

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر و تهيئة الساحل

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



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DU  
MASTER

**La caractérisation de la phylogénie et de la résistance  
aux antibiotiques des souches d'*Escherichia coli*  
isolées à partir de la moule « *mytilus*  
*galloprovincialis* ».**

Elaboré par :

**BELHOCINE Massinissa**

**BOUACHA Chahrazed**

Soutenu le 11-10-2015 devant le jury composé de :

Mme MAOUEL. DJ	maitre assistante A (ENSSMAL)	présidente
Mlle ALOUACHE. S	maitre de conférences B (ENSSMAL)	promotrice
Mme CHAOU. N	maitre assistante A (ENSSMAL)	examinatrice
Mme AMAR. I	maitre assistante A (ENSSMAL)	examinatrice

**Session : septembre 2015**

## **Remerciements**

**Nous remercions DIEU de nous avoir aidé et donner le courage et la curiosité pour effectuer ce travail.**

**Ce travail a été réalisé à l'ENSSMAL en collaboration avec le laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire –équipe de génétique à l'USTHB pour la partie de biologie moléculaire.**

**La réalisation de ce travail a été effectuée grâce à la collaboration de plusieurs personnes qui nous ont apporté leurs soutiens et leur savoir faire afin de nous permettre de travailler dans les meilleures conditions. Nous remercîments s'adressent :**

**Au Dr Alouache . S**

**D'avoir accepté de nous encadrer, nous avons eu l'honneur de réaliser un travail scientifique aussi patient avec vous. merci nous avoir guidés,. Merci pour votre temps fournis pour corriger, diriger et contrôler notre travail. Nous vous exprimons notre gratitude et nos respectueux sentiments.**

**Aux membres de jury :**

**A Madame MAOUEL Dj. Maitre assistante à l'ENSSMAL, d'avoir accepté de présider ce jury de soutenance.**

**A madame CHAOU N. maitre assistante A et à madame AMAR I. maitre assistante A à l'ENSSMAL, d'avoir accepté d'examiner ce travail.**

**Aux ingénieurs de l'ENSSMAL et à madame Nawel pour leur aide. Nous vous exprimons notre haute considération et notre profond respect.**

**A toute personne qui a participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.**

## Liste des figures

<b>Figure I.1</b> : aspect extérieur de la moule.....	14
<b>Figure I.2</b> : aspect intérieur de la moule.....	15
<b>Figure I.3</b> : observation de la ciliature péritriche d'E coli par microscope électronique.....	17
<b>Figure I.4</b> : Les îlots génomiques acquis par transferts horizontaux intégrés dans le squelette génomique bactérien au niveau des gènes codant les ARN de transfert.....	20
<b>Figure I.5</b> : l'arbre phylogénique des groupes A, B2, D, B1 d'E. Coli.....	21
<b>Figure I.6</b> : différents groupes d'Escherichia coli pathogènes.....	23
<b>Figure I.7</b> : principaux facteurs de virulence impliqués dans le développement des processus infectieux chez les ExPEC.....	24
<b>Figure II.8</b> : Dichotomie permettant de déterminer le groupe phylogénétique de souches d' <i>E.coli</i> par amplification génique (PCR).....	41
<b>Figure III.9</b> : illustration de la présence du gène <i>ChuA</i> chez les souches d' <i>E.coli</i> . M : marqueur 100pb DNA ladder, C- : contrôle négatif, ChuA+ : contrôle positif.....	41
<b>Figure III.10</b> : illustration de la présence du gène <i>YjA</i> chez les souches d' <i>E.coli</i> . M : marqueur 100pb DNA ladder, C- : contrôle négatif, YjaA+: contrôle positif. <b>B</b> : souches sauvages, <b>O</b> : les souches d'élevages.....	42
<b>Figure III.11</b> : illustration de la présence du gène TSEp4C chez les souches d' <i>E.coli</i> . marqueur 100pb DNA ladder, C- : contrôle négatif, TSEp4C+: contrôle positif.....	42
<b>Figure III.12</b> : Répartition des groupes phylogénétiques selon le site de prélèvement.....	43
<b>Figure III.13</b> : taux de résistance aux antibiotiques des 24 souches d' <i>Escherichia coli</i> isolées à partir des moules <i>mytilus galloprovincialis</i> sauvages et d'élevages.....	44
<b>Figure III.14</b> : comparaison des taux de résistance aux antibiotiques chez les souches isolées à partir de la moule sauvage (x=13) et à partir de la moule d'élevage (x=11).....	46

## Liste des tableaux

<b>Tableau I.1</b> : les caractères biochimique d' <i>E. coli</i> .....	17
<b>Tableau I.2</b> : pathotypes d' <i>E. Coli</i> en fonction des signes cliniques et des facteurs de Virulence.....	27
<b>Tableau II.3</b> : Les différents antibiotiques en disque utilisés pour l'antibiogramme.....	35
<b>Tableau II.4</b> : liste des amorces utilisées pour la détermination de la phylogénie d' <i>E.coli</i> .....	38
<b>Tableau III.5</b> : Identification des 24 coliformes isolés à partir de moules d'élevages et de moules sauvages.....	40
<b>Tableau III.6</b> : Résultats de la détermination des groupes phylogénétiques.....	43
<b>Tableau III.7</b> : Relation entre le nombre de résistance et le groupe phylogénétique.....	47

## Liste des abréviations

**ADH:** arginine di hydrolase.

**ADN :** Acide désoxyribonucléique.

**APEC:** Avian pathogen E. coli ;

**ARN :** Acide ribonucléique.

**BLSE :** -Lactamase à Spectre Etendu

**CA-SAFM :** comité de l'Antibiogramme de la Société Française de la Microbiologie.

**CMI :** concentration minimale inhibitrice.

**CNF:** Facteur cytotoxique nécrosant

**DAEC:** Escherichia coli à adhésion diffuse (Diffuse-Adhering Escherichia. Coli).

**DDR :** Cellular DNA-damage Response

**DR :** des structures en répétition directes.

**E:** Escherichia

**EAST:** EnteroAggregative ST

**ECAD:** diffuse adhering E. coli

**ECEH:** Escherichia coli entérohémorragiques(Enterohaemorrhagic Escherichia. Coli)

**ECEI:** E. colientéroinvasifs

**ECEP :** E. colientéropathogènes

**ECET :** E. colientérotoxinogènes

**ECOR :** E. coli Reference Collection

**ExPEC :** E. colipathogènes extra-intestinaux

**Int :** des gènes codant des intégrases.

**IS :** Insertion Sequence.

**LCD :** lysine decarboxylase.

**LPS :** Lipopolysaccharide.

**MLEE** : Multi locus enzyme electrophoresis.

**MLST** : Multilocus sequence typing.

**MO** : la moule d'élevage.

**N** : le nombre.

**NMEC** : Neonatal meningitis E. coli

**ODC** : ornithine décarboxylase.

**PCR** : Polymerase Chain Reaction.

**Pks** : polyketidesynthase.

**PLP** : protéine de liaison à la pénicilline.

**SAT**: secreted autotransport toxin.

**ST**: Entérotoxines thermostable.

**STx** : Shiga-like toxines.

**TBE**: tris- acide borique EDTA

**UPEC**: Escherichia coli uropathogènes.

**UV**: ultra violet

**VAT** : vacuolating autotransport toxin.

**VP** : réaction de voges-proskauer.

<b>Introduction</b>	11
<b>Chapitres I : Recherches bibliographiques</b>	
I.1 La mytiliculture.....	13
I.2 La moule.....	13
I.2.1 Systématique.....	14
I.2.2 Morphologie.....	14
I.2.2.1 Aspect extérieur.....	14
I.2.2.2 Aspect intérieur.....	15
I.2.3 Habitat.....	15
I.2.4 Alimentation.....	15
I.2.5 Les risques liés à la consommation des moules.....	16
I.3 Généralités sur <i>Escherichia coli</i> .....	16
I.3.1 Présentation d' <i>E coli</i> .....	17
I.3.2 Caractères sérologiques.....	18
I.3.3 Organisation du génome et virulence.....	18
I.3.3.1 Squelettes génomiques.....	18
I.3.3.2 Ilots génomiques-îlots de pathogénicité.....	19
I.3.4 Phylogénie, Plasticité et clonalité génomique de l'espèce.....	20
I.3.4.1 Test moléculaire.....	21
I.3.5 Commensalité et pathogénicité.....	22
I.3.5.1 <i>E coli</i> pathogènes extra-intestinaux (ExPEC).....	22
I.3.5.1.1 Facteurs de virulence des ExPEC.....	23
I.3.5.1.1.1 Facteurs de colonisation des muqueuses.....	24
I.3.5.1.1.2 Survie des ExPEC dans les tissus hôtes.....	24
I.3.5.1.1.2.1 Les capsules, outils de protection des ExPEC.....	24
I.3.5.1.1.3 Implication des toxines dans la pathogénicité des ExPEC.....	25
I.3.5.2 Les pathogènes intestinaux.....	25
I.3.5.2.1 <i>E coli</i> entéro- invasifs(ECEI).....	27
I.3.5.2.1.1 <i>E. coli</i> à adhésion diffuse DAEC ou ECEAg.....	28
I.4 La résistance d' <i>Escherichia coli</i> aux antibiotiques.....	29
I.4.1 Résistance aux bêtalactamines.....	29
I.4.2 Résistance d' <i>E. coli</i> aux quinolones.....	30
I.4.3 Résistance d' <i>E. coli</i> aux aminosides.....	32
I.4.4 La résistance d' <i>E. coli</i> aux tétracyclines.....	32
I.4.5 la résistance d' <i>E. coli</i> aux phénicolés.....	32
<b>Chapitre II : Matériel et méthodes</b>	
II.1 Présentation du site.....	34
II.2 présentation des souches.....	34
II.3 Méthodes.....	34
II.3.1 Identification biochimique par galerie API 20 E.....	34
II.3.2 Diffusion en milieu gélosé : antibiogramme.....	35
II.3.3 Détection des bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) : test de synergie.....	36
II.3.4 Détection des Bêta-lactamases inductibles : test d'antagonisme.....	36
<b>4 Extraction de l'ADN.....</b>	37
II.5 Détermination des groupes phylogénétique par PCR.....	37
II.5.1 Principe de la PCR.....	37
II.5.2 Recherche des groupes phylogénétiques.....	38
II.5.3 Mélange réactionnel.....	38

II.5.4 Conditions de PCR.....	38
II.6 Électrophorèse.....	39
<b>Chapitre III : Résultats et discussion</b>	
III.1 Identification de l'espèce.....	41
III.2 Classification phylogénique des souches d' <i>Escherichia coli</i> .....	40
III.3 Résistance aux antibiotiques des souches.....	44
III.4 Relation entre les groupes phylogéniques et la résistance aux antibiotiques.....	46
<b>Conclusion</b> .....	50
<b>Références bibliographiques</b> .....	51
<b>Annexe</b> .....	58

## Introduction

Les moules sont des bio-accumulateurs des bio-toxines, la consommation de ces derniers peut causer des intoxications sévères et surtout quand le germe présente une résistance vis-à-vis aux antibiotiques, ce qui entraîne un échec thérapeutique. 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, elles ont été décrites chez la plupart des souches cliniques d'origine humaine ou animale, tandis que l'on ne dispose pas beaucoup de données concernant leur devenir une fois que les bactéries sont émises dans l'environnement marin.

*Escherichia coli* est l'espèce type du genre *Escherichia* qui a été découvert en 1885 par **THEODOR ESCHERICH**, c'est un indicateur de pollution Sa présence dans les eaux de consommation ou les aliments constitue un risque non négligeable pour la santé humaine.

Au début de son histoire, le problème qui se pose est de savoir si le germe est un saprophyte banal ou un redoutable pathogène puisque il est retrouvé aussi bien chez des sujets sains au niveau de la flore intestinale que chez des sujets malades.

Le fond génétique des souches a une relation étroite avec la virulence et la résistance aux antibiotiques de ces souches. Actuellement, les souches pathogènes sont retrouvées parmi les groupe B2 et D. Et le problème est d'autant plus grave lorsque ces souches pathogènes sont résistantes aux antibiotiques.

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à la caractérisation des souches d'*E. coli* isolées à partir des moules sauvages et des moules d'élevages, et de déterminer leurs groupes phylogénétiques et leurs profils de résistance aux antibiotiques.

Pour se faire, nous avons adopté le plan suivant :

- ✓ L'identification bactérienne.
- ✓ La détermination des groupes phylogénétique des souches d'*Escherichia coli*.
- ✓ Etude de la sensibilité aux antibiotiques

# **Chapitre I**

## **Recherches bibliographiques**

## **Chapitre I : La caractérisation de la phylogénie et de la résistance aux antibiotiques des souches d'*Escherichia coli* isolées à partir de la moule « *mytilus galloprovincialis* ».**

---

L'aquaculture algérienne connaît actuellement un grand essor en matière de production. Depuis la création du Ministère de la Pêche et des Ressources Halieutiques en 2000, plusieurs plans et programmes de développement ont été élaborés permettant ainsi le démarrage de plusieurs projets privés d'aquaculture dans différentes filières d'activité. La production aquacole actuelle provient de:

- La pisciculture marine en bassin et en cages flottantes pratiquée par des opérateurs privés.
- La pêche continentale, La pisciculture intégrée à l'agriculture, La pêche lagunaire en eau saumâtre et en eau douce dans l'Est du pays, et la conchyliculture pratiquée par des opérateurs privés produisant quelques dizaines de tonnes de moules méditerranéennes et d'huîtres creuses. **(Boutouchent et Milla, 2005)**

### **I.1 la mytiliculture :**

C'est une activité aquacole qui s'intéresse principalement aux moules de la famille des Mytilidés, l'espèce la plus cultivée en Méditerranée est *Mytilus galloprovincialis*. La mytiliculture est pratiquée en mer, dans des filières mytilicoles, bouchots ou tables mytilicoles.

En Algérie, les principales actions dans le domaine de la mytiliculture ont été :

- En 1921, création de la station de Bou-Ismaïl (Est d'Alger) avec pour objectifs en matière d'aquaculture dont le but est de Déterminer les meilleures méthodes et lieux pour la pratique de l'ostréiculture (*Crassostrea gigas*) et de la mytiliculture (*Mytilus galloprovincialis*).
- En 1940, début de l'exploitation des lacs de l'Est du pays (Mellah, Oubeira et Tonga) avec installation de bordigues, pêche et exploitation de mollusques (*Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea gigas*, *Ruditapes decussatus*). **(Boutouchent et Milla, 2005)**

Actuellement, la conchyliculture est pratiquée par des opérateurs privés produisant quelques dizaines de tonnes de moules méditerranéennes et d'huîtres creuses. Selon la FAO (2015) ; la production de *mytilus galloprovincialis* est augmentée jusqu'à 114 115 tonnes en 2012.

## **I.2 La moule :**

Les moules sont des mollusques appartenant à la classe des bivalves ou lamellibranches. Elles font partie de la famille des mytilidés dont les membres se distinguent par leurs valves égales, un ligament presque toujours externe, une charnière sans dent (ou avec des dents très réduites), des branchies à filaments séparés, un pied allongé et un byssus (**Marteil, 1976**).

### **I.2.1 systématique de la moule :**

Embranchement	Mollusques
Classe	Lamellibranches
Ordre	Pteriomorpha
Famille	Mytilidés
Genre	Mytilus
Espèce	<i>Mytilus galloprovincialis</i> ( <b>Lamarck, 1819</b> ).

### **I.2.2 Morphologie :**

#### **I.2.2.1 Aspect extérieur:**

La coquille, plus ou moins renflée, pointue à l'une des extrémités et arrondie à l'autre, comprend deux valves égales, l'une droite et l'autre gauche, unies par un ligament situé le long de la charnière dorsale. La partie antérieure du mollusque correspond à l'extrémité rétrécie (le crochet) de la coquille, la partie postérieure à la région arrondie. (**Marteil, 1976**).



**Figure 1** : aspect extérieur de la moule (**Boughachiche et SI Abdallah, 2011**).

### **I.2.2.2 Aspect intérieur:**

L'intérieur des valves est lisse et bleuâtre. On peut y distinguer les points d'insertion des différents muscles : muscles adducteurs qui relient le corps de l'animal à sa coquille, muscles rétracteurs du pied, etc... L'insertion des fibres musculaires qui relèvent les bords libres du manteau se traduit par une ligne ou impression palléale qui joint les impressions des adducteurs (**Marteil, 1976**).



**Figure 2** : aspect intérieur de la moule (**Bouaghachiche et SI Abdellah, 2011**).

### **I.2.3 Habitat :**

La moule vit fixée par son byssus sur des fonds durs très variés, dans la zone littorale et à de faibles profondeurs. Sa répartition bathymétrique est limitée vers le bas dans l'infralittoral (**Marteil, 1976**).

### **I.2.4 Alimentation :**

La moule ingère la plupart des particules présentes dans le milieu qui l'entoure : diatomées, dinoflagellés détritiques organiques, bactéries, flagellés et protozoaires divers, spores, fragment d'algues, débris inorganique (**Marteil, 1976**). La collecte des particules en suspension dans l'eau est assurée par les branchies.

---

### **I.2.5 Les risques liés à la consommation des moules :**

Les moules filtrent des quantités considérables d'eau et concentrent les polluants en particulier les bactéries et les algues microscopiques toxiques ou non, ils sont donc sensibles aux conditions d'environnement et à la pollution des eaux où ils sont ramassés (**Christiane et Jean-Noël, 2010**).

La consommation importante des moules dans le monde nous amène à prendre en compte les problèmes de la santé publique qu'elle pouvait entraîner.

Les maladies pouvant survenir à la suite d'ingestion de coquillage, ont de nombreuses étiologies : bactériennes, virales (hépatites), parasitaires, chimique (métaux lourds, pesticide) et phytoplanctoniques (toxines) (**Stablo, 1998**).

En 1990, plus de deux cent cas ont été enregistrés en France à la suite de la consommation de moules importées du Danemark (**Vivares, 1991**).

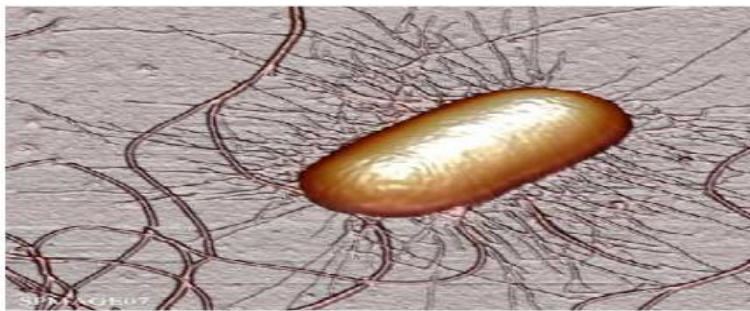
En juin 2001, dans le même pays, plus de cent malades ont été déclarés suite à une consommation de moules en provenance de deux zones de productions Irlandaises (**Haeghebaerts et al., 2002**).

Nous nous intéresserons dans cette synthèse à un agent bactérien très important dans le contrôle sanitaire de la moule. Il s'agit d'*Escherichia coli* : un germe commensal qui peut être parfois très pathogène.

### **I.3 Généralités sur *Escherichia coli* :**

#### **I.3.1 Présentation d'*E. Coli* :**

C'est une bactérie de 2 à 3  $\mu\text{m}$  de long et de 0,5  $\mu\text{m}$  de large, communément retrouvée dans les intestins des mammifères, y compris l'homme. Elle est généralement commensale mais peut être considérée pathogène. Elle appartient à la famille des entérobactéries. Les sept critères définissant classiquement cette bactérie sont : un gram négatif, une culture facile, l'absence d'oxydase, la capacité de réduire les nitrates, aéro-anaérobie facultative, la capacité de fermenter le glucose et leur mobilité grâce à la possession d'une ciliature péritriche. (LeMinor, 1990).



**Figure 3** : observation de la ciliature péritriche d'*E coli* par microscope électronique. ([www.globepharma.org](http://www.globepharma.org)).

*E. coli* appartient :

Règne : Procaryotae

Phylum : Proteobacteria

Classe : Gammaproteobacteria

Ordre : Enterobacteriales

Famille : Enterobacteriaceae

Genre : Escherichia

Espèce : *Escherichia coli* (([www.globepharma.org](http://www.globepharma.org))).

**Chapitre I** : La caractérisation de la phylogénie et de la résistance aux antibiotiques des souches d'*Escherichia coli* isolées à partir de la moule « *mytilus galloprovincialis* ».

Les principaux caractères biochimique sont : absence de production d'oxydase, fermentation de lactose , production d'indole, absence de croissance sur le citrate et pas de production H<sub>2</sub>S, (orskov et Genus,1986), le reste des caractères sont indiqués dans le tableau (1)

**Tableau 1** : les caractères biochimique d'E. coli (orskov et Genus, 1986).

Tests biochimiques	E.coli
B-galactosidase	+*
Uréase	–
Gaz en glucose	+
Indole	+
LDC**	D
ADH**	–

+\* : positif pour 90% à 100% des souches, \_ : négatif pour 90% à 100% des souches.

**d** : variable selon les souches.

**LCD \*\*** : lysine decarboxylase, **ADH** : arginine di hydrolase.

**ODC** : ornithine décarboxylase, **VP** : réaction de voges-proskauer

### **I.3.2 Caractères sérologiques :**

D'un point de vue épidémiologique, il est essentiel de pouvoir différencier les isolats d'*E. coli*. Les travaux de Kaufman ont permis d'établir une première classification d'*E. coli* fondée sur l'étude des antigènes de surface. Trois antigènes de surface sont décrits et pris en compte (Orskov et Genus, 1986) :

**Les antigènes O somatiques** : Sont de nature lipopolysaccharidique et ils forment une partie de la membrane externe de la paroi bactérienne.

**Les antigènes K capsulaire**, Correspondent à la capsule polysaccharidique.

**Les antigènes H flagellaire**, sont associés aux protéines des flagelles et sont également variés, leur identification permet de déterminer le sérotype d'une souche de colibacille.

### **I.3.3 Organisation du génome et virulence :**

L'organisation chromosomique entre les bactéries proches est globalement conservée, Mais il existe une grande variabilité génomique entre des bactéries d'une même espèce ou d'un même genre. Toutes les bactéries sont capables d'évoluer par modification (gain ou Perte) de matériel génétique, causée par des recombinaisons génétiques ou des mutations, et de transmettre ces modifications verticalement aux générations suivantes (Sylvie, 2010).

#### **I.3.3.1 Les squelettes génomiques :**

L'analyse comparative des différents génomes disponibles à ce jour confirme une variabilité de taille des génomes au sein de l'espèce *E. coli*. La plupart des souches pathogènes possèdent des génomes de plus grande taille par rapport à ceux des souches commensales (Sylvie, 2010). Le génome de la souche d'*E. coli* K-12 séquencée en 1997 est constitué de  $4,7 \times 10^6$  paires de bases (4 200 protéines codées). Certains gènes codants pour des fonctions essentielles, sont communs à toutes les souches d'*E. coli* et définissent le squelette génomique (Welch et al., 2002). L'analyse de ces gènes permet d'étudier les relations génétiques entre espèces. Cependant le nombre de gènes constituant ce squelette dépend principalement du nombre et de la diversité des organismes comparés (Sylvie, 2010).

### I.3. 3.2 Ilots génomiques- îlots de pathogénicité :

Les gènes de virulence des bactéries pathogènes peuvent se localiser sur des éléments génétiques transmissibles tels que les transposons, les plasmides ou les bactériophages. En outre, ces gènes peuvent faire partie de régions particulières du chromosome bactérien qu'on appelle « îlots de pathogénicité ». Ces îlots sont présents dans le génome des souches pathogènes de certaines espèces mais absents ou rarement présent chez les souches non pathogènes de la même espèce. Ils contiennent de large régions d'ADN (jusqu'à 200 Kb d'ADN) et souvent ils appartiennent à la classe des Ilots génomiques, figure 5 (Dobrindt et al., 2004), Par définition, les îlots génomiques sont des zones possédant des caractéristiques différentes du reste du génome :

- Région génomique de grande taille (entre 10 et 200 kilo bases).
- GC% pouvant être différent. Ceci atteste d'une origine exogène et facilite leur Identification.
- Sites spécifiques d'intégration, fréquemment situés dans des régions qui codent pour les ARN de transfert.
- Bornés par des séquences répétées directes de 9 à 136 Pb créées par recombinaison lors de l'intégration de l'îlot. Il faut noter que certains îlots ont perdu les éléments ayant permis leur intégration, ainsi ils ne sont plus capables d'être transférés ce qui explique leur spécificité au sein de certains pathovars.
- Présence de gènes de mobilité fonctionnels ou le plus souvent cryptiques tels que IS, transposons et intégrons. Ainsi les îlots peuvent provoquer divers réarrangements moléculaires par recombinaison et augmenter leur diversité. (Sylvie, 2010)

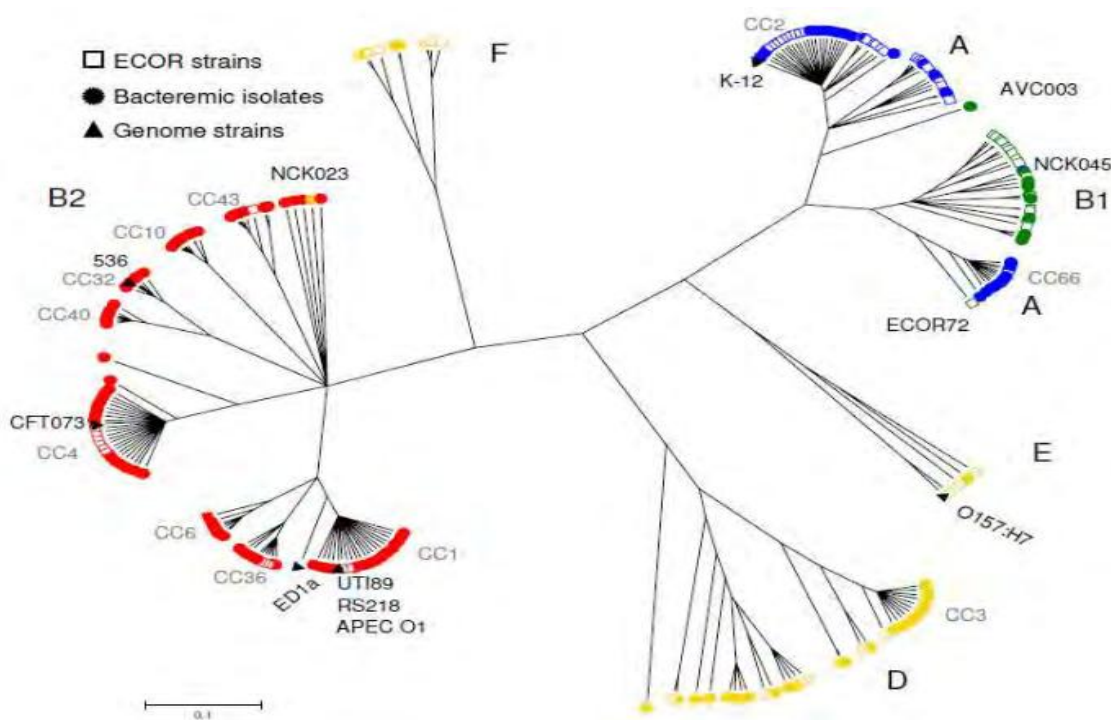


**Figure 4:** Les îlots génomiques sont acquis par transferts horizontaux et généralement intégrés dans le squelette génomique bactérien au niveau des gènes codant les ARN de transfert. Ces îlots sont bordés par des structures en répétition directe (DR) et comprennent différents gènes, notamment des séquences d'insertion (IS) et des gènes codant des intégrases (int) impliqués dans leur mobilité (Dobrindt et al., 2004).

### I.3.4 Phylogénie, Plasticité et clonalité génomique de l'espèce :

*Escherichia coli* est l'une des espèces bactériennes présentant une très forte plasticité génomique. Elle s'adapte entre son habitat primaire, l'intestin des vertébrés, où elle vit comme commensale, et son habitat secondaire, l'eau et les sédiments. Le répertoire total de gènes de l'espèce est supérieur à 10 000. La majorité des souches, porte environ 4 721 gènes, et seulement 1 976 gènes appartiennent au fond commun. (Tenailon et al., 2010).

Ainsi, la diversité phénotypique observée est le résultat d'un grand nombre de combinaisons de gènes. Outre le flux de gènes important, des études basées sur l'analyse du polymorphisme électrophorétique d'enzymes métaboliques (multilocus enzyme electrophoresis ou MLEE) ont montré que *E. coli* était une espèce clonale. Cette espèce appartient à neuf sous groupes phylogénétiques avec la délimitation claire au moins de six principaux groupes phylogénétiques (A, B1, B2, D, E et F) (figure 6), (Tenailon et al., 2010).



**Figure 5** : l'arbre phylogénique des groupes A, B2, D, B1 d'*E. Coli*. Les Cercles représentent l'analyse de 161 Souches isolées d'une bactériémie; Les carrés représentent 67 Souches ECOR ; et les triangles représentent 7 génomes de référence .En Rouge le groupe B2,En vert le B1,En jaune le D, et en bleu le groupe A.

#### **I.3.4.1 Test moléculaire :**

Historiquement l'espèce *E. coli*, faisant partie de la famille des Enterobacteriaceae, elle a été déterminée à partir de caractères phénotypiques, biochimiques et physiologiques. Aujourd'hui ce sont des techniques basées sur l'utilisation de l'ADN qui permettent une étude génétique des populations et la caractérisation des différentes souches d'*E. coli*.

Depuis la fin des années 90 et l'utilisation des automates permettant le développement du séquençage des gènes, la technique MLST est reconnue comme la plus puissante pour l'étude génétique des populations (**Enright et Spratt, 1999**).

➤ **La technique MLST (Multilocus sequence typing) :**

Elle mesure directement la variation de la séquence ADN dans un groupe de gènes dits « gènes de ménage », connus pour avoir subi peu de recombinaison, caractérisant ainsi les souches par un profil allélique unique.

➤ **La technique MLEE (Multilocus enzyme electrophoresis) :**

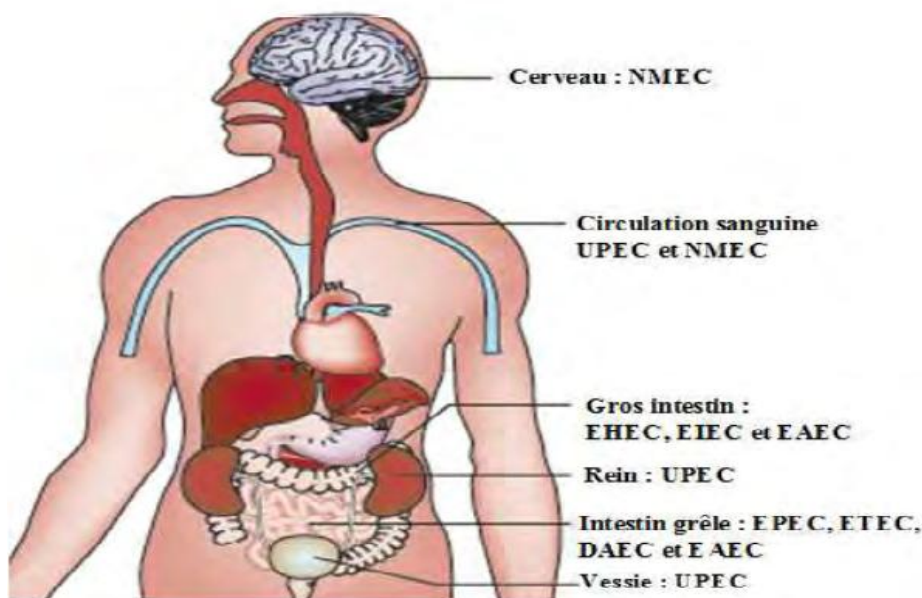
Elle consiste à analyser des variations de mobilité électrophorétique de certaines enzymes bactériennes (isoenzymes). Elle peut être considérée comme une méthode génotypique car les variations de mobilité sont dues à des différences dans la séquence en acides aminés de l'enzyme qui reflètent des différences dans la séquence nucléotidique du gène correspondant. (**Ochman et Selander, 1984**).

Dans l'espèce *E. coli*, différentes études faisant appel à la technique MLST montrent la présence de quatre groupes phylogénétiques majeurs A, B1, B2 et D, ainsi que trois groupes mineurs nommés C, E et F. Leclercq et al. ont pour la première fois en 1998, grâce à cette technique, raciné l'arbre de *E. coli* par comparaison avec un groupe externe *Salmonella enterica* (**Leclercq et al., 1998**). Cette étude a permis aussi de définir le groupe B2 comme le plus ancien des groupes phylogénétiques chez *E. coli*.

Une technique d'amplification par PCR de trois fragments d'ADN (*chuA*, *yjA* et *TSPE4.C2*), PCR triplex, a été mise au point afin de déterminer plus simplement l'appartenance de certains isolats aux quatre groupes phylogénétiques majeurs (B2, D, B1 et A) (Figure 7) (**Clermont et al., 2000**). Cette méthode simple a montré une bonne corrélation avec la technique MLST même si elle est moins précise (**Gordonet al., 2008**).

### **I.3.5 Commensalité et pathogénicité :**

Les souches *Escherichia coli* sont retrouvées dans le tractus gastro-intestinal de nombreux animaux à sang chaud, dont l'homme, où elles jouent communément le rôle de bactérie commensale. Cependant, l'acquisition et la combinaison de facteurs de virulence chez les souches *E. coli* peuvent entraîner des modifications de leur comportement pouvant occasionner diverses infections telles des infections intestinales (**Levine et Edelman, 1984**) ou extra-intestinales (Figure 7).



**Figure 6** : différents groupes d'*Escherichia coli* pathogènes. (**Pohl et Lintermans, 1989**).

#### **I.3.5.1 Les *E. coli* pathogènes extra intestinaux (ExPEC) :**

Les souches ExPEC se caractérisent par leur pouvoir de coloniser d'autres systèmes en dehors du système gastro-intestinal ( **Russo et Johnson ,2000**) et elles représentent un risque sanitaire plus élevé que celui des *E. coli* pathogènes intestinaux. Ce groupe comprend les :

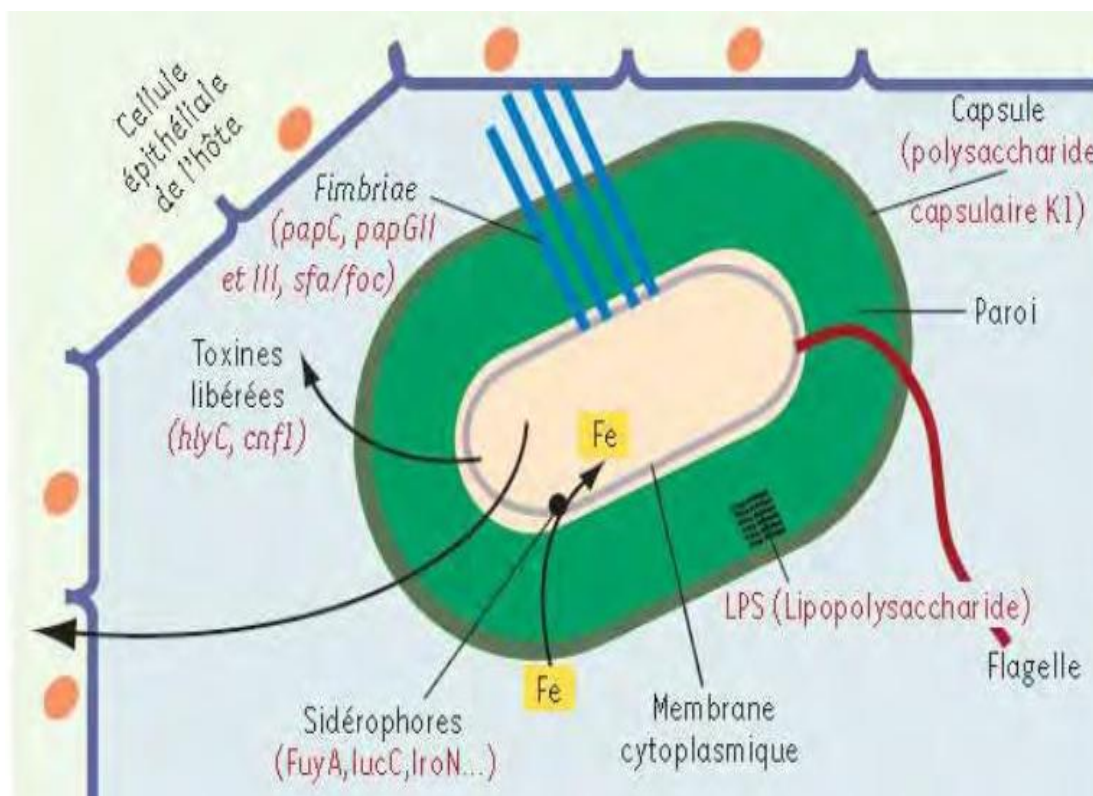
- *E. coli* uropathogènes (UPEC): responsables d'infections urinaires (cystites, pyélonéphrites) (**Stamm et Norrby , 2004**)
- *E. coli* associées à des méningites et des septicémies (neonatalmeningitis
- E. coli* ou NMEC) : qui sont la première cause des méningites.(**Wang et al.,2004**).

- Le pathovar aviaire « Avian Pathogenic *E. coli* » (APEC) : La volaille est considérée comme la principale source animale de contamination des humains par les souches ExPEC. Les APEC (« AvianPathogenic *E. coli* ») possèdent le plus souvent des gènes de virulence semblables à ceux d'ExPEC humain pouvant occasionner des infections chez l'homme (Jauréguy, 2009).

### I.3.5.1.1 Les facteurs de virulence des ExPEC :

Les ExPEC s'opposent aux bactéries pathogènes intestinales par la possession de facteurs de virulence qui leur sont propres. Les ExPEC sont distribués principalement dans le groupe phylogénétique B2, et dans une moindre mesure dans le groupe D.

La virulence des souches ExPEC est un processus basé sur de multiples facteurs génétiques dont la combinaison détermine le niveau de virulence de chaque souche (figure 8) (Johnson et al., 2005).



**Figure 7** : principaux facteurs de virulence impliqués dans le développement des processus infectieux chez les ExPEC (Jauré Guy, 2009).

#### **I.3.5.1.1.1 Les facteurs de colonisation des muqueuses :**

La première étape des infections par les ExPEC est la colonisation des surfaces de l'hôte, c'est-à-dire les muqueuses et la peau. L'adhésion de ces bactéries aux muqueuses est médiée par des structures présentes à la surface de la cellule bactérienne, appelées adhésines, qui interagissent avec des composants présents à la surface de la cellule eucaryote ou à hauteur de la matrice extracellulaire, appelés récepteurs. Il existe différents types (Mainil et Daube, 2005) :

- Les fimbriae de type 1
- Les fimbriae de type P
- Les fimbriae de types S et F1C
- Les adhésines afimbriales et Dr

#### **I.3.5.1.1.2 Survie des ExPEC dans les tissus hôtes :**

Une fois l'étape d'adhésion effectuée, les ExPEC doivent être capables de survivre dans les tissus hôtes afin d'enclencher l'infection. Pour cela des facteurs de nutrition et de protection interviennent :

##### **Les sidérophores, complexes d'acquisition du fer :**

Les ExPEC ont développé des stratégies multiples pour s'approvisionner en fer à partir de la cellule hôte. Parmi ces stratégies, l'expression des systèmes d'acquisition de fer par production de sidérophores (FuyA, IucC, IroN) qui chélate le fer de l'environnement. Le complexe sidérophores-fer reconnaît spécifiquement un récepteur dans l'espace périplasmique, créant un pore permettant le passage du complexe dans le périplasme et la libération des ions ferriques (Johnson, 1991).

##### **I.3.5.1.1.2.1 Les capsules, outil de protection des ExPEC :**

Certaines bactéries afin d'échapper à la réponse immunitaire sont capables de synthétiser les polysaccharides capsulaires K1, 2 et 3 (codées respectivement par kpsMTI ou neuC, II et III). De nombreuses études montrent que ce sont de bons marqueurs de l'uropathogénicité. Les souches ExPEC et tout particulièrement les souches « NewbornMeningitis *E. coli* » (MNEC)

sont fréquemment encapsulées. Il a été montré que l'expression de la capsule K1 chez les NMEC permet à ces microbes pathogènes, d'interférer avec l'action du complément et également des bactériophages, de faciliter l'évasion bactérienne de la phagocytose et par conséquent d'augmenter la survie bactérienne dans les cellules endothéliales des vaisseaux du cerveau (Pluschke et al., 1983).

### **I.5.1.1.3 Implication des toxines dans la pathogénicité des ExPEC :**

Les principales toxines produites par les *E.coli* ExPEC sont les suivantes :

#### **❖ Facteur cytotoxique nécrosant 1 (CNF1) :**

Les toxines de type CNF comprennent une chaîne polypeptidique unique d'environ 115 kDa organisée en trois domaines. Elle entraîne la nécrose de la cellule hôte. (Lemonniet et Lemichez, 2007).

#### **❖ Hémolysine :**

L'Hémolysine, d'origine chromosomique est fréquente pour des souches uro-pathogènes ou responsables d'autres infections extra intestinales humaines. Elle est produite très tôt lors de la croissance bactérienne et forme des pores dans la membrane de la cellule infectée provoquant la fuite ionique puis l'éclatement de la cellule (Lemonniet et Lemichez, 2007).

#### **❖ Les toxines Sat et Vat :**

Récemment, Sat (« secreted autotransport toxin »), un facteur de virulence potentiel d'UPEC, a été identifiée comme l'est aussi Vat (« vacuolating autotransport toxin ») qui entraîne une altération de l'épithélium rénal lors d'infections ascendantes du tractus urinaire. (Liebana et al., 2006)

#### **❖ La Colibactine :**

La colibactine est une toxine codée par un îlot génomique « pks » pour polyketidesynthase. La Colibactine induit des cassures double brins de l'ADN dans plusieurs lignées cellulaires in vitro. Le dommage à l'ADN déclenche la « Cellular DNA-damage Response » (DDR), puis le cycle cellulaire s'arrête dans la transition G2/M et la cellule développe une mégalocytose. (Nougayrede et al., 2006)

---

### I.3.5.2 Les pathogènes intestinaux :

Les souches d'*E. coli* à l'origine de maladies intestinales sont des souches qui se multiplient dans l'intestin de leurs hôtes. Elles se retrouveront donc dans les fèces et par la suite dans les effluents animaux (élevages et abattoirs) et les effluents d'origine humaine. Ils appartiennent pour la plupart aux groupes phylogénétiques A/B1/E (**clermont et olier, 2011**) et sont reconnus comme des agents responsables de syndrome diarrhéique d'origine alimentaire ou hydrique. Ce groupe de pathogènes est subdivisé en 6 pathovars majeurs (**croxen, Finlay ; 2010**) selon le type de maladie engendrée et les facteurs de virulence associés (tableau 2) .

**Tableau 2:** pathotypes d'*E. Coli* en fonction des signes cliniques et des facteurs de virulence (**Mariani et al., 2000**).

Pathotypes	Pathologie	Interaction avec les anthérocytes	Toxines
ECET	Diarrhée aqueuse	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Grêle proximal</li> <li>• adhésion (CFA)</li> <li>• pas de lésion du muqueux plasmidique</li> </ul>	LT ST
ECEP	Diarrhée aigue et chronique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Grêle proximal</li> <li>• adhésion localisée (eae,bfp)</li> <li>• Lésions de la muqueuse sans invasion plasmide EAF</li> </ul>	
ECEH	Diarrhée sanglante, colite hémorragique,SHU .	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Colon</li> <li>• Adhésion (eae)</li> <li>• Lésions de la muqueuse sans invasion plasmide</li> </ul>	Stx
ECEI	Dysenterie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Grêle distal, caecum, colon</li> <li>• Invasion et multiplication dans les entérocytes</li> <li>• Plasmide de virulence (plnv)</li> </ul>	Sh, ET2
ECEAg	Diarrhée aigue et chronique, diarrhée des voyageurs.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adhésion (AAF)</li> <li>• Plasmide 60Md</li> </ul>	EAST

ECAD	Diarrhée aigue et chronique, diarrhée des voyageurs.	❖ Adhésion (AIDA)	
------	--	-------------------	--

### **I.3.5.2.1 *E coli* entéro- invasifs(ECEI) :**

Transmission d'origine alimentaire, hydrique ou interhumaine, l'élément majeur du pouvoir pathogène des ECEI est leur capacité d'invasion de l'épithélium intestinal au niveau du colon. les gènes nécessaires à l'entrée des bactéries dans ce dernier sont porté par un plasmide d'environ 140MDA (Sansonetti, 1992).

#### **I.3.5.2.1.1 *E. coli* à adhésion diffuse DAEC ou ECEAg :**

Une adhésine appelée « agrégative adhérence » (AAF/1), d'origine plasmatique, est impliquée dans l'adhérence bactérienne et codée par deux groupes de gènes portés par un plasmide de 60MDA (Nataro et Kaper, 1998).

##### **➤ ECAD :**

Ces bactéries semblent être responsable de diarrhée, aucune toxine n'a été mise en évidence dans ce pathotype .Deux facteurs d'adhésion ont été associés à ce pathovar : des protéines de membrane externe (dénommée AIDA), et des adhesines de nature fimbriale. ECAD pourrait être le réservoir des souches uropathogènes. (Mariani et al., 2000).

##### **➤ ECEP :**

Le pouvoir pathogène des ECEP se caractérise par une adhésion spécifique entre la cellule bactérienne et la surface de l'entérocyte, cette adhésion s'effectue en deux temps :

- ❖ Les bactéries se lient aux enterocytes à distance par l'intermédiaire de fimbriae de type IV, les pili BFP.
- ❖ Une adhésion entérite à la bordure en brosse des entrocystes, s'accompagnant d'une destruction de celle-ci sans invasion cellulaire, phénomène décrit sous le nom : attachement-effacement A/E(les gènes codant pour les pilis, située sur des plasmides de 60a70 Mda, plasmide EAF). (Mariani et al., 2000).

➤ **ECET :**

ECET sont rare, associée à la production des toxines cytotoxique (LT ou ST) provoquant une sécrétion intestinale accrue d'eau et d'électrolytes sans altération de la muqueuse intestinale. Les gènes de structure ST et LT sont localisés sur des plasmides de haut poids moléculaire. (Mariani et al., 2000)

➤ **ECEH :**

Ce sont des bactéries pathogènes qui se retrouvent dans l'eau et parfois dans les aliments, elles sont responsables de diarrhée, de colite hémorragique et syndrome urémique hémolytique, le serotype O157 : H7 est le fréquent pour les souches EHEC chez l'homme (Nataro, Kaper ; 1998).

Le facteur principal de virulence d'EHEC est la shigatoxine Stx 1 et 2 La shigatoxine tient son nom du fait de sa grande similitude avec une toxine produite par *shigella*, elle est également connue sous le nom de vérotoxine.

L'infection par une souche EHEC chez l'homme peut revêtir plusieurs aspects allant de colites hémorragiques, jusqu'à des atteintes rénales et parfois neurologiques dans les cas les plus graves (Mariani et al., 2000).

#### **I.4 La résistance d'*Escherichia coli* aux antibiotiques :**

Un antibiotique est une molécule naturelle ou bien semi-synthétique qui détruit ou bloque la croissance des bactéries, on parle dans le premier cas d'un antibiotique bactéricide et dans le second cas on parle de bactériostatique.

L'évolution rapide de la résistance bactérienne aux antibiotiques est un phénomène actuellement préoccupant dans les pays en voie de développement où les pathogènes résistants aux antibiotiques peuvent avoir une plus forte prévalence dans certains pays africains (Bonnet, 2004).

L'Algérie est un pays du nord de l'Afrique où les récentes données de résistance aux antibiotiques indiquent une situation inquiétante. En effet, ces dix dernières années ont été marquées par l'émergence et la dissémination de nouveaux gènes de résistance notamment

dans le nord du pays. Les défis majeurs de cette résistance ont été rencontrés principalement chez différentes espèces d'entérobactéries (**Baba ahmed ,2013**).

Selon ses pathovars, *E.coli* peut être une cause fréquente d'intoxication alimentaire facilement traitable par des antibiotiques vue qu'elle est naturellement sensible à la majorité des familles d'antibiotiques actifs sur les bactéries à Gram négatif (**Vedel, 1992**). Cependant, ces dernières années le problème de l'émergence de la résistance aux antibiotiques a été observé vis-à-vis de la majorité de ces molécules.

#### **I.4.1 La résistance d'*E.coli* aux beta- lactamines :**

Les bactéries ont développé différents mécanismes pour s'échapper à l'action des bêta-lactamines (**Walsh, 2003**) :

- Modification de la cible (PLP : protéine de liaison à la pénicilline) qui les rend moins sensibles aux bêta-lactamines mais permet de maintenir son activité physiologique normale.
- Synthèse des enzymes (bêta-lactamases) qui inactivent les bêtalactamines par modification chimique.
- Acquisition ou surproduction des pompes efflux qui peuvent expulser l'antibiotique hors de la cellule même contre le gradient de concentration.
- Modification des porines ayant pour résultat la diffusion plus lente des bêta-lactamines à travers la membrane externe.
- *E. coli* possède une céphalosporinase chromosomique de type AmpC exprimée à très bas niveau de sorte que le phénotype naturel des souches vis-à-vis des bêta-lactamines est un phénotype de sensibilité. Cependant, plusieurs mutations peuvent engendrer une hyperproduction de cette enzyme aboutissant à des CMI beaucoup plus élevées, 32-128 µg/l (**Goldstein, et al ., 2000**) :
  - Modification du promoteur ou du récepteur D' AmpC,
  - Modification de la transcription ou de la régulation.
- En cas d'hyperproduction de cette enzyme, les céphalosporines dites de la première et la deuxième génération voir même le 3<sup>ème</sup> génération sont fortement affectés. (**goldstein et al.,2000**).

- *E. coli* héberge fréquemment des bêta-lactamases extrachromosomiques de type TEM , inhibées par l'acide clavulanique ou le tazobactam. Cependant plus de 30 % de ces souches actuellement moins sensibles à l'action des inhibiteurs à cause d'une hyperproduction de cette enzyme ou bien d'une mutation qui fait diminuer l'affinité de ses inhibiteurs pour l'enzyme : TRI ou IRT. Nous retrouvons également des bêta-lactamases de type SHV ou OXA (Vedel et al.,1992).
- Comme toutes les entérobactéries, *E.coli* héberge également les différents types de BLSE (BLSE dérivant de TEM ou SHV, CTX-M...) ainsi que les céphalosporinases plasmidiques (CMY, DHA.....) (Goldestein et al ., 2000).

#### **I.4.2 Résistance d' *E coli* aux quinolones :**

Plusieurs mécanismes peuvent contribuer à la résistance du *E coli* aux quinolones

(Alekhshun et Levy, 1997 ; Piddock, 1999) :

- ✓ Modification de l'ADN gyrase A ou plus rarement B : ces mutations sont parmi les plus fréquentes et responsables de la résistance de haut niveau (CMI inf à 32 µg /ml) a la ciprofloxacine.
- ✓ Modification de la topoisomérase IV ( parC ou parE) : plus rares , elles surviennent toujours après une première mutation sur la gyrase et sont responsables d'une augmentation de 2 a 3 dilutions de la CMI.
- ✓ Cependant, depuis le début de cette décennie des mécanismes enzymatiques codés par des plasmides transférables ont été observés, tel que la production d'enzymes appelées QNR assurant la protection de la cible. Jusqu'à présent 5 gènes codant des QNR ont été identifiés : qnrA, qnrB, qnrS, qnrC, et qnrD (Choutet et Goldsein, 2000).
- ✓ Augmentation de l'efflux actif
- ✓ Diminution de l'incorporation par diminution de la perméabilité liée a une diminution de certaines porines ou du LPS. (Choutet et Goldstein, 2000).

### **I.4.3 Résistance d' *E coli* aux aminosides :**

La résistance aux aminosides est généralement liée à la présence d'enzymes modifiant les aminosides : acétylases, phosphorylases et adénylases. Ces enzymes sont souvent présentes sur les éléments mobiles (transposons portés ou non par des plasmides).

D'autres mécanismes de résistance sont moins souvent impliqués :

- ✓ Diminution de la perméabilité de la paroi par modification de la structure des lipopolysaccharides
- ✓ Diminution du transport actif au niveau de la membrane cytoplasmique.
- ✓ Modification du ribosome, site d'action des aminosides (**Choutet et Goldstein ,2000**).

### **1.4.4 La résistance d'*E coli* aux tétracyclines :**

Elle est généralement due à un efflux actif, parfois à des mutations sur le gène *marA* responsable d'une résistance à plusieurs familles d'antibiotiques (**Alekshun et Levy, 1997**).

### **I.4.5 la résistance d'*E coli* aux phénicols :**

Elle est lié a la présence d'une acétyl-transférase inactivant l'antibiotique ; plus rarement, modification du gène *marA* (**Alekshun et Levy, 1997**).

# **Chapitre II**

## **Matériel et méthodes**

## **II- MATERIELS ET METHODES**

### **II.1 Présentation du site :**

#### **•La ferme conchylicole « SARL ORCA marine »**

Le site d'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 prélevées les moules sauvages, est situé à ford de l'eau, Bordj EL Kiffan, à l'Est de la wilaya d'Alger, c'est une zone d'agglomération qui contient une plage de baignade qui se situe pas loin de l'embouchure de oued-el Hamiz.

### **II.2 Présentation des souches**

Le travail a concerné 24 souches de coliformes isolés en 2012 à partir de moules « *Mytilus galloprovincialis* » propre à la consommation et récoltées à partir d'un site d'élevage (Ain Chrob) (n=11) et d'un site sauvage situé à bateau cassé (n=13).

### **II.3 Méthodes**

#### **II.3.1 Identification biochimique par galerie API 20 E**

##### **Principe**

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.

## **Chapitre II : La caractérisation de la phylogénie et de la résistance aux antibiotiques des souches d'*Escherichia coli* isolées à partir de la moule « *mytilus galloprovincialis* ».**

---

- 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 à 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.3.2 Diffusion en milieu gélosé : antibiogramme**

L'étude de la résistance de nos souches vis-à-vis de 18 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<sup>8</sup> cellules/ml)
- Plonger un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne
- Ensemencer la boîte en frottant l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée et tournant la boîte trois fois de 60° afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum.
- Appliquer les disques d'antibiotiques (Tableau 3).
- Laisser diffuser pendant 15 minutes, à température ambiante.
- Incuber à 37°C pendant 18-24h.

## Chapitre II : La caractérisation de la phylogénie et de la résistance aux antibiotiques des souches d'*Escherichia coli* isolées à partir de la moule « *mytilus galloprovincialis* ».

### 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 résistante (R) selon les valeurs critiques (CA-SFM, 2011).

**Tableau 3** : Les différents antibiotiques en disque utilisés pour l'antibiogramme

Famille		Antibiotiques	Charge (µg)	Abréviation
Béta-lactamines	Pénicilline	Amoxicilline	25	AX
		Amoxicilline+Clavulanate	20+10	AMC
	Monobactam	Aztréonam	30	ATM
	Céphalosporines de 3 <sup>ème</sup> génération	Céfoxitine	30	FOX
		Cefotaxime	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
	Triméthoprime		5	TMP
	Triméthoprime/ Sulfamethoxazol		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.3.3 Détection des bêta-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 Béta-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.3.4 Détection des Béta-lactamases inductibles : test d'antagonisme :

Ce test permet de mettre en évidence la production d'une céphalosporinase inductible. 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 bêta-lactamine initialement active, grâce à la production d'une céphalosporinase inductible (Vedel, 2005).

## **II.4 Extraction de l'ADN**

### **Principes**

C'est une technique de séparation biochimique par solubilisation préférentielle des molécules dans deux phases liquides non miscibles.

### **Technique**

- Préparer l'inoculum bactérien : 3 à 4 colonies dans 50µl d'eau distillée stérile
- Mettre l'inoculum à 100°C pendant 10min pour la lyse
- Centrifuger à 12000trs/min pendant 3min
- Récupérer le surnageant

## **II.5 Détermination des groupes phylogénétique par PCR**

### **II.5.1 Principe de la PCR**

La « Polymerase Chain Reaction » est une réaction enzymatique qui permet de sélectionner puis d'amplifier en une très grande quantité, un fragment d'ADN particulier présent en très faible quantité au départ (Hoorfart et al., 2004).

La PCR est une suite de cycles (20 à 40 cycles), qui se répètent en boucle, comportant chacun trois paliers de température (Hoorfar et al., 2004).

Chaque cycle comporte les étapes suivantes :

- La phase de dénaturation

Lors de cette étape très courte (environ une minute), une dénaturation d'une séquence cible d'ADN double brin est réalisée entraînant la formation de deux ADN simple brin.

- La phase d'hybridation des amorces

Cette étape permet aux amorces de se fixer des deux côtés du fragment d'ADN simple brin spécifique à amplifier. La température de cette étape est fixée en fonction de la température de fusion ( $T_m$ ) des amorces.

- La phase d'élongation

Lors de cette étape, la synthèse de la séquence d'ADN cible a lieu grâce à une enzyme, la Taq-polymérase. A la fin de ce premier cycle de l'ADN double brin est obtenu et un nouveau cycle peut alors recommencer.

## **II.5.2 Conditions de PCR**

Les réactions de PCR de chaque gène se sont déroulées selon le programme suivant :

Une étape de dénaturation de 94°C pendant 5min puis 30 cycles de PCR constitué chacun d'une étape de dénaturation à 94°C / 30sec, d'hybridation à 55°C / 30 sec et d'élongation à 72°C / 30sec. Enfin, une étape d'élongation finale à 72°C / 7min.

## **II.5.3 Recherche des groupes phylogénétiques**

Les groupes phylogénétique d' *E. coli* ont été déterminés sur la base de l'amplification de trois marqueurs génétiques selon **Clermont et al, (2000)**: *chuA* : gène nécessaire pour le transport de l'hème chez *E.coli* entérohémorragique O157:H7, *yjaA* : gène de fonction inconnue identifié chez *E.coli* K12 et TspE4.C2 : fragment d'ADN anonyme (Tableau 2) Les groupes phylogénétiques sont comme suit: B2 (*chua+*, *yjaA+*), D (*chua+*, *yjaA-*), B1 (*chua-*, TspE4.C2+) ou A (*chua-*, TspE4.C2-) (**Clermont et al., 2000**).

## **II.5.4 Mélange réactionnel**

Les réactions de **PCR** ont été réalisées dans un volume final de 12.5 µl contenant les concentrations finales suivantes :

PCR Master mix 1X (Proméga) .....	6.25 µl
Amorces sens.....	0.25 µM
Amorces antisens .....	0.25 µM
ADN.....	2.5 µl
Eau .....	3.25 µl

## Chapitre II : La caractérisation de la phylogénie et de la résistance aux antibiotiques des souches d'*Escherichia coli* isolées à partir de la moule « *mytilus galloprovincialis* ».

**Tableau 4:** liste des amorces utilisées pour la détermination de la phylogénie *d'E.coli*.

Gène	Séquence d'amorces S'-3'	Taille de l'amplifiat (pb)	Référence
<i>chuA</i>	<b>chuA-F : GACGAACCAACGGTCAGGAT</b> <b>chuA-R : TGCCGCCAGTACCAAAGACA</b>	279	Clermont et al. 2000
<i>ijaA</i>	<b>yjaA-1 : TGAAGTGTCAGGAGACGCTG</b> <b>yjaA-2 : ATGGAGAATGCG1TCCTCAAC</b>	211	
<i>TSPE4.C2</i>	<b>TspE4.C2-1 : GAGTAATGTCGGGGCATTCA</b> <b>TspE4.C2-2 : CGCGCCAACAAAGTATTACG</b>	152	

### II.6 Électrophorèse

L'électrophorèse sur gel est une méthode de séparation des macromolécules en fonction de leur taille, de leur charge électrique et d'autres propriétés physiques (Westermeier, 1997).

Le principe de cette technique est basé sur la migration des amplifiats dans un gel d'agarose (1,2%) de 20cm x 25cm soumis à un courant électrique de 90 volts. Les amplifiats chargés négativement vont migrer vers le pôle positif. La taille des produits d'amplification a été déterminée en utilisant un marqueur de taille de 100pb DNA ladder (proméga). Après migration, une lecture du gel sous ultraviolet est effectuée grâce au bromure d'Ethidium introduit préalablement dans le gel d'agarose (0,5µg/ml). Ce produit possède la propriété d'être fluorescent sous UV.

# **Chapitre III**

## **Résultats et discussion**

## **Chapitre III : La caractérisation de la phylogénie et de la résistance aux antibiotiques des souches d'*Escherichia coli* isolées à partir de la moule « *Mytilus galloprovincialis* ». :**

### **III Résultats et discussion :**

#### **III.1 Identification de l'espèce :**

Les souches qui ont fait l'objet de cette étude sont des coliformes isolés en 2012 à partir des moules sauvages (bateau casé), et des moules d'élevages (ORCA Marine). Leur identification par galerie API20E a révélé l'appartenance de ces souches à l'espèce *Escherichia coli* (tableau 5).

**Tableau 5 :** Identification des 24 coliformes isolés à partir de moules d'élevages et de moules sauvages.

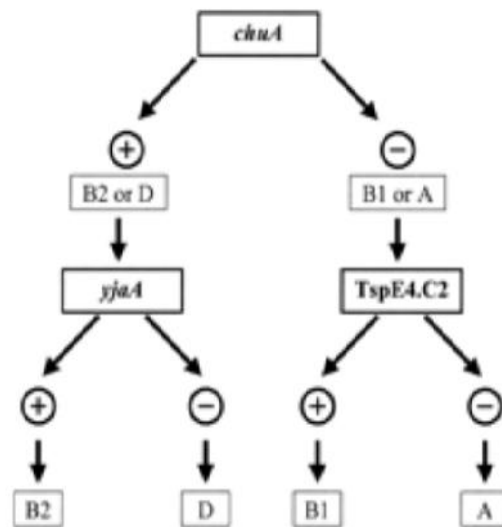
<b>Souche</b>	<b>Numéro de code</b>	<b>Identification</b>
<i>Escherichia coli</i> (MB13)	5044542	Bonne (98.1%)
<i>Escherichia coli</i> (MO1), (MO2), (MO12), (MO18)	5044552	Très bonne (99.8%)
<i>Escherichia coli</i> (MB11)	5044572	Excellente (99.9%)
<i>Escherichia coli</i> (MO11)	5144152	Bonne (97.7%)
<i>Escherichia coli</i> (MB22)	5144500	Très bonne (79.9%)
<i>Escherichia coli</i> (MB12), (MB9), (MB21),	5144552	Excellente (99.9%)
<i>Escherichia coli</i> (MO16)	5144562	Très bonne (99.8%)
<i>Escherichia coli</i> (MB1), (MB3), (MO3), (MO17), (MB7), (MO 14), (MB6), (MB4),), (MO7), MO13),	5144572	Très bonne (99.5%)
<i>Escherichia coli</i> (MB6)	7144572	Très bonne (99.8%)

**MO :** La Moule d'élevage **ORCA** marine **MB :** La Moule sauvage **Bateau** casée.

#### **III.2 Classification phylogénique des souches d'*Escherichia coli* :**

Les souches d'*Escherichia coli* isolées à partir de la moule « *Mytilus galloprovincialis* » peuvent être attribuées à quatre principaux groupes phylogénétiques: A, B1, B2 et D. Cette classification nous a permis de répartir les souches en souches commensales et souches pathogènes.

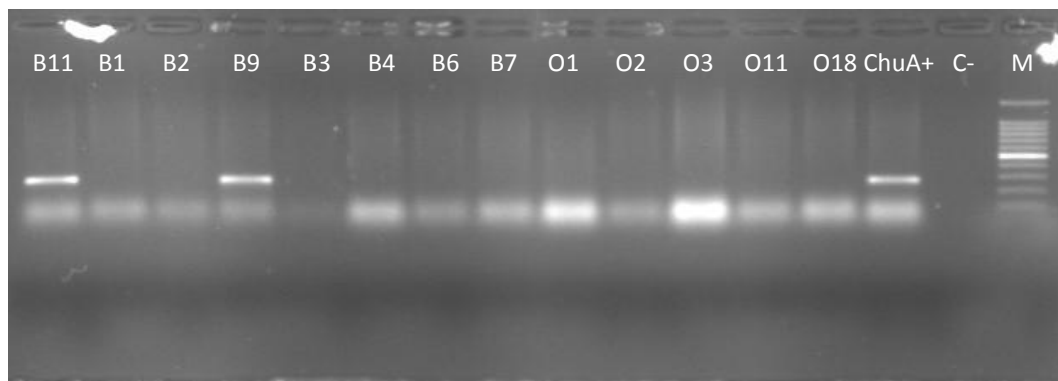
Pour déterminer ces quatre groupes phylogénétiques, une méthode basée sur la détection par PCR de la présence ou de l'absence de deux gènes (*chuA* et *yjaA*) et un fragment d'ADN anonyme (TSPE4.C2), utilisés comme des marqueurs génétiques (figure 9) (Clerrmont et al, 2000).



**Figure 9:** Dichotomie permettant de déterminer le groupe phylogénétique de souches d'*E.coli* par amplification génique (PCR) (Clerrmont et al., 2000).

Après l'identification des souches, l'extraction de leurs ADNs et l'amplification par PCR, l'électrophorèse a montré les résultats suivants :

La présence du gène *chuA* chez les deux souches d'*E.coli* isolées à partir de moules sauvages (MB11, MB9). Ce qui implique que ces deux dernières appartiennent soit au groupe phylogénique D ou B2. (Figure 10).



**Figure 10:** illustration de la présence du gène *ChuA* chez les souches d'*E.coli*. M : marqueur 100pb DNA ladder, C- : contrôle négatif, ChuA+ : contrôle positif. **B** : souches sauvages, **O** : les souches d'élevages.

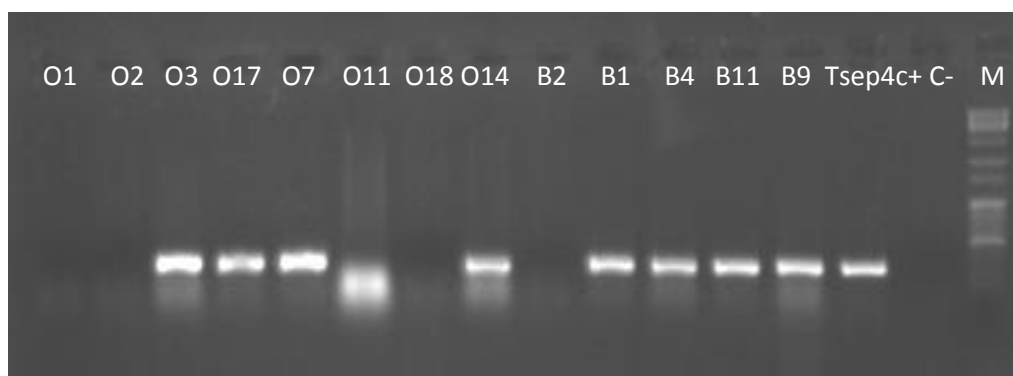
### **Chapitre III : La caractérisation de la phylogénie et de la résistance aux antibiotiques des souches d'*Escherichia coli* isolées à partir de la moule « *mytilus galloprovincialis* ». :**

Les souches (MO12, MO11, MO17, MO1) isolées à partir des moules d'élevages et la souche (MB9) isolée à partir de la moule sauvage, ont montré la présence du gène *yjaA*. La présence de ce dernier chez des souches *chuA*+, nous permet de faire la distinction entre le groupe B2 et D. En effet, la souche MB9 positive pour les deux gènes *chuA*+ et *yjaA*+ est assignée au groupe B2. Par contre la souche MB11 positive seulement pour le gène *chuA*+ est assignée au groupe D. (figure 11) (clermont et al, 2000).



**Figure 11** : illustration de la présence du gène *YjaA* chez les souches d'*E.coli*. M : marqueur 100pb DNA ladder, C- : contrôle négatif, YjaA+: contrôle positif. **B** : souches sauvages, **O** : les souches d'élevages.

Le fragment d'ADN TSPE4.C2 a été retrouvé chez 13 souches (MB1,MB4,MB6 ,MB7, MB9,MB11,MB16 ,MB22, MO3 ,MO7,MO13,MO14,MO17) isolées à partir des moules sauvages et des moules d'élevage (figure11), la présence de ce dernier chez les souches *chuA* négatifs ;nous a permis de les classer dans le groupe B1, alors que les souches TSPE4.C2 négatif seront classées dans le groupe A.( figure 12).



**Figure 12** : illustration de la présence du gène TSEp4C chez les souches d'*E.coli*. M : marqueur 100pb DNA ladder, C- : contrôle négatif, TSEp4C+: contrôle positif. **B** : souches sauvages, **O** : les souches d'élevages

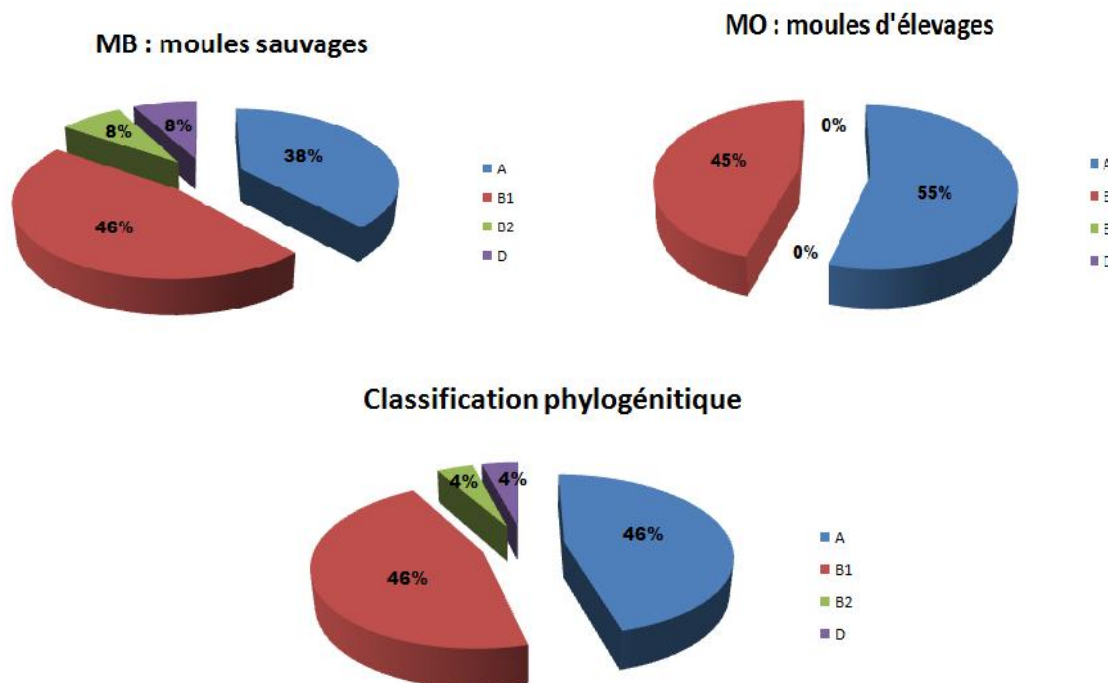
**Chapitre III : La caractérisation de la phylogénie et de la résistance aux antibiotiques des souches d'*Escherichia coli* isolées à partir de la moule « *mytilus galloprovincialis* ». :**

**Tableau 6 :** Résultats de la détermination des groupes phylogénétiques.

Souche	chuA	yja	TSEP4C	Groupe phylogénétique
<b>MB11</b>	+	-	+	<b>D</b>
<b>MB 9</b>	+	+	+	<b>B2</b>
MB 22, MB 16, MB 7, MB 6, MB 4, MB1, MO 13, MO 14, MO 7, MO 17, MO 3	-	-	+	B1
MB 12, MB 21, MB 3, MB 2, MB 13, MO 6, MO 12, MO 11, MO 18, MO 2, MO 1	-	-	-	A

Les groupes de souches commensales A et B1 sont les groupes phylogénétiques les plus répondus (11, 45.83%), quelque soit dans le milieu d'élevage (A : 6- 55% ; B1 : 5- 45%), que dans le milieu sauvage (A : 5- 38% ; B : 6- 46%) (Figure 13).

Les deux groupes phylogénétique pathogènes D et B2 ont été isolées uniquement à partir des moules sauvage (2/13 souches – 8%) ce qui représente au total 8.34% (2/24). (Figure 13).

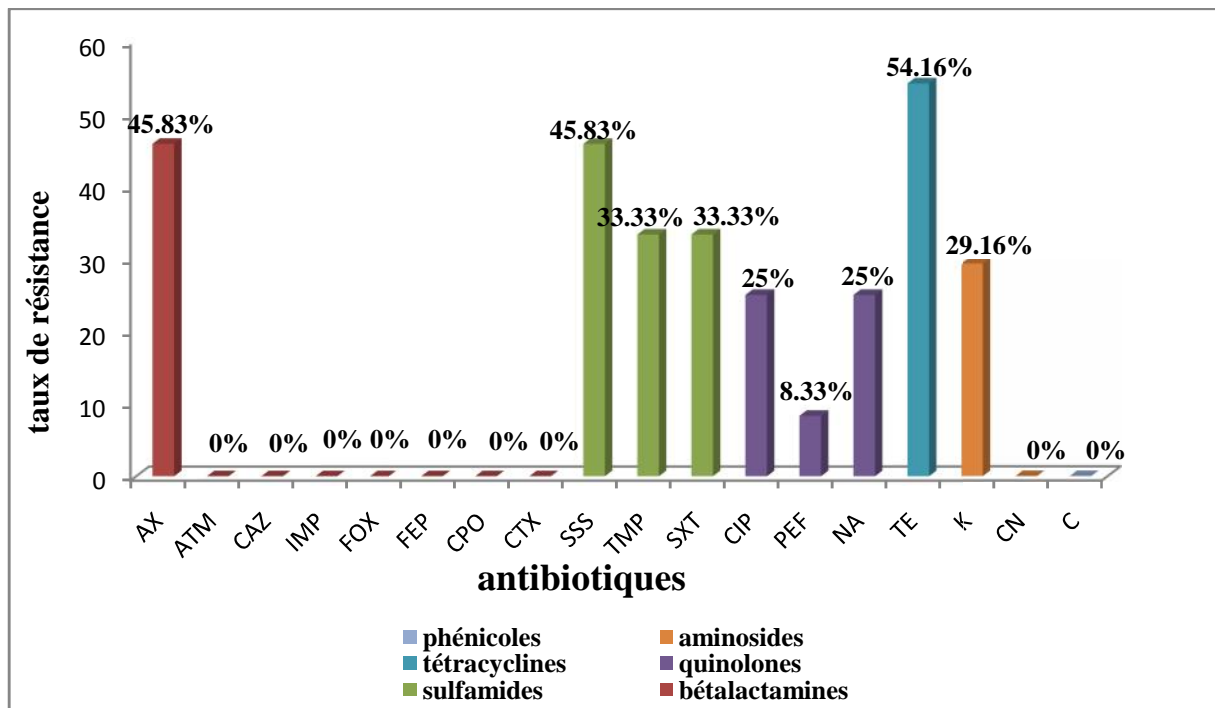


**Figure 13 :** Répartition des groupes phylogénétiques selon le site de prélèvement

### **III.3 Résistance aux antibiotiques des souches :**

La virulence des souches est d'autant plus grave si elle est associée à la résistance aux antibiotiques ce qui entrainerait un échec thérapeutique certain et des pertes économiques.

La résistance aux antibiotiques des souches étudiées a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Les résultats sont présentés dans la **figure 14**.



**Figure 14 :** taux de résistance aux antibiotiques des 24 souches d'*Escherichia coli* isolées à partir des moules *mytilus galloprovincialis* sauvages et d'élevages.

Concernant la résistance aux bêtalactamines, les résultats de la figure (12) ont montré une résistance élevée aux pénicillines (AX : x=11 ; 45.83%).

La totalité des souches ont été trouvées sensibles aux restes des bêtalactamines, tel que :

Aztréonam (ATM : x=0 ; 0%), cefoxitine (FOX : x=0 ; 0%), imipènème (IPM : x=0 ; 0%), céphalosporines de la troisième génération (CTX : x=0 ; CAZ : x=0 ; 0%) et aux céphalosporines de la quatrième génération (FEP : x=0 ; 0%, CPO : x=0 ; 0%).

### **Chapitre III : La caractérisation de la phylogénie et de la résistance aux antibiotiques des souches d'*Escherichia coli* isolées à partir de la moule « *mytilus galloprovincialis* ». :**

---

Les *Escherichia coli* sont naturellement sensibles à l'ensemble des lactamines. Toutefois comme *Shigella*, *Escherichia coli* produit à très bas niveau une céphalosporinase chromosomique qui ne se traduit en pratique par aucun phénotype particulier (**Goldstein et al., 2000**).

D'après l'interprétation de notre antibiogramme, nous avons constaté une résistance d'*E.coli* à l'amoxicilline dans 45.83 % des cas, ce qui explique l'inactivation de cet antibiotique probablement due à l'acquisition de l'enzyme de type pénicillinase par ces souches d'*E.coli*. (**Goldstein et al., 2000**).

L'analyse interprétative de l'antibiogramme ainsi que les tests de synergie et d'antagonisme ont montré l'absence d'enzyme de type BLSE ou de type céphalosporinase ce qui confirme la présence d'enzyme de type pénicillinase chez les souches résistantes à l'amoxicilline.

Concernant la famille des sulfamides, nous avons constaté une résistance élevée aux sulfamides (SSS : x=11 ; 45.83%) , la triméthoprine (TMP : x=8 ; 33.33%) , le complexe triméthoprine-sulfaméthoxazol (SXT : x=8 ; 33.33%). Le plus souvent, la résistance est due à des enzymes plasmidiques : DHPS (sulfamides) et DHFR (triméthoprine) qui modifient la cible de ces antibiotiques (**Goldstein & Stein, 1999**).

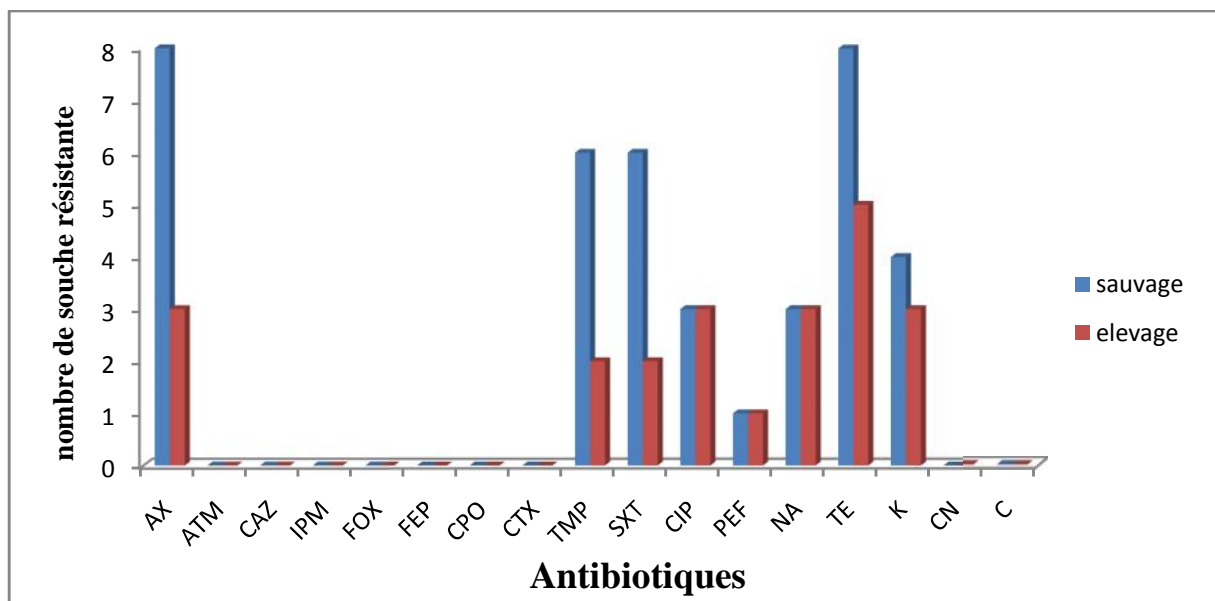
Pour les quinolones, nous avons constaté une résistance de 25 % des souches pour l'acide nalidixique (NA : x=6) et les fluoroquinolones (CIP: x=6) et que 8.33% pour les Pefloxacines. ( PEF : x= 2). Cette résistance est due généralement à la diminution de l'incorporation par diminution de la perméabilité liée à une diminution de certaines porines ou à des mutations chromosomiques (**Piddock, 1999**).

En ce qui concerne les tétracyclines, nous avons constaté une résistance de 54.16% de nos souches (TE : x=13). Elle est généralement due à un flux actif, parfois à des mutations sur le gène marA responsable d'une résistance à plusieurs familles d'antibiotiques (**Alekshun & Levy., 1997**). Pour les aminosides, nous avons constaté que la résistance de nos souches à la kanamycine est de 29.16% (K : x=7) alors qu'une sensibilité totale à la gentamicine a été notée. Généralement, la résistance est due à la présence d'enzymes modifiant les aminosides (acétylase, phosphorylase et adénylase) (**Choutet et Goldstein., 2000**).

Une sensibilité totale a été observée pour les chloramphénicols (C), (x=0 ; 0%).

**Comparaison entre les souches isolées à partir des moules sauvages et celles qui ont été isolées à partir des moules d'élevage :**

La figure 15 montre que les souches sauvages sont les plus résistantes pour l'amoxicilline (x=8 ; 72.72%), sulfamides (x=6 ; 54.54%), triméthoprimes (x=6 ; 66.66%), triméthoprime-sulfaméthoxazole (x=6 ; 66.66%), tétracyclines (x=8 ; 61.53%), kanamycine (x=4 ; 57.14%). alors qu'elles ont la même résistance aux ciprofloxacine (CIP), pefloxacine (PEF), acide nalidixique (NA).



**Figure 15:** Comparaison des taux de résistance aux antibiotiques chez les souches isolées à partir de la moule sauvage (x=13) et à partir de la moule d'élevage (x=11).

Les profils de multirésistance présentés par nos souches vont de 1 à 9 molécules, réparti en 15 profils différents, avec 8 profils dans le site d'élevage et 10 profils pour le site sauvage. Un profil d'antibiorésistance a été retrouvé dans les deux sites. Ces profils de résistance confirment l'hypothèse d'apport anthropique des bactéries résistantes aux antibiotiques. En effet, dans une étude réalisée en 2009 sur la plage d'Ain Chrob, il a été rapporté la présence de bactéries multirésistantes et particulièrement la détection d'une *E.coli* productrice d'une bêta-lactamase à spectre élargi (Alouache et al., 2012).

**III.4 Relation entre les groupes phylogéniques et la résistance aux antibiotiques :**

Selon les données de la littérature, Les souches d'*E. coli* ayant le plus de facteurs de virulence appartiennent au groupe phylogénétique B2 mais présente de manière statistiquement significative moins de résistance aux antibiotiques (Johnson et al, 1991).

### **Chapitre III : La caractérisation de la phylogénie et de la résistance aux antibiotiques des souches d'*Escherichia coli* isolées à partir de la moule « *mytilus galloprovincialis* ». :**

Les résultats obtenus dans notre étude montrent que les groupes phylogénétiques virulents B2 et D présentent un taux de résistances très élevé (6 et 5 respectivement). Ce qui implique que les souches MB9 et MB11 ont acquis plusieurs caractères de résistance. Par ailleurs, nos résultats corroborent les données de la littérature qui rapportent que les souches commensales (A et B1) sont les réservoirs des gènes de résistance (**Johnson et al, 1991**) (**tableau 7**).

**Tableau 7** : Relation entre le nombre de résistance et le groupe phylogénétique.

Souches	Antibiotiques	Nombre de résistance	Groupe phylogénétique
MO12		<b>0</b>	<b>A</b>
MB 4		<b>0</b>	<b>B1</b>
MO 18		<b>0</b>	<b>A</b>
MB 1		<b>0</b>	<b>B1</b>
MO 7		<b>0</b>	<b>B1</b>
MB3		<b>0</b>	<b>A</b>
MO13	TE	<b>1</b>	<b>B1</b>
MO1	TE	<b>1</b>	<b>A</b>
MO6	TE	<b>1</b>	<b>A</b>
MB2	AX	<b>1</b>	<b>A</b>
MO17	SSS	<b>1</b>	<b>B1</b>
MO2	AX-SSS	<b>2</b>	<b>A</b>
MB13	AX-TE	<b>2</b>	<b>A</b>
MB22	NA-TE	<b>2</b>	<b>B1</b>
MB6	AX-SSS-TE	<b>3</b>	<b>B1</b>
MB12	TPM-SXT-TE-K	<b>4</b>	<b>A</b>
MO14	SSS-CIP-REF-NA-K	<b>5</b>	<b>B1</b>
MB11	AX-SSS-TPM-SXT-TE	<b>5</b>	<b><u>D</u></b>
MB16	AX-SSS-TPM-SXT-K	<b>5</b>	<b>B1</b>
MB9	AX-SSS-TPM-SXT-TE-K	<b>6</b>	<b><u>B2</u></b>
MO11	AX-SSS-TPM-SXT-NA-TE-K	<b>7</b>	<b>A</b>
MB7	AX-SSS-TPM-SXT-CIP-NA-TE-K	<b>8</b>	<b>B1</b>
MO3	AX-SSS-TPM-SXT-CIP-NA-TE-K	<b>8</b>	<b>B1</b>
MB21	AX-SSS-TPM-SXT-CIP-PEF-NA-TE-K	<b>9</b>	<b>A</b>

### **Chapitre III : La caractérisation de la phylogénie et de la résistance aux antibiotiques des souches d'*Escherichia coli* isolées à partir de la moule « *mytilus galloprovincialis* ». :**

---

L'acquisition des mécanismes de résistance aux antibiotiques se font par :

#### **•Mutation de gène :**

Les populations bactériennes subissent en permanence des mutations au niveau du système de réplication de l'ADN, dont le nombre peut être augmenté par des agents mutagènes, ainsi la gyrase A de *E. coli* est la cible, la mutation du gène donne une gyrase modifiée, ne réagissant plus avec l'antibiotique, la bactérie devenue résistante et donnera une progéniture elle-même résistante (Chotet et Goldstein, 2000).

#### **•Acquisition des gènes de résistance :**

Résulte de la migration de ces gènes depuis des micro-organismes où ils existent à l'état naturel, vers les bactéries pathogènes par l'intermédiaire des plasmides. Les antibiotiques favorisent ce transfert et sélectionnent la population bactérienne devenue résistante (Chotet et Goldstein, 2000).

#### **•Le stress causé par un antibiotique peut provoquer des résistances à d'autres antibiotiques :**

- Les aminosides, en provoquant des erreurs durant le décodage au niveau des ribosomes augmentent la compétence des pneumocoques et favorisent la résistance aux bêta-lactamines par exemple, par un processus de transformation (Hampfrey et al., 2005).
- Les quinolones produisent des altérations de l'ADN et augmentent la fréquence de transformation chez *Leifionella pneumophila* (Coté et Quessy, 2005).

Le contrôle de routine de la qualité des aliments destinés à la consommation humaine (estimation de la charge microbienne), ne suffit pas pour juger la salubrité d'un produit ; car la présence d'une seule souche d'*E. coli* pathogène résistante à différentes familles d'antibiotiques au même temps ; dans un isolat des souches commensales, peut engendrer de sérieux problèmes.

Les souches résistantes aux antibiotiques peuvent créer des manifestations pathologiques chez l'homme, difficiles à maîtriser. Mais d'autres bactéries peuvent simplement transférer leur gène de résistance aux bactéries commensales du tractus digestif, et favorise la constitution d'un immense réservoir de gènes de résistance (Michel-Briand, 2012).

### **Chapitre III : La caractérisation de la phylogénie et de la résistance aux antibiotiques des souches d'*Escherichia coli* isolées à partir de la moule « *mytilus galloprovincialis* ». :**

---

La contamination des eaux de rivière par des bactéries résistantes aux antibiotiques peuvent être en cause. Une enquête a été publiée en 2009, sur la contamination d'un bassin de la Seine, met en évidence que 42% des *Escherichia coli* sont porteurs d'une résistance, ces bactéries ayant au moins quatre origines (**Servais et Passerat., 2009**) :

- Les eaux usées provenant des hôpitaux 71% d'*E. coli* résistante aux antibiotiques.
- Les eaux municipales en contenant 44%.
- Celles en provenance de l'agriculture 16%.
- Celles des régions forestières 2 %.

Tous ces rejets vont à la fin se retrouvés en pleine mer, car plusieurs travaux ont montré que le traitement des eaux usées fait que diminuer la charge microbienne, sans modifier le pourcentage de bactéries résistantes qui sont donc disséminées dans les eaux maritimes (**Alouache et al, 2014**).

Les effluents des piscicultures ont également leurs parts dans la dissémination de la résistance, mais les travaux scientifiques dans ce domaine, sont plus orientés sur les résidus d'antibiotiques que sur les bactéries résistantes (**Michel-briand ,2012**).

## Conclusion

Notre travail avait pour objectif la caractérisation des souches d'*E.coli* isolées à partir de la moule *Mytilus galloprovincialis* et de déterminer leur groupe phylogénétique afin de distinguer entre les souches commensales et les souches pathogènes. De plus, nous avons également évalué la résistance de ces souches aux antibiotiques. Les résultats obtenus dans cette étude ont montré que :

- La majorité des souches sont de phylogroupes A et B1 ; dites Commensales et ceci indépendamment de l'origine des souches. Les souches de phylogroupes pathogènes ont été détectées parmi les souches isolées des moules sauvages.
- La résistance aux antibiotiques est notée aussi bien chez toutes les souches commensales que chez les souches pathogènes. Cette résistance confirme le fait que l'utilisation d'antibiotiques tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire engendre l'émergence puis la dissémination de bactéries fécales antibiorésistantes.

L'absence de souches productrices de BLSE ne doit pas négliger l'importance du contrôle de ce phénotype au laboratoire de bactériologie, par contre la résistance à l'amoxicilline et aux tétracyclines, quinolones et sulfamides est alarmante.

En perspective, il serait nécessaire d'élargir cette étude et de rechercher les gènes de virulence afin de déterminer les pathovars détectés dans l'environnement. Un suivi de l'état de la résistance et de la virulence dans ces sites afin de déterminer l'origine de cette pollution et émettre des recommandations afin de préserver le milieu.

# **Références bibliographique**

- **ALEKSHUN, M. et LEVY, S. (1997).** Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistances: the mar regulon. vol. 41, p. 2067.
- **ALOUACHE, S. et al. (2012).** Antibiotic resistance and extended-spectrum - lactamases in Isolated Bacteria from seawater of Algiers beaches (Algeria), p. 80-86.
- **ALOUACHE, S. et al. (2014).** Characterization of ESBLs and associated quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* isolates from urban wastewater treatment plant in Algeria: Microbial Drug resistance, vol. 20, p. 30-38.
- **BABA AHMAD, Z. (2013).** Etude de la résistance aux antibiotiques des bactéries a Gram négatif du CHU de Tlemecen laboratoire antibiotique. Thèse de doctorat : synthèse et activité biologiques: Tlemecen : université Abou Beker Belkaid, p.7.
- **BONNET, R. (2004).** Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob Agents Chemother. p. 1-14.
- **BOUGHACHICHE, Z. et SI ABDALLAH, C. (2011).** Contribution à la détermination de la qualité microbiologique des moules produites dans une ferme aquacole d'Algérie. Mémoire d'ingénieur : aquaculture : ENSSMAL, 57 p.
- **BOUTOUCHET. et MILLA. (2005).** guide de l'aquaculture. Algérie : MPRH, 27p.
- **CA-SFM, (2001).** Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, recommandation 2008.
- **CHOUTET, P. et GOLDSTEIN. (2000).** *Escherichia coli* aspects fondamentaux et cliniques. Paris : Lavoisier. p. 12.
- **CHRISTIANE, J. et JEAUN-NOEL. (2010).** microbiologie alimentaire. 6<sup>e</sup> éd. Paris : Lavoisier. P. 172.
- **CLERMONT, J. et OLIER. (2011).** Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. Infect Genet Evol rev, vol. 11, p.654-662.
- **CLERMONT, O. (2000).** Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Appl Environ Microbiol rev, vol. 66, 4555p.
- **COTE, C et. GUESSY, S. (2005).** Persistence of *Escherichia coli* and salmonella in surface soil following application of liquid hog manure for production of pickling cucumbers, Jfood production rev, 2005, vol. 68, p. 900-905.
- **COURVALIN, P. (1985).** L'antibiogramme. paris : MCP édition.
- **CROXEN, M. et FINLAY, B. (2010).** Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nat Rev Microbiol, vol. 8, p. 26-38.

- **DOBRINDT, U. (2004).** Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol*, vol. 2, 424 p.
- **ENRIGHT, M . et SPRATT, B. (1999).** Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol.* vol. 7, 482 p.
- **FAO, 2015.** FAO fisheries et aquaculture- vue générale du secteur aquacole national – Algérie.
- **GOLDSTEIN, F .et STEIN, E. (1999).** Trimethoprim and trimethoprim-sulfamethoxazole, p. 995-1007.
- **GOLDSTEIN, F. (1999).** Infection urinaires en pratique de ville : étiologie et sensibilité aux antibiotiques en fonction des antécédents, *la presse med*, p. 1624-1628.
- **GORDON, D. et al. (2008).** Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method, p. 2484-2496.
- **GRIGGS, D. et al. (2005).** Incidence and mechanism of ciprofloxacin resistance in *Campylobacter* spp: isolated from commercial poultry flocks in the United Kingdom before, during, and after fluoroquinolone treatment, *Vol. 49*, p. 699-707.
- **HAEGHEBAERT, S. et al. (2002).** Les toxi – infections alimentaires collectives en France en 200, *Vol. 50*, p. 249-253.
- **HAMPFREY, J. et al. (2005).** Prevalence and subtype of ciprofloxacin resistant *Campylobacter* spp. In commercial poultry flocks before, during and after treatment with fluoroquinolones , antimicrob agent chemother, *Vol. 49*, p. 690-698.
- **HOORFAR, J. (2004).** Diagnostic PCR: making internal amplification control mandatory. *J Appl Microbiol rev*, *Vol.96*, p. 221-222.
- **JARLIER, V. et al. (1988).** Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents enterobacteriaceae : hospital prevalence and susceptibility patterns. *Revue of infection diseases*, vol. 10, p. 867-878.
- **JAUREGUY, F. (2009).** Déterminants cliniques et bactériens au cours des infections extra-intestinales dues à *Escherichia coli*, 25 p.
- **JOHNSON, J. et al. (2005).** Contamination of retail foods, particularly turkey, from community markets (Minnesota, 1999 2000) with antimicrobial resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog Dis rev*, vol. 2, p. 38-49.
- **JOHNSON, J. (1991).** Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev*, vol. 4, p.80 -128.

- **LECOINTRE, G .et al. (1998).** Escherichia coli molecular phylogeny using the incongruence length difference test. *Mol Biol Evol rev*, vol. 15, p. 1685-1695.
  - **LEMINORE, L. et al. (1990).** Bactériologie médicale. 2<sup>e</sup> ed, medicine-science Flammarion, p. 398-472.
  - **LEMONNIER, M. et LEMICHEZ. (2007).** Rho GTPase-activating bacterial toxins: from bacterial virulence regulation to eukaryotic cell biology. *FEMS Microbiol Rev*, Vol. 31, p. 515-34.
  - **LEVINE, M. et EDELMAN, R. (1984).** Enteropathogenic Escherichia coli of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol* , vol. 6, p. 31-51.
  - **LIEBANA, E. et al. (2006).** Longitudinal farm study of extended-spectrum beta-lactamase-mediated resistance. *J Clin Microbiol rev*, vol. 44, p.1630-1634.
  - **MAINIL, J. et DAUBE, S. (2005).** Verotoxigenic Escherichia coli from animals, xddxcfersxdhumans and foods: who's who?. *J Appl Microbiol rev*, vol. 98, p. 332-44.
  - **MARIANI, et al. (2000).** Escherichia coli O157 : H7, un agent pathogène émergent. *Presse Med*.
  - **MARTEIL, L. (1976).** La conchyliculture française ; 2<sup>e</sup> partie : Biologie de l'huitre et de la moule. *Rev Pêches maritimes*, vol. 40, p. 149-346.
  - **MICHEL-BRIAND, Y. (2012).** Aspect de la résistance bactérienne aux antibiotiques.paris : lavoisier, vol.5, p. 227-234.
  - **NATARO, J. et KAPER, J. (1998).** Diarrheagenic Escherichia coli. *Clin Microbiol rev*, vol. 11, 142 p.
  - **NOUGAYREDE, J. et al. (2006).** Escherichia coli induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science rev*, vol. 313, 848 p.
  - **OCHMAN, H .et SELANDER, R. (1984).** Standard reference strains of Escherichia coli from natural populations. *J Bacteriol rev*, Vol. 157, p. 690-693.
  - **ORSKOV .et GENUS. (1986).** Escherichia coli.Castellani and Chalmers. *J.G Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 1.
  - **PIDDOCK, L. (1998).** Mechanisms of fluroquinole resistance , Vol. 58, p. 8-11. *Act.* 1994-1998.
  - **PLUSCHKE, G. et al. (1983).** Role of the capsule and the O antigen in resistance of O18:K1 Escherichia coli to complement-mediated killing. *Infect Immun*, vol. 42, 907 p.
-

- **POHL, P. et LINTERMANS.(1989).** Production de vérocytotoxine par les *Escherichia coli* du porc. Rev Méd. Vét. Vol.133, p. 31-38.
- **RUSSO, T. et JOHNSON, J. (2000).** Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli* ExPEC. J. Infect. Dis rev, vol. 181, 1753 p.
- **SANSONETTI, P. (1992).** Molecular and cellular biology of shigella flexneri invasiveness : from cell assay systems to shigellosis, p. 1-19.
- **SERVAIS, P. et PASSERAT, J. (2009).** Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the seine river watershed (France), Vol. 408, p. 365-372.
- **STABLO, C. (1998).** conséquence sur la santé de consommation de coquillages de pêche a pied dans le bassin d'ARCACHON En période estivale. URF des sciences pharmaceutique, 92 p.
- **STAMM, W. et NORRBY, S. (2001).** Urinary tract infections: disease panorama and challenges. J Infect Dis rev.
- **SYLVIE, M. (2010).** Facteurs de virulence de *Escherichia coli* adhérent et invasifs associés a la maladie de cohern : caractérisation et de leur expression.
- **TENAILLON, O. et al. (2010).** The population genetics of commensal *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol, vol. 8, p. 207-17.
- **VEDEL, G. (2005).** Simple method to determine beta-lactam resistance phenotype in *pseudomonas aeruginosa* using the disc agar diffusion test. Journal of Antimicrobial.
- **VIVARES, C. (1991).** Consommer les coquillages est-il dangereux? Contamination, rev surveillance et santé publique.Vol. 2, 540 p.
- **WALSH, C. (2003).** Antibiotics: actions, origins, resistance, Washington. ASM press.
- **WANG, Y. et al. (2004).** Role of S fimbriae in *Escherichia coli* K1 binding to brain microvascular endothelial cells in vitro and penetration into the central nervous system in vivo. Microb Pathog rev, vol. 37, p. 287-293.
- **WELCH, R. et al. (2002).** Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli* Proc Natl Acad Sci U S A 99, p. 17020-17024.
- **WESTERMEIER R. (1997).** Electrophoresis in Practice: a Guide to methods and applications of DNA and Protein Separation.

### Les sites web :

- **QUENTIN, M.** 5 juillet 2007. *mytilus galloprovincialis*, (consulter le : 03/02/2015). disponible sur le web : <http://www.futura-sciences.com>
- **BRAND, S.** 3 january 2011. The catalogue of life. (Consulter le : 03/02/2015). Disponible sur le web : <http://www.zipcodezoo.com/>
- **Rivm Antimicrobial resistance interactive database.** 2012. (consulter le : 12 /03/2015). Disponible sur le web : <http://www.rivm.nl/earss>
- **PIERRIX.** (2013). Retour à la vie. (Consulter le: 13 /01 /2015). Disponible sur le web : [www.globepharma.org](http://www.globepharma.org)

# Annexe

## **Annexe 1 : Solutions pour la réalisation de l'électrophorèse**

TBE: Tris Borate EDTA

-Tris 45mM,

-Borate 45mM,

-EDTA 1 mM.

Bleu de dépôts

- Glycérol 50%,

- EDTA- $\text{NA}_2$  100mM pH: 8,

-Bleu de bromophénol 0,2%,

-Sodium dodécyl sulfate (SDS) 3%.

Souche	Boite 1						boite 2						Boite 3						S	A	ME C
	ATB AX	ATM	CAZ	IPM	FOX	CTX	PEP	CPO	SSS	TMP	SXT	CIP	PEF	NA	TE	R	ON	C			
S16 (E.coli)	R	R	11 R	38 S	29 S	25 S	39 S	40 S	0 R	0 R	0 R	26 S	23 I	17 I	29 S	0 R	20 I	25 S	-	-	
E17 (E.coli)	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 I	22 I	28 S	-	-	
E2 (E.coli)	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 I	28 S	-	-	
E12 (E.coli)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	
S13 (E.coli)	0 R	40 S	28 S	39 S	26 S	36 S	36 S	36 S	20 I	33 S	28 S	40 S	34 S	28 S	7 R	24 S	26 S	20 I	-	-	
S6 (E.coli)	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 I	19 I	24 S	-	-	
S7 (E.coli)	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	-	-	
S22 (E.coli)	18 I	40 S	28 S	39 S	30 S	39 S	40 S	40 S	18 I	31 S	28 S	32 S	29 S	0 R	0 R	26 S	28 S	30 S	-	-	
S3 (E.coli)	24 S	40 S	S	S	S	S	S	S	34 S	S	S	S	S	S	S	28 S	S	S	-	-	
E14 (E.coli)	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 I	26 S	-	-	
S11 (E.coli)	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 I	20 I	30 S	-	-	

Tableau : le test de synergie et d'antagonisme de la collection d'E. coli isolées chez la moule

ATB #mm Des souches	BOITE 1						Boite 2						BOITE 3						S	A	
	AX	ATM	CAZ	IP M	FOX	CTX	FEP	CPO	AMC	TMP	SXT	CIP	PEF	NA	TE	K	CN	C			
	16-21	21-27	19-26	17-24	15-22	23-26	17-24	17-24	16-21	16-20	13-16	22-25	16-22	15-20	17-19	15-17	16-18	23			
E13	22 S	45 S	28 S	37 S	30 S	38 S	36 S	40 S	40 S	S	S	34 S	36 S	34 S	27 S	O R	22 S	22 S	28 S	-	-
E1	22 S	>40 S	28 S	>40 S	28 S	40 S	>46 S	45 S	31 S	S	S	S	40 S	35 S	27 S	O R	23 S	21 S	28 S	-	-
E3	O R	S	29 S	40 S	28 S	>35 S	>40 S	>40 S	27 S	O R	O R	O R	O R	21 I	O R	O R	O R	20 S	27 S	-	-
S21	O R	42 S	32 S	38 S	30 S	34 S	39 S	40 S	25 S	O R	O R	O R	14 R	13 R	O R	O R	O R	27 S	27 S	-	-
S4	18 I	40 S	28 S	36 S	30 S	38 S	40 S	40 S	26 S	34 S	32 S	36 S	36 S	36 S	28 S	27 S	23 S	22 S	26 S	-	-
E6	18 I	40 S	22 I	36 S	30 S	36 S	36 S	40 S	30 S	27 S	30 S	30 S	34 S	30 S	29 S	O R	23 S	21 S	25 S	-	-
S2	15 R	>40 S	30 S	36 S	26 S	26 I	40 S	40 S	28 S	32 S	34 S	34 S	38 S	34 S	28 S	26 S	26 S	26 S	24 S	-	-
E18	24 S	>40 S	28 S	39 S	32 S	38 S	40 S	>40 S	30 S	30 S	34 S	32 S	36 S	32 S	28 S	25 S	26 S	26 S	29 S	-	-
E11	O R	40 S	28 S	38 S	30 S	38 S	38 S	40 S	25 S	O R	O R	O R	24 I	20 I	O R	O R	O R	26 S	24 S	-	-
S1	20 I	38 S	28 S	32 S	28 S	39 S	38 S	40 S	26 S	30 S	30 S	34 S	36 S	34 S	28 S	25 S	25 S	30 S	28 S	-	-
E7	20 I	44 S	30 S	40 S	30 S	40 S	40 S	40 S	26 S	S	S	34 S	44 S	32 S	30 S	28 S	26 S	26 S	26 S	-	-
S9	O R	S	28 S	>40 S	30 S	38 S	>40 S	>40 S	22 S	O R	O R	O R	>40 S	36 S	29 S	O R	30 S	28 S	28 S	-	-
S12	20 I	42 S	30 S	40 S	30 S	40 S	36 S	36 S	28 S	22 S	O R	O R	38 S	34 S	34 S	7 R	O R	22 S	24 S	-	-

Tableau : le test de synergie et d'antagonisme de la collection d'E. coli isolées chez la moule