

République algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche
Scientifique Université SAAD DAHLEB- Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département De Biologie et Physiologie Cellulaire

Mémoire de fin d'études

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

Filière Sciences Biologiques

Spécialité : Génétique.

Thème :

Etude de l'impact de la production de β -lactamases à spectre élargi sur l'expression des gènes de virulence de souches cliniques d'entérobactéries.

Présenté par : MEKARNIA ABDERRAOUF

BRUCE JOSHUA NII LAMTEY KOFI

Devant le jury :

Président (e) : Challal. N. Maitre de Conférences A (USDB1)

Examinatrice : Zerouti. K. Maitre de Conférences B (USDB1)

Promotrice : Aïssaini-El Fertas R. Maitre de Conférences B (USDB1)

Promotion 2021/2022

Remerciements

« Avant tout, nous tenons à remercier celui qui nous a créés, protégé, aidé, et celui qui nous a donné la force, la patience, la volonté et le courage pour pouvoir accomplir notre travail dans les meilleures conditions en disant « Dieu Merci »

*Nous adressons notre profonde gratitude et nos vifs remerciements les plus sincères et les plus chaleureux à notre promotrice **M^{me} Aissani Radia** d'avoir fait le grand honneur d'accepté de nous encadrer et nous dirigé dans ce travail avec bienveillance et rigueur. Merci pour votre amabilité, gentillesse, dynamisme, soutien, patience, merci pour votre aide précieuse et disponibilité ainsi votre rigueur scientifique au quotidien durant ces années. Merci de nous avoir fait confiance et de nous encourager pour la réalisation de ce mémoire.*

*Nous remercions infiniment **Dr. Mohamed Said Ramdane**, Responsable du master « Génétique » et de la filière Sciences Biologiques, pour son soutien et les leçons de vie qu'il nous a donné et pour tout ce qu'il a fait pour nous aider.*

*Nous remercions aussi cordialement les membres du jury, **Dr. Challal N.** D'avoir honoré ce travail en acceptant de présider le jury et **Dr. Zerrouti K.**, d'avoir consacré leur temps pour la lecture de notre manuscrit et de nous avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner et juger ce modeste travail.*

*Nous tenons à communiquer nos remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin d'une quelconque manière à la réalisation de ce mémoire, de ce défi personnel, nos **très chers parents**. Merci à tous pour leurs aides et leurs encouragements.*

Dédicaces

Avant tout, je remercie le Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.

Je dédie ce modeste travail...

Aux personnes les plus chères dans le monde, mes chers parents ♥

Vous avez tant sacrifié et cru en moi. Merci pour votre amour, soutien, Prières et confiance continus.

A ma très chère mère ♥

Affable, honorable, aimable qui représentes pour moi la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas de m'encourager et de prier pour moi.

A mon père ♥

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour lui, rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit des sacrifices qui ont consentis pour mon éducation et ma formation.

A ma promotrice Mme Aissani Radia ♥

La plus adorable et la plus gentille ainsi que sa famille.

♥ Abderraouf ♥

Nous dédions cette œuvre d'abord et avant tout au DIEU Tout-Puissant, qui nous accorde la sagesse et la compréhension pour mener à bien l'œuvre.

Un grand merci à nos familles qui nous ont soutenus à chaque étape du processus financièrement, émotionnellement et psychologiquement.

Nous dédions également cela à tous nos conférenciers de la 1ère année à maintenant, qui ont été patients avec nous et nous ont aidés alors que nous poursuivions la génétique comme domaine d'étude. Plus important encore, notre promoteur et mentor qui nous a montré le chemin et la voie du succès concernant ce travail.

Enfin, nous n'aurions pas pu tout faire sans nos amis et nos camarades de cours, qui ont été des piliers sur lesquels nous pouvons compter dans les moments de découragement et d'agitation, apportant le calme à nos cœurs, à nos esprits et à nos âmes.

♥ BRUCE ♥

Résumé

Les entérobactéries sont à l'origine de nombreuses infections nosocomiales et communautaires, chez l'homme. Le pouvoir pathogénicité des entérobactéries est parfois associé à la résistance aux antibiotiques et à une structure génétique particulière.

Nous avons entrepris d'étudier l'impact de la production de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) sur l'expression des gènes de virulence de 24 souches cliniques d'entérobactéries. Nous avons choisi comme modèle la formation de biofilm. Dans un premier temps, nous avons caractérisés le profil BLSE sur le plan phénotypique. Ensuite nous avons réalisé des expériences de curage plasmidiques. Enfin, nous avons comparé l'intensité du biofilm, formé *in vitro*, entre souches sauvages et souches curées.

Les résultats ont confirmé le caractère BLSE suite à l'apparition d'une image de synergie entre le disque AMP et CTX pour les 24 souches. Les expériences de curage ont été fructueuses pour 11 souches parmi les 24. Les souches curées ne poussaient plus dans un milieu de culture supplémenté de CTX. Les résultats indiquaient aussi que toutes les souches (sauvages et curées) formaient un biofilm *in vitro*. La comparaison de l'intensité du biofilm formé entre souches sauvages et curées a révélé qu'il n'y a aucune différence significative, entre la moyenne des densités optique pour le groupe BLSE (1.8180 ± 0.0808) et leurs curés par la température (1.8564 ± 0.0570). Cependant, une différence significative entre le groupe BLSE (1.7493 ± 0.1056) et ses curés par le SDS (1.9898 ± 0.0165). Il semblerait que la perte plasmidique ait eu un effet positif sur la formation de biofilm ce qui pourrait être fortement préjudiciable pour l'hôte en cas d'infection par des bactéries ayant ce profil génétique.

Mots clés : Entérobactéries, BLSE, plasmides, curage, virulence, biofilm

Abstract

Enterobacteriaceae are the cause of many nosocomial and community-acquired infections in humans. The pathogenicity of *Enterobacteriaceae* is sometimes associated with antibiotic resistance and a particular genetic structure.

We undertook to study the impact of production of β -lactamases with extended spectrum (BLSE) on virulence gene expression in 24 clinical strains of enterobacteria. We chose as a model the formation of biofilm. First, we characterized the BLSE profile phenotypically. Then we carried out experiments on plasma cures. Finally, we compared the intensity of the biofilm, formed in vitro, between wild and cured strains.

The results confirmed the BLSE character following the appearance of an image of synergy between the AMP disk and CTX for the 24 strains. The cleaning experiments were successful for 11 of the 24 strains. The curated strains no longer grew in a culture medium supplemented with CTX. The results also indicated that all strains (wild and cured) formed an in vitro biofilm. A comparison of the biofilm intensity between wild strains and cures revealed that there is no significant difference between the mean optical densities for the BLSE group (1.8180 0.0808) and their cures by temperature (1.8564 0.0570). However, a significant difference between the BLSE group (1.7493 0.1056) and its parish priests by the SDS (1.9898 0.0165). It appears that plasma loss has had a positive effect on biofilm formation, which could be highly detrimental to the host if infected with bacteria with this genetic profile.

Key words : *Enterobacteriaceae*, BLSE, plasmids, curage, virulence, biofilm

ملخص

البكتيريا المعوية هي عسوية سلبية الغرام توجد في كل مكان في التربة، في الماء، وخاصة في
المعاء (المعاء) للإنسان والحيوان، هذه السالالت من أصل زوسومي ومجتمعي.

تعدنا بدراسة تأثير إنتاج اللكتامات β ذات الطيف الممتد (*BLSE*) على التعبير الجيني للنوع
في 24 ساعة سريرية من البكتيريا المعوية. اخترنا كنموذج تكوين الأغشية الحيوية. أولًا، قمنا بتحديد
حلف تعريف *BLSE* من الزاحية الظاهرة. ثم أجرينا تجارب على علاجات البالزما. أخيرًا، وازنا كثافة
الأغشية الحيوية، المتكونة في المختبر بين السالالت البرية والمعالجة.

أكدت النتائج شخصية *BLSE* بعد ظهور صورة التأثر بين قرص *AMP* و *CTX* للسالالت الـ
24. نجحت تجارب التنظيف في 11 ساعة من أصل 24 ساعة. لم تعد السالالت المنسقة نتمو في وسط
تغلي مكمل بـ *CTX* أشارت النتائج أيضًا إلى أن جميع السالالت (البرية والمعالجة) شكلت أغشية حيوية
في المختبر. كشفت مقارنة كثافة الأغشية الحيوية بين السالالت البرية والعلاج أن ال يوجد فرق كبير
بين متوسط الكثافة البصرية لمجموعة *BLSE (1.8180 0.0808)* وعالجا حسب درجة الحرارة
(*1.8564 0.0570*). ومع ذلك هناك فرق كبير بين مجموعة *BLSE (1.7493 0.1056)* وكهزة
أبرشيتها من قبل *SDS (1.9898 0.0165)* يبدو أن فقدان البالزما كان له تأثير إيجابي على تكوين
الأغشية الحيوية، والذي يمكن أن يكون ضارًا للغاية بالمضيف إذا أصيب بالبكتيريا بهذا الحلف الجيني.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا المعوية، امتد طيف بينا اللكتاماز، علاج البالزما، ممرض البالزما، الأغشية الحيوية.

Liste des abréviations

API : Analytical Profile Index

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMC : Amoxicilline-AC-clavulanique

ATM : Aztreonam

β-lactamines : Bêta-lactamines

β-lactamase : Bêta-lactamase

BLSE : Bêta-lactamases à spectre élargi

KP : *Klebsiella pneumoniae*

CIG : Céphalosporine de 1ère génération

CRO : Ceftriaxone

CAZ : Ceftazidime

CsgD : Curlin subunit gene D

CTX : Cefotaxime

DO : Densité optique

E. coli : *Escherichia coli*

ECEP : *Escherichia Coli Entéropathogènes*

UPEC : *Escherichia coli uropathogènes*

UTIs : Infections du tractus urinaire

GES : Gene Expression Signatures

LB : Luria Broth

LPS : Lipopolysacharides

MH : Muller hinton

NDM-1 : New Delhi metallo-bêta-lactamase 1

OriT : Origine du transfert

PCR : Polymerase Chain Reaction

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SHV : Sulfhydryl reagent variable

SEM : Structural equation modeling

T4CP : Type IV coupling protein

T4SS : Type IV secretion system

VEB : Ventricular ectopic beats

Liste des figures et des tableaux

Figure 1 : Structure et aspect microscopique des <i>Enterobacteriaceae</i>	3
Figure 2 : Facteurs de virulence et de fitness exprimés par <i>E. coli</i> uropathogènes	4
Figure 3 : Mécanisme de conjugaison chez les plasmides conjugatifs et les plasmides mobilisables	6
Figure 4 : Structure générale des β -lactamines en rouge noyau β -lactame	8
Figure 5 : Mécanismes primaires de la résistance aux β -lactamines chez les <i>Enterobacteriaceae</i>	10
Figure 6 : Structures génétiques hébergeant des gènes codant pour les BLSE.....	12
Figure 7 : Etapes de formation du biofilm bactérien.....	15
Figure 8 : Principales infections associées aux biofilms	17
Figure 9 : Détection du phénotype BLSE.....	21
Figure 10 : Curage plasmidique par la température	23
Tableau I : Résultat du curage plasmidique par élévation de la température	22
Tableau II : Résultat du curage plasmidique par élévation de la température.....	23

Sommaire

Introduction	1
---------------------------	----------

Rappels Bibliographiques

I. Généralités sur les entérobactéries	2
I. 1. Caractères morphologiques cultureux et biochimiques	2
I. 2. Propriétés infectieuses des entérobactéries	3
II. Plasmides chez les entérobactéries	4
II. 2. Types de plasmides	5
II. 2.1. Les plasmides conjugatifs.....	5
II.2.2. Les plasmides mobilisables	5
II.2.3. Les plasmides non conjugatifs	5
II. 3. Transfert des plasmides par conjugaison	5
III. Plasmides et résistance aux antibiotiques.....	7
III. 1. Généralités sur les antibiotiques	7
III. 2. Résistance aux antibiotiques	8
III. 3. Résistance aux β -lactamines chez les entérobactéries.....	9
III. 3. 1. β -lactamases à spectre élargi.....	10
III. 3. 2. β -lactamases de type CTX-M	11
II. Biofilm bactérien.....	13
II. 1. Composition du biofilm	13
II. 2. Etapes de formation des biofilms	14
II. 3. Gènes impliqués dans la formation de biofilm.....	15
II. 4. Facteurs influençant la formation de biofilm	16
II. 5. Conséquences médicales du développement des biofilms	16

Matériel et Méthodes

I. Matériel	18
I. 1. Matériel biologique	18
I. 2. Matériel non biologique	18
II. Méthodes	19
II. 1. Mise en évidence du caractère BLSE chez les souches sauvages.....	19
II. 2. Essai de Curage plasmidique.....	19
II. 3. Recherche de la formation de biofilm.....	20
III. Etude statistique	20

Résultats et Discussion

I. Résultats de la recherche du phénotype BLSE	21
II. Curage plasmidique par élévation de la température	22
III. Résultats de la relation du plasmide de résistance sur la formation de biofilm	24

Conclusion et perspectives

Conclusion	28
Références bibliographiques	30

Annexes

L'évolution rapide de la résistance bactérienne aux antibiotiques est aujourd'hui une préoccupation majeure de nombreux pays dans le monde. Cette résistance est marquée par l'apparition et la dissémination de nouveaux gènes, souvent portés par des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides. La résistance aux antibiotiques est encore plus marquée chez les diverses espèces d'entérobactéries dont *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* (Ahmed et al., 2014).

Les entérobactéries font partie des bactéries les plus souvent isolées chez les malades hospitalisés. Elles sont souvent à l'origine d'infections urinaires, pulmonaires, septicémiques ou intra-abdominales. Sur le plan génétique ces bactéries sont très hétérogènes. Elles exhibent un profil de résistance varié dont l'un des plus répandu et des plus inquiétant est la production de β -lactamases à spectre élargi, conférant la résistance aux β -lactamines étendu aux céphalosporines de 3^{ème} génération (Lagha, 2015). Cette résistance, longtemps opposée à la virulence au sein d'une même souche, dans certains cas elle semble s'associer à des profils de pathogénicité très dangereux, donnant à la bactérie la capacité de s'échapper aux différents mécanismes de défense de l'hôte. Cette association fut rapporté par certains écrits qui suggère que les gènes de résistance aux antibiotiques pourraient potentialiser l'expression des gènes de virulence pour une meilleur adaptation dans l'hôte (Hannequin et al., 2015).

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 l'étude de l'impact de la production de β -lactamases à spectre élargi sur l'expression des gènes de virulence de souches cliniques d'entérobactéries. 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.
- Evaluation de l'impact du plasmide BLSE sur l'intensité du biofilm formé parmi les souches sauvages et curées.

I. Généralités sur les entérobactéries

Les membres de la famille des entérobactéries sont des bactéries à Gram négatif présents dans le sol, l'eau et, surtout, dans l'intestin de l'homme et des animaux. Il existe une grande variété d'espèces et de genres au sein de cette famille. En effet, il existe plus de 130 espèces dont les plus isolées sont celles des genres : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia* (**Khayar, 2011**).

Les entérobactéries sont des aéro-anaérobies, mobiles ou immobiles, facilement cultivable, glucose fermentant, transformant les nitrates en nitrites, dépourvu d'oxydase (**Khayar, 2011**). Elle constitue une famille très hétérogène sur le plan pathogénique et écologique. Elle inclut des espèces pathogènes (*Shigella*, *Yersinia pestis*), commensales (*Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*) ou saprophytes (*Serratia sp.*, *Enterobacter sp.*) (**Soumaila, 2012**).

I. 1. Caractères morphologiques cultureux et biochimiques

Les bactéries de la famille des entérobactéries ont une forme en bâtonnet (Bacille). Elles mesurent entre 2 et 3 micromètres de longueur et 0,6 de largeur. Les espèces mobiles sont souvent causées par une ciliature péritriche. Certains sont immobiles (*Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia pestis*) (**Figure 1**) (**Khayar, 2011**).

Les entérobactéries croissent facilement dans des milieux ordinaires en 24 heures à 37°C dans des conditions aérobies et anaérobies. Leurs exigences nutritionnelles sont généralement réduites et la plupart se multiplie en milieu synthétique avec une simple source de carbone telle que le glucose. Ce sont des germes mésophiles et neutrophiles (pH 5,5 - 8) et ils sont assez tolérants aux variations de la pression osmotique (**Konare, 2016**).

Il faut mettre en évidence les propriétés de la famille pour affirmer que la souche est une entérobactérie. Nous utilisons des tests d'étude du métabolisme des protéines (présence d'uréase, production d'indole, dégradation du tryptophane) ou de fermentation des sucres (glucose, lactose, saccharose, etc.), la possibilité d'utiliser le citrate, la présence d'enzymes (décarboxylases, désaminases), la production de sulfure d'hydrogène ou la formation de gaz (**Konare, 2016**). Classiquement, l'identification se déroule dans des tubes, assurant à la fois la croissance et la réaction biochimique. De nouvelles approches à cette méthode notamment par

l'élaboration des galeries API 20E, premières galeries mises au point pour les entérobactéries et aussi la création d'automate comme le MINI API (Khayar, 2011).

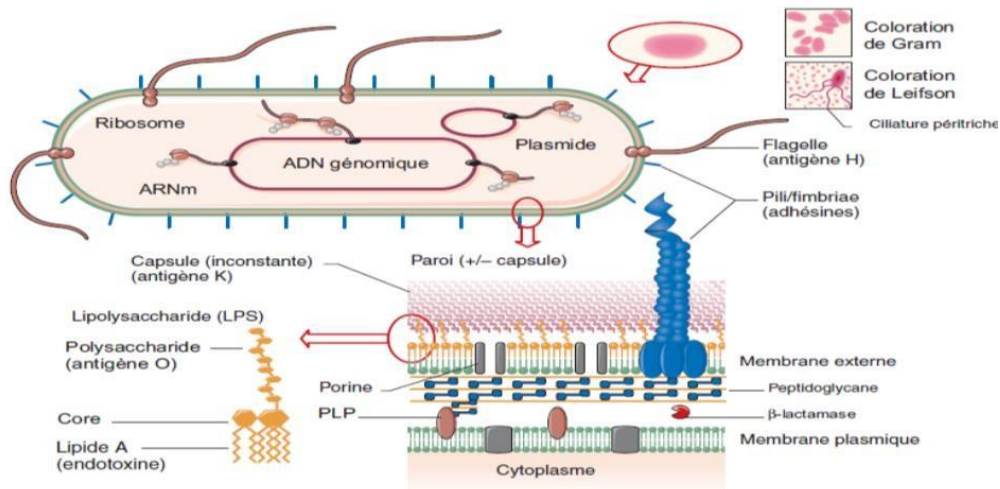


Figure 1 : Structure et aspect microscopique des *Enterobacteriaceae* (Denis et al. 2007).

I. 2. Propriétés infectieuses des entérobactéries

Les entérobactéries peuvent causer des maladies de gravité très variable dues à des mécanismes pathogènes distincts. Les étapes de l'infection sont réalisées grâce à une panoplie de facteurs de virulence, codés par des gènes aux structures parfois complexes. *Escherichia coli* peut causer des infections intestinales. En effet, les souches d'*E. coli* Entéropathogènes ou « ECEP » causent des une diarrhée liquide aiguë abondante, qui est rarement persistante. Les selles ne sont généralement ni sanglantes, ni mucoïdes, ni dysentériques. Une faible fièvre, des nausées et des vomissements sont possibles. L'infection par ECEP se caractérise par la formation de lésions d'attachement/effacement dans les régions touchées de l'intestin. Hormis les infections intestinales, *Escherichia coli*, peut causer des infections extra-intestinales. En effet, les souches uropathogènes ou UPEC qui cause des infections du tractus urinaire (UTIs), peuvent atteindre la vessie et provoquer une cystite aiguë ou infecter les reins et provoquer une pyélonéphrite aiguë. Dans certains cas les UTIs peuvent mener à une septicémie. La **figure 2** illustre les principaux facteurs de virulence qui sont impliqués dans les UTIs.

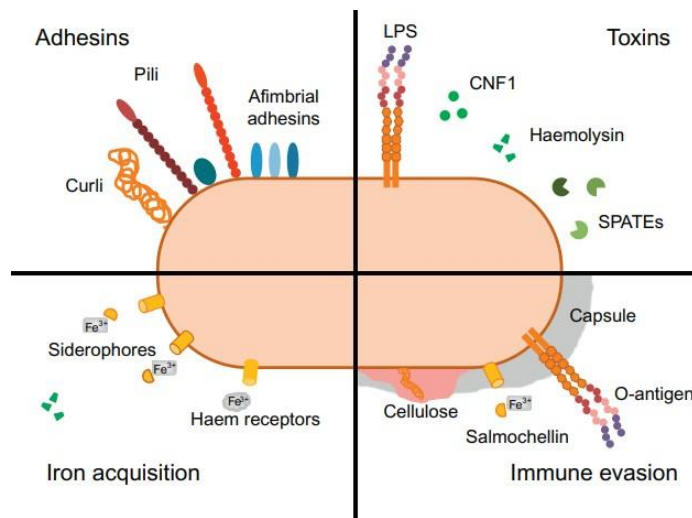


Figure 2 : Facteurs de virulence et de fitness exprimés par *E. coli* uropathogènes.

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

II. Plasmides chez les entérobactéries

Un plasmide est une molécule d'ADN surnuméraire distincte de l'ADN chromosomique, capable de répllication autonome (c'est-à-dire indépendante du génome bactérien), et non indispensable à la survie des cellules (**Madi, 2013**). Il est généralement de forme circulaire mais peut aussi se présenter sous forme linéaire chez certaines espèces.

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**).

La présence de certains gènes situés sur leurs plasmides peut leur conférer un avantage sélectif et des fonctions permettant une meilleure adaptation de la bactérie hôte à son environnement, comme la résistance aux antibiotiques, toxines, adhésines, chaînes métaboliques supplémentaires. Les plasmides se distinguent par leur mobilisation, leur nombre copie, leur particularité d'hôte (**Mhaya, 2019**). La mobilité plasmidique (par

conjugaison) dans les populations bactériennes augmente le spectre hôte des gènes impliqués dans la virulence (plasmides conjugatifs) (Madi, 2013).

II. 2. Types de plasmides

II. 2.1. Les plasmides conjugatifs

Ce sont des plasmides qui peuvent s'auto-transférer d'une bactérie (Donneuse) à une autre (Réceptrice). Ces plasmides se caractérisent par des structures modulaires, qui consistent en un module de conjugaison codant les gènes *Tra*. Ce module comporte une origine de transfert reconnue par une relaxase et permet la synthèse d'un système de sécrétion de type IV (ou pilus sexuel). La relaxase réalise une coupure simple brin et reste fixée de manière covalente à l'extrémité 5' d'un brin de formation d'ADN qui sera transféré *via* le pilus sexuel de conjugaison (Mhaya, 2019).

II.2.2. Les plasmides mobilisables

Les plasmides mobilisables (MOB) sont petits et ont un nombre de copies élevé. Ils contiennent habituellement juste un *oriT*, un gène de relaxase et une ou plusieurs protéines de coupure. Ces plasmides contiennent un ensemble génétique minimal (donc incomplet) qui leur permet d'être transmis conjugalement juste en présence d'un plasmide conjugal auxiliaire. Ils codent seulement une machinerie MOB minimale qui leur permet d'être transportés par d'autres plasmides (Garcillán et al., 2009).

II.2.3. Les plasmides non conjugatifs

De plus petite taille (0,5 à 50Md), ces plasmides ne sont pas autotransmissibles par conjugaison. Ils sont souvent cryptiques et ne codent pour aucune fonction décelable hormis l'autoréplication. Leur nombre de copies par cellule est cependant plus élevé (de 10 à 15 pour pColE1 d'*E. coli*). Leur transfert ne peut se réaliser que par mobilisation par un autre plasmide présent dans la même cellule ou par transformation (Khallef, 2016)

II. 3. Transfert des plasmides par conjugaison

La conjugaison des plasmides est un mécanisme de premier plan pour l'échange génétique dans les bactéries et donc une composante importante de l'évolution bactérienne (Garcillán et al., 2009). L'opéron *Tra* code pour la relaxase, une protéine commune nécessaire à tous les plasmides pour leur transfert. La relaxase 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 (Figure 3) (Byrd & Matson, 1997 ; de la Cruz et al., 2010; Furste et al., 1989; Gomis-Ruth et al., 2004).

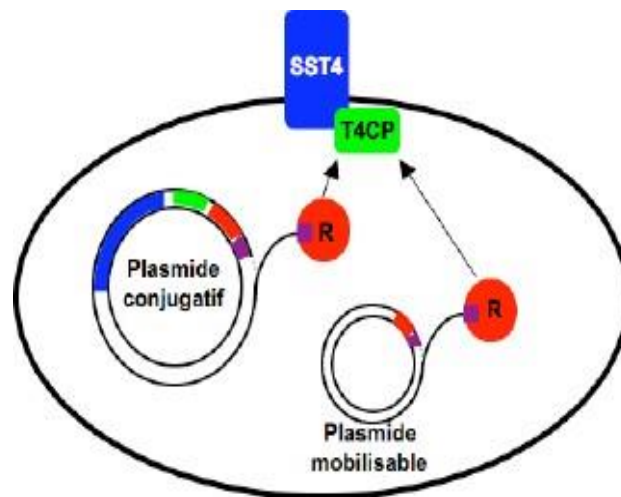


Figure 3 : Mécanisme de conjugaison chez les plasmides conjugatifs et les plasmides mobilisables (Smillie et al., 2010).

La relaxase (Rouge, R) coupe l'ADN au niveau du site spécifique situé au niveau de l'origine de transfert *oriT* (violet) et reste liée de manière covalente à l'extrémité 5' du brin d'ADN. La relaxase interagit ensuite avec la protéine de couplage T4CP (vert) puis avec les autres composantes du système de sécrétion de type IV (SST4, bleu), ce qui permet le transfert de l'ADN vers le SST4 puis vers la cellule réceptrice.

III. Plasmides et résistance aux antibiotiques

III. 1. Généralités sur les antibiotiques

Le terme « antibiotique » a été proposé en 1991 par Waksman pour désigner toute substance chimique produite par un micro-organisme qui est en mesure d'inhiber le développement ou de détruire d'autres micro-organismes (**Ayad, 2016**).

Les antibiotiques sont des substances d'origine naturelle, qu'elles soient de synthèse ou semi-de synthèse. Agir en faibles concentrations sur les bactéries en bloquant certaines étapes métaboliques essentielles pour leur survie (bactéricide) ou leur croissance (bactériostatique) (**Chaouch, et al, 2020**), est un antibactérien d'origine biologique, fabriqué par des micro-organismes (champignons microscopiques et bactéries).ou de synthèse chimique et qui est en mesure d'empêcher la multiplication ou de détruire d'autres microorganisme. (**Yala et al, 2001**).

Les antibiotiques sont classés selon leur structure chimique qui définit leurs principales propriétés bactériologiques (Mode d'action, mécanisme de résistance, spectre), pharmacologique (mode d'admission, diffusion, élimination) et toxicologiques (effets indésirables et contre-indications). Ceux-ci sont également classés en fonction de leurs sites d'action (**Ayad, 2016**). On peut classer les antibiotiques en fonction de :

- Origine : biologique (naturelle), semi-synthétique ou synthétique.
- Spectre d'activité : les antibiotiques sont actifs sur des bactéries Gram positives ou Gram négatives (spectre étroit) ou les deux (large spectre).
- Structure chimique : très variable, elle repose souvent sur une structure de base (par exemple, le cycle β lactame) sur laquelle il y a hémi synthèse.
- Mode d'action : très courant. (**Chaouch et al., 2020**)

Les β -lactamines sont les meilleurs antibiotiques dans le traitement des infections dues aux entérobactéries. Ils se distinguent par la présence constante du cycle β -lactame associé aux cycles et aux chaînes latérales variables qui expliquent les propriétés pharmacocinétiques et leur spectre d'activité (**Cavallo et al, 2004**) (**Figure 4**).

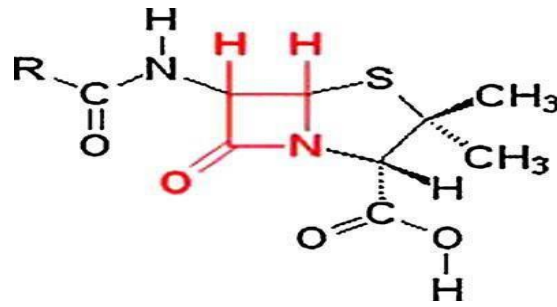


Figure 4 : Structure générale des β -lactamines [en rouge noyau β -lactame] (Ruppé, 2010)

Les β -lactamines agissent sur la paroi bactérienne en inhibant (bloquant) l'étape finale dans la synthèse du peptidoglycane provoquant une lyse bactérienne (Yala *et al.*, 2001).

Ce blocage se produit en inhibant certaines enzymes responsables de la transpeptidation. Ces enzymes, communément appelées PLP, sont insérées dans la partie externe de la membrane cytoplasmique bactérienne. Pour être actifs, les β -lactamines devront atteindre leur cible en pénétrant la paroi bactérienne et en s'attachant aux PLP. La connaissance de la structure de la paroi bactérienne permet une meilleure compréhension du mécanisme d'action des bêta lactamines et les mécanismes qui font en sorte que les bactéries résistent à ces antibiotiques (Cavallo *et al.*, 2004).

III. 2. Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est dû à de multiples événements génétiques relatifs aux mutations chromosomiques et à l'acquisition d'éléments composites mobiles : plasmides, transposons, intégrons). Les entérobactéries sont un bel exemple pour illustrer des phénomènes adaptatifs puisqu'elles peuvent exprimer un large spectre de résistance, en usant de différents mécanismes. Par exemple, les entérobactéries peuvent produire une enzyme, « β -lactamase » qui leur confère la résistance aux β -lactamines (Jarlier, 2019). Il existe 2 types de résistance ; naturelle et acquise.

La résistance naturelle a un effet immédiat sur toutes les souches de la même espèce. Il est stable, transmis à la descendance mais pas ou peu transmissible par transfert horizontal. La résistance intrinsèque à un antibiotique ou à une famille d'antibiotiques de différentes souches et espèces bactériennes n'est pas liée à une exposition aux antibiotiques. Les entérobactéries peuvent aussi résister de façon naturelle à certains antibiotiques en raison de l'imperméabilité de leur membrane externe. Les pompes à efflux bactériens qui transportent activement

beaucoup d'antibiotiques hors de la cellule peuvent contribuer de façon importante à la résistance intrinsèque des bactéries à Gram négatif à de nombreux antibiotiques. Lorsqu'elles sont surexprimées, les pompes d'efflux peuvent aussi conférer une plus grande résistance aux antibiotiques. Cette résistance peut s'expliquer aussi par l'inaccessibilité de la cible pour l'antibiotique, une faible affinité de la cible pour l'antibiotique ou l'absence de la cible. La résistance bactérienne naturelle est permanente et a des origines chromosomiques (**Carle, 2009**).

La résistance acquise résulte de la capacité des bactéries de s'adapter à la pression exercée par les antibiotiques en modifiant leur génome par :

- mutation chromosomique (dont elle présente les caractéristiques : spécificité, spontanéité, rareté, indépendance, et transmissibilité) (**Carle, 2009**).
- Acquisition de gènes « étrangers » provenant d'autres bactéries (transfert horizontal de gènes résistants) par l'intermédiaire de plasmides, de transposons, ou d'intégrons (résistance extra chromosomique) grâce à des processus aussi divers que la conjugaison, la transformation et la transduction (**Jarlier, 2019**)

De façon générale, l'acquisition d'une résistance aux antibiotiques comprend trois grandes catégories de mécanismes :

- inactivation de l'antibiotique associé avec la production enzymatique
- modification d'une cible antibiotique
- absence d'accumulation de l'antibiotique à cause d'un manque de pénétration intracellulaire. (diminution de l'influx membranaire) ou quand l'antibiotique est expulsé de la bactérie (efflux membranaire) (**Pantel, 2015**).

III. 3. Résistance aux β -lactamines chez les entérobactéries

Les mécanismes de résistance des entérobactéries aux β -lactamines sont illustrés dans la **figure 5**. Comme nous pouvons le voir sur cette figure, nous avons des mécanismes enzymatiques et des mécanismes non enzymatiques. Le premier est le principal mécanisme de résistance aux β -lactamines chez les entérobactéries. Ce sont des enzymes capables d'ouvrir le cycle β -lactame en créant un intermédiaire acyl-enzyme instable, menant finalement à la perte d'un groupe carboxylique (**Ruppé, 2010**).

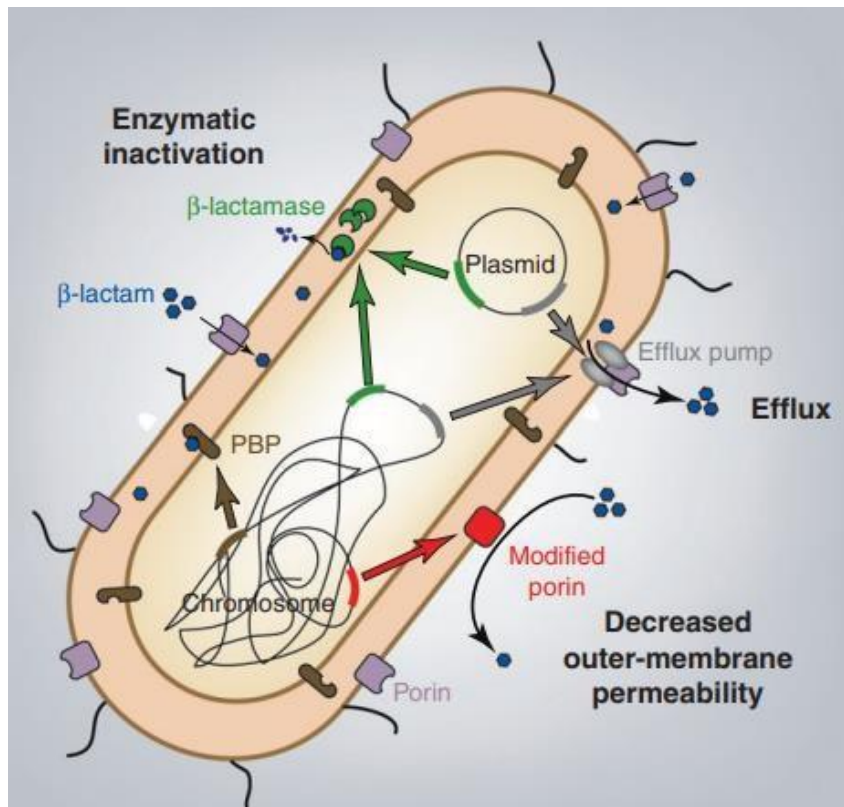


Figure 5 : Mécanismes primaires de la résistance aux β -lactamines chez les *Enterobacteriaceae* (Nordmann et al., 2012)

III. 3. 1. β -lactamases à spectre élargi

Les β -lactamases à spectre étendu ou « BLSE » sont un groupe d'enzymes qui ont la propriété commune de conférer une résistance aux pénicillines, aux céphalosporines de 1ère, 2ème et 3ème génération, à l'aztréonam (à l'exception des céphamycines et des carbapénèmes) par hydrolyse de ces antibiotiques qui sont inhibés par des inhibiteurs de β -lactamases tels que l'acide clavulanique (Bush et al., 1995). Ces enzymes étaient appelées cefotaximase et ceftazidimase parce qu'elles conféraient aux bactéries qui leur fournissaient une résistance préférentielle au cefotaxime ou à la ceftazidime. Ils ont aussi inactivé d'autres oxyimino- β -lactamines comme la ceftriaxone et l'aztréonam (Gangoue, 2007)

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.

III. 3. 2. β -lactamases de type CTX-M

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 6).

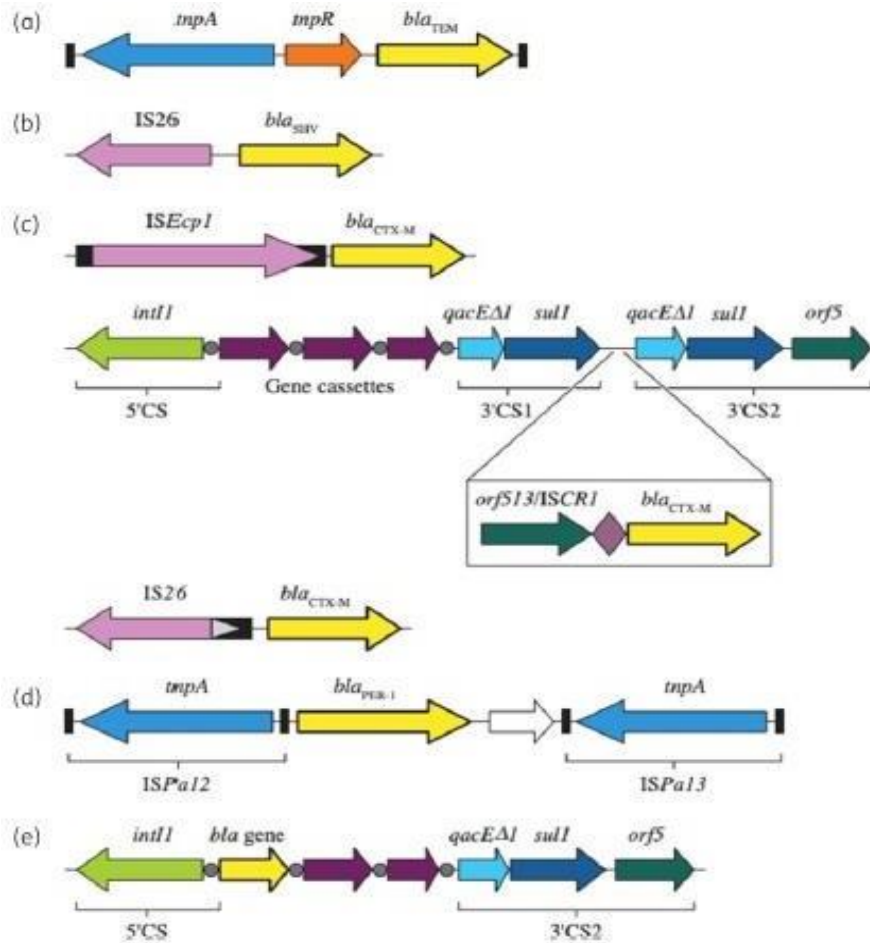


Figure 6 : Structures génétiques hébergeant des gènes codant pour les BLSE (Castanheira et al., 2021).

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.

II. Biofilm bactérien

Bien qu'ils aient d'abord identifié des microbes sur une surface fixe, ce sont leurs formes libres et planctoniques qui ont fait l'objet de plus de recherches et d'études. Ce n'est que récemment que nous avons commencé à vraiment nous pencher sur les couches de formation et de composition du biofilm et leurs effets sur l'homme et les industries ainsi que sur le monde dans son ensemble.

Un biofilm est une communauté de micro-organismes assez complexe, adhérente à une surface et encapsulée dans une matrice de substances polymériques extracellulaires (EPS) produite par les membres de cette communauté. Selon *Costerton et al. (1995)*, cette définition inclut les agrégats et aussi les populations bactériennes adhérant à des surfaces biotiques ou abiotiques. Les biofilms peuvent être constitués d'une ou plusieurs espèces de bactéries et se développer sur des interfaces solides ou liquides variées, que l'on rencontre par exemple dans l'environnement : fond de rivières, cailloux, racines. . . et dans les organismes vivants : tube digestifs, plaque dentaire, plaies . . . (*Costerton et al., 1987*).

II. 1. Composition du biofilm

Les microscopes puissants tels que les microscopes confocaux ont révélé une communauté bien structurée de matière bactérienne au sein des biofilms. Avec des organismes agrégés formant des parties de l'ensemble ainsi que des espaces entre ces bactéries qui permettent l'écoulement des nutriments et des substances, les biofilms sont une structure vivante dans laquelle les différents composants travaillent pour la survie et la croissance de cette entité. Les bactéries formant les biofilms baignent dans un réseau de substances polymériques extracellulaires (EPS) essentiellement composés de polysaccharides, de protéines et d'acide nucléique.

Les EPS sont des biopolymères produits par divers microorganismes dont les bactéries. Ces EPS jouent un rôle important dans le développement du biofilm. Ils sont caractérisés par leur apparence gélatineuse. Ils sont responsables de la morphologie, la structure, la cohésion et l'intégrité fonctionnelle des biofilms. Leur composition détermine la plupart de leur propriétés physico-chimiques et biologiques (*Wingender et al., 1999*).

Les EPS ont plusieurs fonctions dans le biofilm, comme la promulgation de l'adhérence des bactéries sur la surface et entre elles, la formation et la maintenance de la

structure du biofilm, l'augmentation de sa résistance contre le stress environnemental et sa protection contre les prédateurs (**Costerton et al., 1995**).

Les EPSs comptent entre 50% et 90% de la matière organique totale des biofilms (**Evans, 2003**). Contrairement à la connaissance commune, les EPSs sont certainement plus que des polysaccharides. Ils comportent une grande variété de protéines, des glycoprotéines, des glycolipides et, dans certains cas, des quantités surprenantes de l'ADN extracellulaire (**Flemming et al., 2007**). Ainsi en ce qui concerne les biofilms environnementaux, les polysaccharides représentent souvent uniquement un composant mineur du biopolymère. Cependant, les diverses fonctions de l'ADN des biofilms commencent seulement à émerger (**Das et al., 2013**). Enfin, le taux de production des EPSs ne dépend pas seulement du type d'organisme mais est également fonction des conditions en termes de nutriments, âge du biofilm, et environnement (**Leriche et al., 2000**).

L'ADN extracellulaire (ADNe) est une partie essentielle de la matrice extracellulaire des biofilms qui joue un rôle essentiel dans les biofilms. L'ADNe est organisé en une structure en forme de réseau, stabilisée par la famille de protéines DNABII, connue pour avoir une affinité et une spécificité élevées pour les jonctions Holliday (HJ).

II. 2. Etapes de formation des biofilms

L'observation directe des biofilms par microscopie, ainsi que les nombreuses études génétiques réalisées sur les biofilms, ont conduit à un modèle de développement en cinq étapes. Après le conditionnement très rapide de la surface, les bactéries se déplacent dans le milieu liquide grâce à la force du flux, à la gravitation et/ou aux mouvements de leurs flagelles. Lorsque les bactéries sont au voisinage d'une surface, des forces d'attraction physico-chimiques interviennent et conduisent à une interaction réversible avec la surface. Dans un second temps, à mesure que les cellules se divisent, le nombre de bactéries associées à la surface augmente et l'adhésion devient irréversible. Cette transition vers une adhésion irréversible correspond à la synthèse de structures à la surface de la bactérie, qui s'accompagne d'une profonde modification du profil d'expression des gènes (**Schembri, Kjaergaard et Klemm, 2003 ; Beloin et al., 2004 ; Ren et al., 2004**).

Les bactéries forment alors des amas à la surface et produisent des polysaccharides extracellulaires. La troisième étape est caractérisée par la formation de microcolonies composées à la fois des bactéries initiales qui se divisent et de bactéries qui s'attachent sur le biofilm en formation. Enfin le stade de maturation correspond au développement des

microcolonies et à la structuration du biofilm : les microcolonies se développent en piliers d'épaisseur variable au sein desquels les cellules sont englobées dans la matrice extracellulaire. Les espaces séparant les microcolonies deviennent les canaux du biofilm à l'intérieur desquels les fluides nutritifs peuvent circuler. Certaines bactéries peuvent se détacher du biofilm mature et rentrer dans la phase de dissémination. Cette dernière étape permet la colonisation de nouvelles surfaces (**Roux et Ghigo, 2006**).

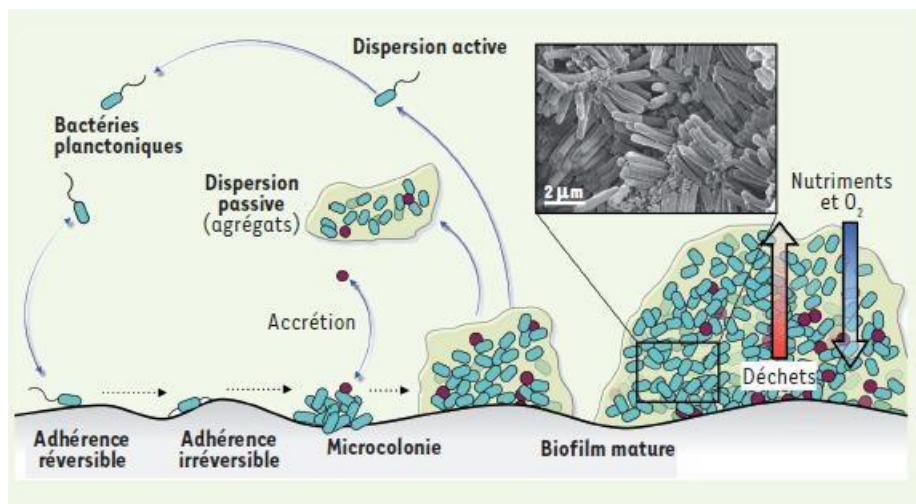


Figure 7 : Etapes de formation du biofilm bactérien (**Le beaux et Chigo, 2012**)

II. 3. Gènes impliqués dans la formation de biofilm

De nombreux travaux ont montré que la formation d'un biofilm induit une expression différentielle des gènes, comparée à celle des bactéries planctoniques (**Whiteley et al., 2001; Beloin et Ghigo, 2005**). Dans la plupart des cas, des gènes spécifiques influencent les différentes étapes conduisant à la formation de biofilm. Parmi ces gènes nous retrouvons le cluster *icaADBC*, codant la synthèse de l'exopolysaccharide PGA.

L'étude des gènes impliqués dans le processus de formation du biofilm est nécessaire pour mieux comprendre la formation du biofilm et comment contrôler leurs effets néfastes et réduire les coûts de perte et la propagation des maladies *via* les produits végétaux et animaux.

L'adoption du mode de vie biofilm s'accompagne de profondes modifications de l'expression des gènes qui induisent de très nombreuses modifications physiologiques. Plusieurs mécanismes génétiques spécifiques ont été mis en évidence tels que l'accumulation de glucanes inhibant la diffusion des antibiotiques à travers le périplasme de *P. aeruginosa* ou l'expression de pompes d'efflux d'antibiotiques spécifiquement exprimées en biofilm chez *E. coli* ou *P. aeruginosa* (**Le beaux et Chigo, 2012**).

II. 4. Facteurs influençant la formation de biofilm

Le processus de formation d'un biofilm et le retour éventuel des cellules à l'état planctonique impliquent la coordination de grandes quantités d'informations génétiques. Néanmoins, les preuves dominantes suggèrent que la progression globale de ce cycle au sein d'une espèce ou d'une souche de bactéries donnée répond aux conditions environnementales. Ces conditions répondent à un ensemble de facteurs régulateurs qui affectent les éléments enzymatiques et structurels nécessaires à la formation et à la dispersion du biofilm. Parmi les conditions qui affectent la formation du biofilm figurent la température, le pH, les niveaux d'O₂, l'hydrodynamique, l'osmolarité, la présence d'ions spécifiques, de nutriments et de facteurs dérivés de l'environnement biotique. L'intégration de ces influences détermine en fin de compte le modèle de comportement d'une bactérie donnée par rapport au développement du biofilm. Avec le QS (quorum sensing) susmentionné, ce mécanisme dépendant de la densité cellulaire est utilisé par les bactéries à Gram positif et à Gram négatif pour répondre aux stress environnementaux, y compris la carence en nutriments, les effets de température et les réponses de défense de l'hôte.

Les résultats ont indiqué que des températures plus élevées (25 à 42 °C) et des valeurs de pH (7,0 et 8,0) ont entraîné une formation de biofilm plus robuste que des températures plus basses (4 et 10 °C) et des niveaux de pH plus bas (4,0 à 6,0).

En termes généraux, l'osmolarité affecte la formation de biofilm mais avec des effets spécifiques sur peu de souches dans une espèce d'étude donnée.

Les cations divalents, tels que Mg²⁺ et Ca²⁺, peuvent influencer la formation de biofilm directement par leur effet sur les interactions électrostatiques et indirectement via les processus d'attachement dépendants de la physiologie en agissant comme des cations cellulaires importants et des cofacteurs enzymatiques. Malgré le rôle potentiellement important, l'effet des ions Mg²⁺ sur l'adhésion bactérienne et la formation de biofilm a à peine été étudié. Il a été démontré que mg²⁺ influence l'adhérence aux surfaces chez *Pseudomonas* spp. Les contraintes hydrodynamiques peuvent provoquer le détachement de parties du biofilm conduisant à des canaux d'eau étendus dans des structures préformées.

II. 5. Conséquences médicales du développement des biofilms

La contamination des surfaces médicales telles que les cathéters ou les prothèses articulaires aboutit à la formation de biofilms bactériens qui, outre leur tolérance aux biocides,

libèrent des bactéries planctoniques à l'origine d'infections systémiques (**Figure 8**). Même chez un individu immunocompétent, la réaction immunitaire ne permet pas de détruire la communauté bactérienne au sein du biofilm (**Costerton et al., 1999 ; Lewis, 2007 ; Le beaux et Chigo, 2012**). Par ailleurs, si l'administration d'antibiotiques permet la disparition transitoire des symptômes en éradiquant les bactéries planctoniques, elle n'élimine pas le biofilm, qui pourra de nouveau constituer une source d'infection. Les biofilms constituent donc des réservoirs bactériens à l'origine d'infections chroniques ou récidivantes. Parmi les complications médicales liées aux biofilms, peuvent être distinguées les infections liées à un matériel implanté et les infections chroniques (**Figure 8**) (**Le beaux et Chigo, 2012**).

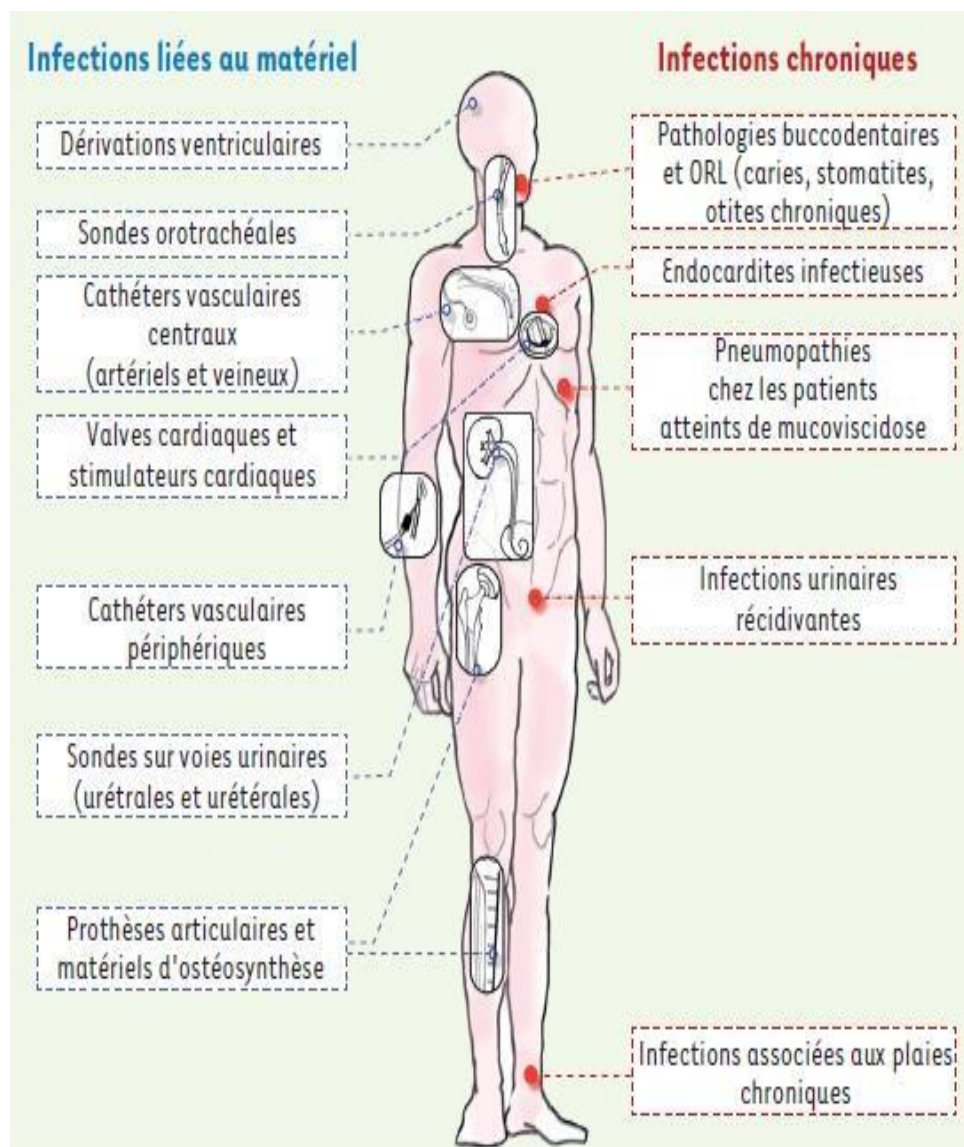


Figure 8 : Principales infections associées aux biofilms (**Le beaux et Chigo, 2012**).

ORL : oto-rhino-laryngologie.

Notre étude a été réalisée au niveau des laboratoires de pédagogies de la FSNV de l'université de Blida 1 (Station expérimentale), durant une période d'un mois, de juin à juillet 2022.

Notre travail a concerné l'impact de la production de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) sur l'expression des gènes de virulence de souches cliniques d'entérobactéries. Nous avons choisi comme modèle de pathogénicité, la formation de biofilm. Ainsi nous avons comparé l'intensité de la formation de cette structure entre différentes bactéries avec et sans le caractère BLSE.

I. 1. Matériel biologique :

➤ Souches bactériennes sauvages :

Nous avons travaillé sur une collection de 24 souches appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Ces souches sont d'origine nosocomiale et communautaire. Elles ont été isolées chez des patients à partir de divers prélèvements biologiques.

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 1**). L'antibiogramme réalisé après l'identification, suggère un éventuel phénotype BLSE ; les souches produiraient des β -lactamases à spectre élargi.

➤ Souches curées

Nous avons travaillé sur une collection de souches BLSE ayant été curées de leur plasmide de résistance (n=11). Le curage a été réalisé en utilisant un agent physique ; la température et un agent chimique le SDS. Nous n'avons réalisé, expérimentalement, que le curage par la température. Les souches curées par le SDS ont été obtenues par un autre binôme encadré par le Dr. AÏSSANI.

I. 2. Matériel non biologique :

Nous avons utilisé de la verrerie, de l'appareillage, des milieux de culture, des réactifs.

Leurs caractéristiques sont résumées dans l'**annexe 1**.

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**).

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 boîtes se fait 18 à 24h à 37°C (**Nedjai et al., 2012**).

Un résultat positif est basé sur l'inhibition des BLSE par l'acide clavulanique, et par conséquent l'augmentation de l'activité des céphalosporines de troisième et quatrième génération en présence d'acide clavulanique.

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 la température comme agent curant de nature physique. Ce facteur engendre un stress répliatif. Les bactéries sont obligées donc de se débarrasser des molécules « facultatives » telles que les plasmides et de garder les composantes vitales tels les chromosomes.

➤ **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 à 45C°, puis effectuer des passages (deux ou plus) toutes les 24h à la même température par dilution 1/10 dans le même milieu.

Après ces essais de curage, un isolement sur gélose nutritive est réalisé. Après incubation 24h à 37C °, on procède à une réplique de 100 clones, à l'aide de cure dents stérile sur une gélose avec et sans antibiotique (céfotaxime, 4 µg/mL).

II. 3. Recherche de la formation de biofilm

Les biofilms sont recherchés à partir d'une culture bactérienne d'une nuit à 37 °C dans du LB. Une dilution au 1/100 est réalisée (dans 200µL de LB), puis déposée dans une microplaque de 96 puits et incubée une nuit à 37 °C. Les biofilms sont colorés au cristal violet (1%) ; Le colorant est solubilisé avec de l'éthanol absolu et mesuré par spectrophotométrie à 570-590nm (**Maldonado et al., 2006**). L'intensité du biofilm formé est lue comme suit :

- DO > 0.5 : Biofilm de forte intensité.
- 0.1 < DO < 0.5: Biofilm de moyenne intensité
- DO < 0.1 : Biofilm de faible intensité.

III. Etude statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Le logiciel GraphPad Prism v. 6.0 est utilisé pour analyser les données.

Le test t de student est utilisé pour comparer les différences de moyenne entre les 2 groupes, avec P<0,05 étant considéré comme statistiquement significatif.

I. Résultats de la recherche du phénotype BLSE

Les souches BLSE, 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 9**). Ceci est fortement indicateur de l'expression d'une β -lactamase à spectre élargi par ces souches.

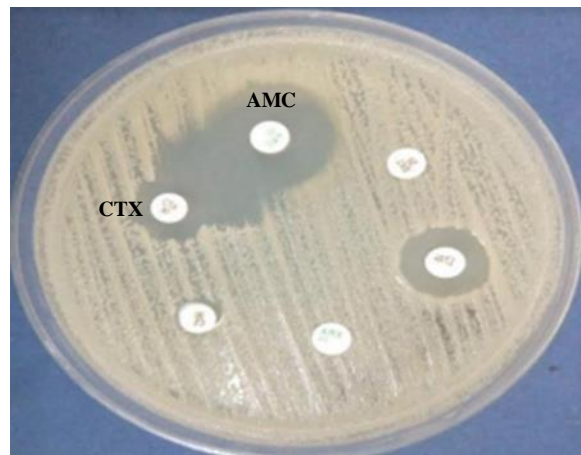


Figure 9 : Détection du phénotype BLSE

Observation d'une image de synergie entre le disque d'AMC et de CTX

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 sur le plan moléculaire, en amplifiant les gènes de la famille *bla_{CTX-M}* par PCR. Une étape que nous n'avons, malheureusement, pas pu réaliser.

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).

II. 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 10**). Les résultats de ce curage sont mentionnés dans le **tableau I**.

Tableau I : 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)
Total	11 (45.83)	13 (54.16)

L'analyse du **tableau I** montre que 11 souches sur 16 ont été curées par élévation de la température d'incubation. 7 souches de *K. pneumoniae* soumises au curage par la température, ont généré des curées dépourvues du caractère BLSE. Concernant les isolats d'*E. coli*, 4 souches ont été curées.

Les souches curées par le SDS, obtenues dans une précédente étude, ainsi que celles curées par la température ont été cultivées dans un milieu supplémenté de céfotaxime (4µg/ml), afin de vérifier la perte de la résistance à ce plasmide. Toutes les souches curées se sont révélées sensibles au céfotaxime.

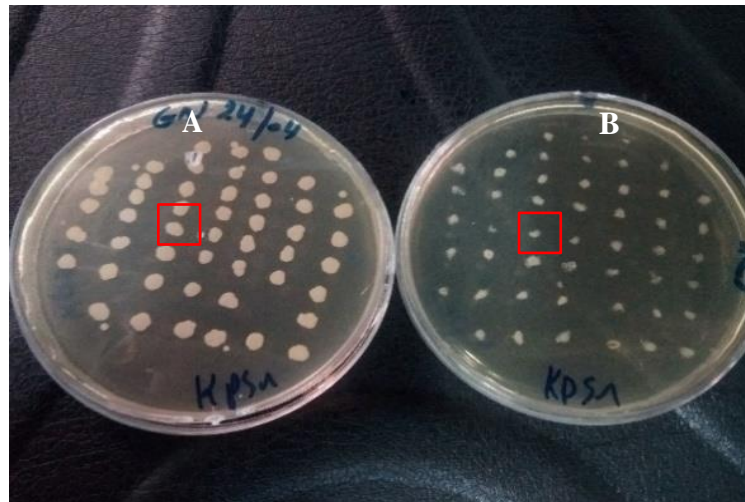


Figure 10 : Curage plasmidique par la température.

A- Boite non sélective ; B- Boite sélective (4µg/ml de CTX)
Encadré rouge : en (A) souche sauvage BLSE ; en (B) la même souche curée ayant perdu le plasmide BLSE

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 II**).

Tableau II : 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 (86.9)

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). **Coutinho 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.

III. Résultats de la relation du plasmide de résistance sur la formation de biofilm

Dans la littérature, il est fait mention de l'influence du plasmide de résistance sur la virulence et la pathogénicité de la souche bactérienne qui l'héberge. Cette relation entre les deux entités est parfois identifiée comme étant de l'ordre statistique, alors que parfois, elle est décrite comme étant physique (les gènes de virulence et de résistance étant portés par le même support génétique).

Dans notre étude, nous avons comparé l'intensité du biofilm formé par des souches sauvages BLSE et des souches n'exprimant pas ce caractère du fait d'une perte plasmidique. Les résultats indiquent que toutes les souches quel que soit leurs profils de résistance, formaient un biofilm de forte intensité (les DO étaient supérieurs à 0.5).

Nos résultats sont en accord avec les résultats d'**Aljanaby et Alhasani (2016)**, **El Ferta-Aïssani et al. (2013)** et **Shon et al. (2012)**, qui indiquent que les entérobactéries sont de bons producteurs de biofilm.

De nombreuses études mettent l'accent sur le problème que constitue le développement d'une telle structure dans la pathogénèse des infections nosocomiales. En effet, ce mode d'organisation promeut la persistance des bactéries dans un biofilm et donc l'établissement d'infections chroniques. Au sein de ce biofilm, les bactéries sont protégées de l'action des antibiotiques et des défenses de l'hôte. Elles communiquent plus facilement par le quorum sensing afin d'induire l'expression des gènes de virulence. Chez les individus hospitalisés ou atteints de maladies lourdes, le risque lié à la formation de biofilm est plus important. En effet, ces patients sont souvent sondés, cathétérisés ou portant une prothèse ; c'est autant de surface abiotique adhésive permettant la fixation, la colonisation et la formation de ces tissus bactériens (**Tremblay et al., 2014**).

Nous avons comparé l'intensité du biofilm formé par les souches pour lesquelles nous avons des curés à notre disposition. Les résultats de l'étude statistique après application du test *t* de Student, montrent que :

- il n'y a aucune différence significative, entre la moyenne des densités optique pour le groupe BLSE (1.8180 ± 0.0808) et leurs curés par la température (1.8564 ± 0.0570). La valeur *P* étant de 0.7001.
- il y a une différence significative entre le groupe BLSE (1.7493 ± 0.1056) et ses curés par le SDS (1.9898 ± 0.0165). La valeur *P* étant de 0.0320. Il semblerait que la perte plasmidique ait eu un effet positif sur la formation de biofilm.

La résistance aux antibiotiques chez les bactéries est liée à la présence de mutations chromosomiques ou à l'acquisition de gènes de résistance, souvent portés par des éléments génétiques mobiles, qui permettent à la bactérie de survivre malgré la pression sélective des antibiotiques. Ces mutations chromosomiques s'accompagnent souvent d'un coût biologique pour la bactérie, ce coût est plus faible avec l'acquisition de plasmides de résistance. Ainsi, la résistance des bactéries aux antibiotiques est associée dans la plupart des cas, directement ou indirectement, à une diminution de leur virulence et de leur compétitivité (« fitness »). Cependant, certaines données montrent également le contraire, et il est de plus en plus évident que la relation est souvent d'un plus grand bénéfice pour l'agent pathogène, ce qui complique davantage la situation et constitue un sérieux problème de santé publique (**Kempf et al., 2012**).

Dans ce qui suit, nous vous rapportons quelques études concernant ce sujet et faites sur des souches cliniques de *K. pneumoniae* et *E. coli*.

Yazgan et al. (2018) ont constaté que des isolats de *K. pneumoniae* de phénotype BLSE, formaient des biofilms de plus grande intensité comparé aux souches KPC (productrices de carbapénèmases). Ils ont remarqué que cette caractéristique était associée à des gènes de virulence, également portés par les plasmides BLSE.

L'équipe de **Sahly** a longuement étudié l'effet du plasmide BLSE sur l'expression des facteurs de virulence chez l'espèce *Klebsiella pneumoniae*. En effet, **Sahly et al. (2008)** ont rapporté que l'acquisition de plasmides BLSE conduit à des changements dans l'expression des gènes chromosomiques codant les fimbriae, affectant par la suite la capacité d'invasion des souches testées (**Sahly et al., 2008**).

Dans l'étude de **Hennequin et al. (2007)**, il est rapporté que la présence des plasmides BLSE altère la capacité d'adhésion basale de la souche receveuse (ayant reçu ce plasmide par conjugaison), alors que les souches curées n'ayant plus de plasmide BLSE, adhèrent plus que les souches parentales. Plus tard, **Hennequin et al. (2012)** ont montré que les plasmides porteurs des gènes CTX-M-15 n'ont aucune influence sur la capacité de formation de biofilms.

La relation entre le plasmide BLSE et l'expression des facteurs de virulence (particulièrement la formation de biofilm) est tout aussi ambiguë chez *E. coli* que chez *K. pneumoniae*. En effet, des études ont identifié divers facteurs de virulence dans les isolats d'*E. coli* producteurs de CTX-M et ont montré que les isolats d'*E. coli* ST131 producteurs de NDM-1 hébergent plus de gènes de virulence que les autres clones (**Peirano et al., 2011**). D'autre part, une autre étude a suggéré que la production de l'enzyme CTX-M-15 n'était pas associée à la virulence dans les isolats d'*E. coli in vivo* (**Dobois et al., 2009**).

L'étude de **Shin et Ko (2015)** a révélé que les isolats d'*E. coli* ST131 non producteurs de BLSE, étaient plus compétitifs et virulents que les isolats d'*E. coli* ST131 producteurs de CTX-M, en ce qui concerne la formation de biofilm et la résistance au sérum. Cependant, certains transconjugants n'ont montré aucune réduction de virulence, et la plupart des transconjugants n'étaient pas moins compétitifs que leurs hôtes sensibles. Dans le même sillage, **Rehab et al. (2020)** ont constaté que les souches extra-intestinales d'*E. coli* isolées à partir d'échantillons d'urine et de sang, possèdent toute une batterie de facteurs de virulence et de gènes de résistance, et ont une grande capacité à produire un biofilm.

Schaufler et al. (2016) ont étudié l'influence du plasmide BLSE sur l'expression du gène *csgD* (curlin subunit geneD ; codant un régulateur transcriptionnel) qui régule les interactions entre le biofilm et la motilité (**Hammar et al., 1995 ; Dudin et al., 2014**). Cette étude pilote a montré que le plasmide BLSE ne conduit pas nécessairement à une perte des aptitudes de croissance et métabolique. Certains plasmides BLSE dans certaines souches peuvent influencer l'expression des gènes chromosomiques, en particulier ceux qui modulent les modes de vie sessiles et planctoniques, comme le gène *csgD*.

Les processus évolutifs qui sous-tendent la persistance des plasmides ne sont pas bien compris. Les plasmides bactériens peuvent porter des gènes codant pour des traits qui sont parfois bénéfiques pour leurs hôtes, comme la résistance aux antibiotiques, la virulence, la résistance aux métaux lourds, le catabolisme de sources uniques de nutriments (**Lili et al., 2007 ; Slater et al., 2008 ; Rankin et al., 2011**). Cependant, quand la pression de sélection liée à un antibiotique a disparu, les modifications du bagage génétique de la bactérie ayant conduit à une résistance à l'antibiotique peuvent entraîner un coût biologique pour la bactérie, c'est à dire une réduction de sa compétitivité, et donc de sa « fitness » (**Kempf et al., 2012**).

Les effets des plasmides sur la compétitivité au sens large ne sont pas toujours clairs. Par exemple, un plasmide peut être bénéfique lorsque son hôte bactérien est exposé à un nouveau facteur de stress, mais préjudiciable une fois que le facteur de stress est supprimé (**Vogwill et MacLean 2015**). Dans ces conditions, on s'attend à ce que les bactéries dépourvues du plasmide « coûteux » surpassent les souches porteuses de plasmide, en raison du coût biologique que génère le plasmide (**Enne et al., 2004 ; San Millan et MacLean, 2017**)...Mais ce n'est pas toujours le cas, d'où le « paradoxe du plasmide ».

Notre étude comparative visait à étudier le rôle des plasmides BLSE dans la potentialisation de la virulence des entérobactéries. Nous avons choisi comme facteur, la formation de biofilm. Nous avons travaillé sur une collection de souches appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* à l'origine de diverses infections chez l'homme. Dans notre travail de recherche nous avons :

- Observé une résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération, tout particulièrement au céfotaxime.
- Confirmé le phénotype BLSE grâce au test de synergie pour les 24 souches analysées.
- Déterminé le support génétique du caractère BLSE par des expériences de curage plasmidique.
- Obtenu un taux de curage de 45.83% en élevant la température d'incubation

Dans la première partie de notre étude nous avons, comme de nombreuses études, mis en évidence des profils de résistance aux antibiotiques inquiétants, pouvant mettre en péril la vie de l'individu. La résistance aux C3G constitue un véritable frein à la mise en place d'une thérapie anti-infectieuse rapide et efficace. Le clinicien pourrait se retrouver devant une impasse thérapeutique, n'ayant plus de molécules en réserve. Le fait que ce phénotype soit due à l'expression de gènes plasmidiques, complique encore plus la situation. En effet, une diffusion pandémique des BLSE est observée depuis de nombreuses années, du fait du transfert, par conjugaison, des plasmides en question.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous nous sommes intéressés à l'impact de la présence d'un plasmide BLSE sur la formation de biofilm étant un important facteur de virulence souvent incriminés dans les infections récurrente chez l'homme. Les résultats indiquent que la perte plasmidique :

- n'a eu aucun effet sur la formation de biofilm en comparant son intensité entre sauvages et curés.
- A eu un effet positif sur la formation de biofilm. L'intensité de ce dernier s'est vue diminuée chez les souches ayant perdu le plasmide BLSE.

Ces résultats confirment le caractère ambigu de la relation entre le plasmide de résistance et la virulence d'une souche. Tantôt le plasmide est une lourde charge pour la bactérie qui doit alors s'en libérer pour espérer s'adapter aux mécanismes de défenses de l'hôte ; tantôt ce plasmide pour

contribuer à l'adaptation de ces bactéries en en association les deux caractères (résistance et virulence) dans une même structure génique. Certains scientifiques considèrent même la résistance aux antibiotiques comme étant un facteur de virulence.

Afin d'améliorer ce travail, il serait intéressant d'élargir la collection de souches en associant des souches non productrices de BLSE et des transconjugants. Nous aurons ainsi une meilleure vision et une comparaison plus exacte, sur le plan statistique entre les différents groupes. Il serait aussi très pertinent de i) caractériser sur le plan génétique les profils de résistance en déterminant aussi son environnement génétique, ii) caractériser sur plan génétique et phénotypique d'autres facteurs de virulence et iii) d'analyser l'expression de gènes de virulence connus (tels que les adhésines, sidérophores, toxines...etc.) par RT-PCR et développer un modèle murin d'infection par les différents groupes bactériens.

Ahmed et al., (2014) Faruque Ahmed, Megan C. Lindley, Norma Allred, Cindy M. Weinbaum, Lisa Grohskopf, Effect of Influenza Vaccination of Healthcare Personnel on Morbidity and Mortality Among Patients : Systematic Review and Grading of Evidence, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 58, Issue 1, 1 January 2014, Pages 50–

57, <https://doi.org/10.1093/cid/cit580>

Aljanaby et Alhasani (2016) Ahmed, Abduljabbar Jaloob Aljanaby, and Hassan Abdulhusain Alhasani Alaa. "Virulence factors and antibiotic susceptibility patterns of multidrug resistance *Klebsiella pneumoniae* isolated from different clinical infections." *African Journal of Microbiology Research* 10, no. 22 (2016): 829-843. <https://academicjournals.org/journal/AJMR/article-full-text-pdf/EC412E358948>

Beloin et al., (2004) Beloin, Christophe, Jaione Valle, Patricia Latour-Lambert, Philippe Faure, Mickaël Kzreminski, Damien Balestrino, Janus AJ Haagensen et al. "Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression." *Molecular microbiology* 51, no. 3 (2004): 659-674. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03865.x>

Beloin et Ghigo, (2005) Beloin, Christophe, and Jean-Marc Ghigo. "Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms." *Trends in microbiology* 13, no. 1 (2005): 16-19. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.008>

Bush et Jacoby, (2010) Bush, Karen, and George A. Jacoby. "Updated functional classification of β -lactamases." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54, no. 3 (2010): 969-976.
DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>

Coque et al., (2008) Coque, Teresa M., Fernando Baquero, and Rafael Canton. "Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe." *Eurosurveillance* 13, no. 47 (2008): 19044. <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/ese.13.47.19044-en>

Cantón et al. (2012) Cantón, Rafael, José María González-Alba, and Juan Carlos Galán. "CTX-M enzymes : origin and diffusion." *Frontiers in microbiology* 3 (2012): 110. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00110>

Costerton et al. (1995) JW Costerton, Overview of microbial biofilms, *Journal of Industrial Microbiology*, Volume 15, Issue 3, 1 September 1995, Pages 137–140, <https://doi.org/10.1007/BF01569816>

Costerton, J. William, Zbigniew Lewandowski, Douglas E. Caldwell, Darren R. Korber, and Hilary M. Lappin-Scott. "Microbial biofilms." *Annual review of microbiology* 49, no. 1 (1995): 711-745.

(Costerton et al., 1987). **Costerton, J. William, K. J. Cheng, Gill G. Geesey, Timothy I. Ladd, J. Curtis Nickel, Mrinal Dasgupta, and Thomas J. Marrie.** "Bacterial biofilms in nature and disease." *Annual Reviews in Microbiology* 41, no. 1 (1987): 435-464. https://www.academia.edu/download/47440907/Bacterial_Biofilms_in_Nature_and_Disease_20160722-30977-1458f9v.pdf

Coutinho et Hjortso (1988) Coutinho, Terence M., and Martin A. Hjortso. "A new method for quantifying the probability of segregative plasmid loss in Escherichia coli B/r." *Biotechnology techniques* 2, no. 2 (1988): 141-146. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01876166>

(Das et al., 2013). **Das, Theerthankar, Shama Sehar, and Mike Manefield.** "The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development." *Environmental microbiology reports* 5, no. 6 (2013): 778-786. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12085>

Dobois et al., 2009 Dubois, Damien, Nemani V. Prasadarao, Rahul Mittal, Laurent Bret, Marie Roujou-Gris, and Richard Bonnet. "CTX-M β -lactamase production and virulence of Escherichia coli K1." *Emerging infectious diseases* 15, no. 12 (2009): 1988. doi: [10.3201/eid1512.090928](https://doi.org/10.3201/eid1512.090928)

(Drieux et al., 2008) **Drieux, L., F. Brossier, W. Sougakoff, and V. Jarlier.** "Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae : review and bench guide." *Clinical Microbiology and Infection* 14 (2008): 90-103.

<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01846.x>

Dudin et al., 2014 Dudin, Omayya, Johannes Geiselmann, Hiroshi Ogasawara, Akira Ishihama, and Stéphan Lacour. "Repression of flagellar genes in exponential phase by CsgD and CpxR, two crucial modulators of Escherichia coli biofilm formation." *Journal of bacteriology* 196, no. 3 (2014): 707-715. DOI : <https://doi.org/10.1128/JB.00938-13>

Enne et al., (2004) Enne, Virve I., Peter M. Bennett, David M. Livermore, and Lucinda MC Hall. "Enhancement of host fitness by the sul2-coding plasmid p9123 in the absence of selective pressure." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53, no. 6 (2004): 958-963. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh217>

Fertas-Aïssani et al. (2013) El Fertas-Aïssani, R., Y. Messai, S. Alouache, and R. Bakour. "Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens." *Pathologie Biologie* 61, no. 5 (2013): 209-216. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2012.10.004>

Flemming et al., (2007) Flemming, Hans-Curt, Thomas R. Neu, and Daniel J. Wozniak. "The EPS matrix : the "house of biofilm cells". " *Journal of bacteriology* 189, no. 22 (2007): 7945-7947. DOI : <https://doi.org/10.1128/JB.00858-07>

Hammar et al., 1995 Hammar, M» rten, Anna Arnqvist, Zhao Bian, Arne Olsén, and Staffan Normark. "Expression of two csg operons is required for production of fibronectin-and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12." *Molecular microbiology* 18, no. 4 (1995): 661-670.

https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_18040661.x

Hannequin et al., 2015 Hannequin, C., Robin, F. Correlation between antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **35**, 333–341 (2016). <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2559-7>

Harriot et al., 1994 A cryptic miniplasmid from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga*.sp. strain RQ7 Authors : O.T Harriott, R. Huber, K.O Stetter, P.W Betts, K.M No II DOI : <https://doi.org/10.1128/jb.176.9.2759-2762.1994>

Hennequin et al. (2012 Hennequin, Claire, Frédéric Robin, Nadège Cabrolie, Richard Bonnet, and Christiane Forestier. "Characterization of a DHA-1-producing *Klebsiella pneumoniae* strain involved in an outbreak and role of the AmpR regulator in virulence." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56, no. 1 (2012): 288-294.

<https://doi.org/10.1093/jac/dks169>

(Khayar, 2011) KHAYAR, Yassine. "Comportement des enterobacteries isolees des urines vis-a-vis de l'amoxicilline–acide clavulanique l'imipeneme et l'ertapeneme." PhD diss., 2011. <http://ao.um5.ac.ma/xmlui/handle/123456789/1943>.

Kempf et al., (2012) Gupta, Sushim Kumar, Babu Roshan Padmanabhan, Seydina M. Diene, Rafael Lopez-Rojas, Marie Kempf, Luce Landraud, and Jean-Marc Rolain. "ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58, no. 1 (2014): 212-220.

DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.01310-13>

Konare, 2016) Konaré, S. "Sensibilité aux antibiotiques des souches d'Entérobactéries isolées en 2016 au Laboratoire de Biologie Médicale et Hygiène Hospitalière du CHU du Point G [thèse]." *Bamako. : Université des Sciences des Techniques et des Technologies de Bamako* (2016).

<http://www.keneya.net/fmpos/theses/2018/pharma/pdf/18P53.pdf>

Le beaux et Chigo, 2012) Lebeaux, David, and Jean-Marc Ghigo. "aux biofilms." *médecine/sciences* 28 (2012) : 727-39. DOI : 10.1051/medsci/2012288015

Leriche et al., 2000 Leriche, V., and B. Carpentier. "Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms." *Journal of applied microbiology* 88, no. 4 (2000): 594-605.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01000.x>

Lili et al., 2007 Lili, Loukia N., Nicholas F. Britton, and Edward J. Feil. "The persistence of parasitic plasmids." *Genetics* 177, no. 1 (2007): 399-405.

<https://doi.org/10.1534/genetics.107.077420>

(Maldonado et al., 2006) Maldonado, Natalia Cecilia, C. Silva de Ruiz, M. Cecilia, and M. E. Nader-Macias. "A simple technique to detect *Klebsiella* biofilm-forming-strains. Inhibitory potential of *Lactobacillus fermentum* CRL 1058 whole cells and products." *Communicating current research and educational topics and Trends in Applied Microbiology* (2007): 52-59.

<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.597.5733&rep=rep1&type=pdf>

(Nedjai et al., 2012 Nedjai, Sabrina, A. Barguigua, N. Djahmi, L. Jamali, K. Zerouali, M. Dekhil, and M. Timinouni. "Prevalence and characterization of extended spectrum β -lactamases in *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria." *Médecine et maladies infectieuses* 42, no. 1 (2012) : 20-29.

<https://doi.org/10.1016/j.medmal.2011.10.001>

(Peirano et al., 2011 Peirano, Gisele, Paul C. Schreckenberger, and Johann DD Pitout. "Characteristics of NDM-1-producing *Escherichia coli* isolates that belong to the successful and virulent clone ST131." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55, no. 6 (2011): 2986-2988. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.01763-10>

Pitout et Laupland, 2008 Pitout, Johann DD, and Kevin B. Laupland. "Extended- spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern." *The Lancet infectious diseases* 8, no. 3 (2008): 159-166.

[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70041-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70041-0)

Rankin et al., 2011 Rankin, Daniel J., Eduardo PC Rocha, and Sam P. Brown. "What traits are carried on mobile genetic elements, and why?" *Heredity* 106, no. 1 (2011): 1-10.

<https://www.nature.com/articles/hdy201024>

Rehab et al. (2020) Flament-Simon, Saskia-Camille, María de Toro, Vanesa García, Jesús E. Blanco, Miguel Blanco, María Pilar Alonso, Ana Goicoa, Juan Díaz-González, Marie-Hélène Nicolas-Chanoine, and Jorge Blanco. "Molecular Characteristics of Extraintestinal Pathogenic E. coli (ExPEC), Uropathogenic E. coli (UPEC), and Multidrug Resistant E. coli Isolated from Healthy Dogs in Spain. Whole Genome Sequencing of Canine ST372 Isolates and Comparison with Human Isolates Causing Extraintestinal Infections." *Microorganisms* 8 no.11(2020):1712.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms8111712>

Ren et al., 2004). Ren, D., L. A. Bedzyk, S. M. Thomas, R. W. Ye, and Thomas Keith Wood. "Gene expression in Escherichia coli biofilms." *Applied microbiology and biotechnology* 64, no. 4 (2004): 515-524. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1517-y>
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-003-1517-y>

Sahly et al. (2008 Sahly, H., S. Navon-Venezia, L. Roesler, A. Hay, Y. Carmeli, R. Podschun, C. Hennequin, C. Forestier, and I. Ofek. "Extended-spectrum β -lactamase production is associated with an increase in cell invasion and expression of fimbrial adhesins in *Klebsiella pneumoniae*." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52, no. 9 (2008): 3029-3034. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.00010-08>

San Millan et MacLean, 2017 San Millan, Alvaro, and R. Craig Maclean. "Fitness costs of plasmids: a limit to plasmid transmission." *Microbiology spectrum* 5, no. 5 (2017): 5-5. DOI: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MTBP-0016-2017>

Schaufler et al. (2016) Schaufler, Katharina, Torsten Semmler, Derek J. Pickard, María de Toro, Fernando de la Cruz, Lothar H. Wieler, Christa Ewers, and Sebastian Guenther. "Carriage of extended-spectrum β -lactamase-plasmids does not reduce fitness

but enhances virulence in some strains of pandemic E. coli lineages." *Frontiers in microbiology* 7 (2016): 336. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00336>

(Schembri, Kjaergaard et Klemm, 2003 Schembri, Mark A., Kristian Kjærgaard, and Per Klemm. "Global gene expression in Escherichia coli biofilms." *Molecular microbiology* 48, no. 1 (2003): 253-267. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03432.x>

Shin et Ko (2015) Shin, Juyoun, and Kwan Soo Ko. "Effect of plasmids harbouring blaCTX-M on the virulence and fitness of Escherichia coli ST131 isolates." *International journal of antimicrobial agents* 46, no. 2 (2015): 214-218.

<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.04.012>

Shon et al. (2012) Kong, Qingli, Janet M. Beanan, Ruth Olson, Ulrike MacDonald, Alyssa S. Shon, Daniel J. Metzger, Alexander O. Pomakov, and Thomas A. Russo. "Biofilm formed by a hypervirulent (hypermucoviscous) variant of Klebsiella pneumoniae does not enhance serum resistance or survival in an in vivo abscess model." *Virulence* 3, no. 3 (2012): 309-318. <https://doi.org/10.4161/viru.20383>

Slater et al. 2008 Slater FR, Bailey MJ, Tett AJ, Turner SL (2008). Progress towards understanding the fate of plasmids in bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol* 66 : 3–13.

DOI : [10.1111/j.1574-6941.2008.00505.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00505.x)

Tremblay et al., 2014 Tremblay, Yannick DN, Vincent Caron, Andréanne Blondeau, Serge Messier, and Mario Jacques. "Biofilm formation by coagulase-negative staphylococci: impact on the efficacy of antimicrobials and disinfectants commonly used on dairy farms." *Veterinary Microbiology* 172, no. 3-4 (2014): 511-518.

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.06.007>

Vogwill et MacLean 2015) Vogwill, Tom, and R. Craig MacLean. "The genetic basis of the fitness costs of antimicrobial resistance: a meta-analysis approach." *Evolutionary applications* 8, no. 3 (2015): 284-295. <https://doi.org/10.1111/eva.12202>

Whiteley et al., 2001 Whiteley, Marvin, M. Gita Bangera, Roger E. Bumgarner, Matthew R. Parsek, Gail M. Teitzel, Stephen Lory, and E. P. Greenberg. "Gene expression in Pseudomonas aeruginosa biofilms." *Nature* 413, no. 6858 (2001): 860-864.

DOI <https://doi.org/10.1038/35101627>

Wingender et al., 1999 Mayer, Christian, Ralf Moritz, Carolin Kirschner, Werner Borchard, Ralf Maibaum, Jost Wingender, and Hans-Curt Flemming. "The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms." *International journal of biological macromolecules* 26, no. 1 (1999): 3-16.

[https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(99\)00057-4](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00057-4)

Wouters et al. (1980 Wouters, J. T. M., F. L. Driehuis, P. J. Polaczek, Marie-Louise HA Van Oppenraay, and J. G. Van Andel. "Persistence of the pBR 322 plasmid in Escherichia coli K 12 grown in chemostat cultures." *Antonie van Leeuwenhoek* 46, no. 4 (1980): 353-362. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00421982>

Yazgan et al. (2018) Yazgan, Burak, İbrahim Türkel, Rıdvan Güçkan, Kılınc Kılınc, and Tuba Yıldırım. "Comparison of biofilm formation and efflux pumps in ESBL and carbapenemase producing Klebsiella pneumoniae." *The Journal of Infection in Developing Countries* 12, no. 03 (2018): 156-163. <https://jidc.org/index.php/journal/article/view/9677>

Annexes

I. Appareillages

Autoclave (Pb-INTERNATIONAL), Bain-marie (MEMMERT),

Etuve 37° (MEMMERT) , Spectrophotomètre visible (MEDLINE),

Balance de précision (KERN), Agitateur magnétique (RÜHRO MAG),

Réfrigérateur (ENIEM), Bec-Bunsen

II . Verrerie et autres matériels

Micropipettes 100, 1000 et ul (SCI LOGEX), Microplaques 96 puits,

Tubes à essai à vis stériles, Ensemenceurs, Barreau magnétique Boites

de Pétri en plastique, Flacons stérile, Entonnoirs , Béchers

Spatule, Pipettes graduées stériles à différents volumes, Pipettes Pasteur

Galeries biochimiques API 20E (Biomérieux), B é c h e r s , Cristallisoirs

III . Milieux de culture

III .1. Luria Broth (LB) :

- Extrait de levures2.5g
- NaCl..... 5g
- Tryptone 5g
- [Eau distillée](#).....500 ml

III . 2. Gélose nutritive (GN):

- GN (poudre) 59g
- [Eau distillée](#)..... 1L

III . 3. Mueller Hinton (MH) :

- MH (poudre)38g
- [Eau distillée](#)..... 1L

III . 4. Colorants et réactifs

- Eau distillée..... 10 ML
- Cristal violet (poudre) 0.2g
- Ethanol200 ul

Annexe 2 : Matériel

Appareillages

Autoclave (Pb-INTERNATIONAL), Bain-marie (MEMMERT), Bec-Bunsen
Etuve 37°(MEMMERT), Spectrophotomètre visible (MEDLINE),
Balance de précision (KERN), Agitateur magnétique (RÜHRO MAG),
Réfrigérateur (ENIEM),

Verrerie et autres matériels

Micropipettes 100, 1000 et ul (SCI LOGEX), Microplaques 96 puits,
Tubes à essai à vis stériles, Ensemenceurs, Barreau magnétique, Cristallisoirs
Boîtes de Pétri en plastique ; Flacons stérile, Entonnoirs, Pipettes Pasteur
Spatule, Pipettes graduées stériles à différents volumes, Bêchers,
Galeries biochimiques API 20E (Biomérieux), Bêchers,

Milieux de culture

Luria Broth (LB) :

- Extrait de levures2.5g
- NaCl..... 5g
- Tryptone 5g
- Eau distillée.....500 ml

Gélose nutritive (GN) :

- GN (poudre) 59g
- Eau distillée..... 1L

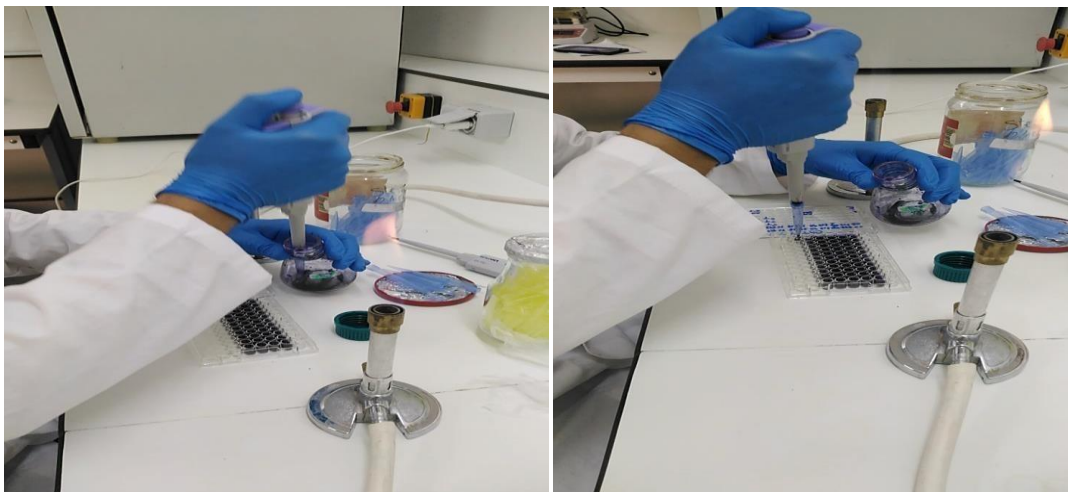
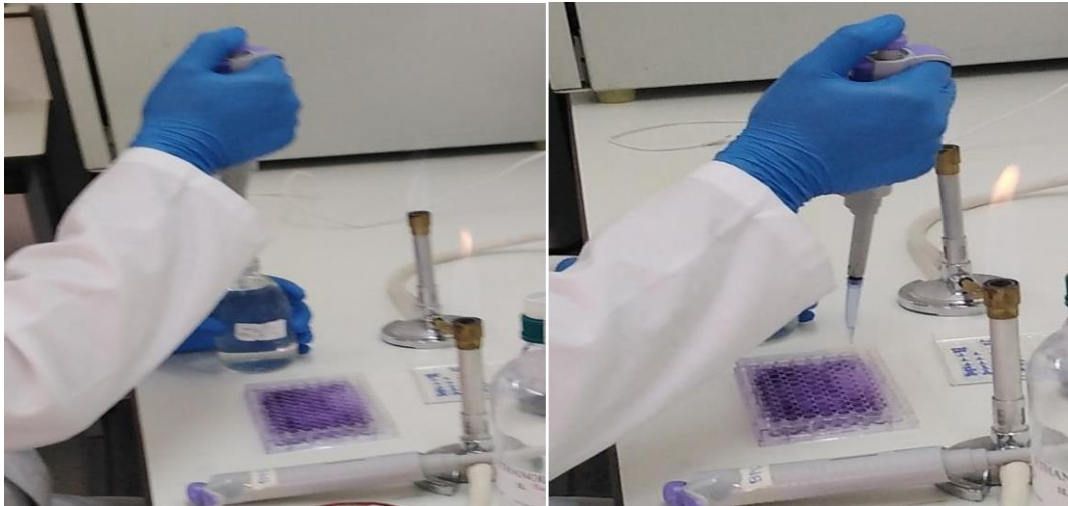
Mueller Hinton (MH) :

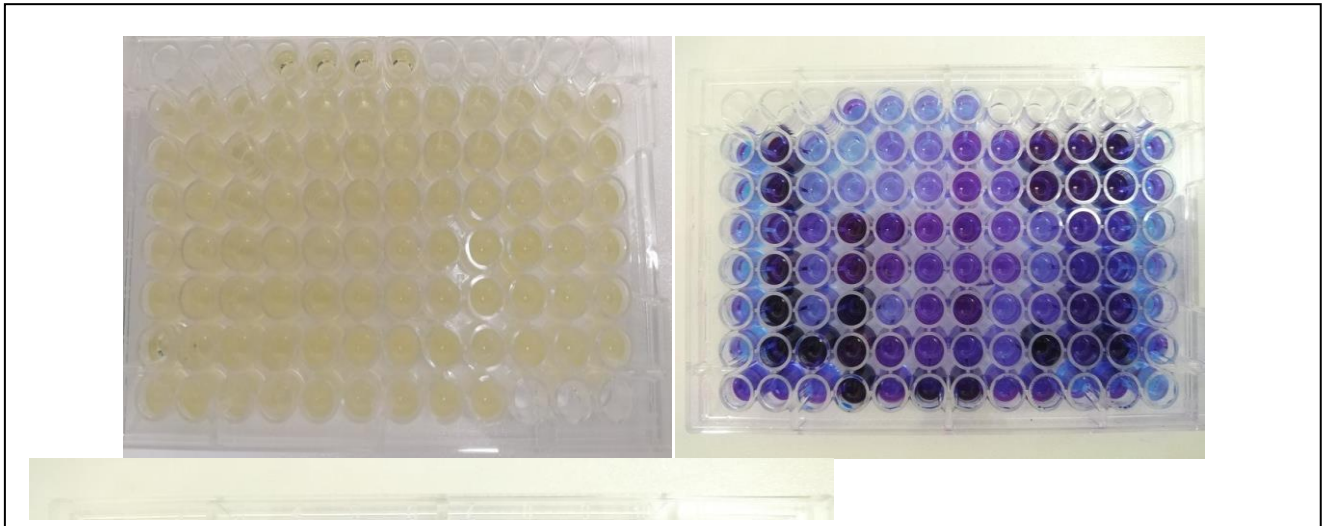
- MH (poudre)38g
- Eau distillée..... 1L

Colorants et réactifs

- Eau distillée..... 10 ML
- Cristal violet (poudre)0.2g

- Ethanol 200 ul





- **Giani T, Antonelli A, Caltagirone M, Mauri C, Nicchi J, Arena1 F, Nucleo E, Bracco S, Pantosti A .2017.** Evolving bêta-lactamase epidemiology in *Enterobacteriaceae* from Italian nationwide surveillance, October 2013: KPC-carbapenemase spreading among outpatients. *Euro Surveillance* **22**(31) : 84–90.
- **Robin, F., Gibold, L., and Bonnet, R. 2012.** Résistances naturelles et acquises aux β -lactamines chez les entérobactéries : comment les identifier en pratique quotidienne. *Revue Francophone des laboratoires*. 445 : 47-58.
- **Madi et al., 2013 Madi, Zita Erika, Christian Brandes, Georg Neumann, David Quist, Werner Ruppitsch, and Rupert Hohegger.** "Evaluation of Adh1 alleles and transgenic soybean seeds using Scorpion PCR and HRM analysis." *European Food Research and Technology* 237, no. 2 (2013) : 125-135.

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-013-1969-y>

- **(Harriot et al., 1994 Barr, J., P. Chambers, P. Harriott, C. R. Pringle, and A. J. Easton.** "Sequence of the phosphoprotein gene of pneumonia virus of mice: expression of multiple proteins from two overlapping reading frames." *Journal of virology* 68, no. 8 (1994): 5330-5334.
- **DOI : <https://doi.org/10.1128/jvi.68.8.5330-5334.1994>**
- **(Hogrefe et al., 1984 Hogrefe, C. H. R. I. S. T. I. N. E., D. Römermann, and B. A. R. B. E. L. Friedrich.** "Alcaligenes eutrophus hydrogenase genes (Hox)." *Journal of bacteriology* 158, no. 1 (1984) : 43-48.
- **Garcillán et al., 2009). Garcillán-Barcia, María Pilar, María Victoria Francia, and Fernando de La Cruz.** "The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification." *FEMS microbiology reviews* 33, no. 3 (2009): 657-687.
- **Khallef, 2016) Boumaza, A., K. Lalaoui, M. Khallef, H. Sbayou, H. Talbi, and A. Hilali.** "Assessment of cytotoxic and genotoxic effects of Clodinafop-propargyl commercial formulation on *Allium cepa* L." *Journal of Materials and Environmental Science* 7, no. 4 (2016): 1245-1251

- **(Ruiz-Maso et al., 2015). Ruiz-Masó, José A., Cristina Machón, Lorena Bordanaba-Ruiseco, Manuel Espinosa, Miquel Coll, and Gloria Del Solar.** "Plasmid rolling-circle replication." *Microbiology spectrum* 3, no. 1 (2015): 3-1.
- **Byrd & Matson, 1997 Byrd, Devon R., and Steven W. Matson.** "Nicking by transesterification: the reaction catalysed by a relaxase." *Molecular microbiology* 25, no. 6 (1997): 1011-1022.
- **de la Cruz et al., 2010 Smillie, Chris, M. Pilar Garcillán-Barcia, M. Victoria Francia, Eduardo PC Rocha, and Fernando de la Cruz.** "Mobility of plasmids." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74, no. 3 (2010) : 434-452.
- **Furste et al., 1989 Fürste, Jens Peter, Werner Pansegrau, Gunter Ziegelin, Manfred Kröger, and Erich Lanka.** "Conjugative transfer of promiscuous IncP plasmids: interaction of plasmid-encoded products with the transfer origin." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86, no. 6 (1989) : 1771-1775.
- **Gomis- Ruth et al., 2004). Gomis-Ruth, F. X., Maria Sola, and M. Coll.** "Coupling factors in macromolecular type-IV secretion machineries." *Current pharmaceutical design* 10, no. 13 (2004): 1551-1565.
- **Smillie et al., 2010). Smillie, Chris, M. Pilar Garcillán-Barcia, M. Victoria Francia, Eduardo PC Rocha, and Fernando de la Cruz.** "Mobility of plasmids." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74, no. 3 (2010): 434-452.
- **(Chaouch, et al, 2020 Chaouch, Mohamed Aymen, and Stefania Benvenuti.** "The role of fruit by-products as bioactive compounds for intestinal health." *Foods* 9, no. 11 (2020): 1716.
- **Yala et al., 2001). Fleming, Euan M., and Charles Yala.** *Policy options for the tree crop industries in Papua New Guinea.* No. 435-2016-33761. 2001.
- **(Cavallo et al, 2004) Cavallo, J-D., R. Fabre, F. Jehl, C. Rapp, and E. Garrabé.** "Bêtalactamines." *EMC-Maladies infectieuses* 1, no. 3 (2004) : 129-202.
- **(Ruppé, 2010) Ruppé, E.** "Épidémiologie des bêta-lactamases à spectre élargi : l'avènement des CTX-M." *Antibiotiques* 12, no. 1 (2010) : 3-16.
- **(Ayad, 2016). Relier, Sébastien, Laura Yazdani, Oualid Ayad, Armelle Choquet, Jean-Francois Bourgaux, Michel Prudhomme, Julie Pannequin, Françoise Macari, and Alexandre David.** "Antibiotics inhibit sphere-forming ability in suspension culture." *Cancer Cell International* 16, no. 1 (2016): 1-9.
- **Jarlier, 2019 Jarlier, Vincent, Liselotte Diaz Högberg, Ole E. Heuer, José Campos, Tim Eckmanns, Christian G. Giske, Hajo Grundmann et al.** "Strong correlation between the rates of intrinsically antibiotic-resistant species and the rates of acquired resistance in Gram-negative species causing bacteraemia, EU/EEA,

2016." *Eurosurveillance* 24, no. 33 (2019): 1800538.

- **(Nordmann et al., 2012 Nordmann, Patrice, Laurent Poirel, and Laurent Dortet.** "Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae." *Emerging infectious diseases* 18, no. 9 (2012): 1503.
- **Carle, 2009 Carle, Sylvie.** "La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important !" *Pharmactuel* 42 (2009).
- **(Bush et al., 1995). Bradford, Patricia A., Carl Urban, Arun Jaiswal, Noriel Mariano, Beth A. Rasmussen, Steven J. Projan, James J. Rahal, and Karen Bush.** "SHV-7, a novel cefotaxime-hydrolyzing bêta-lactamase, identified in Escherichia coli isolates from hospitalized nursing home patients." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39, no. 4 (1995) : 899-905.
- **Castanheira et al., 2021). Bush, Karen, George A. Jacoby, and Antone A. Medeiros.** "A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 39, no. 6 (1995): 1211-1233.
- **Sabate et al., 2002. Sabaté, Montserrat, Ferran Navarro, Elisenda Miró, Susana Campoy, Beatriz Mirelis, Jordi Barbé, and Guillem Prats.** "Novel complex sul1-type integron in Escherichia coli carrying bla CTX-M-9." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46, no. 8 (2002): 2656-2661.
- **Mendonca et al., 2007 Mendonça, Nuno, Joana Leitão, Vera Manageiro, Eugénia Ferreira, and Manuela Caniça.** "Spread of extended-spectrum β -lactamase CTX-M-producing Escherichia coli clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51, no. 6 (2007): 1946-1955.
- **Arduino et al., 2002 Arduino, Sonia M., Paul H. Roy, George A. Jacoby, Betina E. Orman, Silvia A. Pineiro, and Daniela Centron.** "bla CTX-M-2 is located in an unusual class 1 integron (In35) which includes Orf513." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46, no. 7 (2002): 2303-2306.
- **Cao et al., 2002 Cao, Van, Thierry Lambert, and Patrice Courvalin.** "ColE1-like plasmid pIP843 of Klebsiella pneumoniae encoding extended-spectrum β -lactamase CTX-M-17." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46, no. 5 (2002): 1212-1217.
- **Marcade et al., 2009 Marcadé, Geraldine, Catherine Deschamps, Anders Boyd, Valérie Gautier, Bertrand Picard, Catherine Branger, Erick Denamur, and Guillaume Arlet.** "Replicon typing of plasmids in Escherichia coli producing

extended-spectrum β -lactamases." *Journal of antimicrobial chemotherapy* 63, no. 1 (2009): 67-71.

- **Poirel et al., 2003** Poirel, Laurent, Jean-Winoc Decousser, and Patrice Nordmann. "Insertion sequence IS Ecp1B is involved in expression and mobilization of a bla CTX-M β -lactamase gene." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47, no. 9 (2003): 2938-2945.
- **Gangoue, 2007** Gangoué-Piéboji, Joseph, Stéphane Baurin, Jean-Marie Frère, Pierre Ngassam, Bathelémy Ngameni, Anatole Azebaze, Dieudonné Emmanuel Pegnyemb, Jean Watchueng, Colette Goffin, and Moreno Galleni. "Screening of some medicinal plants from Cameroon for β -lactamase inhibitory activity." *Phytotherapy research* 21, no. 3 (2007): 284-287.
- **D'Andrea et al., 2006** D'Andrea, Marco M., Elisabetta Nucleo, Francesco Luzzaro, Tommaso Giani, Roberta Migliavacca, Francesca Vailati, Vesselina Kroumova, Laura Pagani, and Gian Maria Rossolini. "CMY-16, a novel acquired AmpC-type β -lactamase of the CMY/LAT lineage in multifocal monophyletic isolates of *Proteus mirabilis* from northern Italy." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50, no. 2 (2006): 618-624.
- **Haldorsen et al., 2008** Haldorsen, Bjørg, Bettina Aasnaes, Kristin H. Dahl, Anne-Merethe Hanssen, Gunnar S. Simonsen, Timothy R. Walsh, Arnfinn Sundsfjord, and Eirik W. Lundblad. "The AmpC phenotype in Norwegian clinical isolates of *Escherichia coli* is associated with an acquired IS Ecp1-like ampC element or hyperproduction of the endogenous AmpC." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 62, no. 4 (2008): 694-702.
- **Pantel, 2015** Pantel, Alix. "Multirésistance des entérobactéries aux antibiotiques et modulation de l'influx et de l'efflux membranaires chez *Escherichia coli* ST131." PhD diss., Université Montpellier, 2015.
- **Mhaya, 2019** Mhaya, Amel. "Analyse de la résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries et étude d'une potentielle voie alternative aux traitements antibiotiques." PhD diss., Bordeaux, 2019.
- **Soumaila, 2012** Bilski, J., D. Jacob, F. Soumaila, C. Kraft, and A. Farnsworth. "Agronomic biofortification of cereal crop plants with Fe, Zn, and Se, by the utilization of coal fly ash as plant growth media." *Advances in bio research* 3, no. 4 (2012): 130.
- **; Margolin et al., 1993** Margolin, Alexey L. "Enzymes in the synthesis of chiral drugs." *Enzyme and Microbial Technology* 15, no. 4 (1993): 266-280.