

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE 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

Mémoire de fin d'études

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

Filière sciences biologiques

Option : Microbiologie

Thème

Caractérisation moléculaire de gènes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries isolées à partir des eaux usées traitées rejetées à la mer

Présenté par :

- NECHE Souhila

Devant le jury :

Présidente : HAMAIDI-CHERGUI. F Professeur Université de Blida 01

Examinatrice : TOBAL SGHEIR. S M.A.A. Université de Blida 01

Promoteur : DRALI. R M.R.A. L'Institut Pasteur

Co-promotrice : SAIDI. F Professeur Université de Blida 01

Promotion : 2020-2021

Remerciements

Je voudrais remercier tout d'abord mon promoteur Dr Drali, responsable de la plateforme génomique-bioinformatique merci de m'avoir accepté comme étudiante, merci pour votre encadrement, vos précieux conseils, votre encouragement et votre confiance, vous êtes aussi remercié pour le temps que vous avez généreusement investi dans ma formation.

Votre rigueur dans le travail et votre expérience et la grande culture scientifique font de vous une référence dans le domaine des sciences bactériologiques et la biologie moléculaire, Je suis très honorée d'un scientifique de votre rang m'encadre, veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance.

Je tiens à remercier de façon particulière ma co-promotrice professeur Saidi Fairouz, vous n'avez pas hésité un instant à accepter de me co-encadrer et je sais que vous l'avez fait pour moi, vos conseils et votre disponibilité sont autant de qualité qui ont suscités en moi une très grande admiration et un profond respect pour votre personne, soyez rassurée chère professeur de ma reconnaissance vis à vis de ce que vous avez fait pour moi, merci infiniment.

*Président du jury
Professeur Hamaidi Chergui*

Chère professeur, vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury, nous avons admiré vos qualités scientifiques et pédagogiques tout au long de notre formation, veuillez trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

Mme Tobal, Je vous dis sincèrement merci d'avoir accepté de participer au jury de ce travail en étant l'examinatrice, votre contribution aussi bien dans la forme que dans le fond m'a été très précieuse.

Directeur général de l'institut Pasteur Professeur Derrar Je vous prie de bien vouloir recevoir toute ma profonde gratitude pour avoir permis de faire mon stage de fin d'étude au sein de votre établissement.

Conseiller Dr Lebres Vous avez toujours été près à répondre à la moindre de mes interrogations et je vous en remercie.

Au personnel de la plateforme génomique-bioinformatique Nawel et Khalil, merci pour votre collaboration et votre sympathie à mon égard

J'adresse mes remerciements aussi à Dr Kernif Tahar chercheur à l'institut Pasteur d'Algérie

Dédicaces

À ma mère

*Extraordinaire **maman**, les mots ne suffisent pas pour exprimer ce que tu représentes pour moi, tu as été mon pilier et mon réconfort, tu m'as élevé dans le sens du bienfait, **mama** merci de m'avoir menée là où j'en suis aujourd'hui, les mots me manquent et je ne pourrais jamais te remercier suffisamment pour ton amour inconditionnel, ta tendresse, ta patience, ta confiance que tu m'as témoignée, tes prières et les énormes sacrifices que tu as consenti pour moi.*

*Que dieu t'accorde longue vie et de santé à fin que je puisse à mon tour te combler, **mama** je t'aime.*

À mon père

***Papa**, tes efforts ne sont pas vains !*

Je voudrais te remercier pour m'avoir encouragé et d'avoir supporté tous mes caprices, ce travail est aussi le fruit de tes sacrifices de tes prières et de ton amour.

Puisse dieu te préserver et te procurer santé et bonheur

À mon mari

*Cher **mari**, c'est grâce à ta compréhension, ta confiance et surtout ton soutien durant toutes ces longues années que j'ai pu en arriver ici.*

*Que le tout puissant **ALLAH** nous donne ce qu'on a tant attendu.*

À mes soeurs

Naima

*Ma sœur et ma 2ème **maman**, source inépuisable d'amour et de bienfaits, tes conseils ont été d'un recours inestimable tout au long de ma vie, merci pour ton soutien et ta présence à mes côtés à chaque fois que j'en ai besoin.*

Fatima

Une sœur comme on ne peut trouver nulle part! Aucune dédicace ne peut exprimer la profondeur des sentiments fraternels d'amour et d'attachement que j'éprouve à ton égard, puisse dieu te protéger ainsi ta famille et renforce notre fraternité.

À mes frères

Merci de m'avoir encouragé tout le long de mes études, merci pour votre compréhension permanente et de votre soutien moral physique et fraternel qui a contribué à la réalisation de ce travail.

À mes neveux et nièces

*À ma nièce adorée **Rimasse***

À toute ma famille et ma belle famille

*À mon amie de l'enfance **Ines***

À mes amis, Fatima Zohra, Lina, Hiba, Mohamed, Sidali, Iskander, Hacene.

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique du mode d'action des AGA dans les ribosomes bactériens.	4
Figure 2 : Mécanisme d'action des quinolones	5
Figure 3 : Structure du peptidoglycane.	5
Figure 4 : mécanisme d'action des glycopeptides.....	9
Figure 5 : mécanismes d'action des macrolides	10
Figure 6 : mode d'action des tetracyclines	11
Figure 7 : différents mécanismes de résistance aux antibiotiques dans une bactérie gram négative,	18
Figure 8 : La conjugaison.....	21
Figure 9 : La transduction	22
Figure 10 : transformation génétiques.....	22
Figure 11 : Métagénomique fonctionnelle appliquée à l'antibiorésistance.....	25
Figure 12 : Disposition des antibiotiques sur la gélose Mueller Hinton pour les entérobactéries.....	30
Figure 13 : Disposition des antibiotiques sur la gélose Mueller Hinton pour les <i>Staphylococcus spp.</i>	30
Figure 14 : Disposition des antibiotiques sur la gélose Mueller Hinton pour les Gram positives.....	31
Figure 15 : Disposition des antibiotiques sur la gélose Mueller Hinton pour les <i>Enterococcus spp.</i>	31
Figure 16 : Une photographie montrant un résultat obtenu au spectrophotometre.....	34
Figure 17 : Les différents aspects culturels des bactéries isolées	40
Figure 18 : Résultat du Test à KOH.....	41
Figure 19 : Différenciation entre les genres des bactéries à Gram positif après le test d'oxydase	42
Figure 20 : Résultat d'antibiogramme pour les entérobactéries.....	45
Figure 21 : la souche d'entérobactéries qui présente une pénicillinase de haut niveau	46
Figure 22 : la souche d'entérobactéries productrice d'une BLSE et une céphalosporinase haut niveau	46
Figure 23 : a. synergie 1er cas : entre DOX et CTX ; b. synergie 2ème cas : entre CIP et SXT	47

Figure 24 : Résultat d'antibiogramme pour les Pseudomonas	48
Figure 25 : Résultat d'antibiogramme pour les staphylocoques	49
Figure 26 : Résultat d'antibiogramme pour les streptocoques et les entérocoques	50
Figure 27 : résultat de PCR, exemple d'électrophorèse sur gel d'agarose des produits PCR du gène tem et tet	52
Figure 28 : Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S mettant en évidence les résultats de l'identification phylogénétique des 7 souches sélectionnées.....	54

Liste des tableaux

Tableau I : Association d'un inhibiteur de bêta-lactamase avec un antibiotique bêta-lactame	8
Tableau II. Les mécanismes d'action des antibiotiques	13
Tableau III. Familles et valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibitions des antibiotiques testés	29
Tableau IV. Les séquences d'amorces utilisées pour la détection des gènes de résistance par PCR	32
Tableau V. Mélange réactionnel (mixe de la PCR)	34
Tableau VI. Programme d'amplification « cycle thermique »	35
Tableau VII. Mélange réactionnel (mixe de la PCR) pour l'ADNr 16S	36
Tableau VIII. Programme d'amplification « cycle thermique » l'ADNr 16S	37
Tableau IX. Le mélange réactionnel de la réaction du Big Dye	38
Tableau X . Programme d'amplification « séquençage »	38
Tableau XI. Résultat de test d'oxydase	42
Tableau XII. Résultats d'identification bactérienne	43
Tableau XIII. Résultats d'identification bactérienne (suite)	44
Tableau XIV. Le phénotype acquis de résistance des entérobactéries	47
Tableau XV. Résultats de détection de gène de résistance dans les souches testées	51
Tableau XVI. Profil de résistance des bactéries qui présentent des gènes de résistances ciblées	52

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARNr : Acide ribonucléique ribosomale

ARNt : Acide ribonucléique de transfert

AGA : Antibiotiques aminosides

ATB : Antibiotiques

BGN : Bacille à Gram négatif

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

BLSE : Bêta-lactamase à spectre étendu

BMR : Bactérie multirésistante

BRA : Bactéries résistantes aux antibiotiques

CARD : Comprehensive Antibiotic Resistance Database

DO : Densité optique

dNTP : désoxyribonucléoside triphosphate

ddNTP : didésoxyribonucléotide triphosphate

ERV : Entérocoque résistante à la vancomycine

FDA : Food and Drug Administration

GRA : Gènes de résistance aux antibiotiques

HGT : Transfert horizontal de gènes

KOH : hydroxyde de potassium

MGEs : éléments génétiques mobiles

MgCl₂ : Magnésium

MLS : macrolides, lincosamides, streptogramines

NCBI : National Center for Biotechnology Information

PCR : *polymerase chain reaction*

PBP : Penicillin-binding proteins

qPCR : PCR quantitative en temps réel

R : Résistance

S : Sensible

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

STEP : Station d'épuration

STEPU : Stations d'épuration urbaines

T_m : Température de fusion

Résumé

L'utilisation intensive d'antibiotiques à des fins humaines, vétérinaires et agricoles entraîne leur rejet continu dans l'environnement. Avec les antibiotiques, des bactéries résistantes aux antibiotiques (BRA) et des gènes de résistance aux antibiotiques (GRA) sont introduits dans les eaux usées. Les usines de traitement des eaux usées (STEP) sont considérées comme des points chauds probables pour la dissémination de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement, car elles offrent des conditions propices à la prolifération des BRA ainsi qu'au transfert horizontal des GRA entre différents micro-organismes.

Au cours de cette étude, Nous avons procédé à la caractérisation préliminaire de 93 souches bactériennes isolées à partir des eaux usées traitées rejetées à la mer, conservées à la souchothèque du laboratoire de la plateforme génomique - bio-informatique de l'institut Pasteur Algérie. Nous avons également étudié leur profil de résistance aux antibiotiques. En seconde partie, une recherche de gènes de résistances spécifiques par PCR et une caractérisation moléculaire par séquençage ont été effectués pour les souches sélectionnées.

Les résultats d'identification préliminaires ont permis d'affilier les 93 souches à 4 groupes différents : les staphylocoques (39 souches), les entérocoques et streptocoques (27 souches), les entérobactéries (20 souches) et les *Pseudomonas* (7 souches). L'étude de l'activité antibactérienne vis-à-vis des antibiotiques a montré une variation de résistances selon les germes bactériens. De plus, les gènes de résistances *tem* pour la résistance aux bêta-lactamines et *tet* pour celui de la tétracycline ont été détectés et caractérisés chez 08 souches d'entérobactéries. Quatre d'entre elles présentent les deux gènes à la fois. Aucun gène n'a été détecté pour les autres groupes bactériens.

L'analyse de L'ADNr 16S et l'arbre phylogénétique obtenu ont montré que nos 07 souches appartenaient à deux clades d'entérobactéries, le premier dominé par le genre *Citrobacter* et le deuxième par les genres *Escherichia/Shigella*, avec degré de similitude avec inférieur à 97%, Des investigations plus fines seront conduites pour déterminer l'identification taxonomique exacte de ces bactéries

Mots-clés : bactéries résistantes aux antibiotiques, gènes de résistance aux antibiotiques, PCR, séquençage, L'ADNr 16S, l'arbre phylogénétique.

Abstract

The intensive use of antibiotics for human, veterinary and agricultural purposes results in their continued release into the environment. Along with antibiotics, antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) are introduced into wastewater. Wastewater treatment plants (WWTPs) are considered likely hot spots for the spread of antibiotic resistance in the environment, as they provide conditions conducive to the proliferation of ARBs as well as the horizontal transfer of GRAs between different microorganisms.

During this study, we carried out the preliminary characterization of 93 bacterial strains isolated from treated wastewater discharged into the sea, kept in the strain library of the genomic - bioinformatics platform laboratory of the Institut Pasteur Algeria. We also studied their antibiotic resistance profile. In the second part, a search for specific resistance genes by PCR and molecular characterization by sequencing were carried out for the selected strains.

The preliminary identification results made it possible to affiliate the 93 strains to 4 different groups: staphylococci (39 strains), enterococci and streptococci (27 strains), enterobacteria (20 strains) and *Pseudomonas* (7 strains). The study of the antibacterial activity against antibiotics showed a variation in resistance depending on the bacterial germs. In addition, the resistance genes *tem* for resistance to beta-lactams and *tet* for that of tetracycline were detected and characterized in 08 strains of enterobacteria. Four of them have both genes at the same time. No genes were detected for other bacterial groups

The analysis of 16S rDNA and the phylogenetic tree obtained showed that our 07 strains belonged to two clades of Enterobacteriaceae, the first dominated by the genus *Citrobacter* and the second by the genera *Escherichia* / *Shigella*, with a degree of similarity with less than 97%, More detailed investigations will be carried out to determine the exact taxonomic identification of these bacteria

Keywords: antibiotic resistant bacteria, antibiotic resistance genes, PCR, sequencing, 16S rDNA, phylogenetic tree.

ملخص

يؤدي الاستخدام المكثف للمضادات الحيوية للأغراض البشرية والبيطرية والزراعية إلى استمرار إطلاقها في البيئة. جنبا إلى جنب مع المضادات الحيوية ، يتم إدخال البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية والجينات المقاومة للمضادات الحيوية في مياه الصرف الصحي. تعتبر محطات معالجة مياه الصرف الصحي نقاط ساخنة محتملة لنشر مقاومة المضادات الحيوية في البيئة ، لأنها توفر ظروفًا مواتية لتكاثر إدخال البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية وكذلك النقل الأفقي لـ بين الكائنات الحية الدقيقة المختلفة.

خلال هذه الدراسة ، أجرينا توصيفًا أوليًا لـ 93 سلالة بكتيرية معزولة من مياه الصرف الصحي المعالجة التي يتم تصريفها في البحر ، مخزنة في مكتبة السلالات في مختبر منصة المعلومات الجينومية الحيوية التابع لمعهد باستور الجزائر. لقد درسنا أيضًا ملف مقاومة المضادات الحيوية. في الجزء الثاني ، تم إجراء بحث عن جينات مقاومة محددة والتوصيف الجزيئي عن طريق التسلسل للسلالات المختارة.

أناحت نتائج التعريف الأولية إمكانية ضم 93 سلالة إلى 4 مجموعات مختلفة: المكورات العنقودية (39 سلالة) ، والمكورات المعوية والمكورات العقدية (27 سلالة) ، والبكتيريا المعوية (20 سلالة) ، والزائفة (7 سلالات). أظهرت دراسة النشاط المضاد للبكتيريا ضد المضادات الحيوية تباينًا في المقاومة اعتمادًا على الجراثيم البكتيرية. بالإضافة إلى ذلك ، تم اكتشاف جينات المقاومة لمقاومة بيتا لكتام و *tet* للتتراسيكلين وتم تمييزها في 08 سلالات من البكتيريا المعوية. أربعة منهم لديهم كلا الجينين في نفس الوقت. لم يتم الكشف عن أي جينات للمجموعات البكتيرية الأخرى

أظهر تحليل S rDNA 16 وشجرة النشوء والتطور التي تم الحصول عليها أن سلالاتنا 07 تنتمي إلى سلالتين من *Enterobacteriaceae* ، الأول يسيطر عليه جنس *Citrobacter* والثاني من جنس *Escherichia / Shigella* ، بدرجة تشابه أقل من 97% ، سيتم إجراء تحقيقات أكثر تفصيلاً لتحديد التصنيف الدقيق لهذه البكتيريا

الكلمات المفتاحية: البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية ، الجينات المقاومة للمضادات الحيوية ، تفاعل البوليميراز المتسلسل ، التسلسل ، S rDNA 16 ، شجرة النشوء والتطور.

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Résumé

INTRODUCTION	1
I. Les antibiotiques et l'antibiorésistances	3
I.1 Définition.....	3
I.2 Les classes d'antibiotiques et mécanismes d'action.....	3
I.2.1 Les aminosides	3
I.2.2 Les quinolones.....	4
I.2.3 Les bêta-lactamines	5
I.2.4 Antibiotiques glycopeptidiques.....	8
I.2.5 Les macrolides.....	9
I.2.6 Les cyclines	10
I.2.7 Association Triméthoprimé et sulfaméthoxazole.....	11
I.2.8 LES NITROFURANES	11
I.2.9 LES NITROIMIDAZOLES	11
I.2.10 ACIDE FUSIDIQUE.....	12
I.2.11 LES RIFAMYCINES.....	12
I.3 Les résistances naturelles et acquises	15
I.4 Les mécanismes de résistances aux antibiotiques	16
I.4.1 Inactivation enzymatique de l'antibiotique	16
I.4.2 Modification ou remplacement de la cible de l'antibiotique.....	17
I.4.3 Pompes à efflux	17
I.4.4 Perméabilité réduite.....	17
I.4.5 Protection de la cible de l'antibiotique.....	17
I.4.6 Piégeage de l'antibiotique	18
I.5 Le problème d'antibiorésistance en santé public.....	19
I.5.1 Conséquences de l'antibiorésistance bactérienne.....	19
II. La résistance des bactéries aux antibiotiques dans l'environnement	19
II.1.1 Facteurs influençant la propagation de l'antibiorésistance dans l'environnement	19
II.1.2 Transfert de l'antibiorésistance dans l'environnement	20

II.1.3	Transfert dans l'eau	20
III.	Méthodes d'étude de l'antibiorésistance dans l'environnement.....	22
III.1	Détection de bactéries résistantes aux antibiotiques par culture	22
III.2	Détection des gènes de résistance (ARGs) aux ATBs par approches moléculaires 23	
III.3	Approche métagénomique globale des communautés et de l'antibiorésistance ..	24
I.	Matériel et méthodes	26
I.1	Matériel.....	26
I.1.1	Matériel biologiques.....	26
I.1.2	Matériel non biologiques.....	26
I.2	Méthodes	26
I.2.1	Revivification des souches bactériennes	26
I.2.2	Caractérisation phénotypiques des souches	26
I.2.3	Détermination de profils de résistance aux antibiotiques.....	27
I.2.4	Caractérisation par PCR et détection des gènes de résistance aux bêta- lactamines, Polymyxines, Tétracyclines, Sulfonamides et aux Lincosamides	32
I.2.5	Amplification de l'ADNr 16S, séquençage et analyse phylogénétique	36
II.	RESULTATS	40
II.1	. Caractérisation des souches isolées	40
II.1.1	Etude phénotypique.....	40
II.2	Profil de résistance et de sensibilités aux antibiotiques.....	45
II.3	Résultats de détection de gène de résistance dans les souches testées	50
II.4	Identification moléculaires des souches sélectionnées	53
	Discussion.....	55
	Conclusion.....	62
	Références bibliographiques	64
	Annexes	

Introduction

INTRODUCTION

La résistance aux antibiotiques est reconnue comme l'un des défis les plus importants de la médecine contemporaine et le grave problème de santé publique. Il s'agit d'un phénomène extrêmement dangereux, qui empêche par conséquent le traitement efficace des infections bactériennes et peut être à l'origine de menaces épidémiques et d'une mortalité élevée (**Pazda et al., 2019**). Face à ce problème de santé publique, il est nécessaire de définir les éléments responsables de l'émergence de ces bactéries multi-résistantes. Il est maintenant établi que l'environnement représente une source et/ou un réservoir de bactéries résistantes ou de gènes de résistance aux antibiotiques qui pourraient être transmissibles à l'Homme (**Hartmann et al., 2014**).

Les stations d'épuration urbaines (STEPU) ont un rôle central dans la protection de l'environnement, en particulier des masses d'eau naturelles. L'élimination des matières organiques, des polluants chimiques et des micro-organismes indésirables des eaux usées, en utilisant des combinaisons de traitements physico-chimiques et biologiques, permettant le retour à l'environnement d'eau de bonne qualité. Cependant, les effluents finaux des STEPUs sont loin d'être stériles et, par conséquent, libèrent dans l'environnement, surtout aquatique qui est un milieu favorable pour l'acquisition et la dissémination de l'antibiorésistance de grandes quantités de bactéries, dont beaucoup sont d'origine animale ou d'origine humaine (**Berendonk et al., 2015; Watts et al., 2017; Manaia et al., 2018**).

Beaucoup de ces bactéries abritent des gènes de résistance aux antibiotiques et sont des vecteurs potentiels de dissémination de ces gènes dans le microbiome environnemental (**Manaia et al., 2018**). En tant que telles, ces bactéries sont considérées comme une menace potentielle pour la santé des humains et/ou des animaux, car elles peuvent entraîner davantage de cas d'infections difficiles à traiter. Parmi les espèces bactériennes courantes (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*), provoquant les infections hospitalières et communautaires les plus fréquentes (infections des voies urinaires, de la peau et des tissus sous-cutanés, du sang ou de la pneumonie) (**Mao et al., 2014; Pazda et al., 2019**).

En Algérie, très peu d'études se sont intéressées à l'état de la résistance aux antibiotiques dans les environnements aquatiques. Alors que les données sur la résistance en milieu clinique dénotent de l'ampleur de ce phénomène. A l'échelle internationale, ces dernières années, plusieurs études sur la résistance aux antibiotiques dans l'environnement ont été réalisées démontrant la complexité de ce phénomène multifactoriel.

Pour contribuer à cet effort, notre étude s'inscrit dans un contexte écologique afin d'étudier et évaluer la résistance aux antibiotiques dans un environnement aquatique en employant deux approches culturelle et moléculaire.

Nous avons entrepris notre travail par une démarche qui s'articule autour de trois volets :

Le premier est consacré à la caractérisation phénotypique des souches préalablement isolées des eaux usées traitées rejetées à la mer (plages d'Ain Benian).

Le second volet est dédié à l'étude et l'évaluation du profil de résistance de ces souches vis-à-vis des différents antibiotiques appartenant à plusieurs familles et classes chimiques.

Enfin, dans la dernière partie, une approche moléculaire a été utilisée d'une part pour la recherche de gènes de résistance spécifiques et d'autre part pour la caractérisation phylogénétiques de souches sélectionnées.



**Revue
bibliographiques**

I. Les antibiotiques et l'antibiorésistances

I.1 Définition

On appelle « Antibiotique » toute substance naturelle d'origine biologique élaborée par un organisme vivant, substance chimique produite par synthèse ou substance semi synthétique obtenue par modification chimique d'une molécule de base naturelle ayant une activité antibactérienne, activité en milieu organique et une bonne absorption et bonne diffusion dans l'organisme. Chaque famille d'antibiotiques a des propriétés spécifiques : le spectre d'activité, le mécanisme d'action, et l'activité bactéricide ou bactériostatique (Veyssiere, 2020)

I.2 Les classes d'antibiotiques et mécanismes d'action

La classification la plus importante des antibiotiques est basée sur leur origine, leur mode d'action, leur spectre d'activité et leur structure moléculaire. Il existe certains moyens de classification des antibiotiques, en particulier une méthode basée sur leur voie d'administration, telle que topique, orale ou injectable. D'autres antibiotiques liés à la même classe structurale présenteront une efficacité, des effets secondaires allergiques et des schémas de toxicité similaires. Certaines classes d'antibiotiques célèbres, comme les quinolones, les sulfamides, les macrolides, les aminosides, les tétracyclines, les bêta-lactamines, les glycopeptides et les oxazolidinones, sont basées sur leurs structures moléculaires et chimiques. (Dauvergne, 2018)

I.2.1 Les aminosides

« Les aminosides ou antibiotiques aminosides (AGA) sont des métabolites secondaires de bactéries utilisées dans la guerre contre d'autres micro-organismes, qui ont été réutilisés en médecine en tant qu'antibiotiques à large spectre chez les humains et les animaux. Cette classe d'antibiotiques a une activité contre les bactéries Gram-négatives et Gram-positives en ciblant l'ARN ribosomique (ARNr), conduisant à un mauvais repliement des protéines)(Hanberger et al., 2013). Malgré leur toxicité et ototoxicité rénales potentielles et leur résistance bactérienne connue, diverses molécules de cette famille d'antibiotiques sont utilisées en pratique clinique depuis plusieurs décennies.(Chandrika et Garneau-Tsodikova, 2018)

Les AGA sont constitués d'un résidu d'hydrate de carbone et possèdent plusieurs fonctionnalités de groupes amino et hydroxyle, déterminants pour l'interaction avec les séquences cibles sur l'ARNr et pour altérer la fonction ribosomique normale. Bien que les AGA naturels partagent le même noyau à base de myo-inositol .(Capelo-Martínez et Igrejas, 2020)

»

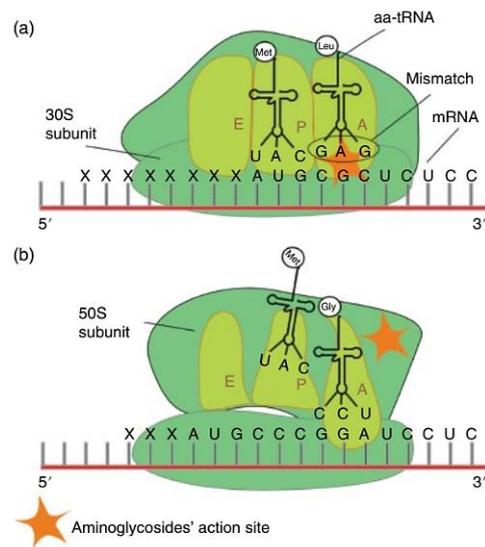


Figure 1 : Représentation schématique du mode d'action des AGA dans les ribosomes bactériens. (a) augmentant le taux d'erreur pendant le processus de décodage dans le site A et **(b)** en induisant des changements de conformation dans la sous-unité 50S, en inhibant la translocation des molécules d'ARNt (de l'A- et des sites P aux sites P et E).

I.2.2 Les quinolones

« Dans cette famille, plusieurs sous divisions sont acceptées, ici nous les subdiviserons en quinolones urinaires avec les quinolones de 1ère génération (acide pipémidique, fluméquine) déremboursées en 2018 et dont l'arrêt de commercialisation date du début d'année 2019 et fluoroquinolones (énoxacine, loméfloxacin, norfloxacin qui est à visée urinaire), les fluoroquinolones à visée systémique (ciprofloxacine, ofloxacine, péfloxacin qui a été supprimé) et enfin les fluoroquinolones dites antipneumococciques qui vont agir essentiellement sur le pneumocoque (lévofloxacine, moxifloxacine).

Cette famille d'antibiotique est à utiliser avec précaution car elle présente de nombreuses résistances et sera donc à éviter en première intention. (Veysièrè, 2020) »

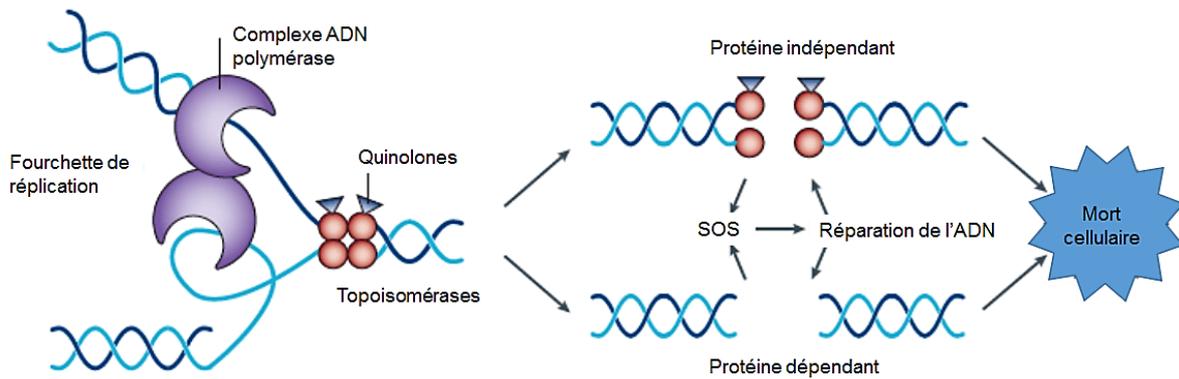


Figure 2 : Mécanisme d'action des quinolones (adapté de Kohanski MA et *al.* Nature Reviews Microbiology, 2010)

I.2.3 Les bêta-lactamines

Les antibiotiques bêta-lactamines sont un grand groupe d'antibiotiques qui partagent en commun une structure de base appelée anneau bêta-lactame. Les diverses structures moléculaires de ces antibiotiques permettent de les classer en plusieurs sous-groupes avec des spécificités caractéristiques. Les antibiotiques bêta-lactamines sont les agents antibactériens les plus couramment utilisés pour traiter les infections bactériennes en raison de leur activité bactéricide et de leur faible toxicité, sauf pour les patients souffrant d'allergies. (Balsalobre et *al.*, 2019)

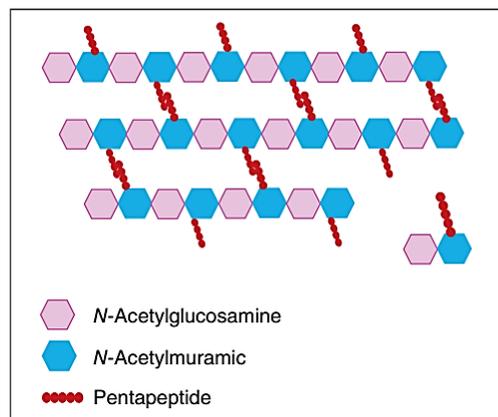


Figure 3 : Structure du peptidoglycane.

A. Pénicillines

Les pénicillines font partie du grand groupe des penams. Ils possèdent une structure centrale bicyclique, l'acide 6-aminopénicillanique (6-APA), qui est formé par condensation de l-cystéine et de d-valine. En raison de la nature hautement réactive du cycle bêta-lactame, les pénicillines sont susceptibles de se dégrader dans certaines conditions telles que l'acidité. En effet, ils doivent être protégés du pH acide gastrique lorsqu'ils sont utilisés par voie orale (Fernandes et Prudêncio 2013). Les différentes pénicillines sont définies par la chaîne latérale dans le groupe 6-amino. (Balsalobre et al., 2019)

B. Céphalosporines

Les céphalosporines sont des dérivés des produits de fermentation du champignon *Acremonium chrysogenum*. Sa structure centrale de cepème est appelée acide 7-aminocéphalosporanique (7-ACA). La structure chimique des radicaux R1 et R2 définit les différentes molécules de céphalosporine ainsi que leurs activités antibactériennes et leurs propriétés pharmacocinétiques. (Balsalobre et al., 2019)

Les céphalosporines sont plus résistantes à l'hydrolyse par les bêta-lactamases que les pénicillines ; par conséquent, ils ont montré un spectre d'activité plus large et ils sont classés en cinq générations selon leur activité antibactérienne (Fernandes et al., 2013). En général, les céphalosporines de première et deuxième générations ont une bonne activité contre les microorganismes à Gram positif, et les troisième et quatrième générations sont plus actives contre les pathogènes à Gram négatif. Cependant, *Listeria*, *Pasteurella spp.*, les entérocoques et tous les staphylocoques résistants à la méthicilline sont résistants aux céphalosporines (à l'exception des céphalosporines de cinquième génération). (Balsalobre et al., 2019)

C. Monobactames

Les monobactames sont des bêta-lactamines monocycliques actives contre les bacilles à Gram négatif, y compris *Pseudomonas spp.* Cependant, ils n'ont aucune activité contre les bactéries Gram-positives ou les anaérobies. L'aztréonam est le seul antibiotique cliniquement disponible de ce groupe. Son activité est similaire mais légèrement inférieure à la ceftazidime mais peut être utilisée chez les patients présentant une hypersensibilité de type 2 à la pénicilline ou aux céphalosporines. (Gomez et al. 2015).

D. Carbapénèmes

Les carbapénèmes sont les antibiotiques à spectre le plus large disponibles parmi les bêta-lactamines. Ils diffèrent des autres bêta-lactames en ce qu'ils ont un atome de carbone au lieu d'un atome de soufre ou d'oxygène dans le noyau bicyclique et une chaîne latérale hydroxyéthyle en configuration trans en position 6. Le premier carbapénème connu était la thiénamycine, produite par la bactérie à Gram positif *Streptomyces cattleya* (Birnbaum et al., 1985). L'imipénem a ensuite été obtenu par modification chimique. Au total, quatre carbapénèmes sont largement commercialisés (doripénème, ertapénème, imipénème et méropénème) et deux autres (biapénème et tébipénème) disponibles uniquement au Japon (Bush et Bradford, 2016)

En général, leur spectre d'activité s'étend à la majorité des agents pathogènes Gram-positifs et Gram-négatifs, y compris les aérobies et les anaérobies, en raison de leur pénétration bactérienne efficace, de leur stabilité contre l'hydrolyse par la plupart des bêta-lactamases et de leur affinité élevée pour plusieurs PBP. Cependant, cette classe de bêta-lactamines montre une inactivité intrinsèque contre les *staphylocoques* résistants à la méthicilline, *Enterococcus faecium* et certains bâtonnets non fermentants. (Papp-Wallace et al., 2011)

E. Bêta-lactamines associé aux inhibiteurs de la bêta-lactamase

Les inhibiteurs des bêta-lactamases en médecine clinique sont introduits en 1970 et constituent une bonne approche pour lutter contre la résistance aux bêta-lactamines. Ils sont utilisés en association avec une bêta-lactamine et sont capables de restaurer l'activité de la bêta-lactamine. (Lebrun, 2016)

Ils peuvent être classés en deux groupes (tableau .I) :

- **Inhibiteurs des bêta-lactamines.**

L'acide clavulanique, le tazobactam et le sulbactam sont structurellement des bêta-lactamines et agissent comme des inactivateurs ou des « inhibiteurs suicides » des bêta-lactamases de classe A

- **Inhibiteurs non bêta-lactamines.**

L'avibactam est un inhibiteur non bêta-lactamine. Sa structure contient un diazabicyclooctane ponté (DBO) et est un inhibiteur réversible covalent à liaison étroite pour la plupart des enzymes. Il est utilisé en association avec des céphalosporines à spectre étendu (ceftazidime)

et est en cours de développement pour une utilisation avec la ceftaroline et l'aztréonam. Certains autres inhibiteurs non bêta-lactamines en cours de développement comprennent les DBO RG6080 et le relebactam (MK-7655) en association avec l'imipénem et l'acide boronique RPX7009 en association avec le méropénème (**Balsalobre et al., 2019**)

Tableau I : Association d'un inhibiteur de bêta-lactamase avec un antibiotique bêta-lactame

Type d'inhibiteur	Inhibiteur de la β -lactamase	Antibiotique β -lactamine
bêta-lactamines	Acide clavulanique	Amoxicilline
		Ticarcilline
	Sulbactam	Ampicilline
	Tazobactam	Piperacilline
		Ceftolozane
non bêta-lactamines	Avibactam	Ceftazidime

I.2.4 Antibiotiques glycopeptidiques

Les antibiotiques glycopeptidiques sont une classe importante d'antibiotiques qui inhibent la biosynthèse de la paroi cellulaire bactérienne. La vancomycine a été le premier membre de cette classe d'antibiotiques à être découvert par Eli Lilly et approuvé pour une utilisation clinique par la Food and Drug Administration (FDA) en 1958. (**Sarkar et Haldar, 2019**)

La découverte de la vancomycine est survenue à un moment où la résistance aux antibiotiques les plus largement utilisés, les β -lactamines, était apparue. Il est toujours vital pour le traitement des infections bactériennes à Gram positif causées par *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) et *Clostridium difficile*. Plus tard en 1988, la teicoplanine, qui a été découverte au Centre de recherche Lepetit (Milan, Italie), a été approuvée pour une utilisation en Europe pour le traitement d'infections à Gram positif similaires (**Butler et al., 2014**).

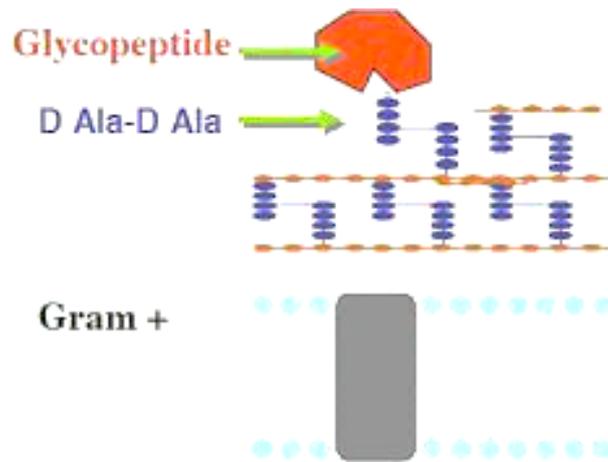


Figure 4 : mécanisme d'action des glycopeptides

I.2.5 Les macrolides

Les antibiotiques macrolides sont caractérisés par un grand cycle lactone macrocyclique auquel un ou plusieurs sucres désoxy (généralement du cladinose et de la désosamine) sont attachés. Plus de 2000 macrolides ont été isolés à partir d'une variété de sources naturelles aussi diverses que les actinobactéries, les champignons, les plantes, les insectes et les vertébrés. **(Liang et Han, 2013)** Presque tous les antibiotiques macrolides utilisés aujourd'hui sont des dérivés chimiques de macrolides naturels, en particulier l'érythromycine qui est dérivée des actinobactéries maintenant connues sous le nom de *Saccharopolyspora erythraea* (Labeda 1987). Les antibiotiques macrolides cliniquement pertinents entrent dans la catégorie des macrolides à cycle lactone à 14, 15 ou 16 carbones, tandis que ceux ayant d'autres activités antimicrobiennes et immunosuppressives peuvent avoir un cycle plus varié. **(Veysièrè, 2020)**

La plupart des macrolides modernes sont des macrolides de deuxième génération et sont dérivés de l'érythromycine A, notamment la clarithromycine, la dirithromycine, la roxithromycine et l'azithromycine **(Veysièrè, 2020)**

Macrolides (Érythromycine, clarithromycine, azithromycine)

Mécanisme d'action:

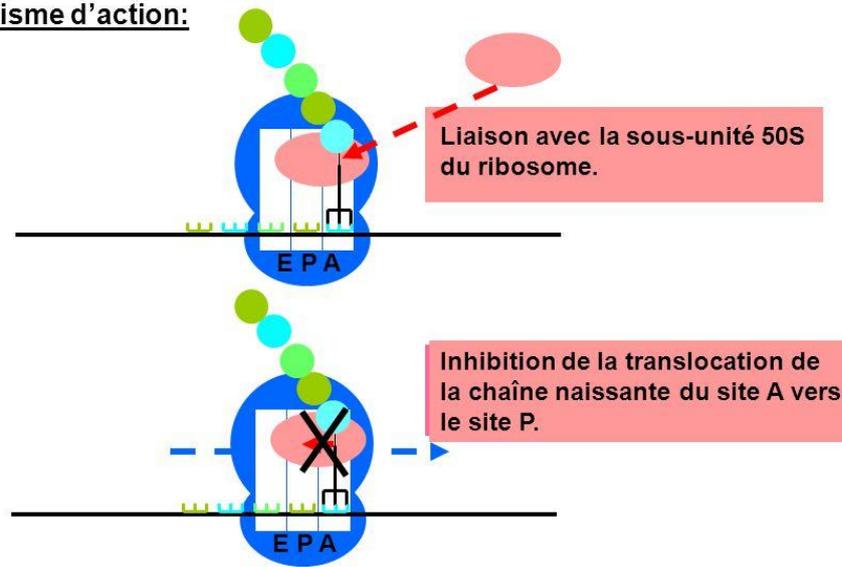


Figure 5 : mécanismes d'action des macrolides

I.2.6 Les cyclines

Les tétracyclines sont appelées ainsi à cause de leurs quatre cycles accolés. Dans cette famille on retrouve la doxycycline, lymécycline, minocycline et tigécycline (disponible seulement à l'hôpital). Les tétracyclines sont bactériostatiques, elles pénètrent bien dans les cellules, ces molécules présentent une grande homogénéité (Veysiere, 2020)

On distingue les cyclines naturelles et les cyclines semi synthétiques.

Cyclines naturelles

- Chlortetracycline (Auréomycine®)
- Tetracycline base (Tetracyne ®)

Cyclines semi-synthétiques

- Oxytetracycline (Terramycine®),
- Doxycycline (Vibramycine®),
- Minocycline (Mynocine®).

La Doxycycline et la Minocycline ont une meilleure activité in vitro et sont actives sur les souches bactériennes résistantes aux cyclines naturelles.

Elles ont, de plus, une meilleure absorption digestive et une plus longue durée d'action. (Yala et al., 2001)

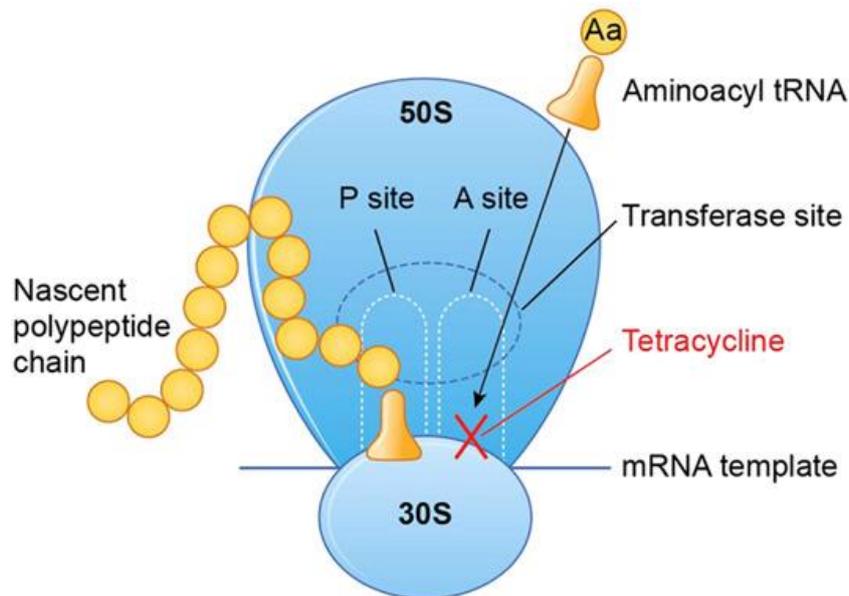


Figure 6 : mode d'action des tetracyclines

I.2.7 Association Triméthoprimé et sulfaméthoxazole

Le triméthoprimé est disponible en agent unique ou en association avec le sulfaméthoxazole (un antibiotique sulfamide). Ces médicaments agissent en synergie pour bloquer les étapes séquentielles du métabolisme de l'acide folique bactérien, Il appartient à la famille des diaminopyrimidines qui sont des antiactériens et des antiparasitaires. (Werth, 2020)

I.2.8 LES NITROFURANES

Les nitrofuranes comportant un groupe NO₂ fixé sur un noyau furane ont un effet bactériostatique sur des germes Gram négatif comme Escherichia coli. Les bactéries réduisent les groupes NO₂ d'une manière beaucoup plus rapide que les cellules de l'organisme et ce sont les métabolites réduits qui lèsent le DNA. Ceci explique que les nitrofuranes ont peu d'effets sur les cellules de l'hôte, Selon la structure chimique on distingue : Le Nifuroxazide et le Nitrifurzide. (KASSAH et al., 2020)

I.2.9 LES NITROIMIDAZOLES

Les nitroimidazoles sont actifs contre les germes anaérobies comme Clostridium, Fusobacterium, Streptococcus, Bacterioides, contre des parasites comme Trichomonas vaginalis, Giardia intestinalis, qui possèdent un équipement enzymatique capable de transformer les nitroimidazoles en dérivés réduits toxiques qui altèrent le DNA dont les brins

se dissocient. Le groupe nitré accepte des électrons des flavoprotéines et des ferredoxines présents dans ces microorganismes(**KASSAH et al., 2020**)

On distingue le Tinidazole et le Métronidazole.

I.2.10 ACIDE FUSIDIQUE

L'acide fusidique (Fucidine) est un antibiotique stéroïdien. Qui agit sur la synthèse des protéines. C'est un antibiotique antistaphylococcique majeur. Il est actif sur les staphylocoques Méciciline S. et Méciciline R.(**Gendrin, 2012**)

I.2.11 LES RIFAMYCINES

Les rifamycines sont constituées d'une macro cycle et d'un cycle aromatique. On distingue trois antibiotiques : La Rifamycine S, la Rifamide et la Rifampicine. Ils agissent en bloquant la transcription par inhibition de l'ARN polymérase.(**Werth, 2020**)

La Rifamycine SV et la Rifampicine sont bactéricides ; elles ont une excellente activité sur les germes à Gram positif (staphylococcus et entérocoques).

Tableau II. Les mécanismes d'action des antibiotiques

Famille d'antibiotiques	Mécanisme d'action	Référence
Les aminosides	<p>Le ribosome bactérien est la cible finale des AGA, plus précisément le site A situé sur l'ARN 16S de la sous-unité ribosomique bactérienne 30S, qui est le site de liaison d'un ARN de transfert (ARNt) apparenté (Figure 1).</p> <p>L'élucidation de cette machine macromoléculaire a été réalisée en étudiant le mode d'action des AGA et d'autres antibiotiques ciblant les ribosomes.</p> <p>Les molécules d'ARNr sont les principaux acteurs, interagissant avec les molécules d'ARN messenger (ARNm) et d'ARNt lors de la synthèse des protéines. L'étude des AGA a également permis de comprendre l'efficacité et la fidélité du processus de traduction, décodant l'ARNm en protéine. Les AGA ciblent le cycle d'allongement, entraînant une diminution de la fidélité du ribosome (Figure 1.a) ou une inhibition complète de la synthèse protéique (Figure 1.b).</p> <p>On pense que les protéines aberrantes produites interrompent la membrane cellulaire en créant des canaux membranaires, permettant ainsi aux AGA de pénétrer dans la paroi cellulaire. Cette absorption rapide des AGA conduit finalement à la létalité</p>	(Correia et al., 2019)
Les quinolones	<p>Les quinolones agissent par formation d'un complexe ternaire entre ADN et l'ADN gyrase (topoisomérases II) (gènes <i>gyr A</i> et <i>gyr B</i>) ou les topoisomérases IV (gènes <i>par C</i> et <i>par E</i>). Ces enzymes sont directement impliquées dans les mécanismes de dénouement et de superenroulement de l'ADN au cours de la réplication afin de faciliter l'action de l'ADN polymérase (Figure 2). L'activité antibactérienne Gram - passe surtout par l'inhibition des activités ADN gyrases tandis que l'activité anti-Gram+ semble passer par le blocage de la topoisomérase IV.</p>	(Marie, 2017)
Les bêta-lactamines	<p>«Les β-lactamines ont une action bactéricide et représentent 60% des antibiotiques utilisés en médecine humaine. Elles possèdent leur site actif à l'intérieur de leur noyau (noyau β-lactamine caractérisant cette classe d'antibiotique). La fixation des</p>	(Dauvergne, 2018)

	<p>β-lactamines aux protéines de liaison (PLP) permet l'inhibition de l'activité des transpeptidases et ainsi arrête la synthèse du peptidoglycane (constitutif de la paroi bactérienne), (Figure 3). Les β-lactamines comprennent plusieurs groupes : pénicillines (à spectre étroit, dégradées par les pénicillinases, à spectre moyen, à spectre large, à spectre étendu) céphalosporines (première à cinquième génération), monobactames, carbapénèmes, et inhibiteurs de β-lactamases»</p>	
Glycopeptides	<p>Il a été constaté que le traitement des bactéries à la vancomycine entraînait l'accumulation de précurseurs de la paroi cellulaire tels que l'UDP-MurNAc-pentapeptide dans le cytoplasme. Cela indique que ces antibiotiques glycopeptidiques inhibent le stade ultérieur de la biosynthèse de la paroi cellulaire.</p> <p>Les glycopeptides sont des inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne (Figure 4). Ils inhibent la transglycolysation en se liant au dipeptide terminal du peptidoglycane, en se chélatant à l'aminocyl-D-alanyl-D-alanine..</p>	<p>(Sarkar et Haldar, 2019) ; (Butler et al., 2014)</p>
Les macrolides	<p>Le mode d'action général des antibiotiques macrolides consiste à inhiber l'assemblage des protéines par liaison réversible à la grande sous-unité 50S du ribosome bactérien (Figure 5), en particulier à l'ARNr 23s. L'érythromycine agit pour empêcher à la fois l'assemblage ribosomique et l'extension de la chaîne peptidique en bloquant la sortie tunnel du ribosome.</p>	<p>(Liang et Han, 2013)</p>

<p>Les cyclines</p>	<p>Action bactériostatiques par fixation de haute affinité sur la sous unité 30S de l'ARNribosomal (pas loin de la partie 16S) mais réversible. Ils empêchent la fixation de l'ARNt sur le site A et ainsi inhibe l'élongation peptidique (Figure 6).</p> <p>« Les possibles interactions avec le site d'action se situent au niveau des hélices H34 et H31 des bases incluant la chélation d'ion magnésium, des liaisons hydrogènes, et des interactions aromatiques de type pi-stacking ».</p>	<p>(Buxeraud et Faure, 2016)</p> <p>Site web</p>
<p>Triméthoprim et sulfaméthoxazole</p>	<p>Le Triméthoprim agit dans le blocage enzymatique de la synthèse des folates, juste après les sulfamides. L'association "sulfamide triméthoprim" la plus utilisée est le cotrimoxazol Bactrim®. Les deux molécules bloquent la synthèse des folates à deux stades différents, ce qui renforce leurs activités antibactériennes.</p> <p>L'intérêt de cette association est que les mutants résistants aux deux composants apparaissent moins rapidement et l'association a un effet bactéricide.</p>	<p>(Eddens et al., 2021)</p>

I.3 Les résistances naturelles et acquises

La résistance aux antibiotiques est un phénomène naturel. Certaines bactéries sont résistantes à des antibiotiques de manière innée. On parle de résistance naturelle.

Celle-ci constitue également un marqueur d'identification de la bactérie. D'autres échappent, par des modifications génétiques, à l'action d'antibiotiques auxquels elles étaient jusqu'alors sensibles : on parle de résistance acquise. Elle constitue un marqueur épidémiologique. **(Veysièrè, 2020)**

Une résistance intrinsèque se définit comme une caractéristique fonctionnelle ou structurelle conférant une certaine tolérance, voir une insensibilité totale, à tous les membres d'un groupe de bactéries (une espèce, un genre ou parfois un groupe plus grand), vis-à-vis d'une molécule particulière ou vis-à-vis d'une classe d'antimicrobiens. **(Seydina, 2016)**

L'absence ou la réduction de sensibilité à un antibiotique peut être due à : (i) un manque d'affinité du composé pour la cible bactérienne (par exemple, la faible affinité de l'acide nalidixique pour la gyrase des entérocoques), (ii) une inaccessibilité de la molécule à la cellule bactérienne (impermeabilité de la membrane externe des bactéries gram négatives aux glycopeptides comme la vancomycine), (iii) une expulsion de l'antibiotique par des pompes à

efflux chromosomiques (résistance aux tétracyclines, au chloramphénicol et aux quinolones chez *Pseudomonas aeruginosa*, ou encore (iv) une inactivation enzymatique innée de l'antibiotique (la production d'une bêta-lactamase AmpC chez certains membres de la famille *Enterobacteriaceae*). (Muylaert et Mainil, 2013)

On parle de résistance acquise lorsqu'une ou plusieurs souches d'une espèce bactérienne naturellement sensible à un antibiotique y deviennent résistantes. La résistance acquise se caractérise donc par l'apparition subite d'une résistance à un ou plusieurs antibiotiques chez certaines bactéries qui étaient auparavant sensibles (Veysièrè, 2020). On décrit deux phénomènes majeurs à la base de l'acquisition de résistances par modifications du génome bactérien, à savoir, les mutations responsables des résistances endogènes, et l'acquisition horizontale de matériel génétique étranger responsable des résistances exogènes. En outre, certaines résistances résultent de l'association d'une mutation et d'un transfert horizontal de gène, comme par exemple les événements conduisant à l'élargissement du spectre des bêta-lactamases ou qui leur confèrent une résistance aux inhibiteurs de bêta-lactamases. (Seydina, 2016)

I.4 Les mécanismes de résistances aux antibiotiques

Les bactéries ont développé différents mécanismes afin de neutraliser l'action des agents antibactériens, les plus répandus étant l'inactivation enzymatique de l'antibiotique, la modification ou le remplacement de la cible de l'antimicrobien, l'efflux actif ou encore la pénétration réduite de la molécule (Figure 6). « D'autres mécanismes tels que la protection ou la surproduction de la cible de l'antibiotique sont également décrits. Ils sont, cependant, plus rares et surtout associés à certaines classes de composés (Guardabassi et Courvalin, 2006). La figure 07 présente une illustration de ces différents mécanismes de résistance au sein des bactéries Gram négatives. (Muylaert et Mainil, 2013)»

I.4.1 Inactivation enzymatique de l'antibiotique

« L'inactivation enzymatique de l'antibiotique représente le principal mécanisme de résistance des bêta-lactames, des aminoglycosides et des phénicolés (Veysièrè, 2020). On décrit également ce type de résistance pour le groupe MLS (macrolides, lincosamides, streptogramines), pour les tétracyclines, pour la fosfomycine et plus récemment pour les fluoroquinolones. L'enzyme en modifiant le noyau actif de l'antibiotique par clivage ou par addition d'un groupement chimique, empêche la fixation de l'antimicrobien sur sa cible et provoque une perte d'activité». (Muylaert et Mainil, 2013)

I.4.2 Modification ou remplacement de la cible de l'antibiotique

« Pour parer à l'action de l'antibiotique, les cibles de ce dernier peuvent être modifiées ou remplacées de telle manière que l'antibiotique ne puisse plus les reconnaître, donc ne s'y fixe plus ; ainsi la bactérie acquiert souvent une résistance qui s'étend à tous les antibiotiques de cette famille.» (Seydina, 2016)

I.4.3 Pompes à efflux

L'efflux actif, médié par des protéines transmembranaires connues sous le terme de pompes à efflux ou transporteurs actifs, est un mécanisme nécessitant de l'énergie et utilisé par les bactéries, par les cellules eucaryotes dont notamment les protozoaires, pour expulser à l'extérieur des métabolites et des composés toxiques étrangers tels que des antibiotiques et d'autres médicaments. (Muylaert et Mainil, 2013).

Les bactéries sont capables d'éliminer les antibiotiques par pompage actif hors de la cellule, qui efflue les composés toxiques au dehors. C'est l'un des mécanismes de résistance de *Pseudomonas aeruginosa*, pathogène opportuniste responsable de nombreuses infections nosocomiales. (Veysièrè, 2020)

I.4.4 Perméabilité réduite

Contrairement aux bactéries Gram positives, dont la structure enveloppante est assez simple, composée d'une paroi externe épaisse de peptidoglycane que les antibiotiques traversent par simple diffusion, les bactéries Gram négatives jouissent quant à elles d'une enveloppe plus complexe et plus difficilement franchissable. (Emilie Cardot Martin et Oana Dumitrescu, 2019)

Ainsi, au sein des bactéries Gram négatives, les antibiotiques hydrophiles pénètrent dans la bactérie via des protéines transmembranaires nommées porines, alors que les molécules hydrophobes diffusent simplement à travers la couche phospholipidique. La membrane externe de certaines bactéries telles que *P. aeruginosa* est moins perméable que celle d'autres espèces, ce qui lui confère un niveau moins élevé de sensibilité aux antimicrobiens. (Muylaert et Mainil, 2013).

I.4.5 Protection de la cible de l'antibiotique

La protection de la cible de l'antibiotique est un mode de résistance bien connu pour la famille des tétracyclines et plus récemment décrit pour les quinolones et les fluoroquinolones. Ce mécanisme a été rapporté parmi différentes bactéries les Gram négatives à travers le monde, et des analogues de gènes ont également été décrits chez des bactéries Gram positives.

Les protéines qnr en se fixant sur les topoisomérases, cibles des fluoroquinolones, réduisent l'affinité de la famille d'antibiotiques pour leurs cibles (**Emilie Cardot Martin et Oana Dumitrescu, 2019**)

I.4.6 Piégeage de l'antibiotique

Les bactéries sont capables de piéger un antibiotique en augmentant la production de sa cible ou en produisant une autre molécule possédant une affinité pour ce dernier. Il en résulte une diminution de l'antibiotique à l'état libre au niveau de la cible. Ainsi des mutations chromosomiques responsables d'une surproduction des cibles des sulfamidés et dutriméthoprine ont été décrites chez de nombreuses espèces bactériennes. Ce mécanisme est également impliqué dans des bas niveaux de résistance aux glycopeptides chez certaines souches de *S. aureus*, et à la tobramycine chez *E. coli* (**Muylaert et Mainil, 2013**).

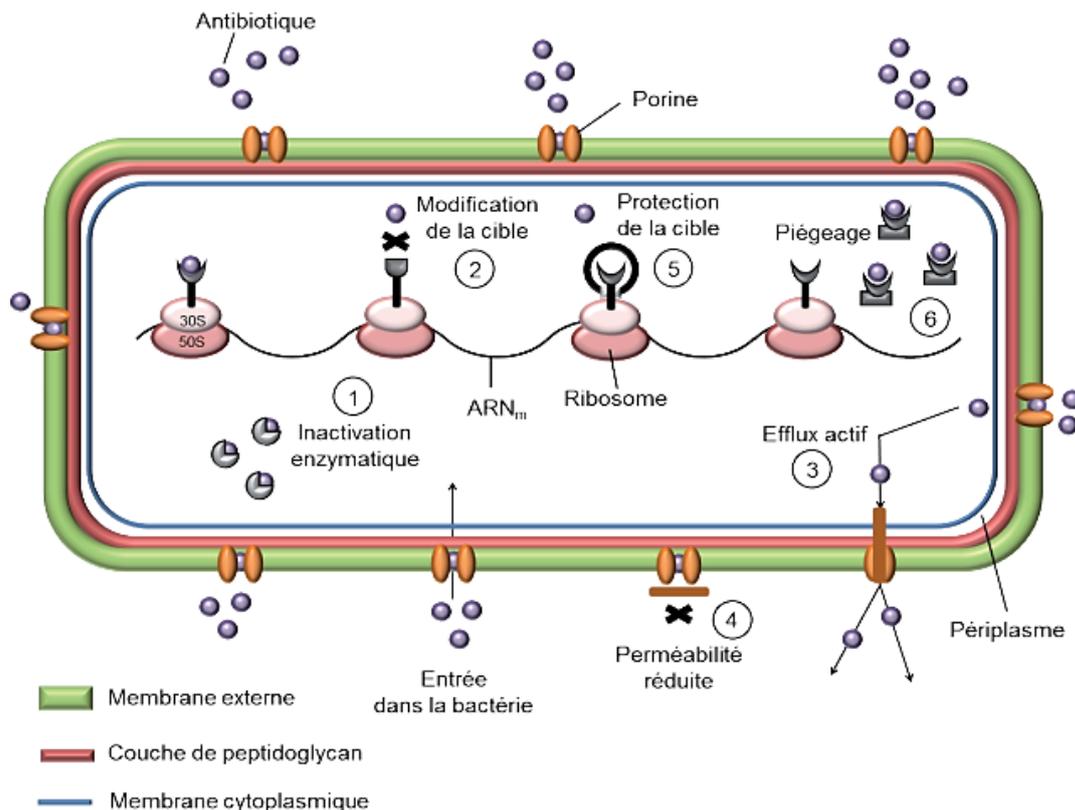


Figure 7 : différents mécanismes de résistance aux antibiotiques dans une bactérie gram négative, adapté de guardabassi et Courvalin (2006) **1** : inactivation enzymatique de l'antibiotique, **2** : modification de la cible de l'antibiotique, **3** : efflux actif de l'antibiotique, **4** : perméabilité réduite, **5** : protection de la cible de l'antibiotique, **6** : piégeage de l'antibiotique.

I.5 Le problème d'antibiorésistance en santé public

I.5.1 Conséquences de l'antibiorésistance bactérienne

« Il est actuellement estimé que la résistance bactérienne aux antibiotiques cause 700000 morts chaque année dans le monde. Ce nombre pourrait s'élever à 10 millions en 2050 si aucune action n'est mise en œuvre (O'Neill et al, 2016). La résistance bactérienne engendre aussi un coût financier, La découverte de nouveaux antibiotiques ne compense pas l'émergence de résistances (Butaye et al, 2015) ce qui aboutit, à long terme, à des impasses thérapeutiques. En santé animale, la législation européenne interdit tout usage d'antibiotiques depuis le 1er janvier 2006 comme facteurs de croissance chez les animaux de rente (terrestres ou aquacoles.(Dauvergne, 2018)»

II. La résistance des bactéries aux antibiotiques dans l'environnement

L'utilisation des antibiotiques, à la fois en médecine humaine et vétérinaire, exerce une pression de sélection parmi les bactéries commensales ou pathogènes de l'homme ou de l'animal qui peuvent rejoindre l'environnement naturel par exemple dans les eaux continentales, côtières ou le sol, via les effluents d'élevages ou les eaux usées provenant d'activités humaines ou animales. Cela pourrait conduire à l'émergence et à la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques dans les communautés microbiennes de l'environnement(Pazda et al., 2019). En ce qui concerne le milieu hydrique la compréhension de l'évolution spatiale et/ou temporelle des profils d'antibiorésistance chez les bactéries aquatiques (bactéries indicatrices de contamination fécale et bactéries de l'environnement) est particulièrement intéressante étant donné l'usage qui peut être fait de l'eau par l'homme (boisson, usage alimentaire ou soins) (Mania et al., 2018). Les prérequis à un tel événement reposent d'une part sur la capacité des organismes autochtones à acquérir des gènes de résistance d'organismes saprophytes ou pathogènes introduits dans l'environnement, d'autre part, sur leur capacité ultérieure à jouer le rôle d'intermédiaires dans le maintien, la propagation et l'évolution des gènes de résistance jusqu'à ce que l'opportunité d'un transfert se présente. (Pazda et al., 2019)

II.1.1 Facteurs influençant la propagation de l'antibiorésistance dans l'environnement

Le début du XX^e siècle a été marqué par la découverte et surtout la production en masse d'antibiotiques naturels (extraits de microorganismes producteurs de ces molécules) ou obtenus

par synthèse chimique. Parmi les antibiotiques naturels, on peut citer les bêta-lactamines (notamment la pénicilline), les aminoglycosides, les tétracyclines, et les macrolides. La plupart de ces molécules naturelles ont été modifiées chimiquement pour devenir des antibiotiques semi-synthétiques, puis plus récemment synthétiques. (MAURIN, 2018) Les sulfamides et les quinolones sont des molécules synthétisées d'emblée par l'homme. A partir des années 1940, l'utilisation des antibiotiques chez l'homme et les animaux a augmenté de façon exponentielle, correspondant au relargage de millions de tonnes d'antibiotiques dans l'environnement. Trois sources principales de pollution de l'environnement par les antibiotiques existent :

- les usines de production industrielle des antibiotiques qui dispersent une partie de cette production dans leur environnement aquatique ;
- les élevages d'animaux domestiques traités par des antibiotiques ;
- les humains qui reçoivent des antibiotiques.

II.1.2 Transfert de l'antibiorésistance dans l'environnement

Aujourd'hui, on considère que le transfert des gènes de résistance entre bactéries se produit dans toute la biosphère et plus spécialement dans les sites riches en nutriments comme les systèmes aqueux, le sol, les sédiments.

II.1.3 Transfert dans l'eau

Plusieurs approches ont été tentées pour étudier le transfert de gènes dans l'environnement aquatique. La détermination de la résistance bactérienne aux antibiotiques dans des eaux recevant des effluents d'eaux usées d'une part et la capacité de transfert *in vitro* de déterminants de la résistance entre bactéries d'autre part ont été tout d'abord examinées dès les années 1999 (Laure, 1999). Des études *in situ* ont permis de mettre en évidence le transfert plasmidique de gènes de résistance dans des chambres de diffusion immergées dans des eaux naturelles. (Pazda et al., 2019)

Diffusion de gènes de résistance aux antibiotiques dans l'environnement

Pour que les bactéries piègent les ARG, le mécanisme le plus important est le HGT. Il peut se produire par l'un des trois processus suivants :

- ✚ Conjugaison
- ✚ Transduction
- ✚ Transformation

1. **La conjugaison** : est l'échange de matériel génétique par connexion de cellule à cellule via la formation de pilus (**Figure 8**). Il a été découvert pour la première fois dans les années 1950 et il a été prouvé qu'il était présent dans l'eau, le sol, les sédiments d'eau de mer, les boues activées et les eaux usées. Il y a eu des rapports de transfert d'ADN parmi une vaste gamme d'hôtes, même à des eucaryotes (Davison, 1999). Le matériel génétique important qui est couramment transféré comprend des éléments conjugatifs intégratifs et des plasmides. (Saima et al., 2020)

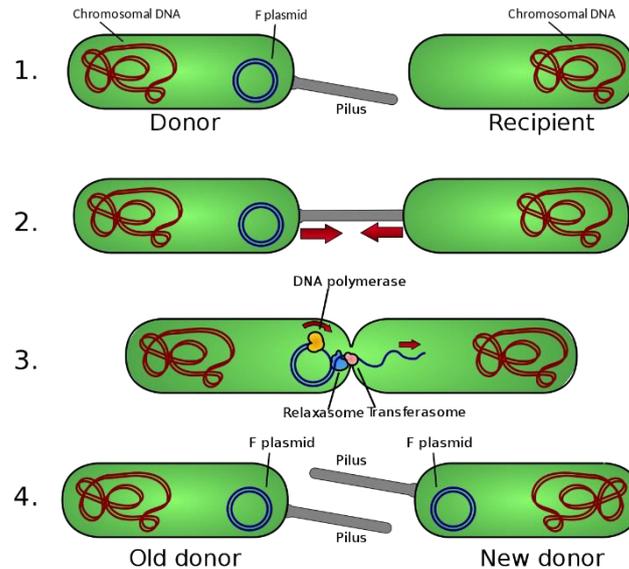


Figure 8 : La conjugaison

2. **Intégrons** : Les intégrons sont des éléments génétiques mobiles qui fournissent une plate-forme pour la capture et l'expression de cassettes de gènes contenant des ARG. Leur caractéristique de base est un gène, *intI*, qui code pour une enzyme appelée tyrosine recombinase, qui excise et intègre les gènes dans la cassette. Les intégrons peuvent être mobiles ou chromosomiques. Les intégrons mobiles peuvent être transférés à d'autres bactéries via des plasmides. Des études ont rapporté la présence d'intégrons dans divers milieux aquatiques, montrant leur ubiquité dans le milieu naturel. (Saima et al., 2020)
3. **Transduction** : La transduction est le transfert de matériel génétique à des bactéries par l'intermédiaire de bactériophages (**Figure 9**). Il est plus facile pour les particules de phage de survivre à la dégradation de l'environnement que l'ADN nu, et aussi en raison de leur petite taille, elles sont bien adaptées à la dissémination de l'ADN. (Saima et al., 2020)

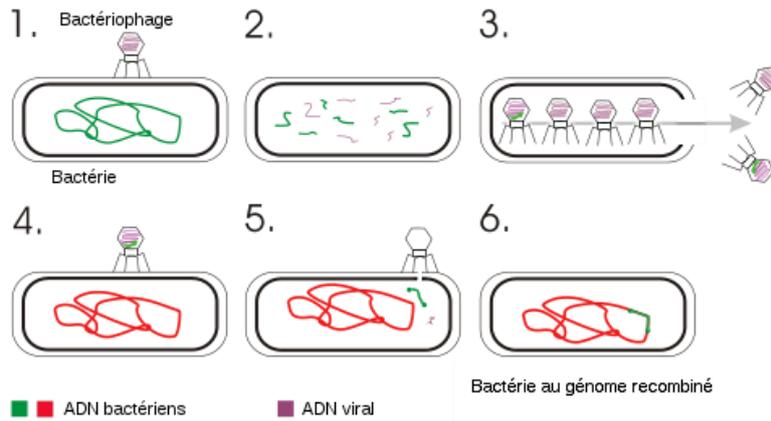


Figure 9 : La transduction

4. **Transformation** La transformation se produit lorsqu'une bactérie absorbe du matériel génétique de l'environnement libéré par une autre bactérie après sa mort (**Figure 10**). Des études ont prouvé que la transformation naturelle se produit dans l'eau de mer, les cours d'eau, les eaux souterraines et le sol. La transformation a été considérée comme une raison de la propagation des gènes résistants à la pénicilline. (**Saima et al., 2020**)

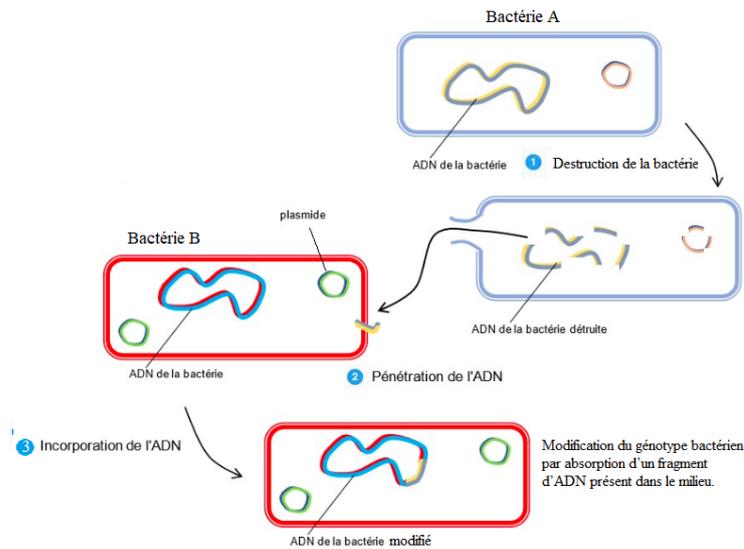


Figure 10 : Transformations génétiques

III. Méthodes d'étude de l'antibiorésistance dans l'environnement

III.1 Détection de bactéries résistantes aux antibiotiques par culture

Ces méthodes de recherche reposent sur la culture d'échantillons et l'isolement de colonies généralement considérées comme des souches pures ou des clones. En ajoutant l'ATB d'intérêt au milieu d'isolement, les ARB (bactéries résistantes aux antibiotiques) seront cultivées de manière sélective. Ce milieu peut être universel (Luria-Broth, Mueller Hinton, Trypticase soja,

etc.) pour le traitement de la flore totale cultivable ou spécifique d'un sous-groupe bactérien donné, comme MacConkey ou Drigalski, pour la détection des Bactériacées intestinales. ATB (s) est ajouté à une concentration qui permet la sélection de souches résistantes (**Riber et al., 2014; Salloto et al., 2012**) Ou la co-résistance, par exemple, en utilisant un milieu contenant de l'ATB et des métaux lourds. L'étude de la résistance environnementale aux antibiotiques peut être basée sur l'utilisation de milieux couramment utilisés en biologie clinique pour détecter directement le phénotype de résistance aux médicaments dans des échantillons humains. Par exemple, les milieux ChromID BLSE®, CarbaSMART® et ChromID VRE® (Biomérieux) peuvent détecter directement les bactéries Gram-négatives, produisant respectivement des BLSE, des carbapénémases et des entérocoques résistants à la vancomycine. Une fois les souches isolées, elles peuvent être entièrement caractérisées d'un point de vue taxonomique et fonctionnel, y compris leurs mécanismes de résistance..(**Almakki, 2017**)

Si on s'intéresse aux bactéries pathogènes de l'homme, ces techniques donnent de bonnes indications sur le risque sanitaire lié à l'environnement.(**Almakki, 2017**)

III.2 Détection des gènes de résistance (ARGs) aux ATBs par approches moléculaires

Plusieurs méthodes moléculaires utilisées pour détecter et caractériser l'ARG sont basées sur des méthodes d'amplification génique par réaction en chaîne par polymérase (PCR). Les méthodes PCR ou dérivées de la PCR sont largement utilisées pour détecter les gènes de résistance ou les gènes liés à la résistance dans les communautés microbiennes environnementales. La PCR permet également la détection d'éléments génétiques mobiles (MGE), tels que les transposons, les intégrons mobiles, ou leurs cassettes et plasmides, pour détecter les mécanismes génétiques impliqués dans la propagation de ces gènes de résistance.(**Yang et al., 2014**)

La variante la plus largement utilisée de la PCR pour les tests environnementaux est la PCR quantitative en temps réel (qPCR), qui est non seulement plus sensible que la PCR traditionnelle, mais peut également quantifier le nombre de copies d'ADN cible présentes dans un échantillon. L'analyse quantitative des gènes de résistance en milieu aquatique permet d'étudier l'impact de certains facteurs environnementaux ou procédés de traitement sur la dynamique des gènes de résistance (**Harnisz et al., 2015**). La qPCR peut également être mise en œuvre pour rechercher et quantifier les MGEs. Cette approche permet de quantifier les MGEs sans culture préalable évaluant ainsi la capacité de transfert horizontal de gènes de résistance (**Ouyang et al., 2015**).

Les techniques d'hybridation de l'ADN ont été modifiées pour permettre l'identification de gènes spécifiques (par exemple gènes de résistances) à partir d'échantillons divers. Les puces à ADN sont les principaux outils actuels basés sur l'hybridation. Certaines puces ont été conçues pour du génotypage au sein de communautés (PhyloChip), permettant l'étude de la biodiversité de la communauté étudiée. Cependant, l'utilisation des puces à ADN pour l'étude d'échantillons environnementaux est souvent limitée en raison de sa faible sensibilité et en raison de la complexité des échantillons environnementaux (Almakki, 2017)

III.3 Approche métagénomique globale des communautés et de l'antibiorésistance

La métagénomique globale permet le séquençage de tous les gènes présents dans une communauté sans a priori sur les gènes recherchés. Elle permet aussi un accès aux gènes eucaryotes et viraux. La métagénomique globale est aussi appelée génomique environnementale, génomique communautaire ou ecogénomique microbienne (Joly et al., 2015).

La composition des communautés microbiennes a été étudiée par métagénomique dans différents environnements tels que des environnements marins, des communautés bactériennes du sol, les sédiments, ou des communautés bactériennes d'eau douce (Meziti et al., 2016). Ces approches sont souvent complémentaires de la métagénomique ciblée qui fournit uniquement le répertoire des espèces présentes. Elles apportent des informations fonctionnelles par l'analyse *in silico* de tous les gènes de la communauté. Dans le contexte de l'analyse des eaux naturelles, la métagénomique globale apporte aussi des informations sur les sources de contamination (Meziti et al., 2016), et sur la résistance dans la communauté.

Par ailleurs, la source de contamination par des gènes de résistance peut être déterminée par métagénomique. Par exemple, cette technologie a permis de déterminer le résistome, c'est à dire la diversité et l'abondance des gènes de résistance aux antibiotiques et des éléments génétiques mobiles (plasmides mobilisables, intégrons de classes I et II et transposons) dans divers environnements. Par exemple, les effluents des fermes laitières et d'usines de traitement des eaux usées ont été comparées à la source et au fleuve récepteur de ces effluents (Rowe et al., 2016)

L'analyse directe des séquences permet d'identifier des gènes de résistance déjà connus déposés dans des banques de données généralistes ou spécialisées. Une annotation précise peut aussi permettre de relier un gène inconnu à une fonction grâce à des signatures fonctionnelles

communes. Il existe des bases de données spécialisées pour la résistance aux ATBs. CARD, Comprehensive Antibiotic Resistance Database (Jia et al., 2017; McArthur et al., 2013) centralise les annotations des bases de données concernant l'antibiorésistance et permet d'évaluer la probabilité de transfert horizontal, ou si le gène est responsable d'une résistance intrinsèque ou adaptative. Une autre plateforme, RESCon (resistance readiness condition), affecte des catégories de risque en termes de santé publique selon le gène détecté (Martínez et al., 2015).

L'approche de métagénomique fonctionnelle peut également être développée pour explorer les fonctions présentes dans un environnement donné. Cette technique implique le clonage des ADNs métagénomiques dans des plasmides, la transformation de bactéries avec ces plasmides et recherche des phénotypes de résistance conférés. Cette approche est lourde et couteuse mais elle permet la découverte de mécanismes de résistance inédits. Une représentation schématique de la métagénomique fonctionnelle appliquée à l'antibiorésistance est donnée en (Figure8)(Almakki, 2017)

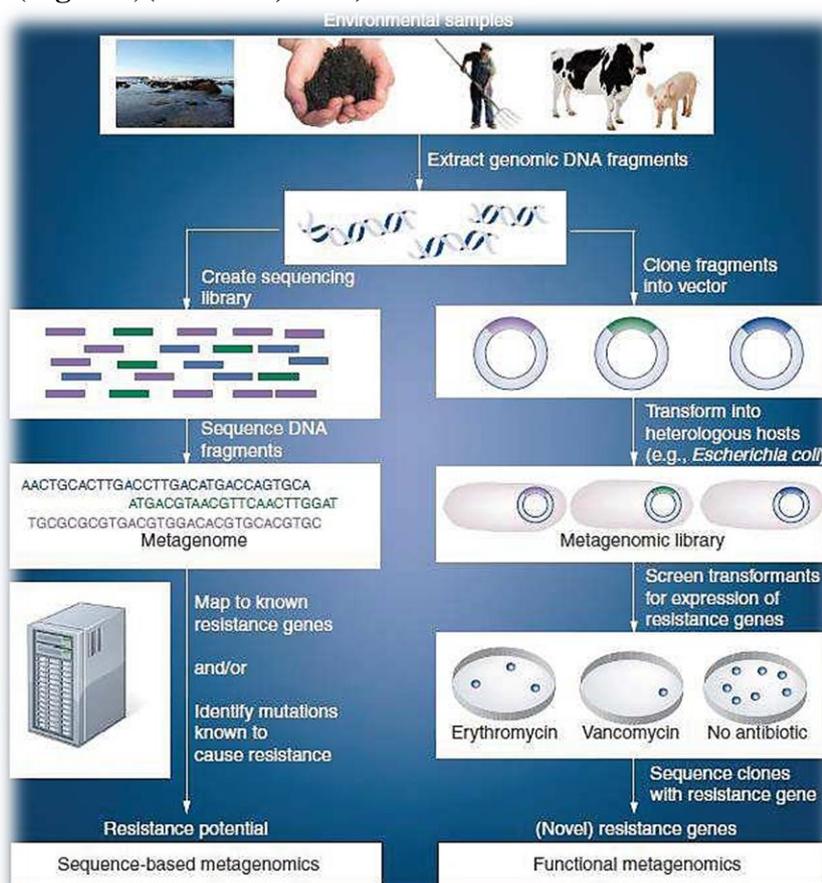


Figure 11 : Métagénomique fonctionnelle appliquée à l'antibiorésistance ; figure de (Schmieder et Edwards, 2012)



Matériel et méthodes

I. Matériel et méthodes

Cette étude a été réalisée au niveau de la plateforme génomique - bio-informatique de l'institut Pasteur Algérie durant la période allant du 02/05/2021 au 31/07/2021.

Notre étude a pour but de détecter les gènes de résistance chez les bactéries isolées à partir d'eaux usées traitées rejetées à la mer (Ain Benian).

I.1 Matériel

I.1.1 Matériel biologiques

Les souches bactériennes incluses dans notre étude appartiennent à la souchothèque du laboratoire. Ces dernières ont été isolées à partir des eaux usées traitées rejetées à la mer au niveau de la station d'épuration de Ain Benian d'Alger ouest et conservées dans du glycérol 50% à -20 °C.

Les gènes de résistance recherchés sont illustrés dans **Annexe 1**.

I.1.2 Matériel non biologiques

Le matériel et les appareils utilisés dans les différentes expérimentations sont cités dans le **Annexe 2**.

I.2 Méthodes

I.2.1 Revivification des souches bactériennes

Quatre-vingt-treize souches bactériennes conservées, préalablement isolées et purifiées, ont été ensemencées et repiquées sur des boîtes de Pétri contenant différents milieux gélosés à savoir : gélose nutritive, Hecktoen, Chapman et la gélose Columbia au sang.

I.2.2 Caractérisation phénotypiques des souches

Afin de faire une caractérisation préliminaire des souches revivifiées, les tests suivants ont été réalisés :

- **Test à l'hydroxyde de potassium, KOH à 3%**

Nous avons remplacé l'utilisation de la coloration de Gram classique par un test plus rapide. Il s'agit du test à l'hydroxyde de potassium. (**Sagar Aryal, 2019**)

Le test KOH repose sur la résistance différentielle à 3% d'hydroxyde de potassium entre les cellules Gram positives et négatives, où une partie d'une colonie est mélangée avec un petit volume de 3% KOH. Les parois cellulaires à Gram négatif sont décomposées par 3% de KOH et libèrent à leur tour un matériau chromosomique viscoïde qui rend la suspension épaisse et filandreuse.

Le test est réalisé comme suit :

Deux gouttes d'une solution d'hydroxyde de potassium (KOH 3%), sont mises en contact avec une colonie bactérienne sur une lame. À l'aide d'une pipette Pasteur, On effectue un mouvement circulaire. Quelques secondes plus tard, on tire le mélange vers le haut. Si un filament se forme entre la pipette et la lame, la colonie isolée est alors constituée de bactéries Gram négatives ; si rien n'est entraîné par la pipette, on a affaire à des bactéries Gram positives.

- **Test de la catalase**

La catalase est une enzyme qui dégrade le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et oxygène selon la réaction suivante :



Ce test a été réalisé par l'incorporation d'un fragment de colonie (culture pure) dans une goutte d'eau oxygénée préalablement déposée sur une lame. Le dégagement immédiat de bulles de gaz indique un test positif

- **Test de l'oxydase**

Le test de l'oxydase est un test de détection de l'enzyme cytochrome oxydase chez les bactéries Gram négative qui produisent cette enzyme.

- A l'aide de pinces, placer un disque d'oxydase sur une lame porte objet.
- Choisir une colonie bien isolée et représentative de la culture fraîche à tester.
- Prélever la colonie choisie à l'aide d'un bâtonnet ou d'une öse.
- Frotter doucement la colonie sur le disque et observer l'apparition d'une coloration violette dans un délai de 30 secondes.

I.2.3 Détermination de profils de résistance aux antibiotiques

La méthode utilisée est la technique de la diffusion des disques d'antibiotique, sur un milieu gélosé. L'antibiogramme en milieu solide est une méthode basée sur le principe de diffusion de l'antibiotique en milieu gélosé à partir d'un disque imprégné avec une concentration définie de cet antibiotique. Il a été principalement développé en bactériologie médicale et permet de déterminer à quels antibiotiques une souche bactérienne isolée chez un patient est sensible. Cette méthode peut également être utilisée pour établir un profil de résistance à divers antibiotiques des souches isolées de l'environnement.

Les antibiogrammes des souches ont été réalisés sur le milieu gélosé Muller-Hinton suivant la technique recommandée par la standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale 8^{ème} édition parue en 2020.

Les antibiotiques utilisés, ainsi que la famille et les groupes d'appartenance sont résumés dans le **Tableau III**. La disposition des disques d'antibiotiques selon chaque groupe de bactéries est illustrée dans les **Figures 12, 13, 14 et 15**.

Mode opératoire

+ Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.

+ Ensemencement

Bien décharger l'anse ou l'écouvillon dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9 %.

Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0.5 McFarland ou une densité optique (DO) de 0.08 à 0.10 lue à une longueur d'onde de 625 nm.

+ Application des disques d'antibiotiques

Les disques des antibiotiques ont été déposés par le distributeur BIORAD® sur la surface de la gélose

+ Conditions d'incubations

Incubation 18 à 24 h à 37 C°

+ Lecture

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.
- Comparer les résultats obtenus aux valeurs critiques,
- Classer les bactéries dans l'une des catégories Résistant (R), Sensible (S) ou Intermédiaire (I)

Tableau III. Familles et valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibitions des antibiotiques testés

Famille des antibiotiques	Antibiotiques testés	Signe	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)			
				R	I	S	
Beta lactamines	Pénicillines	Amoxicilline	AMX	10ug	13	14-16	17
		Amoxicilline+ Ac clavulanique	AMC	20-10ug	13	14-17	18
		Pénicillines	PEN	10ug	28	-----	29
		Oxacilline	OX	-----	-----	-----	-----
	Céphalosporines	Céfotaxime 3ème G	CTX	30ug	22	23-25	26
		Céfoxitine 2ème G	FOX	30ug	14	15-17	18
		Céftazidime 3ème G	CAZ	30ug	14	15-17	18
		Cefoprime 4ème G	PEP	30ug	-----	-----	-----
	Monobactame	Aztréonam	ATM	30ug	15	16-21	22
	Carbapénèmes	Méropénème	MEM	10ug	19	20-22	23
Carboxypénicillines	Ticarcilline	TIC	75 ug	15	16-23	24	
Aminosides	Gentamicines	GMN	10ug	12	13-14	15	
	Tobramycine	TMN	10ug	12	13-14	15	
Quinolones	Ciprofloxacine	CIP	5ug	18	19-24	25	
	Acide nalidixique	NAL	30ug	13	14-18	19	
Sulfamides	Triméthopri- sulfaméthanzole	SXT	23ug	10	11-15	16	
Acide fosfoniques	Fosfomycine	FSF	200ug	12	13-15	16	
Polymexines	Colistine	COL	10ug	-----	-----	-----	
Rifamycines	Rifampicine	RIF	5ug	16	17-19	20	
Cyclines	Doxycycline	DOX	30ug	14	15-18	19	
	Tétracycline	TET	30ug	14	15-18	19	
Phénicolés	Chloramphénicol	CHL	30ug	12	13-17	18	
Macrolides	Erythromycine	ERY	15ug	13	14-22	23	
Glycopeptides	Vancomycine	VAN	30ug	-----	-----	-----	

- Application et disposition des disques d'antibiotiques

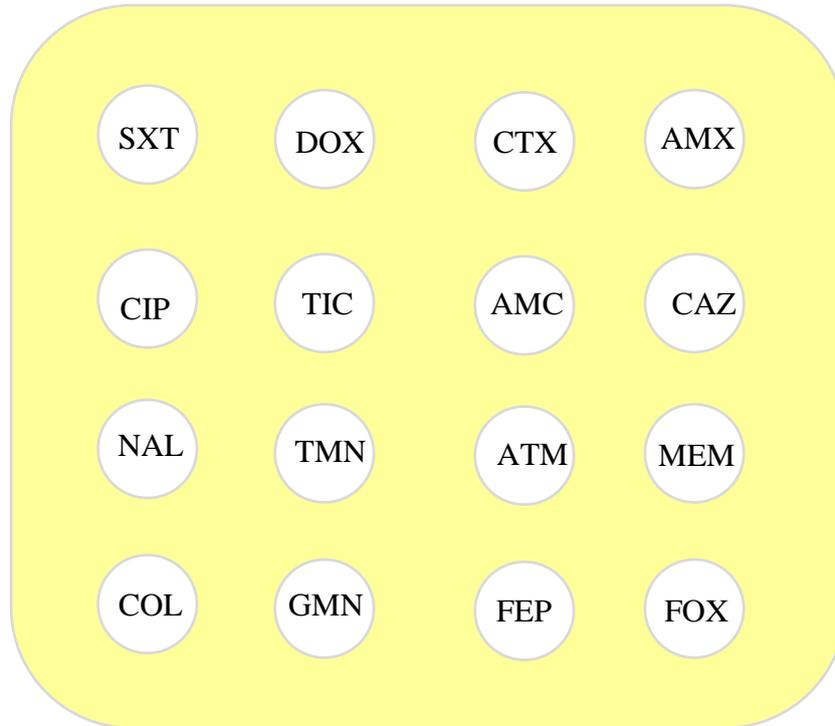


Figure 12 : Disposition des antibiotiques sur la gélose Mueller Hinton pour les entérobactéries

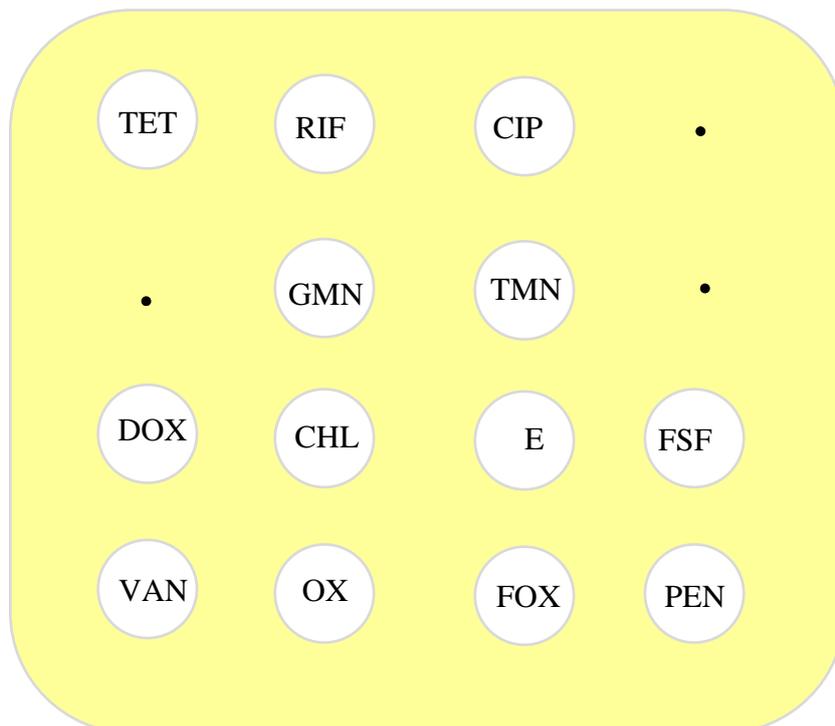


Figure 13 : Disposition des antibiotiques sur la gélose Mueller Hinton pour les *Staphylococcus* spp.

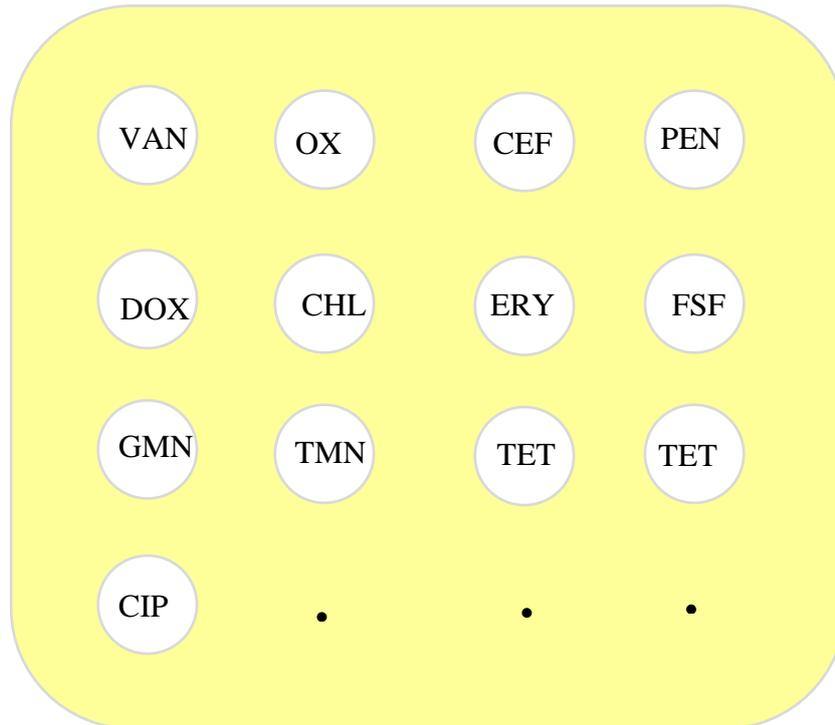


Figure 14 : Disposition des antibiotiques sur la gélose Mueller Hinton pour les Gram positives

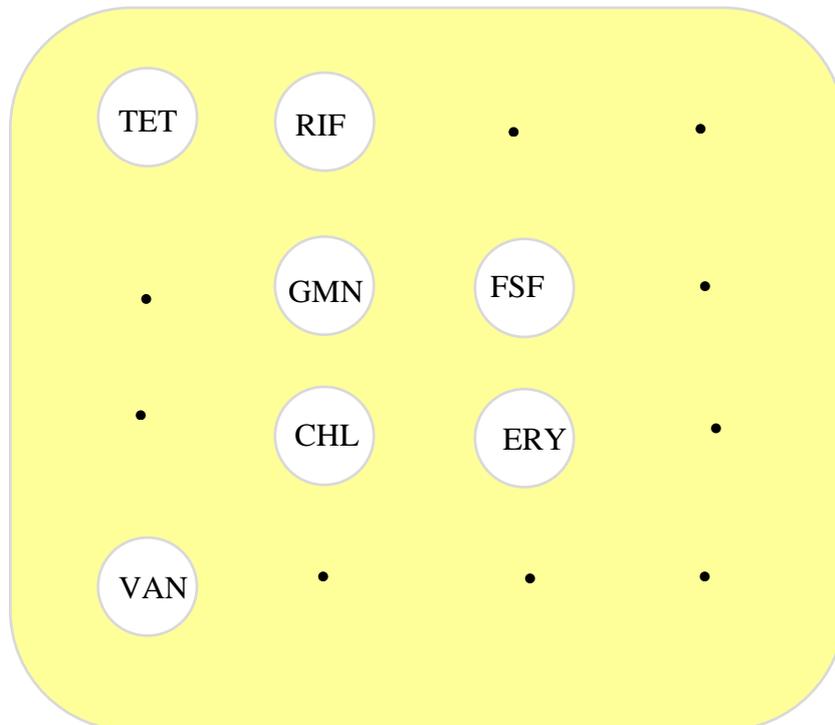


Figure 15 : Disposition des antibiotiques sur la gélose Mueller Hinton pour les *Enterococcus* spp.

I.2.4 Caractérisation par PCR et détection des gènes de résistance aux bêta-lactamines, Polymyxines, Tétracyclines, Sulfonamides et aux Lincosamides

Nous avons procédé à la recherche des gènes de résistance aux antibiotiques illustrés en **Tableau IV** en utilisant une approche moléculaire.

Tableau IV. Les séquences d'amorces utilisées pour la détection des gènes de résistance par PCR

	Gène	Séquences d'amorces	T _m (C°)	Taille Fragment (Pb)
Carbapénèmases	<i>oxa 23-F</i>	GATCGGATTGGAGAACCAGA	53	501
	<i>oxa 23-R</i>	ATTTCTGACCGCATTTCCAT		
	<i>oxa 24-F</i>	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	54	246
	<i>oxa 24-R</i>	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT		
	<i>oxa 48-R</i>	TTGGTGGCATCGATTATCGG	56	744
	<i>oxa 48-R</i>	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC		
	<i>oxa 58-F</i>	GTGCTGAGCATAGTATGAGTCGAGCA	70	599
	<i>oxa 58-R</i>	GCCACCACTTGCCCATCTGCCT		
	<i>ndm-F</i>	CATTTGCGGGTTTTTAATG	55	1297
	<i>ndm-R</i>	CTGGGTCGAGGTCAGGATAG		
Beta lactamases	<i>shv-F</i>	TTTATGGCGTTACCTTTGACC	55	1051
	<i>shv-R</i>	ATTTGTGCGCTTCTTTACTCGCCG		
	ALL <i>tem-F</i>	ATGAGTATTCAACAACATTTCCGTG	56	840
	ALL <i>tem-R</i>	TTACCAATGCCTAATCAGTGAG		
Céphalosporinases	<i>ctx M-1-R</i>	GAGCGCTTTTGCCGTCTAAG	57	924
Tétracyclines	<i>tet X-F</i>	TTCTTACCTTGACATCCCG	55	278
	<i>tet X-R</i>	AGCCTTACCAATGGGTGTAAA		
	<i>tet(A)-F</i>	GCTACATCCTGCTTGCCTTC	57	210
	<i>tet(A)-R</i>	CATAGATCGCCGTGAAGAGG		
Erythromycine	<i>erm(B)-F</i>	GAATCGAGACTTGAGTGTGC	53	364
	<i>erm(B)-R</i>	GATACCGTTTTACGAAATTGG		
Polymyxines	<i>mcr 1-F</i>	GCAGCATACTTCTGTGTGGTAC	61	554
	<i>mcr 1-R</i>	TATGCACGCGAAAGAACTGGC		
Sulfamide	<i>sul 1-F</i>	CCGTTGGCCTTCTGTAAAAG	54	67
	<i>sul 1-R</i>	TTGCCGATCGCGTGAAGT		
Methicilline	<i>mec (A)-F</i>	ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT	55	163
	<i>mec (A)-R</i>	TACGCGATATCTAACTTTCCTA		

Les gènes choisis dans cette étude ont été sélectionnés en fonction de leur importance en santé publique selon la liste de l'OMS répertoriant les classes d'antibiotiques critiques en santé humaine mais aussi selon la disponibilité des amorces au niveau du laboratoire.

L'approche moléculaire a été réalisée en suivant les étapes suivantes:

A. Extraction de l'ADN génomique des souches bactériennes étudiées

Deux méthodes ont été adoptées afin d'extraire l'ADN des bactéries, le « boiling extract » pour les bactéries Gram négatif et l'extraction « Tent » pour les bactéries Gram positif.

- **Technique de Boiling**

L'extraction d'ADN génomique a été réalisée par « boiling extract », une technique d'extraction rapide d'ADN total par chauffage à 100 °C pendant 15 min d'une suspension de colonies bactériennes dans 100 µl d'eau stérile. Après centrifugation, l'ADN contenu dans le surnageant a pu être utilisé directement. **(Digabel, 2013)**

- **Extraction Tent (pour les bactéries à Gram positif)**

Pour les bactéries Gram positifs, le tampon TENT (Tris-EDTA-NaCl-TritonX100) a été utilisé pour l'extraction d'ADN. Il s'agit d'une technique rapide décrite par **Hassanzadeh et al., 2016**.

Les protocoles détaillés des deux techniques d'extraction sont indiqués en **Annexe 3**.

B. Dosage d'ADN et contrôle de pureté

La quantification de l'ADN a été faite à l'aide d'un appareil spectrophotométrique (Nanodrop) ce qui permet de connaître la quantité et la pureté d'ADN recueillie lors de l'extraction. L'appareil permet de réaliser un dosage spectrophotométrique en utilisant une petite quantité de l'échantillon (1 à 2 µl).

Avant de commencer les mesures, un blanc est réalisé avec de l'eau distillée. Par la suite, 1 µL de chaque échantillon est déposé sur la cellule de l'appareil. Un système d'aimant permet de former une colonne de liquide entre les deux surfaces de lecture permettant la mesure du spectre. Toutes les mesures effectuées sont enregistrées en temps réel par un ordinateur.

L'absorbance de l'acide nucléique est à 260 nm, ceux des protéines à 280 nm et les composés organiques comme le phénol absorbent à 230nm. Ainsi, les rapports 260 nm/280 nm et 260 nm/230 nm donnent une information sur la « pureté » des échantillons. En théorie, un ratio se

situant entre 1,8 et 2,2 est considéré comme acceptable (**Figure 16**). Si la concentration d'ADN est supérieure à 100 nano g/ml, une série de dilutions est menée pour diminuer la charge.

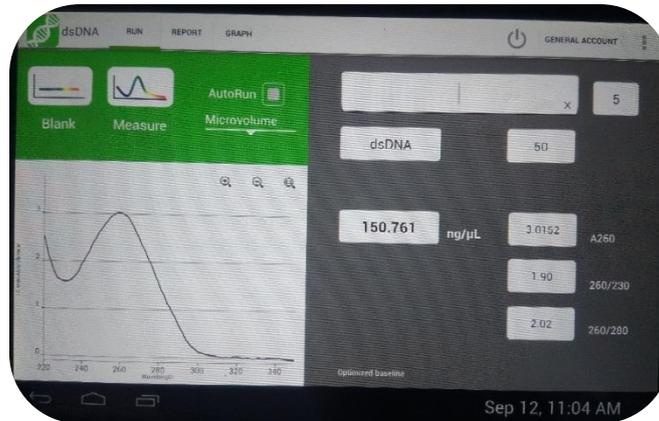


Figure 16 : Une photographie montrant un résultat obtenu au spectrophotometre

C. Amplification de l'ADN Par PCR

- **Principe**

La «Polymerase Chain Reaction» ou PCR est une technique de répllication ciblée in vitro. Elle consiste à amplifier sélectivement une séquence particulière d'ADN par action d'une ADN polymérase thermostable. L'amplification s'effectue sur un fragment d'ADN à partir de deux amorces oligonucléotidiques s'appariant spécifiquement aux extrémités des deux brins complémentaires qui délimitent la partie d'ADN à amplifier. (**Larzul, 1989**)

- **Composition de mélange réactionnel**

Le mélange réactionnel utilisé et le cycle de PCR employés sont présentés dans les **Tableaux V et VI** :

Le mélange de PCR (23 μl) contient 2 μl d'ADN, 0.25 μl Taq polymerase, 0.5 μl de dNTP, 0.5 μl de chaque amorce et 2.5 μl de tampon (10X), et 18.5 μl d'H₂O

Tableau V. Mélange réactionnel (mixe de la PCR)

Réactifs (mélange réactionnel)	
H2O	18.5 μl
Tampon X10	2.5 μl
d'NTP (10 mM)	0.5 μl
Amorce F (10 μM)	0.5 μl
Amorce R (10 μM)	0.5 μl
Taq (5U/ul)	0.25 μl
Total mix	23 μl
ADN	2 μl

- **Réaction d'amplification**

Ces réaction ont consistées à amplifier c'est à dire multiplier le matériel génétique (par un facteur de 2^n n=nombre de cycle) disponible dans le milieu réactionnel grâce à l'utilisation des amorces sens et antisens spécifiques **Tableau III** à une région spécifique au ADN. Les paramètres d'amplification utilisés sont présentés dans le **Tableau V**

L'amplification a été programmé comme suit: 15 min à 95 °C, 30 cycles de 30 sec à 94 °C pour la dénaturation, 30 sec à T_m °C pour l'hybridation et 30 sec 72°C pour l'élongation et 5min à 72 °C pour une extension finale.

Tableau VI. Programme d'amplification « cycle thermique »

Température	Temps	
95 °C	15 min	
94 °C	30 s	} X 30
T_m ca varie de gène étudié	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	5 min	

- **L'électrophorèse**

Pour s'assurer de la qualité et de la spécificité de l'amplification, une électrophorèse des produits de PCR est effectuée dans un gel d'agarose à 0.8% durant 40 mn sous un courant électrique de 100 V. Cette technique est basée sur le déplacement de particules chargées en solution, sous l'influence d'un champ électrique généré par un courant continu pendant un certain temps. Les molécules d'ADN chargées négativement à pH neutre migrent alors vers l'anode (+) et leur vitesse est inversement proportionnelle à leur taille. **(Gilles Camus, 2009)**

Le gel d'agarose est préparé avec du tampon d'électrophorèse (TBE 1X) Tris borate EDTA. Ce dernier placé à l'intérieur de la cuve à électrophorèse, en veillant à ce qu'il soit recouvert entièrement par du tampon TBE 1X, puis les échantillons et un standard de taille sont déposés dans le gel. L'électrophorèse est lancée après fermeture de la cuve.

Après migration, les fragments d'ADN sont visualisés sur une plaque de trans-illumination sous UV à 300 nm grâce au Bromure d'Ethidium contenu dans le gel et qui s'insère entre la double hélice d'ADN. La particularité de cette molécule est, qu'une fois insérée dans l'ADN, celle-ci devient fluorescente sous excitation ultra-violette. Le gel est ensuite photographié sous UV et analysé à l'aide du logiciel

I.2.5 Amplification de l'ADNr 16S, séquençage et analyse phylogénétique

Les isolats bactériens seront identifiés par l'analyse des séquences d'ADNr 16S en utilisant les amorces universelles.

a) Amplification de l'ADNr 16S

Les gènes d' l'ADNr 16S sont amplifiés à partir de l'ADN génomique extrait des bactéries isolées avec des amorces universelles (Youssef *et al*, 2009) suivants : F (CCTACGGG AGGCAGCAG) ; R (ATTACCGCGGCTGCTGG). La réaction de PCR est préparée dans un volume réactionnel final de 23 μ l contenant 2 μ l l'ADN matriciel, 0.5 μ l de chacune des deux amorces utilisées (Tableau VII), 0.5 μ l de dNTPs, et 18.5 μ l d'H₂O, 0.25 μ l de Taq polymérase en fonction du gène à amplifier avec 2.5 μ l de son tampon réactionnel 10X fin

Tableau VII. Mélange réactionnel (mélange de la PCR) pour l'ADNr 16S

Réactifs (mélange réactionnel)	
H₂O	18.5 μ l
Tampon X10	2.5 μ l
d'NTP (10 mM)	0.5 μ l
Amorce F (10 μM)	0.5 μ l
Amorce R (10 μM)	0.5 μ l
Taq (5U/μl)	0.25 μ l
Total mix	23 μ l
ADN	2 μ l

Un thermocycleur automatisé répète 30 cycles de trois étapes : la dénaturation de l'ADN (30s à 95°C), l'hybridation des amorces (30s) à la température d'hybridation $T_m=52$ (voir **Tableau VIII**) et la synthèse du brin complémentaire grâce à une ADN polymérase thermostable (30s à 72°C).

L'ensemble des cycles de PCR est précédé par une étape de dénaturation de l'ADN (15 min à 95°C) et suivi d'une élongation finale (5 min à 72°C).

Tableau VIII. Programme d'amplification « cycle thermique » l'ADNr 16S

Température	Temps	
95 °C	15 min	
94 °C	30 s	} X 30
Tm=52	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	5 min	
15 °C	∞	

b) Le séquençage des fragments amplifié par capillarité (Sanger)

Une librairie d'ADNr 16S est ensuite constituée et les gènes sont séquencés par la méthode de Sanger (Sanger 1977).

- **Principe de la technique de Sanger**

Dans un premier temps, il est nécessaire d'amplifier l'ADN cible par PCR, puis de le dénaturer afin d'obtenir un ADN simple brin. À l'aide d'une amorce spécifique et complémentaire du brin étudié, identique ou différente de celle utilisée pour la PCR, une ADN polymérase effectue alors la synthèse de l'ADN complémentaire à partir de cette amorce. (Lamoril et al., 2008) quand la polymérase incorpore un des quatre « didésoxynucléotides » (ddATP, ddCTP, ddGTP, ou ddTTP présents séparément dans quatre réactions individuelles), la synthèse s'arrête. Cela génère un mélange de molécules qui se terminent à chaque position où se trouve un A, un C, un G, ou un T (selon le type de didésoxynucléotide présent). Les fragments dans ce mélange sont séparés selon leur taille par électrophorèse sur gel. La connaissance du didésoxynucléotide qui a été incorporé dans chaque réaction permet ainsi de déduire la séquence du fragment d'ADN d'intérêt. (Erwin van Dijk et Claude Thermes, 2021)

Le séquençage s'appuie sur les étapes suivantes :

- 1) **Réalisation d'une PCR par l'amplification de l'ADNr 16S** (déjà mentionné)
- 2) **Purification du produit PCR avec kit Qiagen ou plaque silice**

Les produits PCR obtenus ont été purifiés en utilisant un Kit commercial Qiagen®. Ce kit fournit un procédé simple, efficace et à haut débit pour la purification de produits PCR et de l'ADN issu de réactions enzymatiques. Le kit utilise des membranes de gel de silice qui absorbent sélectivement jusqu'à 10 µg de fragments d'ADN dans chaque puits en présence de

tampons de liaison spécialisés. Les nucléotides, les oligos (<40-mer), les enzymes, les huiles minérales et autres impuretés ne se lient pas aux membranes et sont éliminés. Les fragments d'ADN peuvent ensuite être élués de la colonne dans un petit volume et utilisés directement dans des applications en aval.

Le protocole suivi est indiqué en **Annexe 4**.

3) Réaction du Big Dye dans glace :

Préparer le mélange réactionnel dans un volume final de 10,5 µl comme suit:

Dans un tube eppendorf on met 3 µl de réactif Big Dye (qui se compose de la taq polymérase, des dNTP, ddNTP marqués, tampon et du MgCl₂) 4 µl d'eau distillée stérile, 0,5 µl des primer et 3 µl d'ADN **Tableau IX**

Tableau IX. Le mélange réactionnel de la réaction du Big Dye

Mélange réactionnel	
Big Dye Terminator V1.1	3 µl
EDS	4 µl
Primer (4µM/6µM)	0,5 µl
ADN	3 µl

En suivant le programme de thermocycler indiqué dans le **Tableau X**

Tableau X . Programme d'amplification « séquençage »

Phase	Température	Temps
Dénaturation	96 °C	5 min
Amplification 25 cycle de	96 °C	30 s
	55 °C	20 s
	60 °C	2 min
	15 °C	∞

Les fragments de séquençage sont alors séparés dans un séquenceur capillaire qui permettra de déterminer les séquences des fragments analysés.

4) Purification de la réaction de séquence par Séphadex:

Cette réaction est purifiée par chromatographie pour piéger les ddNTP en excès et le Magnésium car ils influencent le signal de fluorescence spécifique.

La chromatographie d'exclusion repose sur le poids moléculaire des particules des ddNTP, Mgcl₂, en piégeant celles de poids moléculaire bas sur une colonne Séphadex dont

les perfores ont un diamètre précis et petit, les petites particules de diamètre inférieur à ceux des colonnes entrent et donc sont piégées, par contre les grosses molécules passent autour.

Le protocole de la purification par Séphadex est détaillé en **Annexe 5**.

Les fragments de séquençage sont alors séparés dans un séquenceur capillaire qui permettra de déterminer les séquences des fragments analysés.

c) Analyse phylogénétique des séquences

Les séquences ont dans un premier temps été comparées avec celles présentes dans la Banque de données GenBank database du National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) grâce à l’outil d’alignement Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Cette étape permet l’identification de la séquence par homologie avec des séquences connues.

Chaque séquence est alors affiliée à un taxon par comparaison avec les séquences de référence contenues dans les bases de données. Un alignement multiple conduit à la création d’un arbre phylogénétique qui ordonne les séquences expérimentales et calcule des distances relatives par rapport à des séquences de référence.



Résultats et discussion

II. RESULTATS

II.1 . Caractérisation des souches isolées

II.1.1 Etude phénotypique

- Aspect culturale

Les 93 souches ont été ensemencées préalablement sur la gélose nutritive pour observer certaines pigmentations et certains aspects culturels.

Nous avons ensemencé 27 souches sur le milieu Hecktoen pour observer la dégradation de lactose et la production d'H₂S, et 66 souches sur Chapman pour déduire la dégradation du mannitol et le caractère d'halotolérance. Les mêmes souches ont été ensemencées sur la Gélose Columbia au sang pour sélectionner le type d'hémolyse.

Les différents aspects culturels sur les différents milieux utilisés sont illustrés dans la figure 17.

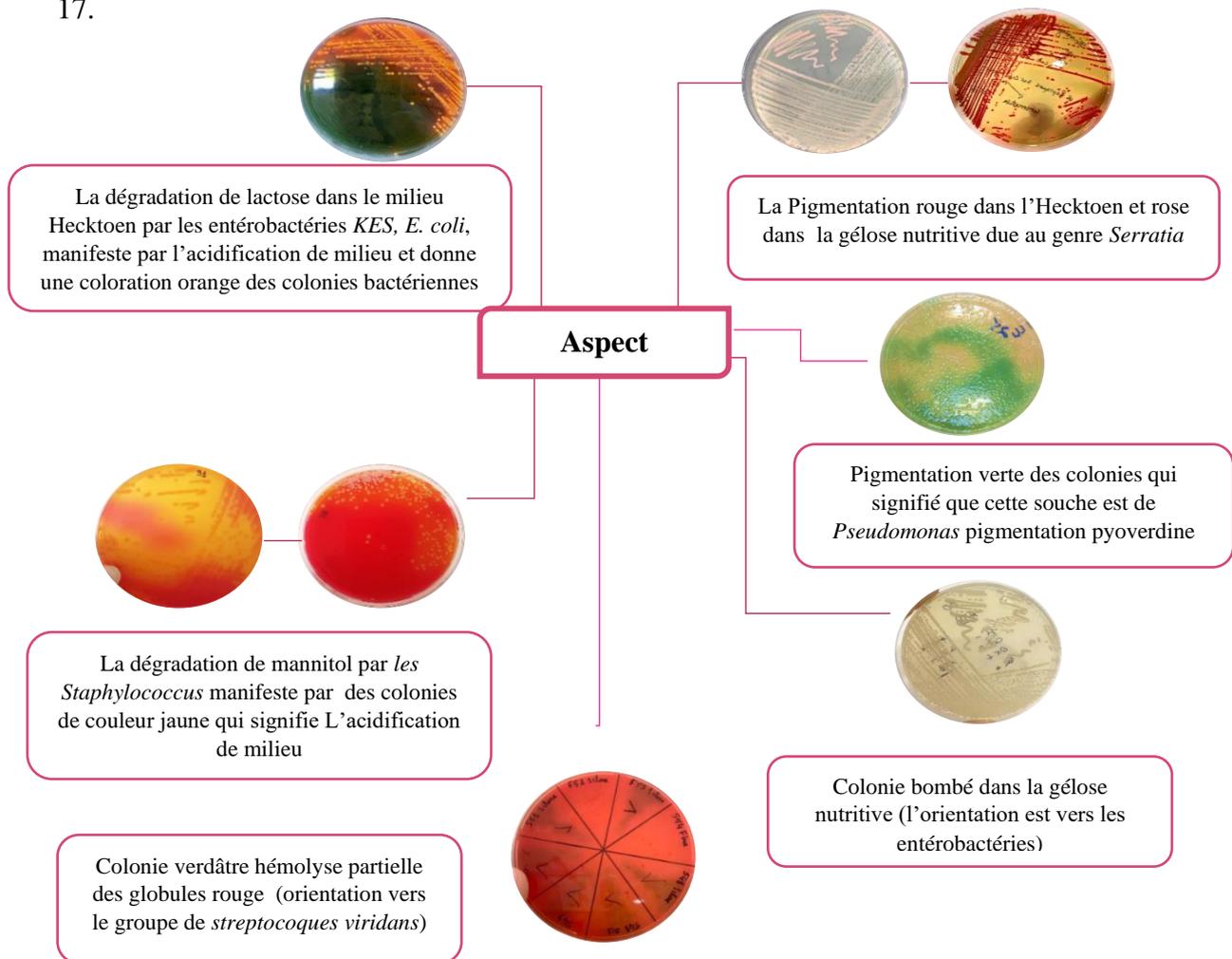


Figure 17 : Les différents aspects culturels des bactéries isolées

- **Résultats du test à la potasse**

La réalisation du test à l'hydroxyde de potassium KOH à 3%, nous a permis de différencier entre les bactéries Gram positives et négatives.

Parmi les 93 souches testées, 66 bactéries étaient Gram positif et 27 bactéries Gram négatives (**Figure 18**).

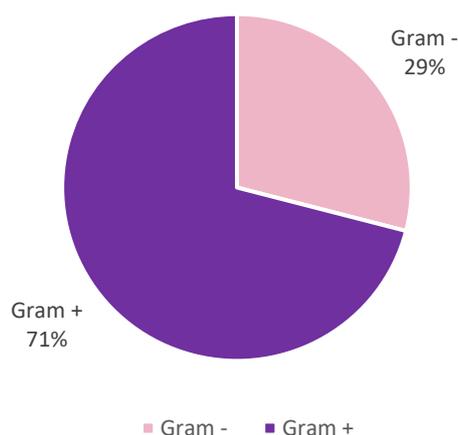


Figure 18 : Résultat du Test à KOH

- **Résultat des tests catalase et oxydase**

La recherche de catalase et de l'oxydase sont des critères d'orientation pour l'identification bactérienne.

a) La Catalase

Ce test a été effectué pour les 93 souches isolées. Une effervescence due à un dégagement de dioxygène a été observée, qui signifie la présence d'une catalase (pour confirmer le groupe bactérien à Gram négatif car elles produisent leur propre catalase, et pour détecter le genre de staphylocoques), Par contre un résultat négatif chez les genres des streptocoques et les entérocoques.

Pour les bactéries à Gram négatif, 27 souches ont une catalase positive, pour les bactéries à Gram positif, 39 souches avaient une catalase positive et 27 souches avaient une catalase négative.

b) Test de l'oxydase

Ce test a été effectué pour les 27 souches des BGN. Un résultat positif de ce test est traduit par l'apparition d'une coloration violette sur le disque prêt à l'emploi après la déposition d'une colonie à tester, c'était le cas de *Pseudomonas* qui est pourvue d'oxydase (réaction positive), par contre la famille des entérobactéries sont d'oxydase négatif (**Tableau XI; Figure 19**).

Tableau XI. Résultat de test d'oxydase

Le test d'oxydase	Positif	Négatif
Pour les bactéries à Gram négatif	07	20

Les bacteries à Gram négatif

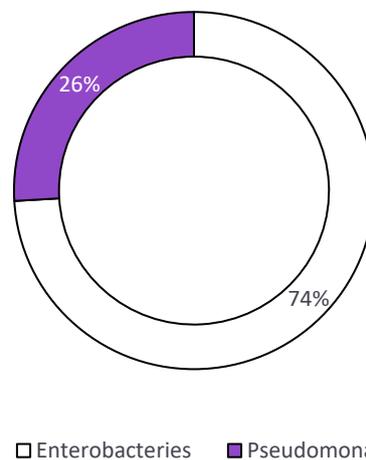


Figure 19 : Différenciation entre les genres des bactéries à Gram positif après le test d'oxydase

L'identification bactérienne réalisée par le biais des différents tests phénotypiques nous a permis de caractériser les souches isolées et de leur attribuer une affiliation **probable** à des groupes et des espèces bactériennes connus. **Tableau XII,XIII**

Nous avons pu répartir les 93 souches isolées en quatre groupes bactériens principaux : les entérobactéries (20 souches), les *Pseudomonas* (7 souches), les staphylocoques (39 souches) et les streptocoques entérocoques (27 souches).

Les souches appartenant au groupe des entérobactéries pourraient être affiliées aux genres ou aux espèces suivantes : *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Providencia*, *Proteus*, *Morganella*, *Shigella*.

Tableau XII. Résultats d'identification bactérienne

Groupe bactérien	Critères d'identification						L'affiliation probable	
	Forme	Gram	Caractères culturaux	Catalase	Oxydase	Lactose		H2S
E1, E15	Bacille	Négatif	colonie fine avec bords réguliers	positif	Négatif	+	-	<i>E. coli</i> , <i>Kleibseilla</i> , <i>Serratia</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Providencia</i>
E2, E3, E6, E16, E17			Colonie fine bombée			-	-	<i>Proteus rettegerie</i> , <i>Proteus morgani</i> , <i>Morganella morgani</i> , <i>Acinetobacter baumanii</i> , <i>Shigella</i>
E4, E19, E7, E9, E10, E11, E12			Colonie a bords irréguliers aspect œuf plat			+	-	<i>E. coli</i> , <i>Kleibseilla</i> , <i>Serratia</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Providencia</i>
E5			colonie fine avec un halo transparent,			+	-	<i>E. coli</i> , <i>Kleibseilla</i> , <i>Serratia</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Providencia</i> , <i>Levenia</i>
E8, E18, E20			Colonie avec centre noir et un halo claire, des vagues			-	+	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus</i>
E8			colonie aplati, bords réguliers			+	-	<i>E. coli</i> , <i>Kleibseilla</i> , <i>Serratia</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Providencia</i> , <i>Levenia</i>
E14			colonie fine bords irréguliers, rouge			+	-	<i>Serratia</i>

Tableau XIII. Résultats d'identification bactérienne (suite)

Groupe bactérien	Critères d'identification						L'affiliation probable
	Forme	Gram	Catalase	Oxydase	Résistance naturelle aux CTX	Culture à 6,5 % de NaCl	
Les Pseudomonas	Bacille bâtonnée	Négatif	positif	positif	R	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
P1					S	+	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
P2					R	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
P3					R	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
P4					S	-	<i>Pseudomonas sp</i>
P5					R	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
P6					R	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
P7							
Les staphylocoques	Cocci en grappe	positif	positif	Résistant	+	Total	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i>
S1, S3, S4, S5, S8, S9, S11, S13, S16, S20, S21, S22, S23, S25, S26, S30, S31, S33, S34, S35					-	Pas d'hémolyse	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus saprophyticus</i>
S2, S6, S7, S10, S12, S14, S15, S17, S18, S19, S24, S27, S28, S29, S32							
Les streptocoques et les entérocoques	Cocci en chaînette	positif	Négatif	S	Non hémolytique de type gama		<i>Streptococcus du Groupe D</i> <i>Enterococcus</i>
T3, T4, T6, T7, T8, T9, T11, T13, T14, T15, T18, T19, T21, T23, T24, T25, T26, T27, T20, T22							

II.2 Profil de résistance et de sensibilités aux antibiotiques

Le profil de résistance et de sensibilité vis-à-vis des antibiotiques des bactéries isolées a été déterminé en utilisant le test de l'antibiogramme. Les résultats sont présentés en fonction du groupe bactérien.

- **Les entérobactéries (Figure 20)**

17 souches des entérobactéries présentent une résistance très élevée vis-à-vis de doxycycline et 12 à l'amoxicilline. 04 souches sont résistantes aux céphalosporines de 3^e génération. Toutes les 20 souches sont sensibles à la ciprofloxacine et à l'azitromycine.

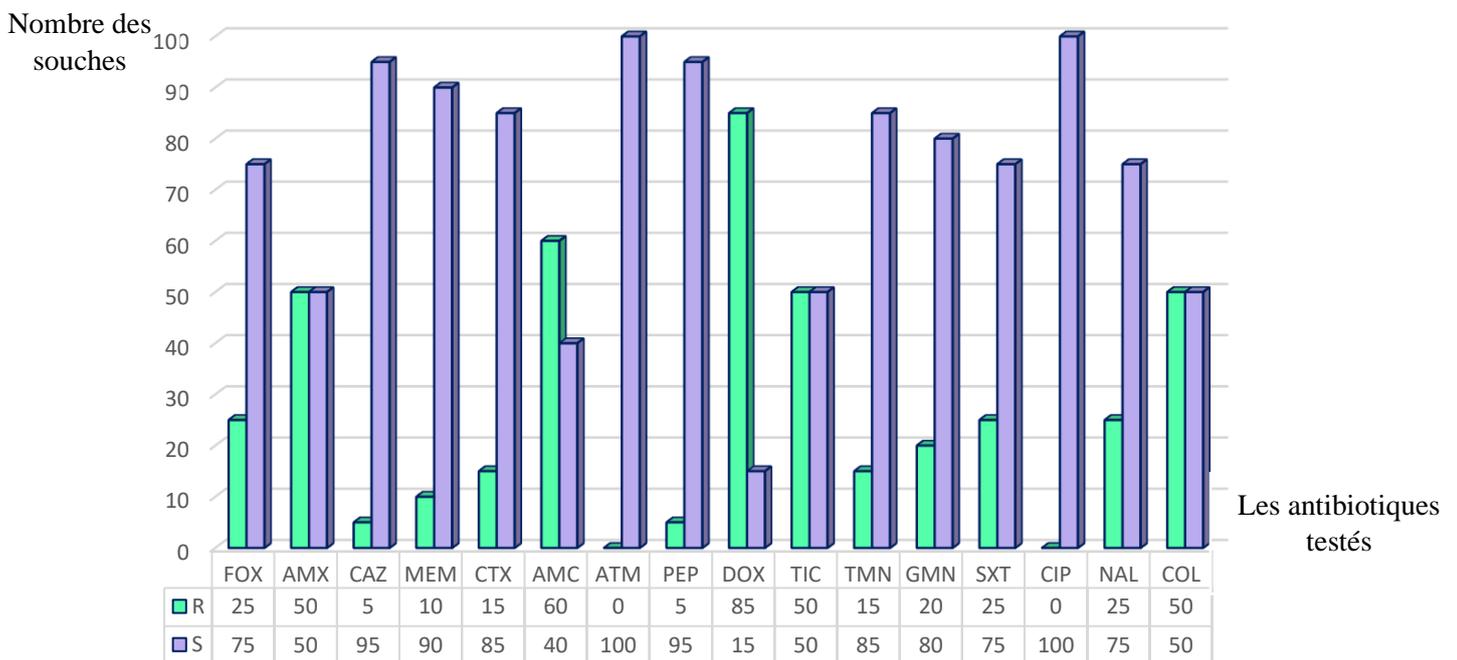


Figure 20 : Résultat d'antibiogramme pour les entérobactéries

- ❖ **Détection phénotypique de résistance des entérobactéries**

La détection phénotypique est utilisée en routine. Elle repose sur le choix des antibiotiques testés, leur disposition dans l'antibiogramme classique par disque diffusion, l'observation des diamètres de zone d'inhibition, les synergies ou antagonismes entre certains antibiotiques permettent de décrire des phénotypes et d'en déduire les mécanismes de résistance précis.

- Nous avons 11 souches de phénotype sauvage qui est le phénotype dominant.
- Le phénotype acquise (Tableau XIV) est présenter par la production de :

- Une Pénicillinase de haut niveau : Résistance haut niveau à AMX, TIC ; inhibition de l'activité enzymatique par l'acide clavulanique chez 5 souches

Figure 21

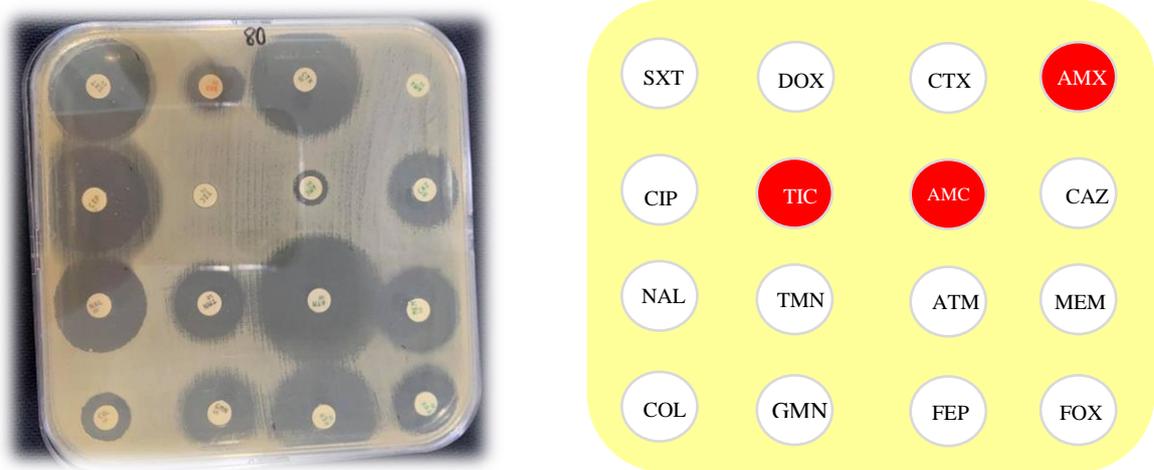


Figure 21 : la souche d'entérobactéries qui présente une pénicillinase de haut niveau

- Une BLSE combinée à une céphalosporinase haut niveau chez une souche résistante aux AMX ; AMC ; TIC en plus aux cefoxitine FOX. céphalosporine de 2eme G, et aux ceftazidime CAZ et cefotaxime CTX céphalosporines de 3eme G **Figure 22**

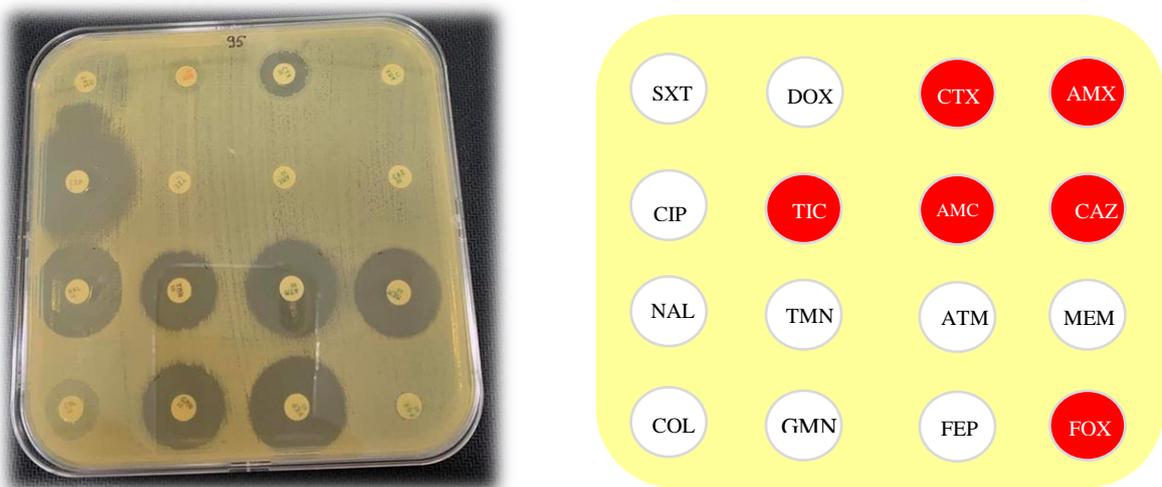


Figure 22 : la souche d'entérobactéries productrice d'une BLSE et une céphalosporinase haut niveau

Tableau XIV. Le phénotype acquis de résistance des entérobactéries

Les souches	Phénotype de résistance
E4	Pénicillinase haut niveau
E7	multi résistant
E9	multi résistant
E10	Pénicillinase haut niveau
E11	Pénicillinase haut niveau
E12	Pénicillinase
E14	Pénicillinase haut niveau
E15	BLSE+ céphalosporines haut niveau
E19	Pénicillinase haut niveau

❖ Phénomène de bouchon de champagne

Tout comme les pénicillinases, les β LSSE sont inhibées *in vitro* par l'acide clavulanique. Cette inhibition par l'acide clavulanique se manifeste sur l'antibiogramme par la présence d'images de synergie (dites en « bouchon de champagne ») entre les C3G et l'acide clavulanique

Deux souches présentes le phénomène de synergie (bouchon de champagne)

1^{er} cas pour les entérobactéries : entre Doxycycline et Céfotaxime **Figure 23a**

2^{ème} cas: entre le Ciprofloxacine et le Triméthoprim-sulfaméthanzole **Figure 23b**



Figure 23 : a. synergie 1^{er} cas : entre DOX et CTX ; b. synergie 2^{ème} cas : entre CIP et SXT

• Pour les *Pseudomonas* (Figure 24)

05 souches de *Pseudomonas* sont résistantes à la doxycycline et à l'amoxicilline, à l'amoxicilline + l'acide clavulanique. Les 07 souches sont totalement sensibles à la ciprofloxacine et aux Quinolones (Acide nalidixique). Deux souches sont résistantes à la 3eme génération de céphalosporine Céfotazidime.

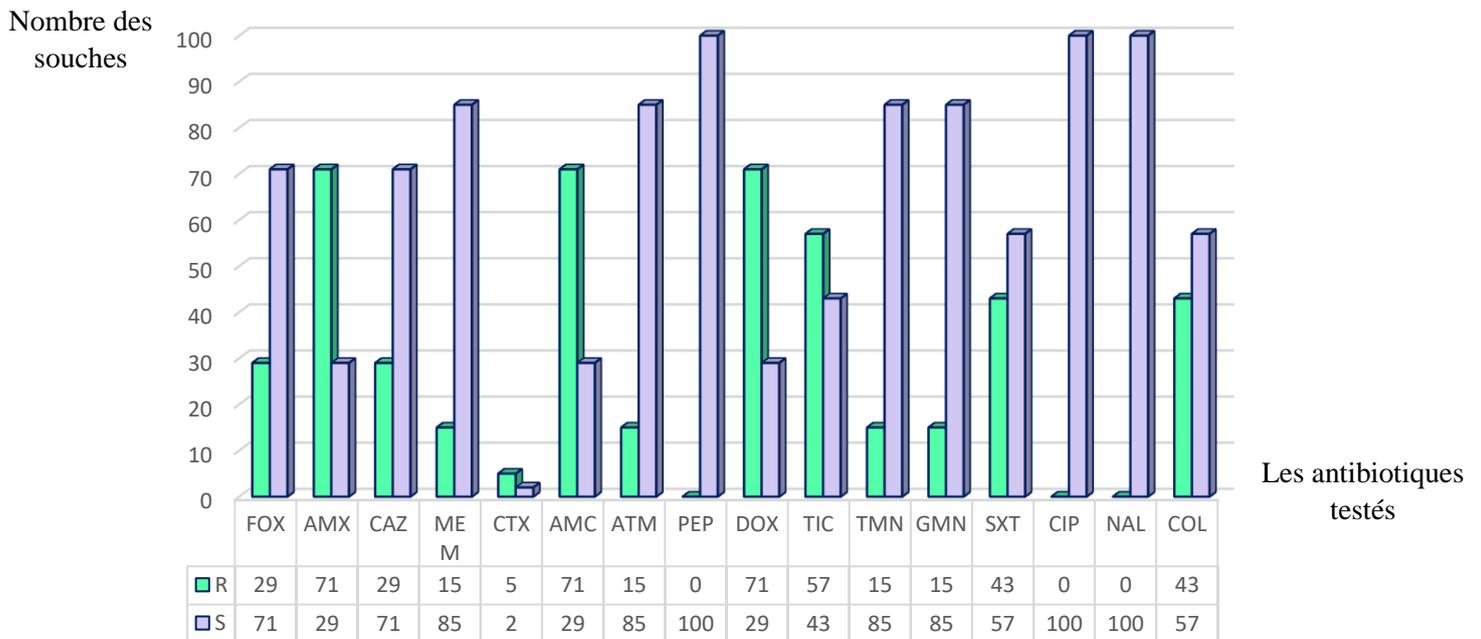


Figure 24 : Résultat d'antibiogramme pour les *Pseudomonas*

• Pour les *Staphylococcus* (Figure 25)

32 souches sont résistantes à l'oxacilline et 14 sont résistante à la cefoxitine qui sont probablement résistante à la methiciline, 29 à fosfomycine et 22 à la tétracycline

Aucune souche n'est résistante au chloramphénicol. Elles ont une forte sensibilité vis-à-vis de vancomycine.

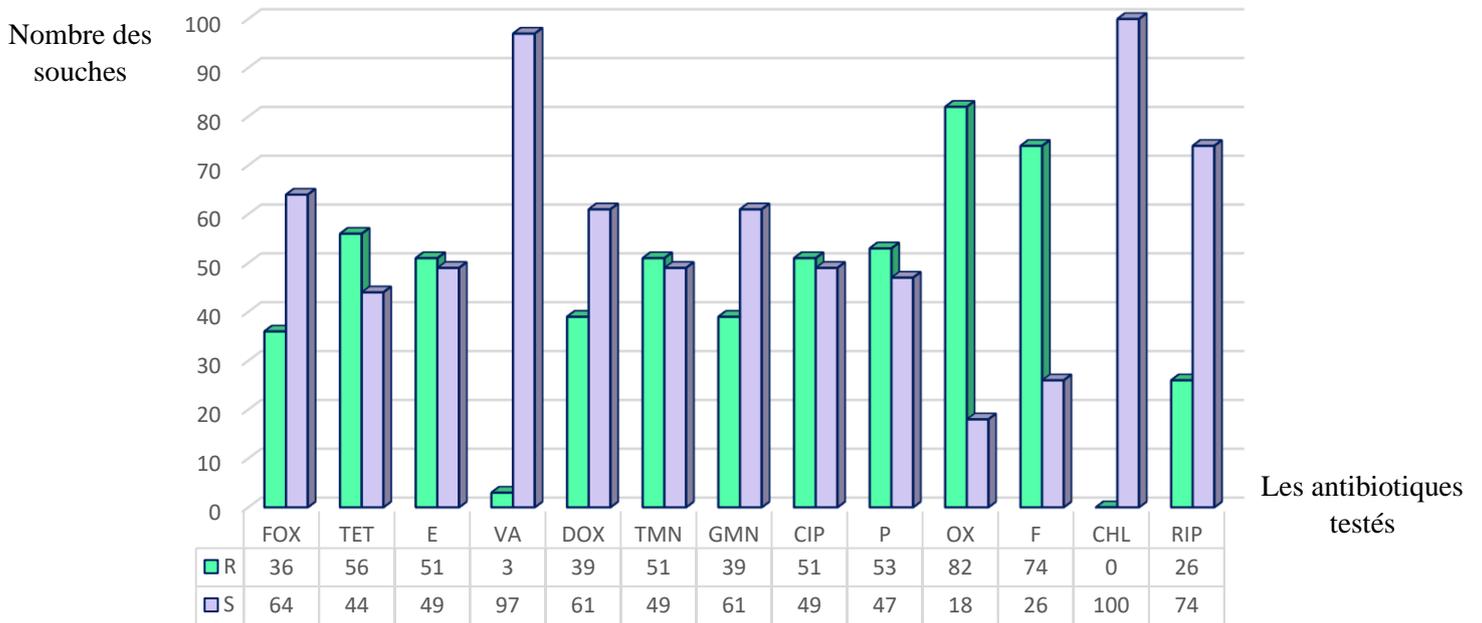


Figure 25 : Résultat d'antibiogramme pour les staphylocoques

- **Pour les streptocoques et les entérocoques (Figure 26)**

18 souches présentent une résistance très élevée vis-à-vis de Tobramycine et 17 à Tétracycline, à Oxacilline et à la Pénicilline. Une seule souche résistante à la vancomycine. Les 27 souches sont totalement sensibles aux chloramphénicol.

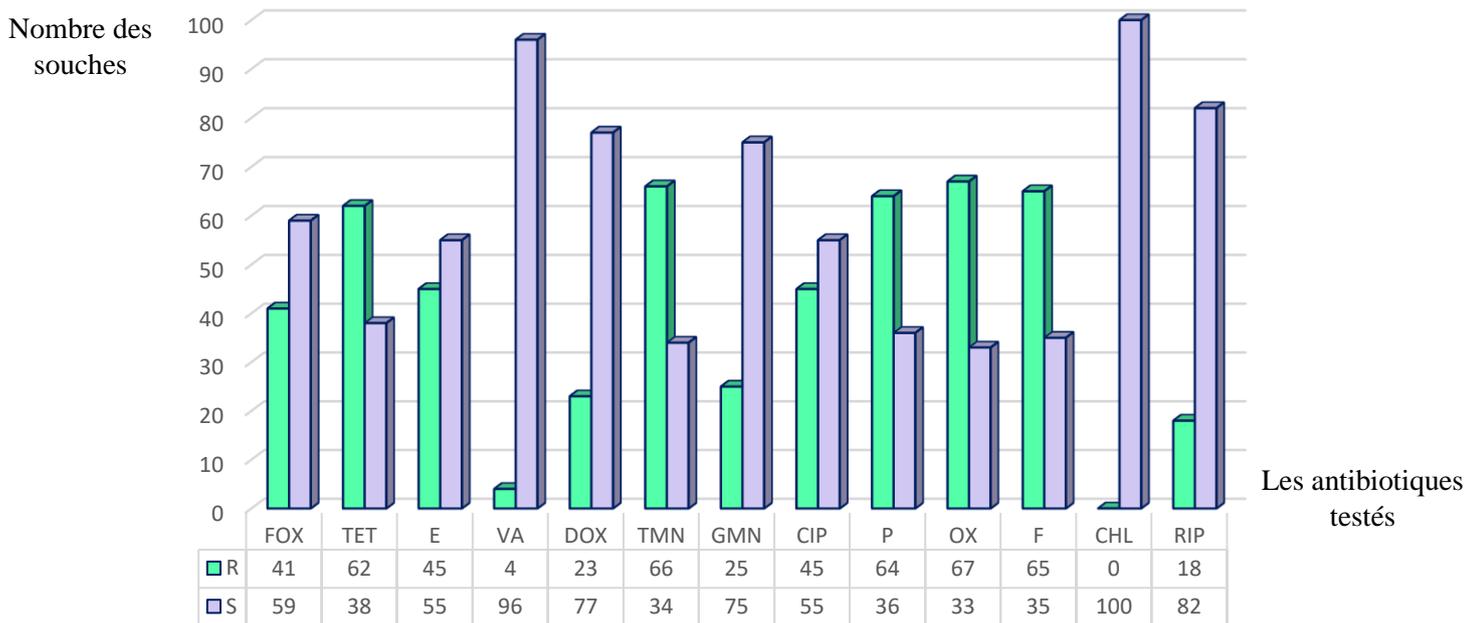


Figure 26 : Résultat d’antibiogramme pour les streptocoques et les entérocoques

II.3 Résultats de détection de gènes de résistance dans les souches testées

Suite à nos résultats d’antibiogramme, nous avons recherché des gènes de résistances spécifiques en utilisant la technique PCR, chez 31 souches qui présentaient le profil de résistance le plus important.

Nous avons pu détecter les gènes *tet A* et *tem 12* impliqués dans la résistance au bêta-lactamines et aux tétracyclines, respectivement, chez 8 souches appartenant toutes au groupe entérobactéries (Tableau XV). (Figure 27)

4 souches d’entre elles possèdent à la fois les deux gènes et peuvent être considérés. Il s’agit des souches E10, E11, E12 et E15. Le gène *tem* est retrouvé également chez quatre autres souches d’entérobactéries : E4, E7, E9 et E19.

Aucun gène de résistance n’a été détecté pour les autres souches bactériennes des différents groupes

Tableau XV. Résultats de détection de gène de résistance dans les souches testées

	Souches	Code	tet A	tet X	mec A	tem	oxa48	Ctx M	oxa23	oxa24	oxa58	sul	erm	ndm	shv	mcr
Les entérobactéries	E4	78	-	-	/	+	-	-	-	-	/	/	/	-	/	/
	E1	79	-	-	/	/	-	/	-	-	-	/	/	-	/	/
	E2	80	-	/	/	-	-	-	-	-	/	/	/	-	/	/
	E3	81	/	/	/	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	E6	82	/	/	/	-	-	/	-	-	/	/	/	-	/	/
	E7	83	-	-	/	+	/	-	/	/	/	-	-	-	/	/
	E8	85	-	-	/	/	-	/	-	-	-	/	/	-	/	/
	E9	86.1	-	-	/	+	-	-	-	-	/	-	/	-	-	/
	E19	86.2	-	-	/	+	-	-	-	-	/	-	/	-	-	/
	E11	87.1	+	-	/	+	/	-	/	/	/	/	-	-	/	/
	E12	87.2	+	-	/	+	/	-	/	/	/	/	-	-	/	/
	E14	89	-	-	/	-	-	-	-	-	/	/	/	-	/	/
	E15	90	+	-	/	+	-	-	-	-	/	/	/	-	/	/
	E16	91	/	/	/	-	-	-	-	-	/	/	/	/	-	/
	E17	92	-	-	/	-	/	-	/	/	/	/	/	-	-	/
E19	93	-	-	/	/	-	/	-	-	-	/	/	-	/	/	
E10	95	+	-	/	+	-	-	-	-	/	/	/	-	-	-	
Les Pseudomonas	P1	84	-	-	/	/	-	/	-	-	-	/	/	-	/	/
	P3	94	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	P6	96	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	P7	97	-	-	/	-	-	-	-	-	/	/	/	-	/	/
Les cocci gram positives	S2	278	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-
	S26	341	/	/	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	S14	342	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	S30	343	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	S34	344	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	T13	345	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	T14	350	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	T21	351	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	T23	352	/	/	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	T24	353	/	/	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

Le tableau ci-dessus représente les souches bactériennes qui ont les gènes de résistance de β -lactamases *tem* et de Tétracyclines *tet*, leurs origine et leurs profile de résistance parmi elles deux souches sont multi résistante E7 et E9 les autres souches sont plus résistant aux betalactamines et aux tétracyclines **Tableau XVI**

Tableau XVI. Profil de résistance des bactéries qui présentent des gènes de résistances ciblées

Isolats	Code	Origine	Gène de résistance		Profil d'antibio-résistance
			β -lactamases	Tétracyclines	
E4	78	Eau traité	<i>tem</i> +	<i>tet</i> -	AMX ; AMC ; DOX ;TIC ; SXT;
E19	83	Eau traité	<i>tem</i> +	<i>tet</i> -	AMX ; AMC ; DOX ;TIC ; SXT;
E7	86.1	Eau traité	<i>tem</i> +	<i>tet</i> -	AMX; AMC; FOX. ;DOX ;TIC ; TMN; GMN ;SXT;
E9	86.2	Eau traité	<i>tem</i> +	<i>tet</i> -	AMX; AMC; FOX. ;DOX ;TIC ; TMN; GMN ;SXT;
E10	87.1	Eau traité	<i>tem</i> +	<i>tet</i> +	AMX ; AMC ; DOX ;TIC ; NAL
E11	87.2	Eau traité	<i>tem</i> +	<i>tet</i> +	AMX ; AMC ; DOX ;TIC ; NAL
E12	90	Eau traité	<i>tem</i> +	<i>tet</i> +	AMX ; AMC ; DOX ;TIC
E15	95	Eau traité	<i>tem</i> +	<i>tet</i> +	AMX; AMC; FOX. ; CAZ; CTX; DOX ;TIC ; SXT; COL

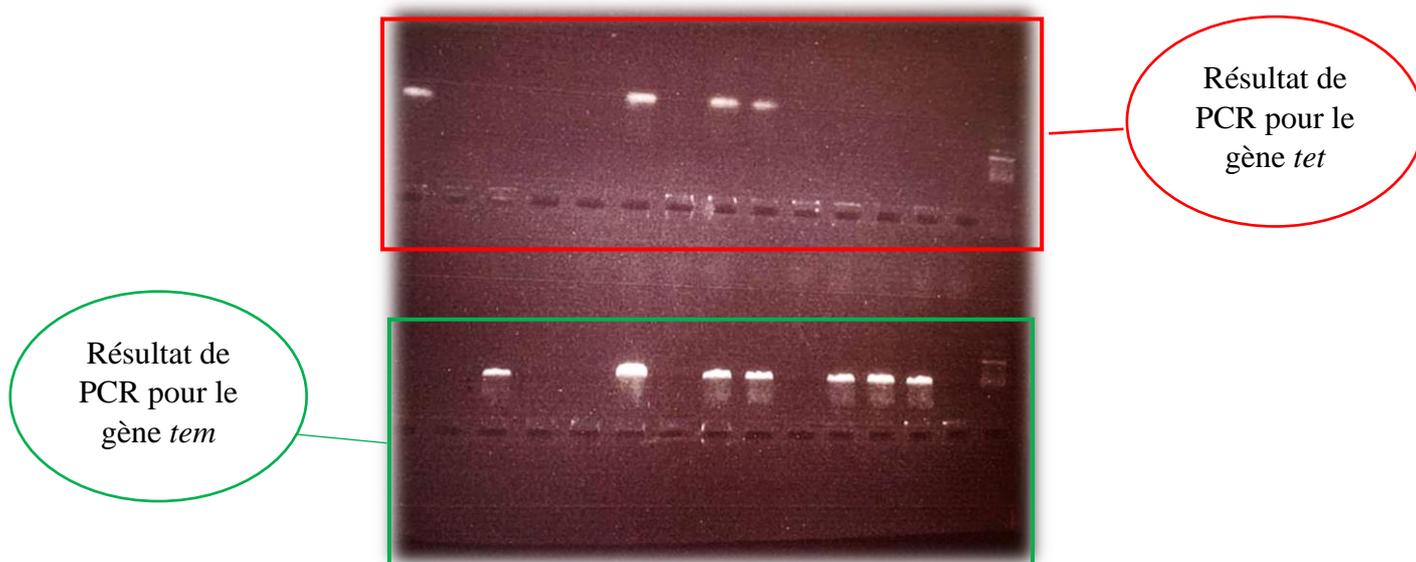


Figure 27 : résultat de PCR, exemple d'électrophorèse sur gel d'agarose des produits PCR du gène *tem* et *tet*

Ces 08 souches ont fait l'objet d'une caractérisation moléculaire par PCR-Séquençage du gène 16S rRNA pour permettre une identification précise.

II.4 Identification moléculaires des souches sélectionnées

Les produits PCR obtenus ont été séquencés. Les séquences générées ont été corrigées par le logiciel Chromas Pro.

Les 07 séquences obtenues (78, 86.1, 86.2, 83, 87.1, 87.2 et 95) ont été par la suite comparées aux séquences disponibles dans les banques de données publiques (GenBank).

Pour construire des arbres phylogénétiques, les séquences GenBank apparentées à nos séquences ont été téléchargées sous format fasta pour pouvoir les traiter avec le logiciel MEGA10.

L'analyse de l'arbre phylogénétique obtenu avec MEGA10 a montré que nos 07 souches appartenaient à deux clades d'entérobactéries, le premier dominé par le genre *Citrobacter* et le deuxième par les genres *Escherichia/Shigella* (**Figure 28**).

Des investigations plus fines seront conduites pour déterminer l'identification taxonomique exacte de ces bactéries. En effet, le génome entier de ces bactéries sera obtenu grâce à l'utilisation de l'outil séquençage de nouvelle génération disponible au niveau de la plateforme Génomique – Bioinformatique de l'Institut Pasteur d'Algérie.

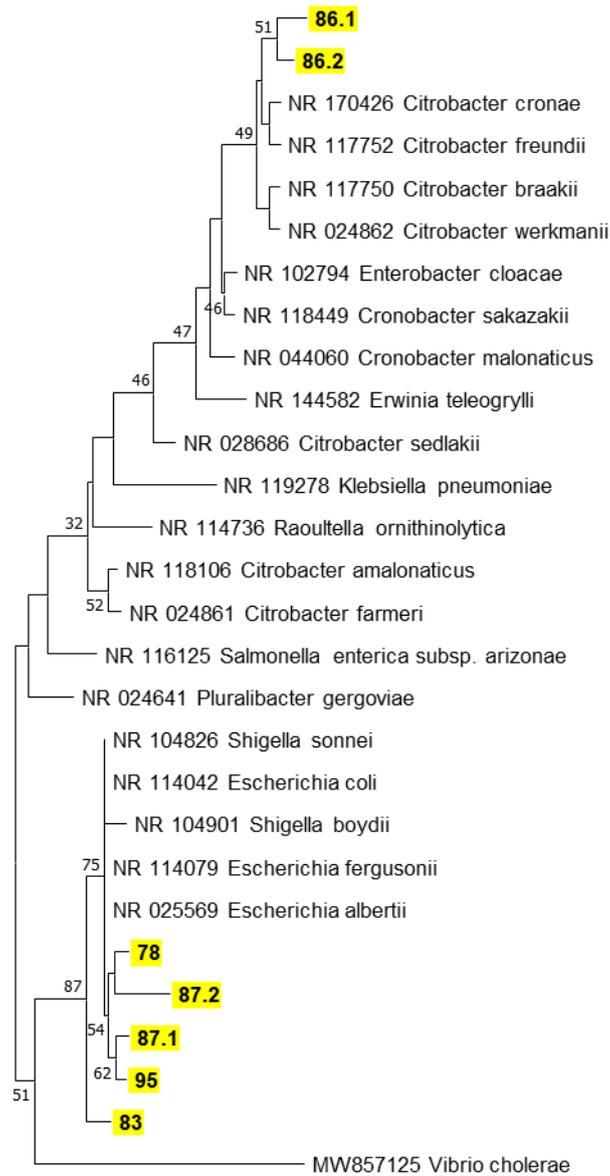


Figure 28 : Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S mettant en évidence les résultats de l'identification phylogénétique des 7 souches sélectionnées

Discussion

Le problème croissant de la résistance aux antimicrobiens est désormais reconnu comme une menace majeure de santé publique mettant en péril la prise en charge de milliers de patients dans le monde. Elle est comme l'un des défis les plus importants de la médecine contemporaine. Il s'agit d'un phénomène extrêmement dangereux, qui empêche par conséquent le traitement efficace des infections bactériennes et peut être à l'origine de menaces épidémiques et d'une mortalité élevée (**Pazda et al., 2019**).

Les bactéries se distinguent des autres organismes vivants par le fait qu'elles possèdent un remarquable pouvoir d'adaptation aux changements les plus divers et les plus extrêmes de leur environnement. Elles acquièrent leurs capacités adaptatives essentiellement grâce à des échanges et des remaniements de matériel génétique extra-chromosomique qui leur confèrent notamment la résistance vis à vis des toxiques tels que les antibiotiques et les métaux lourds (**Singer et al., 2016**).

Dans l'environnement, les antibiotiques ne sont pas seulement des polluants chimiques qui peuvent exercer des effets toxiques, mais ils sont surtout capables de provoquer une pression de sélection. Ce phénomène consiste en l'élimination des micro-organismes sensibles aux antibiotiques et la survie des cellules résistantes, dont les caractéristiques leur permettent de surmonter les effets indésirables des antibiotiques (**Birošová et al., 2014**).

L'eau constitue non seulement un moyen de dissémination d'organismes résistants aux antibiotiques parmi la population humaine et animale, car l'eau potable est produite à partir des eaux de surface, mais aussi la voie par laquelle les gènes de résistance sont introduits dans les écosystèmes bactériens naturels. Beaucoup de ces bactéries hébergent des gènes de résistance aux antibiotiques, principalement insérés dans des plasmides, transposons ou intégrons capables d'être transférés parmi la communauté bactérienne de l'eau et du sol via le transfert horizontal de gènes (**Djenadi, 2017**).

Les eaux usées après le processus de traitement sont rejetées dans les milieux récepteurs, tels que les eaux de surface (rivières, lacs, mers ou océans), ou dans les sols agricoles et les cultures à la suite de l'irrigation avec des eaux usées récupérées où la résistance peut être transmise entre bactéries dont des bactéries pathogènes (**Christou et al., 2017; Pazda et al., 2019**).

Notre travail est une contribution à l'étude des microorganismes pathogènes résistants aux antibiotiques isolées d'un milieu aquatique en utilisant deux approches culturale et moléculaire pour la caractérisation des souches isolées et la recherche ciblée des gènes de résistance spécifique.

93 souches bactériennes conservées à la souchothèque du laboratoire de la plateforme génomique - bio-informatique de l'institut Pasteur Algérie ont fait l'objet de notre étude. Nous avons procédé à un essai de caractérisation phénotypique de ces souches par la réalisation de différents tests. En effet, nous avons réalisé le test à la potasse KOH à 3%, la recherche des enzymes de la catalase et de l'oxydase chez toutes les souches.

Parmi les 93 souches isolées, 66 souches sont des bactéries Gram positives. Les organismes à Gram positif sont des agents pathogènes humains majeurs, causant à la fois des infections associées aux soins de santé et à la communauté. Les agents pathogènes à Gram positif présentent un immense répertoire génétique pour s'adapter et développer une résistance à pratiquement tous les antimicrobiens disponibles en clinique (Munita et al., 2015). D'autre part, le nombre d'infections causées par des BMR à Gram-négatif étant en nette augmentation dans le monde entier, celles-ci représentent un enjeu majeur de santé publique.

La caractérisation des souches isolées à partir des échantillons prélevés de l'eau usée rejetée à la mer d'Ain Benian, en utilisant différents tests d'identification nous a permis de les répartir en quatre groupes majeurs : les staphylocoques (39 souches), les streptocoques entérocoques (27 souches), les entérobactéries (20 souches) et les pseudomonas (7 souches).

Alors qu'il s'agit d'un commensal parmi les plus fréquents de notre flore normale, *Staphylococcus aureus* est un pathogène redoutable qui a su développer des résistances à chaque nouvel antibiotique introduit depuis un demi-siècle. La plasticité de son génome lui confère la capacité de s'adapter à toutes les conditions environnementales, et notamment d'acquérir des gènes de résistance aux antibiotiques et de développer des mécanismes de régulation pour s'adapter à des concentrations croissantes d'antibiotiques (Dumitrescu et al., 2010).

Les streptocoques et entérocoques comportent des espèces commensales mais aussi des espèces responsables d'infections chez l'homme. *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*, sont responsables d'infections nosocomiales, et constituent un problème de santé

publique par leur résistance naturelle à de nombreux antibiotiques dont les céphalosporines, et par l'acquisition par certaines souches de résistances aux glycopeptides

La prévalence des ERV est devenue l'une des causes les plus importantes des infections nosocomiales. Il existe des différences considérables entre les espèces, la plupart des résistances à la vancomycine se produisant dans les isolats d'*E. faecium*.

Dans le cas des entérobactéries, ils représentent plus de la moitié des infections chez l'homme et la majorité des BMR, l'augmentation du nombre de cas est encore plus importante. Les entérobactéries productrices de carbapénèmases (EPC) constituent aujourd'hui la principale préoccupation en termes de résistance bactérienne aux antibiotiques.

Escherichia coli est identifiée comme une cause majeure d'infection de la circulation sanguine et des voies urinaires dans les milieux communautaires et de soins de santé à l'échelle mondiale. Grâce au transfert horizontal de gènes, *E. coli* acquiert généralement des gènes de résistance d'autres membres des *Enterobacterales* (De Oliveira et al., 2020).

Les souches appartenant au groupe *Pseudomonas* sont principalement rattachés à *Pseudomonas aeruginosa* (6 souches) et *Pseudomonas stutzeri* (1 souche).

Largement présent dans les milieux aquatiques, *P. aeruginosa* est un pathogène humain opportuniste à Gram négatif couramment associé à des infections respiratoires sévères chez les patients immunodéprimés. Alors que *P. aeruginosa* est responsable de 10 % de toutes les infections nosocomiales, il est également de plus en plus reconnu comme cause d'infection communautaire. (De Oliveira et al., 2020)

Nous avons également établie le profil de résistance de nos souches vis-à-vis plusieurs familles d'antibiotiques par l'antibiogramme. Nous avons remarqués une variation des résultats selon la nature du germe et le groupe d'antibiotique testé.

. Les souches appartenant au groupe *Staphylococcus* sont plus résistants aux bêta-lactamines, l'oxacilline (pénicillines du groupe M) et la cefoxitine. 11 souches sont résistantes à la méthiciline, et une seule souche résistante à la vancomycine

L'émergence et la dissémination de la résistance aux -lactamines chez *S. aureus* se sont produites en plusieurs vagues épidémiques qui pourraient être résumées par : (1) l'acquisition d'une pénicillinase codée par un plasmide dans les années 1950, (2) une deuxième vague qui a commencé après l'introduction de la méthicilline (1959) et a été caractérisée par l'émergence

d'isolats de SARM hospitaliers qui ont principalement circulé dans les hôpitaux européens jusqu'aux années 1970, (3) le développement de plusieurs clones de SARM hospitaliers très performants qui se sont propagées dans différentes parties du monde et continuent de circuler (troisième vague), et (4) la dernière vague de résistance au SARM à ce jour, caractérisée par l'émergence et la diffusion du SARM associé à la communauté dans les années 1990. De nos jours, la plupart des *S. aureus* sont résistants à la pénicilline grâce à la production d'une β -lactamase plasmidique (4 types sont connus, dont A, B, C et D) (Munita et al., 2015).

Le mécanisme de résistance à la méthicilline repose sur l'acquisition de la cassette chromosomique staphylococcique *mec* (*SCCmec*) contenant *mecA*, qui code pour la PBP2a, une transpeptidase de faible affinité pour toutes les Beta-lactamines (à l'exception des céphalosporines de dernière génération) (Mendes et al., 2012 ; Munita et al., 2015)

L'expression de *mecA* est étroitement régulée et nécessite souvent une induction par une b-lactame. Il existe un certain nombre de variantes différentes de l'ADN *SCCmec* ; cependant, en général, des éléments plus courts dépourvus de déterminants de résistance à d'autres antimicrobiens sont présents dans le SARM associé à la communauté (*SCCmec* IV ou V) (Munita et al., 2015).

La sensibilité réduite à la vancomycine chez les staphylocoques peut être classée en 2 phénotypes distincts : (1) le plus souvent, les isolats présentant une sensibilité intermédiaire à la vancomycine (vancomycine intermédiaire *S. aureus* [VISA] ; CMI, 4-8 g/mL), et (2) rarement, résistance élevée à la vancomycine (*S. aureus* résistant à la vancomycine [VRSA] ; CMI 16 g/mL) (Tenover et Moellering, 2007 ; Munita et al., 2015).

Concernant les souches du groupe streptocoques entérocoques, nos résultats montrent qu'ils sont plus résistants aux tétracyclines, et aux pénicillines, et une souche d'entérocoques est révélée résistante à la vancomycine.

Les entérocoques font partie de la flore normale intestinale des animaux et des humains. Plusieurs études ont démontré que les entérocoques d'origine animale pouvaient représenter un réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques pour la communauté humaine et animale. Les espèces *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* sont importantes en santé publique; elles sont responsables d'environ 12% de toutes les infections nosocomiales aux États-Unis. Au Canada, les cas de colonisation et/ou d'infections à entérocoques résistants à la vancomycine ont plus que triplé de 2005 à 2009.

Le mécanisme de l'ERV est l'acquisition de groupes de gènes *van*, probablement à partir d'organismes environnementaux. Le groupe de gènes le plus fréquent est *vanA*, généralement situé dans un transposon de la famille Tn3 (Tn1546) qui a été trouvé dans des plasmides conjugatifs et non conjugatifs. De plus, 8 autres *van* clusters (*vanBCDEGLMN*) ont été caractérisés dans des isolats d'entérocoques.

Ces groupes de gènes codent pour une machinerie enzymatique complexe qui modifie les terminaisons terminales D-Ala-D-Ala des précurseurs du peptidoglycane et détruit les précurseurs de terminaison D-Ala-D-Ala « normaux ». Le plus souvent, le D-Ala-D-Ala est remplacé par le D-Ala-D-lactate, diminuant l'affinité de la vancomycine pour son cible d'environ 1000 fois. D-Ala-D-Ala peut aussi être remplacé par la D-Ala-D-sérine, qui affecte l'affinité de la vancomycine pour sa cible à un degré moindre (entraînant une résistance de niveau relativement faible (**Munita et al., 2015**)).

Notre étude a démontré aussi une résistance aux céphalosporines de 3^e génération Céfotaxime pour quatre souches d'entérobactéries, et une seule souche résistante aux céphalosporines de 4^e génération Cefoprime.

L'évolution constante des mécanismes de résistances et de transfert de gènes de résistance ont mené à l'émergence de souches d'entérobactéries résistant à presque tous les antibiotiques disponibles sur le marché, sans autres possibilités de traitement. En effet, le spectre de résistance devient de plus en plus large, on parle actuellement de β -lactamases à spectre élargi (ESBL). Le Réseau algérien sur la Résistance aux Antimicrobiens rapporte pour l'année 2016 des taux de BMR par espèce qui montrent que pratiquement une entérobactérie sur trois, soit 30,39 % (1309/4307) est productrice d'une bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE).

La résistance aux β -lactames et plus précisément aux céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} génération et aux carbapénèmes devient de plus en plus fréquente chez certaines entérobactéries de prévalence élevée comme *Klebsiella* et *Escherichia*. Ceci est une réelle menace pour la santé humaine et animale ainsi que pour l'avenir de l'antibiothérapie (**Sonnet, 2020**).

Pour les *Pseudomonas* nous avons constaté que cinq souches parmi sept sont résistantes à l'amoxiciline et à la ticarciline et deux souches sont résistantes à la 3^{ème} génération de céphalosporine (Céftazidime).

P. aeruginosa est probablement l'espèce bactérienne pathogène présentant la diversité la plus large en termes de β -lactamases acquises. Ces enzymes sont quasi exclusivement codées

par des plasmides. Les β -lactamases de classe A d'Ambler (sérine- β -lactamases, sensibles aux inhibiteurs) les plus fréquentes chez *P. aeruginosa* sont celles du groupe PSE (CARB). Il s'agit le plus souvent de pénicillinases à spectre étroit n'hydrolysant que les carboxy- et les uréido-pénicillines, l'activité des inhibiteurs (clavulanate, tazobactam), des céphalosporines, de l'aztréonam et des carbapénèmes étant conservée (**Barbier et Wolff, 2010**)

La deuxième étape de notre étude consiste à déterminer et sélectionner les gènes de résistances dans les bactéries qui présentent un profil de résistance important. Les méthodes PCR pour l'amplification de séquences d'ADN ont été utilisées pour détecter des gènes spécifiques de résistance aux antimicrobiens ou identifier des agents pathogènes dans des échantillons cliniques (**Capelo-Martínez et Igrejas, 2020**).

Nous avons détecté des gènes de résistance pour les bactéries qui appartient à la famille des entérobactéries, après une amplification génique PCR avec des amorces divers de gènes de résistances. En effet, nous avons constaté la présence des gènes *tet A* et *tem 14* impliqués dans la résistance au bêta-lactamines et aux tétracyclines, respectivement, chez 8 souches appartenant toutes au groupe entérobactéries.

Nos résultats corroborent avec ceux de **Chagas et al. en 2011** qui ont étudié la diversité bactérienne et les modèles de résistance aux antimicrobiens et les types de gènes de bêta-lactamase dans les bactéries Gram-négatives isolées d'une station d'épuration des eaux usées d'un hôpital situé dans la ville de Rio de Janeiro. Il détecté 89 sur 221 isolats identifiés et caractérisés comme producteurs de bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE). Les micro-organismes non pathogènes et certains genres pathogènes ont été quantifiés. Les isolats producteurs de BLSE les plus retrouvés étaient *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* et *Escherichia coli*. Les gènes *bla*, *tem*, *bla*, *SHV* et *blaCTX-M* ont été détectés dans 82, 48 et 67 % des isolats bactériens, respectivement.

En 2012, une étude a conclu que il y'avais un niveau important de résistance aux antibiotiques des microorganismes retrouvé dans l'eau de mer des plages de la région d'Alger, principalement chez les bactéries saprophytes de l'environnement. Cette résistance aux antibiotiques semble dépendante du niveau des apports anthropiques que reçoivent ces milieux. La détection d'une *E. coli* productrice de CTXM-15 dans l'eau de mer peut signifier que la contamination de l'environnement par des bactéries résistantes peut être le point de départ d'une dissémination de gènes de résistance dans ces eaux côtières, avec des risques sanitaires par contact de l'homme avec ces eaux récréatives (**Alouache, 2012**).

Dans notre étude aucun gène de résistance aux antibiotiques n'a été détecté pour les 04 souches de *Pseudomonas* et les souches 05 de *Staphylococcus* et aussi pour les 05 d'entérocoques.

Une étude réalisée en Tunisie en 2017, a détecté pour la 1^{ère} fois le gène *optrA* dans un pays africain au sein d'un plasmide mosaïque transférable d'origine différente pour des souches d'entérocoques. Son identification dans des isolats provenant de sources environnementales est préoccupante et alerte sur la nécessité d'une surveillance mondiale concertée de l'apparition et de la propagation de l'*optrA*. (Freitas et al., 2017)

Les auteurs ont utilisé des isolats d'entérocoques résistants au chloramphénicol (>16 mg/L, n = 245) provenant de différentes sources (hôpitaux/humains sains/eaux usées/animaux) au Portugal, en Angola et en Tunisie (1996-2016) ont été sélectionnés. Les gènes de résistance au phenicol (huit variantes de *cat*(*fexA*, *fexB*) ou au phenicol + oxazolidinone (*cfr*, *cfrB*, *optrA*) ont été recherchés par PCR. La sensibilité (diffusion sur disque/microdilution), l'accouplement sur filtre, la stabilité de la résistance aux antibiotiques (500 générations bactériennes), le typage plasmidique (S1-PFGE/hybridation), MLST et WGS (Illumina-HiSeq) ont été réalisés pour les isolats *optrA*-positifs (Freitas et al., 2017).

Ces résultats ne sont pas compatibles à notre étude parce que on a pas finalement détecté et caractériser un gène de résistances pour les entérocoques.

Les huit souches présentant les gènes ont fait l'objet d'une identification moléculaire par le biao de séquençage du gène codant de l'ARN 16S. Les résultats montre que 7 souches appartenaient à deux clades d'entérobactéries, le premier dominé par le genre *Citrobacter* et le deuxième par les genres *Escherichia/Shigella*.

Malgré l'appartenance aux clades d'entérobactéries, le degré de similitude avec les séquences disponibles dans les banques de données publiques (GenBank) était inférieur à 97%, ce résultat montre l'importance taxonomique des souches isolées, ces dernières peuvent être décrite comme des nouvelles espèces. D'autres tests plus avancés sont nécessaire pour confirmer ce résultat.

En effet, le séquençage du génome entier de ces bactéries sera obtenu grâce à l'utilisation de l'outil séquençage de nouvelle génération disponible au niveau de la plateforme Génomique – Bioinformatique de l'Institut Pasteur d'Algérie.

Conclusion

Conclusion

Selon l’OMS, en 2050, la mortalité annuelle par infection à bactéries mutirésistantes (BMR) occupera le 1er rang avec 10 millions de décès, largement devant le cancer (8,2 millions) et les autres pathologies comme le diabète (1,5 millions), ou les diarrhées infectieuses (1,4 millions). La résistance des bactéries aux antibiotiques constitue donc une menace réelle sur la santé publique qui touche tous les pays sans distinction y compris l’Algérie.

Les eaux usées sont exposées de façon chronique à de multiples contaminants chimiques, dont les antibiotiques, auxquels s’ajoutent des apports en bactéries résistantes. Ce sont, de ce fait, des environnements vulnérables, d’autant plus qu’ils sont proches des sources de contamination (rejet hospitalier, rejet industriel ou pisciculture). L’enrichissement du résistome bactérien des sédiments en gènes de résistance dans un environnement où des concentrations subinhibitrices en antibiotiques pourraient être atteintes rend ce compartiment propice à la dissémination de gènes de résistance au sein des communautés microbiennes.

Notre travail a porté sur l’évaluation et la caractérisation de la résistance aux antibiotiques dans des eaux usées traitées rejetées à la mer (plages d’Ain Benian).

La résistance bactérienne aux antibiotiques des 93 isolats s’est révélée plus importante pour les entérobactéries qui présentent des phénotypes de résistances de BLSE, céphalosporines haut niveau et de Pénicillinase haut niveau, aussi pour les staphylocoques et les entérocoques qui présentent par deux souches résistantes à la vancomycine.

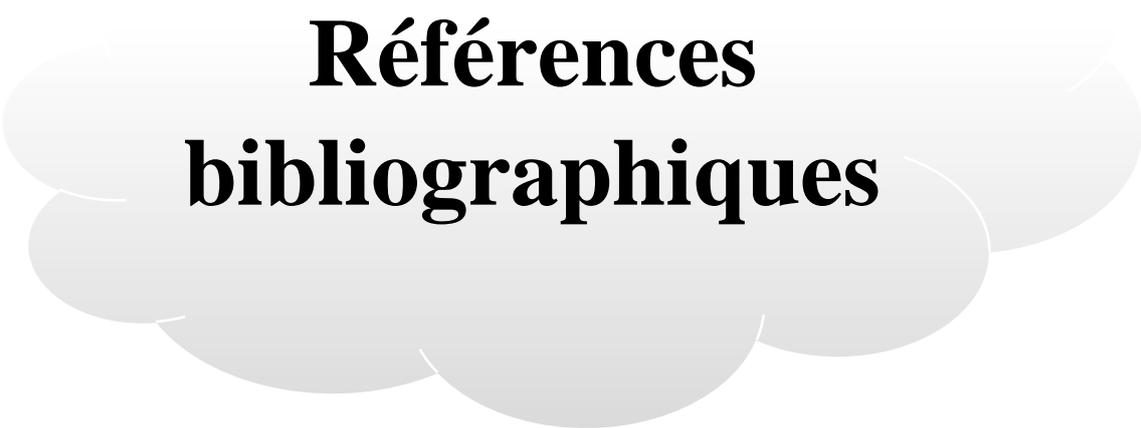
Les résultats de la recherche de gènes de résistance chez 31 bactéries présentant un profil de résistance important, ont montré la présence des gènes *tet A* et *tem*, 14 impliqués dans la résistance aux bêta-lactamines et aux tétracyclines, respectivement, chez 8 souches appartenant toutes au groupe entérobactéries. 4 souches d’entre elles possèdent les deux gènes à la fois. Le gène *tem* est retrouvé également chez quatre autres souches d’entérobactéries.

Les résultats d’identification moléculaire de 7 de ces souches a montré leur appartenance à deux classes d’entérobactéries, le premier dominé par le genre *Citrobacter* et le deuxième par les genres *Escherichia/Shigella*.

A l’issu de notre travail nous avons pu démontrer que :

- ✓ le traitement biologique des eaux usées dans les stations d'épuration peut conduire à une concentration de la résistance aux antibiotiques dans les effluents traités. Ces derniers évacués vers les cours d'eau favoriseraient la dissémination de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement aquatiques.
- ✓ Un niveau important de résistance aux antibiotiques a été retrouvé dans l'eau de mer des plages de la région d'Alger. La détection des souches productrice de bêta-lactamase dans l'eau de mer peut signifier que la contamination de l'environnement par des bactéries résistantes peut être le point de départ d'une dissémination de gènes de résistance dans ces eaux côtières, avec des risques sanitaires par contact de l'homme avec ces eaux récréatives.

A la fin, des investigations plus fines seront conduites pour déterminer l'identification taxonomique exacte de ces bactéries. En effet, le génome entier de ces bactéries sera obtenu grâce à l'utilisation de l'outil séquençage de nouvelle génération disponible au niveau de la plateforme Génomique – Bioinformatique de l'Institut Pasteur d'Algérie



**Références
bibliographiques**

Références bibliographiques

- Almakki, A.Q.M., 2017.** Résistance aux antibiotiques dans des eaux urbaines péri-hospitalières considérées dans un continuum hydrologique (phdthesis). Université Montpellier.
- Alouache, S., 2012.** Prévalence et caractérisation de la résistance aux agents antimicrobiens chez les bacilles à Gram négatif isolés de l'environnement 182.
- Anaïs Veysiere.** La résistance aux antibiotiques des bactéries les plus communément rencontrées dans les infections communautaires état des lieux en 2019. Sciences du Vivant [qbio]. 2019
- Balsalobre, L., Blanco, A., Alarcón, T., 2019.** Beta-Lactams. pp. 57–72.
- Barbier, F., Wolff, M., 2010.** Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa* - Vers l'impasse thérapeutique ? *Med Sci (Paris)* 26, 960–968.
- Berendonk, T.U., Manaia, C.M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Bürgmann, H., Sørum, H., Norström, M., Pons, M.-N., Kreuzinger, N., Huovinen, P., Stefani, S., Schwartz, T., Kisand, V., Baquero, F., Martinez, J.L., 2015.** Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat Rev Microbiol* 13, 310–317.
- Birnbaum, J., Kahan, F.M., Kropp, H., Macdonald, J.S., 1985.** Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics: Discovery and development of imipenem/cilastatin. *The American Journal of Medicine, Carbapenems: A New Class of Antibiotics* 78, 3–21.
- Birošová, L., Mackul'ak, T., Bodík, I., Ryba, J., Škubák, J., Grabic, R., 2014.** Pilot study of seasonal occurrence and distribution of antibiotics and drug resistant bacteria in wastewater treatment plants in Slovakia. *Science of the Total Environment* 490, 440–444.
- Brian J. Werth, 2020a.** Triméthoprim et sulfaméthoxazole - Maladies infectieuses. Édition professionnelle du Manuel MSD.
- Brian J. Werth, 2020b.** Rifamycines - Infections. Manuels MSD pour le grand public.
- Bush, K., Bradford, P.A., 2016.** β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6, a025247.
- Butler, M.S., Hansford, K.A., Blaskovich, M.A.T., Halai, R., Cooper, M.A., 2014.** Glycopeptide antibiotics: Back to the future. *J Antibiot* 67, 631–644.
- Buxeraud, J., Faure, S., 2016.** Les macrolides et les cyclines. *Actualités Pharmaceutiques* 55, 7–12. Capelo-Martínez, J.-L., Igrejas, G. (Eds.), 2020. Antibiotic drug resistance, First edition. ed. Wiley, Hoboken, NJ.
- Chandrika, N.T., Garneau-Tsodikova, S., 2018.** Comprehensive review of chemical strategies for the preparation of new aminoglycosides and their biological activities. *Chem. Soc. Rev.* 47, 1189–1249.

- Christou, A., Agüera, A., Bayona, J.M., Cytryn, E., Fotopoulos, V., Lambropoulou, D., Manaia, C.M., Michael, C., Revitt, M., Schröder, P., 2017.** The potential implications of reclaimed wastewater reuse for irrigation on the agricultural environment: the knowns and unknowns of the fate of antibiotics and antibiotic resistant bacteria and resistance genes—a review. *Water research* 123, 448–467.
- Correia, V.G., Pinheiro, B.A., Carvalho, A.L., Palma, A.S., 2019.** Resistance to aminoglycosides: Glycomics and the link to the human gut microbiome. *Antibiotic Drug Resistance* 1–38.
- D. Lebrun, M.B., 2016.** Pénicillines et inhibiteurs de bêta-lactamases. EM-Consulte.
- Dauvergne, E., 2018.** Détection de gènes de résistance aux antibiotiques dans les bactéries isolées des produits de la mer 56.
- De Oliveira, D.M.P., Forde, B.M., Kidd, T.J., Harris, P.N.A., Schembri, M.A., Beatson, S.A., Paterson, D.L., Walker, M.J., 2020.** Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin Microbiol Rev* 33.
- Digabel, Y.L., 2013.** Etude de la diversité bactérienne et génétique dans des cultures dégradant l'ETBE ou le MTBE 177.
- D.Larzul, 1989.** La PCR : principes et applications. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 4, 19-IN6.
- Eddens, T., Wolfe, R., Nowalk, A., Forno, E., Campfield, B.T., 2021.** The association of trimethoprim-sulfamethoxazole with improved lung function in pediatric asthma. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 126, 440–442.
- Emilie Cardot Martin, Oana Dumitrescu, 2019.** La résistance aux antibiotiques. Planet-Vie.
- Emilie Dauvergne.** Détection de gènes de résistance aux antibiotiques dans les bactéries isolées des produits de la mer. *Microbiologie et Parasitologie*. 2018. fhal-02010604
- Erwin van Dijk, Claude Thermes, 2021.** La révolution de la génomique : les nouvelles méthodes de séquençage et leurs applications. Planet-Vie.
- Fernandes, R., Amador, P., Prudêncio, C., 2013.** β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Reviews in Medical Microbiology* 24, 7–17.
- Freitas, A.R., Elghaieb, H., León-Sampedro, R., Abbassi, M.S., Novais, C., Coque, T.M., Hassen, A., Peixe, L., 2017.** Detection of *optrA* in the African continent (Tunisia) within a mosaic *Enterococcus faecalis* plasmid from urban wastewaters. *J Antimicrob Chemother* 72, 3245–3251.
- Gendrin, v, 2012.** Acide fusidique. EM-Consulte.
- Gilles Camus, 2009.** L'électrophorèse. Planet-Vie.
- Hanberger, H., Edlund, C., Furebring, M., G. Giske, C., Melhus, Å., Nilsson, L.E., Petersson, J., Sjölin, J., Ternhag, A., Werner, M., Eliasson, E., 2013.** Rational use of

aminoglycosides—Review and recommendations by the Swedish Reference Group for Antibiotics (SRGA). *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 45, 161–175.

Harnisz, M., Korzeniewska, E., Ciesielski, S., Golaś, I., 2015. tet genes as indicators of changes in the water environment: Relationships between culture-dependent and culture-independent approaches. *Science of The Total Environment* 505, 704–711.

HASSANZADEH, S., POURMAND, M.R., AFSHAR, D., DEHBASHI, S., MASHHADI, R., 2016. TENT: A Rapid DNA Extraction Method of *Staphylococcus aureus*. *Iran J Public Health* 45, 1093–1095.

Jia, B., Raphenya, A.R., Alcock, B., Waglechner, N., Guo, P., Tsang, K.K., Lago, B.A., Dave, B.M., Pereira, S., Sharma, A.N., et al. (2017). CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res.* 45, D566–D573.

Joly, D., Faure, D., and Salamitou, S. (2015). Empreinte du vivant.

KASSAH-LAOUAR, K.-L., Oudjih, M., Chiboub, B., 2020. Les antibiotiques De la définition princeps à la totorésistance 110.

Lamoril, J., Ameziane, N., Deybach, J.-C., Bouizegarène, P., Bogard, M., 2008. Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 23, 260.

Laure, D., 1999. Antibiorésistance bactérienne dans l'eau : problématique de la transmission de l'animal à l'homme. 70.

Liang, J.-H., Han, X., 2013. Structure-Activity Relationships and Mechanism of Action of Macrolides Derived from Erythromycin as Antibacterial Agents. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 13, 3131–3164.

Martínez, J.L., Coque, T.M., and Baquero, F. (2015). What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nat. Rev. Microbiol.* t3, 116–123.

McArthur, A.G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M.A., Baylay, A.J., Bhullar, K., Canova, M.J., De Pascale, G., Ejim, L., et al. (2013). The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3348–3357.

Mendes RE, Tsakris A, Sader HS, et al. Characterization of methicillinresistant *Staphylococcus aureus* displaying increased MICs of ceftaroline. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67:1321–4.

Meziti, A., Tsementzi, D., Ar Kormas, K., Karayanni, H., and Konstantinidis, K.T. (2016). Anthropogenic effects on bacterial diversity and function along a river-to-estuary gradient in Northwest Greece revealed by metagenomics. *Environ. Microbiol.* t8, 4640–4652.

Manaia, C.M., Rocha, J., Scaccia, N., Marano, R., Radu, E., Biancullo, F., Cerqueira, F., Fortunato, G., Iakovides, I.C., Zammit, I., Kampouris, I., Vaz-Moreira, I., Nunes, O.C., 2018. Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: Tackling the black box. *Environment International* 115, 312–324.

- Mao, D., Luo, Y., Mathieu, J., Wang, Q., Feng, L., Mu, Q., Feng, C., Alvarez, P.J.J., 2014.** Persistence of Extracellular DNA in River Sediment Facilitates Antibiotic Resistance Gene Propagation. *Environ. Sci. Technol.* 48, 71–78.
- Marie, C., 2017.** LA DISPENSATION DES FLUOROQUINOLONES PAR LE PHARMACIEN D'OFFICINE. UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER.
- MAURIN Max, 2018.** Antibiotiques, antibiorésistance et environnement. Encyclopédie de l'environnement.
- Munita, J.M., Bayer, A.S., Arias, C.A., 2015.** Evolving Resistance Among Gram-positive Pathogens. *Clin Infect Dis.* 61, S48–S57.
- Muylaert, A., Mainil, J., 2013.** Résistance bactériennes aux antibiotiques, les mécanismes et leur “contagiosité.” *Annales de Médecine Vétérinaire* 156.
- Ouyang, W.–Y., Huang, F.–Y., Zhao, Y., Li, H., and Su, J.–Q. (2015).** Increased levels of antibiotic resistance in urban stream of Jiulongjiang River, China. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 5697–5707.
- Papp-Wallace, K.M., Endimiani, A., Taracila, M.A., Bonomo, R.A., 2011.** Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55, 4943–4960.
- Pazda, M., Kumirska, J., Stepnowski, P., Mulkiwicz, E., 2019.** Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems – A review. *Science of The Total Environment* 697, 134023.
- Paterson, D.L., and Bonomo, R.A. (2005).** Extended–spectrum beta–lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* t8, 657–686.
- Riber, L., Poulsen, P.H.B., Al–Soud, W.A., Skov Hansen, L.B., Bergmark, L., Brejnrod, A., Norman, A., Hansen, L.H., Magid, J., and Sørensen, S.J. (2014).** Exploring the immediate and long–term impact on bacterial communities in soil amended with animal and urban organic waste fertilizers using
- Rowe, W., Verner–Jeffreys, D.W., Baker–Austin, C., Ryan, J.J., Maskell, D.J., and Pearce, G.P. (2016).** Comparative metagenomics reveals a diverse range of antimicrobial resistance genes in effluents entering a river catchment. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 73, 1541–1549.
- Sagar Aryal, 2019.** Potassium Hydroxide Test - Principle, Procedure, Uses and Interpretation. *Microbiology Info.com.* Saima, S., Fiaz, M., Zafar, R., Ahmed, I., Arshad, M., 2020. Dissemination of antibiotic resistance in the environment, in: *Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes in the Environment.* Elsevier, pp. 99–116.
- Saima, S., Fiaz, M., Zafar, R., Ahmed, I., Arshad, M., 2020.** Dissemination of antibiotic resistance in the environment, in: *Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes in the Environment.* Elsevier, pp. 99–116.
- Salloto, G.R.B., Cardoso, A.M., Coutinho, F.H., Pinto, L.H., Vieira, R.P., Chaia, C., Lima, J.L., Albano, R.M., Martins, O.B., and Clementino, M.M. (2012).** Pollution impacts on bacterioplankton diversity in a tropical urban coastal lagoon system. *PloS One* 7, e51175.

- Seydina, 2016.** Mécanismes de résistance des bactéries aux agents antimicrobiens
- Sarkar, P., Haldar, J., 2019.** Glycopeptide Antibiotics: Mechanism of Action and Recent Developments. *Antibiotic Drug Resistance* 73–95.
- Sonnet, M., 2020.** Les entérobactéries face aux céphalosporines de 3ème génération et carbapénèmes : évolution, actualité, problématique 34.
- Tenover FC, Moellering RC Jr.** The rationale for revising the Clinical and Laboratory Standards Institute vancomycin minimal inhibitory concentration interpretive criteria for *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2007; 44:1208–15
- Veysié, A., 2020.** La résistance aux antibiotiques des bactéries les plus communément rencontrées dans les infections communautaires état des lieux en 2019 107.
- Watts, J.E.M., Schreier, H.J., Lanska, L., Hale, M.S., 2017.** The Rising Tide of Antimicrobial Resistance in Aquaculture: Sources, Sinks and Solutions. *Marine Drugs* 15, 158.
- Yala, D., Merad, A.S., Mohamedi, D., Korich, M.N.O., 2001.** Classification et mode d'action des antibiotiques 8.
- Yang, C., Pan, H., Liu, Y., Zhou, X., 2014.** Selection of Reference Genes for Expression Analysis Using Quantitative Real-Time PCR in the Pea Aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Hemiptera, Aphidiae). *PLOS ONE* 9, e110454.

Annexes

Annexes

Annexe 1.

Tableau XVII. Témoin positif d'ADN

gène recherché	Témoin positif d'ADN
<i>oxa-23</i>	bla _{oxa-23}
<i>oxa-24</i>	bla _{oxa-24}
<i>oxa-48</i>	bla _{oxa-48}
<i>oxa-58</i>	bla _{oxa-58}
<i>shv</i>	bla _{SHV}
<i>erm</i>	bla _{erm}
<i>ndm</i>	bla _{NDM}
<i>mcr</i>	bla _{mcr}
<i>ctx m</i>	bla _{CTX M}
<i>tem</i>	bla _{TEM}
<i>mec a</i>	bla _{MEC A}
<i>tet X</i>	bla _{Tet X}
<i>tet A</i>	bla _{Tet A}
<i>sul</i>	bla _{sul}

Annexe 2.

Tableau XVIII. Matériels non biologiques utilisés

Milieu de culture	<ul style="list-style-type: none"> • Gélose nutritif (GN), • Hektoen, • Chapman, • Gélose Columbia au sang • Mueller-Hinton (MH) • Gélose conservateur • BHIB
Réactif	<ul style="list-style-type: none"> • taq polymérase • Tp 10X • dNTP • ddNTP • Amorce F • Amorce R • TENT buffer pH 8.0 • Tris -HCl • gel d'agarose à 0.8% • Tampon PE • Tampon PB • Tampon EB • Big Dye • Séphadex
Produit chimique	<ul style="list-style-type: none"> • H₂O₂ • KOH a 3% • Ethanol • Mgcl₂
Appareillage	<ul style="list-style-type: none"> • Autoclave • Sécheuse • Incubateur • Thermocycleur • Vortex • spectrophotomètre • Electrophorèse • Densitomètre • Centrifugeuse • Bain marie • pH neutre • Spiner • PS3 • Séquenceur
Verrerie	<ul style="list-style-type: none"> • Bicher • Flacon en verre • Tube en verre • Pipette pasteur

Autre matériel

- Boite pétri
 - Micropipette 1000ul, 200ul, 100ul, 50ul, 10ul
 - Plaque MAHV N45
 - Plaque collectrice
 - Cône stérile 200ul, 10ul
-

Annexe 3.

- **Le protocole d'extraction « Technique boiling»**

1. Prend 150 μ L de l'eau distillée stérile + quelques colonies environ 5 colonies, mélangé la suspension avec le Vortex
2. Réglez le bain-marie à 100 ° C ou faites bouillir de l'eau dans un récipient.
3. Gardez les tubes à centrifuger contenant la culture bactérienne dans de l'eau bouillante pendant 10 min.
4. Enclenchez immédiatement les tubes à centrifuger dans de la glace pendant 5 min.
5. Après incubation sur de la glace, centrifuger le tube à 10 000 tr/min pendant 5 min à 4 ° C.
6. Transférer le surnageant dans un nouveau tube et conservez-le à 4 ° C jusqu'à utilisation ultérieure.

- **Le protocole d'extraction « Tent »**

La technique a été réalisée comme suit :

1. Les bactéries ont été cultivées sur milieu Trypic Soy Agar (TSA) pendant 24h à 37 C°
 - a) Alternativement, les souches sont mises en culture dans un milieu liquide B.H.I.B à 37C° pendant 24h.
 - b) Transférer 1ml de suspension dans un micro-tube de 1.5ml, centrifuger 5min à 10000rpm
 - c) Eliminer le surnageant.
 - d) Remplir à nouveau avec 1ml de suspension dans le même tube, centrifuger 5min à 10000rpm
 - e) Eliminer le surnageant.
2. Remplir le tube avec 1ml d'eau physiologique stérile.
3. Vortexer pour re-suspendre le culot
4. Centrifuger 5min à 10000rpm
5. Eliminer le surnageant.
6. Re-suspendre dans 300ul de solution TENT
7. Vortexer
8. Bouillir à 100C° pendant 15min puis centrifuger 5min à 10000rpm

9. Transférer le surnageant dans un nouveau micro-tube
10. Ajouter 2.5 volumes d'éthanol à 95%
11. Conserver les tubes à -20C° pendant 20min
12. Centrifuger 12min à 12000rpm
13. Eliminer le surnageant
14. Renverser les tubes et les laisser sécher jusqu'à évaporation complète de l'éthanol
15. Re-suspendre avec 30ul d'eau distillée stérile et conserver à -20C°

Annexe 4.

Protocole de purification du produit PCR avec le kit Qiagen

- Ajouter de l'éthanol (96-100%) au tampon PE avant utilisation (voir l'étiquette du flacon pour le volume)
 - Toutes les étapes de la centrifugation sont à 13 000 tr/min (17 900 x g) dans une microcentrifugeuse de table conventionnelle
1. ajouter 5 volumes de tampon PB à 1 volume d'échantillon PCR et mélanger. il n'est pas nécessaire d'éliminer les huiles minérales ou le kérosène. Par exemple, ajoutez 500 ul de tampon PB à 100 ul d'échantillon PCR (non compris oll)
 2. placer une colonne de centrifugation QIAquick dans un tube de prélèvement de 2 ml fourni
 3. pour lier l'ADN, appliquez l'échantillon à la colonne QIAquick et centrifugez pendant 30-60s
 4. jeter le flux continu. replacer la colonne QIAquick dans le même tube. les tubes de collecte sont réutilisés pour réduire les déchets plastiques
 5. pour laver, ajouter 0,75 ml de tampon PE à la colonne rapide QIA et centrifuger pendant 30-60 s
 6. jeter le flux continu et placer la colonne rapide QIA dans le même tube. Centrifuger la colonne pendant 1 min supplémentaire/ **important** : l'éthanol résiduel du tampon PE ne sera pas complètement éliminé à moins que l'écoulement ne soit éliminé avant cette centrifugation supplémentaire
 7. placer la colonne QIAquick dans un tube de microcentrifugation propre de 1,5 ml
 8. pour éluer l'ADN, ajouter 50 ul de tampon EB (10 mM Tris-CL, PH = 8,5) ou H₂O au centre de la membrane QIAquick et centrifuger la colonne pendant 1 min
Alternativement., pour augmenter la concentration d'ADN, ajoutez 30 ul de tampon d'élution au centre de la membrane QIAquick, laissez la colonne reposer pendant 1 min et la centrifugeuse

Annexe 5

Purification de la réaction de séquence par Séphadex

- ✓ Préparer du Séphadex 5% (ajouter 100ml d'Eau distillée RNAase DNAase free à 5g de Séphadex) laisser reposer 1h
- ✓ Superposer une plaque (MAHVN45) et une plaque collectrice (MicroAmp)
- ✓ Ajouter 400 µl de Séphadex sur le dispositif, centrifuger 1 min à 500 g 4C° et jeter l'eau
- ✓ Ajouter 200 µl de Séphadex 5% sur le dispositif, centrifuger 2min à 1200g 4C° et jeter la plaque collectrice
- ✓ Mettez une nouvelle plaque collectrice
- ✓ Ajouter 10 µl d'eau d'eau distillée dans la barrette PCR contenant la réaction Big Dye
- ✓ Transférer les 20µl (10 µl eau + 10 µl réaction Big Dye) sur la plaque Séphadex
- ✓ Centrifuger 2 min à 1200g 4C°
- ✓ La plaque collectrice est prête à être mise sur le séquenceur

