

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 1945 قالمة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité/Option : Biologie moléculaire et cellulaire
Département : Biologie

Étude moléculaire de l'antibiorésistance des bactéries isolées des hôpitaux

Présenté par : BOUDJEHEM Radhia

GHOUL Ahlem

KACHI Rawya

Devant le jury composé de :

Président : Pr. BENOURETH Djamel Eddine

Université de Guelma

Examineur : Dr. TORCHE Esma

Université de Guelma

Encadreur : Dr. KHALLEF Messaouda

Université de Guelma

Juin 2018

Remerciements

Nous tenons à remercier en premier lieu « ALLAH » le tout puissant et miséricordieux, de nous avoir donné la patience et l'énergie pour dépasser toutes les difficultés et d'avoir permis à ce modeste travail d'aboutir à son terme.

Tout d'abord, nous adressons nos sincères remerciements plus particulièrement aux enseignants, intervenants qui ont accepté de juger ce travail et de l'enrichir par leurs remarques et conseils.

*Avant tout, nous voudrions adresser notre gratitude et nos chaleureux remerciements à la directrice de ce mémoire, Docteur **Khallef. M**, pour le choix du thème, pour son suivi tout au long du déroulement de ce projet, pour sa patience, sa rigueur scientifique exceptionnelle, ses critiques fructueuses et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter notre réflexion.*

*Nos sincères remerciements vont au Professeur **Benouareth. D**, pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury lors de la soutenance. Qu'il trouve ici nos plus vifs remerciements.*

*Notre reconnaissance va également au Docteur **Torche. E**, d'avoir accepté de faire partie du Jury et d'examiner ce travail. Qu'il nous soit ainsi permis de la remercier sincèrement.*

*Ce travail n'aurait pu être ce qu'il est sans l'intervention de près ou de loin de certaines personnes qui ont contribué à sa réalisation, pour cela nous tenons à remercier vivement le personnel du Laboratoire de l'hôpital El-hakim Okbi tout particulièrement : Docteur **Seridi** et M^{me} **Anissa** qui ont mis à notre disposition les souches bactériennes utilisées dans notre travail, et nous ont soutenu et témoigné leur amitié.*

Nos remerciements s'adressent également à tous les enseignants de la faculté des Sciences de la nature et de la vie et sciences de la Terre et de l'Univers de Guelma de nous avoir transmis énormément de choses sur le plan scientifique et de nous aider à avoir confiance en soi et à nos capacités,

Enfin, nous n'oublions jamais l'aide, les conseils et surtout les encouragements et le soutien moral de nos familles et de nos précieux amis.



Dédicace

Je dédie ce modeste travail

*À mes chers parents **Slimane** et **Nora** :*

Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler, je les remercie pour leur tendresse, leur soutien et leurs prières accompagnés tout au long mon parcours, vous m'avez transmis l'amour de la science et le savoir.

*À mes précieuses **Rawnek**, **Hanen** et **Rayene**,
Mes chers frères **Chakib** et **Sohaib***

Pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.

*À mes chères tentes **Aziza** et **Nadia**, pour leur amour et leur aide moral et pratique durant la réalisation de mon projet de fin d'étude.*

À toute ma famille, mes proches et mes amies.

*Je remercie mes binômes **Doda** et **Halouma**, pour les plus beaux souvenirs que je garderai toute ma vie.*

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible,

Merci d'être toujours là pour moi.

Raouia

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

*À Mes Très Chers Parents **Hamid** et **Salima***

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être

J'espère avoir répandre aux espoirs que vous avez fondés en moi, que dieu vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie

*À mes chères sœurs **Soumia**, **Yasmine**, **Nina**, **Marwa**
Pour leurs encouragements permanents et leur soutien moral*

*À mon cher frère **Islem** ma fierté dans cette vie*

*À mes chères cousines **Abir**, **Imen***

*À mon cher cousin **Wael** pour son soutien et ses encouragements*

*À toute ma famille paternelle et maternelle à mes chères amies d'enfance **Assia**, **Selma**, **Saïda**, **Sihem***

*Mes chères puces **Ahlem** (malikat électro) ,**Raouia** (Miss Bromure) pour le courage, le sourire, le bonheur, et tous les bons moments qu'on a passé ensemble*

A tout qui me connaisse de près ou de loin

***Radia** (Douda)*



Dédicace

Je dédie ce modeste travail

*À mes chers parents **Rachid** et **Khadidja***

Pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études, que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.

*À mes chères sœurs **Samia**, **Sabah**, **Besma** et **Houda**.*

Pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral, je vous souhaite une vie pleine de bonheur, de santé et de prospérité.

*À mes chères amies **Imen** et **Soumia**.*

Je vous aime mes chéries, belles princesses merci d'être toujours là pour moi que dieu vous garde.

*À mes chères binômes **Radia** et **Raouia***

Avec lesquels j'ai partagé mes moments de joie et de bonheur je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de réussite.

À toute ma famille

Pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire.

Ahlem (El Malika)



Table des matières

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction	1

Chapitre 1 : Infections nosocomiales

I. Généralités sur les infections nosocomiales	2
I.1 Définition des infections nosocomiales.....	2
I.2. Épidémiologie des infections nosocomiales	2
I.2.1 Réservoirs et sources	3
I.2.1.1 Les infections d'origine « endogène »	3
I.2.1.2 Les infections d'origine « exogène »	3
I.2.2 Modes de transmission.....	4
II. Les bactéries multi résistantes BMR	5
II.1 Définition de BMR.....	5
II.2 Les types de BMR	6
II.2.1 Staphylococcus aureus résistante à la méthicilline SARM	6
II.2.2 Bétalactamases à spectre élargi BLSE	6
II.2.3 Entérobactéries productrices de céphalosporinases (EBCASE)	6
II.2.4 Bactéries productrices de carbapénémases (EPC)	7
II.2.5 Résistance des entérobactéries aux fluoroquinolones(FQ)	7
II.2.6 Entérobactéries résistantes à la vancomycine (ERV).....	7
II.3. Les types des résistances	7
II.3.1 La résistance naturelle ou intrinsèque	7
II.3.2 La résistance acquise	8
II.4 Les mécanismes biochimiques de la résistance.....	8

Chapitre 2 : Support génétique de la résistance bactérienne

I. Les éléments génétiques responsables de la résistance bactérienne	10
I.1 Les plasmides	11
I.1.1 Définition	11
I.1.2 Les caractéristiques de plasmide	11
Les plasmides présentent certaines propriétés propres :	11
I.1.3 Les plasmides F.....	12
I.1.4 Les plasmides R	12
I.2 Les transposons	13
I.2.1 Définition	13
I.2.2 Structure et diversité des transposons procaryotes.....	13
I.2.2.1 Les séquences d'insertion ISs :	13
I.2.2.2 Les transposons composites :	14
I.2.2.3 Les transposons non composites :	14

I.2.2.4	Les transposons conjuguatifs :	15
I.3	Les intégrons	15
I.3.1	Définition et structure des intégrons	15
I.3.1.1	La plateforme fonctionnelle	16
I.3.1.2	La région variable : Les cassettes.....	17
I.3.2	Types de l'intégrons	19
I.3.3	Origine des intégrons	20
II.	Les moyens de transfert génétique	20
II.1	La transformation	21
II.2	La conjugaison	22
II.3	La transduction.....	23

Chapitre 3 : Expérimentation

I. Matériel et méthodes

I.	Objectif de l'étude	24
II.	Matériel biologique	24
III.	Culture des bactéries	24
IV.	Extraction plasmidique.....	27
IV.1	Récupération des cellules bactériennes	27
IV.2	Lyse alcaline.....	27
V.	Spectrophotométrie	29
-	Qualité et quantification de l'extrait	29
VI.	Électrophorèse.....	30
-	Préparation du gel	30
-	Dépôt des échantillons et migration.....	30
-	Coloration et visualisation	31
-	Analyse de gel.....	31
VII.	Transformation	32

II. Résultats et discussion

I.	Résultats	34
I.1	Extraction d'ADN plasmidique.....	34
I.2	Quantification de concentration d'ADN plasmidique.....	34
I.3	Électrophorèse.....	37
-	Poids moléculaire.....	38
-	Analyse de gel.....	40

I.4 Transformation	51
- Analyse de gel.....	51
- Poids moléculaire.....	52
II. Discussion	54
Conclusion.....	58
Résumé	
Références bibliographiques	
Annexe	

Liste des figures

Figure	Titre	Page
Figure 1	Transmission endogène	3
Figure 2	Transmission exogène	4
Figure 3	Chaine épidémiologique des infections nosocomiales	5
Figure 4	Les principaux mécanismes de la résistance aux antibiotiques	9
Figure 5	Un plasmide R avec des gènes de résistance portés dans un transposon	12
Figure 6	Structure d'une séquence d'insertion	13
Figure 7	Structure des transposons composites	14
Figure 8	Structure des transposons non composites	14
Figure 9	Structure usuelle des intégrons	16
Figure 10	Structure d'une cassette	17
Figure 11	Mécanisme d'intégration et d'excision de cassettes	19
Figure 12	Les bactéries échangent de l'ADN par plusieurs processus	21
Figure 13	Transformation naturelle	22
Figure 14	Les types de transfert d'ADN peuvent avoir lieu au cours de la conjugaison	23
Figure 15	Ensemencement des souches sur des milieux d'isolement spécifiques	24
Figure 16	Exécution de l'extraction de l'ADN plasmidique	28
Figure 17	Déroulement d'électrophorèse.	31
Figure 18	Exécution de la transformation + l'extraction plasmidique	33
Figure 19	Aspect du culot de l'ADN plasmidique	34
Figure 20	Les concentrations en ADN des souches utilisées	36
Figure 21	Profil électrophorétique de l'ADN plasmidique	38
Figure 22	Les valeurs du poids moléculaire d'ADN plasmidique obtenues par le logiciel	39
Figure 23	Profil électrophorétique de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (1) (4R+I) traité par le logiciel	40
Figure 24	Profil électrophorétique de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (2) (3R) traité par le logiciel	41
Figure 25	Profil électrophorétique de <i>Klebsiella oxytoca</i> (6R) traité par le logiciel	41
Figure 26	Profil électrophorétique d' <i>E. coli</i> 2322 (6R) traité par le logiciel	42
Figure 27	Profil électrophorétique d' <i>E. coli</i> (8R) traité par le logiciel	43
Figure 28	Profil électrophorétique de <i>E. coli</i> 379 (6R) traité par le logiciel	43
Figure 29	Profil électrophorétique d' <i>E. coli</i> 379 (6R) traité par le logiciel	44
Figure 30	Profil électrophorétique d' <i>E. coli</i> 2278 (4R) traité par le logiciel	44
Figure 31	Profil électrophorétique de <i>Staphylococcus sp</i> (8R+2I) traité par le logiciel	45

Figure 32	Profil électrophorétique de <i>Staphylococcus aureus</i> 358 (4R) traité par le logiciel	46
Figure 33	Profil électrophorétique de <i>Staphylococcus aureus</i> P13 (4R) traité par le logiciel	46
Figure 34	Profil électrophorétique de <i>Citrobacter koseri</i> (6R) traité par le logiciel	47
Figure 35	Profil électrophorétique de <i>Acinetobacter baumannii</i> 312 (7R) traité par le logiciel	47
Figure 36	Profil électrophorétique de <i>Proteus sp</i> (3R) traité par le logiciel	48
Figure 37	Profil électrophorétique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (R1) traité par le logiciel	48
Figure 38	Rapport entre la quantité en ADN plasmidique et le nombre de bande obtenu par électrophorèse	50
Figure 39	Profil d'électrophorèse de la transformation	51
Figure 40	Profil électrophorétique de <i>E. coli</i> (R8) traité par le logiciel	52
Figure 41	Profil électrophorétique de la DH5 α (après transformation) traité par le logiciel	52
Figure 42	Les valeurs du poids moléculaire d'ADN plasmidique calculé par le logiciel	53

Liste des Tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau 1	Classification de résistance aux antibiotiques décrites sur des intégrons	18
Tableau 2	Les caractères génétiques des souches utilisées	24-25
Tableau 3	Les valeurs d'absorbance d'ADN plasmidique	35

Liste des abréviations

- 5' CS** : Région 5' conservée.
- ADN** : Acide désoxyribonucléique.
- ADNp** : Acide désoxyribonucléique plasmidique.
- ARN** : Acide ribonucléique.
- ATB** : Antibiotiques.
- BGN** : Bacille à Gram négatif.
- BLSE** : Béta lactamases à spectre élargi.
- BMR** : Les bactéries multirésistantes
- DO** : Densité optique.
- EBCASE** : Entérobactéries productrices de épholosporines.
- ECBU** : Examen cytobactériologique des urines.
- EPC** : Bactéries productrices de carbapénémases.
- ERV** : Entérocoques résistantes à la vancomycine.
- FQ** : Fluoroquinolone.
- GN** : Gélose nutritive
- GyrA** : Gyrase A.
- Hfr** : Haut fréquence de recombinaisons.
- Int** : Intégrons.
- IR** : Intégron de résistance.
- Kb** : Kilobase.
- LB** : Luria-Bertani
- Pb** : Paire de bases.
- Pc** : Promoteur des cassettes.
- Pint** : Promoteur de l'intégrase.
- PLP** : Protéines de liaison aux pénicillines.
- PLP 2a** : Proteine de liaison à pénicilline.
- PMQR** : Plasmid-Mediated Quinolone Resistance
- QRDR** : Quinolone-resistance determining region
- SARM** : Staphylococcus aureus résistante à la méthicilline.
- SI** : Super intégrons.
- Tn** : Transposons.
- UV** : Ultraviolet.

Introduction

Les agents d'infections nosocomiales ont évolué continuellement depuis le début de l'ère antibiotique, en fonction des pressions de sélection successives exercées lors de l'introduction en thérapeutique à l'hôpital de nouvelles molécules (**Eyquem *et al.*, 2000**).

Le mécanisme de résistance (gène de résistance) préexistait au sein de la population bactérienne. L'utilisation irraisonnée est importante d'antibiotique en détruisant les souches non résistantes, favorise la sélection et le développement des souches résistantes (**Rémy, 2010**).

Cette résistance est le plus souvent acquise par transfert de gènes entre bactéries par l'intermédiaire d'un plasmide. Ce transfert de plasmide peut avoir lieu entre souches de la même espèce (transfert intraspécifique) et dans certaines conditions entre souches d'espèces différentes (transfert interspécifique). Après transfert plasmidique, une bactérie peut donc acquérir simultanément de nombreuses informations de résistance. Ces transferts sont fréquents par conjugaison chez les bacilles à Gram négatif, qui sont les principaux vecteurs de la résistance « épidémique » (**Flandrois, 1997**).

De ce fait l'objectif de notre travail était d'assembler des souches bactériennes issues des prélèvements cliniques, responsables des infections nosocomiales, afin d'étudier sa multirésistance contre les antibiotiques et de mettre en évidence son origine et leurs moyens de dissémination.

Notre étude comporte trois chapitres, dont les deux premiers traitent la partie théorique de notre travail. Le premier chapitre expose les infections nosocomiales, leur apparition et évolution et leurs agents causals. Le deuxième chapitre décrit les différents supports génétiques de la résistance et les moyens de transfert génétique entre les bactéries nécessaire pour l'acquisition de la résistance aux antibiotiques.

Le troisième chapitre comporte la partie expérimentale, qui consistait à extraire l'ADN plasmidique, pour pouvoir analyser leurs plasmides par spectrophotométrie à UV et déterminer sa concentration et sa pureté, passant par une électrophorèse sur gel d'agarose afin de détecter le nombre et le poids moléculaire de ces plasmides vis-à-vis le nombre de résistance présent dans chaque souche. Finalement faire une expérience de transformation bactérienne entre deux souches de la même espèce, permettant de traiter un des moyens de transfert génétique responsable de la dissémination des infections nosocomiales.

Chapitre 1
Les infections nosocomiales

I. Généralités sur les infections nosocomiales

On entend par une infection nosocomiale ou infection hospitalière toutes maladies provoquées par des micros organismes, contractée dans un établissement de soins par tout patient après son admission soit pour hospitalisation soit pour y recevoir des soins ambulatoires que les symptômes apparaissent lors du séjour à l'hôpital ou après. Ces caractéristiques concernent aussi le personnel hospitalier en raison de leurs activités (**Figorelle et al., 2007**).

I.1 Définition des infections nosocomiales

L'infection nosocomiale est définie par Emile Littré (1801-1881) en nosos et komein (grec) et signifie maladie de soigner (**Yvon, 2012**). Une infection est dite nosocomiale, si elle survient au cours ou au décours d'une prise en charge (diagnostique, thérapeutique, palliative, préventive ou éducative) d'un patient et si elle n'était ni présente, ni en incubation au début de la prise en charge (**Bouganoune, 2017**).

Pour affirmer son caractère nosocomial, on se base sur le temps écoulé entre l'admission et le début de l'infection.

- **L'infection survient avant les 48h** est directement en rapport avec une procédure invasive mise en place, après l'admission l'infection est aussi considérée comme nosocomiale.
- **Dans les 30 jours** pour les infections de site opératoire après chirurgie.
- **Dans l'année** si un matériel prothétique a été mis en place.
- **Moins de 48h après admission** du patient à l'hôpital est dit communautaire, car elle est absente au moment de l'admission, on estime qu'elle était en incubation (**Ammour et al., 2006**), [1].

Les infections nosocomiales peuvent apparaître :

- Endémique autrement dit de façon permanente (90 % des infections nosocomiales).
- Épidémique, c'est à dire très fortement sur une très courte période, cette forme représente moins de 10 % des infections nosocomiales (**Ammour et al., 2006**).

I.2 Épidémiologie des infections nosocomiales

Pour qu'une infection survienne il faut :

- Un réservoir et /ou source de micro-organismes.
- Un mode de transmission.
- Le sujet réceptif (patient récepteur) (**Hygis, 1998**).

I.2.1 Réservoirs et sources

Le réservoir d'un agent infectieux est l'endroit où il maintient sa présence en se multipliant (Bouguenoun, 2017).

I.2.1.1 Les infections d'origine « endogène »

La plupart des microorganismes infectant des sujets hospitalisés proviennent des malades eux même, les flores commensales (intestinales et oropharyngée essentiellement) de malades sous antibiothérapie, sont une source abondante de bactéries multirésistantes aux antibiotiques et susceptible d'engendrer des infections.

En effet, l'intestin est le lieu privilégié pour les transferts de plasmides de résistance, car la flore intestinale rassemble de nombreuses espèces réceptives à ces plasmides (Figure 1) (Figarella et al., 2017).

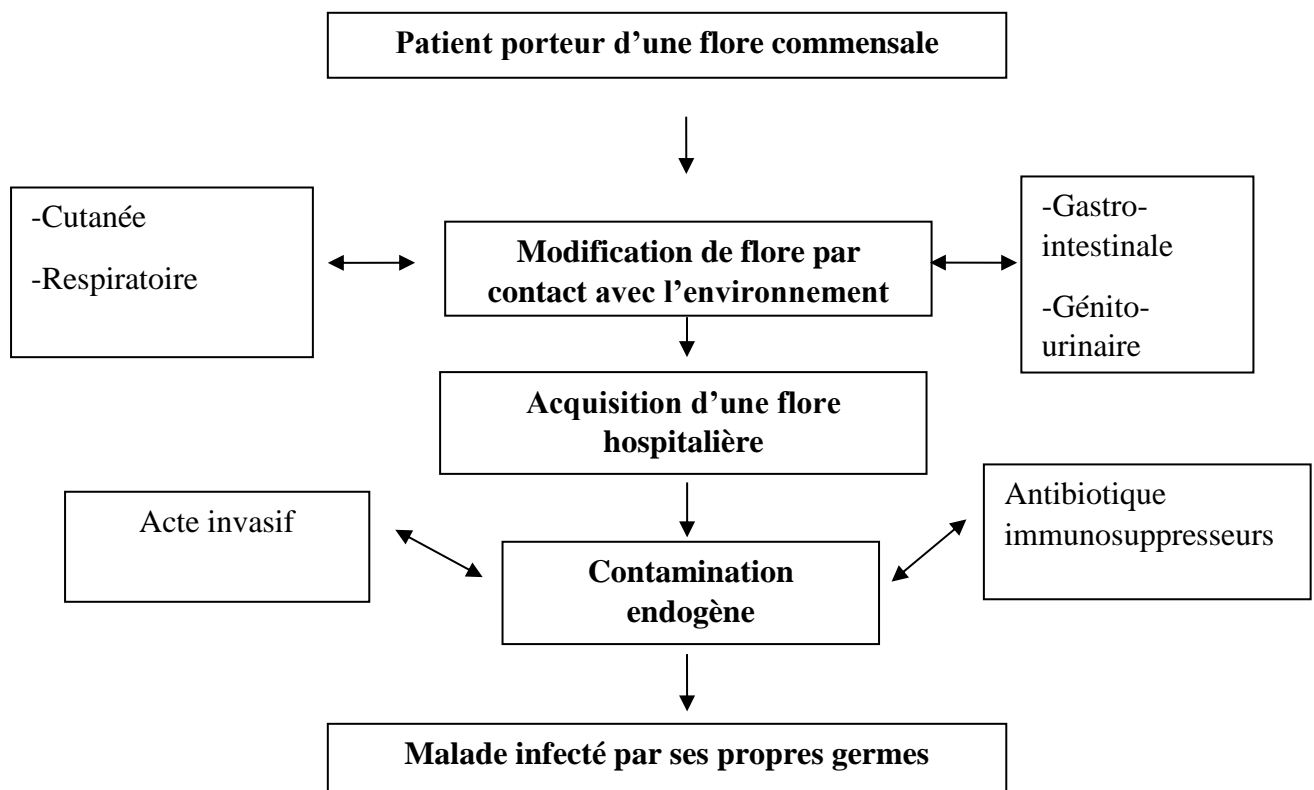


Figure 1 : Transmission endogène (Ammour et al., 2006)

2.1.2 Les infections d'origine « exogène »

Issues d'infections croisées, transmises d'un malade à l'autre par les mains ou les instruments de travail du personnel médical ou paramédical, d'infections provoquées par les microorganismes portés par le personnel soignant, ou d'infections liées à la contamination de

l'environnement hospitalier, des bacilles à Gram négatif peuvent être apportés par les poussières et l'eau (figure 2) (Bouguanoun, 2017 ; Figraella *et al.*, 2017).

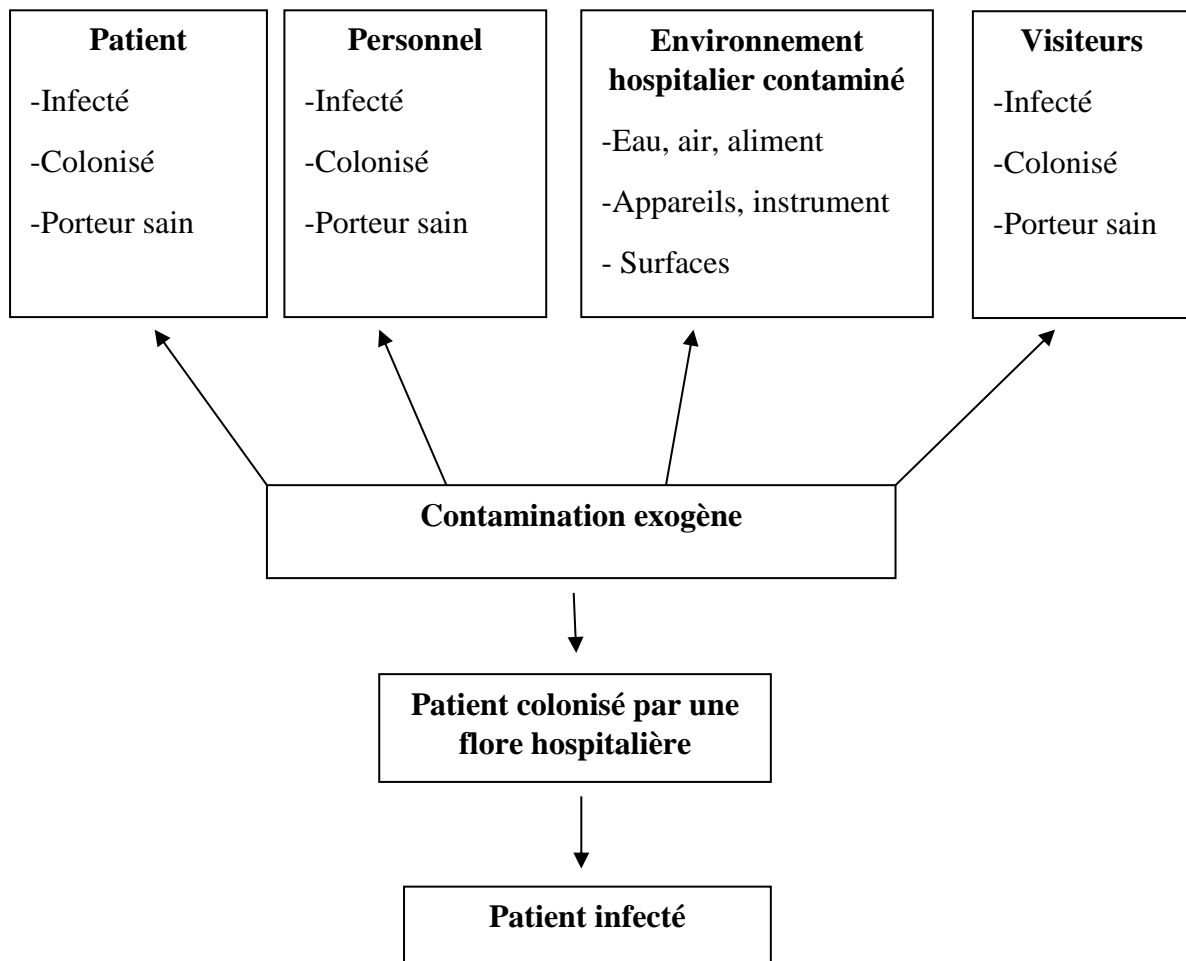


Figure 2 : Transmission exogène (Ammour *et al.*, 2006)

2.2 Modes de transmission

Il existe deux modes de transmission dans le milieu hospitalier :

❖ Transmission par contact direct

C'est le mode classique, il s'agit de la propagation d'un microorganisme pathogène par contact physique direct entre patients, de patients à soignant et de soignants aux patients (Emaleu, 2017).

❖ Transmission par contact indirect

La transmission par contact indirect désigne la propagation d'un agent pathogène du réservoir à un hôte par un support d'un objet (les instruments chirurgicaux, les endoscopes ...etc) (Emaleu, 2017).

❖ Les autres modes de transmission

La transmission par l'intermédiaire d'un support contaminé (nourriture, liquide de perfusion...) s'observe sporadiquement dans le cadre d'épidémies (**Bouguenoun, 2017**).

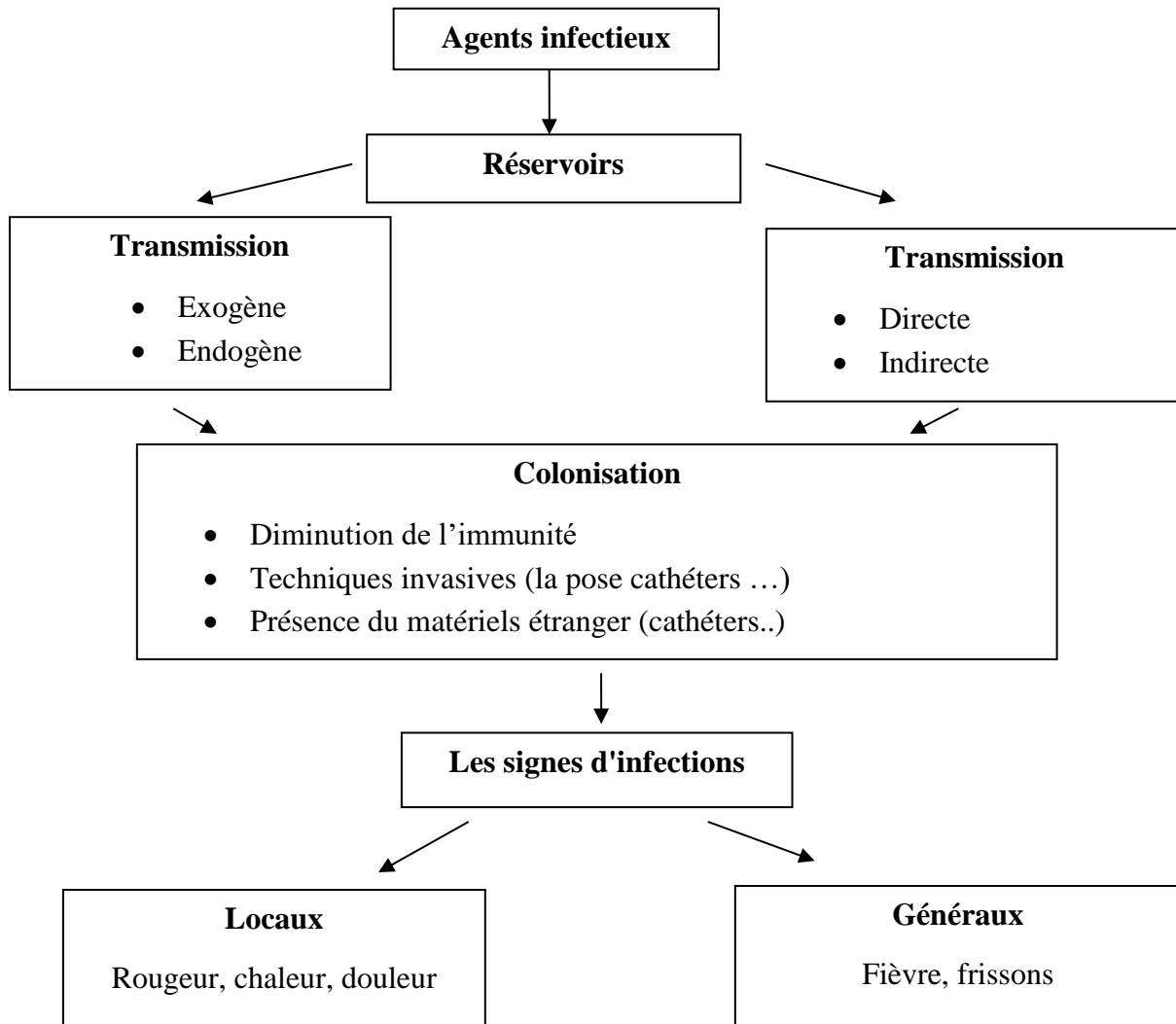


Figure 3 : Chaine épidémiologique des infections nosocomiales [2]

II. Les bactéries multi résistantes BMR

II.1 Définition de BMR

Une souche est dite « résistante » lorsque la concentration d'ATB qu'elle est capable de supporter est plus élevée que la concentration que l'on peut atteindre in vivo à la suite d'un traitement. Parfois la résistance à un ATB confère de la résistance à un autre ATB, on appelle ça la résistance croisée (**Bouguenoune, 2017**).

II.2 Les types de BMR

II.2.1 *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline SARM

C'est une bactérie à Gram positif pouvant causer des infections nosocomiales graves dues à sa résistance à la méthicilline, par l'acquisition d'un gène produisant une modification de la protéine liant la pénicilline (PLP2a), cette protéine est encodée par le gène *mecA* localisé sur un élément génétique mobile. Les PLP2a sont différentes des PLP ordinaires par leur très faible affinité pour les antibiotiques possédant un anneau β -lactame. Pour cette raison les pénicillines, les céphalosporines et autres β -lactamines ne sont pas actives contre les SARM-N, et une résistance croisée se produit avec la clindamycine, les carbapénèmes, les macrolides et les tétracyclines.

Au cours des dernières années de nouvelles molécules plus coûteuses et toxiques, ont été synthétisées pour aider dans la lutte contre le SARM, tels le linézolide, la tigécycline, la daptomycine, le ceftobiprole et la dalbavancine (Sylvie, 2009).

II.2.2 Bétalactamases à spectre élargi BLSE

Les entérobactéries sont responsables de la majorité des infections nosocomiales, l'un des mécanismes courant de la résistance bactérienne des bacilles Gram négatif (BGN) est la production de β -lactamases. Le premier isolat producteur de BLSE à transmission plasmidique a été observé en Allemagne en 1983 et rapidement après en Amérique, cette lactamase a été tout d'abord identifiée chez une souche de *Klebsiella pneumoniae*. Cette enzyme s'est rapidement et facilement transmise aux autres BGN, dont *Escherichia coli*. Par la suite, l'augmentation spectaculaire de la résistance des bactéries aux β -lactamines a été largement associée à la propagation des BLSE (Sylvie, 2009).

II.2.3 Entérobactéries productrices de céphalosporinases (EBCASE)

Initialement, les céphalosporinases étaient connues comme des enzymes d'origine chromosomique retrouvées chez le *Pseudomonas aeruginosa* et pouvaient être induites par des antibiotiques comme la céfoxitine, la céfotaxime et la ceftazidime. L'hyperproduction de ces enzymes est associée à une diminution du nombre de porines dans la membrane externe des bactéries.

La transmission plasmidique et la promiscuité dans la famille des entérobactéries entraînent, des taux très élevés de céphalosporinases chez les *E. coli* et *K. pneumoniae* mais aussi chez les souches d'*Enterobacter* et de *Citrobacter* (Sylvie, 2009).

L'expression de cette céphalosporinase est médiée par le gène Amp-C. Plus de 20 lactamases de type Amp-C différentes ont été retrouvées. Ceci entraîne une résistance de haut niveau aux lactamines. Seule la sensibilité à la céfépime et aux carbapénèmes est maintenue (Sylvie, 2009).

II.2.4 Bactéries productrices de carbapénémases (EPC)

Les carbapénémases qui sont produites par les isolats *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*, peuvent être l'origine d'infections nosocomiales graves et difficiles à traiter (Sylvie, 2009).

II.2.5 Résistance des entérobactéries aux fluoroquinolones(FQ)

Les fluoroquinolones sont des antibiotiques à large spectre actif notamment sur les bacilles Gram négatif de type entérobactéries (Tankovic *et al.*, 1998).

Les principaux mécanismes de résistance chez les entérobactéries :

- Baisse de la perméabilité de la paroi bactérienne : Ce type de résistance est fréquemment observé chez les Gram négatif, elle est due à une modification (réduction) de l'expression du gène codant pour les porines OmpF [3].
- Modification de la cible : mutation du gène codant pour :
 - La sous-unité GyrA de l'ADN-gyrase (germes Gram -)
 - La sous-unité ParC de la topoisomérase IV (germes Gram +) [3].
- Phénomène d'efflux : la concentration des FQ dans les bactéries réduit par les échanges contre des protons qui fonctionnent la pompe à efflux [3].

II.2.6 Les bactéries résistantes à la vancomycine (ERV)

Les principaux risques liés aux entérocoques résistantes à la vancomycine sont la transmission croisée et l'impasse thérapeutique, car le plus souvent les ERV sont résistantes aux ATB actifs sur les entérocoques (ampicilline, aminosides, cyclines, cotrimoxazole) (Dali, 2015).

II.3 Les types des résistances

II.3.1 La résistance naturelle ou intrinsèque

C'est un caractère d'espèce qui touche toutes les bactéries de l'espèce considérée, elle est stable transmise à la descendance (elle a pour support génétique le chromosome bactérien)

mais elle n'est pas ou peu transmissible sur un mode horizontal (d'une bactérie à l'autre au sein d'une même espèce ou entre espèces différentes) (Dali, 2015).

II.3.2 La résistance acquise

Les bactéries peuvent développer la résistance à un ATB préalablement sensibles, ce qui implique des changements génétiques, c'est l'acquisition de nouveaux gènes capables de rendre la bactérie résistante à un antibiotique. Une espèce bactérienne peut être résistante à plusieurs antibiotiques selon des mécanismes différents (Lozniewski *et al.*, 2010).

II.4 Les mécanismes biochimiques de la résistance

Ils peuvent être regroupés en quatre grands types de mécanismes :

- Diminution de la perméabilité (mutation affectant la structure des porines ou diminuant la synthèse des porines par lesquelles l'antibiotique peut pénétrer dans la bactérie) et efflux actif: l'efflux repose sur une pompe insérée, dans la membrane et capable d'éjecter l'antibiotique hors de la bactérie grâce un canal, cet efflux conduit à une diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique.
- Modification de la cible des antibiotiques par modification des protéines liant les pénicillines (PLP), qui sont des enzymes qui catalysent l'étape finale de la biosynthèse du peptidoglycane (paroi bactérienne), et qui sont la cible des bêta-lactamines (en se fixant aux PLP les bêta-lactamines les empêchent de jouer leur rôle, la synthèse du peptidoglycane est donc entravée).
- Production d'enzymes inactivant les antibiotiques par production de bêta-lactamases codées par des plasmides ou des éléments génétiques transposables. Le nombre des bêta-lactamases plasmidique est très élevé et elles sont classées selon leurs vitesses d'hydrolyse, leurs constantes d'affinité pour les bêta-lactamines, leur faculté à être inhibée par les inhibiteurs tel que l'acide clavulanique (Lozniewski *et al.*, 2010).
- Pompe à efflux : l'antibiotique ne peut atteindre son site d'action par pompage actif de l'antibiotique à l'extérieur de la bactérie (efflux). Les transporteurs d'efflux de plusieurs médicaments sont des composants normaux des cellules bactériennes et contribuent pour une large part à la résistance intrinsèque des bactéries à de nombreux agents antibactériens, ces pompes ont besoin d'énergie.

L'exposition aux antibiotiques favorise une surexpression par mutation de transporteurs entraînant une hausse de la résistance bactérienne, il est également possible qu'une résistance par efflux apparaisse à cause de l'exposition à un antibiotique d'une autre classe. Parmi les bactéries d'importance clinique munies d'une pompe à efflux comme mécanisme de résistance,

on trouve l'*E. coli* et le *Shigella*. Le *Staphylococcus aureus* peut également comporter une pompe à efflux lui permettant d'acquérir une résistance au macrolide (sylvie, 2009).

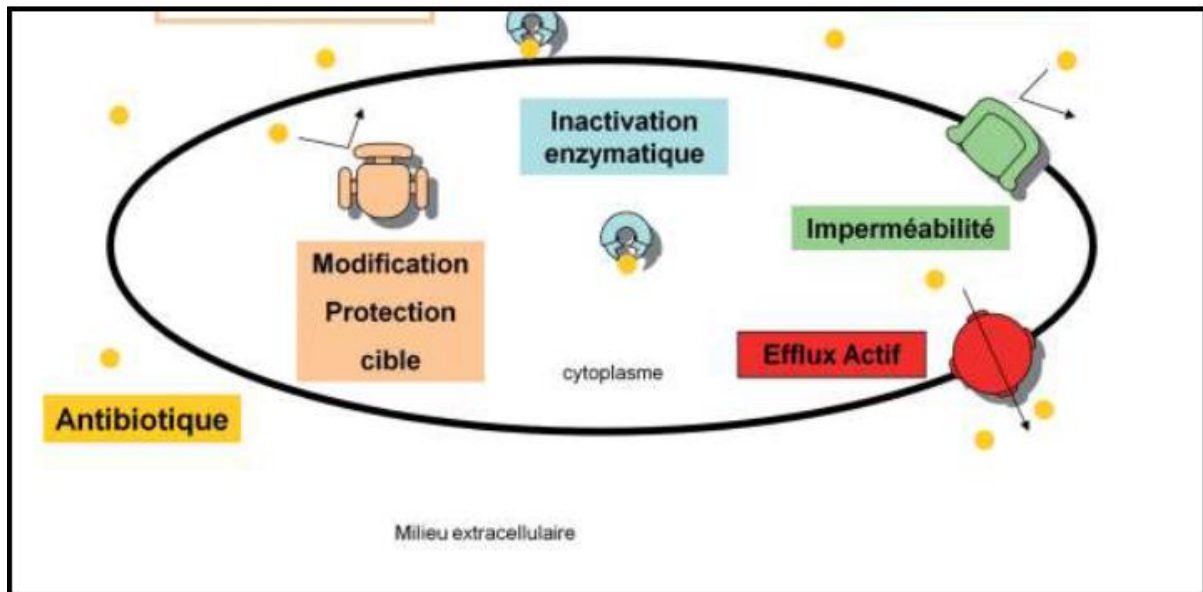


Figure 4 : Les principaux mécanismes de la résistance aux antibiotiques (Meriah, 2017)

Chapitre 2
Support génétique de la résistance bactérienne

I. Les éléments génétiques responsables de la résistance bactérienne

Le potentiel génétique d'une bactérie est constitué du chromosome et d'un ou de plusieurs génophores facultatifs et extra-chromosomiques, les plasmides. Des gènes sont également portés par des éléments génétiques transposables et par des intégrons. Une bactérie peut ainsi acquérir une résistance aux antibiotiques par deux grands mécanismes génétiques. L'un a pour support le chromosome et définit une résistance chromosomique, l'autre a pour support les plasmides ou les éléments transposables ou les intégrons et ils définissent une résistance extra-chromosomique (**Lozniewski *et al.*, 2010**).

❖ La résistance chromosomique

Elle résulte d'une mutation. C'est un phénomène rare, dû au hasard il n'est pas provoqué par la présence de l'antibiotique, mais l'antibiotique révèle la mutation de résistance en sélectionnant les bactéries mutantes résistantes (ou plus exactement, en détruisant les autres bactéries de l'espèce, celles restées sensibles à l'action de l'antibiotique). C'est un phénomène indépendant, l'apparition d'une mutation ne favorise pas l'apparition d'autres mutations de résistance à d'autres antibiotiques. La probabilité de deux mutations simultanées est donc très faible. Cette indépendance des mutations constitue un des meilleurs arguments pour justifier l'association des antibiotiques. Elle est transmissible, elle est permanente et a donc un caractère héréditaire (transmission sur un mode vertical de bactérie-mère à bactéries-filles). Toutes les mutations ont pour conséquence la perte ou la modification d'une protéine structurale ou enzymatique et une bactérie mutée est souvent contre-sélectionnée en l'absence d'antibiotique (**Lozniewski *et al.*, 2010**).

❖ La résistance extra-chromosomique (plasmides)

La résistance plasmidique est liée à la synthèse de protéines additionnelles et non à une modification des constituants normaux de la bactérie. Les bactéries porteuses de plasmides sont normales alors que les bactéries résistantes par mutation sont souvent fragilisées. Aussi, les bactéries porteuses de plasmides ne sont pas ou peu contre-sélectionnées en l'absence d'antibiotique (**Lozniewski *et al.*, 2010**).

De nombreux plasmides de résistance sont conjugatifs ou mobilisables ce qui permet un transfert horizontal, ces transferts sont à l'origine d'une dissémination très importante de la résistance au sein des populations bactériennes ce qui fait qualifier la résistance plasmidique de "contagieuse ou d'infectieuse". Les plasmides de résistance sont susceptibles d'évoluer par acquisition ou pertes successives de déterminants de résistance portés par des éléments

génétiques transposables. Les éléments génétiques transposables permettent la dissémination de gènes entre des bactéries phylogéniquement éloignées en permettant l'implantation d'un gène là où celle d'un plasmide échoue. Comme pour la résistance chromosomique, les gènes de la résistance extra-chromosomique ne sont pas induits par l'utilisation des antibiotiques qui se contentent de sélectionner les bactéries porteuses de tels gènes. Il est important de noter que la résistance extra-chromosomique étant souvent une multirésistance, l'utilisation d'un seul antibiotique va sélectionner des bactéries multirésistantes qui ne sont pas contre-sélectionnées en l'absence d'antibiotique (**Lozniewski *et al.*, 2010**).

I.1 Les plasmides

I.1.1 Définition

Le terme de "plasmide" a été introduit par Lederberg en 1952 et désignait à l'époque toute particule extra-chromosomique capable de se reproduire dans un état autonome (**Lederberg, 1952**).

Les plasmides sont de petits fragments d'ADN double brin, circulaires et cytoplasmiques, capables de répllication autonome. Cependant, les plasmides peuvent conférer à leur hôte des aptitudes qui dans certains cas lui donnent un avantage sélectif. Cet avantage sélectif peut provenir d'une résistance à un antibiotique ou encore de la possibilité d'utiliser une nouvelle voie métabolique (**Skurnik et Andremont, 2006 ; del Solar et Espinosa, 2000**).

I.1.2 Les caractéristiques de plasmide

Les plasmides présentent certaines propriétés propres :

- Une petite taille qui varie de 1 à 400 (kb) et plus, soit une longueur d'ADN de l'ordre de 1/10 à 1/1 000 de celle du chromosome.
- Une répllication autonome, indépendante de celle du chromosome, assurant un nombre fixe de copies plasmidiques par copie du chromosome et la répartition équitable de ces copies dans les cellules filles.
- Leur transmission naturelle d'une bactérie à l'autre s'effectue habituellement par conjugaison, on parle alors de plasmides conjugatifs.
- Une autre propriété essentielle des plasmides est l'incompatibilité liée au produit de gènes *inc*, elle se traduit par l'incapacité ou non pour deux plasmides de coexister dans une même bactérie selon qu'ils portent ou non les mêmes gènes *inc*. Cette propriété est à la base d'une classification des plasmides en groupes d'incompatibilité.

- D'autres gènes éventuellement présents leur confèrent des propriétés spéciales : résistance aux antibiotiques (plasmides R) (Guillot, 1990).

I.1.3 Les plasmides F

Les plasmides conjugatifs sont des molécules d'ADN extra-chromosomique capables d'une réplication autonome régulée par eux-mêmes, et d'échanges (réplication du plasmide suivie de son transfert) au sein de populations bactériennes grâce au phénomène de conjugaison via un appendice de transfert, le pilus, codé par le plasmide et localisé en surface de la bactérie (Mainil et Muylaert, 2012).

I.1.4 Les plasmides R

Les plasmides R sont des éléments génétiques extra-chromosomiques à réplication autonome, porteurs de facteurs R, soit un groupe de différents gènes de résistance. Ces éléments, généralement classés en groupes d'incompatibilité, sont d'une importance majeure dans le phénomène de résistance aux antibiotiques (Roy, 2000).

Les plasmides R de *shigella* ont été les premières découvertes et ils portent de nombreux types différents de gènes responsables de la résistance aux antibiotiques se trouve souvent dans une unité appelée transposon (Figure 5), de nombreux plasmides F comme les plasmides R sont capables de conjugaison. Même les plasmides R incapables de conjugaison et qui ne quitte jamais leurs cellules peuvent donner leurs allèles R à un plasmide conjuguant par transposition (Carroll *et al.*, 2013).

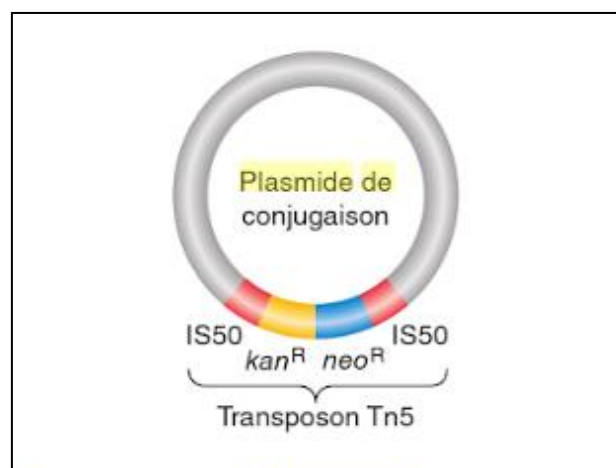


Figure 5 : Un plasmide R avec des gènes de résistance portés dans un transposon (Carroll *et al.*, 2013).

I.2 Les transposons

L'existence d'éléments génétiques mobiles a été mise en évidence pour la première fois en 1948 par Barbara McClintock au cours de ses travaux de génétique sur le maïs (Anxolabéhère *et al.*, 2007).

I.2.1 Définition

Les transposons, ou éléments génétiques transposables, sont des séquences d'ADN double brin linéaires, n'apparaissant jamais à l'état libre, n'ayant pas d'existence autonome stable pouvant s'insérer à différents endroits dans un génome ou plasmide pour être dupliqués avec lui et exprimés. Ces éléments "sauteurs" comprennent généralement des gènes de résistance ou facteurs impliqués dans la pathogénicité (Roy, 2000 ; Dufour, 2008).

I.2.2 Structure et diversité des transposons procaryotes

Les éléments transposables présentent des caractéristiques communes qui ont permis de les regrouper selon des critères structuraux ou fonctionnels.

I.2.2.1 Les séquences d'insertion ISs :

Sont les éléments transposables les plus simples, retrouvés dans presque tous les génomes bactériens, de petite taille (de 750 à 2500 pb). Ils ne codent généralement que les informations nécessaires à leur mobilité. Ces dernières comportent des séquences d'ADN répétées inversées (IR) de 10 à 40 pb délimitant les extrémités des éléments et une enzyme (la transposase) codée par un cadre ouvert de lecture ORF et reconnaissant ces extrémités et catalysant la mobilité des éléments (Figure 6). Une classification des séquences d'insertion selon la nature et structure des IRs, nature et structure de la transposase et devenir du site cible d'insertion ; 17 familles sont ainsi reconnues : IS1, IS3, IS4, IS5, IS6, IS21, IS30, IS66, IS91, IS110, IS200/605, IS256, IS630, IS982, IS1380, ISAs1 et ISL3 (Dufour, 2008).

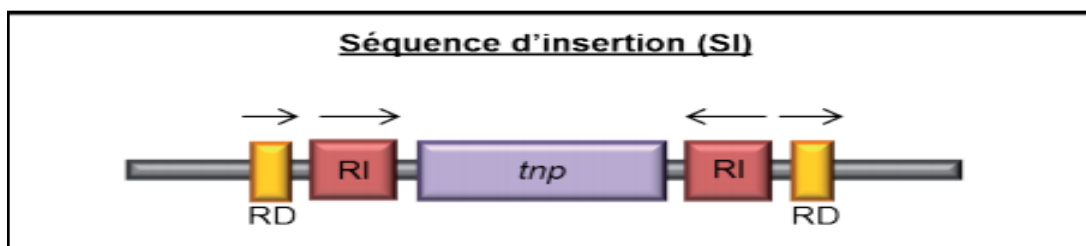


Figure 6 : Structure d'une séquence d'insertion (IS) (Mainil et Muylaert, 2012).

I.2.2.2 Les transposons composites :

Des structures plus importantes (quelques milliers de paires de bases) dans lesquelles un ou plusieurs gènes sont encadrés par deux séquences d'insertion identiques disposées dans la même direction ou en direction opposée (**Figure 7**), collaborant entre elles lors de leur transposition et mobilisant ainsi toute la séquence d'ADN qui les sépare. Les transposons composites sont très nombreux chez les bactéries à Gram négatif. Les plus connus sont : l'élément Tn5 de 5700 pb portant trois gènes de résistance à la kanamycine, à la bléomycine et à la streptomycine, l'élément Tn9 de 2638 pb portant un gène de résistance au chloramphénicol et l'élément Tn10 de 9300 pb portant un gène de résistance à la tétracycline (**Dufour, 2008**).

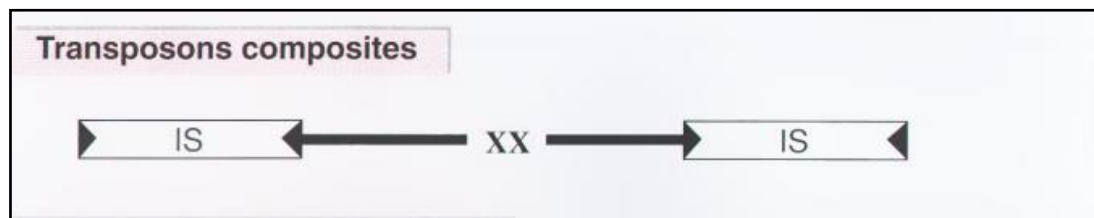


Figure 7 : Structure des transposons composites (**Merlin et Toussaint, 1999**).

I.2.2.3 Les transposons non composites :

Les transposons non composites se caractérisent par l'absence d'IS à leurs extrémités. La plupart d'entre eux sont apparentés par leurs séquences terminales de 35 à 48 pb, répétées en orientation inverse et encadrant une région centrale composée notamment des gènes de transposase et des gènes de résistance (**Figure 8**), dans le transposon Tn3 code pour un seul gène de résistance, celui de la β -lactamase TEM-1 (**Merlin et Toussaint, 1999 ; Mainil et Muylaert, 2012**).

Leur mode de transposition implique une transposase (TnpA) mais également une autre enzyme, une résolvasse (TnpR), qui permet de terminer la réaction en catalysant une étape de recombinaison à un site spécifique (*res*) porté par le transposon (**Dufour, 2008**).

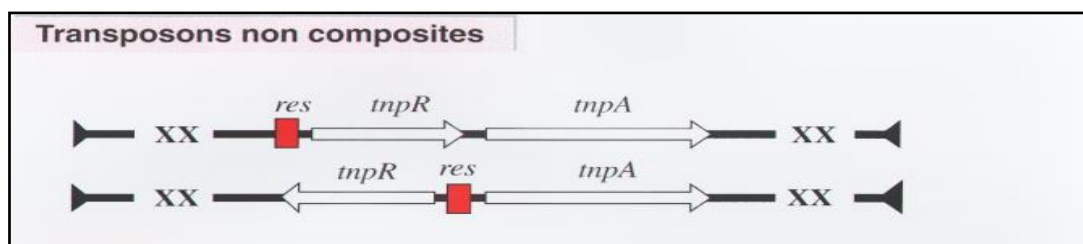


Figure 8 : Structure des transposons non composites (**Merlin et Toussaint, 1999**).

I.2.2.4 Les transposons conjugatifs :

Les transposons conjugatifs, qui sont des éléments génétiques mobiles très répandus chez les cocci à Gram positif (entérocoques, streptocoques y compris les pneumocoques). Les transposons conjugatifs diffèrent des autres transposons car, d'une part, ils possèdent des fonctions de transfert, faisant d'eux une sorte d'hybride entre le transposon et le plasmide, et d'autre part, l'absence de séquences répétées inversées. Le transposon conjugatif est capable de promouvoir son excision du génome de la cellule hôte, pour former une structure intermédiaire circulaire d'ADN bicaténaire, suivie ensuite d'une étape de conjugaison à une bactérie voisine. Cette étape de conjugaison peut, en fait, être vue comme une forme de réplication. En effet, au cours de ce processus, l'intermédiaire circulaire est scindé en deux, une structure simple brin maintenue dans la bactérie donneuse et l'autre fournie à la bactérie receveuse, qui doivent encore être dupliquées pour former à nouveau une structure double-brin essentielle à l'intégration ultérieure au chromosome ou dans un plasmide (**Courvalin, 1997 ; Mainil et Muylaert, 2012**).

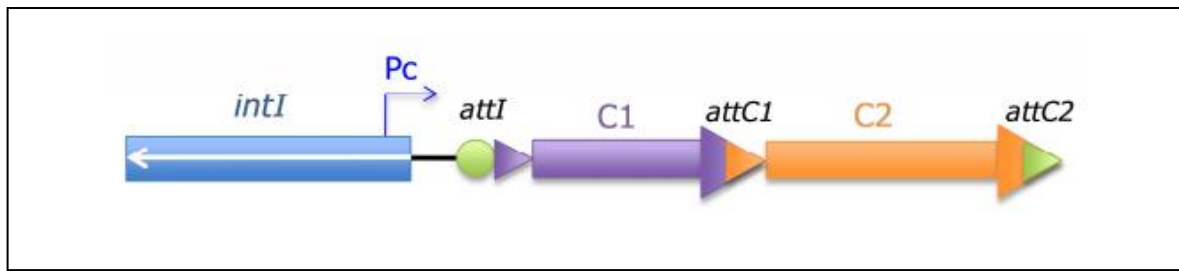
I.3 Les intégrons

Au cours des années 1980, de nouveaux éléments génétiques susceptibles d'acquérir ou de perdre des gènes de résistance aux antibiotiques ont été décrits et désignés sous le nom d'intégrons (**Samine, 2011**).

I.3.1 Définition et structure des intégrons

Les intégrons ont eu plusieurs définitions. Actuellement celle de Hall et Collis datant de 1995 est adoptée par tous : « Un intégron est une unité génétique qui inclut un système spécifique de recombinaison, capable de capturer et mobiliser des gènes contenus dans des éléments mobiles appelés gènes cassettes, et un promoteur pour l'expression des gènes cassette. Il agit comme un vecteur d'expression » (**Andremont et Skurnik, 2006**).

La structure de base d'un intégron se définit par sa plateforme fonctionnelle et les cassettes localisées en aval de cette plateforme constituent la région dite variable (**Figure 9**).



Pc : promoteur des cassettes ; C1, C2 : cassettes ; *attI*, *attC1*, *attC2* : sites spécifiques de recombinaison ; *intI* : gène de l'intégrase.

Figure 9 : Structure usuelle des intégrons (Barraud, 2011).

I.3.1.1 La plateforme fonctionnelle

Se compose de trois éléments essentiels :

1- un gène *intI* qui code une intégrase appartient à la famille des recombinases à tyrosine spécifique de site (Collis et Hall, 1995). Les variations de séquences en acides aminés des intégrases IntI ont permis de distinguer 5 classes d'intégrons de résistance IR .

- **Classe 1 (IR1)** : Les plus prévalents sont caractérisés par une intégrase IntI1 composée de 337 acides aminés. De nombreux gènes codant des résistances à des antibiotiques différents : *catA2* (résistance au chloramphénicol), *blaDHA_1*, *blaCTXM_2*, *blaCTX_M_9* (résistance aux b-lactamines), *dfrA10*, *dfrA19* (résistance au triméthoprime), *qnrA*, *qnrB* (résistance aux quinolones).
- **Classe 2 (IR2)** : Ont une intégrase IntI2 de 325 acides aminés. La taille de cette dernière est réduite à 178 acides aminés du fait de la présence d'un codon stop en position 179 dans le gène *intI2* rendant ainsi la protéine non fonctionnelle. Ils présentent une grande stabilité dans leur réseau de cassettes avec la présence quasi-constante de trois cassettes : *dfrA1* (résistance au triméthoprime), *sat2* (streptothricine) et *aadA1* (streptomycine et spectinomycine), suivies d'une séquence *orfX*.
- **Classe 3 (IR3)** : L'intégrase IntI3 est composée de 346 acides aminés. Ils associent une cassette de résistance aux b-lactamines à une cassette *aac* (6')-Ib (résistance à tobramycine, nétilmicine et amikacine).
- **Classe 4 et 5 (IR4 et IR5)** : Sont des intégrons décrits uniquement chez *Vibrio*. associés à des transposons conjugatifs. Leur implication en microbiologie clinique est considérée à ce jour comme nulle.

2- Un site spécifique de recombinaison *attI* se comporte au moins deux sites d'attachement de l'intégrase, nommés L et R. Il existe une forte spécificité des intégrases pour leur site *attI* mais

des recombinaisons peuvent intervenir de façon moins efficace avec les sites attI d'autres IR. Par exemple, IntI1 reconnaît aussi les sites attI2 et attI3 (**Barraud et Ploy, 2011**).

3- Un promoteur de cassettes Pc qui assure l'expression des gènes de cassettes. Chez les IR de classe 1 et 3, le promoteur Pc est localisé dans la séquence codante d'IntI1 et IntI3 (**Barraud et Ploy, 2011**).

I.3.1.2 La région variable : Les cassettes

Les cassettes constituent la partie variable des intégrons, en aval de la plateforme fonctionnelle. Elles constituent des unités fonctionnelles indépendantes, non répliquatives, mobilisables de manière individuelle : elles existent sous forme linéaire au sein d'un intégron ou sous forme circulaire à l'état libre (**Barraud, 2011**).

Les cassettes contiennent un gène flanqué à son extrémité 3' d'une séquence palindromique, le site *attC*. Il s'agit d'un site spécifique de recombinaison reconnu par l'intégrase, et souvent désigné « élément 59-pb » car les premiers sites *attC* décrivent une taille de 59pb. Il est constitué de plusieurs séquences relativement conservées, inversées et répétées. Les séquences conservées recouvrent surtout les 20 premières et les 20 dernières bases, et encadrent une région de séquence et de longueur variables. Ainsi, certains sites *attC* sont formés de 141 paires de bases, d'où l'ambiguïté de la terminologie « élément 59-pb ». On trouve aux deux extrémités de chaque site *attC* deux séquences inversées et répétées de 7 paires de bases désignées core et core inverse. Le core (GTTRRRY ; R : purine ; Y : pyrimidine) est localisé à l'extrémité 3' du site *attC* et le core inverse, de séquence complémentaire RYYAAC, à l'extrémité 5' (**Figure 10**) (**Ploy et al., 2000**).

La plupart des gènes de cassettes des IR codent une résistance aux antibiotiques (**Tableau 1**), d'autres orf codent des protéines de fonction inconnue (**Barraud et Ploy, 2011**).

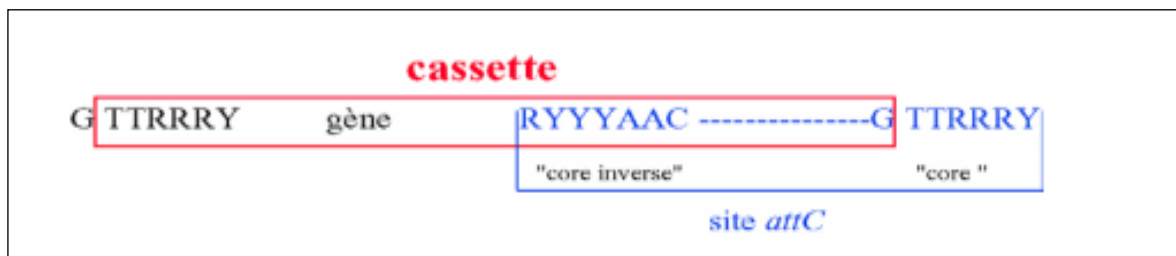


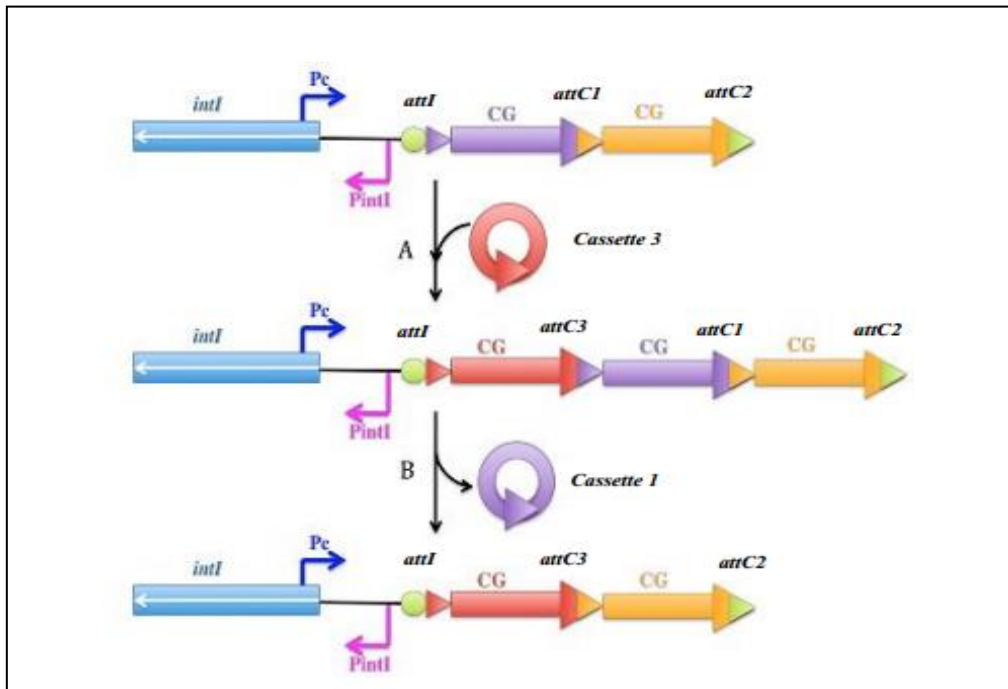
Figure 10 : Structure d'une cassette (**Ploy et al., 2005**).

Tableau 1 : Classification de résistance aux antibiotiques décrites sur des intégrons (**Ploy et al., 2000**).

	Intégrons de classe I	Intégrons de classe 2	Intégrons de classe 3
Espèces bactériennes	<i>Entérobactéries</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Corynebacterium glutamicum</i> <i>Campylobacter jejuni</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Entérobactéries</i> <i>Acinetobacter</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Alcaligenes xylosoxidans</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Fonctions des cassettes (blaIMP)	<p>Résistance aux β-lactamines β-lactamases classes A, C D β-lactamases classe B (blaIMP)</p> <p>Résistance aux aminosides 3-acétyltransférases 2''-adénylyltransférases 3''-adénylyltransférases</p> <p>Résistance au chloramphénicol acétyltransférases mécanisme non enzymatique</p> <p>Résistance au triméthoprim dihydrofolate réductases</p> <p>Résistance à la rifampicine ADP-ribosyl transférases</p>	<p>Résistance aux aminosides 3''-adénylyltransférases Acétyltransférases</p> <p>Résistance au triméthoprim dihydrofolate réductases</p>	<p>Résistance aux β-lactamines β-lactamases classes B</p> <p>Résistance aux aminosides 6'-acétyltransférases</p>

Plusieurs cassettes peuvent exister en tandem sur un même intégron et entraîner ainsi pour la bactérie qui l'héberge une résistance en bloc à différentes familles d'antibiotiques, jusqu'à huit cassettes de résistance ont été décrites sur un même intégron. Les cassettes sont des éléments génétiques mobiles capables d'être intégrés ou excisés par un mécanisme de

recombinaison catalysée par l'intégrase IntI. Au sein des intégrons (**Figure 11**) (Ploy *et al.*, 2005).



A : Mécanisme de recombinaison impliquant le site *attI* et le site *attC3* de la cassette rouge, l'intégration de cette dernière se fait au plus proche du promoteur Pc.

B : Recombinaison entre 2 sites *attC* des cassettes violette et rouge entraînant l'excision de la deuxième cassette (violette). Les recombinaisons sont médiées par l'intégrase IntI.

Figure 11 : Mécanisme d'intégration et d'excision de cassettes (Barraud, 2011).

I.3.2 Types de l'intégrons

On distingue deux grands types d'intégrons :

- **Les super-intégrons (SI)** : les SI ont été caractérisés sur le génome de différentes espèces de *Vibrio* mais aussi chez d'autres genres bactériens tels que *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Xanthomonas*, *Listonella*, *Nitrosomonas*. Les superintégrons ont donc une structure similaire à celle des intégrons de résistance aux antibiotiques mais cependant différent par :

- ✓ Les SI sont toujours présents sur le chromosome.
- ✓ La région variable est caractérisée par un nombre de cassettes plus élevé.
- ✓ Les sites de recombinaison *attC* des cassettes d'un même SI sont très conservés tandis qu'ils varient en séquences et en taille pour les cassettes présentes chez les IR (Tchuente, 2016).

- **Les intégrons de résistance aux antibiotiques (IR)** : Les IR contiennent un nombre plus restreint de cassettes dans un même IR, dont les gènes codent le plus souvent des résistances aux antibiotiques. Les IR ne codent pas de fonction de transposition mais, localisés sur des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides ou les transposons, ils peuvent être transférés entre bactéries et contribuent ainsi à la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques (**Barraud, 2011**).

I.3.3 Origine des intégrons

L'origine des intégrons et des cassettes constitue une énigme, de même que la genèse des cassettes. Plusieurs hypothèses ont été avancées, mais la plus probable considérerait que les super-intégrons seraient les ancêtres des trois classes d'intégrons impliquées dans la multirésistance aux antibiotiques. Les intégrons de résistance auraient évolué à partir de super-intégrons par le biais de la capture d'un gène *intI* et d'un site *attI* dans des structures mobiles type transposon et ensuite, sous l'effet de la pression de sélection, il y aurait eu capture de gènes de résistance provenant de pools de cassettes contenus dans différents super-intégrons (**Ploy et al., 2005**).

II. Les moyens de transfert génétique

Le transfert horizontal de gènes est un phénomène d'échange d'information génétique entre bactéries par l'acquisition d'ADN étranger. Ce phénomène représente 80% des cas de résistance aux antibiotiques (**Samine, 2011**).

La première mise en évidence de transfert de gènes a été réalisée par l'étude de déterminants de la virulence chez *Staphylococcus pneumoniae* par Griffith, en 1928. Ses études ont montré qu'on vivo, chez la souris, un facteur de virulence était transféré entre des bactéries virulentes mortes et des réceptrice avirulente (**Georges et François-Marie, 2007**).

Griffith mettait en évidence qu'il existait un principe thermostable, capable de modifier durablement l'hérédité. Il sera identifié quelques années plus tard comme étant l'ADN.

Il existe des mécanismes spécifiques qui permettent à de l'ADN étranger d'accéder au génome, dont les trois principaux sont la transformation, la conjugaison et la transduction (Figure 12) (Lefevre *et al.*, 2016).

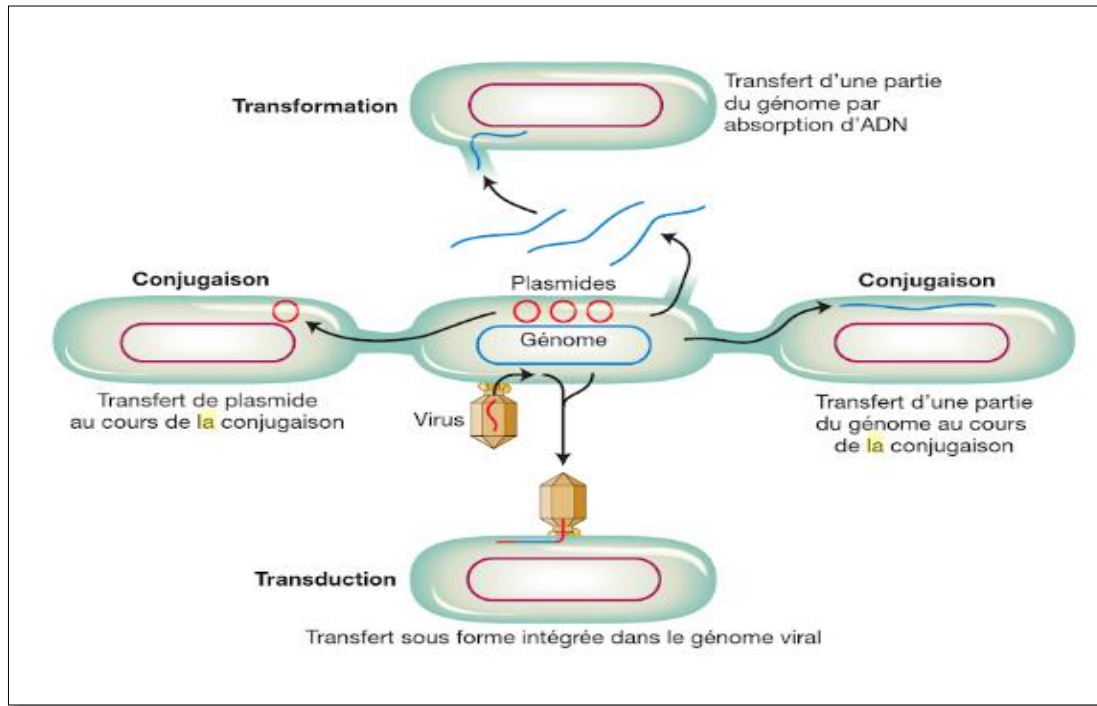


Figure 12 : Les bactéries échangent de l'ADN par plusieurs processus (Carroll *et al.*, 2013).

II.1 La transformation

Certaines bactéries peuvent capter des fragments d'ADN à partir du milieu extérieur. Ceci est un autre moyen pour les bactéries d'échanger leurs gènes (Carroll *et al.*, 2013).

La transformation c'est le transfert d'un fragment d'ADN d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice. Ce phénomène n'a été mis en évidence que pour quelques espèces (*S. pneumoniae*, *Acinetobacter sp*, *Neisseria sp*). L'ADN d'une bactérie donatrice, libéré naturellement lors d'une lyse bactérienne, est transféré sous forme libre à une bactérie réceptrice. La bactérie réceptrice doit être dans un état réceptif dit de compétence, caractérisé par la présence de récepteurs spécifiques de l'ADN à la surface bactérienne. La pénétration de l'ADN de la donatrice s'accompagne d'une hydrolyse de l'un des deux brins de la molécule et l'intégration de l'ADN exogène dans le chromosome de la réceptrice se fait par recombinaison légitime (Figure 13) (Flandrois, 1997).

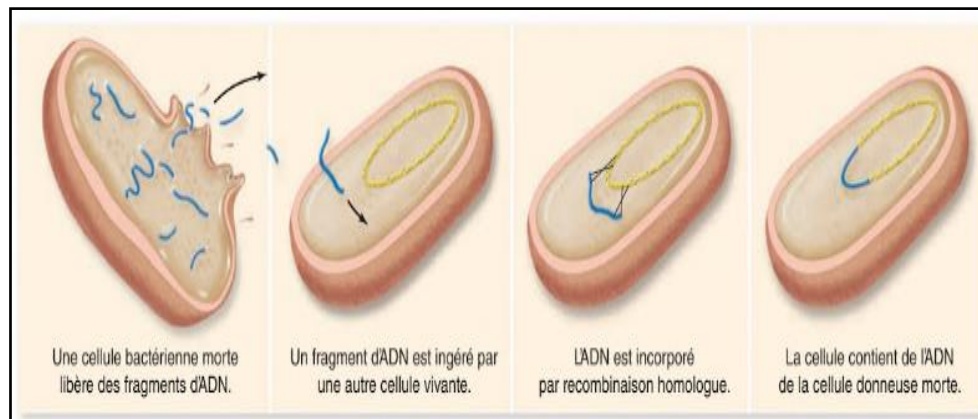


Figure 13 : Transformation naturelle (Raven *et al.*, 2017).

II.2 La conjugaison

La conjugaison bactérienne mise en évidence en 1945 par Joshua Lederberg, ne se produit qu'entre bactéries d'une même espèce surtout chez les bactéries à Gram (-) telles que Entérobactéries (*E.coli*, *Salmonella*.....etc.) est un mécanisme de transmission unidirectionnel d'ADN d'une cellule à l'autre, via un "pilus sexuel". La bactérie donneuse est qualifiée de mâle alors que la bactérie receveuse est appelé femelle. Les gènes à l'origine de la conjugaison sont portés par des plasmides (Lefevre *et al.*, 2016).

Une bactérie contenant un plasmide F est désignée par F⁺, alors qu'une bactérie sans plasmide F est désignée par F⁻. Une bactérie contenant un facteur F inséré dans son ADN est désignée par Hfr ; elle peut être obtenue à partir d'une bactérie F⁺ par insertion d'un plasmide F dans le chromosome (Figure 12) (Courtin, 2012).

Une bactérie F⁺ peut transformer une bactérie F⁻ en F⁺, tout en restant elle-même F⁺ : le plasmide F est répliqué et transféré à la bactérie F⁻. Une bactérie Hfr peut transformer une bactérie F⁻ en une bactérie F⁻ recombinée : l'ADN de F⁺ est partiellement répliqué et transféré à F⁻ dont l'ADN est modifié par un enjambement entre gènes homologues (Figure 14) (Courtin, 2012).

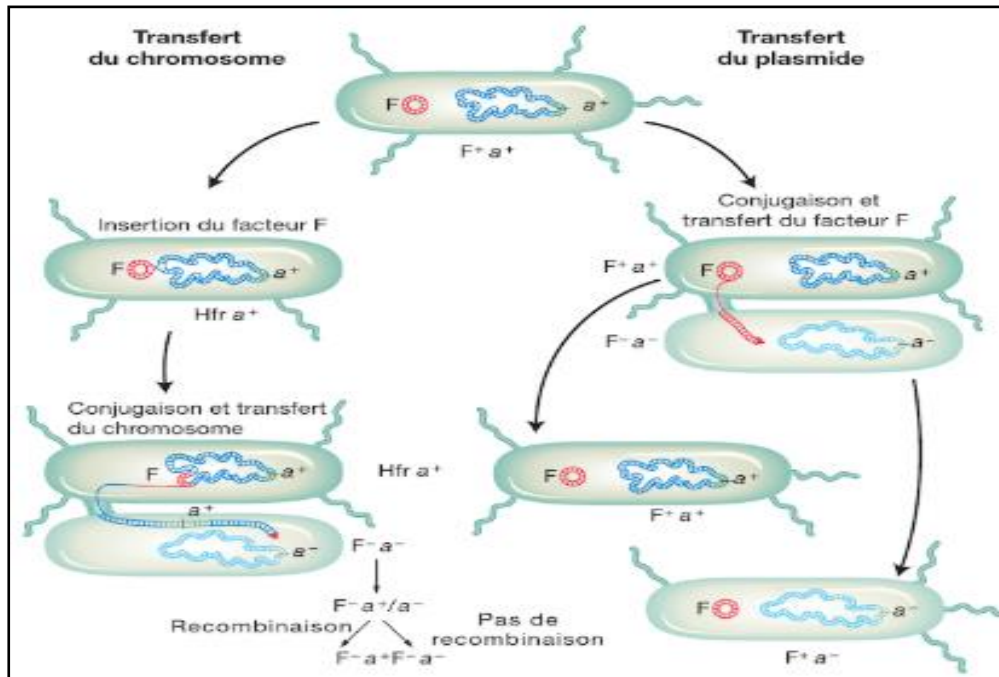


Figure 14 : Les types de transfert d'ADN peuvent avoir lieu au cours de la conjugaison (Carroll *et al.*, 2013).

II.3 La transduction

La transduction est le transfert d'un fragment d'ADN par un bactériophage entre une bactérie donatrice et une récepteur. Le bactériophage n'est que le transporteur involontaire de l'ADN (Jawetz *et al.*, 1973). Elle a été observée chez de nombreuses bactéries à Gram négatif et à Gram positif (*entérobactéries*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*) (Carroll *et al.*, 2013).

Il existe deux formes de transduction, qui toutes deux résultent d'anomalies des cycles de réplication phagique :

- ❖ **La transduction généralisée :** lors du cycle lytique d'un phage, un segment d'ADN de la cellule hôte est enfermé dans une capsule à la place du génome du phage ; ce segment sera inséré dans l'ADN d'une autre cellule selon le processus habituel d'infection du virus (Courtin, 2012).
- ❖ **La traduction localisée :** dans le cycle lysogénique d'un phage tempéré, le génome du phage est excisé du chromosome hôte en entraînant avec lui de petits segments d'ADN bactérien adjacent ; lorsque le phage infecte une autre cellule, le génome phagique s'insère dans l'ADN cible en même temps que les gènes bactériens (Courtin, 2012).

Chapitre 3
Expérimentation



I. Matériel et méthodes

I. Objectif de l'étude

Ce présent travail consistait à assembler des souches bactériennes dotées d'une multirésistance aux antibiotiques, isolées à partir de prélèvements cliniques des malades hospitalisés. Afin d'étudier leur résistance, son origine et les molécules qui sont responsables de cette dernière, nous allons effectuer plusieurs moyens (électrophorèse, spectrophotométrie) et on a tenté une expérience de transformation bactérienne.

II. Matériel biologique

Les quinze souches utilisées ont été isolées et identifiées à l'hôpital Ibn Zohr par notre collègue Mme Menidjel Nadia, dans le cadre de son projet PFE (2017) sur les infections nosocomiales à bactéries multirésistantes, et d'autres ont été isolées cette année (Mars, 2018) à partir du laboratoire d'analyse microbiologique d'hôpital El-Hakim Okbi, dont elles présentent une variété de résistance et sensibilité.

Pour la transformation, une souche compétente a été utilisée pour ce processus, dans ce but on a utilisé *E. coli* DH5 α , apporté du laboratoire de génétique cellulaire de Vrije, université de Bruxelles, Belgique.

III. Culture des bactéries

Les souches déjà conservées dans la gélose de conservation ont été ensemencées par des stries sur des milieux spécifiques selon l'espèce de la souche.

- *Staphylococcus sp* et *Staphylococcus aureus* dans le milieu Chapman.
- *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus sp* dans le milieu Mac Conkey.
- *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter koseri* dans le milieu gélose nutritive

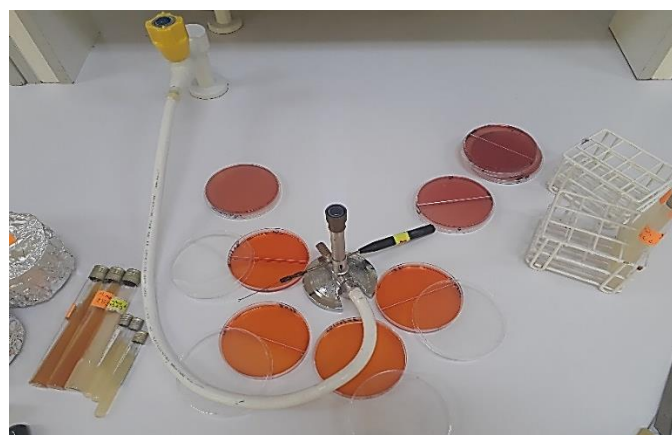


Figure 15 : Ensemencement des souches sur des milieux d'isolement spécifiques

Tableau 2 : Résistance et sensibilité des souches utilisées

Souche \ ATB	AMC	CZ	CRO	ETP	CTX	AMP	FOX	TMN	CX	CAZ	AX	NIT	PC	E
<i>K. pneumoniae</i> (1) (4R+I) *	I	R	R	S	R	R	S	-	-		-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i> (2) (3R) *	-	-	-	-	R	-	-	R	R		-	-	-	-
<i>K. oxytoca</i> 325 (6R) **	R	R	R	R	R	R	S	-	-		-	-	-	-
<i>E. coli</i> 2322 (6R) *	R	R	R	S	R	R	R	-	-		-	-	-	-
<i>E. coli</i> (8R) **	R	S	S	-	S	R	R	S	-	R	R	R	R	R
<i>E. coli</i> 379 (6R) *	R	R	R	S	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 376 (6R) *	R	R	R	S	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 2278 (4R) *	S	R	R	S	R	R	S	-	-	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter koseri</i> (6R) **	R	R	R	S	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-

S : Sensible R : Résistance I : Intermédiaire - : Non testé

* Hôpital Ibn Zohr, 2017

** Hôpital El-Hakim Okbi, 2018

Tableau 2 : Les caractères génétiques des souches utilisées (suite)

Souche \ ATB	CZ	CRO	CTX	FOX	CAZ	COL	TMN	RA	C	OF	TEC	VA	L	OX	FS	TE	IPM	CIP	GMN	TIC
<i>St. sp</i> (8R+2I) **	R	R	-	R	R	R	-	I	R	R	R	I	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>St. aureus</i> 358 (4R) *	-	-	-	R	-	-	-	R	-	-	-	-	R	R	-	-	-	-	-	-
<i>St. aureus</i> P13 (4R) *	-	-	-	R	-	-	-	R	-	-	-	-	R	R	-	-	-	-	-	-
<i>A.baumannii</i> 312 (7R) *	-	-	-	-	R	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	R	R	R
<i>Proteus sp</i> (3R) **	-	-	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ps.</i> <i>aeruginosa</i> 423 (1R) *	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-

S : Sensible R : Résistance I : Intermédiaire - : Non testé

* Hôpital Ibn Zohr, 2017

** Hôpital El-Hakim Okbi, 2018

IV. Extraction plasmidique

La purification des plasmides à partir de bactéries implique la culture de cellules dans un milieu liquide LB et un extrait cellulaire est préparé. L'ARN est retiré et l'ADN est concentré par précipitation à l'éthanol. Dans une préparation plasmidique il est nécessaire de séparer l'ADN plasmidique de la grande quantité d'ADN chromosomique bactérien (**Mahesh S, 2003**).

Nous avons utilisé un protocole d'extraction à partir d'un manuel des travaux pratiques du module biologie moléculaire, université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Maroc [4], avec quelques modifications.

IV.1 Récupération des cellules bactériennes

Les souches ont été mis en culture dans le milieu LB incubées pendant 24h à 37°C°

1- Mettre 1.5 ml de la culture dans un tube eppendorf stérile puis centrifuger 1 min à 12000 g et à 4°C.

2- Le surnageant est éliminé soigneusement du tube, et mettre à nouveau 1.5 ml de la culture dans les eppendorfs pour assurer une concentration bactérienne maximale et refaire la centrifugation.

3- Le surnageant est encore éliminé soigneusement du tube, en laissant le culot cellulaire aussi sec que possible.

IV.2 Lyse alcaline

La lyse alcaline a été initialement développée pour isoler l'ADN plasmidique des bactéries en vertu du principe qu'une solution alcaline dénature l'ADN bactérien, l'ADN plasmidique sauvage restant à double brin (**Kieleczawa, 2006**)

Afin de purifier les plasmides on a suivi la procédure suivante :

1- Resuspendre le culot bactérien dans 100 µl de solution I (voir annexe) maintenue au préalable à 4°C. Il est essentiel de s'assurer que le culot bactérien est complètement suspendu.

2- Incuber le tube à température ambiante pendant 5 minutes.

3- Ajouter par la suite 200 µl de la solution II (voir annexe) fraîchement préparée puis mélanger soigneusement en inversant le tube eppendorf 3 à 6 fois. Il faut s'assurer que le lysat est devenu clair et visqueux.

- 4- Incuber pendant 5min dans la glace.
- 5- Ajouter par la suite 150 μ l de solution III (voir annexe) fraîche (entre 0 et 4°C). Homogénéiser bien le tube pendant quelques secondes. Le tube est immédiatement placé dans la glace (0°C) pendant 15 min.
- 6- Centrifuger le tube pendant 10 min à 12000 g et 4°C.
- 7- Transférer très délicatement le surnageant dans un nouveau tube eppendorf stérile. Cette étape permet d'éliminer les débris cellulaires et les acides nucléiques de haut poids moléculaire.
- 8- Précipiter les plasmides en ajoutant au surnageant deux volumes d'éthanol (900 μ l) ; bien mélanger le contenu du tube et laisser précipiter 15 à 20 min à -20°C.
- 9- Centrifuger le tube pendant 10 min à 12000 g et 4°C.
- 10- Éliminer le surnageant puis inverser le tube sur du papier filtre propre et sécher pendant 10 min à température ambiante.
- 11- Dissoudre délicatement le culot d'ADN (souvent à peine visible) dans 50 μ l de TE (pH 8) et garder le à -20C°.

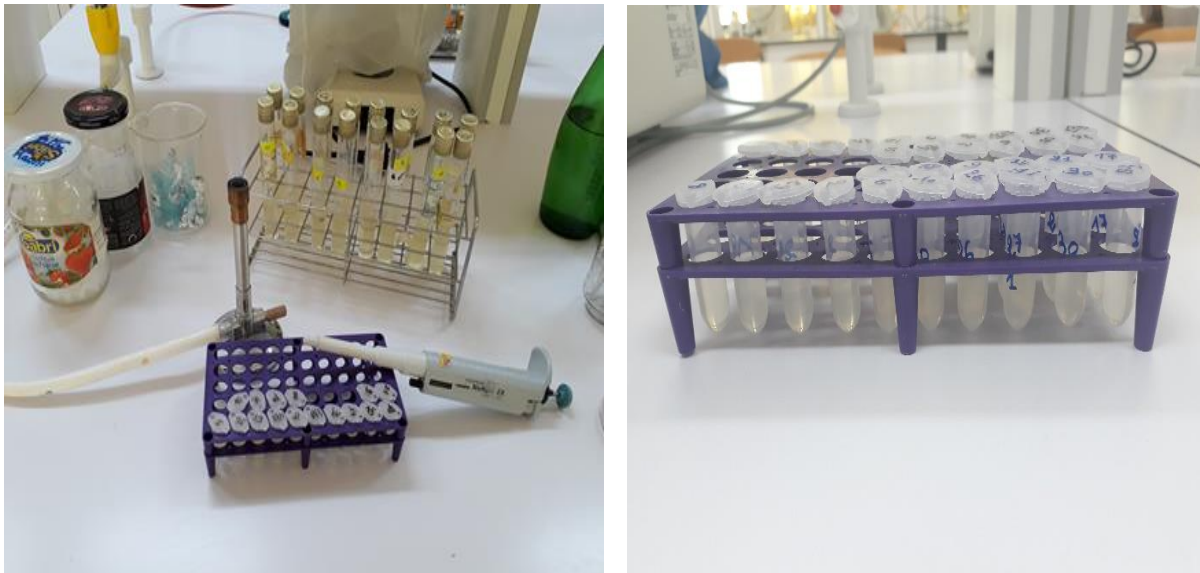


Figure 16 : Exécution de l'extraction de l'ADN plasmidique

V. Spectrophotométrie

Deux méthodes peuvent être utilisées pour évaluer la qualité et la quantité d'ADN génomique purifié : l'électrophorèse sur gel et la spectrophotométrie à UV. Chacune de ces méthodes fournit des informations différentes mais qui se chevauchent sur la quantité la qualité et de l'ADN génomique. La spectrophotométrie à UV peut être utilisée pour fournir une estimation précise de la quantité d'ADN récupéré et pour confirmer que l'ADN est exempt d'autres contaminants chimiques, y compris des solvants organiques (Williams *et al.*, 2007).

Afin de mesurer la quantité plasmidique extraite dans chacune des souches et vérifier sa pureté, une densité optique de l'ADN a été effectuée par spectrophotométrie au stade final de son extraction. L'ADN était conservé dans 50 µl de solution Tris-EDTA à -20C°, ensuite étant dilué par mettre 800 µl d'eau distillée stérile, le volume est divisé en moitié pour mesurer l'ADN sur les deux longueurs d'ondes (260 nm et 280 nm).

❖ Qualité et quantification de l'extrait

La concentration et la pureté de l'ADN peuvent être déterminées en lisant la densité optique d'un échantillon à 260 et 280 nm. La lecture à 260 nm permet le calcul de l'acide nucléique dans l'échantillon. Pour l'ADN double brin pur, 1 DO₂₆₀ = 50 mg / l (pour une cuvette de longueur de trajet de 1,0 cm).

Le calcul de concentration plasmidique mesuré par spectrophotométrie se fait selon cette loi :

$$\text{Concentration } (\mu\text{g/ml}) = 50 \times \text{facteur de dilution} \times \text{DO}_{260\text{nm}}$$

Le rapport entre les lectures à 260 et 280 nm (DO₂₆₀ / DO₂₈₀) fournit une estimation de la pureté de l'acide nucléique. Les préparations pures d'ADN ont une valeur DO₂₆₀ / DO₂₈₀ de 1,6-1,9. S'il y a une contamination avec des quantités significatives de protéines, de lipides ou de phénols, la DO₂₆₀ / DO₂₈₀ sera inférieur à 1,6. Une valeur supérieure à 1,9 indique une contamination possible avec ARN (Williams *et al.*, 2007).

VI. Électrophorèse

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode simple et très efficace de séparation, identifie et purifie des fragments d'ADN de 0,5 à 25 kb. Le protocole peut être divisé en trois étapes :

- 1) Un gel est préparé avec une concentration d'agarose appropriée à la taille des fragments d'ADN à séparer.
- 2) Les échantillons d'ADN sont chargés dans les puits d'échantillon et le gel est mis sous tension et pendant une période de temps qui permettra une séparation optimale.
- 3) Le gel est coloré, le bromure d'éthidium est incorporé dans le gel et tampon d'électrophorèse, visualisé directement par illumination avec la lumière UV (**Voytas D,2001**).

❖ Préparation du gel

- Peser la quantité d'agarose nécessaire pour préparer 100 ml de gel à 1%.
- Transférer la poudre d'agarose dans un erlenmeyer et ajouter 100 ml de TAE (Tris, Acide acétique glacial, EDTA).
- Porter à ébullition sur une plaque chauffante jusqu'à ce que tout l'agarose soit fondu.
- Laisser l'agarose refroidir et puis couler la doucement sur la plaque du gel tout en évitant la formation de bulles d'air et mettre le peigne dans le moule de gel pour créer des puits.
- Laisser par la suite le gel se solidifier à la température ambiante puis retirer le peigne (**Debabza, 2015**).

❖ Dépôt des échantillons et migration

- Ajouter 8 µl de tampon de charge (voir annexe) à des échantillons d'ADN à séparer.
- Déposer à l'aide d'une micropipette 20 µL d'ADN au fond de chaque puits.
- Verser le tampon TAE dans la cuve jusqu'à recouvrir le gel.
- Fermer le couvercle de la cuve à électrophorèse. Brancher la cuve au générateur et le générateur à la prise de courant et faire migrer à 100 V.
- Vérifiez que les électrodes sont branchées sur les emplacements corrects dans l'alimentation.
- Arrêter la migration en coupant le courant lorsque le colorant du tampon de charge a suffisamment migré (**Debabza 2015**).

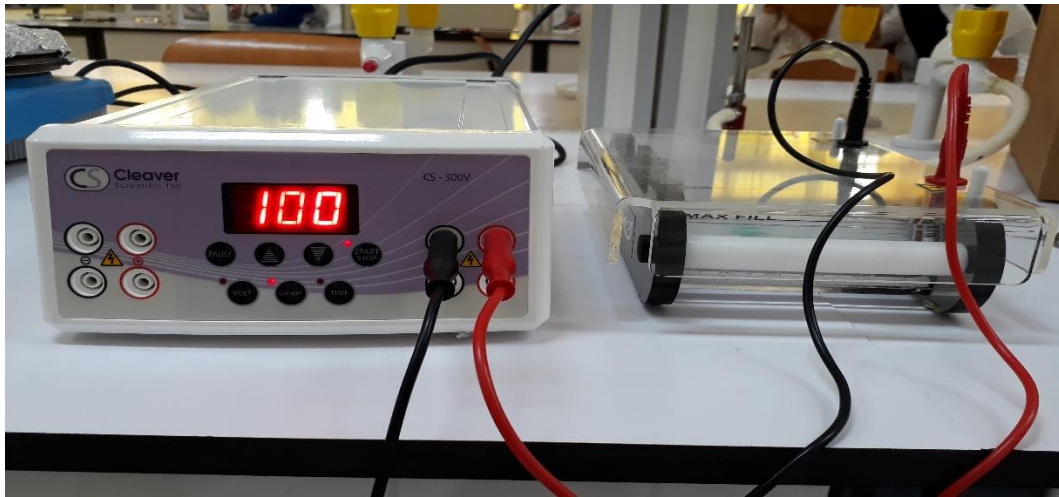


Figure 17 : Déroulement d'électrophorèse.

➤ **Coloration et visualisation**

- Placer le plateau de gel sur du papier absorbant pour absorber tout tampon supplémentaire.
- Faire glisser délicatement le gel dans la cuve de coloration contenant 200 ml d'eau distillée et 20 μ l du bromure d'éthidium pendant 20 à 30 min.
- Après un léger rinçage à l'eau, le gel est placé sur la plaque UV pour visualiser les bandes. (Debabza 2015).

➤ **Analyse de gel**

Un logiciel de traitement d'images numériques donne la possibilité de mesurer l'intensité lumineuse de chaque pixel de l'image. La représentation graphique de chacun de ces tracés à l'aide d'un logiciel permet alors de détecter des bandes invisibles à l'œil nu en repérant les variations d'intensité sur les courbes [5]. Dans ce but, nous avons utilisé un logiciel de traitement d'images conçu pour les profils électrophorétiques, qui s'appelle CLIQS® développé par le laboratoire TotalLab, au Royaume Unis.

VII. Transformation

Certaines bactéries à Gram positif (*Streptococcus* et *Bacillus*) ou à Gram négatif (*Neisseria*, *Branhamella*, *Acinetobacter*, *Haemophilus*) [6] peuvent capter des fragments d'ADN à partir du milieu extérieur. Autre moyen pour les bactéries de transférer leurs gènes, provenir d'autres cellules de la même espèce ou d'autres espèces. L'ADN est issu de cellules mortes, il est capté et intégré dans le chromosome du receveur au cours d'un processus appelé transformation (**Pozzetto et al., 2001**).

Pour effectuer ce processus, nous avons utilisé deux souches :

- *Escherichia coli* résistante à 08 antibiotiques (8R) donatrice de plasmide, d'origine vaginale apporté du laboratoire de microbiologie à l'hôpital El-hakim Okbi.
- *E. coli* DH5 α compétente, apporté du laboratoire de génétique cellulaire de Vrije, université de Bruxelles, Belgique.

Les souches DH5 α sont des cellules d'*E.coli* conçues pour maximiser l'efficacité de la transformation. Ils prennent leur nom du biologiste américain Douglas Hanhan. Ces cellules sont définies par trois mutations :

- *recA1* qui est une mutation ponctuelle qui remplace la glycine au site 160 du polypeptide *recA* par un acide aspartique dans le but de rendre l'activité de la recombinaise inactive.
- *endA1* est une mutation qui inactive une endonuclease intracellulaire pour prévenir la dégradation du futur plasmide inséré.

Ces deux mutations aident à l'insertion du plasmide.

- *lacZ15* qui permet le criblage bleu blanc. Ces cellules sont compétentes et souvent utilisées avec la transformation au chlorure de calcium pour insérer un plasmide désiré [7].

❖ Protocole de transformation

- La souche bactérienne *E. coli* DH5 α est incubée dans le milieu LB contenant CaCl₂ à 37°C pendant 24 heures.
- 5 μ l d'ADN plasmidique purifié à partir de la souche *E. coli* (R8) est ajouté à 150 μ l des souches bactériennes compétentes (DH5 α)

- Placer le mélange dans la glace pendant 15 à 20 minutes, ensuite transférer le rapidement dans l'étuve à 42°C pendant 45 secondes pour provoquer un choc thermique. Puis mettre le rapidement une autre fois 1 à 2 minutes dans la glace.
- Ajouter stérilement 500 µl du milieu LB + CaCl₂.
- Incuber à 37°C pendant 40 minutes.
- Après incubation, 100 à 200 µl de la culture est étalée sur les boîtes LB solide, et incubée à 37°C pendant 24 heures.
- Les colonies transformées sont repiquées sur la GN inclinée puis conservées à 4C°.

Pour s'assurer du bon déroulement de la transformation, une électrophorèse est hautement recommandée afin de confirmer l'acquisition du plasmide par la DH5α.



Figure 18 : Exécution de la transformation + l'extraction plasmidique

II. Résultats et discussion

I. Résultats

I.1 Extraction d'ADN plasmidique

Après avoir effectué l'extraction et la purification de l'ADN plasmidique par lyse alcaline, on a obtenu un culot blanchâtre au fond de l'éppendorf, qui signifie la présence du plasmide extrait et précipité grâce à l'éthanol. Cela est un résultat d'accumulation de millions de filaments d'ADN provenant de nombreuses cellules mais de la même souche.



Figure 19 : Aspect du culot de l'ADN plasmidique

I.2 Quantification de concentration d'ADN plasmidique

Pour déterminer la quantité de plasmide extraite, une spectrophotométrie était faite pour calculer la densité optique de l'ADN plasmidique purifié aux deux longueurs d'ondes 260 nm et 280 nm. Les résultats obtenus ainsi que les calculs du rapport de pureté ($DO_{260\text{nm}} / DO_{280\text{nm}}$) sont illustrés dans le tableau ci-dessous (**tableau 3**).

Les résultats du rapport de pureté montrent que tous nos extraits sont purs, et ne présentent aucune contamination soit de protéines ou de l'ARN, ce qui montre l'efficacité du protocole suivi à éliminer les différents types de contaminants, cela nous a permis donc d'avoir une concentration précise de l'ADN plasmidique présent à partir des valeurs d'absorbance obtenues sur la longueur d'onde 260 nm (**figure 20**).

Tableau 3 : Les valeurs d'absorbance d'ADN plasmidique

Les souches	DO _{260 nm}	DO _{280 nm}	DO _{260nm} / DO _{280nm}
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1) (4R+I)	1.480	0.786	1.88
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (2)	1.190	0.622	1.91
<i>Klebsiella oxytoca</i> 325 (6R)	0.794	0.430	1.84
<i>E. coli</i> 2322 (6R)	1.290	0.696	1.85
<i>E. coli</i> (8R)	1.391	0.754	1.84
<i>E. coli</i> 379 (6R)	1.204	0.680	1.77
<i>E. coli</i> 376 (6R)	1.237	0.696	1.77
<i>E. coli</i> 2278 (4R)	0.781	0.433	1.80
<i>Staphylococcus sp</i> (8R+2I)	1.046	0.590	1.77
<i>Staphylococcus aureus</i> 358(4R)	1.671	0.908	1.84
<i>Staphylococcus aureus</i> P13(4R)	1.405	0.742	1.89
<i>Citrobacter koseri</i> (6R)	1.660	0.915	1.81
<i>Acinetobacter baumannii</i> 312 (R7)	1.488	0.816	1.82
<i>Proteus sp</i> (R3)	1.673	0.916	1.82
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 423 (R1)	0.518	0.311	1.66

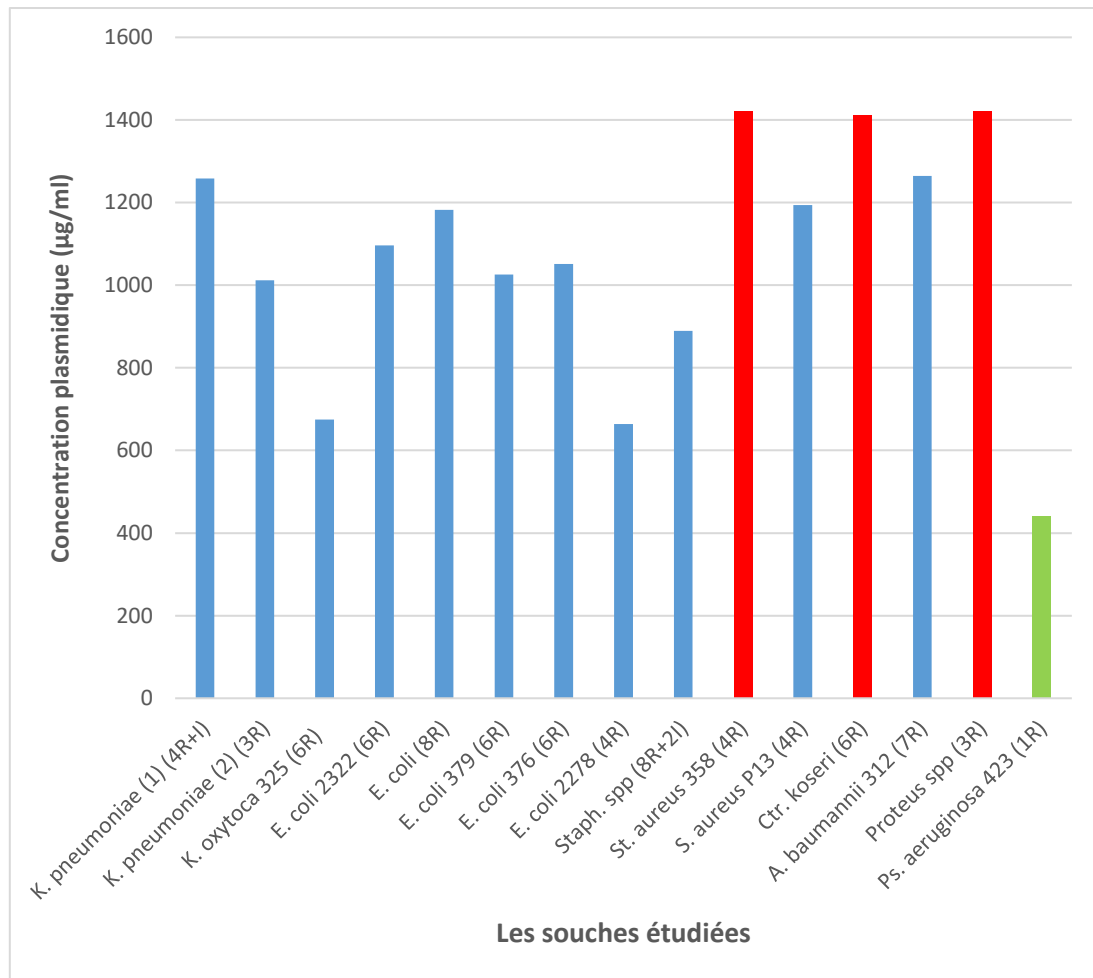


Figure 20 : Les concentrations en ADN des souches utilisées

Selon l'histogramme, les souches *Staphylococcus aureus* 358 (4R), *Citrobacter koseri* (6R) et *Proteus sp.* (3R) ont les valeurs de concentration plasmidique les plus élevées qui dépassent 1420 µg/ml, 1411 µg/ml et 1422 µg/ml respectivement, tandis que *Pseudomonas aeruginosa* 423 (R1) possède la concentration en ADN plasmidique la plus faible (440.3 µg/ml) comparant aux autres souches.

Les Klebsielles ont des concentrations qui oscillent entre 600 µg/ml et 1200 µg/ml. Les différentes souches d'*E. coli* ont des concentrations qui varient de 600 µg/ml à 1100 µg/ml. Les espèces du genre *Staphylococcus* ont les plus grandes concentrations en ADN plasmidique dont la quantité varie de 800 µg/ml à 1400 µg/ml.

I.3 Électrophorèse

L'ADN est chargé dans des puits pré-coulés dans le gel et un courant est appliqué. Les fragments d'ADN migreront vers l'anode chargée positivement, les mobilités observées pour les molécules d'ADN dans les gels d'agarose dépendent fortement du champ électrique appliqué au gel, très probablement parce que le champ électrique perturbe les liaisons hydrogènes dans les zones de jonction [8].

Le processus d'électrophorèse a duré une heure, le gel est trempé dans la solution de bromure d'éthidium qui est un révélateur de bandes, en s'intercalant entre les bases d'ADN pour donner une fluorescence par exposition aux rayons UV aux alentours de 300nm. Les bandes révélées désignent que l'ADN plasmidique extraits des 15 souches bactériennes multirésistantes étudiées a été bien séparé grâce au gel d'agarose qui est le moyen le plus efficace pour séparer des fragments d'ADN de tailles variables allant de 100 pb à 25 kb.

Les fragments d'ADN plasmidique sont séparés par la vitesse du courant, donc la localisation des bandes sur le gel dépend de la mobilité électrophorétique d'ADN qui varie selon sa taille et sa forme, car l'ADN plasmidique surenroulé, en raison de sa conformation compacte, traverse le gel le plus rapidement, suivi d'un fragment d'ADN linéaire de celui-ci, tandis que la forme circulaire ouverte voyageant le plus lent [9].

L'apparition d'une bande sur les pistes de migration de chaque souche, signifie une présence d'un plasmide, ce qui peut expliquer la multirésistance de certaines bactéries, portée par leurs plasmides.

Le résultat d'électrophorèse (**figure 21**) montre que la majorité des souches étudiées possèdent un ou plusieurs plasmides de différentes tailles. Certaines pistes ne montraient aucune bande visible à l'œil nu, mais avec un traitement par le logiciel CLIQS®, nous avons pu détecter des traces de bandes d'ADN et les localiser avec détermination de leur poids moléculaire.

K.p *E.c* *St.s* *E.c* *St.a* *C.k* *St.a* *A.b* *Ps.s* *K.o* *P.a* *E.c* *E.c* *K.p* *E.c*
 (4R+I)(6R)(8R+2I)(8R) (4R) (6R) (4R) (7R) (3R) (6R) (1R) (6R) (6R) (3R) (4R)

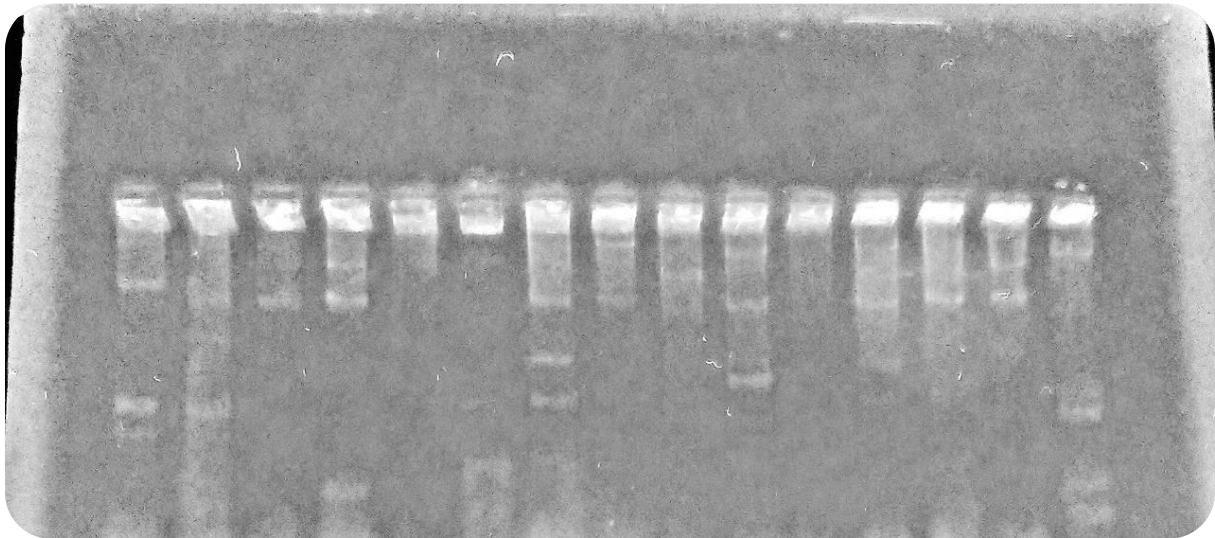


Figure 21 : Profil électrophorétique de l'ADN plasmidique

K.p : *Klebsiella pneumoniae*

E.c : *Escherichia coli*

A.b : *Acinetobacter baumannii*

St.a : *Staphylococcus aureus*

St.s : *Staphylococcus sp*

C.k : *Citrobacter koseri*

Ps.s : *Proteus sp*

K.o : *Klebsiella oxytoca*

P.a : *Pseudomonas aeruginosa*

➤ Poids moléculaire

Grâce au logiciel CLIQS®, nous étions capables de ressortir le poids moléculaire des extraits d'ADN plasmidique de chaque souche. La figure ci-dessous (**figure 22**) indique toutes les pistes de 1 jusqu'au 15, et la taille de chaque bande présente dans la piste de migration.

La taille est indiquée en pair de bases, celles qui sont affichées en rouge s'agissent des plus grandes tailles et des plus petites tailles de plasmide calculées par le logiciel.

image window and then press the button to compute the sizes of all the bands

Standard Edit

LAM-HIN3

23130
 9416
 6557
 4361

Curve Type
 Cubic Spline

Use Rf to propagate sizes

Editing

Unassign a standard by right clicking a lane.

Click and drag the yellow iso-Mol. Size lines from the assigned bands to the correct bands.

Compute Sizes

	Band No	Volume	Vol+BkGnd	Calib Vol(ug)	Base Pairs	Rf
Lane 1	<i>K.p</i> 1	898924,00	898924,00	-	23130,000	0,155
	2	1695855,00	1695855,00	-	9416,000	0,535
	3	718254,00	718254,00	-	7288,402	0,610
Lane 2	<i>E.c</i> 1	625423,00	625423,00	-	21172,806	0,205
	2	296634,00	296634,00	-	16786,615	0,319
Lane 3	<i>St.sp</i> 1	1433273,00	1433273,00	-	9416,000	0,535
	2	820600,00	820600,00	-	20841,169	0,213
Lane 4	1	1384514,00	1384514,00	-	14303,969	0,386
	<i>E.c</i> 1	476352,00	476352,00	-	24852,223	0,108
	2	1934962,00	1934962,00	-	20979,396	0,210
Lane 5	3	1593093,00	1593093,00	-	2317,793	0,788
	<i>Siph</i> 1	819464,00	819464,00	-	20576,532	0,220
	2	801324,00	801324,00	-	10282,983	0,507
Lane 6	3	529165,00	529165,00	-	7191,455	0,613
	<i>Ctr</i> 1	630919,00	630919,00	-	4600,842	0,706
	2	743917,00	743917,00	-	9844,861	0,521
Lane 7	3	1268827,00	1268827,00	-	4901,789	0,695
	<i>Siph</i> 1	603336,00	603336,00	-	21540,458	0,195
	2	948483,00	948483,00	-	14267,265	0,388
Lane 8	3	475033,00	475033,00	-	10008,090	0,516
	<i>Acn</i> 1	1554935,00	1554935,00	-	20989,134	0,209
	<i>Prt</i> 1	1338599,00	1338599,00	-	13864,431	0,399
Lane 9	1	865604,00	865604,00	-	26702,019	0,056
	<i>Klo</i> 2	1244182,00	1244182,00	-	20220,442	0,229
	3	649709,00	649709,00	-	11922,752	0,455
Lane 10	4	417403,00	417403,00	-	8100,110	0,580
	<i>P.a</i> 1	1238219,00	1238219,00	-	19116,639	0,258
	1	590020,00	590020,00	-	24429,905	0,120
Lane 11	<i>E.c</i> 2	1251901,00	1251901,00	-	20937,990	0,211
	3	1256773,00	1256773,00	-	14402,549	0,384
Lane 12	1	594525,00	594525,00	-	23959,219	0,131
	<i>E.c</i> 2	1273307,00	1273307,00	-	21126,849	0,206
	3	315916,00	315916,00	-	15417,001	0,356
	4	1325045,00	1325045,00	-	12479,550	0,440
Lane 13	<i>K.p</i> 1	177049,00	177049,00	-	24405,721	0,119
	2	3018563,00	3018563,00	-	21816,528	0,188
Lane 14	<i>E.c</i> 1	1020680,00	1020680,00	-	9254,759	0,541
	2	760885,00	760885,00	-	3085,357	0,759
	3	475524,00	475524,00	-	379,518	0,854

Figure 22 : Les valeurs du poids moléculaire d'ADN plasmidique obtenues par le logiciel

➤ Analyse de gel

Pour faciliter l'analyse du profil électrophorétique notamment dans la détection des bandes, nous avons utilisé un logiciel CLIQS® de traitement d'image spécialisé dans l'analyse du gel d'électrophorèse, et grâce à ce dernier on a pu bien préciser la localisation des bandes et ressortir le poids moléculaire porté par chaque bande séparée.

1. L'espèce *Klebsiella pneumoniae*

Le premier puit contenait l'extrait plasmidique de *Klebsiella pneumoniae* (1) (4R+I), donne lieu à une piste sur laquelle on distinguait 03 bandes à l'aide du logiciel (**figure 23**), cette souche étant portante de 04 résistances aux antibiotiques (céfazoline, ceftriaxone, céfotaxime et ampicilline) et un état intermédiaire (amoxicilline+acide clavulanique) avec concentration plasmidique égale à 1258 µg/ml.

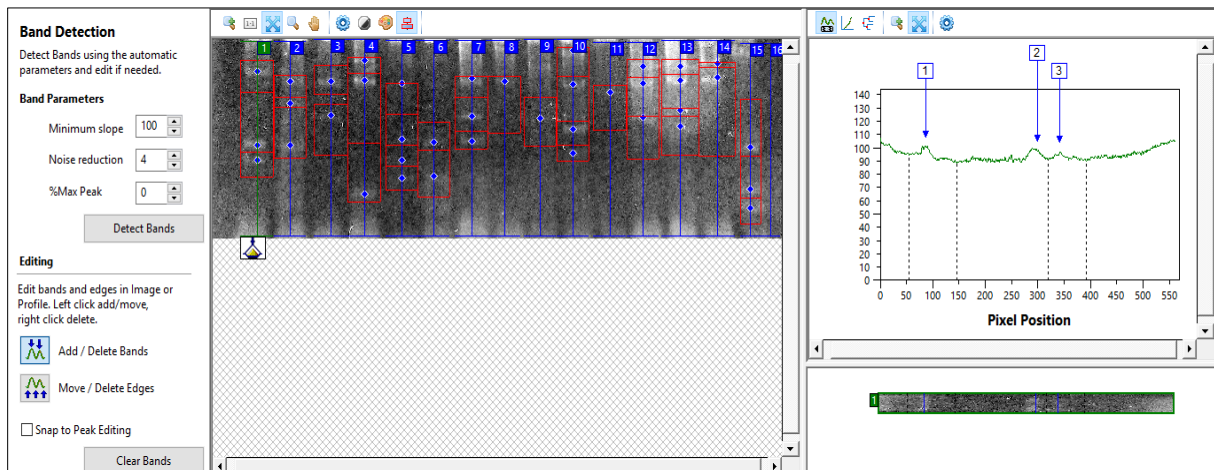


Figure 23 : Profil électrophorétique de *Klebsiella pneumoniae* (1) (4R+I) traité par le logiciel

Ce logiciel affiche un pic correspondant à l'intensité lumineuse mesurée de chaque pixel de l'image, de ce fait chaque pic représente une nuance de bande. La première piste est marquée en vert, le graphe à droite affiche la position pixel de l'intensité lumineuse. On registre alors 03 pics chacun correspondant à une bande indiquant la présence de plasmides de tailles décroissantes de 23130 pb, 9416 pb et 7288 pb respectivement, dont le 2^{ème} pic semble plus intense que les autres pics (1 et 3), cela traduit la présence d'une densité plasmidique supérieure aux autres bandes.

Sur la 14^{ème} piste, *Klebsiella pneumoniae* (2) (3R) résistante aux 03 antibiotiques (céfotaxime, tobramycine et cefoxitine) avec une concentration égale à 1011.5 µg/ml, montrait deux bandes rapprochées de taille égale à 24405 pb et 21816 pb respectivement, dont la 2^{ème} est la plus

intense donc le plasmide correspondant est en volume et en nombre plus important que le premier (figure 24).

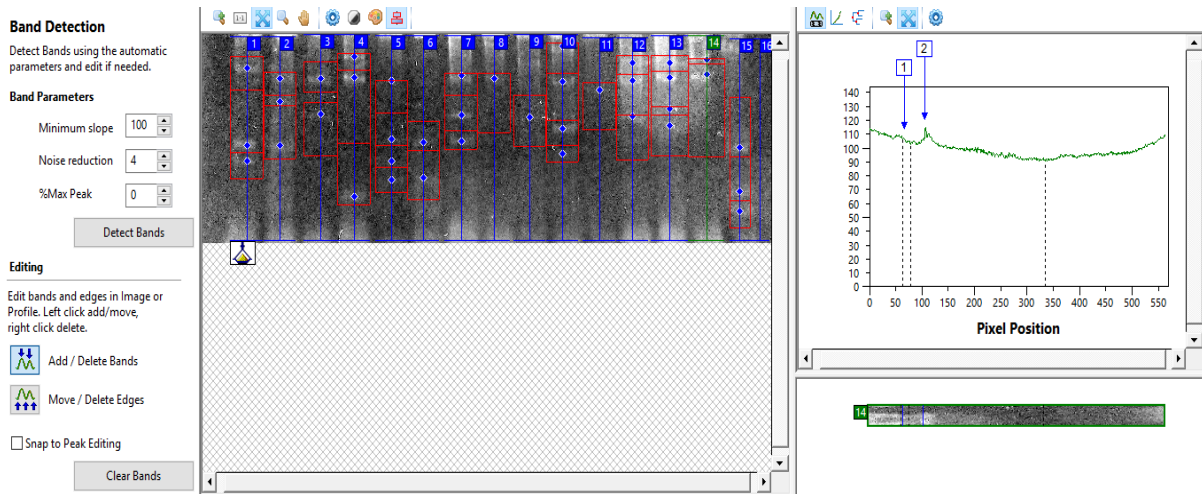


Figure 24 : Profil électrophorétique de *Klebsiella pneumoniae* (2) (3R) traité par le logiciel

2. L'espèce *Klebsiella oxytoca*

Sur la 10^{ème} piste, résistante aux 06 antibiotiques (amoxicilline+acide clavulanique, ampicilline, céfotaxime, ceftriaxone, céfazoline et ertapénème) avec une concentration égale à 674.9 µg/ml. Le logiciel indiquait la présence de 04 bandes de taille différente, 26702 pb, 20220 pb, 11922 pb et 8100 pb respectivement, dont la 3^{ème} est la plus intense (figure 25).

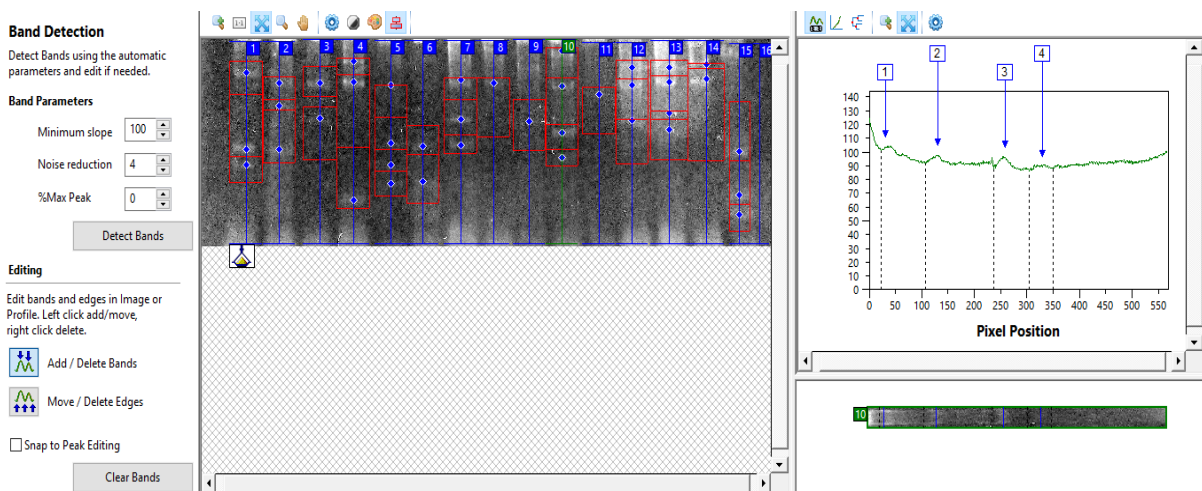


Figure 25 : Profil électrophorétique de *Klebsiella oxytoca* (6R) traité par le logiciel

3. L'espèce *Escherichia coli*

Présente sur la 2^{ème} piste *E. coli* 2322 (6R), la 4^{ème} piste *E. coli* (8R), la 12^e piste *E. coli* 379 (6R), la 13^e piste *E. coli* 376 (6R) et la 15^e piste *E. coli* 2278 (6R).

- On commence par la première souche, *E. coli* 2322 qui possède 06 résistances aux antibiotiques (amoxicilline+acide clavulanique, céfazoline, ceftriaxone, céfotaxime ampicilline et céfoxitine) avec une concentration égale à 1096.5 µg/ml. Le champ de migration indiquait 03 bandes bien séparées d'intensité et distance différentes (**figure 26**).

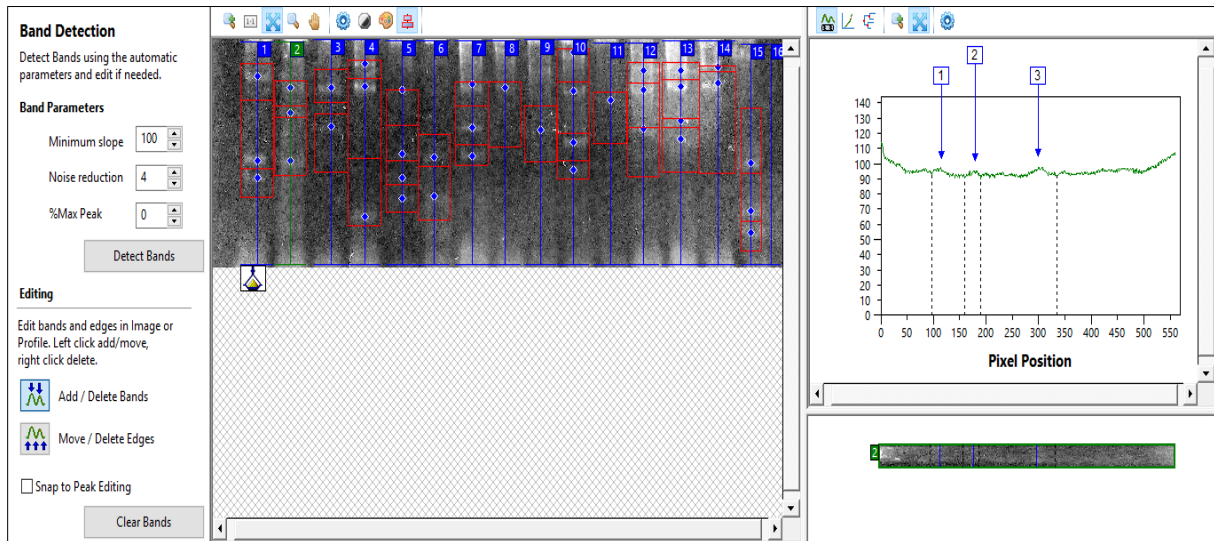


Figure 26 : Profil électrophorétique d'*E. coli* 2322 (6R) traité par le logiciel

La piste verte est la piste actuelle, le graphe enregistre 03 pics indiquant l'existence de 03 plasmides, de taille 21172 pb, 16786 pb et 9416 pb respectivement. Le 3^{ème} pic appartenant à la 3^{ème} bande est le plasmide le plus dense.

- La souche *E. coli* (8R) de la 4^{ème} piste résistante à 08 antibiotiques (amoxicilline+acide clavulanique, ampicilline, céfoxitine, nitrophyranthoïne, pipéracilline, erythromycine, amoxicilline et ceftazidime) ayant une concentration égale à 1182.35 µg/ml, montrait 03 bandes (**figure 27**) avec des tailles différentes : 24852 pb, 20979 pb et 2317 pb respectivement, où la 2^{ème} bande est la plus intense.

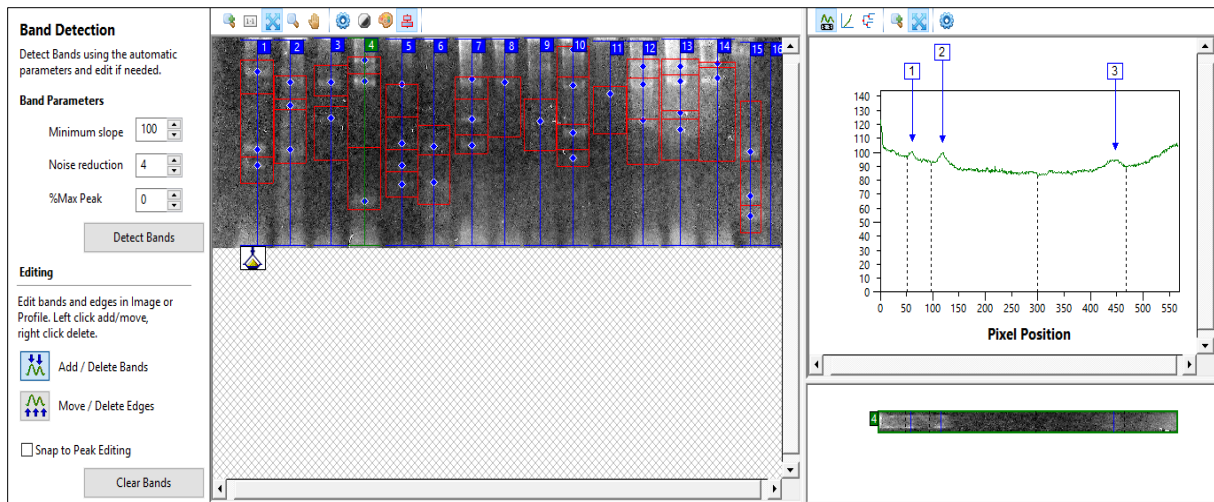


Figure 27 : Profil électrophorétique d'*E. coli* (8R) traité par le logiciel

- La souche *E. coli* 379 (6R) présente sur la 12^{ème} piste, possédante 06 résistances (amoxicilline+acide clavulanique, céfazoline, ceftriaxone, céfotaxime, ampicilline et céfoxitine) avec une concentration égale à 1025,95 µg/ml montrait 03 bandes, de taille 24429 pb, 20937 pb et 14402 pb respectivement (**figure 28**).

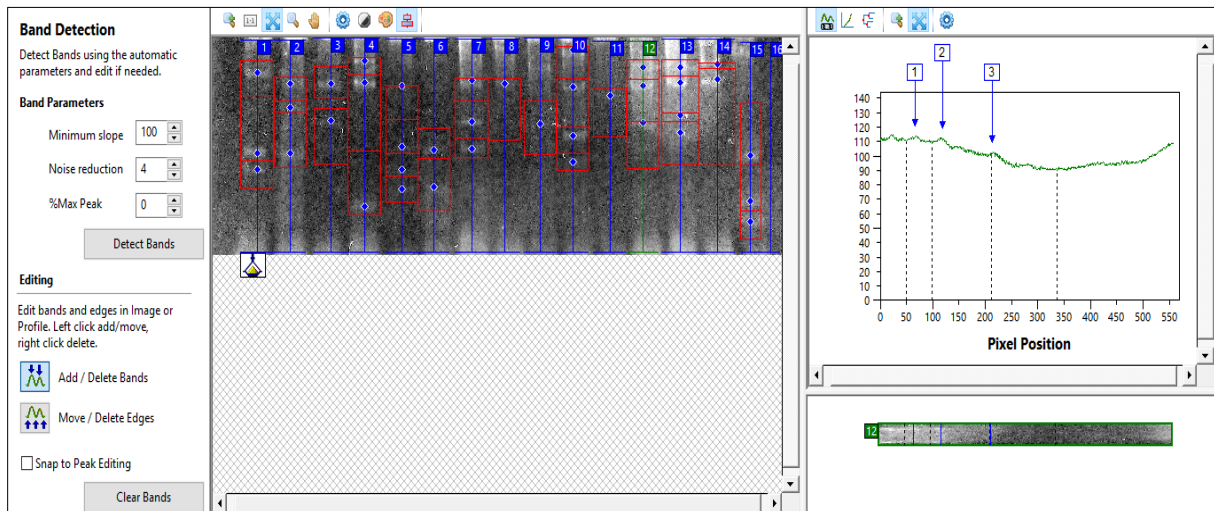


Figure 28 : Profil électrophorétique de *E. coli* 379 (6R) traité par le logiciel

- La souche *E. coli* 376 de la 13^{ème} piste résiste à 06 antibiotiques (amoxicilline+acide clavulanique, céfazoline, ceftriaxone, céfotaxime, ampicilline et céfoxitine) avec une concentration égale à 1051.45 µg/ml, indiquait la présence de 04 bandes rapprochées possédantes une taille de 23959 pb, 21126 pb, 15417 pb et 12479 pb respectivement (**Figure 29**), le 2^{ème} pic enregistré par le graphe est le plus intense reflétant le plasmide le plus dense chez cette souche.

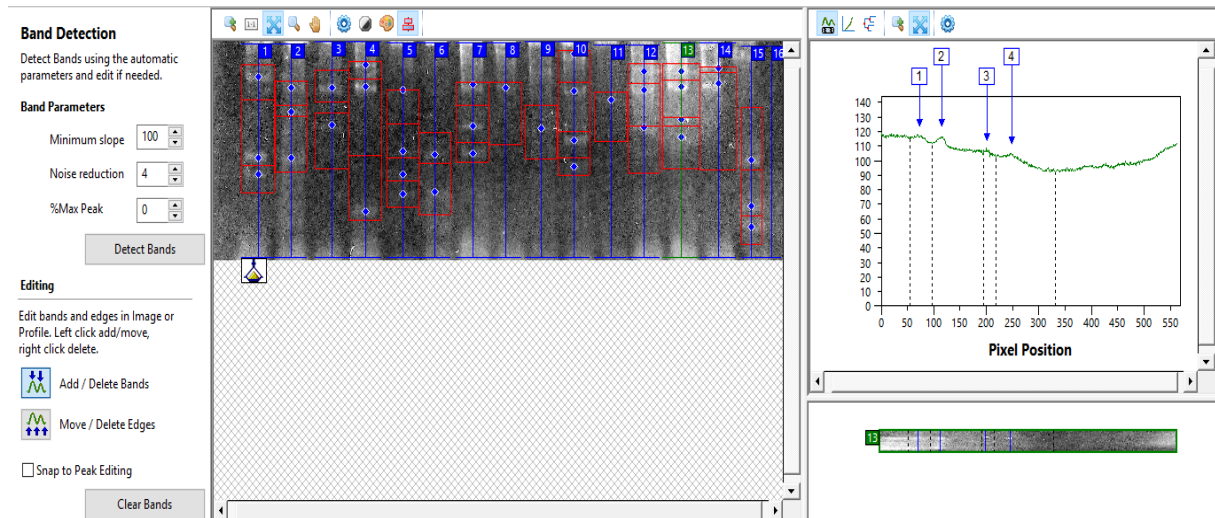


Figure 29 : Profil électrophorétique d'*E. coli* 379 (6R) traité par le logiciel

- Le champ électrophorétique de la dernière souche *E. coli* 2278 (4R) présente sur la 15^{ème} piste résistante aux 04 antibiotiques (céfazoline, ceftiaxone, céfotaxime et ampicilline) avec une concentration égale à 663,85 µg/ml, montrait 03 bandes à distance de migration plus lointe que toutes les autres souches, dont leur taille était : 9254 pb et 3085 pb et 379 pb respectivement (**figure 30**).

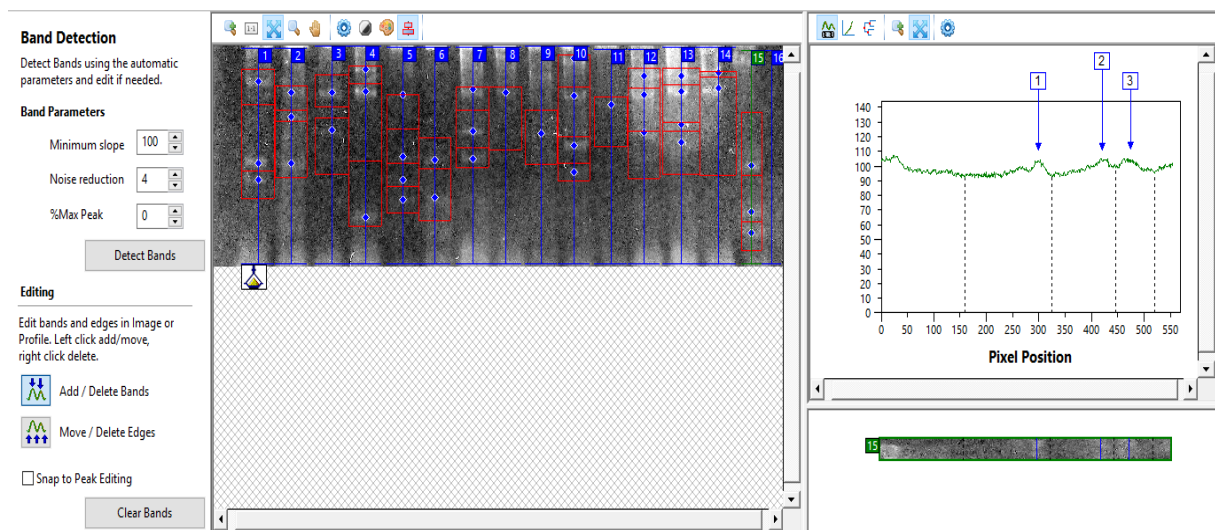


Figure 30 : Profil électrophorétique d'*E. coli* 2278 (4R) traité par le logiciel

4. L'espèce *Staphylococcus sp*

Cette souche migrait sur la 3^{ème} piste, ayant 08 résistances aux antibiotiques (céfazoline, ceftriaxone, céfoxitine, ceftazidime, colistine, chloramphénicol, ofloxacine, et teicoplanine) avec deux états intermédiaires (vancomycine et rifampicine) possédante une concentration égale à 889.1 µg/ml, le logiciel a détecté 02 bandes de taille 20841 pb et 14303 pb respectivement (**figure 31**), dont la première est la plus intense.

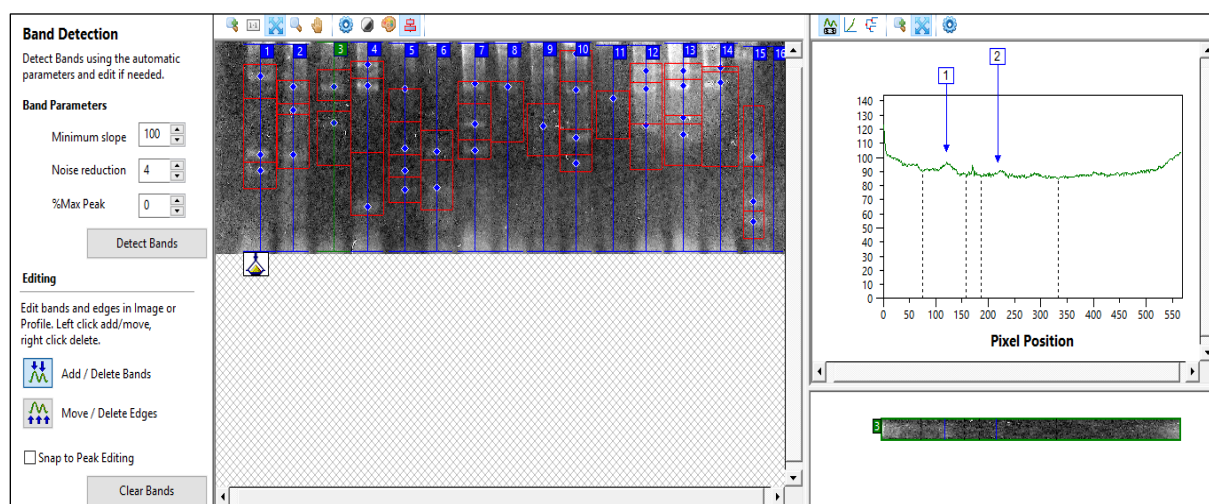


Figure 31 : Profil électrophorétique de *Staphylococcus sp* (8R+2I) traité par le logiciel

5. L'espèce *Staphylococcus aureus*

Présente dans la 5^{ème} piste *Staphylococcus aureus* 358 (4R) et la 7^{ème} piste *Staphylococcus aureus* P13 (4R).

- La souche *Staphylococcus aureus* 358 résistante aux 04 antibiotiques (céfoxitine, oxacilline, lincomycine et kanamycine), sa concentration égale à 1420.35 µg/ml. Le logiciel affichait qu'elle possède 04 bandes équivalentes à 04 plasmides portants ces tailles : 20576 pb, 10282 pb, 7191 pb, et 4600 pb respectivement, ce qui explique sa concentration plasmidique élevée, bien que les bandes n'étaient pas bien visibles à l'œil nu (**figure 32**).

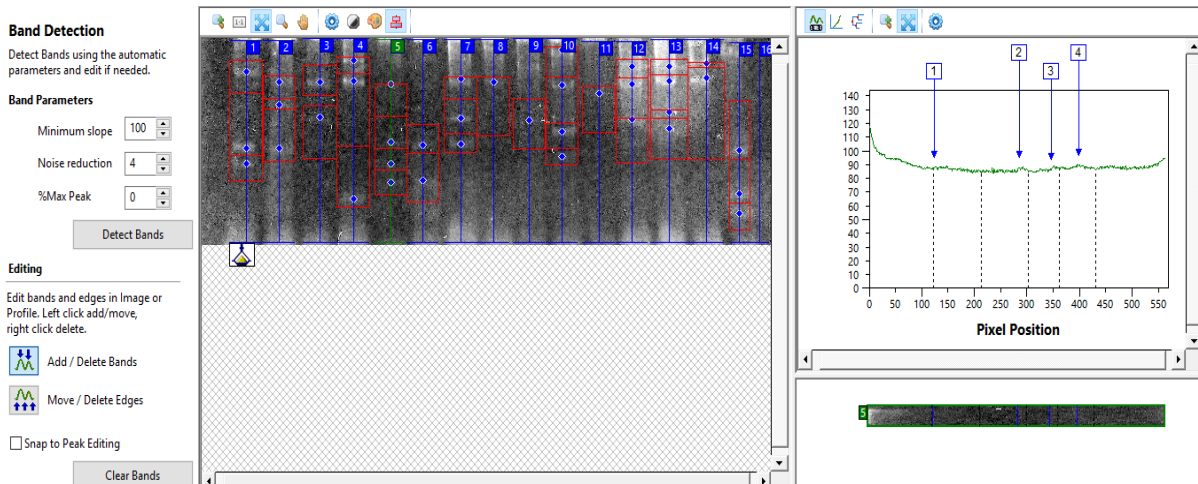


Figure 32 : Profil électrophorétique de *Staphylococcus aureus* 358 (4R) traité par le logiciel La souche *Staph aureus* P13 (4R) présente sur la 7^{ème} piste, possède 04 résistances (céfoxitine, oxacilline, lincomycine et kanamycine) avec une concentration égale à 1194.25 µg/ml, le graphe affichait qu'elle a 03 plasmides suite à la présence de 03 bandes, de taille 21540 pb, 14267 pb et 10008 pb respectivement, dont le 2^{ème} est le plus dense (**figure 33**).

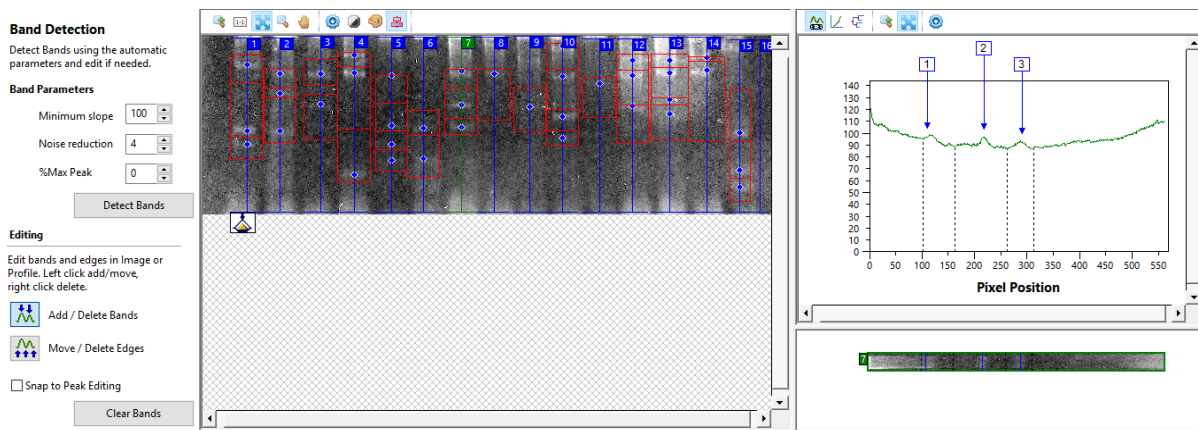


Figure 33 : Profil électrophorétique de *Staphylococcus aureus* P13 (4R) traité par le logiciel

6. L'espèce *Citrobacter koseri*

Cette souche présente sur la 6^{ème} piste, dotée de 06 résistances aux antibiotiques (amoxicilline+acide clavulanique, céfazoline, ceftriaxone, céfotaxime, ampicilline et céfoxitine) avec une concentration plasmidique égale à 1411 µg/ml, indiquait 02 bandes sur son champ de migration, portant une taille de 9844 pb et 4901 pb respectivement, son graphe montrait deux pics légèrement visibles à grande distance de migration (**figure 34**).

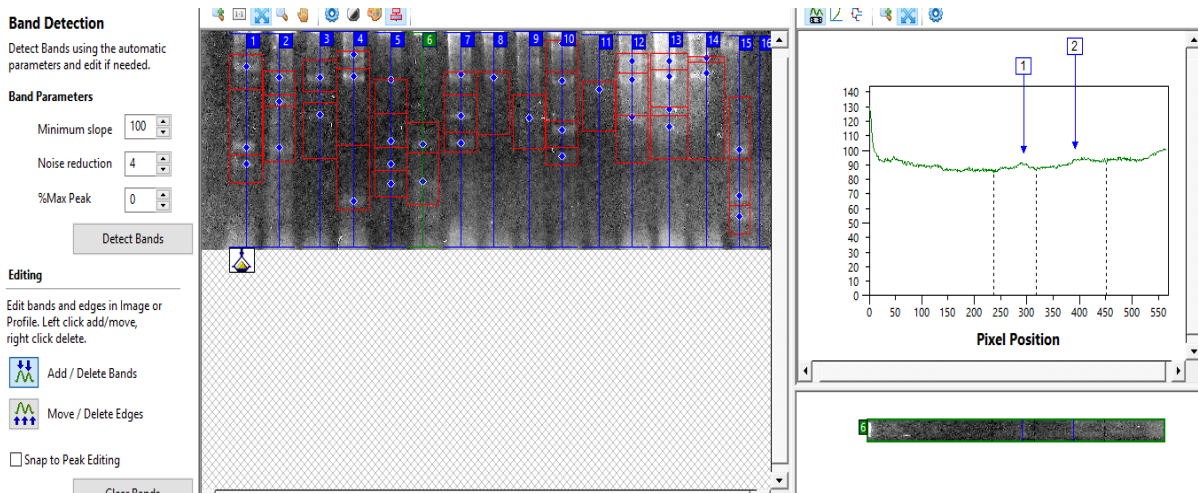


Figure 34 : Profil électrophorétique de *Citrobacter koseri* (6R) traité par le logiciel

7. L'espèce *Acinetobacter baumannii*

Sur la 8^{ème} piste, résistante aux 07 antibiotiques (tétracycline, imopénème, ticarcilline, ceftazidime, tobramycine, ciprofloxacine et gentamicine) avec concentration égale à 1264.8 µg/ml, cependant son profil montrait qu'une seule bande visualisée par le logiciel d'une taille de 20989 pb (**figure 35**).

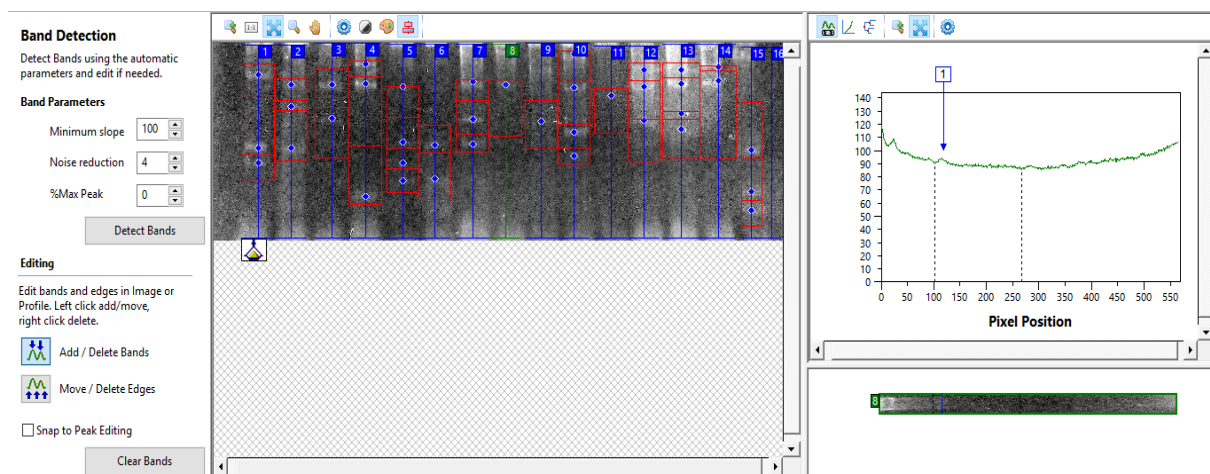


Figure 35 : Profil électrophorétique de *Acinetobacter baumannii* 312 (7R) traité par le logiciel

8. L'espèce *Proteus sp*

Présente sur la 9^{ème} piste, résiste à 03 antibiotiques (ceftazidime, tétracycline et céfotaxime) malgré sa concentration plasmidique élevée (1422.05 µg/ml), son profil ne montrait qu'une seule bande légèrement visible, visualisée par le logiciel d'une taille de 13864 pb (**figure 36**).

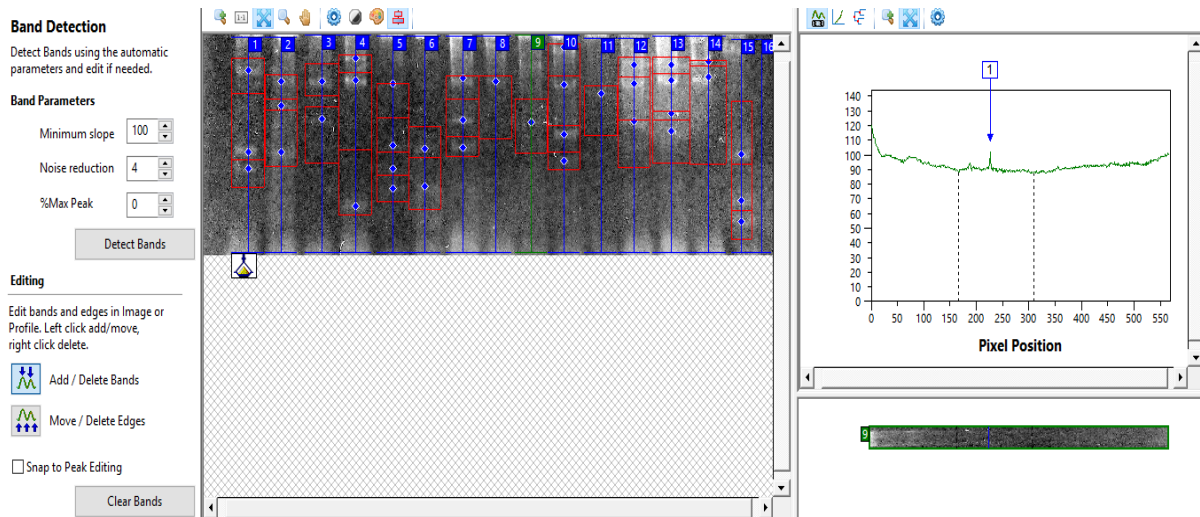


Figure 36 : Profil électrophorétique de *Proteus sp* (3R) traité par le logiciel

9. L'espèce *Pseudomonas aeruginosa*

Présente dans la 11^{ème} piste, résistante à un seul antibiotique (gentamicine) avec une concentration plasmidique égale à 440.3 $\mu\text{g/ml}$, son profil montrait une seule bande d'une taille de 19116 pb (figure 37).

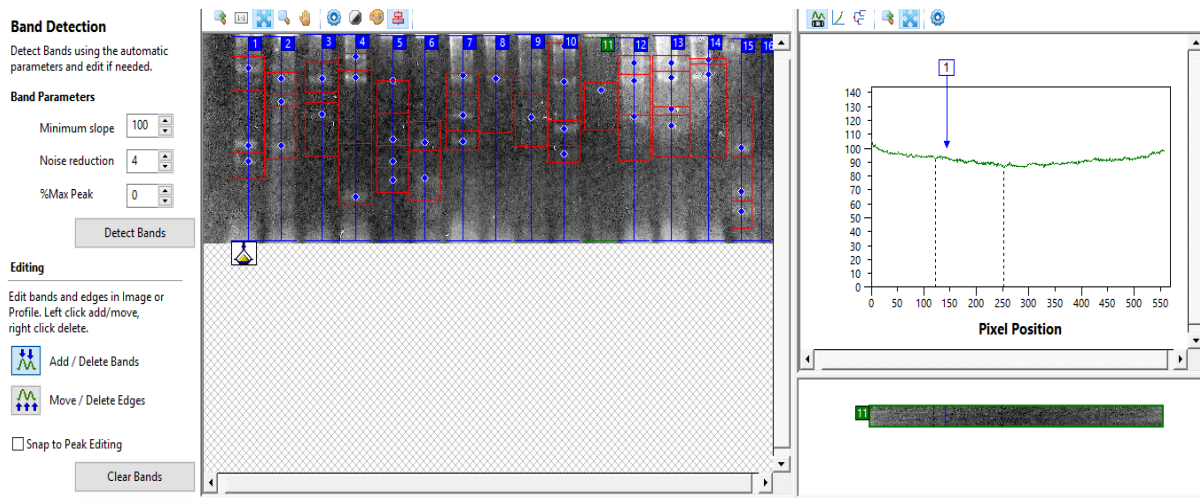


Figure 37 : Profil électrophorétique de *Pseudomonas aeruginosa* (R1) traité par le logiciel

❖ Rapport entre la quantité d'ADN et le nombre de bandes obtenu

La figure 38 présente un graphe combiné qui illustre la concentration en ADNp et son correspondant en plasmides présents dans chacune des souches. On remarque du graphe que pour certaines souches comme pour les *Staphylococcus aureus* qui possèdent un nombre de résistance élevé entre 4 et 8 et des concentrations élevées en ADNp et portent aussi à un nombre élevé en bandes entre 2 et 4 plasmides, ceci est aussi valable pour les espèces de *Klebsiella* qui présentent également entre 2 et 4 bandes dont le nombre augmente avec le nombre de résistance porté par chacune des souches. Les espèces d'*E. coli*, qui ont des résistances allant de 6 à 8

antibiotiques, sont celles qui hébergent le plus de plasmides parmi toutes les souches examinées entre 3 et 4 bandes. *Pseudomonas aeruginosa* possédant une seule résistance ayant aussi une faible quantité en ADNp et héberge un seul plasmide. Ces correspondances du nombre de résistance, de la quantité d'ADNp et du nombre de bandes suggèrent l'origine plasmidique de leurs résistances (résistance acquise de l'environnement).

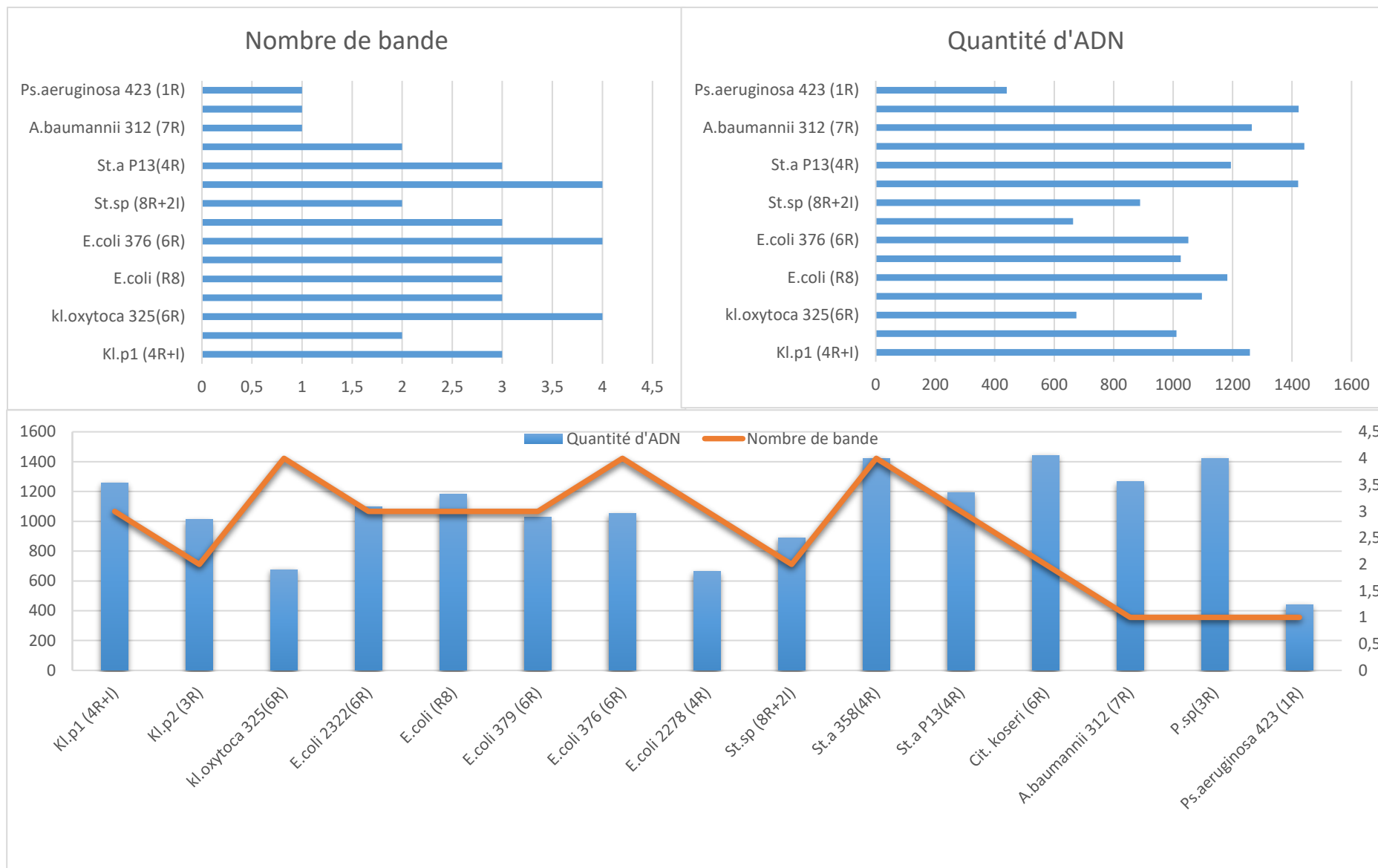


Figure 38 : Rapport entre la quantité en ADN plasmidique et le nombre de bande obtenu par électrophorèse

I.4 Transformation

Le résultat de la transformation est vérifié par électrophorèse, alors une extraction plasmidique des souches donneuses *E. coli* (8R) et de la souche réceptrice *E. coli* DH5 α avant et après transformation a été faite. Les extraits de plasmides obtenus sont alors soumis à une électrophorèse afin de révéler le plasmide acquis par *E. coli* DH5 α après transformation.

Le profil électrophorétique ci-dessous (**figure 39**) montre la migration de trois plasmides extraits des trois souches, et pour bien s'assurer du résultat, on a effectué plusieurs extractions pour les trois souches et on les a mis toutes en examen par électrophorèse. Les trois premières pistes correspondent à *E. coli* (8R) donatrice de plasmide, les trois pistes qui la suivent correspondent à la DH5 α avant la transformation et les quatre dernières correspondent à la DH5 α après la transformation.

E. coli *E. coli* *E. coli* DH5 α^1 DH5 α^1 DH5 α^1 DH5 α^2 DH5 α^2 DH5 α^2 DH5 α^2

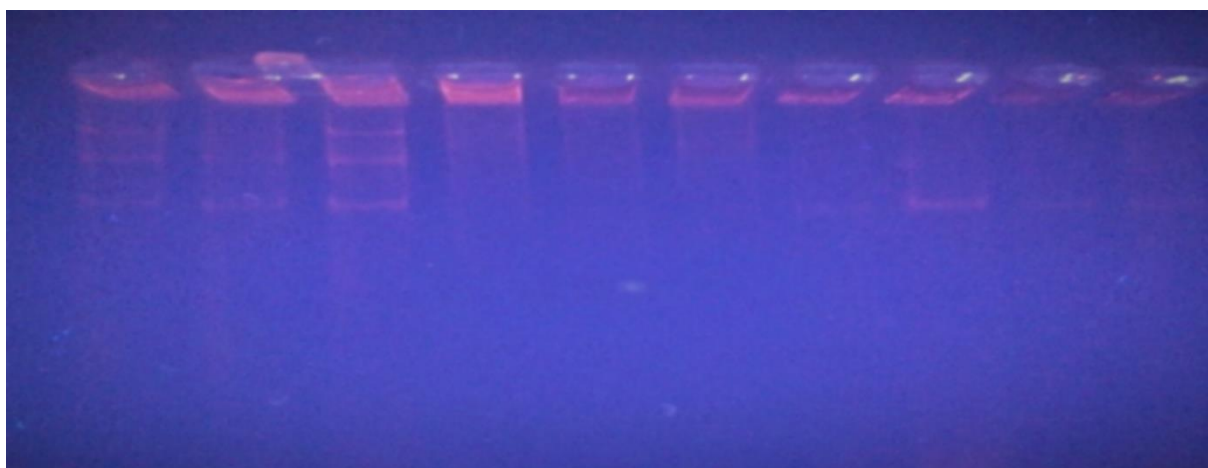


Figure 39 : Profil d'électrophorèse de la transformation

DH5 α^1 : Avant transformation

DH5 α^2 : Après transformation

➤ Analyse de gel

- Le profil électrophorétique de la souche *E. coli* (8R) est identique à celui de la première électrophorèse (4^{ème} piste), on observe trois bandes sur toutes les pistes ce qui explique la présence de trois plasmides chez *E. coli* (8R) (**figure 40**).

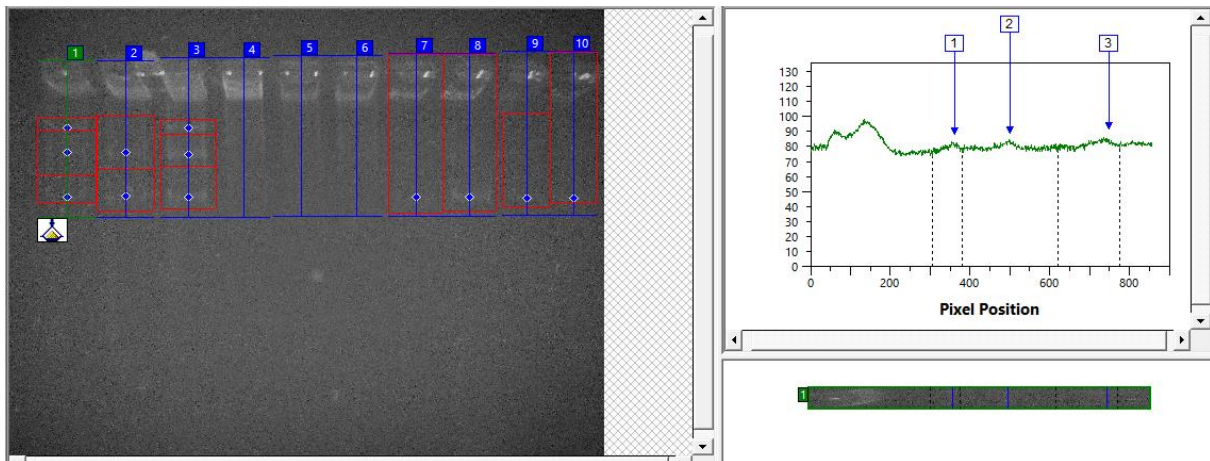


Figure 40 : Profil électrophorétique de *E. coli* (R8) traité par le logiciel

- Sur le champ de migration de la DH5 α avant la transformation, on remarque une absence totale de bande, ce qui signifie la sensibilité de cette souche.
- Dans les pistes qui correspondent à la DH5 α après transformation, on observe une bande qui se localise dans la même ligne que la dernière bande de la *E. coli* (8R), et cela implique que la DH5 α a acquis un plasmide venant de *E. coli* au cours du processus de transformation (**figure 41**).

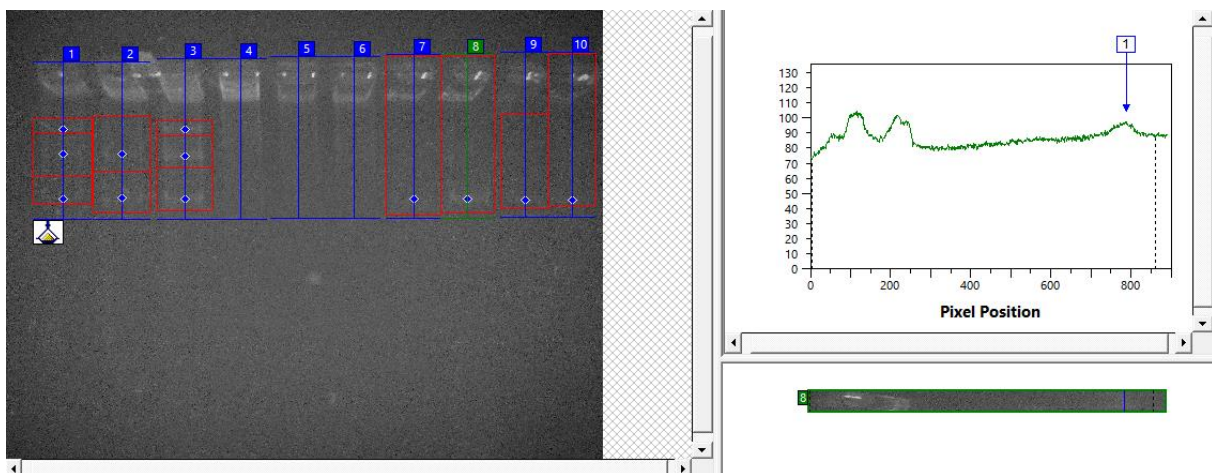


Figure 41 : Profil électrophorétique de la DH5 α (après transformation) traité par le logiciel

➤ Poids moléculaire

La détermination du poids moléculaire est toujours faite par le logiciel CLIQS®, le calcul de taille indique que la dernière bande de la souche *E. coli* (8R) possède le même poids moléculaire que celle de la DH5 α après transformation donc la bactérie transformée a acquis le plasmide ayant la plus petite taille chez *E. coli* donatrice et qui est de poids moléculaire égale à 5393 pb (**figure 42**).

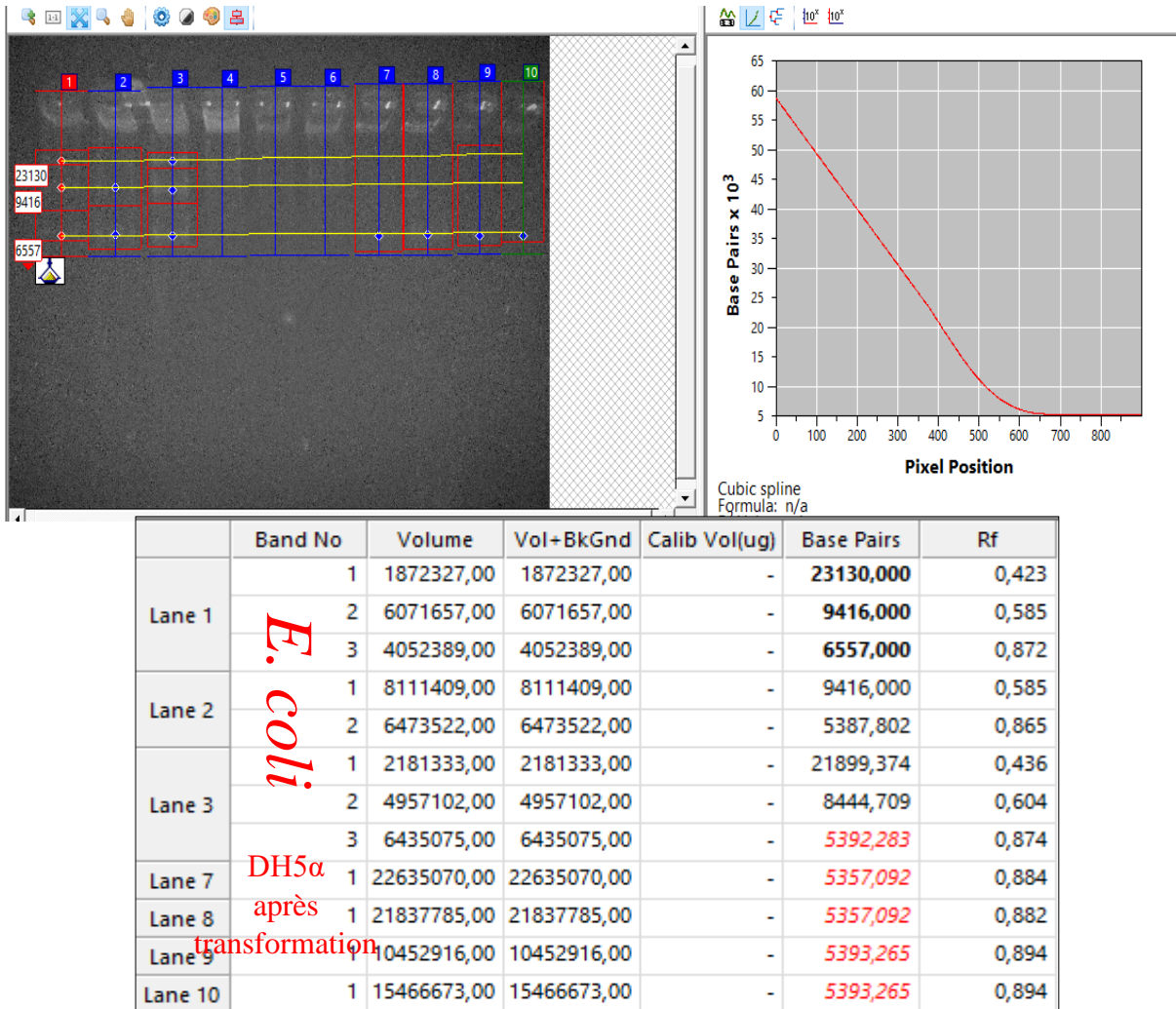


Figure 42 : Les valeurs du poids moléculaire d’ADN plasmidique calculé par le logiciel

II. Discussion

L'objectif de notre étude, était d'isoler l'ADN plasmidique des souches bactériennes dotées d'une multirésistance, et poursuivre son analyse moléculaire par exécution de spectrophotométrie afin de ressortir sa qualité et sa quantité, en passant par l'électrophorèse pour séparer les extraits d'ADN et déterminer le nombre éventuel des plasmides et leur poids moléculaire, et finir par faire un transfert génétique entre deux souches d'une même espèce pour pouvoir étudier l'action des agents moléculaires dans l'acquisition de la résistance aux antibiotiques.

Chacune des souches étudiées possède un nombre de résistance différent, qui est reflété par le nombre, la taille et le volume de chacun des plasmides qui s'exprime en concentration en ADNp différente d'une souche à l'autre. De manière générale, les gènes de résistance bactériens ne sont pas codés par le génome de la bactérie, ça veut dire que la résistance à certains antibiotiques n'est pas un mécanisme standard dans chaque espèce bactérienne, mais un facteur variable adapté par chaque cellule bactérienne afin de surmonter et s'adapter aux changements incessants de milieu [10] ce qui en concordance avec nos résultats.

Au cours du traitement de nos résultats, on estime la présence de plusieurs niveaux et origines de résistance basés sur les concentrations plasmidiques des souches vis-à-vis le nombre de bandes obtenu lors de séparation par électrophorèse. *Staphylococcus sp* (8R+2I) par exemple, ayant une concentration plasmidique très basse comparant à sa résistance aux antibiotiques (08 résistances + 02 états intermédiaires) son profil électrophorétique ne montrait que 02 bandes de plasmides de poids moléculaire élevé de 20841 pb et un autre de 14303 pb plus abondant dans le clone bactérien ce qui suppose qu'ils s'agissent de plasmides conjugatifs et de plasmides de résistances aux antibiotiques. Cela signifie que les gènes de résistances ne sont pas tous portés sur ses plasmides mais également présents sur son ADN chromosomique.

Au terme de notre travail sur l'étude moléculaire de résistance des bactéries associées à l'infection nosocomiale, 10 des souches étudiées sont des bactéries extraites de prélèvement urinaire (*Klebsiella pneumoniae* (1) et (2), *E. coli* (6R), *Actinobacter baumannii* 312 (7R), *Proteus sp* (3R), *Klebsiella oxytoca* (6R), *Pseudomonas aeruginosa* 423 (1R). Les entérobactéries sont la cause principale de la majorité des infections urinaires, notamment celles qui secrètent la β -lactamase à spectre étendu (BLSE), le cas de *Klebsiella pneumoniae* (01) (4R), *E. coli* 2322 (6R), *E. coli* 379 (6R), *E. coli* 376 (6R), *E. coli* 2278 (6R), d'après une étude fondée par Romli *et al.*, 2011, la production de BLSE est observée dans 77 cas parmi les 558

souches d'entérobactéries majoritairement isolées du milieu hospitalier (95%), soit une prévalence de 13.8%. En hospitalier, la fréquence des E-BLSE était de 15.4% contre 4.7% en ambulatoire, la répartition des entérobactéries sécrétrices de BLSE montre une prédominance des Klebsielles réalisant environ 59.7% des cas ; celle-ci était la plus pourvoyeuse de BLSE dans 25% des cas de Klebsielles. Par ailleurs, la multirésistance des germes BLSE à la fois vis-à-vis de la gentamicine et des fluoroquinolones était de 72% , ces souches BLSE gardaient une sensibilité bonne à l'amikacine (77 %) et totale pour l'imipénème. Une revue des services hospitaliers chez qui une production de BLSE était notée montre que ces derniers émanaient davantage des services d'urologie et de la réanimation constituant respectivement 27.4% et 26%.

En addition les résultats de **Sbiti et al., 2017**, montrent que 95,8 % des E-BLSE recensées étaient des souches d'*E. coli* et *Klebsiella sp.* et que ces deux espèces étaient les plus fréquemment responsables de la production des BLSE. Par ailleurs *Klebsiella pneumoniae* reste l'entérobactérie la plus pourvoyeuse de BLSE au sein de son genre avec une prévalence d'expression de 25.8%, ce qui aussi en conformité avec nos résultats, le plasmide de taille égale à 9416 pb obtenu chez *Klebsiella pneumoniae* (4R+I) qui résiste à céfazoline, ceftriaxone, céfotaxime et ampicilline avec un état intermédiaire à l'amoxicilline+acide clavulanique, a été isolé également chez *E. coli* 2322 (6R) résistante à amoxicilline+acide clavulanique, céfazoline, ceftriaxone, céfotaxime ampicilline et céfoxitine et d'abondance proche chez les deux genres bactériens mais de plus chez *klebsiella* .

Selon **Moroh, 2013**, l'ECBU des 12.175 échantillons d'urine a relevé la présence d'infections bactériennes pour 3.058 échantillons soit 25,11% des échantillons analysés. À partir de ces derniers, 3.064 germes bactériens ont été isolés et identifiés. Ils ont noté que 59,59% des germes isolés proviennent des patients ambulatoires, *Escherichia coli* constituait la bactérie dominante. Cette bactérie est responsable de 39,7% des infections issues des patients hospitalisés et de 60,8% des infections communautaires. Depuis les résultats qu'on a obtenu ceci est vrai, puisque le nombre de bandes le plus important parmi toutes les souches étudiées s'est trouvé chez les souches d'*E. coli* dont $\frac{3}{4}$ possédaient toutes 3 plasmides et une souche qui possédait 06 résistances contenait 4 plasmides.

Les bactéries ont développé au cours de leur évolution de multiples et fréquemment élégants mécanismes pour échapper à l'action létale des antibiotiques, c'est pour cette raison leur résistance est toujours en évolution. L'étude d' **Ebongue et al.,2015** sur l'évolution de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées à l'Hôpital Général de Douala de 2005

à 2012 par, a montré que la résistance des entérobactéries au céfotaxime et à la ceftazidime avait progressé dans les années récentes par rapport à l'année 2005 de manière continue et identique pour les deux molécules, ce qui explique l'abondance de cette résistance dans 10 entérobactéries utilisées dans notre travail chez toutes les souches d' *E. coli*, d'*Acinetobacter baumannii*, de *Proteus sp.*, des espèces du genre *Klebsiella* et de *Citrobacter koseri*. La résistance contre gentamicine, tobramycine et néltimicine, a augmenté au fil des années notamment en 2011 et la résistance à l'amikacine, a évolué de 10,2% à 14,1% entre 2005 et 2012 ce qu'on observe également dans notre souche *Acinetobacter baumannii*,

Pendant longtemps, le seul support connu de résistance aux quinolones était de type chromosomique, jusqu'à la découverte du gène *qnrA* porté par une souche de *Klebsiella pneumoniae* (Guillard, 2012). Les entérobactéries sont principalement médiées par des mutations ponctuelles permettant d'avoir une résistance aux quinolones (régions QRDR), selon l'étude de Benaïcha, 2017 sur la prévalence des gènes PMQR chez 398 *E. coli* et 118 *Klebsiella sp* isolats cliniques collectés était de 51% de *E. coli* et 61% de *Klebsiella sp* étaient multirésistantes.

Pour les bacilles à Gram négatif isolés à l'hôpital, une évolution aussi rapide s'est produite et des germes considérés comme faisant partie du microbisme hospitalier, tel que *Pseudomonas aeruginosa* ou *Acinetobacter* (Guillot, 1989). Toutes ces souches constituent un problème de santé publique en milieu hospitalier en raison de leur antibiorésistance ce qui est aussi confirmé par nos résultats qui montrent la présence d'un seul plasmide chez ces deux genres bactériens mais de grande taille moléculaire de 19116 pb et de 20220 pb chez *Pseudomonas* (1R) et *Acinetobacter* (7R), leur grande taille moléculaire suppose qu'il s'agit bien de plasmides conjugatifs qui peuvent donc être transférés aux autres genres bactériens.

L'efficacité de la transformation est inversement proportionnelle à la taille du plasmide ce qui est obtenu dans notre travail malgré les expériences multiples conduites, les souches réceptrices DH5 α n'ont acquis que le petit plasmide dans chaque tube d'essai. La taille du plasmide de 5393 pb peut être portante même de plus de 3 gènes de résistance comme le cas du plasmide pBR329 chez *E. coli* qui est de taille égale à 4150 pb et porte le gène Amp^R, Tet^R et Cam^R de résistance à l'ampicilline, à la tétracycline et au chloramphénicol respectivement. Ce plasmide dans les cellules hôtes est présent à environ 15 copies par cellule si celles-ci sont cultivées en présence des antibiotiques, ce résultat concorde avec nos résultats vu le volume important en plasmide reçu dans la cellule réceptrice supérieur au volume présent dans la cellule donatrice, la pression de sélection est indispensable pour le maintien du plasmide [11].

Alors on peut dire que les mécanismes que les bactéries peuvent adopter afin d'acquérir une telle résistance sont dus aux facteurs naturels ou acquis comme la survenue de mutations dans des gènes endogènes observé dans le cas de la résistance aux quinolones ou à la rifampicine ou encore une résistance inductible due à la présence d'un système de régulation transcriptionnel ou traductionnel (chez les entérocoques). Recrutement de gènes d'origines diverses pour constituer des unités d'expression génétique coordonnées (opérons van de résistance à la vancomycine chez les entérocoques). Finalement, le moyen le plus efficace et abondant dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques entre les souches bactériennes est bien le transfert génétique, notamment par les plasmides et les intégrons qui constituent un excellent système de capture des gènes (**Courvalin, 1997**).

Conclusion

Conclusion

L'augmentation des infections nosocomiales est due à l'émergence de bactéries multirésistantes au sein des établissements sanitaires, notamment les bactéries à Gram négatif (entérobactéries). Afin de développer leurs résistances aux antibiotiques, ces bactéries doivent acquérir de nouveaux gènes qui leur confèrent un effet protecteur. Ces mécanismes d'acquisition de résistance présentent un phénomène inquiétant, qui complique la lutte contre la propagation des infections nosocomiales.

Dans cette présente étude basée sur les techniques de biologie moléculaire, dont le but était de détecter et localiser la résistance des souches bactériennes isolées des prélèvements cliniques. La plupart des souches étudiées représentaient des concentrations en ADN plasmidique assez importantes en fonction du nombre de résistance exprimée. Cela était confirmé par l'électrophorèse, où tous les profils électrophorétiques traités par le logiciel CLIQS®, démontraient la présence des bandes. Selon ces résultats nous étions capables de déduire l'origine de résistance, en basant également sur le poids moléculaire des plasmides extraits.

Pour mieux comprendre et expérimenter le passage des gènes de résistance entre les souches bactériennes, nous avons effectué un processus de transformation, entre *E. coli* dotée de 08 résistances aux antibiotiques donatrice de plasmide et *E. coli* DH5 α compétente. Le résultat était positif, la DH5 a acquis un plasmide de taille 5393 pb, qui peut être un plasmide R de résistance capable de porter un à trois gènes de résistance.

Le problème des infections nosocomiales demeure un danger global, tant que les molécules antibiotiques sont toujours en développement, les bactéries alors développent à leur tour leur mécanisme de résistance. Une solution définitive reste un grand défi pour la communauté scientifique.

Résumé

La résistance d'antibiotiques dans les infections nosocomiales se caractérise par son caractère naturel ou acquis, son mécanisme et son support génétique. Dans ce contexte, notre travail portait sur l'étude de la résistance aux antibiotiques de 15 souches bactériennes provenant de patients hospitalisés par des méthodes de biologie moléculaire (la spectrophotométrie et l'électrophorèse) qui ont montré la présence de nombreux plasmides de grande taille moléculaire pour la plupart, indiquant une présence de plasmides de résistance aux antibiotiques et des plasmides conjugatifs en concentrations différentes. L'expérience de transformation réalisée à partir des espèces d'*E.coli* multirésistantes dans la souche compétante *E.coli* DH5 α a bien montré que ce transfert est inversement proportionnel à la taille moléculaire de l'insert par l'acquis du plasmide de la petite taille.

Mots clé : Infection nosocomiale, bactérie résistante, antibiotique, plasmide, transformation.

Abstract

Antibiotic resistance in nosocomial infections is characterized by its natural or acquired character, its mechanism and its genetic support. In this context, our work focused on the study of the antibiotic resistance of 15 bacterial strains from patients hospitalized by molecular biology methods (spectrophotometry and electrophoresis), which showed the presence of several plasmids of large molecular size for the most of bacterial stains, indicating the presence of antibiotic resistance plasmids and conjugative plasmids in different concentrations. The transformation experiment using multidrug-resistant *E. coli* species in the competent *E. coli* DH5 α strain has shown that this transfer is inversely proportional to the molecular size of the insert by the plasmid of the small plasmid.

Key words: Nosocomial infection, resistant bacterium, antibiotic, plasmid, transformation.

ملخص

تتميز المقاومة ضد المضادات الحيوية في عدوى المستشفيات، بمصدرها الطبيعي أو المكتسب، وآلياتها ودعمها الجيني. في هذا السياق، دراستنا ارتكزت على دراسة مقاومة المضادات الحيوية لـ 15 سلالة بكتيرية مأخوذة من عينات طبية لمرضى بالمستشفى، باستخدام تقنيات البيولوجيا الجزيئية (الطيف الضوئي والفرز الكهربائي) التي أظهرت وجود العديد من البلازميدات ذات الحجم الجزيئي الكبير لنسبة كبيرة من البكتيريا المروسة، مشيراً إلى وجود البلازميدات مقاومة المضادات الحيوية والبلازميدات الاقترانية في تركيزات مختلفة. أظهرت تجربة التحول البكتيري التي أجريت باستخدام أنواع اشيريشيا القولونية المتميزة بعدة جينات مقاومة للأدوية وسلالة *E. coli* DH5 α المختصة، أن هذا النقل يتناسب عكسياً مع الحجم الجزيئي للبلازميد المكتسب وذلك بواسطة بلازميد ذو حجم صغير.

الكلمات المفتاحية: عدوى المستشفيات، البكتيريا المقاومة، المضادات الحيوية، البلازميد، التحول البكتيري.

Références bibliographiques

- Ammour,N. Zekri,D. Lazreg,M.2006 Rapport du stage, Les infections nosocomiales.Chu tijanidamerd.dspace.univ-tlemcen.dz/bitstream/112/7140/1/Les-infection-nOSO-comiales.pdf, consulté le 20/05/2018.
- Anxolabéhère, D. Nouaud, D. Quesneville, H. Ronsseray, S. 2007. Transposons : des gènes. Pour la science. 351, 82-88.
- Barraud, O. 2011. Intégrons de résistance et pression de sélection antibiotique (Thèse de doctorat). Université de Limoges. Faculté de médecine et de pharmacie, France.
- Barraud, O. Ploy, M.-C. 2011. Actualités sur les intégrons de résistance aux antibiotiques : mise aupaoint.Journal des Anti-infectieux 13, 133–144. <https://doi.org/10.1016/j.antinf.2011.03.001>, consulté le 01/05/2018.
- Benaicha, H., Barrijal, S., Ezzakkioui, F., Elmalki, F., 2017. Prevalence of PMQR genes in *E. coli* and *Klebsiella* spp. isolated from North-West of Morocco. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 10, 321–325. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.05.024>, consulté le 25/05/2018
- Bouguanoun,W. 2017, Etudes de la résistance aux antibiotiques des bactéries incriminées dans les infections nosocomiales et leur dissémination dans l’environnement hospitalier de la région de Guelma. Thèse de doctorat : Biologie moléculaire et cellulaire. Annaba : Badji Mokhtar.<http://biblio.univ-annaba.dz/wp-content/uploads/2017/10/These-Bouguanoun-Widad.pdf>, consulté le 20/05/2018.
- Briand Yvon Michel. 2012, Aspects de la résistance bactérienne aux antibiotiques, L’hrmattan.
- Carroll, S.B. Doebley, J. Griffiths, A.J.F. Wessler, S. 2013. Introduction à l’analyse génétique. De Boeck Superieur.
- COURTIN, J.-P. 2012. L’homme et les lois de la nature 2. Lulu.com.
- Courvalin, P., 1997. Evolut,on de la resistance aux antibiotiques. m/s 13, 2.
- Dali,A. 2015,Les infections nosocomiales a bactéries multirésistantes (BMR)en réanimation adulte à l’ehuo profil épidémiologique facteurs de risque et facteurs pronostiques.thèse de doctorat :Epidémiologie et médecine préventive.Oran: Université d’oran1 Ahmed Benbella.<https://theses.univ-oran1.dz/document/1012015003t.pdf>, consulté le 22/05/2018.
- Del Solar, G. Espinosa, M. 2000. Plasmid copy number control: an ever-growing story. *Mol. Microbiol.* 37, 492–500.

- Dufour, D. 2008. Recherche de déterminants génétiques permettant l'adaptation d'une souche *Escherichia coli* à la mamelle bovine (Thèse de Doctorat). Institut National Polytechnique de Lorraine.
- Ebongue, C.O., Tsiazok, M.D., Mefo'o, J.P.N., Ngaba, G.P., Beyiha, G., Adiogo, D., 2015. Evolution de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées à l'Hôpital Général de Douala de 2005 à 2012. *Pan Afr Med J* 20. <https://doi.org/10.11604/pamj.2015.20.227.4770>.
- Emaleu, S. 2017. Prévention infection en milieu hospitalier. France : Editions publibook. <https://books.google.dz/books?id=bkUmDwAAQBAJ&pg=PA39&dq=serg+blaise+emaleu+transmission+direct&hl=fr&sa=X&ved=0ahUKEwiIpYHh5bnbAhXDwxQKHcxECK4Q6AEIJzAA#v=onepage&q=serg%20blaise%20emaleu%20transmission%20direct&f=false>, consulté le 26/05/2018.
- Eyquem, A., Alouf, J., Montagnier, L., 2000. *Traité de microbiologie clinique : deuxièmes mises à jour et compléments*. PICCIN.
- Figarella J., Leyral G., Terret M. 2007, *Microbiologie générale et appliquée*, Collection sciences et techniques biologiques, Edition Delagrave.
- Flandrois, 1997. *Bactériologie médicale*. Presses Universitaires Lyon.
- Georges, C. François-Marie, L. 2008. *Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments*. Lavoisier.
- Guillard, T., Cambau, E., 2012. Une brève histoire des résistances plasmidiques aux quinolones. *Journal des Anti-infectieux* 15, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.antinf.2013.02.002>, consulté le 23/05/2016
- Guillot, J. 1990. Bases moléculaires et épidémiologiques de l'antibiorésistance bactérienne. *Annales de Recherches Vétérinaires* 21, 1–11.
- Guillot, J.F., 1989. Apparition et évolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques. *Annales de Recherches Vétérinaires* 20, 3–16.
- Hall, R.M. Collis, C.M. 2006. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Molecular Microbiology* 15, 593–600. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02368.x>, consulté le 22/04/2018.
- Hygis, N. Laveran. 1998. *Hgiène hospitalier*. Lyon : press universitaire. https://books.google.dz/books?id=PZ4KQkvn3ecC&pg=PA35&dq=infection+nosocomiale&hl=fr&sa=X&ved=0ahUKEwi4_5HD683bAhWCvRQKHZiCBikQ6AEIQDAF#v=onepage&q=infection%20nosocomiale&f=false, consulté le 27/05/2018.
- Jawetz, E. Melnick, J.L. Adelberg, E.A. 1973. *Microbiologie médicale*. Presses Université Laval.

- Jové, T. Da Re, S. Denis, F. Mazel, D. Ploy, M.-C. 2010. Inverse Correlation between Promoter Strength and Excision Activity in Class 1 Integrons. *PLoS Genetics* 6, e1000793. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000793>, consulté le 23/04/2018.
- Kieleczawa, J., 2006. *DNA Sequencing II: Optimizing Preparation and Cleanup*. Jones & Bartlett Learning.
- Lederberg, J. 1952. Cell genetics and hereditary symbiosis. *Physiol. Rev.* 32, 403–430. <https://doi.org/10.1152/physrev.1952.32.4.403>, consulté le 15/04/2018.
- Lefevre, T. Raymond, M. Thomas, F. 2016. *Biologie évolutive*. De Boeck Supérieur.
- Lozniewski, A., Rabaud, C., Nancy, 2010. Résistance bactérienne aux antibiotiques. http://nosobase.chulyon.fr/recommandations/cclin_arlin/cclinSudEst/2010_ResistanceAntibioResist_CCLinSE.pdf, consulté le 25/05/2018.
- Mahesh, S., 2003. *Biotechnology-4: Including Recombinant Dna Technology, Environmental Biotechnology, Animal Cell Culture*. New Age International.
- Mariah, S. Nabi, I. 2017, L'incidence des bactéries multi-résistantes 'BMR' en réanimation chu Tlemcen : intérêt du portage digestif du 15 octobre 2016 au 28 février 2017 : Pharmacie. Tlemcen: Abou Bekr Belkaid. Disponible sur : <http://dspace.univ-tlemcen.dz/bitstream/112/10315/1/LINCIDENCE-DES-BACTERIES-MULTI-RESISTANTES-BMR.PDF> ,consulté le 23/05/2018
- Merlin, C. Toussaint, A. 1999. Les éléments transposables bactériens. *médecine/sciences* 15, I. <https://doi.org/10.4267/10608/1491>, consulté le 01/05/2018.
- Moroh, J.-L.A., n.d. Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes issues de *Morinda morindoides* 214.
- Muylaert, A. Mainil, J. 2013. Résistance bactérienne aux antibiotiques, les mécanismes et leur “contagiosité.” *Annales de Médecine Vétérinaire* 156.
- Ploy, M.-C. Gassama, A. Chainier, D. Denis, F. 2005. Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 20, 343–352. <https://doi.org/10.1016/j.immbio.2005.10.001>, consulté le 02/05/2018.
- Ploy, M.-C., Lambert, T., Gassama, A., Denis, F., 2000. Place des intégrons dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques. *Annales de Biologie Clinique* 58, 439–44.
- Pozzetto, B., 2001. *Infections nosocomiales virales et à agents transmissibles non conventionnels*. John Libbey Eurotext.
- Raven, P.H. Singer, S.R. Johnson, G.B. Mason, K.A. Losos, J.B. 2017. *Biologie*. De Boeck Supérieur.
- Rémy, D., 2010. *Les mammites*. France Agricole Editions.
- Romli, A., Derfoufi, O., Chbouki, O., hajjam, Z., Zouhdi, M., 2013. Les entérobactéries BLSE des infections urinaires : épidémiologie et résistance. *Maroc Médical* 33.

- Roy, D. 2000. Identification et caractérisation de la région variable des intégrons de classe 1 identifiés chez différents isolats cliniques à gram négatif et caractérisation du mécanisme de résistance aux β -Lactamines chez un isolat de salmonelle spp. Isolé au Québec (Mémoire de maître ès sciences). Université Laval.
- Samine, I. 2011. Intégrons : structure et épidémiologie (Thèse de Doctorat). Université de Mouhammed V.
- Sbiti, M., Lahmadi, khalid, louzi, L., 2017. Profil épidémiologique des entérobactéries uropathogènes productrices de bêta-lactamases à spectre élargi. Pan Afr Med J 28. <https://doi.org/10.11604/pamj.2017.28.29.11402>, consulté le 20/05/2018.
- Skurnik, D. Andremont, A. 2006. Antibiothérapie sélectionnante. De la théorie à la pratique. Réanimation 15, 198–204.<https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2006.03.002>, consulté le 03/05/2018.
- Song, Y., Lee, B.-R., Cho, S., Cho, Y.-B., Kim, S.-W., Kang, T.J., Kim, S.C., Cho, B.-K., 2015. Determination of single nucleotide variants in Escherichia coli DH5 α by using short-read sequencing. FEMS Microbiol. Lett. 362. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv073>.
- Sylvie, C.2009.La résistance aux antibiotique :un enjeu de santé publique important!Pharmactuel42(2)
.https://www.pharmactuel.com/index.php/pharmactuel/article/download/977/638,consulté le 25/05/2018
- Tankovic, J., Soussy, C.J.1998Mécanismes de résistance aux fluoroquinolones : la lettre de l'infectiologue 6. Disponible sur :
<http://studylibfr.com/doc/3637977/m%C3%A9canismes-de-r%C3%A9sistance-aux-fluoroquinolones---donn%C3%A9es-r...>, consulté le 28/05/2018
- Tchuinte, P.L.S. n.d. Intégrons de classe 3 : aspects mécanistiques et épidémiologiques (Thèse de Doctorat). Université de Limoges.
- Vincent, R. 2007. Génétique moléculaire. De Boeck Supérieur.
- Voytas, D., 2001. Agarose gel electrophoresis. Curr Protoc Immunol Chapter 10, Unit 10.4. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1004s02>, consulté le 17/05/2018.
- WALKER, G.C. 1984. Mutagenesis and Inducible Responses to Deoxyribonucleic Acid Damage in Escherichia coli. MICROBIOL. REV. 48, 34.
- Williams, S.A., Slatko, B.E., McCarrey, J.R., 2007. Laboratory Investigations in Molecular Biology. Jones & Bartlett Learning.

Sites internet

[1] Infections nosocomiale, vocabulaire médicale, disponible sur : <<https://www.vocabulaire-medical.fr/encyclopedie/215-communautaire-nosocomial> 26/05/2018>

[2] Les structures de lutte contre les Infections Nosocomiales, disponible sur : <http://www.utc.fr/~mastermq/public/publications/qualite_et_biomedical/UTC/dess_tbh/99-00/Projets/Infections_Nosocomiales/Rapport_IN/Rapport_1.html>, consulté le 29/05/2018.

[3] Les quinolones et fluoroquinilones, disponible sur <<http://www.pharmaetudes.com/ressources/cours%20internat/section5/29-quinolones.pdf>>, consulté le 18/05/2018.

[4] Manuel des TRAVAUX PRATIQUES module biologie moléculaire, disponible sur : <https://fpt.usmba.ac.ma/sinfo/Annonces/Polycope%20de%20TP-BioMol_SVI58Pr%20Hammani2016-2017.pdf>

[5] Électrophorèse sur gel d'agarose disponible sur : <<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/ATP/bioch1.htm>>, consulté le 17/05/2018

[6] Génétique bactérienne, disponible sur : <<http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/POLY.Chp.2.2.html>>, consulté le 19/05/2018.

[7] DH5alpha Cell, disponible sur : <https://en.wikipedia.org/wiki/DH5-Alpha_Cell> , consulté le 20/05/2018.

[8] Électrophorèse, disponible sur : <<https://fr.wikipedia.org/wiki/%C3%89lectrophor%C3%A8se>>, consulté le 23/05/2018

[9] ADN purifié, analysé par électrophorèse, disponible sur : <<http://www.takween.com/techniques/ADN-purification-electrophorese.html#suite>> , consulté le 24/05/2018.

[10] Gène de résistance, disponible sur : <https://fr.wikipedia.org/wiki/G%C3%A8ne_de_r%C3%A9sistance>, consulté le 26/05/2018

[11] <http://access.ens-lyon.fr/biotic/biomol/outilsbm/html/plasmides.htm>; consulté le 5 juin 2018 à 11h

Annexe

Réactifs utilisés

1. Solutions utilisées pour l'extraction plasmidique

- **Milieu LB (200 ml)**

- Tryptone 2g.

- NaCl 2g.

- Extrait de levure 1g.

- Agar 3g.

- **Solution I**

- Glucose 50 mM (pH 8.0).

- Tris HCl 25 mM.

- EDTA 10 mM (pH 8.0).

- **Solution II**

- NaOH 0.2 N (fraîchement diluée à partir d'une solution stock 10 N).

- SDS 1%.

- **Solution III**

- Acetate d'ammonium 7.5 M

- **Solution de conservation d'ADN**

- Tris HCl 10 mM (pH 8.0).

- EDTA 1 mM (pH 8.0).

2. Solutions utilisées dans l'électrophorèse

- **Tampon de charge**

- 25% glycerol.

- 0.06g bromo phenol bleu

- 0.6 ml xylene

Et compléter jusqu'à 50 ml avec l'eau distillée stérile.

- **Tampon de migration TAE (500 ml), pH = 8**

- Tris 2.42 g.

- Acide acétique glacial 0.57 ml.

- EDTA 0.185 g.

Tableau : Liste des antibiotiques utilisés

Sigle	Antibiotique	Sigle	Antibiotique
AMC	Amoxicilline+Acide clavulanique	GMN	Gentamicine
AMP	Ampicilline	IPM	Imipénème
AX	Amoxicilline	KMN	Kanamycine
C	Chloramphénicol	L	Lincomycine
CAZ	Ceftazidime	NIT	Nitrofurantoïne
CIP	Ciprofloxacine	OF	Ofloxacine
COL	Colistine	OX	Oxacilline
CRO	Ceftriaxone	PC	Pipéracilline
CTX	Céfotaxime	RA	Rifampicine
CX	Cefoxitine	TE	Tétracycline
CZ	Céfazoline	TEC	Teicoplanine
E	Erytromycine	TIC	Ticarcilline
ETP	Ertapénème	TMN	Tobramycine
FOX	Céfoxitine	VA	Vancomycine
FS	Fosfomycine		