

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université SAAD DAHLAB . Blida 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie



Mémoire de fin d'étude

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Génétique

Thème

***Essais de curage plasmique à partir de souches
d'entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre
élargi.***

Réalisé par : BENDALI ZINEB et ALLAL RIME

Devant les membres du jury :

Président	Nabahat BEN MANSOUR	MCA	USDB1
Examineur	Assia AMOKRANE	MCA	USDB1
Promoteur	Radia AÏSSANI-EL FERTAS	MCB	USDB1

Promotion 2021/2022

*A l'issu de ce cycle de formation, nous tenons à remercier
Dieu le tout puissant*

*Nos remerciements les plus sincères vont au : Dr. Aïssani
Radia pour ses conseils précieux, sa compétence et sa
gentillesse durant tout notre travail. Madame, veuillez
trouver ici, l'expression de notre gratitude.*

*Notre grande estime et notre profond respect vont aux
membres de jury. Chers Dr. BENMANSOUR et
Dr.MOKRANE, vous nous faites un grand honneur en
acceptant de juger ce modeste travail.*

*Nous tenons à remercier chaleureusement l'ensemble du
corps enseignant ayant participé à notre formation, à leur
tête le Dr. R. Mohamed Saïd, responsable du master
Génétique et de la filière Sciences Biologiques.*

*Enfin, nous remercions l'ensemble des personnes qui ont
participé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.*

Merci

Dédicace

Je dédie cette thèse

*À mon cher père,
À ma chère mère,*

Quoi que je dise ou je fasse, je n'arrivai jamais à vous remercier comme il se doit. C'est grâce à vos encouragements, vos bienveillances et votre présence à mes côtés, que j'ai réussi ce respectueux parcours.

Je souhaite que vous soyez fières de moi, et que j'ai pu répandre aux espoirs que vous avez fondés en moi.

*À mes chers frères « ABDELALI », « MOUHAMED OTHMANE »,
Pour vos soutiens moral et vos conseils précieux. Tous ou long de mes études, et mon petit frère « ABDELGHANI » pour ses prières.*

*À mes chers grands parents,
Qui je souhaitent une longue vie et une bonne santé.*

*À mes chères Amies et sœurs « ASSIA et YAMONDA »,
Qui sont aidée et supportes dans les moments difficiles.*

À mes chers cousines surtout « ASSIA, AFIFA, IBTISSEM »

A toutes ma famille et surtout ma chère tante et ma grande sœur « SAFIA » .

À ma chère binôme « ALLEL RIME », et sa famille.

A mes amis au nom de lamitié qui nous réunit, Et au nom de nos souvenir inoubliable.

À travers ses lignes je ne peux pas vous décrire tous mes sentiments d'amours, le seul mot que je peux dire est merci, vraiment merci beaucoup à toute personne qui a contribué à la réalisation de ce mémoire.

. ZINEB.

Dédicace

Je dédie ce mémoire

A L'homme de ma vie, mon exemple éternel, celui qui s'est toujours sacrifié

Pour me voir réussir, à toi mon père » DJAMEL «

*A maman »FATIHA » pour son amour et qu'elle m'a toujours accordé en témoignage
de ma reconnaissance envers sa confiance, ses sacrifices, et sa tendresse.*

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts et de bonheur mon fiancé » YACINE AMMER »
pour l'encouragement et l'aide qu'il m'a toujours accordé et à toute sa famille*

A la flamme de mon cœur, mon soutien moral, mon frère « MOULOUE «

A mes frères » ABDE EL RAHMANE « et » ABDE EL ALI » que Dieu lui garde

*A mes sœurs « YOUSRA » et « ZAHRA » pour l'amour qu'elle me réserve
Je leur souhaite une vie pleine de bonheur et de succès*

*A la mémoire de mon grand père » MOUSSA » et ma grande mère » ZOHRA « que Dieu lui garde
dans son vaste paradis*

A ma chère binôme « ZINEB BENDALI » et à sa famille

A mes amis

Au nom de l'amitié qui nous réunit,

Et au nom de nos souvenirs inoubliables

A tous ceux qui me sont chers

L'émergence de bactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi (BLSE), en particulier *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*, est une préoccupation majeure en raison des infections qu'il provoque, tel que les infections nosocomiales ou communautaires. Ceci est encore plus inquiétant quand on observe une dissémination pandémique de clones épidémiques dotés d'une plasticité génétique remarquable.

Dans notre étude, nous avons entrepris d'étudier le support génétique de la résistance bactérienne aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G). En effet, nous avons réalisés des essais de curage plasmidique (chimique et physique) sur une collection de 24 souches d'entérobactéries de phénotype BLSE ainsi que des expériences de conjugaison bactérienne. Le caractère BLSE a été recherché en réalisant le test de synergie. Une augmentation de l'activité des C3G (céfotaxime, CTX) et quatrième génération (aztréoname) en présence d'acide clavulanique fut observée pour l'ensemble des souches. Le plasmide BLSE fut curé par élévation de la température (45°C) pour la moitié (11/24) des souches étudiées. En revanche, le curage chimique par culture dans le SDS fut moins satisfaisant, puisque seules 6 souches ont perdu leur plasmide BLSE. L'élévation de la température semble plus efficace dans la perturbation des systèmes de ségrégation et de partition plasmidique. Le transfert par conjugaison a réussi pour 10 des 11 souches pour qui le curage plasmidique a marché. Ceci indique que le plasmide porteur de la résistance aux CTX-M serait un plasmide conjuguatif.

Ces résultats nécessitent d'être complétés par une étude moléculaire ciblant les gènes de résistance ainsi que leur environnement.

Mots clés : Entérobactéries, BLSE, C3G, Antibiotique, Résistance, curage, conjugaison.

The emergence of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing bacteria, particularly *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, is a major concern because of the infections it causes, such as hospital-acquired or community-acquired infections. This is even more worrying when we observe a pandemic dissemination of epidemic clones with a remarkable genetic plasticity.

In our study, we undertook to study the genetic support of bacterial resistance to 3rd generation cephalosporins (C3G). Indeed, we performed plasmid curing tests (chemical and physical) on a collection of 24 strains of enterobacteria with ESBL phenotype as well as bacterial conjugation experiments. The ESBL character was investigated by performing the synergy test. An increase in the activity of C3G (cefotaxime, CTX) and fourth generation (aztreonam) in the presence of clavulanic acid was observed for all strains. The ESBL plasmid was cured by temperature elevation (45°C) for half (11/24) of the strains studied. In contrast, chemical curing by culture in SDS was less satisfactory, as only 6 strains lost their ESBL plasmid. Temperature elevation seems to be more effective in disrupting plasmid segregation and partition systems. Conjugative transfer was successful for 10 of the 11 strains for which plasmid curation was successful. This indicates that the plasmid carrying the CTX-M resistance would be a conjugative plasmid.

These results need to be completed by a molecular study targeting the resistance genes and their environment.

Key words: Enterobacteria, ESBL, C3G, Antibiotic, Resistance, curing, conjugation.

يعد ظهور البكتيريا التي تنتج طيفاً ممتداً من بيتا-لاكتاماز، وخاصة الإشريكية القولونية والالتهاب الرئوي كليبسيلا ، مصدر قلق كبير بسبب الالتهابات التي تسببها ، مثل العدوى المكتسبة في المستشفيات أو العدوى المكتسبة من المجتمع. وهذا أمر مثير للقلق أكثر عندما نلاحظ انتشار وبائي للنسخ الوبائية التي تتمتع بمرونة وراثية ملحوظة.

في دراستنا ، تعهدنا بدراسة الدعم الجيني للمقاومة البكتيرية للجيل الثالث من السيفالوسبورينات .(في الواقع ، أجرينا اختبارات إزالة البلازميد (الكيميائية والفيزيائية) على مجموعة من 24 سلالة من البكتيريا المعوية بنمط ظاهري (ب-ل-س-ء) بالإضافة إلى تجارب الاقتران البكتيري. تم البحث عن شخصية (ب-ل-س-ء) من خلال إجراء اختبار التأزر. لوحظ زيادة في نشاط الصف الثالث من السيفالوسبورين (سيفوتاكسيم ،(السم الخلوي والجيل الرابع (ازتريونام) في وجود حمض الكلافولانيك لجميع السلالات. تمت معالجة بلازميد (ب-ل-س-ء) برفع درجة الحرارة (45 درجة مئوية) لنصف (24/11) السلالات المدروسة. من ناحية أخرى ، كان العلاج الكيميائي عن طريق الاستزراع في (أقل إرضاءً ، حيث فقدت 6 سلالات فقط بلازميد (ب-ل-س-ء). يبدو أن ارتفاع درجة الحرارة أكثر فعالية في تعطيل أنظمة الفصل والبلازميد. كان النقل عن طريق الاقتران ناجحاً لـ 10 من 11 سلالة التي عمل فيها تنظيف البلازميد. يشير هذا إلى أن البلازميد الذي يحمل المقاومة لـ السم الخلوي "م" سيكون بلازميداً مترافقاً.

يجب استكمال هذه النتائج بدراسة جزيئية تستهدف جينات المقاومة وبيئتها.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا معوية ، طيف ممتد من البيتا لاكتاماز ، الصف الثالث من السيفالوسبورين ، مضاد حيوي ، مقاومة ، انحاء ، اقتران.

ATB : Antibiotique

BLSE : β -lactamase a spectre étendue

BGN : Bacille a Gram Négatif

C3G : Céphalosporine de 3^{ème} Génération

CTX : Céfotaxine

CTX^R : Résistante aux Céfotaxine

D : Donatrice

GN : gélose nutritive

IS : Séquence d'insertion

K. p : Klebsiella pneumoniae

LB : Luria Bertani

LP : Peptidoglycane

LPS : Lipopolysacharides

MH : Muller Hinton

MEC : Matrice extra cellulaire

NA : Azide de sodium

NA^R : Résistante aux Azide de sodium

PLP : Protéines de Liaison à la Pénicilline

R : Réceptrice

SDS : Sodium DodécylSulfate

Figure 1 : Facteur de virulence et de fitness exprimés par E. coli uropathogène	5
Figure 2 : illustration schématique d'un plasmide	6
Figure 3 : Cycle de vie du plasmide F lors de son transfert par conjugaison du Donneur à la cellule réceptrice	11
Figure 4 : Mécanisme primaire de la résistance aux β -lactamines chez les Entérobacteriaceae	13
Figure 5 : Structure génétique hébergeant des gènes codant pour les BLSE	17
Figure 6 : Schéma d'ensemble d'un antibiogramme par la méthode des disques et Par incubation	19
Figure 7 : schéma explicative la technique de curage plasmidique par élévation de Température	21
Figure 8 : schéma exprimer le curage par SDS	22
Figure 9 : Schéma montre les essais de transfert par conjugaison	24
Figure 10 : Détection du phénotype	25
Figure 11 : Curage plasmidique par température	28
Figure 12 : Curage plasmidique par le SDS	30
Figure 13 : transconjugaison CTX ^R , NA ^R	32

Tableau I : Classification des β -lactamases bactériennes	14
Tableau II : Résultats de curage plasmidique par élévation de température du l'ensemble des souches E. coli et K. pneumoniae	24
Tableau III : Résultats de curage plasmidique par élévation de température de 11 Souches de E. coli et K. pneumoniae	25
Tableau IV : Résultats de curage plasmidique par le SDS de l'ensemble des Souches E. coli et K. pneumoniae.....	26
Tableau V : Résultats de curage plasmidique par le SDS de 6 souches de E. coli et K. pneumoniae	27

Introduction	1
Rappel bibliographies	
I. Caractéristiques générales des entérobactéries	3
I.1. Propriétés microbiologiques	3
I.2. Propriété de virulence.....	4
II. les plasmides chez les entérobactéries	5
II.1. Découverte et propriétés générales	5
II.2. Classification des plasmides	7
II.3. Transfert des plasmides conjugatifs par conjugaison	9
II.4. le curage plasmidique	10
III. Entérobactéries et résistance aux antibiotiques	12
III.2. Mécanismes de résistance aux β -lactamine	12
III.3. β -lactamase a spectre élargi	13
III.3.1 BLSE de types TEM et SHV	14
III.3.2 CTX-M	15
Matériels et Méthodes	
I. Matériel	18
I.1. Matériel non biologique	18
I.2. Matériel biologique	18
I.2.1 Souches bactériennes	18
II. Méthodes	18
II.1. Mise en évidence du caractère BLSE chez les souches sauvages	18
II.2. Essais du curage plasmidique	20
II.2.1. Curage par élévation de la température d'incubation	20
II.2.2. Curage par ajout du SDS	22
II.3. Essai de transfert génétique par conjugaison	23
Résultats et discussions	
I. Résultats de le recherche du phénotype BLSE	25
II. Résultats des essais de curage plasmidique	27

II.1. curage plasmidique par élévation de température	27
II.2. curage plasmidique par le SDS	29
III. Essais de conjugaison bactérienne	31
Conclusion	34
Références bibliographique	35
Annexe 1	i
Annexe 2	iii

La résistance aux antibiotiques est un problème de santé publique majeur dans de nombreux pays. L'identification, quotidienne de souches multirésistantes, dans les milieux hospitaliers et en communauté, inquiète le personnel de la santé et met souvent le médecin devant une impasse thérapeutique, ne sachant plus quoi prescrire pour traiter certaines infections aux germes résistants (**Cassini et al., 2019**).

La résistance aux β -lactamines est parmi les plus préoccupantes actuellement. Il s'agit d'une vaste famille d'antibiotiques bactéricides, à spectre antibactérien plus ou moins large et recommandés dans de nombreuses indications (**Van Boeckel et al., 2014**). Les mécanismes de résistance aux β -lactamines sont divers et variés mais ceux qui causent de sérieux problèmes sont ceux à diffusion pandémique, du fait d'un codage plasmidique de la résistance. L'exemple des β -lactamases à spectre élargi « BLSE » est le plus probant, tout particulièrement parmi certaines espèces d'entérobactéries telles que *E. coli* et *K. pneumoniae* (**Mughini-Gras et al., 2019 ; Ludden et al., 2020**).

Les BLSE sont les enzymes principalement responsables de la résistance aux Céphalosporines de 3^{ème} Génération « C3G » chez les entérobactéries. Elles ont diffusé parmi les espèces pathogènes dans les années 1990, principalement à la suite de l'usage massif des C3G mais l'acquisition de résistance aux fluoroquinolones par certains clones a également facilité leur diffusion (**Zakour et al., 2016**). Les isolats producteurs de BLSE hébergeaient majoritairement des dérivés des β -lactamases *TEM-1*, *TEM-2* ou *SHV-1* (**Gniadkowski, 2008**). Les gènes codant pour les enzymes de la famille des *CTX-M* ont ensuite commencé à disséminer et prédominent désormais à travers le globe. La mobilisation et la transposition des *CTX-M* ont été rendues possibles grâce à deux IS : l'*ISEcp1* et l'*ISCR1* (**Naseer et Sundsfjord, 2011 ; Wilson et Török, 2018**). Les gènes *bla_{CTX-M}* sont souvent associés aux plasmides des groupes IncF, IncI, IncN, IncHI2, IncL/M et IncK. Le gène *bla_{CTX-M-15}* est le plus représenté chez l'homme dans le monde (**Carattoli, 2009 ; Zhao et Hu 2013**).

Dans le cadre de l'obtention du diplôme de Master en Sciences biologique option Génétique, nous avons réalisé un mémoire de fin d'étude portant sur des essais de curage plasmidique à partir de souches d'entérobactéries résistantes aux C3G. Les principaux objectifs que nous nous sommes posés sont les suivants :

- Caractérisation phénotypique des BLSE parmi des souches d'entérobactéries isolées des milieux hospitaliers et communautaires.

- Détermination du support génétique de la résistance aux C3G par des essais de curage plasmidique.
- Transfert génétique par conjugaison du plasmide de résistance.

I. Caractéristiques générales des entérobactéries

I. 1. Propriétés microbiologiques

Les bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* ou « Entérobactéries » sont des bacilles à Gram négatif. Le mot "entérobactérie" fait référence à la localisation d'une famille de microorganismes dans le tube digestif et principalement dans le côlon de l'homme et des animaux (Avril et al., 2000). Ces microorganismes sont très hétérogènes pour ce qui est de leur pathogénicité et de leur écologie. Les espèces qui composent la famille des entérobactéries sont en effet soit parasites (*Shigella*, *Yersinia pestis*), soit commensales (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*), soit saprophytes (*Serratia marescens*, *Enterobacter cloacae*) (Avril et al., 2000 ; Joly et Reynaud., 2007).

Hormis leur présence dans le tube digestif de l'homme et des animaux, les entérobactéries sont présentes en abondance dans l'environnement «sols et eaux» et participent aux grands cycles de dégradation des matières organiques (Ben Moussa, 2016).

Les entérobactéries se développent facilement sur les milieux ordinaires en 24 heures à 37°C en aérobiose et en anaérobiose (Freney et al., 2000). Sur les milieux gélosés, les colonies d'entérobactéries sont habituellement lisses, brillantes, de structure homogène (type « smooth » ou S). Cet aspect peut évoluer après des cultures successives pour donner des colonies à surface sèche rugueuse (type « rough » ou R). En milieu liquide, les entérobactéries occasionnent un trouble uniforme du bouillon (Avril et al., 2000).

La mise en évidence de la production du cytochrome C oxydase à partir du test d'oxydase est essentielle pour orienter l'identification des bacilles à Gram négatif. Il permet de différencier dans le grand groupe des bacilles à Gram négatif, la famille des entérobactéries de celles des Pseudomonaceae et des Vibrionaceae (Niang, 2003). Le test d'oxydase est souvent réalisé à l'aide des disques d'oxydase imprégnés du réactif chlorhydrate ou d'oxalate de N-diméthyl paraphénylène diamine ou PDA. Si une bactérie possède l'enzyme respiratoire cytochrome C oxydase, la forme oxydée rose violacée du PDA est produite à partir de la forme réduite incolore.

La distinction entre les genres et les espèces se fait par l'étude des caractères biochimiques que sont l'utilisation du citrate de Simmons comme seule source de carbone, la production d'uréase, la capacité à fermenter le glucose, la capacité à réduire les nitrates en nitrite, la

fermentation du lactose, la production d'indole, la production d'acétoïne, la désamination du tryptophane (Avril et al., 2000). Les caractères biochimiques différentiels de certaines entérobactéries sont illustrés dans le **Tableau 1 en annexe 1**.

I. 2. Propriété de virulence

La virulence est définie comme la capacité d'un organisme à provoquer une maladie chez un hôte particulier. La virulence résulte de l'impact cumulé d'une ou de plusieurs propriétés spéciales, ou facteurs de virulence, qui servent à distinguer une bactérie pathogène (Salah et al., 2019).

Chez les entérobactéries, les facteurs de virulence comprennent différentes adhésines, la production d'hémolysine et d'héماغglutination, la résistance au sérum, la production de différentes enzymes : la lipase ; la protéase et la lécithinase et notamment la formation de biofilm qui est un facteur le plus représentatif et le plus incriminé dans la pathogénicité des souches d'*E. coli* et d'*E. spp.* (Neupane et al., 2016).

L'espèce *Escherichia coli* est subdivisée en de nombreuses souches pathogènes pour l'homme et les animaux, sur la base de la production de facteurs spécifiques, responsables de leur pouvoir pathogène. Ces souches pathogènes sont classiquement divisées en souches à tropisme intestinal (entérotoxigènes, entéropathogènes, entérohémorragiques, vérotoxigènes et entéro-invasives) et en souches à tropisme extra-intestinal (uropathogènes et invasives). Les souches invasives provoquent des septicémies et/ou des bactériémies avec localisations dans différents organes (infections systémiques). Si les propriétés et facteurs spécifiques de virulence des souches à tropisme intestinal sont relativement bien connus et caractérisés, ceux des souches à tropisme extra-intestinal le sont beaucoup moins, surtout chez les animaux (Freney et al., 2000). Dans la **figure 1** sont résumés les principaux facteurs de virulence impliqués dans la pathogénicité des souches UPEC.

Les entérobactéries sont les espèces bactériennes les plus impliquées dans les infections humaines. Nous retrouvons principalement les infections intestinales et extra intestinales (infection urinaire, respiratoires, septicémie, et méningites) (Dortet et al., 2013). *Escherichia coli* est souvent responsable d'infections nosocomiales, notamment des infections des plaies chirurgicales et des bactériémies (Alain et Bernard, 2002). *Klebsiella pneumoniae* occupe une place importante dans la pathologie infectieuse du nouveau-né et les infections nosocomiales dans les unités de soins intensifs (Sahly et al., 2004).

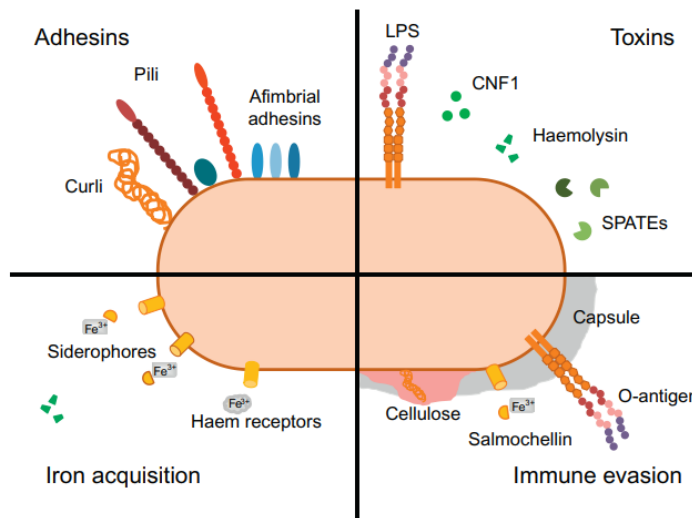


Figure 1 : Facteurs de virulence et de fitness exprimés par *E. coli* uropathogènes (Lüthje et Brauner, 2014).

E. coli emploie différentes stratégies pour infecter les voies urinaires, résister aux défenses immunitaires de l'hôte et persister.

II. Les plasmides chez les entérobactéries

II. 1. Découverte et propriétés générales

La découverte des plasmides remonte aux années 1940. Cette découverte est liée à l'observation du transfert de matériel génétique entre des souches d'*Escherichia coli* (Lederberg *et al.*, 1946). Lederberg suggéra alors que ces gènes n'étaient pas portés par le chromosome, mais par une molécule d'ADN extra chromosomique qu'il décida d'appeler « **plasmide** ». La définition du plasmide a évolué au cours du temps en fonction du développement des connaissances scientifiques dans ce domaine (Virrolle *et al.*, 2020).

Les plasmides sont des réplicons extra-chromosomiques circulaires ou linéaires que l'on trouve dans de nombreux micro-organismes des domaines *Bacteria*, *Archaea* et *Eukaryota* (Funnell et Phillips, 2004). C'est l'un des plus importants « véhicules » de l'information génétique au cours des communications bactériennes, facilitant ainsi les phénomènes liés à l'évolution et l'adaptation rapides observées chez les bactéries (Figure 2) (Aminov, 2011).

Les plasmides ne codent généralement pas pour des gènes essentiels à l'hôte, c'est à dire que la majorité ne sont pas indispensables au métabolisme de la cellule dans des conditions normale de croissance. Ils portent plutôt des gènes qui peuvent aider l'hôte à s'adapter à de nouveaux environnements, comme dans le cas d'une exposition aux antibiotiques ou d'autres

sources de nutriments (**Lili et al. 2007 ; Slater et al. 2008 ; Rankins et al. 2011**). De plus, les plasmides peuvent porter des gènes codant pour des fonctions spécifiques au plasmide, telles que l'auto-réplication, partitionnement et transfert conjugatif (**Bennett, 2008**).

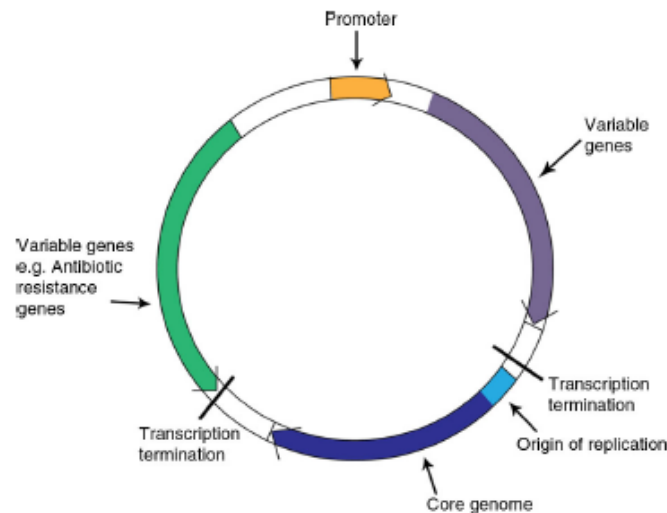


Figure 2 : Illustration schématique d'un plasmide (**Brolund, 2014**).

La taille des plasmides peut considérablement varier de 1 à 10kb pour les petits plasmides, (10-50kb) pour les plasmides de taille moyenne, 50-100kb pour les gros plasmides et enfin il y a les méga plasmides tels que le plasmide pRQ7 de la bactérie thermophile *Thermotoga maritima* (**Harriot et al., 1994**). Ces derniers sont considérés comme des « mini-chromosomes » additionnels au chromosome principal, en particulier chez les bactéries du genre *Rhizobium* (**Hogrefe et al., 1984; Margolin et al., 1993**).

Les plasmides au sein des protéobactéries sont l'un des groupes les plus étudiés car ils incluent ceux qui hébergent les gènes de pathogénicité, connus pour infecter à la fois les animaux et végétaux. En effet, environ la moitié des plasmides retrouvés dans les bases de données appartiennent aux protéobactéries. La majorité des plasmides au sein de ce phylum ont été trouvés dans le classes Gammaprotéobactéries (1389 ; 63 %) (**Shintani et al., 2015**).

Parmi les 1396 plasmides des *Gammaproteobacteria*, 830 sont classés dans les groupes *Inc* (*IncA* à *IncZ*, *IncP-1* à *IncP-9*, et *Inc13* ; 485 plasmides), *ColE1* (210 plasmides), *ColE2/E3* (38 plasmides) et d'autres groupes avec Rep connu (119 plasmides) (**Shintani et al., 2015**).

La majorité des plasmides de *Gammaproteobacteria* sont ceux des *Enterobacteriaceae* (927) et des *Pseudomonaceae* (183). Les plasmides des entérobactéries renferment le plus souvent la résistance aux antibiotiques, et qui provoquent un développement rapide de ce phénotype au sein d'une communauté bactérienne. Ainsi, plus de 75 % des plasmides chez *Enterobacteriaceae* (697/927) sont classés dans les Groupes *Inc*, y compris *IncF*, *IncA/C* (équivalent à *IncP-3*), *IncL/M*, *IncI*, *IncHI2/S* et *IncN* (Carattoli, 2009 ; Wang et al., 2013). La propagation de plasmides porteurs de gènes de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) dans cette famille est la plus documentée.

Les groupes plasmidiques trouvés dans les entérobactéries, telles que *Enterobacter*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* et *Yersinia*, comprennent un grand nombre de plasmides de virulence. Il convient de noter que les traits associés à la virulence d'*E. coli* se trouvent presque exclusivement sur les plasmides de la famille *IncF* (Johnson et Nolan, 2009). Chez *Yersinia* les résultats de recherches approfondies ont mis en évidence des « plasmides de réponse à de faible teneur en ions calcium (Ca^{2+}) », qui régulent la croissance et l'expression de plusieurs facteurs associées à la virulence, par Ca^{2+} et la température (Shintani et al., 2015).

II. 2. Classification des plasmides

Il existe de nombreuses façons de classer les plasmides du général au spécifique. Parmi les classifications les plus courantes, nous retrouvons celle qui se base sur la capacité des plasmides à se transférer d'une cellule à une autre, par conjugaison. Nous avons donc les :

➤ Plasmides conjugatifs

C'est des plasmides qui peuvent s'auto-transférer d'une cellule à une autre *via* un mécanisme de conjugaison, et bénéficient d'un spectre d'hôte allant parfois au-delà des limites intradomaine

➤ Plasmides non conjugatifs

Ce sont des plasmides qui ne peuvent pas faire la conjugaison. Ils sont généralement plus petits que les plasmides conjugatifs et il leur manque un ou plusieurs gènes nécessaires pour le transfert d'ADN.

➤ Plasmides mobilisables

C'est des plasmides qui ne sont pas autotransférable, mais qui peuvent être transférés d'une cellule bactérienne à une autre grâce à un plasmide assistant qui est un plasmide conjugatif

(**FROST, 1992**). Ces plasmides ne possèdent qu'une partie des gènes nécessaires à leur transfert et sont donc dépendants de l'établissement de la machinerie conjugatif d'autres éléments conjugatifs.

Une autre classification des plasmides se base sur les groupes d'incompatibilité (Inc). Dans une bactérie, différents plasmides ne peuvent coexister que s'ils sont compatibles entre eux. Un plasmide incompatible sera expulsé de la cellule bactérienne. Les plasmides sont incompatibles s'ils ont la même stratégie de reproduction dans la cellule ; cela permet aux plasmides d'habiter un certain territoire en son sein sans que d'autres plasmides n'interfèrent. Il existe 27 Groupes *Inc* chez les entérobactéries. La classification dans un groupe *Inc* est toujours basée sur la séquence en acides aminés de la protéine d'initiation de la réplication (Rep) (typage du réplicon).

Il existe cinq principaux types de plasmides spécifiques: les plasmides F de fertilité, les plasmides de résistance, les plasmides de virulence, les plasmides de dégradation et les plasmides Col.

➤ **Plasmides F de fertilité**

Les plasmides de fertilité, également connus sous le nom de plasmides F, contiennent des gènes de transfert qui permettent de transférer des gènes d'une bactérie à une autre par conjugaison. Ceux-ci constituent la grande catégorie des plasmides conjugatifs. Les plasmides F sont des épisomes, qui sont des plasmides qui peuvent être insérés dans l'ADN chromosomique. Les bactéries qui ont le plasmide F sont appelées F positives (F+), et les bactéries qui n'en ont pas sont F négatives (F-). Lorsqu'une bactérie F+ se conjugue avec une bactérie F-, il en résulte deux bactéries F+. Il ne peut y avoir qu'un seul plasmide F dans chaque bactérie.

➤ **Plasmides de résistance**

Les plasmides de résistance ou R contiennent des gènes qui aident une cellule bactérienne à se défendre contre les facteurs environnementaux tels que les poisons ou les antibiotiques. Certains plasmides de résistance peuvent se transférer par conjugaison. Lorsque cela se produit, une souche de bactéries peut devenir résistante aux antibiotiques.

➤ **Plasmides de virulence**

Lorsqu'un plasmide de virulence se trouve à l'intérieur d'une bactérie, il transforme cette bactérie en agent pathogène susceptible de causer des maladies. *Escherichia coli* possède

plusieurs plasmides de virulence. De cette manière, certaines souches d'*E. coli* peuvent provoquer de graves diarrhées et des vomissements. *Salmonella enterica* est une autre bactérie qui contient des plasmides de virulence.

➤ **Plasmides de dégradation**

Les plasmides dégradants aident la bactérie hôte à digérer des composés que l'on ne trouve pas couramment dans la nature, tels que le camphre, le xylène, le toluène et l'acide salicylique. Ces plasmides contiennent des gènes pour des enzymes spéciales qui décomposent des composés spécifiques. Les plasmides de dégradation sont conjugatifs.

➤ **Les plasmides Col**

Les plasmides Col contiennent des gènes qui fabriquent des bactériocines (également appelées colicines), qui sont des protéines qui tuent d'autres bactéries et défendent ainsi la bactérie hôte. Les bactériocines se trouvent dans de nombreux types de bactéries, y compris *E. coli*, qui les obtient du plasmide ColE1.

II. 3. Transfert des plasmides conjugatifs par conjugaison

Le transfert d'ADN dans une bactérie peut se dérouler selon 3 types de mécanismes : la transformation la transduction et la conjugaison. Cette dernière fut observée pour la première fois en 1946 chez *E. coli* Edward Tatum et Joshua Lederberg qui ont montré que les bactéries pouvaient s'échanger des informations génétiques par le transfert unidirectionnel d'ADN, médié par un facteur appelé facteur F (Fertilité). C'est bien plus tard qu'on s'est rendu compte que le facteur F est un élément génétique répliatif extra-chromosomique, surnommé « plasmide », qui peut être transféré à travers les membranes cellulaires des souches bactériennes (**Virrolle et al., 2020**).

Depuis cette découverte majeure, une pléthore d'éléments conjugatifs ont été mis en évidence, y compris les plasmides, les transposons conjugatifs et les éléments conjugatifs intégratifs (ICEs), révélant ainsi que la conjugaison est un mécanisme de transfert d'ADN universellement conservé parmi les bactéries Gram négatif et à Gram positif (**Grohmann et al., 2003 ; Cruz et al., 2010**).

La conjugaison dépend d'un contact cellulaire établi par un pilus. Un pont cytoplasmique est alors formé et permet le transfert du plasmide d'un organisme donneur (ou cellule mâle) à un organisme Récepteur (ou cellule femelle) (**Novick et al., 1976**).

Les plasmides conjugatifs codent les fonctions permettant leur propre transfert. La relaxase est une protéine commune nécessaire à tous les plasmides pour leur transfert, qui reconnaît une origine de transfert (*oriT*) et procède à la coupure simple brin du plasmide. L'association avec d'autres protéines forme un complexe dénommé relaxosome. Cette structure est par la suite reconnue par la protéine de couplage (T4CP) permettant de la diriger vers la paroi cellulaire. Le plasmide est parallèlement dupliqué par un mécanisme de réplication en cercle roulant très représenté chez les plasmides des bactéries à Gram positif, mais également décrit pour des plasmides de bactéries à Gram négatif (**Ruiz-Maso et al., 2015**). Chez les bactéries à Gram négatif, les plasmides sont transférés à travers un pilus assemblé par un système de sécrétion de type IV (T4SS). Une fois dans la cellule réceptrice, la relaxase catalyse une dernière étape de ligature permettant la re-circularisation du plasmide et son maintien dans le cytoplasme (**Byrd & Matson, 1997; de la Cruz et al., 2010; Furste et al., 1989; Gomis-Ruth et al., 2004**) (**Figure 3**).

II. 5. Le curage plasmidique

L'élimination de l'ADN plasmidique est une étape importante qui permet de vérifier la nature plasmidique de certains caractères dont ceux liés à la résistance aux antibiotiques (ATB). Le curage peut se produire de façon spontanée ou induite. Parmi les traitements utilisés pour inhiber la réplication du plasmide sans affecter la reproduction des cellules hôte nous retrouvons :

- **Les agents physiques** : tels que la température élevée (**Tomoeda et al., 1968**) au-dessus de la température de croissance normale ou optimale. Par exemple, les souches qui ont normalement une température de croissance optimale de 37°C peuvent être incubées à 43°C (**Carlton et Brown, 1981**)

- **Les agents chimiques** : Tels que le Sodium dodécylsulfate (SDS), un détergent ionique largement utilisé pour la rupture de la membrane cellulaire. Ce qui conduit à une réplication imparfaite du plasmide (**Brow, 1999**). Il existe d'autres agents courants de nature chimique différents comme : Acridine orange, Bromure d'éthidium, Quinacrine, Coumermycine, Novobiocine, Rifampicine.

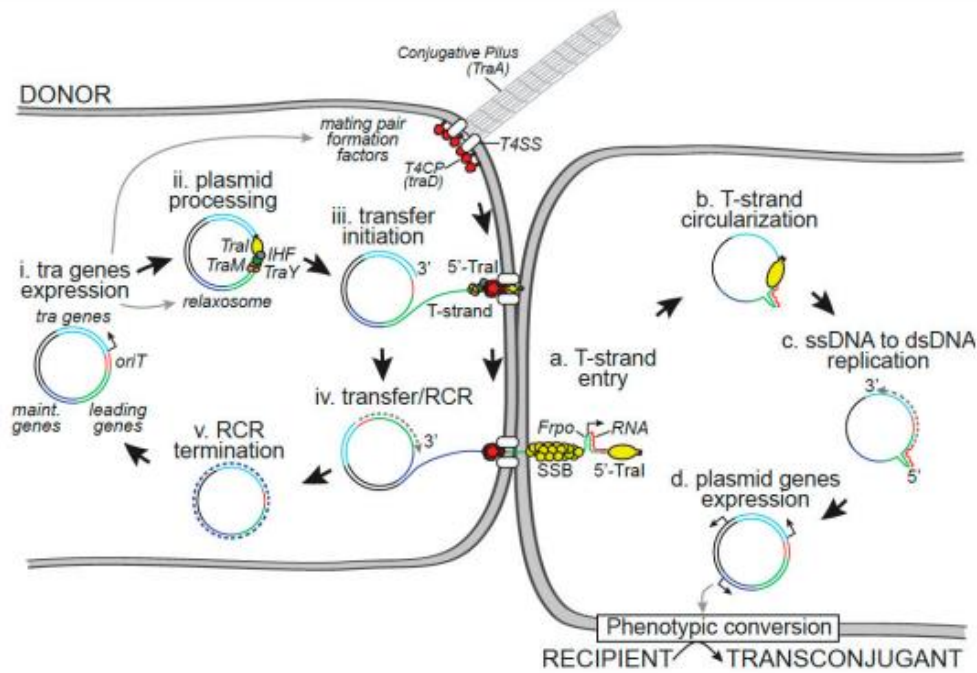


Figure 3 : Cycle de vie du plasmide F lors de son transfert par conjugaison du donneur à la cellule receveuse (Virolle et al., 2020).

La structure du plasmide F est composée des régions *tra* codant pour tous les gènes impliqués dans le transfert par conjugaison (bleu clair); l'origine du transfert *oriT* (rouge) ; la région leader (vert), qui est la première à être transféré dans la cellule réceptrice ; et la zone de maintenance (bleu foncé) impliquée dans la réplication et la partition des plasmides. (i) L'initiation de la conjugaison nécessite l'expression des gènes *tra*. Certaines des protéines Tra produites forment le T4SS et le pilus conjugatif qui recrute la cellule réceptrice et assurera la stabilisation de la paire d'accouplement. (ii) Les autres protéines Tra constituent le relaxosome (TraI, TraM et TraY) qui, associé au facteur d'intégration de l'hôte (IHF), se lie à l'*oriT* et prépare le plasmide pour le transfert en induisant la réaction de coupure par le TraI relaxase. (iii) L'interaction entre le relaxosome et la protéine de couplage de type IV (T4CP) initie le transfert du brin T par le T4SS. (iv, v) Le transfert du brin T lié à TraI chez le receveur est concomitante à la conversion du ssDNA en dsDNA par la réplication Rolling Circle (RCR) dans le donneur. (a) Lors de l'entrée dans le receveur, le brin T d'ADNss est recouvert par les protéines SSB de l'hôte, et le promoteur simple brin *Frpo* adopte une structure tige-boucle reconnue par l'ARN polymérase de l'hôte pour initier la synthèse des amorces d'ARN. (b) TraI effectue la circularisation de la totalité brin en T intérieurisé. (c) Le duplex ARN-ADN est reconnu par l'ADN polymérase hôte pour initier la réaction de synthèse du brin complémentaire. (d) Une fois la conversion du plasmide ssDNA en l'ADNdb terminée, l'expression du gène plasmidique entraîne la conversion

III. Entérobactéries et résistances aux antibiotiques

La pénicilline est le premier antibiotique découvert en 1928, par Alexander Fleming, qui a observé, par hasard, qu'une ou des substances produites par un champignon, *Penicillium notatum*, avaient la capacité d'inhiber la croissance bactérienne. Elle commença à être utilisée en 1943 pour traiter des soldats alliés lors de la deuxième guerre mondiale.

L'utilisation massive des antibiotiques depuis leur découverte a conduit à l'expansion de bactéries, dont les entérobactéries, de plus en plus de résistantes aux différentes familles d'antibiotiques. De par leur large utilisation en médecine humaine et vétérinaire, les β -lactamines sont les antibiotiques pour lesquels nous comptons le plus de résistance, par le biais de l'utilisation de divers mécanismes, qu'ils soient enzymatiques ou non.

Les β -lactamines sont une vaste famille d'antibiotiques, la plus largement développée et la plus diversifiée dans le monde (**Tableau II, Annexes 1**). Toutes les molécules de cette famille possèdent un noyau β -lactame, qui est la partie efficace de la molécule. Leurs cibles moléculaires sont les protéines PLP « Protéines Liant les Pénicillines » situées dans la paroi bactérienne et impliquées dans la synthèse du peptidoglycane. En se liant à ses protéines, les β -lactamines empêchent la synthèse des peptidoglycans de la paroi cellulaire. Ces antibiotiques ont donc un effet bactéricide (**Tooke et al., 2019**).

III. 2. Mécanismes de résistance aux β -lactamines

La **figure 4** est une illustration des différents mécanismes de résistance des entérobactéries aux **β -lactamines**. Comme nous pouvons le voir sur cette figure, nous avons des mécanismes enzymatiques et des mécanismes non enzymatiques. Le premier est le mécanisme prédominant de la résistance aux β -lactamines chez les entérobactéries. Ce sont des enzymes « β -lactamases » capables d'ouvrir le cycle β -lactame en créant un intermédiaire acyl-enzyme instable, menant au final à la perte d'un groupement carboxyle. L'enzyme en modifiant le noyau actif de l'antibiotique par le clivage ou par addition d'un groupement chimique, empêche la fixation de l'antibiotique sur sa cible et provoque une perte d'activité (**Tooke et al., 2019**).

La base de données des β -lactamases (www.bldb.eu) contient plus de 4300 de ces enzymes et qui ont subi des degrés divers de caractérisation (**Tooke et al., 2019**). Les β -lactamases sont généralement classées selon deux schémas généraux : la classification moléculaire d'Ambler et la classification fonctionnelle de Bush-Jacoby-Medeiros (**Bush et**

Jacoby, 1995 ; Ambler, 1980). Le schéma d'Ambler répartit les β -lactamases en quatre classes sur la base de l'homologie protéique des enzymes. Les β -lactamases de classe A, C et D sont des sérines β -lactamases et les enzymes de classe B sont les métallob- β -lactamases. Le schéma fonctionnel de Bush-Jacoby-Medeiros est basé sur les propriétés fonctionnelles des enzymes, c'est-à-dire les profils de substrat et d'inhibiteur. Cette classification est plus ramifiée que la première (**Ruppé, 2010**) (**Tableau I**).

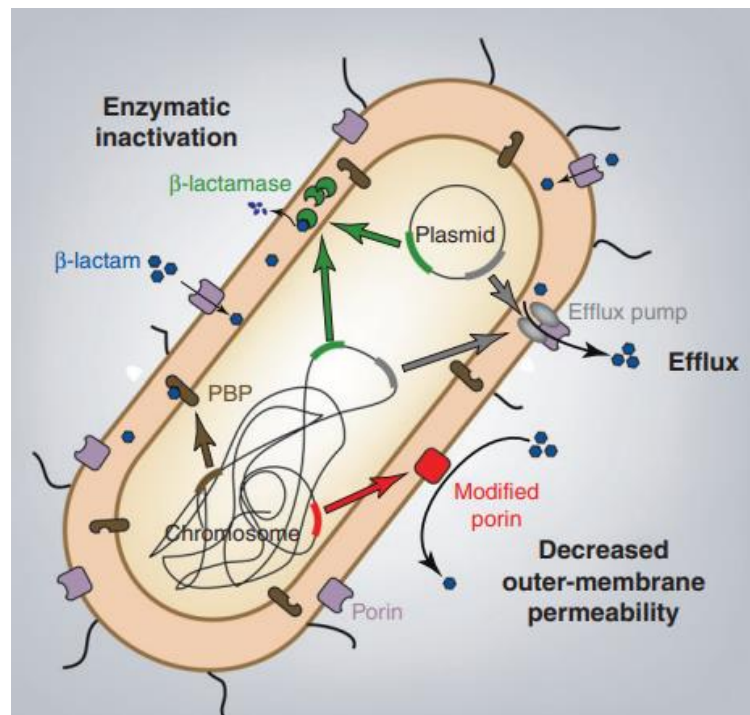


Figure 4 : Mécanismes primaires de la résistance aux β -lactamines chez les *Enterobacteriaceae* (**Nordmann et al., 2012**)

III. 3. β -lactamases à spectre élargi :

Les β -lactamases à spectre élargi (BLSE) sont une grande famille très hétérogène. Elles sont codées soit par des gènes plasmidiques, soit par des gènes chromosomiques préexistants mais qui ont subi des mutations (Ex : mutation du génome naturel chez *Klebsiella spp*, codant pour une β -lactamase SHV). Ceci confère aux bactéries concernées la capacité d'hydrolyser une grande variété de pénicillines et de céphalosporines. La majorité des BLSE sont le résultat de mutations génétiques de β -lactamases naturelles, en particulier de *TEM-1*, *TEM-2* et *SHV-1*. Ces dernières sont très actives contre les pénicillines et moyennement actives contre les céphalosporines.

Tableau I : Classification des β -lactamases bactériennes (Bush et al., 1995).

Bush-Jacoby-Medeiros group	1989 Bush group (44)	Richmond-Sykes class (253)	Mitsuhashi-Inoue type (194) ^a	Molecular class (2, 121, 132)	Preferred substrates	Inhibited by:		Representative enzymes
						CA ^b	EDTA	
1	1	Ia, Ib, Id	CSase	C	Cephalosporins	-	-	AmpC enzymes from gram-negative bacteria; MIR-1
2a	2a	Not included	PCase V	A	Penicillins	+	-	Penicillinases from gram-positive bacteria
2b	2b	III	PCase I	A	Penicillins, cephalosporins	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2bc	2b'	Not included except K1 in class IV	CXase	A	Penicillins, narrow-spectrum and extended-spectrum cephalosporins, monobactams	+	-	TEM-3 to TEM-26, SHV-2 to SHV-6, <i>Klebsiella oxytoca</i> K1
2br	Not included	Not included	Not included	A	Penicillins	±	-	TEM-30 to TEM-36, TRC-1
2c	2c	II, V	PCase IV	A	Penicillins, carbenicillin	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	2d	V	PCase II, PCase III	D	Penicillins, cloxacillin	±	-	OXA-1 to OXA-11, PSE-2 (OXA-10)
2e	2e	Ic	CXase	A	Cephalosporins	+	-	Inducible cephalosporinases from <i>Proteus vulgaris</i>
2f	Not included	Not included	Not included	A	Penicillins, cephalosporins, carbapenems	+	-	NMC-A from <i>Enterobacter cloacae</i> , Sme-1 from <i>Serratia marcescens</i>
3	3	Not included	Not included	B	Most β -lactams, including carbapenems	-	+	L1 from <i>Xanthomonas mal-tophilia</i> , CcrA from <i>Bacteroides fragilis</i>
4	4	Not included	Not included	ND ^c	Penicillins	-	?	Penicillinase from <i>Pseudomonas cepacia</i>

^a CSase, cephalosporinase; PCase, penicillinase; CXase, cefuroxime-hydrolyzing β -lactamase.

^b CA, clavulanic acid.

^c ND, not determined.

III. 3. 1. BLSE de type TEM et SHV

La première β -lactamase plasmidique hydrolysant les C3G fut isolée en République Fédérale d'Allemagne en 1983 au sein d'une *Klebsiella ozaenae*. Cette β -lactamase était dérivée de la β -lactamase à spectre étroit *SHV-1*, par une simple mutation responsable de l'élargissement du spectre d'hydrolyse de cette enzyme (Kliebe et al., 1985). Elle fut ainsi nommée *SHV-2*. Un an plus tard, en France, une autre β -lactamase plasmidique hydrolysant le céfotaxime fut isolée de *K. pneumoniae* (Sirot et al., 1987). Cette fois l'enzyme en question était dérivée de la β -lactamase à spectre étroit *TEM-1*. Cette enzyme fut initialement nommée *CTX-1*, puis finalement renommée *TEM-3*.

Ces BLSE étaient donc étroitement dérivées des β -lactamases à spectre étroit et conservaient ainsi la propriété d'être inhibées par les inhibiteurs de β -lactamase comme l'acide clavulanique, le tazobactam et le sulbactam. De par leur caractéristique de dériver de β -lactamases à spectre étroit (TEM et SHV), ces enzymes ont été désignées comme des β -lactamases à spectre élargi (BLSE) par Philippon et al. (1989). Ainsi jusqu'en 1989, les BLSE

isolées étaient dérivées de TEM et SHV suite à des mutations ponctuelles, et les principales observations ont été effectuées en France et en Allemagne.

III. 3. 2. CTX-M

En 1989, en Allemagne, Bauernfeind et *al.* Caractérisèrent chez une souche de *E. coli* résistante au céfotaxime une β -lactamase non-TEM non-SHV, qu'ils nommèrent CTX-M-1 (CTX-M pour « céfotaximase Munich ») en raison de son activité préférentielle marquée sur le céfotaxime par comparaison à la ceftazidime (**Bauernfeind et al., 1990**).

En 1989, en France, on isola chez un patient italien une souche d'*E. coli* présentant le même profil de résistance qu'une β -lactamase non-TEM non-SHV, nommée cette fois MEN-1 (initiales du patient) (**Bernard et al., 1992**). En 1995, Ishii et *al.* caractérisèrent une nouvelle β -lactamase non-TEM non-SHV chez une souche d'*E. coli* résistante au céfotaxime, dont la séquence nucléotidique montrera 83 % avec *bla*_{MEN-1}. Cette enzyme fut appelée TOHO-1, en référence à son lieu d'isolement (**Ishii et al., 1995**).

Le séquençage en 1996 de *bla*_{CTX-M-1} montra que CTX-M1 et MEN-1 étaient la même β -lactamase, qui s'avérait donc être un variant de TOHO-1 (83 % d'homologie) (**Bauernfeind et al., 1996**). Dans la même étude, le séquençage de *bla*_{CTX-M-2} (isolée dans une souche de *E. coli* d'Argentine en 1990) montra plus de 99 % d'homologie avec *bla*_{TOHO-1}. Dès lors, TOHO-1 fut renommée CTX-M-2, puis plus tard CTX-M-44 (**Ruppé, 2010**).

Comme nous l'avons précisé plus haut, les CTX-M sont des β -lactamases de classe A qui tiennent leur nom de par leur hydrolyse préférentielle du céfotaxime par rapport à la ceftazidime. Elles n'hydrolysent ni les céphamycines ni les carbapénèmes. On compte aujourd'hui plus de 90 CTX-M (www.lahey.org/studies, réparties en cinq familles. À l'intérieur de ces groupes les gènes ont entre eux plus de 94 % d'homologie, alors que les familles entre elles ont moins de 90 % d'homologie Le groupe CTX-M-1 compte notamment les CTX-M-1, CTXM-3, CTX-M-10 et CTX-M-15. Le groupe CTX-M-2 les CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7 et TOHO-1. Le groupe CTX-M-8 comporte CTX-M-8 et CTX-M-40. Le groupe CTX-M9 comporte CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-17, CTXM-19, CTX-M-21, CTX-M-27 et TOHO-2. Enfin le groupe 25 comporte CTX-M-25, CTX-M-26, CTX-M-41 et CTX-M-55 (**Ruppé, 2010**).

La mobilisation des CTX-M est due à plusieurs éléments. Des séquences d'insertion comme *ISEcp1* et *ISEcp1-like* ont été trouvées de façon répétée en amont de plusieurs gènes

codant pour les CTX-M et en amont de certains gènes *ampC* en position plasmidiques (D'Andrea et al., 2006 ; Haldorsen et al., 2008). Ces séquences codent pour une transposase et joueraient également un rôle dans l'expression de ces enzymes (Poirel et al., 2003). En effet, en séquençant *CTX-M-17*, on a trouvé des séquences 35 et 10 jouant un rôle de promoteur à la fin de la séquence 3' de *ISEcp1* (Cao et al., 2002). En plus de jouer un rôle dans la transposition, ces séquences seraient donc impliquées dans le degré d'expression de *bla_{CTX-M}*. D'autres séquences d'insertion ont été décrites, dont certaines en aval des *CTX-M* (*IS903*-like en aval de *CTX-M-14* et *CTX-M-17*) (Cao et al., 2002 ; Mendonca et al., 2007). On a également trouvé des *CTX-M* au sein d'intégrons, comme *CTX-M-9* et *CTX-M-2* qui ont été trouvées sur des intégrons de classe 1 (Sabate et al., 2002 ; Arduino et al., 2002). Les gènes *bla_{CTX-M}* ont été fréquemment isolés sur des plasmides de groupe d'incompatibilité F, dont la bonne diffusion au sein de l'espèce *E. coli* pourrait en partie expliquer le succès de ces β -lactamases au sein de cette espèce (Marcade et al., 2009) (Figure 5).

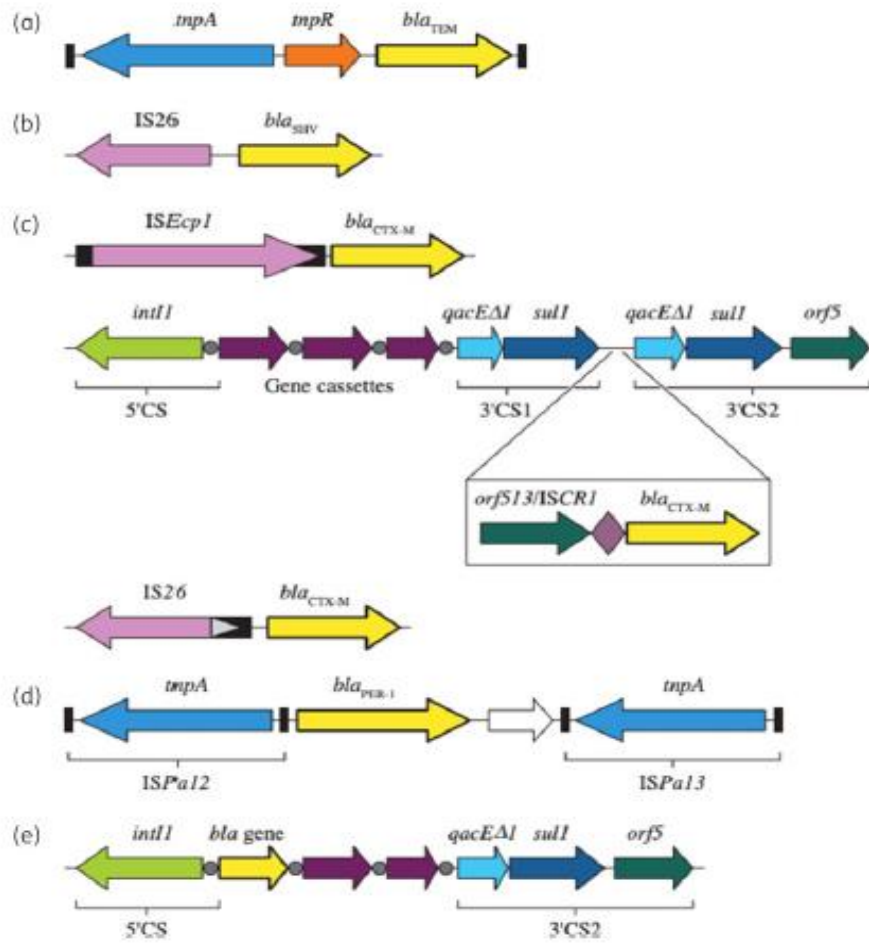


Figure 5 : Structures génétiques hébergeant des gènes codant pour les BLSE (Castanheira et al., 2021).

Les structures génétiques les plus souvent signalées comme hébergeant (a) *bla_{TEM}*, (b) *bla_{SHV}*, (c) *bla_{CTX-M}*, (d) *bla_{PER}* ou (e) intégrons de classe 1 pouvant porter des gènes BLSE peu communs.

Dans le cadre de l'obtention du diplôme de Master en Science de la Nature et de la Vie option Génétique, nous avons réalisé un travail de recherche concernant le curage plasmidique de souche d'entérobactéries à Gram négative productrice de β -lactamases à spectre élargi. Des essais de transfert génétique par conjugaison ont aussi été réalisés.

Notre étude a été menée au niveau du laboratoire de pédagogie de la FSNV de l'université Saad Dahleb, Blida 1 (Station expérimentale), du mois d'avril à juillet 2022.

I. Matériels

I.1. Matériel non biologique

La verrerie, l'appareillage, les solutions et les réactifs utilisés dans cette étude sont résumés dans l'annexe 2.

I.2. Matériel biologique

➤ souches bactériennes

Nous avons travaillé sur une collection de souches d'origine clinique et communautaire de phénotype BLSE, sur lequel notre promotrice Mme **AISSANI-ELFERTAS RADIA** a été réalisée. Il s'agit de souches d'*E.coli* (n=8), et de *K. pneumoniae* (n=16). Ces souches sont issues de divers prélèvements biologiques (sang, urines..) de patients atteints par une infection bactérienne.

L'identification de ces souches fut obtenue en utilisant les galeries API20E, suivie d'un antibiogramme réalisé par la technique de diffusion sur milieu gélosé, selon les normes préconisées par le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM-2013) (**Annexe 2**).

Les souches ont été fournies avec une fiche de renseignement sur laquelle sont déterminées : l'origine de prélèvement, le sexe, l'âge et le profil de résistance .Toutes ces informations seront rapportées dans la partie résultats.

II. Méthodes

II. 1. Mise en évidence du caractère BLSE chez les souches sauvages

La détermination des phénotypes de la BLSE se fait par la détection des substrats préférentiels de cette enzyme; elle se réalise en recherchant les éventuelles images de synergie en « bouchon de champagne » ou en « entonnoir » qui peuvent apparaître sur gélose entre

l'amoxicilline-acide clavulanique et une céphalosporine de troisième génération (Drieux *et al.*, 2008).(figure 6).

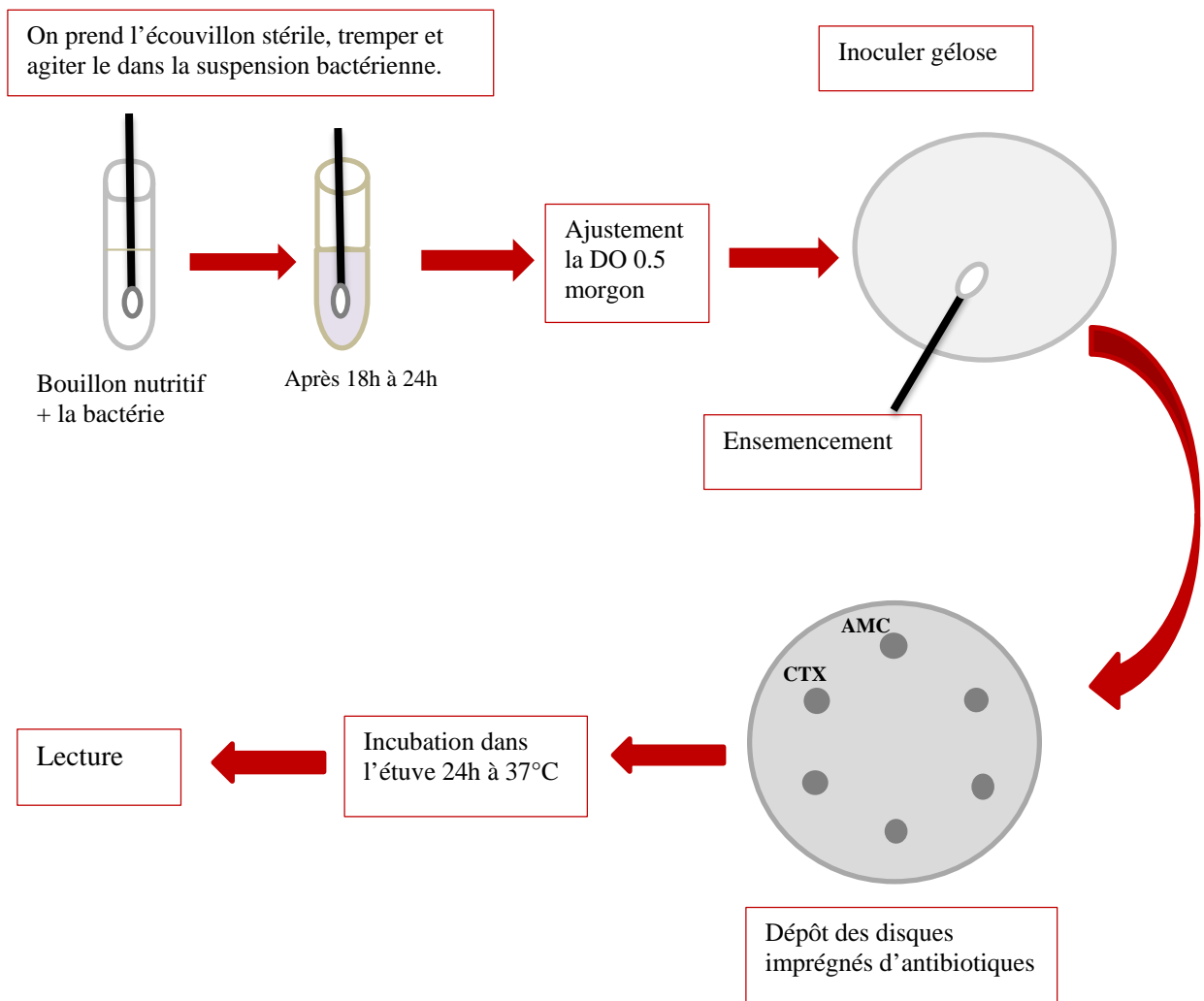


Figure 6 : schéma d'ensemble d'un antibiogramme par la méthode des disques et par incubation

La préparation de la suspension bactérienne ainsi que l'ensemencement d'une gélose Mueller-Hinton sont réalisés selon la technique de l'antibiogramme en utilisant les disques d'antibiotiques suivants: l'amoxicilline-AC-clavulanique (AMC), la ceftazidime (CAZ), la cefotaxime (CTX), la ceftriaxone (CRO) et l'aztreonam (ATM) sont placés sur la gélose Mueller-Hinton. La distance entre deux disques est de 30 mm centre à centre. L'incubation des

II. 2. Essai de Curage plasmidique

Le curage plasmidique est une étape importante dans l'identification du support génétique d'un trait phénotypique. Il permet d'éliminer l'ADN plasmidique d'une souche donnée et d'observer les changements phénotypiques occasionnés par cette perte.

Une multitude des produits d'origine physiques ou chimiques sont capables d'augmenter de façon significative la fréquence de curage en dehors de sa perte spontanée. De cette façon il est possible de vérifier la nature de la résistance bactérienne aux antibiotiques, spécifiquement aux céphalosporines de la 3^{ème} génération et confirmer si elle est portée par le chromosome ou par le plasmide de la bactérie.

Dans notre étude nous avons utilisé 2 types d'agent curant d'origine différente : la température et le Sodium Dodécyl Sulfate (SDS). Ces facteurs engendrent un stress répliatif. Les bactéries sont obligées donc de se débarrasser des molécules « facultatives » telles que les plasmides et de garder les composantes vitales telles le chromosome.

➤ **Protocole du curage par élévation de la température d'incubation**

Le curage par élévation de la température, consiste à cultiver la bactérie à curer dans un milieu LB. (**Figure 7**).

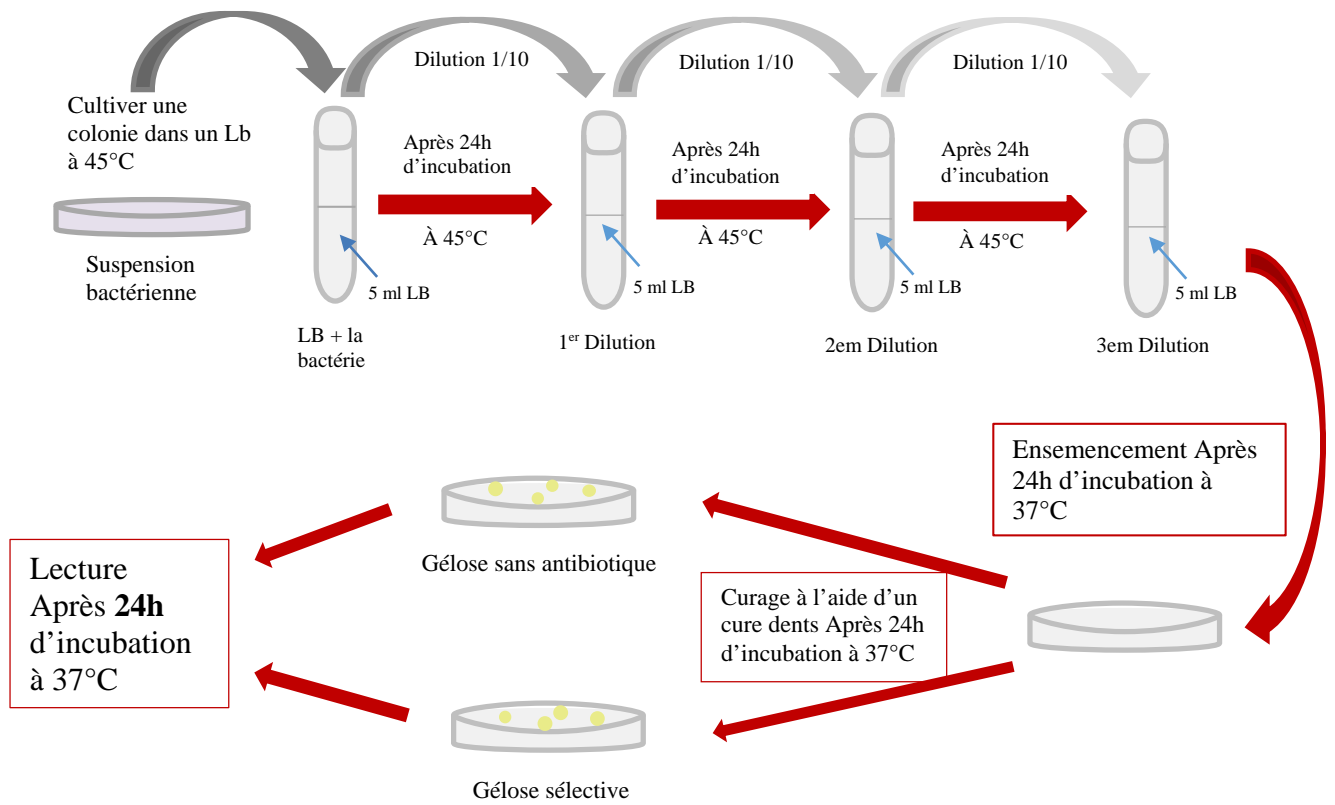


Figure 7 : schéma explicative de protocole de curage plasmidique par élévation de T°

➤ **Protocole du curage par ajout du SDS**

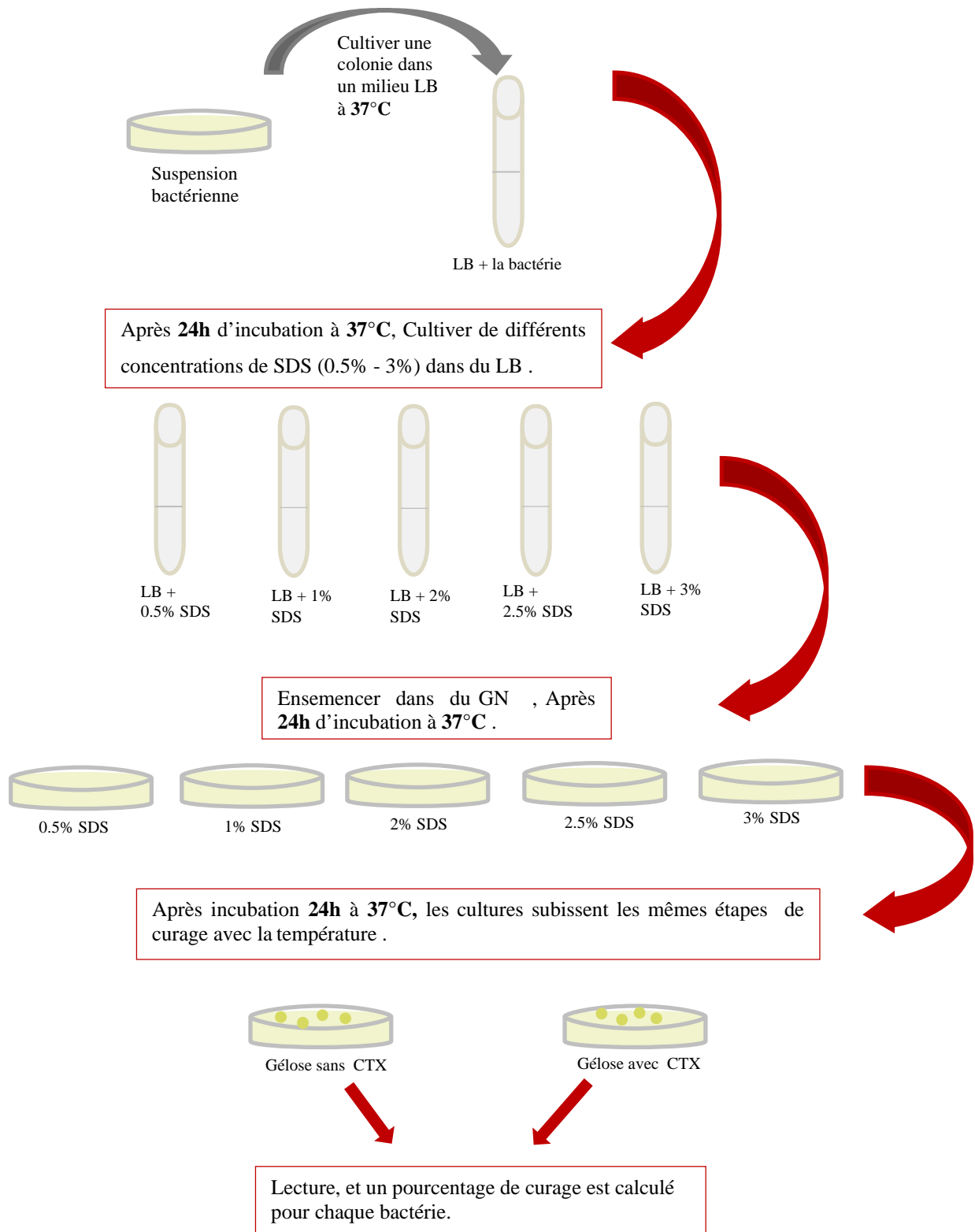


Figure 8 : schéma exprimer le curage par SDS

II. 3. Essais de transfert génétique par conjugaison

La conjugaison bactérienne est un mécanisme de transfert d'éléments génétiques entre une bactérie donatrice et une bactérie réceptrice nécessitant un contact physique entre ces deux bactéries par le biais d'un pili sexuel. La bactérie réceptrice ayant reçu le plasmide est appelée transconjugant. La sélection des transconjugants s'effectue en présence de deux antibiotiques dont l'un correspond à la résistance transférée par la souche donatrice et l'autre à la résistance non transférable de la souche réceptrice (**Davison, 1999**).

Nous avons réalisé des essais de transfert par conjugaison afin de connaître le support de la résistance au céfotaxime. (**figure 9**).

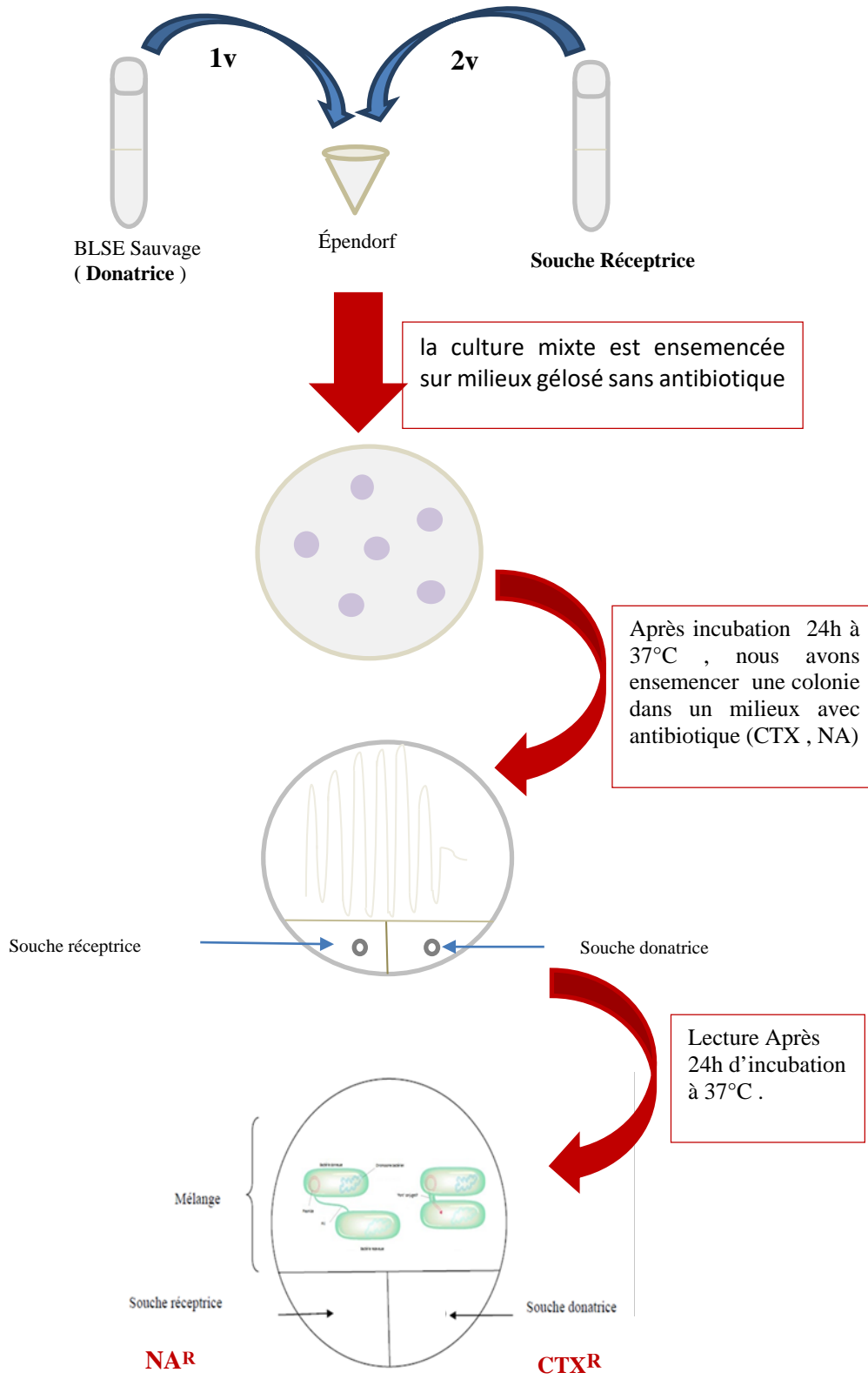


Figure 9 : Schéma montre les polics par conjugaison

I. Résultats de la recherche du phénotype BLSE

Les souches objet de notre étude, au nombre de 24, ont subi un antibiogramme suite à leur identification. La lecture interprétative évoque un éventuel phénotype BLSE. En effet, de faibles zones d'inhibition pour les molécules C3G (en l'occurrence le céfotaxime), furent observées pour l'ensemble des souches.

Le caractère BLSE a été recherché en réalisant le test de synergie. Une augmentation de l'activité des céphalosporines de troisième (céfotaxime) et quatrième génération (aztréoname) en présence d'acide clavulanique fut observée pour l'ensemble des souches (**Figure 10**). Ceci est fortement indicateur de l'expression d'une β -lactamase à spectre élargi par ces souches.

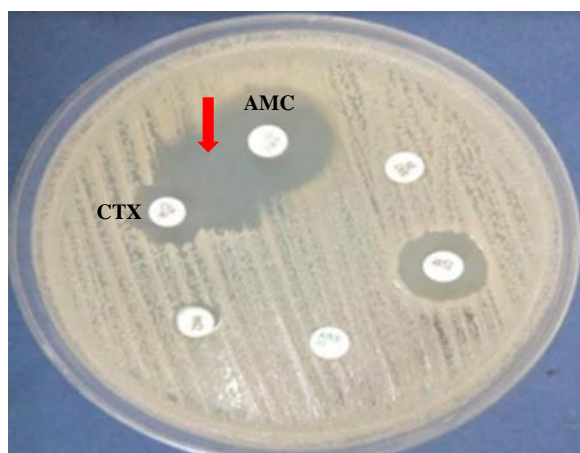


Figure 10 : Détection du phénotype BLSE

Observation d'une image de synergie entre le disque d'AMC et de CTX (flèche rouge)

Le phénotype BLSE est probablement lié, chez nos souches, à la production d'enzymes de type CTX-M vu les profils de résistance qui ont tous en commun la résistance au céfotaxime. Le recours à la biologie moléculaire est le meilleur moyen de confirmer ces résultats, en amplifiant les gènes de la famille *bla_{CTX-M}* par PCR. Une étape que nous n'avons, malheureusement, pas pu réaliser.

A l'instar de nombreux pays dans le monde, l'Algérie enregistre chaque année, à travers tout son territoire, des centaines de nouvelles souches d'entérobactéries multirésistantes, tout

particulièrement les BLSE et qui parfois font l'objet de publication telles que **Messai et al. (2008)**, **Touati et al. (2008)**, **Meradi et al. (2011)**, **Baba Ahmed-Kazi Tani et Arlet (2014)**, **Benbrahim et al. (2021)** et **Souna et al. (2022)**.

Une augmentation dramatique du nombre de β -lactamases a été décrite depuis les années 1980 et est liée presque exclusivement aux β -lactamases de classe A et D (**Bush et Jacoby, 2010**). Dans la classe A, les BLSE sont les plus répandues et représentent un réel problème de santé publique (**Coque et al., 2008 ; Pitout et Laupland, 2008**). Elles comprennent principalement les enzymes TEM, SHV, CTX-M, VEB et GES. Parmi eux, le plus grand nombre de variantes décrites ces dernières années correspond à la famille CTX-M. Cette diffusion massive des CTX-M à travers le monde a été qualifiée de « pandémie CTX-M ». Chaque année de nouvelle mise à jour sont publiées concernant la dissémination, la clonalité des isolats producteurs de CTX-M, l'épidémiologie moléculaire, la plasticité protéique ainsi que l'évolution et l'origine des gènes *bla_{CTX-M}* (**Cantón et al., 2012**).

Des études ont révélé que les enzymes CTX-M ont presque remplacé d'autres enzymes BLSE chez les *Enterobacteriaceae*, y compris les variants TEM et SHV. Cette dissémination pandémique des gènes *bla_{CTX-M}* est non seulement due au caractère mobilisable de leur support génétiques (plasmides, transposons, intégrons) mais aussi à leur présence dans des clones performants (**Cantón et al., 2012**). Une autre raison pourrait expliquer cette forte dissémination est le phénomène de co-résistance des souches arborant un gène *bla_{CTX-M}*, en particulier aux aminoglycosides et aux fluoroquinolones, ce qui pourrait faciliter les processus de co-sélection (**Morosini et al., 2006 ; Canton et Ruiz-Garbajosa, 2011**).

Au sein de la famille des enzymes CTX-M, les CTX-M-15 et CTX-M-14 sont de loin les plus importants. Les clones exprimant ces enzymes ont envahi pratiquement tous les compartiments humains et animaux ainsi que l'environnement, partout dans le monde (**Cantón et al., 2012**).

Les gènes *bla_{CTX-M}* sont liés à un environnement contenant des éléments génétiques spécifiques tels que les séquences d'insertion (IS), les intégrons et les transposons. Ces éléments sont intégrés dans des structures très complexes telles certains réplicons plasmidiques des groupes d'incompatibilité *Inc F, A/C, L/M, I1, HI2 et N*, définissant une organisation hiérarchique complexe avec la possibilité d'interchanger différents modules (**Carattoli, 2009 ; Cantón et al., 2012**). Les gènes *bla_{CTX-M}* ont été mobilisés à partir de *Kluyvera spp.* par les séquence IS et dans une moindre mesure par les bactériophages. Les IS participent également

à la surexpression de ces gènes et certains d'entre eux (c'est-à-dire ISCR1) sont adjacents à des structures d'intégrons qui sont également intégrés dans les unités de transposition. Ces suprastructures sont souvent incorporées dans des plasmides conjugatifs, qui pourraient être présent dans les clones à haut risque. De plus, ils peuvent fonctionner comme des unités évolutives et agir individuellement comme des unités de sélection (Baquero, 2004 ; Cantón et Ruiz-Garbajosa, 2011).

N'ayant pas les moyens techniques de rechercher les gènes *bla_{CTX-M}*, nous avons tenté de déterminer le support génétique de cette résistance et qu'on suspecte plasmidique. Pour ce faire, des essais de curage plasmidique et de transfert par conjugaison ont été réalisés.

II. Résultats des essais du curage plasmidique

Le curage est une technique qui consiste à empêcher la réplication de l'ADN plasmidique et donc entrainer sa dilution, à travers les divisions cellulaires, pour enfin obtenir des bactéries dépourvues d'ADN plasmidique. Des agents curants doivent être utilisés qu'ils soient de nature chimique ou physique.

II. 1. Curage plasmidique par élévation de la température

Dans notre étude, le support plasmidique de la résistance aux C3G, a été recherché par des essais de curage sur les souches BLSE. En effet, après culture bactérienne en plusieurs passages et incubation à des températures élevées (45°C), nous avons pu obtenir des souches « curées » devenues sensibles aux C3G, ayant donc perdu le caractère BLSE (Figure 11). Les résultats de ce curage sont mentionnés dans le tableau II.

Tableau II : Résultat du curage plasmidique par élévation de la température.

Souches BLSE	Souches curées (n, %)	Souches non curées (n, %)
<i>K. pneumoniae</i> (n= 16)	7 (43.75)	9 (56.25)
<i>E. coli</i> (n=8)	4 (50)	4 (50)

L'analyse du **tableau II** montre que sur 16 souches de *K. pneumoniae* soumises au curage par la température, 7 ont généré des souches curées dépourvues du caractère BLSE. Concernant les isolats d'*E. coli*, 4 souches ont été curées. Les résultats indiquent donc que la moitié des souches soumises au curage par élévation de la température ont été curées.

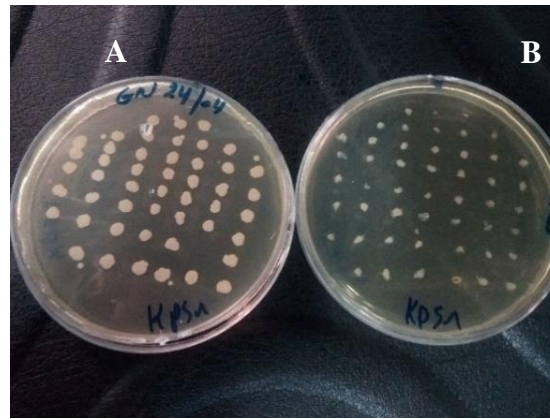


Figure 11 : Curage plasmidique par la température.

A- Boite non sélective ; B- Boite sélective (4µg/ml de CTX)

Le pourcentage de curage le plus élevé, avec la température, a été obtenu pour 3 souches de *K. pneumoniae* (tous les clones analysés ont perdu leur plasmide) et une souche *E. coli* (94.28% des clones analysés ont perdu leur plasmide) (**Tableau III**).

Tableau III : Résultat du curage plasmidique par élévation de la température.

	Souches	Clones analysés (n)	Clones curés (n, %)
<i>K. pneumoniae</i> (n=7)	Kp1	49	49 (100)
	Kp2	39	2 (5.12)
	Kp3	30	3 (10)
	Kp4	37	14 (37.83)
	Kp5	38	38 (100)
	Kp6	28	26 (92.85)
	Kp7	34	34 (100)
<i>E. coli</i> (n=4)	Ec1	35	33 (94.28)
	Ec2	32	17 (53.12)
	Ec3	29	5 (17.24)
	Ec4	23	20 (8.69)

Les souches ayant été curées ont donc un nouveau phénotype dit « sensible aux C3G ». Ce phénotype est attribué à la perte du plasmide porteur du gène *bla_{CTX-M}*. La température élevée, lors de l'incubation, a rendu les plasmides BLSE, instables, ce qui a conduit à des défauts de réplication et de partition entre les cellules filles après division cellulaire.

L'effet de la température a été étudié par **Wouters et al. (1980)** sur la souche *E. coli* PC221 (pBR322). Ils ont montré que l'apparition de cellules dépourvues de plasmide survenait plus tôt lorsque la température de culture était plus élevée (42°C au lieu de 37°C). **Cortinho et Hjortso (1988)** ont obtenu des résultats identiques avec *E. coli* B (pECA306). Ces auteurs ont de plus démontré que l'augmentation de l'acidité du milieu de culture contribuait à augmenter la probabilité de perte de plasmide.

Les agents curant tels que la température induisent une instabilité plasmidique. Cette dernière peut se définir comme la variation du nombre de plasmides dans les cellules ou leur modification. La distribution du nombre de copies de plasmides lors de la division cellulaire dépend de la réplication et la partition, deux phénomènes totalement indépendants. L'instabilité plasmidique peut être, dans certains cas, directement reliée au phénomène de partition ; on parle alors d'instabilité plasmidique ségrégationnelle. Elle peut aussi être due à des changements physiques dans la structure de l'ADN plasmidique, s'agissant donc d'une instabilité structurale.

II. 2. Curage plasmidique par le SDS

Nous avons réalisés d'autres essais de curage, cette fois-ci, en utilisant un agent chimique ; le Sodium Dodécyle sulfate ou SDS. Les mêmes souches ont été traitées. Les résultats sont mentionnés dans le **tableau IV**.

Tableau IV : Résultat du curage plasmidique par le SDS.

Souches BLSE	Souches curées (n, %)	Souches non curées (n, %)
<i>K. pneumoniae</i> (n=16)	3 (18.78)	13 (81.25)
<i>E. coli</i> (n=8)	3 (37.5)	5 (62.5)

L'analyse du **tableau IV** montre que sur 16 souches *K. pneumoniae* soumises au curage, en ajoutant dans le milieu de culture différentes concentrations de SDS, seules 3 souches ont généré des curées dépourvues du caractère BLSE (**Figure 12**). Concernant les isolats d'*E. coli*, 3 ont été curées sur 8.

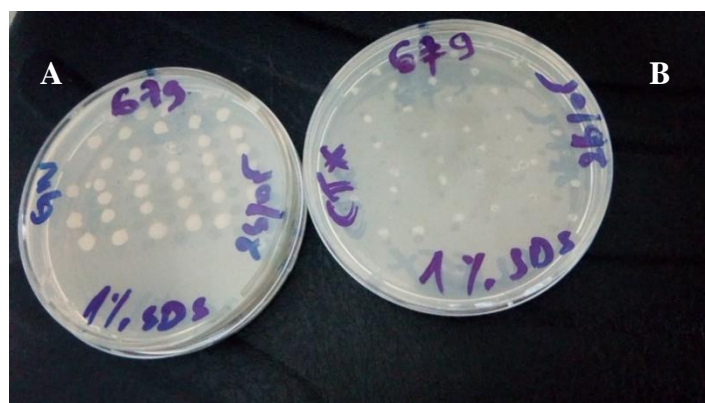


Figure 12 : Curage plasmidique par Le SDS.

A- Boite non sélective ; B- Boite sélective (4µg/ml de CTX)

Les résultats du **tableau V** indiquent que le curage plasmidique était positif, quel que soit la concentration du SDS. Le pourcentage de curage variait de 21.87% (Ec2 ; 2.5 µg/ml) 100% (souche Kp1 à toutes les concentrations).

Tableau V : Résultat du curage plasmidique par le SDS.

	Souches	Clones curés par le SDS (n, %)					
		0.5 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml	2.5 µg/ml	3 µg/ml	
<i>K. pneumoniae</i> (n=3)	Kp1	26/26 (100)	41/42 (97.62)	18/19 (94.73)	/	36/36 (100)	
	//	Kp3	14/36 (38.88)	/	/	/	/
	//	Kp5	/	38/38 (100)	5/14 (35.71)	/	4/15 (25)
<i>E. coli</i> (n=3)	Ec1	22/22 (100)	40/40 (100)	22/22 (100)	35/40 (87.5)	16/16 (100)	
		Ec2	/	/	/	7/32 (21.87)	/
		Ec4	/	26/28 (92.85)	22/22 (100)	/	16/16 (100)

Une caractéristique importante que partagent l'ADN génomique (chromosome) et l'ADN plasmidique est leur attachement direct à la membrane cellulaire. Le SDS, un détergent anionique largement utilisé pour la rupture de la membrane cellulaire, peut, à la bonne concentration, être capable de déloger le plasmide indigène de son site d'attachement, ce qui entraîne une réplication imparfaite et une ségrégation infructueuse du plasmide.

Après application du test de Chi-2 afin de comparer entre les taux de curage par la température et le SDS, les résultats statistiques indiquent que le chi carré est égal à 1,471 avec 1 degré de liberté. La valeur P bilatérale est égale à 0,2253. Selon les critères classiques, cette différence est considérée comme non statistiquement significative.

En analysant le tableau **IV** et **V**, nous remarquons que, parmi les klebsielles, la souche Kp1 fut curée dans les 2 cas (température et SDS), et que le taux de curage était le plus élevé à chaque fois (100%). Nous constatons aussi que la souche Kp3 a le pourcentage de curage le plus faible. Il semblerait que les 2 souches expriment des niveaux de résistance à la température différents ; la seconde étant plus résistante que la première et donc capable de se répliquer aisément dans des températures élevées, sans pour autant sacrifier ses plasmides.

III. Essais de conjugaison bactérienne

Le support plasmidique de la résistance aux antibiotiques a aussi été recherché, par des essais de transfert par conjugaison, sur milieux solide. Ce transfert n'a concerné que les souches qui ont été curées. Elles sont au nombre de 11. En effet, toutes les souches pour lesquelles le curage plasmidique a marché, ont été mises en contact (sur milieux solide) avec la souche réceptrice *E. coli* BM21 Na^R. Les résultats montrent que le transfert a réussi pour la quasi-totalité des souches (10/11). Les transconjugants obtenus possèdent une double résistance (**Figure 13**) ; la première à l'azide de sodium (origine souche réceptrice) et la deuxième au céfotaxime (origine souche donatrice).



Figure 13 : Transconjugants CTX^R, NA^R .

D : souche donatrice CTX^R, NA^S; **R :** souche réceptrice CTX^S, NA^R

Ces résultats indiquent que le plasmide porteur de la résistance au céfotaxime est un plasmide conjugatif (ou autotransférables). Ce type de plasmides codent pour l'ensemble de la « machinerie » de conjugaison. Ils portent les gènes codant pour le relaxosome ou complexe MOB (ou Dtr, DNA transfer replication) et le transférosome ou appareil d'appariement MPF (mating pair formation). Le premier complexe comprend une relaxase, un site d'origine de transfert *oriT* et une protéine de couplage T4CP (type IV coupling protein). Il est impliqué dans la préparation de l'ADN qui va être transféré. Le deuxième structure qui comprend d'une part le pilus qui permet aux deux cellules de rester accouplées et d'autre part, un système de sécrétion de type IV (SST4) qui forme un canal de transfert entre ces deux cellules (**Fronzes et al., 2009 ; Smillie et al., 2010**).

Les plasmides conjugatifs constituent de véritables « véhicules » de la résistance qui permettent le transfert de gènes de résistance d'une bactérie à une autre. L'analyse de sa séquence renseigne, entre autre, sur les fonctions essentielles codées par ce plasmide et ainsi, sur son potentiel de diffusion. Le « succès » d'un plasmide de multirésistance au sein d'une population bactérienne repose sur la répllication et sa coordination, sur le maintien du plasmide au cours des divisions cellulaires successives et sur le transfert conjugatif. La comparaison de plasmides appartenant à un même groupe d'incompatibilité devrait permettre d'approfondir nos connaissances sur ces différents systèmes afin d'identifier des cibles potentielles pour un

traitement prévenant la dissémination de la résistance, soit en causant la perte du plasmide, soit en inhibant son transfert conjugatif (**Williams et Hergenrother, 2008**)

La comparaison des séquences de plasmides permet également d'émettre des hypothèses sur l'émergence de gènes de résistance, sur l'émergence de clones bactériens multirésistants à succès, sur leur diffusion et leur évolution au sein de différents écosystèmes.

Les entérobactéries sont impliquées dans des infections diverses qu'elles soient nosocomiales ou communautaires. Ces infections peuvent être fatales quand elles sont causées par des germes multirésistants mettant ainsi le médecin devant une impasse thérapeutique.

Notre travail avait pour objectif d'étudier le support plasmidique de la résistance aux C3G. Nous avons donc réalisé des curages plasmidiques, chez des souches BLSE, par élévation de la température d'incubation et la culture dans du SDS. Nous avons aussi fait des essais de transfert par conjugaison, sur milieux solide. Les résultats de notre étude ont montraient que :

- toutes les souches étaient bien résistantes aux C3G et que c'était donc des BLSE.
- 11 souches parmi 24 ont été curées de leurs plasmides suite à une élévation de la température d'incubation.
- le rendement de curage par ajout du SDS au milieu de culture était plus faible ; il n'a concerné que 6 souches sur 24.
- les résultats du curage plasmidique était positif, quel que soit la concentration du SDS.
- les résultats du transfert par conjugaison montrent que le transfert a réussi pour la quasi-totalité des souches (10/11). Les transconjugants obtenus possèdent une double résistance ; la première à l'azide de sodium (origine souche réceptrice) et la deuxième au céfotaxime (origine souche donatrice).

Notre étude indique que les gènes *bla_{CTX-M}*; conférant la résistance au céphotaxime (une C3G) pourrait être d'origine plasmidique. En perspectives à ce travail, il serait intéressant de :

- caractériser les gènes responsables du phénotype BLSE, en pratiquant une PCR.
- déterminer l'environnement génétique de cette résistance.
- caractériser sur le plan moléculaire le plasmide porteur du caractère BLSE (séquençage, groupe d'incompatibilité).
- Sensibiliser les personnes et les patients à l'hygiène dans les hôpitaux.

- Alain R. & Bernard J., 2002.** Entérobactéries. *Éditions Lavoisier*, Paris, France, 38p.
- Avril J.L., Dabernat H., Denis F. & Monteil H., 2000.** Bactériologie clinique, *Ellipses 2ieme Edition*, Paris, France, 602 p.
- Baba Ahmed-Kazi Tani, Z., Arlet, G., 2014.** Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie. *Pathologie Biologie* 62, 169–178. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2014.01.005>
- Bakhoun I.M.N.S., 2004.** Contrôle de qualité et validation de différentes micro méthodes d'identification bactérienne. Thèse de Pharmacie, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal, 113 p.
- Barlow, M., Reik, R.A., Jacobs, S.D., Medina, M., Meyer, M.P., McGowan, J.E., Tenover, F.C., 2008.** High Rate of Mobilization for blaCTX-Ms. *Emerg Infect Dis* 14, 423–428. <https://doi.org/10.3201/eid1403.070405>
- Benbrahim, C., Barka, M.S., Basile, A., Maresca, V., Flamini, G., Sorbo, S., Carraturo, F., Notariale, R., Piscopo, M., Khadir, A., Zatout, A., Mechaala, S., 2021.** Chemical Composition and Biological Activities of Oregano and Lavender Essential Oils. *Applied Sciences* 11, 5688. <https://doi.org/10.3390/app11125688>
- Ben moussa. A., (2016).** Profile de sensibilité des entérobactéries aux fluor quinolones au ch de Rabat. Université Mohammed V- Rarat, 5-6p.
- Bibirou, 2016.** Résumé des caractères biochimiques des entérobactéries et autres bacilles gram - aéro-anaérobies
- Bush, Jacoby, 1995.** -Beta-lactamases classification according to Bush-Jacoby-Medeiros https://www.researchgate.net/figure/Beta-lactamases-classification-according-to-Bush-Jacoby-Medeiros_tbl1_262637897
- Canton, R., Gonzalez-Alba, J.M., Galán, J.C., 2012.** CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Frontiers in Microbiology* 3.
- Carattoli, A., 2009.** Resistance Plasmid Families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 2227–2238. <https://doi.org/10.1128/AAC.01707-08>
- Carlton, B.C. and Brown, B.J. (1981)** Gene mutation, in *Manual of Methods for General Bacteriology* (Gerhardt, P, Murray, R.G.E., Costiow, R.N., Nester, E.W., Wood, W.A., Kreig, N.R. and Phillips, G.B., Eds.) pp. 222-242. American Society for Microbiology, Washington, DC
- Cl. BERNARD et al., 1878.**<https://www.cnrtl.fr/definition/pathog%C3%A9nicit%C3%A9>
- Coque, T.M., Novais, Â., Carattoli, A., Poirel, L., Pitout, J., Peixe, L., Baquero, F., Cantón, R., Nordmann, P., 2008.** Dissemination of Clonally Related *Escherichia coli* Strains Expressing Extended-Spectrum β -Lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis* 14, 195–200. <https://doi.org/10.3201/eid1402.070350>

Coutinho, T.M., Hjortso, M.A., 1988. A new method for quantifying the probability of segregative plasmid loss in *Escherichia coli* B/r. *Biotechnol Tech* 2, 141–146. <https://doi.org/10.1007/BF01876166>

Davison, J., 1999. Genetic Exchange between Bacteria in the Environment. *Plasmid* 42, 73–91. <https://doi.org/10.1006/plas.1999.1421>

Drame B., 2001. Micro-méthodes d'identification et d'étude de la sensibilité des entérobactéries : intérêts thérapeutiques et diagnostiques. Thèse de Pharmacie, Université Cheikh Anta DIOP, Dakar, Sénégal. 115 p.

Djahida Souna, n.d. Enterobacter cloacae Complex and CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamases in Algeria | Microbial Drug Resistance [WWW Document]. URL <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/mdr.2020.0535> (accessed 11.4.22).

Dortet L., Poirel L., Nordmann, P. Épidémiologie, détection et identification d'entérobactéries productrices de carbapénèmases. *Feuillets de Biologie* 2013. 312.

Fronzes, R., Christie, P.J., Waksman, G., 2009. The structural biology of type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 7, 10.1038/nrmicro2218. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2218>

FROST L. S., 1992, Bacterial conjugation: everybody's doing it. *Can. T. Microbiol.* 38: 1091-1096.

Freny J., Renaud F., Hansen W. & Bollet C., 2000. Précis de bactériologie clinique. *Éditions ESKA*, France, 1692 p.

Joly B. & Reynaud A., 2007. Entérobactéries: systématique et méthodes de diagnostic. Edition Techniques et Documentation, Paris, 182 p.

Harriott, O. T., R. Huber, K. O. Stetter, P. W. Betts and K. M. Noll (1994). "A cryptic Miniplasmid from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga* sp. strain RQ7." *J Bacteriol* 176(9): 2759-62.

Hogrefe, C. and B. Friedrich (1984). "Isolation and characterization of megaplasmid DNA from lithoautotrophic bacteria." *Plasmid* 12(3):161-9.

Lederberg, J. and E. L. Tatum (1946). "Gene recombination in *Escherichia coli*." *Nature* 58: 558.

Meradi, L., Djahoudi, A., Abdi, A., Bouchakour, M., Perrier Gros Claude, J.-D., Timinouni, M., 2011. Résistance aux quinolones de types qnr, aac (6')-Ib-cr chez les entérobactéries isolées à Annaba en Algérie. *Pathologie Biologie* 59, e73–e78. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2009.05.003>

Messai, Y., Iabadene, H., Benhassine, T., Alouache, S., Tazir, M., Gautier, V., Arlet, G., Bakour, R., 2008. Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamases in

Klebsiella pneumoniae in Algiers hospitals (Algeria). *Pathologie Biologie* 56, 319–325.
<https://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.05.008>

Morosini, M.-I., García-Castillo, M., Coque, T.M., Valverde, A., Novais, Â., Loza, E., Baquero, F., Cantón, R., 2006. Antibiotic Coresistance in Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* and In Vitro Activity of Tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 2695–2699. <https://doi.org/10.1128/AAC.00155-06>

Nedjai, S., Barguigua, A., Djahmi, N., Jamali, L., Zerouali, K., Dekhil, M., Timinouni, M., 2012. Prevalence and characterization of extended spectrum β -lactamases in *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria. *Médecine et Maladies Infectieuses* 42, 20–29.
<https://doi.org/10.1016/j.medmal.2011.10.001>

Niang O., 2003. Validation d'une micro méthode d'identification des bacilles a Gram négatif non fermentaires Thèse de Pharmacie, Université Cheikh Anta DIOP, Dakar, Sénégal, 60p.

NOVICK R.P., CLOWES S. R. C., COHEN S.N., CTIRTSS [I R., DATTA N. & FALKOW S., 1976, Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal *Bacteriol. Rev.*, 40 (1), 1'68-189

Pitout, J.D., Laupland, K.B., 2008. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *The Lancet Infectious Diseases* 8, 159–166. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70041-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70041-0)

Salah, F.D., Soubeiga, S.T., Ouattara, A.K., Sadji, A.Y., Metuor-Dabire, A., ObiriYeboah, D., Banla-Kere, A., Karou, S., Simpore, J., 2019. Distribution of quinolone resistance gene (*qnr*) in ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Lomé, Togo. *Antimicrob Resist Infect Control* 8. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0552-0> .

Sahly H., Ancken H., Benedi V.J., Forestier C., Fussing V., Hansen D.S, Ofek I. & Podshun R., 2004. Impairment of Respiratory Burst in polymorph nuclear Leukocytes by Extended-Spectrum Beta-lactamase-Producing Strains of *Klebsiella pneumoniae*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 23 : 20-26.

Smillie, C., Garcillán-Barcia, M.P., Francia, M.V., Rocha, E.P.C., de la Cruz, F., 2010. Mobility of Plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 74, 434–452.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-10>

Stone P.W., Gupta A., Loughrey R.N., Della-Latta P.H., Cimiotti R.N., Larson E., Rubenstein D. & Saiman L., 2003. Attributable Coast And Length Of Stay Of An Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Outbreak In A Neonatal Intensive Care Unit. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 24 : 601-606.

Tomoeda M., Inuzuka M., Kubo N., Nakamura S., Effective elimination of drug resistance and sex factors in *Escherichia coli* by sodium dodecyl sulfate, *J. Bacteriol.* 95 (1968), 1078–1089

Touati, A., Brasme, L., Benallaoua, S., Madoux, J., Gharout, A., de Champs, C., 2008. *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing CTX-M-15 recovered from

hospital environmental surfaces from Algeria. *Journal of Hospital Infection* 68, 183–185. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2007.11.001>

Updated Functional Classification of β -Lactamases | Antimicrobial Agents and Chemotherapy [WWW Document], n.d. URL <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AAC.01009-09> (accessed 11.4.22).

Williams, J.J., Hergenrother, P.J., 2008. Exposing Plasmids as the Achilles' Heel of Drug-Resistant Bacteria. *Curr Opin Chem Biol* 12, 389–399. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.06.015>

Wouters, J.T.M., Driehuis, F.L., Polaczek, P.J., van Oppenraay, M.-L.H.A., van Andel, J.G., 1980. Persistence of the pBR 322 plasmid in *Escherichia coli* K 12 grown in chemostat cultures. *Antonie van Leeuwenhoek* 46, 353–362. <https://doi.org/10.1007/BF00421982>

Tableau 1 : caractères biochimiques des entérobactéries.(Bibirou, 2016).

Enterobacteriaceae (bacilles négatif aéro-anaérobies)							
	Catalase	Oxydase	Aérobie	Anaérobie	Mobilité	Capsule	Spore
<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	+	V	V	-
<i>Shigella</i>	+	-	+	+	-	-	-
<i>Salmonella</i>	+	-	+	+	+		-
<i>Citrobacter</i>	+	-	+	+	+		-
<i>Klebsiella</i>	+	-	+	+	-	+	-
<i>Enterobacter</i>	+	-	+	+	+		-
<i>Serratia</i>	+	-	+	+	+		-
<i>Proteus</i>	+	-	+	+	+		-
<i>Providencia</i>	+	-	+	+	+		-
<i>Morganella</i>	+	-	+	+	+		-
<i>Yersinia</i>	+	-	+	+	+	-	-
Autres bacilles à gram négatif aéro-anaérobies							
<i>Vibrions</i>	+	+	+	+	+	-	-
<i>Aeromonas</i>	+	+	+	+	V		-
<i>Plesiomonas</i>	+	+	+	+	+		-
<i>Pasteurella</i>	+	+	+	+	-	+	-
<i>Haemophilus</i>	V	V	+	+	-	V	-
<i>Photobacterium</i>	+	+	+	+	+		-
<i>Lucibacterium</i>	+	+	+	+	+		-
<i>Actinobacillus</i>	+	+	+	+	-		-

Tableau 2 : Classification des β -lactamases bactériennes (Bush et Jacoby, 1995)

Bush-Jacoby-Medeiros group	1989 Bush group (44)	Richmond-Sykes class (253)	Mitsuhashi-Inoue type (194) ^a	Molecular class (2, 121, 132)	Preferred substrates	Inhibited by:		Representative enzymes
						CA ^b	EDTA	
1	1	Ia, Ib, Id	CSase	C	Cephalosporins	–	–	AmpC enzymes from gram-negative bacteria; MIR-1
2a	2a	Not included	PCase V	A	Penicillins	+	–	Penicillinases from gram-positive bacteria
2b	2b	III	PCase I	A	Penicillins, cephalosporins	+	–	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2bc	2b'	Not included except K1 in class IV	CXase	A	Penicillins, narrow-spectrum and extended-spectrum cephalosporins, monobactams	+	–	TEM-3 to TEM-26, SHV-2 to SHV-6, <i>Klebsiella oxytoca</i> K1
2br	Not included	Not included	Not included	A	Penicillins	±	–	TEM-30 to TEM-36, TRC-1
2c	2c	II, V	PCase IV	A	Penicillins, carbenicillin	+	–	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	2d	V	PCase II, PCase III	D	Penicillins, cloxacillin	±	–	OXA-1 to OXA-11, PSE-2 (OXA-10)
2e	2e	Ic	CXase	A	Cephalosporins	+	–	Inducible cephalosporinases from <i>Proteus vulgaris</i>
2f	Not included	Not included	Not included	A	Penicillins, cephalosporins, carbapenems	+	–	NMC-A from <i>Enterobacter cloacae</i> , Smc-1 from <i>Serratia marcescens</i>
3	3	Not included	Not included	B	Most β -lactams, including carbapenems	–	+	L1 from <i>Xanthomonas maltophilia</i> , CcrA from <i>Bacteroides fragilis</i>
4	4	Not included	Not included	ND ^c	Penicillins	–	?	Penicillinase from <i>Pseudomonas cepacia</i>

^a CSase, cephalosporinase; PCase, penicillinase; CXase, cefuroxime-hydrolyzing β -lactamase.

^b CA, clavulanic acid.

^c ND, not determined.

2.1. Préparation de la gélose nutritive (GN)

- .Suspendre **39.3g** de la poudre de GN dans **1 litre** d'eau distillée.
- .agiter et Chauffer à l'aide d'un plaque chauffante pendant 30 minutes pour dissoudre complètement le milieu
- . Verser dans les flacons de 200 ml
- .Stériliser par autoclave à une température (**120C°**) pendant 15 minutes.
- . Laissé refroidir
- .Verser de l'agar nutritif dans les boite de pétrie (jusqu'à ce que l'agar soit solidifié).
- .Conserver les boites dans l'étuves à **37C°**.

2.2. Ensemencement des souches sélectionnées sur le bouillon nutritif (eppendorf)

- . À l'aide d'une micropipette verser 1ml de bouillon nutritif dans des éppendorfs
- .utiliser une pipette pasteur pour ajouter une cloner bactérienne dans les éppendorfs
- .agitation des tubes eppendorf
- .incubation dans l'étuves pendant 24h à **37C°**

2.3. Ensemencement sur les boites de gélose

- .mélangé le contenu de eppendorfe uniformément
- .A l'aide d'une pipette pasteur stérile on prend une goutte de suspension bactérienne à partir de eppendorfe
- . Déposer et ensemencer la suspension sur gélose dans la boite de pétrie par la réalisation des stries très serrées (déchargement).
- . Stériliser la pipette, puis refaire un 2^{ème} ensemencement, les stries doivent être toujours serrées.
- .conserver les boite dans l'étuves pendant 24h.

2.4. Préparation de milieu LB

- . Utilisée une balance de précision pour Préparer les ingrédients suivants
- .2.5g** Extrait de levure

.5g de trypton

.5g de Na Cl

.Verser le tout dans **500ml** de l'eau distillée

.Autoclave à **120C°** pendant 20 minutes

.après refroidissement, agiter les flacons et verser dans les tubes

2.5. Cultiver les bactéries dans un milieu LB

Prenez l'anse de platine et stériliser le dans la flamme bleu

Lorsqu'il est stérile retirer-le de la flamme et laissez-le refroidir dans l'air

Prenez la gélose contenant la culture à repiquer et prélevez 2 colonies à l'aide de l'anse de platine

Ouvrir le tube et flambée puis insérer l'anse dans le tube et agitée-le pour ensemer correctement le milieu de culture

Retirée l'anse, reflammée et refermée le tube

Séchez l'anse dans la flamme pour stérilisé

Incubation des tube dans l'étuve à **37C°** pendant 24h

Puis effectuer des passages (3fois) toute les 24h à une température de **45°C** par dilution 1/10 dans le même milieu (3jours)

Cette dilution consiste à :

. Prenez le tube LB contenant la suspension bactérienne

.Agiter le tube, ouvrir, stériliser-le dans la flamme

.à l'aide d'une pipette pasteur Prenez 10 microlitre de la culture et on va Versée dans un autre milieu LB

. Stériliser le tube, puis refermer et agiter le

.Incuber à 45C° pendant 24h

Après ces essais de curage plasmidique par élévation de la température, ont à réaliser un encensement sur GN, ensuit incubation 24h à 45C °.

À l'aide d'un cure-dent stérile on a réalisé des réplique pour chaque souche sur une gélose MH sans et avec céfotaxime (4 µg./mL), puis incubé 24h à 37C°

2.6 préparation le Mueller Hinton :

Suspendre 38g de poudre déshydratée, dans 1 L d'eau purifiée/distillé stérile et mélanger jusqu'à obtention d'une suspension homogène , Le milieu est bouilli pendant 30 min jusqu'à dissolution complète des ingrédients.

Stériliser par autoclavage à une pression de 15 lb (120°C) pendant 15 minutes.

Refroidir bien ,mélanger avant de verser dans des boîtes de Pétri stériles.

2.6.1 préparation la boite sélective :

Dans un eppendorfe ont mis **0.1g** de CTX puis en va diluer avec 1 ml de l'eau distillé , après en va prendre 9µl de la solution mère (CTX + ED) de l'eppendorf et verser dans un tube contenant 20 ml d'eau distillé (solution fille) , agiter -le .

Prendre 1 ml de la solution fille et verser dans la biote qui contient 19 ml de MH ,et en fait des mouvement de huit (8) .

Quand il refroidie en tourne la biote dans l'autre coter et en mis dans la cuve pendant 24h à 37°C .

3.interpétation d'antibiogramme :

- Chaque clone curé doit être cultivé dans un Bouillon (GN) sens ou Bouillon+ ANT (MH+CTX).
- Le clone curé est récupéré à partir de la boite non sélective (GN) .

les souches	Nbr de colonies	Curage positive (+)	Curage négative (-)
22	35	33	3
26	31	/	31
11	32	17	15
27	47	/	47
31	/	/	/
kp95	24	/	24
kp92	30	3	27
80	29	5	24

Kps1	49	49	/
Kps2	35	/	35
Kps3	51	/	51
Kpp2	39	2	37
Kpa1	43	/	43
Kpa2	45	/	45
Kpa3	30	/	30
Kpa4	56	/	56
Kpa5	31	/	31
Tckz19 (S.R)	20	20	/
kp257	37	14	23
kp679	38	38	/
576	23	20	3
676	/	/	/
kp653	28	26	2
kp641	34	34	/
Ec653	20	/	20

LES SOUCHES	Sexe	Age	Prélèvement	Lieu
22	F	1	ECBU	TARZALI
26	F	28	ECBU	TARZALI
11	F	23	ECBU	TARZALI
ND	H	74	ECBU	TARZALI
27	H	11	ECBU	TARZALI
31	F	84	ECBU	TARZALI
95	H	1	ECBU	TARZALI
80	F	46	ECBU	TARZALI
92	H	1	ECBU	TARZLI
KPS1	H	17	SANG	FRANZ FANON
KPS2	H	ND	SANG	FRANZ FANON
KPS3	H	55	SANG	FRANZ FANON
KPP2	F	84	PUS	FRANZ FANON
KPa1	H	44	PVA	FRANZ FANON
KPa2	H	55	PVA	FRANZ FANON
KPa3	H	ND	PVA	FRANZ FANON
KPa4	F	38	PVA	FRANZ FANON
KPa5	F	66	PVA	FRANZ FANON
257	F	ND	SANG	FRANZ FANON

679	ND	ND	Lame	FRANZ FANON
576	ND	ND	PVA	FRANZ FANON
676	ND	ND	PVA	FRANZ FANON
653	H	ND	PVA	FRANZ FANON
641	ND	ND	PVA	FRANZ FANON