves filtreurs peuvent être contaminés par des germes multi résistants notamment du groupe des entérobactéries qui constituent la part anthropique prépondérante des rejets. L'utilisation accrue des antibiotiques en aquaculture côtière ainsi que les rejets en mer d'eaux usées traitées n'est pas sans incidence sur l'arrivée en ces zones de différentes populations de bactéries multi résistantes et leur accumulation dans les produits de la mer, ce qui peut entraîner un échec thérapeutique lors du traitement des intoxications alimentaires. A cet effet, il est important de connaître l'état de la résistance aux antibiotiques chez les coliformes (particulièrement *E.coli*), qui restent le meilleur indicateur de la salubrité des moules et un bon réservoir des gènes de résistance.

#### III.1 Identification des souches résistantes

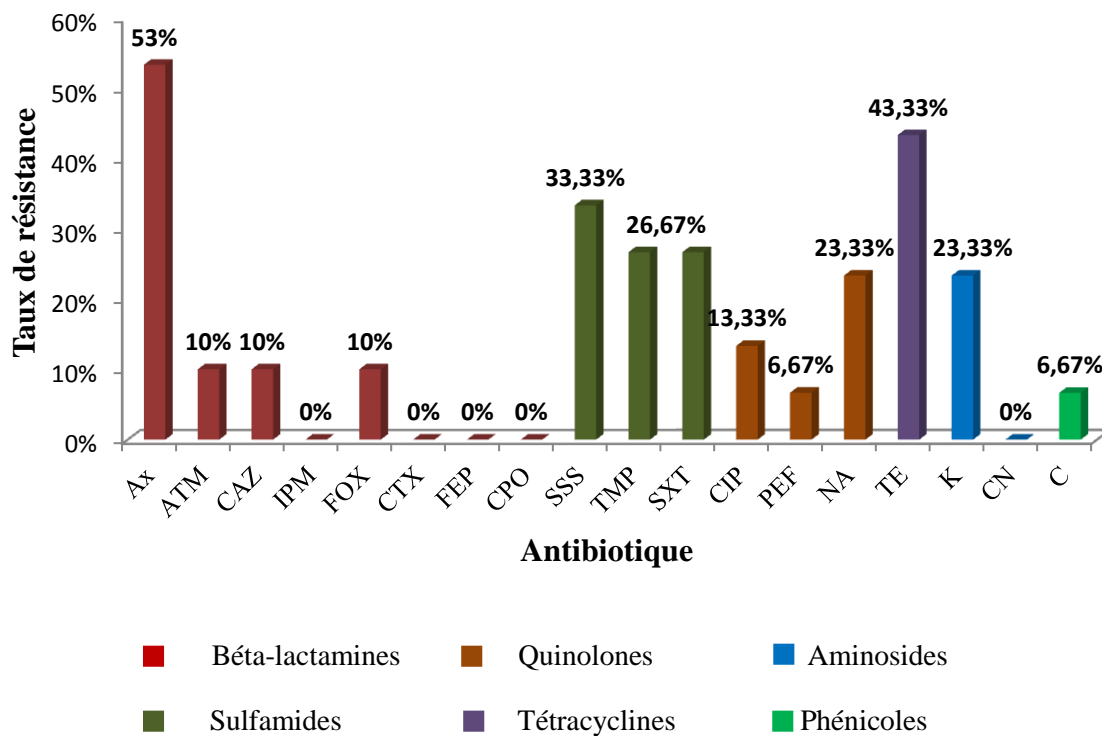
Les résultats de l'identification ont permis d'assigner les souches aux espèces suivantes : *Escherichia coli* (n=24, 80%), *Enterobacter cloacae* (n=4, 13.33%), *Klebsiella pneumoniae* (n=2, 6.66%) (Figure 8). Selon le site de prélèvement nous retrouvant 11 *Escherichia coli*, 3 *Enterobacter cloacae* et 1 *Klebsiella pneumoniae* dans le milieu d'élevage et 13 *Escherichia coli*, 1 *Enterobacter cloacae* et 1 *Klebsiella pneumoniae* dans le milieu sauvage (Figure 8).



**Figure 8** : répartition des 30 coliformes isolés à partir de la moule « *Mytilus galloprovincialis* »: (1) sauvages et d'élevages, (2) élevages, (3) sauvages

#### III.2 Sensibilité aux antibiotiques des souches étudiées

La sensibilité aux antibiotiques des souches testées a été étudiée par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Les résultats sont représentés dans la figure 9 et le tableau 12



**Figure 9 :** Taux de résistance aux antibiotiques des 30 coliformes isolés à partir de la moule *Mytilus galloprovincialis* d'élevage et sauvage

En ce qui concerne la résistance aux bêta-lactamines, les résultats obtenus (Figure 9) ont montré une résistance marquée aux pénicillines (AX : n=16, 53%) et faible pour le monobactame (ATM : n=3, 10%), les céphalosporines de troisième génération (FOX : n=3, 10%) et (CAZ : n=3, 10%).

Toutes les souches ont été trouvées sensibles aux restes des bêta-lactamines : carbapénèmes (IPM : n=0, 0%), céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (CTX : n=0, 0%) et aux céphalosporines de quatrième génération (FEP : n=0, 0% ; CPO : n=0, 0%).

D'après la lecture interprétative de l'antibiogramme nous avons constaté qu'*E.coli* a montré une résistance à l'amoxicilline dans 53% des cas. Cette bactérie présente un phénotype sauvage sensible à tous les antibiotiques malgré la présence d'une céphalosporinase chromosomique exprimée à très bas niveau (Vedel, 1997) ; donc la résistance de nos souches à l'amoxicilline est le produit d'un mécanisme acquis représenté par la production d'une pénicillinase à bas ou à haut niveau (Vedel, 1997). Deux souches d'*E.coli* ont été trouvées résistantes à l'aztréonam et à la ceftazidime, des molécules à large spectre qui peuvent être hydrolysées par une bêta-lactamase à spectre élargi. Cette hypothèse est confortée par la sensibilité des souches à la céfoxitine et l'imipénème (Philippon et Arlet., 2005).

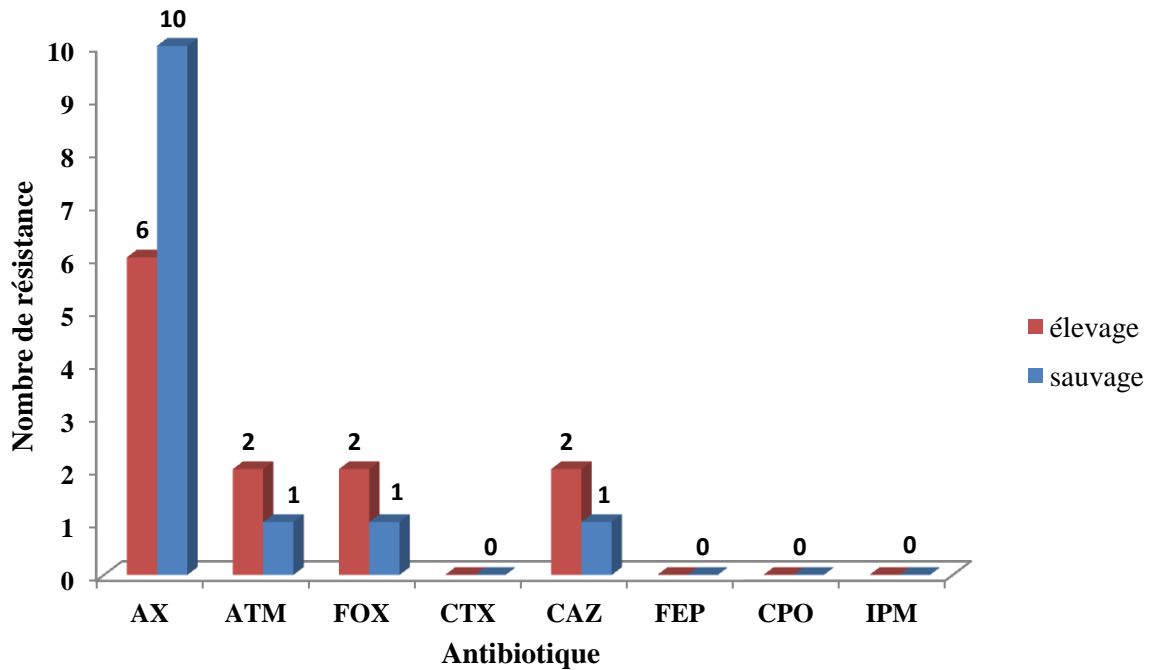
Pour les *K.pneumoniae*, la résistance à l'amoxicilline résulterait de la production d'une pénicillinase chromosomique à bas niveau (type SHV), présente naturellement chez *Klebsiella pneumoniae* (Vedel, 1997). Cependant, l'une de ces *Klebsiella* (E5) a présenté une résistance intermédiaire aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération. Cette résistance est de type acquise, elle serait due à la production d'une pénicillinase à haut niveau ou à une bêta-lactamase à spectre élargi (Vedel, 1997, Philippon et Arlet., 2005).

Pour les souches d'*E.cloacae*, les résultats ont montré la résistance des souches à l'amoxicilline et à la céfoxitine. Cette résistance est de type intrinsèque chez cette espèce par la production d'une céphalosporinase chromosomique de type inductible (Vedel, 1997). Une seule espèce a présenté, en plus de ces résistances, une résistance aux molécules à large spectre (ATM et CAZ) qui serait probablement due à une hyperproduction de la céphalosporinase chromosomique (Vedel, 1997).

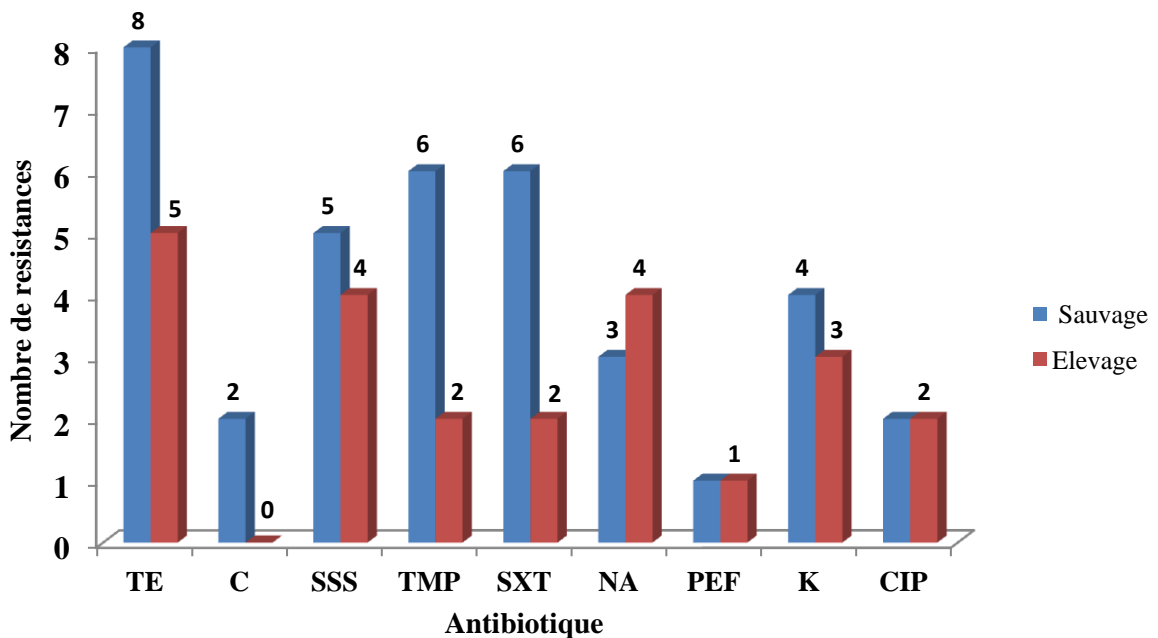
En ce qui concerne les autres familles d'antibiotiques (Figure 9), nous avons constaté une résistance marquée aux tétracyclines (TE : n=13 , 43.33%) suivis par les sulfamides (SSS :n=9, 33.33%), triméthoprimine (TMP :n=8, 26.67%), l'association triméthoprimine/sulfaméthoxazole (SXT : n=8 , 26.67%), la kanamycine (K :n=7, 23.33%) et l'acide nalidixique (NA : n=7, 23.33%). Des faibles taux de résistance ont été observés pour les fluoroquinolones (CIP : n=4, 13.33%), (PEF : n=2, 6.67 %) et le chloramphénicol (C : n=2, 6.67%) alors qu'une sensibilité totale a été observée pour la gentamicine (CN : n=0, 0%). Ces résultats corroborent les données de la littérature qui rapportent la résistance aux antibiotiques chez des bacilles à Gram négatif isolées d'eau de mer (Mudryk, 2005, Manivasagan et al, 2011, Alouache et al, 2012 ; Kada, 2012) et des sites aquacoles (Miranda et Zemelman, 2001). Ces études ont rapporté l'influence des apports anthropiques sur l'augmentation des taux de résistance aux antibiotiques.

Le taux de résistance le plus élevé a été observé pour les tétracyclines, qui sont des molécules très utilisées dans l'agriculture et l'aquaculture pour promouvoir la croissance, le traitement et la prophylaxie. Cette résistance a communément été décrite à des taux significatifs en terme de risque sanitaire (25 à 40%) autour des sites aquacoles marins (Nanoka et al, 2007 ; Manivasagan et al., 2011). Un taux important a également été observé pour les sulfamides, triméthoprimine et l'association sulfamides/triméthoprimine, ces résultats corroborent les données de Matyar et al. (2008) et Manivasagan et al. (2011).

La comparaison entre les souches récupérées à partir des moules d'élevages et celles isolées à partir des moules sauvages a montré (Figure 10, 11) que les souches isolées à partir des moules sauvages ont été plus résistantes pour l'amoxicilline (n=10, 66.67%), sulfamides (n=5, 33.33%), triméthoprimine (n=6, 40%), triméthoprimine/sulfaméthoxazole (n=6, 40%), tétracyclines (n=8, 53.33%), kanamycine (n=4, 26.67%) et chloramphénicol (n=2, 13.33%). Cependant, elles ont été moins résistantes pour certaines bêta-lactamines (ceftazidime, céfoxitine et aztréonam).



**Figure 10 :** Comparaison de la résistance aux antibiotiques bêta-lactamines chez les souches isolées à partir de la moule sauvage (n=15) et à partir de la moule d'élevage (n=15)



**Figure 11:** Comparaison de la résistance aux antibiotiques non bêta-lactamines chez les souches isolées à partir de la moule sauvage (n=15) et à partir de la moule d'élevage (n=15)

Nos souches ont présenté des profils de multi-résistance allant de 1 à 9 molécules, réparti en 18 profils différents, avec 11 profils dans le site sauvage et 9 profils dans le site d'élevage (Tableau 10). Deux profils d'antibiorésistance ont été retrouvés dans les deux sites. Ces profils de résistance acquise confortent l'hypothèse d'apport anthropique des bactéries résistantes aux antibiotiques. En effet, dans une étude réalisée en 2009 sur la plage de Ain Chrob, il a été rapporté la présence de bactéries multirésistantes et particulièrement la détection d'une *E.coli* productrice d'une BLSE (Alouache et al., 2012). De même, dans une étude réalisée en 2008 sur des bactéries isolées à partir des moules d'élevage de Ain Chrob, il a été constaté la présence de souches multirésistantes de *Citrobacter freundii* (Chikh, 2008).

**Tableau 10 :** Profils d'antibio-résistance des 30 coliformes isolés à partir de la moule *Mytilus galloprovincialis*.

Souche	Antibiotype	Nombre de résistances
<i>Escherichia coli</i> (E12), (S1), (S3),(S4),(E2), (E7), (E18)	-	0
<i>Escherichia coli</i> (S2) <i>Klebsiella pneumoniae</i> (E5), (S15)	AX	1
<i>Escherichia coli</i> (E1), (E13), (E6)	TE	1
<i>Enterobacter cloacae</i> (E16)	AX	1
<i>Enterobacter cloacae</i> (E9)	AX-FOX	2
<i>Escherichia coli</i> (S6)	AX-TE	2
<i>Escherichia coli</i> (S22)	NA-TE	2
<i>Escherichia coli</i> (E17)	ATM-CAZ-SSS	3
<i>Enterobacter cloacae</i> (S20)	AX-FOX-C	3
<i>Escherichia coli</i> (S13)	AX-TE-C	3
<i>Escherichia coli</i> (S12)	TMP-SXT-TE-K	4
<i>Escherichia coli</i> (E14)	SSS-CIP-PEF-NA-K	5
<i>Escherichia coli</i> (S9)	AX-SSS-TMP-SXT-TE	5
<i>Enterobacter cloacae</i> (E8)	AX-ATM-CAZ-FOX-NA	5
<i>Escherichia coli</i> (S11)	AX-SSS-TMP-SXT-TE	5
<i>Escherichia coli</i> (S16)	AX-ATM-CAZ-SSS-TMP-SXT-K	7
<i>Escherichia coli</i> (E11)	AX-SSS-TMP-SXT-NA-TE-K	7
<i>Escherichia coli</i> (E3), (S7)	AX-SSS-TMP-SXT-CIP-NA-TE-K	8
<i>Escherichia coli</i> (S21)	AX-SSS-TMP-SXT-CIP-PEF-NA-TE-K	9

### III.3 Production de bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE)

La mise en évidence de la production d'une BLSE a été effectuée par le test de synergie « DDST ». Sur les 30 souches, deux souches seulement ont été productrices d'une image de synergie entre ATM et CAZ et l'acide clavulanique pour la *E.coli* (E17) et entre FEP et l'acide clavulanique pour la souche de *K.pneumoniae* (E5) (Figure 12).

Cette image de synergie augure la production d'une BLSE. Ce mécanisme de résistance est le plus redoutable et le plus prédominant en milieu hospitalier. Au cours de ces dernières années plusieurs études rapportent la présence de ce mécanisme chez les bactéries isolées des eaux usées (Doljeska et al., 2011, Alouache, 2012), des eaux de surface (Kim et al., 2008) et de l'eau de mer (Alouache et al., 2012).

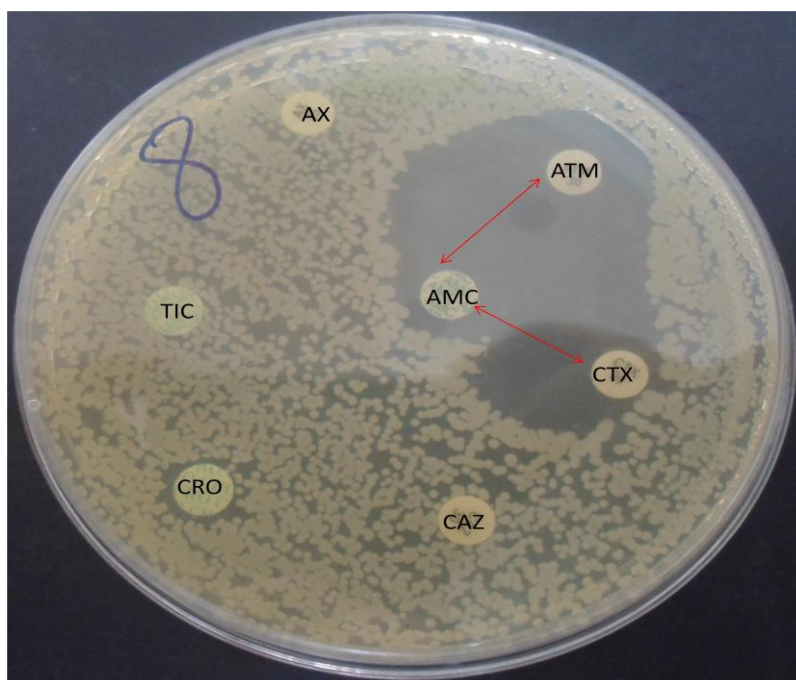
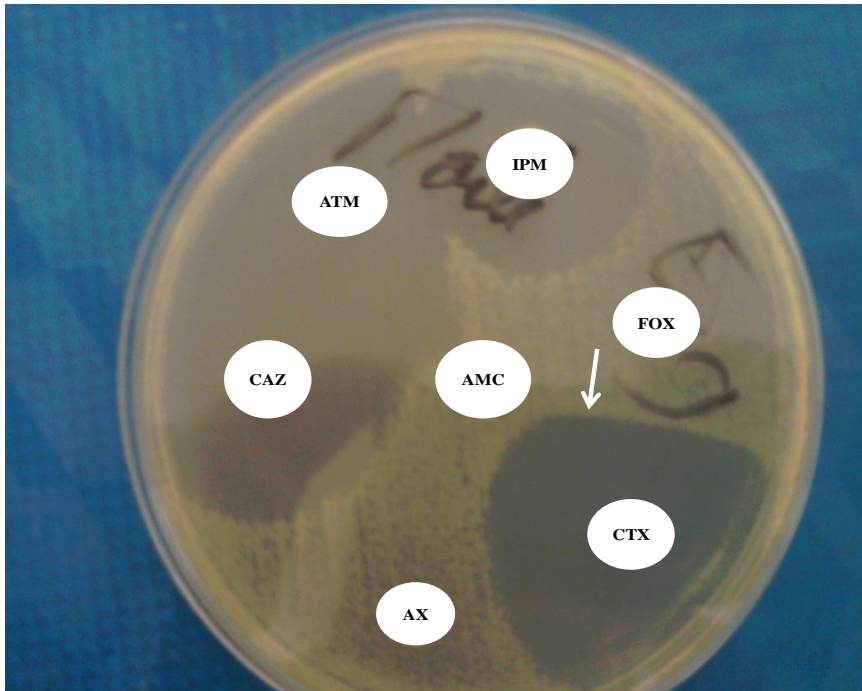


Figure 12 : Illustration d'une image de synergie

### III.4 Production d'une céphalosporinase inducible

La production d'une céphalosporinase inducible a été recherchée par le test d'antagonisme qui se traduit par la réduction du diamètre d'inhibition de l'antibiotique marqueur du côté de l'inducteur (impénème ou céfoxitine) (Figure 13). Ce test a été positif pour les quatre souches d'*E.cloacae*. En effet, cette espèce est connue pour avoir une céphalosporinase inducible de type AmpC à médiation chromosomique. Cette enzyme confère une résistance intrinsèque à la céfoxitine, l'amoxicilline et elle peut atteindre les molécules à large spectre (CAZ).



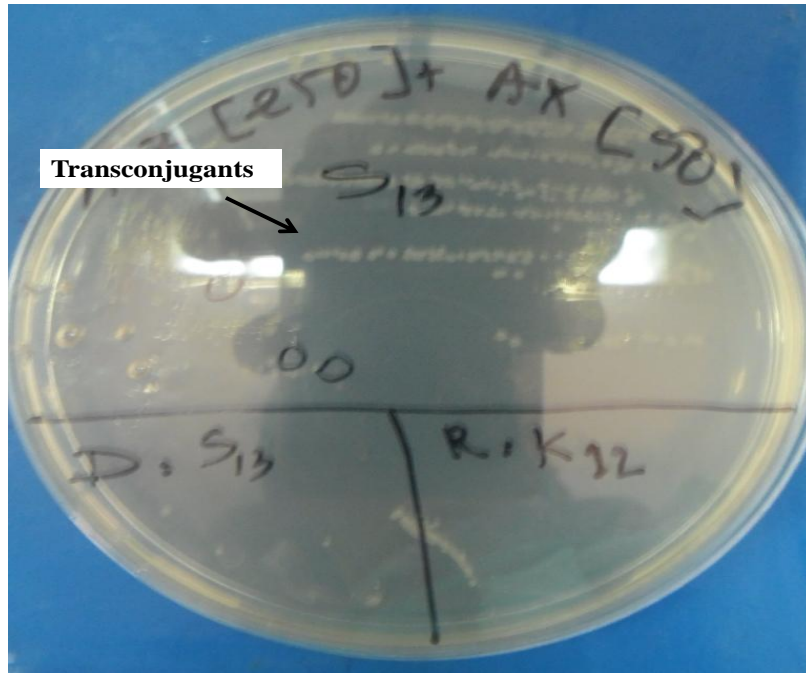
**Figure 13 :** Illustration d'une image d'antagonisme chez *Enterobacter cloacae* (E9)

### III.5 Transfert génétique par conjugaison bactérienne

Le transfert génétique par conjugaison bactérienne vers la souche *E.coli* k12 BM21 résistante à l'acide nalidixique et à l'azide de sodium a été réalisé pour 18 souches présentant une résistance ou une résistance intermédiaire à l'amoxicilline (AX) ainsi que pour la souche de *K. pneumoniae* BLSE+. Le transfert a été positif pour cinq souches dont 4 *E.coli* (S16, S11, E11, S13) et une *K. pneumoniae* (E5) (Figure 14, Tableau 11). Ce résultat confirme que le mécanisme de résistance est un mécanisme acquis porté par un plasmide autotransférable. De plus, les résultats ont montré que la résistance aux sulfamides, triméthoprime/sulfaméthoxazole, Kanamycine et tétracyclines n'est pas portée par le même plasmide qui code pour la résistance aux bêta-lactamines (Tableau 12).

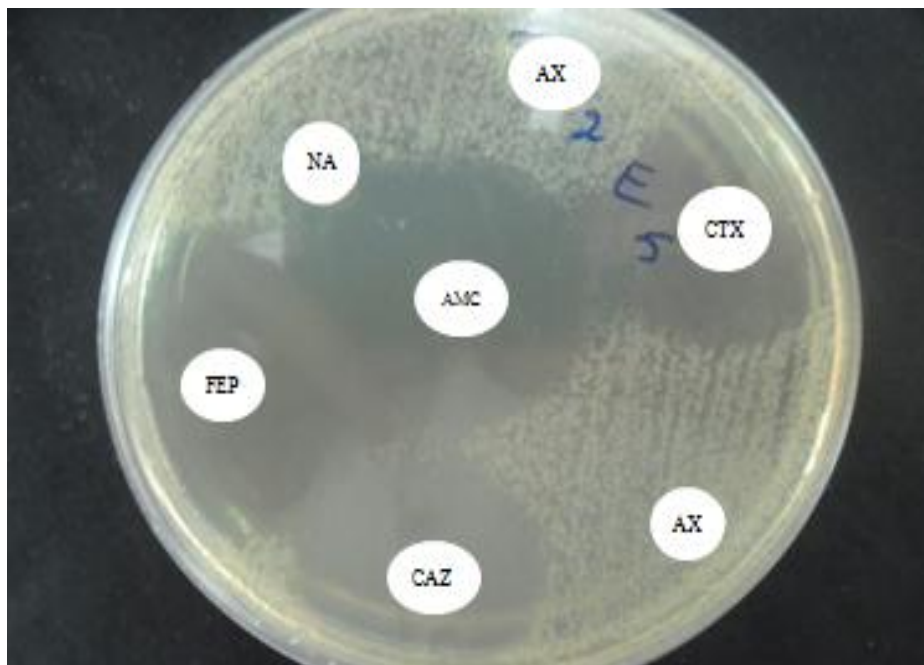
La réalisation du test de synergie pour les transconjugants a révélé le transfert du phénotype BLSE chez la souche de *K. pneumoniae* BLSE+. Ce qui confirme que notre BLSE est à médiation plasmidique et peut être transférée d'une souche à une autre.

Pour les autres souches négatives pour le transfert, le mécanisme de résistance serait porté soit par le chromosome, soit par un plasmide non transférable.



**Figure 14** : Illustration d'un transfert positif par conjugaison bactérienne de la souche *E.coli* S13.

*Noter l'absence de croissance des souches parentales S13 et K12 et la croissance des transconjugants sur la boîte de sélection.*



**Figure 15** : Illustration d'un transfert du phénotype BLSE de la souche de *K.pneumoniae* vers la *E.coli* K12

**Tableau 11** : Antibiotypes des souches aux transferts positifs et de leurs transconjugants

Souches transférées	Profil d'antibiorésistance	Test de synergie
<i>K.pneumoniae</i> E5	AX CTX <sup>I</sup> CAZ <sup>I</sup>	+
E5 TC1	AX CTX <sup>I</sup> CAZ <sup>I</sup>	+
E5 TC2	AX CTX <sup>I</sup> CAZ <sup>I</sup>	+
E5 TC 3	AX CTX <sup>I</sup> CAZ <sup>I</sup>	+
<i>E.coli</i> E11	AX SSS TMP SXT NA TE K	-
E11TC2	AX.TE.	
E11TC3	AX.TE	
<i>E.coli</i> S11	AX SSS TMP SXT	-
S11TC1	AX.	
S11TC2	AX.	
S11TC3	AX.SSS	
<i>E.coli</i> S16	AX ATM CAZ SSS TMP SXT K	-
S16TC1	AX.SSS.SXT.K	
S16TC2	AX.SSS.SXT.K	
<i>E.coli</i> S13	AX TE C	-
S13TC1	AX.TE	
S13TC2	AX	

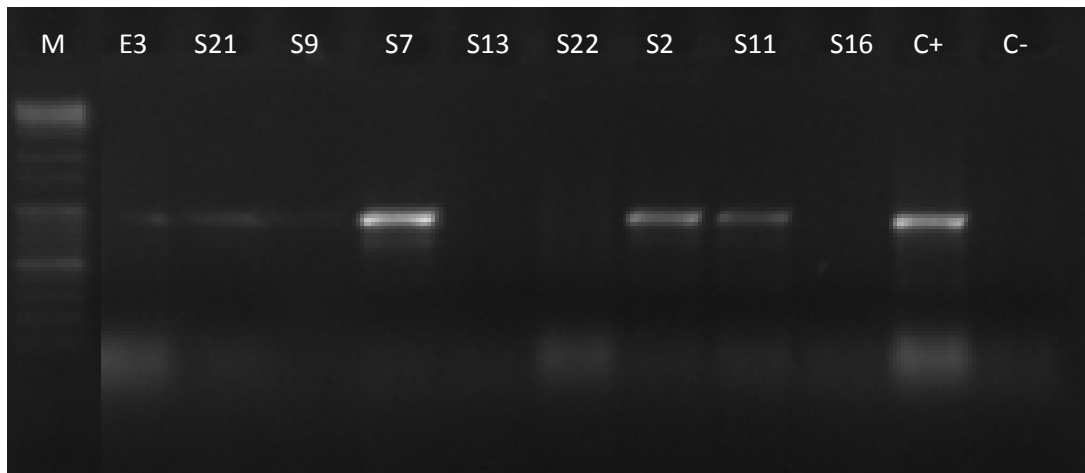
I : intermédiaire.

### III.6 Caractérisation des gènes de bêta-lactamases

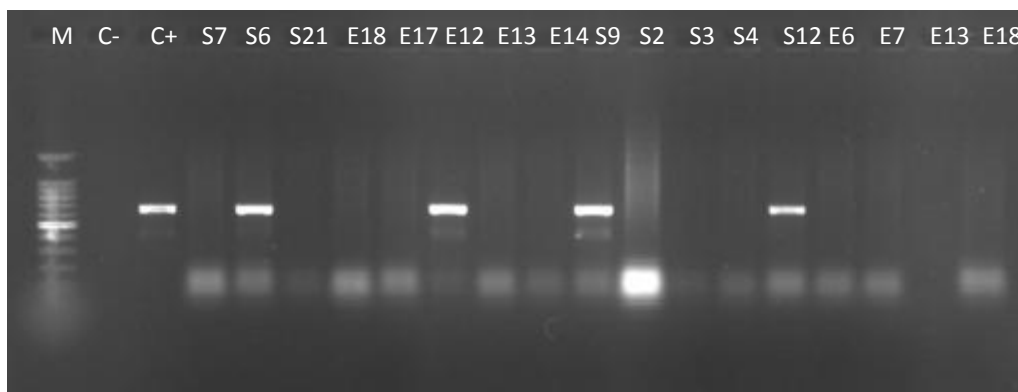
La recherche de trois bêta-lactamases (TEM, SHV, CTX-M) a été effectuée pour les 24 souches d'*E.coli* et la souche de *K.pneumoniae* BLSE+. Les résultats ont montré la présence du gène *bla*<sub>CTX-M</sub> chez *K.pneumoniae* BLSE+, le gène *bla*<sub>TEM</sub> chez 4 souches d'*E.coli* (S2, S7, S11 et S12) (Figure 16) et le gène *bla*<sub>SHV</sub> chez 1 *K.pneumoniae* (E5) et 8 *E.coli* (S16, S11, S13, E11, E12, S6, S9, S12) (Tableau 12, Figure 17). Le gène *bla*<sub>SHV</sub> a été trouvé transférable chez 4 souches (S16, S11, S13 et E11). Les gènes *bla*<sub>TEM</sub> et *bla*<sub>SHV</sub> sont les plus rencontrés chez les *E.coli* particulièrement d'origine animale. Ces gènes peuvent évoluer génétiquement par le biais des mutations qui lui confère la résistance aux molécules à large spectre c'est le cas de la *E.coli* S16. Le gène *bla*<sub>SHV</sub> retrouvé chez *K. pneumoniae* représente le mécanisme de résistance intrinsèque chez cette espèce.

En plus de ces pénicillinases à bas ou à haut niveau, nous avons détecté une BLSE de type CTXM porté par un plasmide autotransférable (Figure 18, Tableau 12). Ce mécanisme est le plus prédominant en milieu clinique dans le monde et en Algérie (Messai et al., 2008 ; Iabadene et al., 2009). Les milieux aquatiques n'ont pas échappé à la présence de ce gène dans les eaux usées de stations d'épuration (Doljeska et al., 2011 ; Alouache, 2012), et dans les eaux du port d'Alger (Alouache, 2012) et l'eau de mer au niveau de la plage de Ain Chrob dans la même zone conchylicole étudiée dans cette étude (Alouache et al., 2012). La détection de cette enzyme représente un risque de santé publique, particulièrement en connaissant la capacité de diffusion de cette enzyme, la capacité des moules à concentrer les bactéries

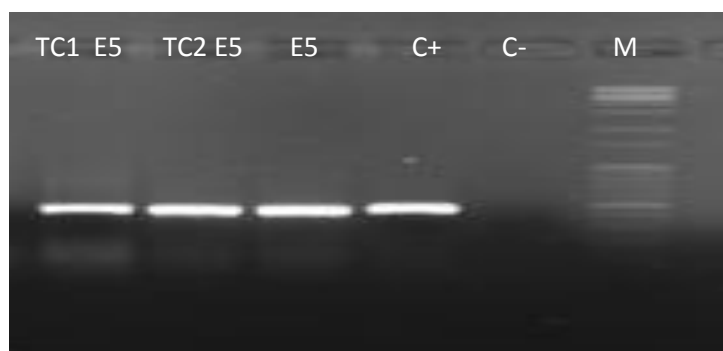
résistantes et à favoriser un environnement propice pour les échange génétique et surtout les échecs thérapeutiques entrainés à cause de la présence de ces gène de résistance.



**Figure 16 : Illustration de la détection du gène *bla*<sub>TEM</sub>.** C- : contrôle négatif, C+ : contrôle positif, taille de l'amplifiat 858pb



**Figure 17 : Illustration de la détection du gène *bla*<sub>SHV</sub>.** C- : contrôle négatif, C+ : contrôle positif, taille de l'amplifiat 795pb



**Figure 18 : Illustration de la détection du gène *bla*<sub>CTX-M</sub> chez la souche *K.pneumoniae* (E5) et ses transconjugants (TC1, TC2).** C- : contrôle négatif, C+ : contrôle positif, taille de l'amplifiat 550pb



**Tableau 12 :** Tableau récapitulatif des souches avec résistance, gènes présents, gènes transférés, et résistance transférée

Souches	Résistance	Gènes présents	Gènes transférés	Résistance transférée
<i>K.pneumoniae</i> E5	AX	SHV CTX-M	CTX-M	AX
<i>E.coli</i> S2	AX	TEM	-	-
<i>E.coli</i> S7	AX.SSS.TMP.SXT.NA.TE.CIP.K	TEM.	-	-
<i>E.coli</i> S11	AX.SSS.TMP.SXT.TE	SHV TEM	SHV	AX-SSS
<i>E.coli</i> S12	TMP.SXT.TE.K	SHV TEM	-	-
<i>E.coli</i> E12	-	SHV	-	-
<i>E.coli</i> S16	AX.ATM.CAZ.SSS.TMP.SXT.K	SHV	SHV	AX-SSS-SXT-K-NA
<i>E.coli</i> S13	AX.TE.C	SHV	SHV	AX-NA-TE
<i>E.coli</i> E11	AX.SSS.TMP.SXT.NA.TE.K	SHV	SHV	AX-TE-NA
<i>E.coli</i> S6	AX.TE	SHV	-	-
<i>E.coli</i> S9	AX.SSS.TMP.SXT.TE	SHV	-	-

**E :** Souches isolées à partir de moules d'élevage / **S :** Souches isolées à partir de moules sauvages

# Conclusion

## Conclusion

L'étude de la résistance de nos souches aux antibiotiques dans la ferme ORCA marine et celles du Bateau cassé a confirmé le fait que l'utilisation d'antibiotiques tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire provoque l'émergence puis la dissémination de bactéries fécales antibiorésistantes. L'existence de souches multirésistantes d'*E.coli* indique que d'autres bactéries d'origine fécale antibiorésistantes potentiellement pathogènes y sont potentiellement présentes. Un risque sanitaire est donc présent étant donné que les possibilités de traitement des infections causées par ces microorganismes s'en trouvent amoindries.

Sur une collection de 30 coliformes, plus de 53% des souches ont été résistantes à l'amoxicilline suivies des tétracyclines (43,33%) et les sulfamides (33,33%).

Les souches retrouvées dans le site sauvage ont présenté des taux de résistance plus élevés pour la plus part des molécules (amoxicilline, kanamycine, sulfamides, triméthoprime, association triméthoprime/sulfaméthoxazole, tétracyclines, chloramphénicol).

Les gènes de bêta-lactamases retrouvés ont été *bla<sub>TEM</sub>* chez 4 *E.coli*, *bla<sub>SHV</sub>* chez 1 *K.pneumoniae* et 8 *E.coli* dont 4 autotransférables. Une bêta-lactamase à spectre élargi de type CTX-M autotransférable a été trouvée chez une souche de *K. pneumoniae*

Cette étude préliminaire a mis en évidence que la résistance aux antibiotiques retrouvée dans les deux sites est pratiquement la même avec des taux un peu plus élevés dans le site sauvage. De plus, la présence dans le site d'élevage de bactéries fécales avec des mécanismes acquis dont le plus redoutable est la production de l'enzyme CTX-M montre l'ampleur du problème sanitaire émergent et impose un suivi de l'état de la résistance dans cette région afin de chercher l'origine de cette pollution et préserver le milieu conchylicole.

En perspective, il serait intéressant de compléter cette étude par la caractérisation des mécanismes de résistance à d'autres familles à savoir les quinolones, de déterminer la phylogénie et la virulence de ces souches.

# Bibliographie

## Références bibliographiques

### A

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

**Alouache S., Kada M., Messai Y., Estepa V., Torres C. et Bakour R., (2012) :** Antibiotic resistance and extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Isolated Bacteria from seawater of Algiers beaches (Algeria). *Microbes. Environ* **27**: 80-86.

**Anonyme 1., (2005) :** Valeur nutritive : [www.passeportsante.net](http://www.passeportsante.net)

**Anonyme 2., (2011) :** Impacts des substances pharmaceutiques sur l'eau et les milieux aquatiques. [www.archimer.ifremer.fr /doc /Bolcaly Mellissa, 2010. pdf.](http://www.archimer.ifremer.fr/doc/Bolcaly%20Mellissa,%202010.pdf)

**Anonyme 3., (2010) :** pharmaetude : [www.24-Bêta-lactamines. com /pdf.](http://www.24-Bêta-lactamines.com/pdf)

**Arlet G. et Philippon A., (2003) :** Les nouvelles bêta-lactamases à l'aube du troisième millénaire. *Revue française des laboratoires* **352** ; 41-55.

### B

**Barrial K. et Scotet J., (2006) :** Classification raisonnée des  $\beta$ -lactamases chez les bacilles à Gram négatif. Perspectives d'évolution. *DES bactériologie Université de Lyon1.*

**Brisou J., Vargues H. et Cadeillan J., (1962) :** La consommation bactérienne des moules de la baie d'Alger. *Arch.Inst.Pasteur d'Alger* : 210-219p.

**Boudjama A. et Ourari S., (2005) :** Description du centre conchylicole pilote du CNDPA et proposition d'un plan de gestion. Mémoire d'ingénieur (option aquaculture). ISMAL : 51p.

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

**Bradford A.P., (2001):** Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21<sup>st</sup> centry: "Characterisation, Epidemiology, and detection of this important resistance threat". *Clin Microbiol Rev.* **14**:9333-51.

**Bryskier A., (1999) :** Antibiotique agent antibactérien et antifongique. Edition Ellipses : 436-440p.

**Bush K. Jachoby G.A. et Medeiros A.A., (1995):** A functional classification schema for  $\beta$ -lactamases and correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agent Chemother.* **39**:1211-1233.

## C

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

**Cavallo J.D., Fabre R., Jalhi F., Rapp C. et Garrabé E., (2004) :**  $\beta$ -lactamases (b $\beta$ -lactam antibiotics).EMC-Maladies infectieuses 1 :129-202.

**Cerbom., (1964) :** Pollution marine par les micro-organismes et les produits pétroliers. Symposium de Monaco.

**Charlier P. et al., (1998) :** Résistance bactérienne aux b $\beta$ -lactamines. Médecine/Science. 14 : 544-55.

**Chevalier P., (2003) :** Coliforme totaux. Fiches synthèse sur l'eau potable et la santé humaine, Institution national de santé publique de Québec : 4p.

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

**Clausen J., wolkoff P. et Wilkins C.K., (1977) :** Situation mondiale des pêches et de l'aquaculture. Université de Californie. Edition maritime, Vol 61 ; 1246-1257.

**Colmen K. et al., (1994) :** Bacterial resistance mechanisms as therapeutic targets. Journal of antimicrobial chemotherapy 33:1094-1116.

**Colwell R.R., (1987) :** Journal d'application bactériologiques.63-1p.

**Courvalin P., Goldstein F., Filippon A. et Sirot J., (1985) :** L'antibiogramme, 1<sup>ère</sup> édition.MCP édition Paris.

## D

**Djediat C., (1993) :** Etude histo-physiologique et ultra structurale de la gonade femelle de *Mytilus galloprovincialis* LMK, Mollusque bivalve lamellibranche. Estimation de la maturité sexuelle de la population. Thèse de magister histo-cytologie (option biologie marine) ; ISN USTHB Alger : 90p.

**Doljeska P., Frolkova M., Florek M., Jamborova I.,Purgertova M., Kuti I., Cizek A., Guenther S. et Literak I., (2011) :** CTX-15-Producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *klebsiella spp.* Isolates in municipal wastewater treatment plant effluents. Antimicrob. Chemother **66** : 2784-2790.

## E

**Elliott L. et Kvernberg J.E., (2000):** Risk assessment used to evaluate the US position on *Listeria monocytogenes* in seafood. Internat. Food Microbiol.**62**; 253-260.

## *F*

**FAO ., (2011)** Vue générale du secteur aquacole national Algérie. Département des peches et de l'aquaculture de la FAO. ([http : www.fao.org](http://www.fao.org)).

## *G*

**Gleeson D. et Gray F., (1997) in Chevalier, (2003):** Biological wastewater treatment (principles, Modeling and Design). Cambridge University Press. 124p.

**Guillaud J.F. et Romana A., (1996) :** La mer et les rejets urbains : 243p.

## *H*

**Hackney H. et Dicharry A., (1988):** Seafood borne bacterial pathogens of marine origin. Food Technol. **42**; 104-109.

**Hiritage J., M'zali F.H., Gascoyne-Binzi D. et Hawkey M.P., (1999):** Evolution and spread of SHV extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram negative bacteria. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. **44**:309-318.

## *I*

**Ibadene H., Messai Y., Alouache S., Verdet V., Arlet G. et Bakour R., (2009) :** Etude moléculaire de la résistance d'*Enterobacter sp* aux céphalosporines à large spectre et aux quinolones dans les hôpitaux d'Alger. 2<sup>ème</sup> Workshop Biotechnologie en santé humaine 08-10 novembre 2009 .USTHB

## *J*

**Jacoby G.A. et Medeiros A.A., (1991):** More extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. Antimicrob. Agents. Chmother. **35** : 1697-1704.

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

**Jarlier V., Nicolas M.H., Fournier G. et Philippon A., (1988):** Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases confiring transferable resistance to newer beta-lactam agents enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. Revue of injection decreases. **10**: 867-878.

**Joradp., (1997):** journal officiel de la République Algérienne et Populaire, Jora dp N° 71, Décret N° 01-139, 1997.

## *K*

**Kerroum K., (2012):** Aquaculture marketing handbook. 54p.

**Kim J., Park Y.J., Kang H.W., Lee S.O. et Lee Y., (2004):** Nosocomial outbreak by *Proteus mirabilis* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases VEB-1 in Korean university hospital, journal of antimicrobial Chemotherapy.56 (6):1144-1147.

## *L*

**Leclerc H., Buttiaux R., Guillaume J. et Wattar P., (1995) :** Microbiologie alimentaire. Edition Doin ; Paris, 228 p.

**Livermore D.M., (1995) :**  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. **In: Heritage J., 1999.**

## *M*

**Manivasagan P., Thilagavathi B. et Saravankumar A., (2011):** Marine medicinal foods, implication and applications-animals and Microbes. Adv. J. Food. Sci.Technol.2: 138-144.

**Marteil L., (1976) :** La conchyliculture française ; 2<sup>ème</sup> partie : Biologie de l'huitre et de la moule. rev. Trav. Inst. Pêches maritimes,40 (2) p : 149-346.

**Matyar F., Arikan B., Kaya A. et Gulnaz O., (2004):** Sorption of basic dyes from aqueous solution by activated sludge. J Hazard Mater.108;183-188.

**Maurin B., (1974) :** Guide des poisons de mer et de pêche. Delachaux et Niestlé, France ; 184-196p.

**Mazières N., (1963) :** Pollutions marines par les microorganismes et les produits pétroliers. Institut scientifique et technique des pêches maritimes. Université de Californie. 384 p.

**Messai Y., Benhasine T., Naim M., Paul G., Bakour R. et Iabadene H., (2008):** Prevalence of  $\beta$ -lactamses, Resistance among *Escherichia coli* clinical isolates hom a hospital in Algeria. Espagnol Quimioterapia. 144-151p.

**Miranda C.D. et Zemelman R., (2002):** Bacterial resistance to Oxytetracycline in Chilean; rev. 31-47p.

**M.P.R.H., (2001) :** Guide de l'aquaculture : 27p.

**Mudryk Y., (2005) :** Effet inhibiteur des antibiotiques sur la croissance des bactéries hétérotrophes. Aquaculture sources in Australia : 16p.

## *N*

**Nadal D. et Von-Graeventiz A., (1993):** Routine detection of inducible beta-lactamases in Gram negative bacilli by means of disk susceptibility testing, journal of microbiology method.1993; 17:283-01.

**Nikaido H., (1992) :** Porins and specific channels of bacterial outer membranes, Mol. Microbial, 6(4): 435-442.

## **P**

**Petrovic M. et Barcelo D., (2007):** Waste Water Treatment and Reuse in the Mediterranean region.vol 14; 116-124.

**Philippon A. et Arlet G., (2005) :** les bêta-lactamases chez les bacilles à Gram négatif ; que de nouveautés en 15 ans. Revue Française des laboratoires 7 : 247-259.

**Pignault A., Hubert B., Dehaumont P. et Quenum B., (1991):** Les toxi-infections alimentaires collectives en 1989.Dulletin Epidermiologique.3 ; 395-400.

**Plusquellec A., Beucher M. et Le gal., (1990) :** Deuxième colloque International de bactériologie marine-IFERMER, actes de Colloques n°3 :541-548p.

**PNUE/OMS., (1977) :** Recommandation pour la surveillance sanitaire des zones côtière à usage récréatif et des zones conchylicoles. Bureau régional de l'OMS pour l'Europe, Copenhague : 186p.

**Poggi R., (1991) :** Impact sanitaire sur des contaminations microbiologiques. La mer et les rejets urbains. IFREMER. Actes de Colloques. N°11.115-548p.

## **R**

**Rocourt J., Jaquet Ch. et Reilly A., (2000) :** Epidemiology of human listriosis and seafoods. Int. J. Food Microbial. 62; 197-209.

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

**Rodier J., Bazin C., Broutin J.P., Chambon P., Champsaur H. et Rodi L., (1996) :** l'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer ; chimie, physico-chimie, microbiologie, biologie, interprétation des résultats. 8<sup>e</sup> édition DUNOD, 1383p.

**Romestaing C., (2006) :** Impacts sur les écosystèmes des résidus de substances médicamenteuses dans les eaux. Office international de l'eau. Paris, 42p.

## **S**

**Sambrook J., Fritsh E.F. et maniatitis T., (1989) :** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.N.Y; 11.

**Saoudi B., (2009).** Prévalence de la contamination par *Escherichia Coli* de la moule ; *mytilus galloprovincialis* dans les golfes de Annaba et de Chétaibi, Mém de poste de graduation spécialisée en aquaculture et ichtyopathologie, ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE VÉTÉRINAIRE –ALGER. 42p.

**Singleton P., (2002):** Bactériologie. Ed Masson, Paris. 158p.

## V

**Vedel G., (1997) :** la lecture interprétative facteur de maîtrise de l'antibiogramme spectro biologie. 16 : 31-38.

**Vedel G., (2005):** Simple method to determine beta-lactam resistance phenotype in *pseudomonas aeruginosa* using the disc agar diffusion test. Journal of Antimicrobial.

**Villeneuve F. et Desire Ch., (1965) :** Zoologie, collection de sciences naturelles par Charle. Desire. Classe de 1 M, BORDAS. 336 p

**Vivares C., (1991) :** Consommer les coquillages est-il dangereux ? Contamination, surveillance et santé publique. La recherche 2. Volume 2 : 540p.

## W

**Witte W., (2000):** Ecological impact of Antibiotic une in animals on different complex microflora environment. International Journal of antimicrobial agents. **14** : 321-325.

## Z

**Zomahoun B., (2005) :** Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées des infections urinaires au laboratoire de microbiologie du centre national hospitalier universitaire-Hubert Koutoukou Maga (C.N.H.U.H.K.M) de Cotonou. Thèse, Université du Mali, Faculté de médecine de pharmacie et d'odontostomatologie.

### Site web

- [www.ZipcodeZoo.com](http://www.ZipcodeZoo.com)
- [www.passeportsante.net](http://www.passeportsante.net)
- [http : www.fao.org](http://www.fao.org)
- [www.24-bêta-lactamines.com.pharmaetude.pdf](http://www.24-bêta-lactamines.com.pharmaetude.pdf)

# Annexes

Souche ATB Ømm des souches	Boite 1						Boite 2					Boite 3							S	A
	AX	ATM	CAZ	IPM	FOX	CTX	FEP	CPO	SSS	TMP	SXT	CIP	PEF	NA	TE	K	CN	C		
	16-21	21-27	19-26	17-24	15-22	23-25	17-24	17-24	12-17	16-20	13-16	22-25	16-22	15-20	17-19	15-17	16-18	23		
<b>S16</b> ( <i>E.coli</i> )	R	R	11 R	38 S	29 S	25 S	39 S	40 S	O R	0 R	0 R	26 S	23 S	17 I	29 S	0 R	20 S	25 S	-	-
<b>E17</b> ( <i>E.coli</i> )	17 S	11 R	14 R	36 S	30 S	30 S	32 S	40 S	0 R	28 S	24 S	34 S	30 S	24 S	29 S	20 S	22 S	28 S	-	-
<b>E2</b> ( <i>E.coli</i> )	16 R	40 S	30 S	36 S	34 S	42 S	42 S	44 S	12 R	36 S	33 S	38 S	34 S	32 S	30 S	28 S	22 S	28 S	-	-
<b>E12</b> ( <i>E.coli</i> )	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
<b>S13</b> ( <i>E.coli</i> )	0 R	40 S	28 S	39 S	26 S	36 S	36 S	36 S	20 S	33 S	28 S	40 S	34 S	28 S	7 R	24 S	26 S	20 R	-	-
<b>S6</b> ( <i>E.coli</i> )	0 R	40 S	28 S	40 S	32 S	36 S	36 S	39 S	14 R	33 S	30 S	26 S	18 I	18 I	8 R	18 S	19 S	24 S	-	-
<b>S7</b> ( <i>E.coli</i> )	0 R	40 S	28 S	38 S	28 S	40 S	40 S	40 S	0 R	0 R	0 R	0 R	28 S	0 R	0 R	0 R	26 S	27 S	-	-
<b>S15</b> ( <i>Kb.p</i> )	8 R	40 S	30 S	36 S	30 S	31 S	31 S	37 S	38 S	32 S	22 S	34 S	32 S	25 S	26 S	22 S	24 S	26 S	-	-
<b>S22</b> ( <i>E.coli</i> )	18 I	40 S	28 S	39 S	30 S	39 S	40 S	40 S	18 S	31 S	28 S	32 S	29 S	0 R	0 R	26 S	28 S	30 S	-	-
<b>S3</b> ( <i>E.coli</i> )	24 S	40 S	S	S	S	S	S	S	34 S	S	S	S	S	S	S	28 S	S	S	-	-
<b>E14</b> ( <i>E.coli</i> )	18 I	40 S	28 S	38 S	26 S	34 S	38 S	36 S	0 R	34 S	26 S	0 R	0 R	0 R	30 S	0 R	20 S	26 S	-	-
<b>S11</b> ( <i>E.coli</i> )	0 R	40 S	30 S	40 S	32 S	38 S	40 S	40 S	0 R	0 R	0 R	40 S	32 S	30 S	9 R	20 S	20 S	30 S	-	-
<b>S20</b> ( <i>E.cloacae</i> )	0 R	40 S	26 S	29 S	0 R	36 S	40 S	40 S	20 R	26 S	21 S	39 S	32 S	24 S	22 S	22 S	22 S	20 R	+ FEP	+ (CAZ-IMP) (CTX-FOX)
<b>E9</b> ( <i>E.cloacae</i> )	0 R	32 S	34 S	30 S	0 R	38 S	38 S	42 S	28 S	32 S	30 S	S	34 S	25 S	26 S	24 S	26 S	30 S	+(ATM CAZ)	+CTX
<b>E8</b> ( <i>E.cloacae</i> )	0 R	7 R	11 R	30 S	0 R	28 S	40 S	42 S	25 S	34 S	30 S	30 S	28 S	13 R	26 S	23 S	28 S	26 S	-	+(CTX-FOX)
<b>E16</b> ( <i>E.cloacae</i> )	0 R	44 S	30 S	38 S	28 S	38 S	36 S	38 S	26 S	30 S	29 S	38 S	36 S	28 S	23 S	22 S	22 S	27 S	-	+(FOX-CTX) (IPM-ATM)

ATB Φmm des souches	BOITE 1						BOITE 2							BOITE 3						S	A
	AX	ATM	CAZ	IP M	FOX	CTX	FEP	CPO	SSS	TMP	SXT	CIP	PEF	NA	TE	K	CN	C			
	16-21	21-27	19-26	17-24	15-22	23-25	17-24	17-24	12-17	16-20	13-16	22-25	16-22	15-20	17-19	15-17	16-18	23			
<b>E13</b> ( <i>E.coli</i> )	22 S	45 S	28 S	37 S	30 S	38 S	36 S	40 S	S	S	34 S	38 S	34 S	27 S	0 R	22 S	22 S	28 S	—	—	
<b>E1</b> ( <i>E.coli</i> )	22 S	>40 S	28 S	>40 S	28 S	40 S	>46 S	45 S	S	S	S	40 S	35 S	27 S	0 R	23 S	21 S	28 S	—	—	
<b>E3</b> ( <i>E.coli</i> )	0 R	S	29 S	40 S	28 S	>35 S	>40 S	>40 S	0 R	0 R	0 R	0 R	21 I	0 R	0 R	0 R	20 S	27 S	—	—	
<b>S21</b> ( <i>E.coli</i> )	0 R	42 S	32 S	38 S	30 S	34 S	39 S	40 S	0 R	0 R	0 R	14 R	13 R	0 R	0 R	0 R	27 S	27 S	—	—	
<b>S4</b> ( <i>E.coli</i> )	18 I	40 S	28 S	36 S	30 S	38 S	40 S	40 S	34 S	32 S	36 S	36 S	36 S	28 S	27 S	23 S	22 S	26 S	—	—	
<b>E6</b> ( <i>E.coli</i> )	18 I	40 S	22 I	36 S	30 S	36 S	36 S	40 S	27 S	30 S	30 S	34 S	30 S	29 S	0 R	23 S	21 S	25 S	—	—	
<b>S2</b> ( <i>E.coli</i> )	15 R	>40 S	30 S	36 S	26 S	26 S	40 S	40 S	32 S	34 S	34 S	38 S	34 S	28 S	26 S	26 S	26 S	24 S	—	—	
<b>E18</b> ( <i>E.coli</i> )	24 S	>40 S	28 S	39 S	32 S	38 S	40 S	>40 S	30 S	34 S	32 S	36 S	32 S	28 S	25 S	26 S	26 S	29 S	—	—	
<b>E11</b> ( <i>E.coli</i> )	0 R	40 S	28 S	38 S	30 S	38 S	38 S	40 S	0 R	0 R	0 R	24 S	20 S	0 R	0 R	0 R	26 S	24 S	—	—	
<b>S1</b> ( <i>E.coli</i> )	20 I	38 S	28 S	32 S	28 S	39 S	38 S	40 S	30 S	30 S	34 S	38 S	34 S	28 S	25 S	25 S	30 S	28 S	—	—	
<b>E7</b> ( <i>E.coli</i> )	20 I	44 S	30 S	40 S	30 S	40 S	40 S	40 S	S	S	34 S	44 S	32 S	30 S	28 S	26 S	26 S	26 S	—	—	
<b>S9</b> ( <i>E.coli</i> )	0 R	S	28 S	>40 S	30 S	38 S	>40 S	>40 S	0 R	0 R	0 R	>40 S	36 S	29 S	0 R	30 S	28 S	28 S	—	—	
<b>S12</b> ( <i>E.coli</i> )	20 I	42 S	30 S	40 S	30 S	40 S	36 S	36 S	22 S	0 R	0 R	38 S	34 S	34 S	7 R	0 R	22 S	24 S	—	—	
<b>E5</b> ( <i>K.pneumoniae</i> )	0 R	31 S	20 I	32 S	30 S	23 S	32 S	28 S	30 S	S	32 S	34 S	32 S	30 S	30 S	24 S	20 S	30 S	FEP	—	

ATB \ Souche	AX	CTX	AMC	NA	FEP	CAZ	TZP	SSS	TMP	SXT	TE	K	TMP	S	A
E5 TC1	0	29	0	8	40	30	31							-	-
E5 TC2	0	28	0	10	37	28	33							-	-
E5 TC3	0	30	0	7	37	28	33							-	-
E11TC2	0			0				18		34	0	28		-	-
E11TC3	0			0				12		34	0	28		-	-
S11TC2	0		0				32	13		35	23			+	-
														SSS-	
														TZP	
S11TC3	0		0				30	11		35	21				-
S16 TC1.TC2.TC3	0		0	0		30	32	0		0		0	40	-	-
S13 TC1.TC3	0			0							0			-	-

ATB : antibiotique      S : synergie      A : antagonisme      TC : transconjugants