

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 Biologiques
Spécialité/Option: Microbiologie appliquée
Département: Ecologie et Génie d'Environnement

Thème

Étude de l'antibiorésistance et de la tolérance aux métaux lourds des entérobactéries et des staphylocoques

Présenté par :

- Chitour Romaissa.
- Souilah Nesrine.

Devant le jury :

Dr. AISSAOUI R.	Président	Université de Guelma
Dr. BENHALIMA L.	Encadreur	Université de Guelma
Mme AMRI S.	Examinatrice	Université de Guelma

Juin 2018

Remerciements

Nous remercions notre créateur Allah, le tout Puissant, pour le courage qu'il nous a donné pour mener ce travail à terme.

Nous exprimons nos remerciements à monsieur AISSAOUI R., Maître de conférences à l'Université de Guelma, Nous sommes fières de l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider notre jury. Veuillez, accepter l'expression de notre profond respect.

Nous tenons à adresser nos sincères remerciements à madame AMRI S., Maître assistant à l'Université de Guelma, Nous sommes fières de l'honneur que vous nous faites en acceptant d'examiner et de juger notre travail.

Nous aimerions aussi remercier notre promotrice et directrice de mémoire madame BENHALIMA L., Maître de conférences à l'Université de Guelma, pour sa disponibilité, sa patience, ses remarques avisées, ces conseils pratiques, technique et scientifiques tout au long de ce travail. Vos qualités intellectuelles et vos connaissances larges font de vous un modèle souhaité par tous les étudiants. Veuillez accepter l'expression de notre haute considération.

Nous adressons aussi toute notre gratitude à l'équipe de laboratoire de microbiologie, sans oublier la grande famille de biologie : enseignants, étudiants, administrateurs et techniciens.

Romaissa et Nesrine

✿ Dédicaces ✿

C'est avec un très grand honneur que Je dédie cet humble travail ...

*À l'homme de ma vie,
Mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui
s'est toujours sacrifié pour me voir réussir ;
À toi mon père.*

*À la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma
vie et mon bonheur ;
Maman que j'adore.*

À mon cher frère et ami CHAREF EDDIN qui a toujours été à mes côtés

À mon trésor mon petit frère OUASSIM

*À Dr. BAALOU DJ AFEF qui m'a aidée tout au long de mes études et je la
remercie pour ses encouragements*

À ma perle précieuse, ma cousine SOUMIA

*À mes adorables amies : FATIMA, NADA, FERYEL, KENZA, RANDA,
NIHAD*

À toute la famille : CHITOUR

*Enfin, À tous ce qui ont de près ou de loin prêté main forte pour Réussir ce
modeste travail.*

ROMAISSA

✿ Dédicaces ✿

Je dédie cet humble travail ...

A ma très chère mère FATMA

*qui a oeuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien,
tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils,
pour toute son assistance et sa présence dans ma vie,
reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il,
l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.
Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et
t'accorder santé, longue vie et bonheur.*

A mon très cher père HOCINE

*qui peut être fier et trouver ici le résultat
de longues années de sacrifices et de privations
pour m'aider à avancer dans la vie.
Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien
permanent venu de toi.
Dieu tout puissant te garde et te procure santé,
bonheur et longue vie.*

A mon très cher frère SABRI

*En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour toi. Je te
souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de
réussite et de sérénité.*

À toute la famille SOUILAH

*Sans oublier mes amies : RANDA, FATIHA, ILHEM
qui m'ont aidé durant toute ma vie estudiantine, et à ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.*

NESRINE

Résumé en français

Résumé en anglais

Résumé en arabe

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des planches

Liste des schémas

Symboles et abréviations

Introduction 1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Antibiotiques	3
I.1. Définition	3
I.2. Critère de classification	3
I.3. Classe des antibiotiques	4
I.4. Mode d'action des antibiotiques	6
I.5. Résistance aux antibiotiques	7
I.5.1. Définition	7
I.5.2. Résistance naturelle	7
I.5.3. Résistance acquise	7
I.5.4. Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques	7
I.6. Résistance des entérobactéries aux antibiotiques	9
I.7. Résistance des staphylocoques aux antibiotiques	10
II. Métaux lourds	12
II.1. Définition	12

II.2. Origine des métaux lourds	13
II.3. Toxicité des métaux lourds	13
II.4. Interactions bactérie – métaux lourds	16
II.4.1. Généralités	16
II.4.2. Systèmes d'import des métaux lourds	17
II.4.3. Notion de tolérance et de résistance aux métaux lourds	18
II.4.3.1. Tolérance aux métaux lourds	18
II.4.3.2. Résistance aux métaux lourds	18
II.4.4. Effets des métaux sur la cellule bactérienne	19
III. Relation entre l'antibio-résistance et la métallo-résistance	20

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

I. Souches bactériennes étudiées	22
I.1. Choix et origine des bactéries	22
I.2. Vérification de la pureté des bactéries	23
I.2.1. Revivification des bactéries	23
I.2.2. Isolement des bactéries	25
I.2.3. Identification des bactéries	25
I.2.3.2. Identification biochimique	27
II. Étude de la résistance des bactéries aux antibiotiques	30
II.1. Technique de l'antibiogramme	30
II.2. Antibiotiques testés	31
III. Étude de la tolérance des bactéries aux métaux lourds	33

III.1. Métaux lourds testés	33
III.2. Préparation des solutions mères et des solutions filles	33
III.3. Préparation de l'inoculum	33
III.4. Taux de tolérance des bactéries aux métaux lourds	33
IV. Dosage de la Méthallothionéine chez les bactéries tolérantes aux métaux lourds	34

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

I. Purification des bactéries étudiées	37
II. Antibiorésistance des bactéries étudiées	38
II.1. Entérobactéries	38
II.2. Staphylocoques	41
III. Tolérance aux métaux lourds	44
III.1. Entérobactéries	44
III.2. Staphylocoques	46
IV. Dosage de la Méthallothionéine	50
V. Interaction entre l'antibio-résistance et la tolérance aux métaux lourds	52
Conclusion et perspectives	54
Références bibliographiques	55
Annexes	67

Résumé

Résumé

Dans la présente étude, la résistance aux antibiotiques et la tolérance aux métaux lourds (cuivre et cadmium) ont été déterminés chez deux groupes bactériens : les entérobactéries et les staphylocoques, isolés à partir des eaux de surface de la région de Guelma. Les résultats de l'antibio-résistance ont indiqué que 100 % des entérobactéries et des staphylocoques étudiés sont multi-résistants. D'autre part, la majorité des bactéries tolèrent à 100 % des concentrations de cuivre et de cadmium allant de 12,5 à 400 µg/ml. Les espèces *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus lentus* tolèrent des concentrations plus élevées. Ces deux bactéries présentent un mécanisme de séquestration intracellulaire lié à la production de la métallothionéine (MT) qui a été exprimée à des concentrations moyennes comprises entre 0,24 et 0,71 nmol de MT / g de biomasse bactérienne. Les données obtenues dans cette étude ont montré que la multi-résistance aux antibiotiques est probablement liée à la tolérance au cuivre et au cadmium. Le changement permanent des résistances d'entérobactéries et de staphylocoques aux différents agents antibactériens doit conduire à renforcer la surveillance et organiser des contrôles périodiques dans notre pays, afin de maîtriser toutes sortes d'anomalies.

Mots-clés: Entérobactéries, Staphylocoques, Antibiotiques, Cuivre, Cadmium, Co-sélection.

Abstract

In the present study, antibiotic resistance and tolerance to heavy metals (copper and cadmium) were determined in two bacterial groups: enterobacteria and staphylococci, isolated from surface waters in the Guelma region. Antibiotic resistance results indicated that 100% of the enterobacteria and staphylococci studied are multi-resistant. On the other hand, the majority of bacteria tolerate 100% copper and cadmium concentrations ranging from 12.5 to 400 $\mu\text{g} / \text{ml}$. *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus lentus* species tolerate higher concentrations. Both of these bacteria have an intracellular sequestration mechanism related to the production of metallothionein (MT) that has been expressed at mean concentrations between 0.24 and 0.71 nmol MT / g bacterial biomass. The data obtained in this study showed that multi-resistance to antibiotics is probably related to tolerance to copper and cadmium. The permanent change in the resistance of enterobacteria and staphylococci to the different antibacterial agents should lead to strengthening surveillance and organizing periodic checks in our country, in order to master all kinds of anomalies.

Keywords: Enterobacteria, Staphylococci, Antibiotics, Copper, Cadmium, Co-selection

ملخص

في هذه الدراسة ، تم تحديد مقاومة المضادات الحيوية و تحمل المعادن الثقيلة (النحاس و الكادميوم) لدى مجموعتين بكتيريتين هما: البكتيريا المعوية *Entérobactéries* و المكورات العنقودية *Staphylocoques* المعزولة من المياه السطحية في منطقة قالمة.

أشارت نتائج مقاومة المضادات الحيوية إلى أن 100٪ من البكتيريا المعوية و المكورات العنقودية التي تم دراستها متعددة المقاومة. من ناحية أخرى ، غالبية البكتيريا تتحمل بنسبة 100٪ تركيزات النحاس و الكادميوم المتراوححة من 12.5 إلى 400 ميكروغرام / مل. الأنواع *Klebsiella pneumoniae* و *Staphylococcus lentus* تتحمل تركيزات أعلى. حيث هاتين البكتيرياتين لديهما آلية عزل الخلايا مرتبطة بإنتاج الميتالوثيونين (MT) الذي تم التعبير عنه بتركيزات متوسطة تتراوح بين 0,24 و 0,71 نانومول من الميتالوثيونين \ الغرام من الكتلة الحيوية البكتيرية. البيانات التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة اظهرت أن المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية ربما تكون مرتبطة بتحمل النحاس و الكادميوم.

ان التغيير الدائم في مقاومة البكتيريا المعوية و المكورات العنقودية لمختلف العوامل المضادة للبكتيريا يجب أن يؤدي إلى تعزيز المراقبة و تنظيم الفحوص الدورية في بلدنا ، وذلك من أجل إتقان جميع أنواع الانحرافات.

الكلمات المفتاحية : البكتيريا المعوية، المكورات العنقودية، المضادات الحيوية، النحاس، الكادميوم، الاختيار المشترك.

Figure	Titre	Page
Figure 1	Mode d'action des antibiotiques (François <i>et al.</i> , 2003).	6
Figure 2	Classification périodique des éléments (Benedetto, 1997).	12
Figure 3	Schématisation des interactions entre métaux et bactéries (adaptée de Ledin, 2000).	17
Figure 4	Co-sélection de résistance aux métaux lourds et à l'imipinème chez les bactéries à Gram négatif (Baker-Austin <i>et al.</i> , 2006).	21
Figure 5	Résistance aux antibiotiques d'entérobactéries étudiées	38
Figure 6	Résistance aux antibiotiques des staphylocoques étudiés.	41
Figure 7	Taux de tolérance des entérobactéries vis-à-vis du cuivre.	45
Figure 8	Taux de tolérance des entérobactéries vis-à-vis du cadmium.	45
Figure 9	Taux de tolérance des staphylocoques vis-à-vis du cuivre.	47
Figure 10	Taux de tolérance des staphylocoques vis-à-vis du cadmium.	47
Figure 11	Processeur Ultrason Sonics (Vibracell 75185)	76
Figure 12 :	pH-mètre (BENCH AD 1030)	76
Figure 13 :	Étuve a agitation Edmund Buhler (GmbH 6445 1346)	76

Figure 14 :	Centrifugeuse réfrigérée (SIGMA2-16K1)	76
Figure 15 :	Spectrophotomètre (Spectrum SP-UV 2005)	77
Figure 16 :	Balance de précision (ABS 220-4)	77

Tableau	Titre	Page
Tableau 1	Classification des principaux antibiotiques (Rahal, 2013).	4
Tableau 2	Origine des souches bactériennes étudiées	22
Tableau 3	Aspects macroscopique des bactéries étudiées sur les milieux de culture sélectifs (Guiraud, 2003 ; Rodier et al., 2005 ; Delarras, 2007).	26
Tableau 4	Recherche des enzymes respiratoires	28
Tableau 5	Préparation et inoculation de galeries biochimiques miniaturisés API (source : http://www.biomerieux.com).	29
Tableau 6	Critères des antibiotiques testés sur les entérobactéries (CA-SFM, 2016).	32
Tableau 7	Critères des antibiotiques testés sur les staphylocoques (CA-SFM, 2016).	32
Tableau 8	Identification des souches bactériennes étudiées	37
Tableau 9	Profils antibiotypiques associés aux entérobactéries étudiées	39
Tableau 10	Profils antibiotypiques associés aux staphylocoques étudiés.	41
Tableau 11	Effet du cuivre et du cadmium sur les souches d'entérobactéries	44
Tableau 12	Effet du cuivre et du cadmium sur les souches de staphylocoques	46
Tableau 13	Dosage de la métallothionéine chez des bactéries tolérantes aux métaux lourds	51
Tableau 15	Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 E (source : http://www.biomerieux.com).	71
Tableau 16	Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api Staph (source : http://www.biomerieux.com).	72
Tableau 17	Limites acceptables des diamètres d'inhibition (mm) obtenus par diffusion en gélose pour les souches de référence utilisées pour le contrôle de qualité (CA-SFM, 2016).	73

Planche	Titre	Page
Planche 1	Antibiogramme des différentes souches d'entérobactéries étudiées	39
Planche 2	Antibiogramme des différentes souches de staphylocoques étudiées	42
Planche 3	Tolérance des entérobactéries et des staphylocoques au cuivre et au cadmium	48

Schéma	Titre	Page
Schéma 1	Vérification de la pureté des souches bactériennes étudiées.	24

AAC : Aminoglycoside N- <i>acetyltransferase</i> .	mm : millimètre.
ADI : Acide Adipique.	MTs : Les métallothionéines
ADN : Acide désoxyribonucléique.	N-cétyl-N-tri : Trimethyl ammonium bromide.
AmpC : Adénosine monophosphate cyclique.	nmol/mg : nano-mole par milligramme.
AMY : Amygdaline.	nmol/ml : nano-mole par millilitre
ANT : Aminoside O- <i>nucléotidyltransférase</i> .	OmpC : Outer membrane protein C.
APH : Aminoglycoside 3'- <i>phosphotransférase</i> .	OmpD : Outer membrane protein D.
API : Appareillage et Procédé d'Identification.	OmpF : Outer membrane protein F.
ARN : Acide ribonucléique.	OmpK : Outer membrane protein K.
ARN-AA : Acide ribonucléique-Acide aminé.	OXA : Oxacillinase.
ARNm : Acide ribonucléique message.	PAC : Phényl-acétate.
ARNr : Acide ribonucléique ribosomique.	PAL : Phosphatase alcaline.
ARNt : Acides ribonucléiques de transfert.	PBP : Penicillin Binding Protein
ATP : Adénosine-triphosphate.	PER : Pseudomonas extended resistance (une bêtalactamase à spectre étendu).
BLSE : Bêta-lactamases à spectre élargi.	pH : Potentielle Hydrogène.
BNR : Bas niveau de résistance.	PLP : Protéines de Liaison aux Pénicillines.
C° : Degré Celsius.	PM : Masse moléculaire.
CAT : Chloramphénicol acétyltransférase.	R : Résistance.
Cd : cadmium.	S : Sensible.
CdCl₂ : cadmium chloride.	SCN : Staphylocoques à coagulase négative.
Cu : cuivre.	SHV : Sulfhydryl variable.
CuO₄ 5H₂O : sulfate pentahydraté.	SS : <i>Salmonella-Shigella</i> .
Cys : cystéines.	TEM : Temoniera : nom du malade chez qui la première souche a été isolée.
DHFR : Dihydrofolate réductase.	μ g/ml : Microgramme par millilitre.
EMT : Élément trace métallique.	VE B : Vietnam extended spectrum (une bêtalactamase à spectre étendu).
GES : Guyana extended spectrum (une bêtalactamase à spectre étendu).	
GSH : Glutathion.	
GST : Glutathion S-transférase.	
g.L⁻¹ : Gramme par litre.	
g/l : Gramme par litre.	
GLU : Glucose.	
g/mol : Gramme par mole.	
H₂S : Sodium thiosulfate.	
HNR : haut niveau de résistance.	
LPS : Lipopolysaccharides.	
MLSB : Macrolides, lincosamides et streptogramines B.	

Introduction

La résistance des bactéries aux antibiotiques reste aujourd'hui un problème majeur de santé publique. La pression de sélection exercée par l'utilisation importante de l'antibiothérapie et la diffusion épidémique des souches résistantes sont les deux facteurs principaux conditionnant cette évolution (Soussy, 2007).

Les entérobactéries et les staphylocoques occupent une place très importante parmi les germes résistants aux antibiotiques aussi bien en milieu hospitalier qu'en milieu aquatique. Ces bactéries ont un niveau de résistance naturel élevé, en relation avec différents mécanismes de résistance : sécrétion d'enzymes, imperméabilité membranaire et les pompes d'efflux. Elles peuvent acquérir des résistances qui peuvent être le fait d'une mutation chromosomique ou de l'acquisition de plasmides de résistance (Lepape, 2007).

Certaines activités anthropiques ont participé à la forte augmentation des taux des entérobactéries et des staphylocoques multi-résistants dans les écosystèmes naturels. C'est le cas par exemple de l'utilisation dans les élevages des antibiotiques comme facteur de croissance ou bien de leur utilisation inadaptée en thérapie humaine et animale (Martinez *et al.*, 2009).

Il apparait de plus en plus clairement que la présence d'autres composés entraînant des conditions de stress pour les communautés bactériennes indigènes serait impliquée dans l'acquisition de mécanismes de résistance aux antibiotiques dans l'environnement. Notamment, des études suggèrent que la contamination par les métaux des écosystèmes naturels ou anthropisés, représenterait une force évolutive importante pour la sélection de ces résistances.

En cas de pollution des écosystèmes aquatiques par les métaux lourds, ces derniers peuvent entraîner des modifications structurales et fonctionnelles des communautés présentes. Certains métaux sont souvent toxiques à faible concentration et les microorganismes sont les premiers organismes influencés par cette toxicité (Giller *et al.*, 1998).

Du fait que les bactéries jouent un rôle clé dans l'environnement, les facteurs qui affectent donc leur diversité et leur activité peuvent menacer la fertilité des écosystèmes et par conséquent leur pérennité. Pour faire face à la profusion de métaux lourds dans

l'environnement, les bactéries ont élaboré plusieurs mécanismes qui leur permettent de persister et/ou de croître, ces mécanismes étant dans plusieurs cas véhiculés par des plasmides (Silver, 1996). Ces plasmides qui codent pour la résistance aux métaux lourds peuvent aussi véhiculer des gènes codant pour la résistance aux antibiotiques (Karbasizaed et al., 2003).

La dissémination de la résistance aux métaux lourds représente un avantage écologique pour les bactéries spécialement dans les environnements pollués par les métaux lourds. Par contre, la prolifération des bactéries résistantes aux antibiotiques, directement à travers l'usage des antibiotiques ou indirectement via la sélection par la pollution métallique, présente un risque potentiel pour la santé publique en raison des échecs thérapeutiques (Ünaldi et al., 2005).

Dans ce contexte, la présente étude a pour objectifs de:

- Étudier la résistance aux antibiotiques d'entérobactéries et de staphylocoques isolés à partir des eaux de surface de la région de Guelma ;
- Déterminer la tolérance de ces bactéries aux deux métaux lourds : le cuivre et le cadmium ;
- Doser la métallothionéine, protéine de régulation de l'homéostasie des métaux, afin de déterminer un mécanisme de tolérance évoqué ;
- Comparer la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds des bactéries étudiées afin de déterminer une co-sélection de résistance.

En effet nous rapportons dans cette étude trois chapitres :

- Le premier est consacré à une synthèse bibliographique qui regroupe des notions et des mécanismes de résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds ainsi que l'interaction entre l'antibio-résistance et la tolérance aux métaux ;
- Le deuxième chapitre relate notre travail expérimental ;
- Le troisième chapitre présente les résultats obtenus et les discussions engendrées par ces résultats.

Enfin, une conclusion achèvera ce travail.

Chapitre I :

Synthèse

bibliographique

I. Antibiotiques

I.1. Définition

Un antibiotique est une substance antibactérienne naturelle ou synthétique d'origine microbienne ou synthétisée chimiquement, capable d'inhiber spécifiquement la croissance d'autres micro-organismes par un mécanisme particulier jouant sur les mécanismes vitaux du germe (Gogny *et al.*, 2001; Morin *et al.*, 2005). Pour qu'il soit actif, un antibiotique doit pénétrer dans la bactérie, sans être détruit ni être modifié, se fixer sur une cible et perturber la physiologie bactérienne (Ogawara, 1981).

Les antibiotiques sont caractérisés par (Bryskier, 1999):

- ✓ Activité antibactérienne (spectre d'activité);
- ✓ Toxicité sélective (mode d'action);
- ✓ Activité en milieu organique (pharmacocinétique);
- ✓ Bonne absorption et diffusion dans l'organisme.

I.2. Critère de classification

La classification des antibiotiques peut se faire selon :

- ✓ **Origine** : élaboré par un organisme (naturel) ou produit par synthèse (synthétique ou semi synthétique) (François *et al.*, 2003; Yala *et al.*, 2001) ;
- ✓ **Spectre d'activité** : liste des espèces sur lesquelles les antibiotiques sont actifs (spectre étroit ou large) ;
- ✓ **Nature chimique** : Très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex : cycle β lactame) sur laquelle il y a hémi synthèse. Elle permet de classer les antibiotiques en familles (β lactamines, aminosides, tétracyclines, etc.) (François *et al.*, 2003; Yala *et al.*, 2001) ;
- ✓ **Mode d'action** : Les antibiotiques agissent au niveau moléculaire de certaines structures de la bactérie, en un point précis dénommé site d'action ou cible moléculaire (Paul, 1997). En fonction de la concentration d'antibiotique et du temps de contact entre celui-ci et la bactérie, l'effet peut être simplement (Gaudy, 2005) : une action bactériostatique qui inhibe la croissance bactérienne en ralentissant puis arrêtant la multiplication et une action bactéricide, qui détruit ou lysent les bactéries définitivement.

I.3. Classe des antibiotiques

Les antibiotiques sont classés par famille selon la composition chimique. On distingue 17 familles d'antibiotiques et plusieurs sous-familles qui sont classées en fonction des groupements chimiques.

La classification la plus courante des antibiotiques est motionnée dans le tableau 1.

Tableau 1 : Classification des principaux antibiotiques (Rahal, 2013).

Mode d'action	Famille	Principaux sous groupes ou antibiotiques	Spectre d'activité (général)
Inhibiteurs de la synthèse du Peptidoglycane	β -lactamines	- Pénicilline G. - Pénicillines M. - Amidino-pénicillines. - Céphalosporines de 1 ^{ère} génération. - Monobactams.	Étroit
		- Aminopénicillines (Amoxicilline). - Carboxy-pénicillines. - Uréido-pénicillines. - Céphalosporines de 2 ^{ème} et 3 ^{ème} génération (Céfotaxime). - Céphalosporines de 4 ^{ème} génération. - Carbapénèmes (Imipénème).	Large
	Fosfomycine	- Fosfomycine.	
	Glycopeptides	- Vancomycine.	Étroit
Action sur la membrane cytoplasmique	Polymixines	- Polymixine B. - Colistine. - Bacitracine. - Tyrocidine.	Étroit
Inhibiteurs de la synthèse des protéines	Aminosides ou Aminoglycoside	- Streptomycine. - Amikacine. - Gentamicine.	Large

Suite du tableau 1 :

Mode d'action	Famille	Principaux sous groupes ou antibiotiques	Spectre d'activité (général)
	Tétracyclines	- Oxytétracycline. - Chlortétracycline.	Étroit
	Acide fucidique	- Acide fusidique.	
	Macrolides- Lincosamides- Streptogramines (MLS)	- Macrolides : (Erythromycine). - Lincosamides : (Lincomycine). - Streptogramines : (Pristinamycine).	
	Phénicolés	- Chloramphénicol	
Inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques	Quinolones et Fluoroquinolones	- Quinolones : (Acide nalidixique). - Fluoroquinolones : (Ciprofloxacine).	Large
	Rifamycines	- Rifaximine. - Rifamycine SV.	
	Novobiocines et Nitro-imidazoles	Pas de sous groupe.	
	Nitrofuranes	- Nitrofurantoïne. - Furazolidone.	
Inhibiteurs de la synthèse des folates	Sulfamides	- Sulfapyridine. - Sulfaméthoxydiazine. - Sulfaguanidine.	
	2-4 diaminoptéridine	- Trimethoprime.	
	Association Sulfamides+ Trimethoprime	- Sulfaméthoxazole + Trimethoprime (Cotrimoxazole)	

I.4. Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques agissent en général de façon très spécifique sur certaines structures de la cellule bactérienne, cette grande spécificité d'action explique pourquoi les antibiotiques sont actifs à très faible concentration. Cette action s'exerce selon les molécules sur des sites variés (Fig. 1) (Mevius *et al.*, 1999 ; Oxoby, 2002).

Les antibiotiques peuvent agir sur:

- **La paroi bactérienne** : en inhibant la dernière étape de la biosynthèse du peptidoglycane au cours de la multiplication cellulaire (Zeba, 2005) ;
- **La membrane cellulaire** : en désorganisant sa structure et son fonctionnement, ce qui produit des graves troubles d'échange électrolytiques avec le milieu extérieur (Flandrois *et al.*, 1997) ;
- **Le ribosome bactérien** : en entraînant l'arrêt de la biosynthèse des protéines ou la formation de protéines anormales. Les aminosides (streptomycine, gentamycine, amikacine) empêchent la traduction de l'ARNm en se fixant sur la petite sous-unité des ribosomes (Hermann, 2005). Les phénicolés (chloramphénicol, thiamphénicol) bloquent la formation de la liaison peptidique sur la grosse sous-unité du ribosome bactérien (Flandrois *et al.*, 1997), les macrolides et les kétolides (érythromycine, azitromycine) bloquent l'élongation de la chaîne peptidique (Nilius *et Ma*, 2002) ;
- **Les acides nucléiques** : en agissant sur l'ADN polymérase et l'ADN hélicase ou l'ARN polymérase, en bloquant de ce fait respectivement la réplication ou la transcription (Prescott *et al.*, 2010).

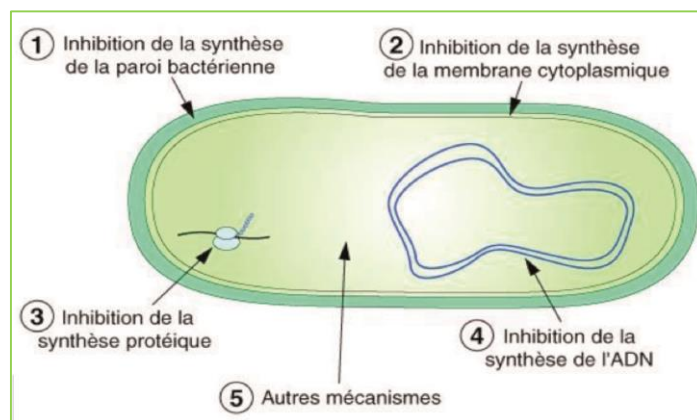


Figure 1: Mode d'action des antibiotiques (François *et al.*, 2003).

Pour qu'un antibiotique fonctionne correctement, il est nécessaire de savoir les conditions d'action suivantes :

- ✓ Une cible bactérienne spécifique ;
- ✓ Forme active ;
- ✓ Accéder à la cible ;
- ✓ Interagir efficacement avec la cible, en l'inactivant.

Si une de ces conditions est absente, la bactérie est nommée résistante ([Rahal, 2013](#)).

I.5. Résistance aux antibiotiques

I.5.1. Définition

Une bactérie est considérée comme résistante à un antibiotique quand la concentration de cet antibiotique au site de l'infection n'est pas suffisamment élevée pour inhiber la multiplication de cette bactérie ou de la tuer ([Schwarz et Chaslus-Dancla, 2001](#); [Poole, 2004](#)).

I.5.2. Résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque à un antibiotique est commune à toutes les bactéries d'une même espèce. Elle est due à la présence de gènes chromosomiques communs à toutes les bactéries d'une même espèce et transmise à la descendance. La résistance naturelle détermine les phénotypes « Sauvages » des espèces bactériennes vis-à-vis des antibiotiques ([Mayer et al., 2000](#)).

I.5.3. Résistance acquise

Ce terme est utilisé pour désigner des processus permettant à des bactéries appartenant à une espèce originellement sensible de devenir résistante à un ou plusieurs antibiotiques. Cette résistance acquise peut provenir par une mutation chromosomique (plutôt rare) ([Chopra et al., 2003](#)) ou par l'acquisition d'ADN étranger par le biais de plasmides (plutôt fréquent), de bactériophages ou de transposons ([Davies, 1997](#)).

I.5.4. Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques

Outre les résistances naturelles des bactéries, il existe un nombre important de mécanismes de résistance développés par les bactéries en réponse à la pression de sélection d'antibiotiques.

Ces résistances relèvent d'un mécanisme biochimique dont le support est génétique et elles peuvent être transmissibles à d'autres bactéries (Andremont, 2002 ; Guillement et al., 2005).

Les modes de résistance connus actuellement qui résultent de la pression de sélection exercée par les antibiotiques sont au nombre de quatre :

- **Inactivation enzymatique**

Par ce mécanisme, la bactérie acquiert la capacité d'inactiver l'action des antibiotiques par la sécrétion d'enzymes avant même qu'ils n'aient pénétrés au sein du microorganisme (Babic et al., 2006).

- **Modification d'affinité de la cible**

Ce mécanisme est en relation avec une modification d'affinité d'une ou plusieurs cibles de type PLP (protéine de liaison pénicilline) ou PBP (Penicillin Binding Protein) définissant une résistance de niveau variable : BNR (bas niveau de résistance) et HNR (haut niveau de résistance). Il est principalement présent chez les bactéries Gram négatif (Guinote et al., 2011 ; Bobba et al., 2011).

- **Imperméabilité membranaire**

Par diminution quantitative ou modification des porines (canaux de pénétration des antibiotiques à travers la membrane externe de la bactérie) provoquant la résistance par défaut de pénétration passive de l'antibiotique.

- **Efflux actif**

Les systèmes d'efflux sont constitués de protéines particulières, jouant le rôle de pompes utilisant une force protons motrice pour expulser l'antibiotique dès qu'il apparaît dans la bactérie (Pool, 2004).

Dans la présente étude, nous nous intéressons à décrire les mécanismes de résistances de 2 groupes bactériens : les entérobactéries et les staphylocoques.

I.6. Résistance des entérobactéries aux antibiotiques

Les entérobactéries (bacilles à Gram négatif) sont retrouvées partout, dans le sol, l'eau, et surtout dans l'intestin de l'homme et des animaux. Leur abondance dans l'intestin, leur mobilité, la rapidité de leur multiplication, l'acquisition fréquente des mécanismes de résistance aux antibiotiques expliquent qu'elles soient les bactéries les plus souvent impliquées en pathologie infectieuse humaine (Prescott *et al.*, 2010).

Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques ont été observés chez les entérobactéries :

- ✓ L'altération des porines par mutation est à l'origine de résistances acquises aux β -lactamines, soit par une modification structurale d'une porine essentielle, soit par une diminution quantitative des porines, qui est la situation la plus fréquente (Kumar et Schweizer, 2005). Bien que plus rare, la disparition de porine provoque l'augmentation des concentrations minimales inhibitrices de certaines β -lactamines comme cela a été mis en évidence chez certaines entérobactéries (Nikaido, 2000) ;
- ✓ Le système d'efflux actif est efficace grâce aux protéines transmembranaires ancrées dans la membrane plasmique mais également dans la membrane externe des bactéries Gram négatif (Walsh, 2003). Des mutations dans les régions régulatrices des opérons des systèmes d'efflux multi-drogues peuvent conduire à une surexpression des systèmes d'efflux constitutifs, associée ou non à une perte des porines, et conférer une multirésistance aux antibiotiques. L'implication des systèmes d'efflux dans la résistance aux β -lactamines a été clairement identifiée dans plusieurs études en particulier chez *klebsiella pneumoniae* (Bialek-Davenet *et al.*, 2011 ; Robin *et al.*, 2012) ;
- ✓ Des mutations dans les gènes chromosomiques codant pour les PLPs ou par l'acquisition de gènes étrangers codant pour des nouveaux PLPs ayant une affinité différente aux β -lactamines (Georgopapadakou, 1993) ;
- ✓ La production de β -lactamases (enzymes hydrolysant les β -lactamines en ouvrant le cycle Bêtalactame et menant à la perte d'un groupement carboxyle, provoquant l'inactivation de l'antibiotique en question) est le mécanisme prédominant de

résistance aux β -lactamines (**Livermore, 2003**). Les β -lactamases catalysent de manière efficace et irréversible l'hydrolyse du pont amide de l'anneau β -lactame des pénicillines, des céphalosporines, des monobactames et des carbapénèmes ; pour donner un acylenzyme qui sera ensuite dégradé en acide inactif (**Barrial et Scotet, 2006**) ;

- ✓ La modification de la cible entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ce mécanisme est utilisé vis-à-vis aux aminosides (**Seck, 2005**) ;
- ✓ La résistance au chloramphénicol chez certaines entérobactéries est une résistance plasmidique due à la production d'enzyme CAT "chloramphénicol acétyltransférase" (**Freney et al., 2000**).
- ✓ La résistance à la triméthoprime, antibiotique appartient à la classe de diaminopyrimidine s'effectuée soit par modification quantitative de l'acide dihydrofolique due à une mutation chromosomique ou par diminution de la perméabilité membranaire due à une diminution de la production des porines (**Freney et al., 2000**).

I.7. Résistance des staphylocoques aux antibiotiques

Les staphylocoques (Cocci à Gram positif) sont des germes ubiquistes qui peuvent vivre en bactéries saprophytes dans la nature, en bactéries commensales sur la peau et les muqueuses de l'homme et des animaux et en bactéries pathogènes, agents d'infection humaines ou animales qui peuvent être redoutables (**Delarras, 2014**).

Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques ont été observés chez les staphylocoques dont les principaux sont :

- ✓ L'inactivation enzymatique qui est due à diverses enzymes spécifiques. Les β -lactamases inactivent les β -lactamines ; les lincosamides peuvent être inactivées par une acétylase codée par un gène plasmidique *linA*. Les streptogramines sont touchées par une hydrolase codée par le gène *VGB*, et le gène *VAT* est responsable d'acétylation des streptogramines A. Ce gène est très souvent associé au gène *VGB* sur le même plasmide (**Leclercq, 2002**);

- ✓ La modification de cible: l'acquisition d'une PLP exogène et /ou la modification des PLP endogènes (**Courvalin et al., 2006**). Ce mécanisme est le plus répandu et confère un spectre de résistance croisé entre macrolides, lincosamides et streptogramines B (**Leclercq, 2002**) ;

- ✓ Des mutations affectant les cibles ribosomales des antibiotiques (**Bismith et Leclercq, 2000**). Les staphylocoques produisent des enzymes modifiant la cible ribosomale (acétyltransférase, nucléotidyl-trasférase et phosphotransférases) (**Bismith et Leclercq, 2000**);

- ✓ L'épaississement de la paroi bactérienne qui piège les antibiotiques dans les couches superficielles en les empêchant d'atteindre la membrane cytoplasmique. C'est le mécanisme de résistance à la vancomycine (alternative aux bêta-lactamines dans le traitement des infections à staphylocoques dorés méthicillino- résistance). Cette résistance est due à des mutations (**Leclercq, 2002**) ;

- ✓ Les mécanismes d'efflux actif qui ne touchent que les antibiotiques de structure apparentée (**Leclercq, 2002**).

II. Métaux lourds

II.1. Définition

Les métaux lourds sont les éléments métalliques naturels dont la masse volumique dépasse 5 g/cm^3 . Ceux-ci sont présents le plus souvent dans l'environnement sous forme de traces : mercure, plomb, cadmium, cuivre, arsenic, nickel, zinc, cobalt, manganèse, etc (Arris, 2008).

D'un point de vue chimique, les éléments de la classification périodique formant des cations en solution sont des métaux.

Les métaux lourds montrés dans la figure 2, sont présents dans tous les compartiments de l'environnement, mais en général en quantités très faibles sous forme de traces. Il s'agit de tous les éléments de transition possédant une orbital d'insaturée, y compris les lanthanides et les actinides (bloc d et f de la classification de Mendeleïev), à l'exception du scandium, du titane et de l'yttrium. On classe de même parmi les métaux lourds, les éléments intermédiaires les moins électronégatifs du bloc p, parmi lesquels figurent le plomb et l'étain (Benedetto, 1997).

Bloc S		Métaux lourds de densité > 5										Bloc p					
H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg	Bloc d										Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Te	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac	Bloc f														
Lanthanides		Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu		
Transuraniens		Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Cf	Bk	Es	Fm	Md	No	Lr		

Figure 2 : Classification périodique des éléments (Benedetto, 1997).

D'un point de vue physique, le terme « métaux lourds » désigne les éléments métalliques naturels, métaux ou dans certains cas métalloïdes (environ 65 éléments), caractérisés par une forte masse volumique supérieure à 5 g/cm^3 (Adriano, 2001).

Du point de vue biologique, nous distinguons deux types de métaux, selon leurs effets physiologiques et toxiques :

- ✓ Les métaux essentiels ou oligoéléments sont des éléments indispensables à l'état de trace pour de nombreux processus cellulaires et qui se trouvent en proportion très faible dans les tissus biologiques (Loué, 1993). Certains peuvent devenir

toxiques lorsque la concentration dépasse un certain seuil. C'est le cas du cuivre (Cu), du nickel (Ni), du zinc (Zn), du fer (Fe) (Adriano, 2001) ;

- ✓ Les métaux non essentiels ou toxiques ont un caractère polluant avec des effets toxiques pour les organismes vivants, même à faible concentration. Ils n'ont aucun effet bénéfique. C'est le cas du plomb (Pb), du mercure (Hg), du cadmium (Cd) (Chiffolleau, 2004).

II.2. Origine des métaux lourds

Les éléments métalliques sont, sous différentes formes, toujours présents au sein de l'environnement (Mohan et al., 2006). Leur présence résulte de causes naturelles et des activités humaines (Naseem et al., 2001).

- **Origines naturelles:** comme d'autres substances, les métaux sont présents dans notre environnement en quantité plus ou moins importantes, pouvant aller des traces jusqu'au métal pratiquement pur dans certains gisements miniers. Les réserves les plus importantes se trouvent dans les roches et/ou les sédiments océaniques (Chiffolleau et al., 2001).
- **Origines anthropiques:** en dehors des concentrations de fond (ou concentrations naturelles) (Miquel, 2001), il existe trois sources principales de métaux lourds (Duchaufour, 1997) :
 - ✓ Apports d'origine agricole (amendements organiques, engrais minéraux, pesticides) ;
 - ✓ Résidus industriels et urbain ;
 - ✓ Retombés atmosphériques ;

De ce fait, l'exploitation et l'utilisation des métaux par l'homme peuvent exagérément augmenter leur dissémination dans des écosystèmes qui n'y sont pas exposés naturellement (Ineris, 2004). Les métaux provenant d'apports anthropiques sont présents sous des formes chimiques assez réactives et entraînent des toxicités (Mckenzie, 1997).

II.3. Toxicité des métaux lourds

Les quantités disponibles des métaux dans l'environnement sont infimes et ils n'ont aucune signification. Mais lorsque les conditions changent de telle manière que les métaux redeviennent solubles, l'augmentation de la concentration devient alors une menace directe

pour l'environnement du fait de l'augmentation de leur disponibilité pour les plantes. En outre, depuis quelques années, les pluies acides augmentent la mobilité des métaux dans le sol et causent donc une augmentation de leur concentration dans les produits agricoles (Sam, 1997).

La toxicité intracellulaire des cations métalliques lourds a trois origines : la modification de la structure des acides nucléiques, l'inhibition des activités enzymatiques et l'interaction avec des dérivés réactifs de l'oxygène. La forte affinité des cations métalliques lourds pour les groupements phosphates ou soufrés entraîne la modification de la structure des acides nucléiques, empêchant ainsi la transcription et la traduction des gènes (Hengstler *et al.*, 2003).

De plus, les cations métalliques présents en excès dans la cellule vont entrer en compétition avec les cations physiologiques et inhiber la fonction en se fixant sur les résidus cystéines, acide glutamique ou acide aspartique des sites actifs enzymatiques, ce qui provoque une inhibition de leurs activités (Nies, 1999 ; Braymer et Giedroc, 2014).

Les espèces aquatiques, les algues et poissons, accumulent les métaux lourds par le processus de bioaccumulation, en rentrant dans la chaîne alimentaire de l'homme tels que le mercure et le plomb (Benguedda, 2012). Des effets indésirables ont été observés chez les poissons, les mollusques et les crustacés qui se manifestent par retard du développement embryonnaire, des malformations, une croissance tardive des adultes (Zhao *et al.*, 2000), des perturbations de la reproduction et l'augmentation ou la baisse du taux des biomarqueurs de défenses (Huynh, 2009).

Chez les plantes sensibles aux métaux, la toxicité peut être reliée à plusieurs causes : l'inhibition de l'activité ou la déformation structurale d'une protéine, la formation de radicaux libres ou d'espèces réactives de l'oxygène et la substitution du métal par un analogue toxique dans la protéine cible (Vanassche et Clijsters, 1990; Clemens, 2001 ; Hall, 2002).

Chez l'homme et les microorganismes, l'affinité pour les protéines soufrées permet à l'organisme de se détoxifier, mais la neutralisation qui résulte de cette fixation est aussi la cause principale des effets toxiques. Lorsqu'une protéine soufrée a fixé un atome de métal, la zone de fixation est inactivée. Ainsi, de nombreuses protéines enzymatiques ou fonctionnelles perdent leurs activités (Baghdadi, 2012).

Vu l'hétérogénéité des effets des polluants métalliques, nous nous limitons à décrire ceux liées au cuivre et au cadmium.

- **Cuivre :**

C'est un élément chimique de symbole Cu et de numéro atomique 29. Métal de couleur rougeâtre, il possède une haute conductivité thermique et électrique à température ambiante (Baize, 1997). Le cuivre est présent naturellement dans la croûte terrestre et dans les océans, les lacs, les rivières sous différentes formes et concentrations. Les sources anthropiques de cuivre dans l'environnement sont liées à la production, à l'utilisation ou à l'élimination du cuivre métal (plus ou moins pur, affiné ou raffiné) et/ou des composés du cuivre et/ou des alliages du cuivre (Dameron et Howe, 1998).

Le cuivre est un métal essentiel, toxique à faible et à forte dose. Sa toxicité pour les microorganismes a été démontrée par Joachim et al. (2009), qui a constaté qu'une concentration de 25 µg/L a conduit à une diminution en abondance de plusieurs taxons de diatomées (*Cocconeis* ssp., *Gomphonema* sp.), de macrophytes (*Lemna minor*, *Nasturtium officinale*), de champignons aquatiques (*Clavariopsis aquatica*), de zooplancton (*Mytilinia* sp., *Trichocerca* sp.) et de macro invertébrés (*Lymnaea* sp., *Gammarus pulex*). Les effets à court terme sur les mollusques, insectes, poissons, oiseaux d'eau et divers animaux venant s'abreuver seraient également désastreux (Mc Ardle, 1995).

- **Cadmium :**

C'est un élément chimique de symbole Cd et de numéro atomique 48 (Andujar et al., 2010). C'est un métal blanc argent, légèrement bleuté, appartenant à la famille des métaux de transition, possède 8 isotopes naturels stables de masse atomique 106. Le cadmium est un élément relativement rare présent dans l'écorce terrestre à des concentrations faibles. Sa dispersion dans l'environnement (en particulier les systèmes aquatiques) est liée aussi aux nombreuses activités industrielles et à l'épandage d'engrais phosphatés faisant intervenir cet élément atmosphériques (Garin et Simon, 2004).

Au sein des milieux aquatiques, le cadmium est considéré comme un des métaux les plus toxiques et représente un risque pour les organismes aquatiques. L'impact du cadmium sur les organismes dépend tout d'abord de la forme chimique sous laquelle il se trouve et bien sûr de la dose et du temps d'exposition (Garin et Simon, 2004).

La toxicité du cadmium s'exerce à l'échelle infra-individuelle, au niveau cellulaire. Les effets de ce métal sont multiples et complexes et les dommages intracellulaires générés concernent tous les types de biomolécules : dénaturation de certaines protéines, peroxydation lipidique, cassures de l'ADN, répression ou au contraire surexpression de nombreux gènes (Liao *et al.*, 2002).

II.4. Interactions bactérie – métaux lourds

II.4.1. Généralités

L'interaction bactéries-métaux lourds a été surtout étudiée dans les environnements extrêmes. La nature des interactions dépend du rôle biologique du métal dans la cellule. Certaines métaux lourds (Ni, CO, Zn, Fe) sont des cofacteurs indispensables de certaines protéines pour leur stabilisation ou leur conformation mais deviennent toxiques à haute concentration (Monchy, 2007).

Vue de la grande variété des ETM (éléments traces métalliques) et de leurs effets opposés, les microorganismes doivent contrôler de façon stricte la concentration intracellulaire en ETM, réguler et maintenir l'homéostasie et développer des stratégies de résistance contrebalançant l'effet des hautes concentrations en ETM. En effet, différents mécanismes cellulaires existent et sont mis en œuvre dans la résistance aux ETM (Nies, 1999).

La bioaccumulation regroupe deux modes d'interaction, le premier consiste en l'adsorption ou la fixation des ETM dans la structure cellulaire sur des sites de liaisons présentant des fonctions anioniques appelés groupements fonctionnels existant au niveau de la surface bactérienne tel que les lipopolysaccharides, les peptidoglycanes et les phospholipides (Badot et Crini, 2007 ; Das, 2008) capables de fixer les métaux. Ce mode est connu sous le terme de biosorption ou « passive uptake » (Malik, 2004). Le second consiste en l'absorption et la séquestration des ETM à l'intérieur des cellules bactériennes (Malik, 2004).

La figure 3 illustre les différentes interactions bactérie – métaux lourds.

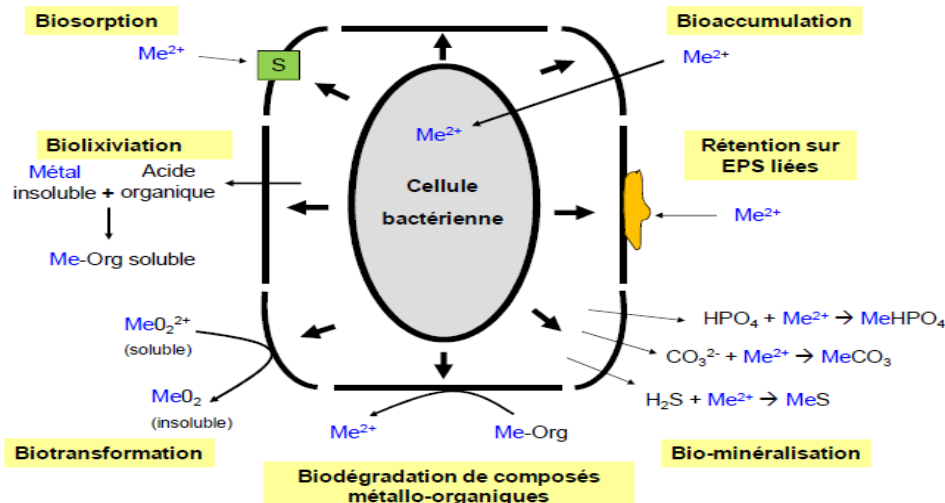


Figure 3: Schématisation des interactions entre métaux et bactéries (adaptée de Ledin, 2000). S : groupements réactifs présents sur la paroi bactérienne. Me^{2+} : un cation métallique. Org : un composé organique.

II.4.2. Systèmes d'import des métaux lourds

Les bactéries ont une régulation fine pour le maintien (homoeostasie) et le contrôle des concentrations intracellulaires de métaux lourds (Nies, 1999). Cette régulation évite l'expulsion des métaux essentiels présents aux concentrations homéostatiques, ou l'entrée de métaux en quantité toxique. Les ions métalliques lourds entrent dans la cellule par deux types de voie :

- ✓ Le premier est un système passif exprimé constitutivement, qui incorpore rapidement les ions au travers des membranes plasmiques bactériennes de façon non-spécifique en fonction du gradient chimio-osmotique. Il est constitué par des protéines de la famille des MIT (Metal Inorganic Transport), comme CorA pour le transport du nickel, du cobalt, du zinc ou du manganèse. Cette "porte ouverte" est la raison principale pour laquelle les métaux lourds sont toxiques. L'expression des gènes de la famille MIT peut être diminuée par mutation et ces mutants deviennent tolérants aux métaux (Silver et Phung, 2005).
- ✓ Le second système de transport est un système actif lent d'import qui possède une forte affinité pour son substrat et utilise l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie. Sa production est induite en fonction du gradient chimio-osmotique et des

besoins de la cellule (Nies et Silver, 1995). Les ATPases de type P assurent l'import du manganèse, du magnésium, du calcium, du potassium, du cuivre, du zinc, du cadmium, du plomb et de l'argent (Fagan et Jr, 1994). Ces ATPases sont des pompes à cations qui doivent leur nom à la phosphorylation transitoire d'un résidu aspartate conservé pendant leur cycle réactionnel (Kühlbrandt, 2004).

II.4.3. Notion de tolérance et de résistance aux métaux lourds

II.4.3.1. Tolérance aux métaux lourds

Le terme « tolérance » est employé lorsque les organismes supportent la présence des métaux grâce à leurs caractéristiques biologiques intrinsèques (Gadd, 1992). De manière globale, les métaux exercent une pression sélective augmentant la tolérance de base de certains microorganismes, mais diminuent leur biodiversité (Almeida Pereira et al., 2006).

II.4.3.2. Résistance aux métaux lourds

La résistance aux métaux et la survie sont le résultat d'une coopération entre les mécanismes de résistance et le métabolisme métallique cellulaire normal (Soussou, 2013). Il existe une grande diversité de mécanismes de résistance aux ions métalliques, liée à leur valence, taille, indice de solubilité, potentiel redox et la forme sur laquelle l'élément se trouve dans l'environnement (Monchy, 2007).

Il existe plusieurs mécanismes de résistance aux métaux chez les bactéries. Ces mécanismes comprennent :

- **Exclusion par perméabilité de la membrane** : les bactéries forment naturellement un « revêtement » de polysaccharides extracellulaires, absorbant les ions métalliques et les empêchant d'interagir avec les composés cellulaires vitaux (Claire, 2012) ;
- **Efflux actif** : il s'agit du mécanisme de résistance le plus utilisé par les microorganismes. Ils utilisent les mécanismes de transport actif pour exporter les métaux toxiques depuis leur cytoplasme jusqu'au milieu extracellulaire (Claire, 2012). Chez *P. aeruginosa*, l'ion Cu^{2+} est exporté par un mécanisme impliquant 4 protéines séquestrant le cuivre dans le périplasme (Claire, 2012) ;
- **Séquestration intracellulaire des métaux lourds par la production de diverses protéines chélatantes** : les métallothionéines sont des protéines intracellulaires riches en cystéine, elles ont été identifiées comme capable de séquestrer des cations de Zn et de Cd (Maynaud, 2012). Il permet la séquestration des métaux au sein du

cytoplasme afin d'éviter l'exposition des composants cellulaires essentiels aux métaux. Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} sont les métaux les plus fréquemment séquestrés (Claire, 2012). Cette stratégie a été mise en évidence chez *P. putida* pour le Cd^{2+} par la synthèse de trois protéines de faible poids moléculaire, riches en cystéines (Claire, 2012) ; Chez *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*, la production de glutathion, un tripeptide contenant un groupement thiol qui produit en général lors d'un stress oxydatif a été mis en évidence dans la détoxification de cations métalliques tels que le Cd et le Ni (Maynaud, 2012) ;

- **La détoxification enzymatique** : Elle fait appel à des gènes impliqués dans la réduction des composés métalliques (Maynaud, 2012) ;
- **La réduction de la sensibilité des cibles cellulaires des métaux** : cette protection se déroule par mutation, diminuant ainsi la sensibilité sans altérer les fonctions de base de la cellule (Claire, 2012) ;
- **la production de sidérophores** : en liant le métal dans le milieu extracellulaire, le sidérophore diminue la concentration en métaux libres, affectant sa diffusion dans la bactérie et ainsi sa toxicité (Claire, 2012). Une souche de *P. aeruginosa* produisant la pyoverdine et la pyocheline apparaît plus résistante aux métaux qu'une souche ne synthétisant pas de sidérophore (Claire, 2012).

II.4.4. Effets des métaux sur la cellule bactérienne

La toxicité intracellulaire des cations métalliques lourds a trois origines : la modification de la structure des acides nucléiques, l'inhibition des activités enzymatiques et l'interaction avec des dérivés réactifs de l'oxygène. La forte affinité des cations métalliques lourds pour les groupements phosphates ou soufrés entraîne la modification de la structure des acides nucléiques, empêchant ainsi la transcription et la traduction des gènes (Hengstler et al., 2003).

De plus, les cations métalliques présents en excès dans la cellule vont entrer en compétition avec les cations physiologiques et en inhiber la fonction en se fixant sur les résidus cystéines, acide glutamique ou acide aspartique des sites actifs enzymatiques, ce qui provoque une inhibition de leurs activités (Nies, 1999). En se liant aux groupements thiols des acides nucléiques et des protéines, les métaux peuvent altérer leur structure conformationnelle et en inhiber l'activité (Monchy, 2007).

Enfin, les cations métalliques peuvent interagir avec les espèces réactives de l'oxygène et former, par la réaction de Fenton, des radicaux libres qui endommagent alors l'ADN et les

protéines (Braymer and Giedroc, 2014). Chez les bactéries à Gram-négatif, ils peuvent se lier au glutathion et conduire à la formation de complexes bisglutathions qui ont tendance à réagir avec l'oxygène moléculaire (Kachur *et al.*, 1998).

III. Relation entre l'antibio-résistance et la métallo-résistance

La propagation de la résistance aux antibiotiques n'est pas seulement le fruit d'une utilisation appropriée ou inappropriée des antibiotiques par l'homme, mais peut être la cause de l'impact d'autres activités anthropogènes. En effet certains polluants de l'environnement tels que les métaux lourds, composés hautement persistants et non biodégradables, engendrés par des activités diverses, se sont révélés un véritable fléau aussi bien sur le plan toxicologique mais également sur le plan écologique. Donc la pollution métallique peut avoir un rôle important dans le maintien et la prolifération de la résistance aux antibiotiques (Baker-Austin *et al.*, 2006).

Les souches bactériennes à Gram négatif et à Gram positif isolées sur des milieux contenant le cobalt, le plomb, le mercure et le molybdène démontrèrent une résistance à l'ampicilline et au chloramphénicol, à l'inverse peu de souches isolées des milieux additionnés de plomb ou de molybdène ont été résistantes à la gentamycine (Habi et Daba, 2009). Perron *et al.* (2004) ont montré que la présence de zinc sélectionne des souches bactériennes à Gram (-) résistantes à la fois à différents métaux : zinc, cadmium et cobalt et à l'imipénème, antibiotique de la famille des carbapénèmes. Cette double résistance implique le système de régulation à deux composants CzcR/CzcS qui en présence du métal va d'une part, induire l'expression de la pompe à efflux CzcCBA permettant l'efflux du zinc, cadmium et cobalt et d'autre part réprimer l'expression de la porine OprD, responsable notamment de l'entrée de l'imipénème dans la cellule (Fig. 4) (Perron, *et al.*, 2004).

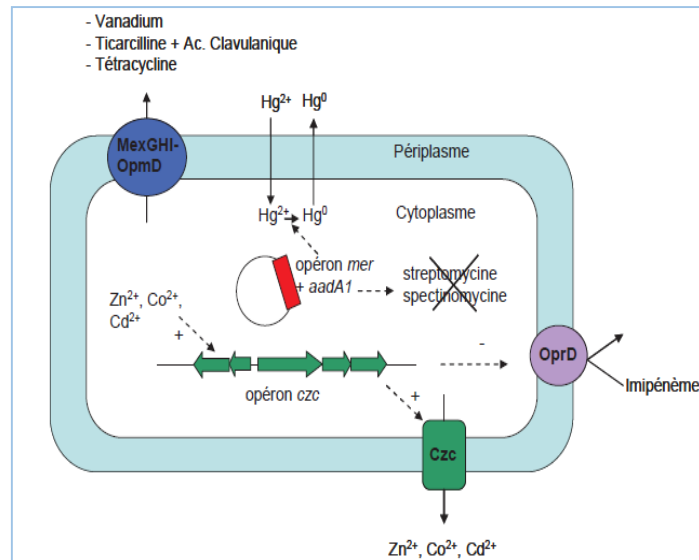


Figure 4 : Co-sélection de résistance aux métaux lourds et à l'imipénème chez les bactéries à Gram négatif (Baker-Austin *et al.*, 2006).

Chapitre II :

Matériel et Méthodes

Durant notre étude, les travaux expérimentaux ont été réalisés au niveau du Laboratoire de Microbiologie de Département de Biologie à l'Université 8 Mai 1945 de Guelma.

I. Souches bactériennes étudiées

I.1. Choix et origine des bactéries

Deux groupes bactériens ont été choisis pour la présente étude : les entérobactéries et les staphylocoques. Les souches bactériennes ont été isolées des eaux de surface de la région de Guelma.

Un total de 5 entérobactéries (E1 – E5) et 5 staphylocoques (S1 – S5) ont été étudié (Tableau 2).

Le choix de ces bactéries est basé sur:

- ✓ Leur caractère ubiquitaire dans l'environnement ;
- ✓ Leur sensibilité différente vis-à-vis aux antibiotiques et aux métaux lourds.

Tableau 2 : Origine des souches bactériennes étudiées.

Souches bactériennes	Lieu de prélèvement	Date de prélèvement	Méthode de conservation	
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia coli</i> (E1)	Oued Bradaa	22/02/2017	GN inclinée en tube
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (E2)	Oued Maïz	22/02/2017	GN inclinée en tube
	<i>Proteus vulgaris</i> (E3)	Oued Seybouse – plaine de Boumahra	13/03/2017	GN inclinée en tube
	<i>Serratia odorifera</i> (E4)	Oued Seybouse – Pont de Bentabouche	13/03/2017	GN inclinée en tube
	<i>Shigella</i> spp. (E5)	Oued Seybouse – plaine de Boumahra	13/03/2017	GN inclinée en tube

GN : gélose nutritive.

Suite du Tableau 2:

Souches bactériennes		Lieu de prélèvement	Date de prélèvement	Méthode de conservation
<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (S1)	Oued Maïz	22/02/2017	Chapman incliné en tube
	<i>Staphylococcus hominis</i> (S2)	Oued Seybouse – Pont de Héliopolis	22/02/2017	Chapman incliné en tube
	<i>Staphylococcus lentus</i> (S3)	Oued Seybouse – Pont de Héliopolis	22/02/2017	Chapman incliné en tube
	<i>Staphylococcus camosus</i> (S4)	Oued Bradaa	13/03/2017	Chapman incliné en tube
	<i>Staphylococcus xylosus</i> (S5)	Oued Seybouse – plaine de Boumahra	13/03/2017	Chapman incliné en tube

I.2. Vérification de la pureté des bactéries

La purification est une étape très importante, elle conduira à la souche pure ce qui facilitera l'étude de la sensibilité aux agents antibactériens (Joffin et leyrat, 2003).

Afin de vérifier la pureté des souches bactériennes étudiées, nous avons suivi les étapes suivantes (Schéma 1) :

I.2.1. Revivification des bactéries

Pour chaque bactérie, des colonies ont été introduites dans un tube contenant 5 ml de bouillon nutritif à l'aide d'une anse de platine stérile. Les tubes sont ensuite incubés à 37 C° pendant 24 à 48 heures (Guiraud, 2003).

Cette étape permet la croissance des bactéries, ce qui facilitera leurs cultures dans les milieux d'isolement (Guiraud, 2003).

Remarque : La composition des milieux de culture, réactifs et colorants utilisés est rapportée en annexe I.

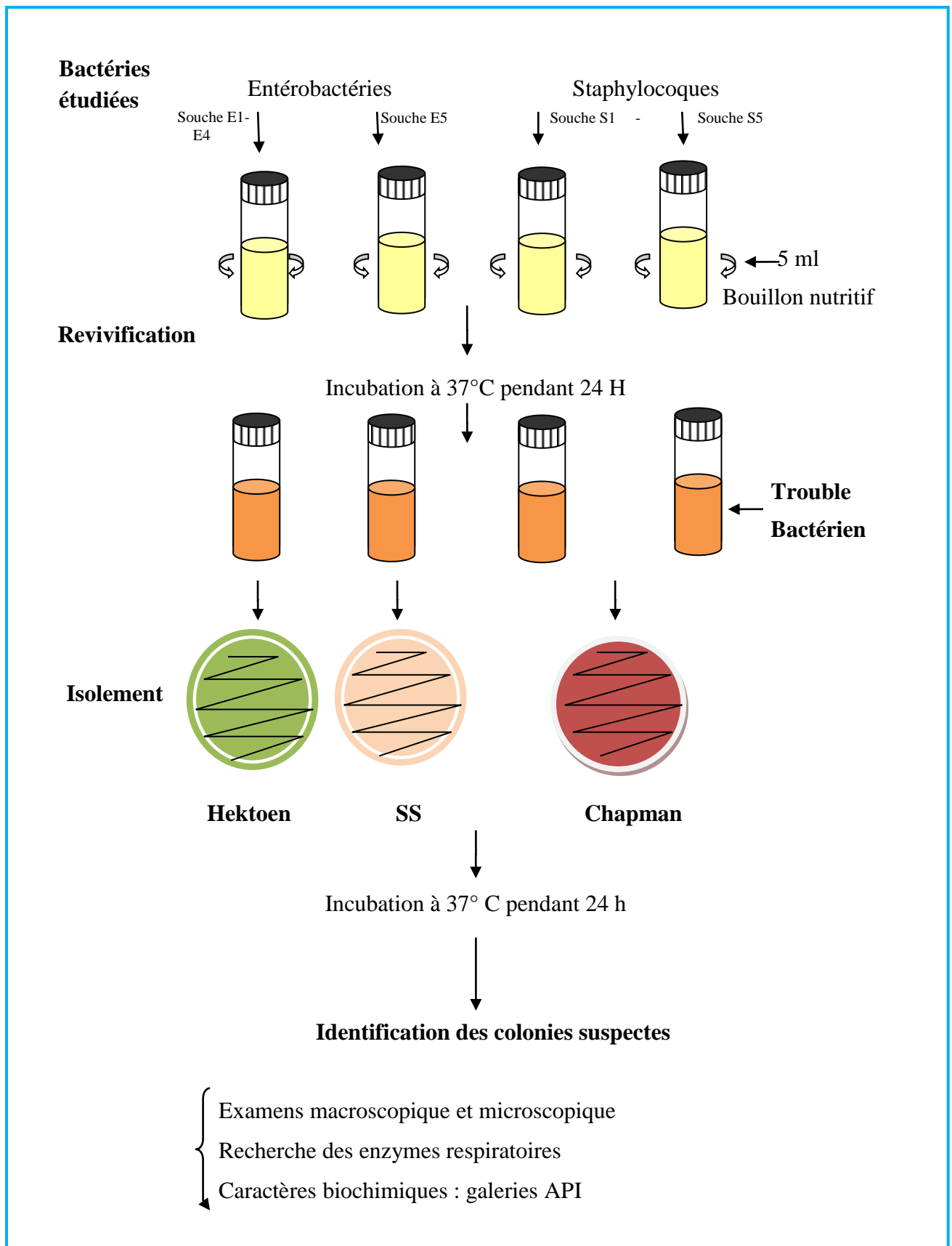


Schéma 1: Vérification de la pureté des souches bactériennes étudiées.

I.2.2. Isolement des bactéries

A partir des milieux d'enrichissements présentant une croissance bactérienne, nous avons ensemencé 3 milieux de culture :

- La gélose Hektoen pour l'isolement des souches E1 à E4. C'est un milieu sélectif pour les entérobactéries pathogènes, il permet une première orientation quant à l'identification de l'espèce isolée sur la base de l'attaque de trois glucides : lactose, salicine et saccharose. Une différenciation supplémentaire (présence de thiosulfate et de citrate de fer dans le milieu) qui se traduit par des colonies à centre noir dû à la formation de sulfure de fer (Larpen, 1997).
- La gélose *Salmonella-Shigella* (SS) pour la souche E5. c'est le milieu sélectif des salmonelles et des shigelles. Il contient du vert brillant, sels biliaries et de fortes concentrations en thiosulfates et en citrate inhibent totalement la croissance de la microflore secondaire Gram positive ainsi que celle de nombreux coliformes et *Proteus* (Larpen, 1997).
- La gélose Chapman pour les souches S1 à S5. C'est un milieu qui contient un inhibiteur de fortes concentrations en chlorure de sodium (75g.L^{-1}), ce qui permet un isolement sélectif de staphylocoques tolérant les fortes concentrations en NaCl (Rodier et al., 2005).

Tous les milieux ensemencés sont incubés à 37°C pendant 24 à 48 heures.

I.2.3. Identification des bactéries

I.2.3.1. Identification morphologique

- **Examen macroscopique**

L'identification des germes est basée sur l'observation de l'aspect macroscopique des colonies obtenues à partir des différents milieux d'isolement (la taille, la forme, la couleur, la consistance, l'opacité, l'allure du contour) (Delarras, 2007).

L'aspect des colonies suspectes des bactéries étudiées sur chaque milieu de culture utilisé est représenté dans le tableau 3.

Tableau 3 : Aspects macroscopique des bactéries étudiées sur les milieux de culture sélectifs (Guiraud, 2003 ; Rodier *et al.*, 2005 ; Delarras, 2007).

Milieu d'isolement	Aspects des colonies	Bactéries suspectes
Hektoen	<ul style="list-style-type: none"> - Jaunes Saumons sans centre noir. - jaunes saumon à centre noir. - vertes ou bleuâtres sans centre noir. - vertes bleuâtres à centre noir. 	<ul style="list-style-type: none"> - Coliformes, <i>Serratia</i>, <i>Arizona</i>, <i>Levinea</i>, <i>Yersinia</i>. - <i>Citrobacter freundii</i>, <i>Proteus vulgaris</i> - <i>Shigella</i>, <i>Salmonella</i> à H₂S (-), <i>Providentia</i>, <i>Proteus morganii</i>, <i>Proteus rettgeri</i>. - <i>Salmonella</i>, <i>Proteus mirabilis</i>.
Salmonella-Shigella	<ul style="list-style-type: none"> - Colonies rouges. - Colonies rouges à centre noir. - Colonies incolores. - Colonies incolores à centre Noir 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Enterobacter</i>, <i>Klebsiella</i>, autres coliformes (<i>E.coli</i>). - <i>Citrobacter freundii</i>, <i>Arizona</i>. - <i>Salmonella</i> H₂S (-), <i>Shigella</i>, <i>Serratia</i>, <i>Alkalescens</i>, <i>Enterobacter hafniae</i>, <i>Proteus morganii</i> - <i>Salmonella</i> H₂S (+), <i>Proteus vulgaris</i>, <i>Proteus mirabilis</i>.
Chapman	<ul style="list-style-type: none"> - Colonies jaunes entourés d'une zone jaune, mannitol (+). - Colonies roses - rouges ou pourpres, mannitol (-). 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus saprophyticus</i> - <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus xylosus</i> <i>Staphylococcus hominis</i>

- **Examen microscopique**

Afin d'observer l'aspect microscopique des bactéries isolées nous avons effectué une coloration de Gram.

- **Coloration de Gram**

Cette coloration aide à déterminer deux grands groupes appelés Gram positif et Gram négatif. Elle nous permet aussi de connaître la morphologie et le mode de regroupement de bactérie (Tortora *et al.*, 2003).

Technique

La coloration de Gram ou coloration différentielle s'effectue de la manière suivante :

- Préparation d'un frottis bactérien : prélever la colonie bactérienne à identifier, et l'étaler sur une goutte d'eau physiologique déposée sur une lame propre puis la fixer par simple passage sur la flamme du bec bunsen ;
- Coloration par le violet : chaque frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au violet de Gentiane, il est ensuite lavé rapidement par l'eau courante ;
- Mordançage : traiter durant une minute par la solution de Lugol et laver à l'eau ;
- Décoloration : en traitant avec l'alcool, couler le solvant sur frottis pendant une à trois secondes puis laver immédiatement à l'eau courante. A ce stade, les cellules Gram négatives seront incolores, les cellules Gram positives restent violettes ;
- Recoloration : soumettre le frottis durant trente secondes à une courte coloration par la fuchsine pour recolorer les cellules Gram négatives présentes puis rincer et sécher entre deux feuilles de papier buvard propre ;
- Examiner le frottis, à immersion à l'objectif $\times 100$.

Lecture : Les bactéries Gram positives sont bien colorées en violet alors que les bactéries Gram négatives sont bien colorées en rose (Prescott *et al.*, 1999).

I.2.3.2. Identification biochimique

- **Recherche des enzymes respiratoires**

Trois enzymes respiratoires sont recherchées : oxydase, catalase et nitrate réductase (Tableau 4).

- **Caractères biochimiques**

L'étude des caractères biochimiques des différentes bactéries a été réalisée par les galeries biochimiques miniaturisées API (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France).

▪ **Galerie biochimique miniaturisée API**

Le système API (Appareillage et Procédé d'Identification) est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries (Freney *et al.*, 2000).

Tableau 4 : Recherche des enzymes respiratoires.

Enzyme	Propriété	Technique	Lecture	Référence
Catalase	Dégrade le peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	<ul style="list-style-type: none"> • Déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) à l'aide d'une pipette Pasteur. • Prélever une colonie à l'aide d'une anse de platine. • Dissocier la colonie dans la goutte. 	<ul style="list-style-type: none"> • Catalase positive : Apparition des bulles de gaz, la bactérie possède la catalase. • Catalase négative : Absence des bulles de gaz, la bactérie ne possède pas la catalase. 	(Rodier, 1996)
Oxydase	Catalyse les réactions d'oxydo-réduction	<ul style="list-style-type: none"> • Déposer le disque d'oxydase sur une lame propre, l'humidifier avec deux gouttes d'eau distillée stérile • Ecraser la colonie testée sur le disque. 	<ul style="list-style-type: none"> • Oxydase positif : Colonie prend une couleur violette. • Oxydase négatif : La colonie reste incolore, donc absence d'enzyme recherché. 	(Jean et Guy, 2001)
Nitrate réductase	Réduire le nitrate en nitrite	<ul style="list-style-type: none"> • La recherche s'effectue : soit à partir de bouillon nitraté, soit à partir de la cupule Glu (galerie API 20E). • Après culture des milieux, ajouter à la surface du milieu 3 gouttes d'acide sulfanilique (NITI) puis 3 gouttes d'alpha naphthylamine (NIT II). • Mélanger et observer. 	<ul style="list-style-type: none"> • Le milieu devient rouge, présence de nitrite. Donc la bactérie possède la nitrate réductase : test (+) • Pas de coloration, on ajoute la poudre du zinc : <ul style="list-style-type: none"> - milieu incolore : test (+) - Coloration rouge : test(-) 	(Jean et Guy, 2001)

Deux galeries API ont été utilisées : l'API 20 E pour l'identification des entérobactéries, et l'API Staph pour les staphylocoques.

La préparation et l'inoculation des galeries citées-ci-dessus sont résumées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Préparation et inoculation de galeries biochimiques miniaturisés API (source :<http://www.biomerieux.com>).

Type de l'API	Caractéristiques	Préparation Galerie/inoculum	Inoculation de la galerie	Lecture	Identification
API 20 E	-Comporte 20 tests -Destinée aux bacilles à Gram négatif dont les entérobactéries.	-Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère Humide ; -Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation ; Faire une suspension bactérienne : cultures jeune dans un tube contenant 5 ml d'eau distillée stérile.	-Remplir les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne, - Remplir uniquement les tubes des autres tests, - Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H ₂ S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine, -Refermer la boîte d'incubation et la placer à 35-37°C pendant 18 à 24 heures.	-Lecture directe ou après addition de réactifs : se référer au tableau de lecture spécifique à chaque API*. -Les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1, 2 ou 4) est indiquée pour chacun. Additionner à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondants aux tests positifs. On obtient un nombre à 7 chiffres qui sert de code d'identification.	L'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification <i>apiweb</i> TM **. Enter manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres.
API Staph	-Comporte 20 tests -Destinée aux genres : <i>Staphylococcus</i> <i>Micrococcus</i> <i>Kocuria</i>		-Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide d'une pipette Pasteur en évitant la formation de bulles. -Pour les caractères ADH, URE, remplir les cupules d'huile de paraffine pour créer une anaérobiose. Incuber 24 heures à 37°C.		

*voir annexe II, ** Consulter : <http://www.biomerieux.com>.

II. Étude de la résistance des bactéries aux antibiotiques

L'étude de la résistance aux antibiotiques a été réalisée par la méthode classique de diffusion des disques d'antibiotiques en milieu Mueller-Hinton selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2016).

II.1. Technique de l'antibiogramme

- **Préparation de l'inoculum**

- A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'un écouvillon quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Bien décharger l'écouvillon dans 5 à 10 ml de bouillon Mueller Hinton.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Ferland ($\sim 10^8$ UFC/ml).

- **Ensemencement de la gélose Mueller Hinton (MH)**

- Couler la gélose MH en boîtes de Pétri ; Laisser sécher et solidifier sur paille avant utilisation ;
- Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum préparé ;
- L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum ;
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la gélose de haut en bas, en stries serrées ;
- Répéter l'opération 2 fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon par la périphérie de la gélose ;
- Laisser les boîtes ensemencer 15 à 20 min sur paille ou dans l'étuve à 37°C avant l'application des antibiotiques.

- **Application des disques d'antibiotiques**
 - Déposer les disques d'antibiotique sur la gélose à l'aide d'une pince flambée, en appuyant doucement sur chaque disque pour assurer un contact uniforme avec le milieu ;
 - Laisser les boîtes à une température ambiante pendant 30 minutes sur la paillasse pour permettre la diffusion de l'antibiotique dans la gélose ;
 - Incuber (sans dépasser les 30 minutes) à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures.

- **Lecture interprétative**

Les diamètres des zones d'inhibition autour des disques sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse en millimètre, puis ils sont comparés aux diamètres critiques conformément aux indications du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2016). Il convient de noter toutefois, qu'une souche dont la sensibilité aux antibiotiques est ainsi évaluée peut être déclarée " sensible, intermédiaire ou résistante".

II.2. Antibiotiques testés

Les antibiotiques qui ont été testés sur les différentes espèces bactériennes sont représentés, dans les tableaux 6 et 7.

Le choix des antibiotiques testés repose sur l'identification du genre et son profil habituel vis-à-vis des antibiotiques (résistances naturelles et résistances acquises possibles).

- **Contrôle de qualité interne**

Un contrôle de qualité interne a été réalisé pour s'assurer de la validité des résultats obtenus. Les souches de référence utilisées sont les suivantes :

Escherichia coli CIP 7624 (ATCC 25922) et *Staphylococcus aureus* CIP 7625 (ATCC 25923) (CA-SFM, 2016).

Les limites acceptables des diamètres d'inhibition (mm) obtenus par diffusion en gélose pour les souches de références utilisées sont rapportées en annexe II.

Tableau 6 : Critères des antibiotiques testés sur les entérobactéries (CA-SFM, 2016).

Antibiotique	Famille D'antibiotique	Classe	Code	Charge Du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)	
					S ≥	R <
Amoxicilline	Bêta -lactamine	Pénicilline	AMC	10	19	19
Pipéracilline	Bêta -lactamine	Pénicillines	PIP	100	20	17
Cefixime	Bêta -lactamine	Céphalosporines	CFM	5	24	21
Gentamicine	Aminoglycoside	Aminosides	GM	120	17	14
Azithromycine	Macrolides	Macrolides	AT	15	18	13
Chloramphénicol	Phénicole	Divers	C	30	17	17

Tableau 7: Critères des antibiotiques testés sur les staphylocoques (CA-SFM, 2016).

Antibiotique	Famille D'antibiotique	Classe	Code	Charge Du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)	
					S ≥	R <
Pénicilline G	Bêta-lactamine	Pénicilline	P	10Unité	26	26
Gentamicine	Aminoglycoside	Aminoside	GM	120	18	18
Erythromycine	Macrolide	Macrolide	E	300	21	18
Co-trimoxazole	Association Sulfamides+ Trimethoprime	Association Sulfamides+ Trimethoprime	COT	25	17	14
Vancomycine	Glycopeptide	Glycopeptide	VA	30	17	-
Nitrofurane	Nitrofurane	Nitrofuranes	NIT	300	15	15

III. Étude de la tolérance des bactéries aux métaux lourds

III.1. Métaux lourds testés

Dans la présente étude nous avons étudié l'effet antibactérien de deux métaux lourds : le cuivre et le cadmium.

Le cuivre testé est sous forme de cuivre sulfate pentahydraté ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), $\text{PM} = 249,68 \text{ g/mol}$; et le cadmium est obtenu à partir de cadmium chloride (CdCl_2), $\text{PM} = 183,31 \text{ g/mol}$.

Le choix de ces métaux repose d'une part sur les données de la direction de l'environnement de la wilaya de Guelma et les travaux de [Guettaf \(2015\)](#) qui montrent leurs présences en concentrations importantes dans les eaux des sites d'échantillonnage, et d'autre part, sur leur disponibilité.

III.2. Préparation des solutions mères et des solutions filles

Des solutions mères de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ et de CdCl_2 contenant 5 g/l ont été préparées dans de l'eau distillée, puis stérilisée par filtration sur membrane (0,2 μm).

Huit solutions filles sont obtenues par dilution successive au demi de la solution mère dans des tubes d'eau distillée stérile.

Après dilution de la solution mère métallique, les concentrations du cuivre et cadmium se répartissent dans les solutions filles entre 12,5 et 1600 $\mu\text{g/ml}$.

III.3. Préparation de l'inoculum

Les bactéries issues d'une culture de 18 heures incubée à 37°C ont été suspendues dans le bouillon Mueller Hinton à une turbidité correspondante à 0,5 Mac Farland.

l'inoculum bactérien est dilué à raison de 10^6 bactéries/ml pour les entérobactéries et à 10^7 bactéries/ml pour les staphylocoques ([Lennette et al., 1985](#)).

III.4. Taux de tolérance des bactéries aux métaux lourds

Afin de déterminer quantitativement la tolérance des bactéries au cuivre et au cadmium, nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu solide (Mueller-Hinton) ([Hassen et al., 1998](#)).

Technique

- Couler la gélose MH dans des boîtes de Pétri en réalisant un puits central de 1cm de diamètre ;
 - Additionner 0,5 ml de chaque solution fille du métal testé dans le puits central ;
 - Incuber à 37°C pendant 24 heures ;
 - Ensemencer les bactéries étudiées en stries radiales ;
 - Incuber à 37°C pendant 24 heures.
- Trois répétitions ont été effectuées.

Lecture

- Mesurer les zones d'inhibition en mm.
- Calculer le taux de tolérance des bactéries en fonction des cultures obtenues.

Remarque

- Les souches de référence *Escherichia coli* K12 ATCC 10798 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 sont utilisées comme un excellent modèle de contrôle de l'effet antibactérien des métaux lourds (Akinbowale *et al.*, 2007).
- Des témoins de croissance pour chaque souche bactérienne sont préparés dans la gélose MH sans métaux lourds.
- Des témoins négatifs sont préparés également avec de la gélose MH additionné de métaux lourds sans culture bactérienne.

IV. Dosage de la Méthallothionéine chez les bactéries tolérantes aux métaux lourds

Les méthallothionéines (MTs) appartiennent à la famille des protéines intracellulaires qui sont capables de lier les métaux et qui régulent en particulier l'homéostasie des métaux essentiels comme le cuivre. Les MTs sont des protéines de faible poids moléculaire (< 7000 Da) qui ne contiennent pas d'acides aminés aromatiques ni d'histidine. Elles sont par contre très riches en cystéines (Cys). Grâce au groupement thiol de ces cystéines elles peuvent séquestrer des métaux comme le zinc, le cuivre, le cadmium ou le mercure (Coyle *et al.*, 2002).

Après les tests de tolérance aux métaux lourds étudiés, deux souches ont été choisies pour le dosage de la MT : *Staphylococcus lentus* et *Klebsiella pneumonia*. Ces souches résistent au cuivre et au cadmium jusqu'à 1600 µg/ml.

Le dosage de la MT a été réalisé selon la méthode spectrophotométrie de [Viarengo et al., \(1997\)](#).

Technique

- Récupérer les biomasses de la concentration 1600 µg/ml par une centrifugation à 10000 g pendant 20 min ;
- Peser la biomasse récupérée ; Mélanger la biomasse récupérée avec le Tampon d'homogénéisation ;
- Après sonication, l'homogénat est centrifugé à 30000 g pendant 20 min à 4 °C ; Les surnageants obtenus sont utilisés pour le dosage de la MT ;
- Prélever 1 ml de l'échantillon à doser ;
- Ajouter 1,05 ml d'éthanol absolu froid (- 20 °C) et 80 µl de chloroforme ;
- Mélanger au vortex pendant quelques secondes ;
- Centrifuger à 6000 g pendant 10 min à 4 °C ;
- Récupérer le surnageant et lui ajouter 3 volumes d'éthanol absolu froid (- 20 °C) ;
- Ajouter 1 mg d'ARN et 40 µl d'HCl à 37 % ;
- Mélanger au vortex pendant quelques secondes ;
- Conserver le mélange à - 20 °C pendant une heure ;
- Centrifuger à 6000 g pendant 10 min à 4 °C ;
- Éliminer le surnageant ;
- Laver le culot avec 3 ml de la solution de lavage ;
- Centrifuger à 6000 g pendant 10 min à 4 °C ;
- Éliminer le surnageant et faire sécher le culot ;
- Ajouter au culot 150 µl de la solution de NaCl et 150 µl de la solution d'HCl qui contient de l'EDTA ;
- Agiter au vortex pendant quelques secondes jusqu'à la remise en suspension complète du culot ;
- Ajouter 4,2 ml du réactif d'Ellman ;
- Centrifuger à 3000 g pendant 5 min ;
- Prélever le surnageant ;

- Mesurer l'absorbance à une longueur d'onde $\lambda = 412 \text{ nm}$;

Lecture

- La lecture se fait contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec du tampon d'homogénéisation remplaçant le surnageant;
- Elaborer une gamme étalon de standards sous forme de GSH, cette gamme comprend 6 concentrations (0; 14,4; 28,8; 43,2; 57,6 et 72 nmol/ml) ;
- Tracer la droite étalon : Absorbance = f (concentration en GSH) ;
- À partir des résultats obtenus sur la gamme étalon, chacun des échantillons est alors déduit ;
- La quantité en MT est exprimée en fonction de la quantité de la biomasse (nmol/mg de biomasse bactérienne).

La composition et la préparation des tampons et des réactifs sont représentées en annexe III.

Chapitre III :

Résultats et discussion

I. Purification des bactéries étudiées :

Les résultats des examens macroscopiques, microscopiques, les enzymes respiratoires et les caractères biochimiques obtenus par la galerie API ont confirmé la pureté de toutes les souches bactériennes étudiées (Tableau 8).

Tableau 8: Identification des souches bactériennes étudiées

Souche bactérienne	Aspect macroscopique/ Aspect microscopique	Enzymes respiratoires	Type de l'API	Code de l'API	Degré de similitude (%)
E1	-Colonies moyennes, rouges, bombées, crémeuses, à contour régulier; Bacille à Gram (-).	Cat (+) OX (-) NR (+)	API 20E	5044572	95
E2	-Colonies moyennes, incolores, à contour régulier; Bacille à Gram (-).			5214773	100
E3	-Colonies noires et à contour régulier; Bacille à Gram (-).			0476021	99,8
E4	-Colonies rouges, bombées, à contour régulier; Bacille à Gram (-).			5346573	100
E5	-Colonies blanchâtres, bombées, crémeuses, à contour régulier; Bacille à Gram (-).			0044140	98,7
S1	-Colonies moyennes, jaunes, à contour régulier; Cocci à Gram (+).	Cat (+) OX (-) NR (+)	API Staph	6736153	98,9
S2	-Colonies moyennes, roses, crémeuses, à contour régulier; Cocci à Gram (+).			6212152	98,99
S3	-Colonies moyennes, roses, crémeuses, à contour régulier; Cocci à Gram (+).			6733650	100
S4	-Colonies blanchâtres, crémeuses, à contour régulier, Cocci à Gram (+).			6536041	99,89
S5	-Colonies moyennes, roses, crémeuses, à contour régulier; Cocci à Gram (+).			6736452	100

Cat : catalase, OX : oxydase, NR : nitrate réductase, (+) : positif, (-) : négatif.

II. Antibiorésistance des bactéries étudiées

II.1. Entérobactéries

Toutes les souches des entérobactéries testées sont résistantes au moins à trois antibiotiques.

100 % des souches sont résistantes à l'amoxicilline, au céfixime et au chloramphénicol ; un taux de résistance important est également enregistré pour la pipéracilline et à l'azithromycine (80 %). Aucune résistance n'a été détectée à la gentamicine (Fig. 5).

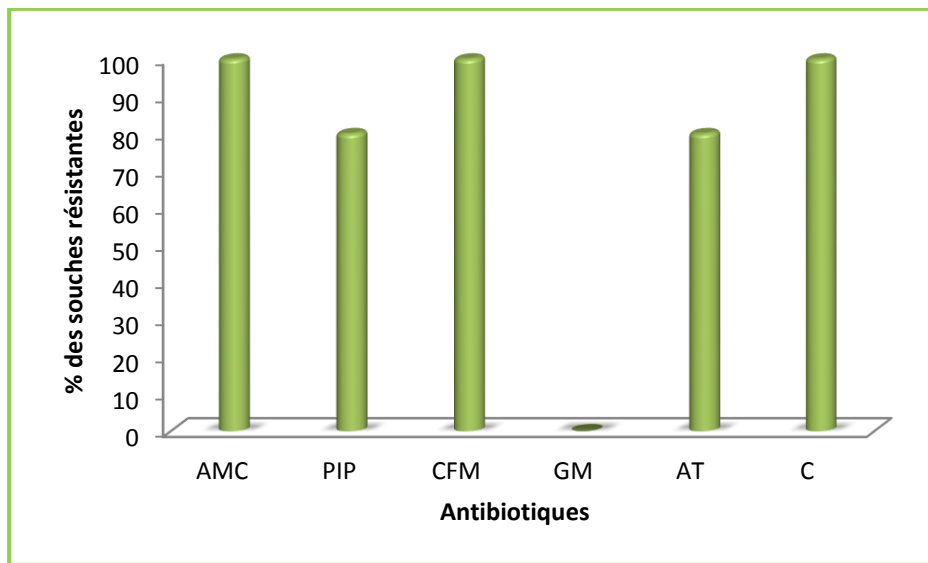


Figure 5: Résistance aux antibiotiques d'entérobactéries étudiées.

AMC : amoxicilline ; PIP : pipéracilline ; CFM : céfixime ;
GM : gentamicine ; AT : Azithromycine ; C : chloramphénicol.

Deux profils antibiotypiques différents sont observés chez les entérobactéries étudiées avec une dominance de l'antibiotype à 5 antibiotiques AMC/PIP/CFM/AT/C (Tableau 9).

Seule l'espèce *E.coli* présente une résistance à 3 antibiotiques. En revanche, les espèces *Proteus vulgaris*, *Serratia odorifera*, *Klebsiella pneumoniae* et *Shigella* spp. résistent à 5 antibiotiques.

Les résultats de l'antibiogramme des entérobactéries étudiées sont illustrés dans la planche 1.

Tableau 9 : Profils antibiotypiques associés aux entérobactéries étudiées.

Profils de résistance	Nombre d'antibiotiques	Nombre des souches	Souches résistantes
AMC/CFM/C	3	1	E1
AMC/PIP/CFM/AT/C	5	4	E2, E3, E4, E5

AMC : amoxiciline ; PIP : pipéracilline ; CFM : céfixime ;
GM : gentamicine ; AT : Azithromycine ; C : chloramphénicol.

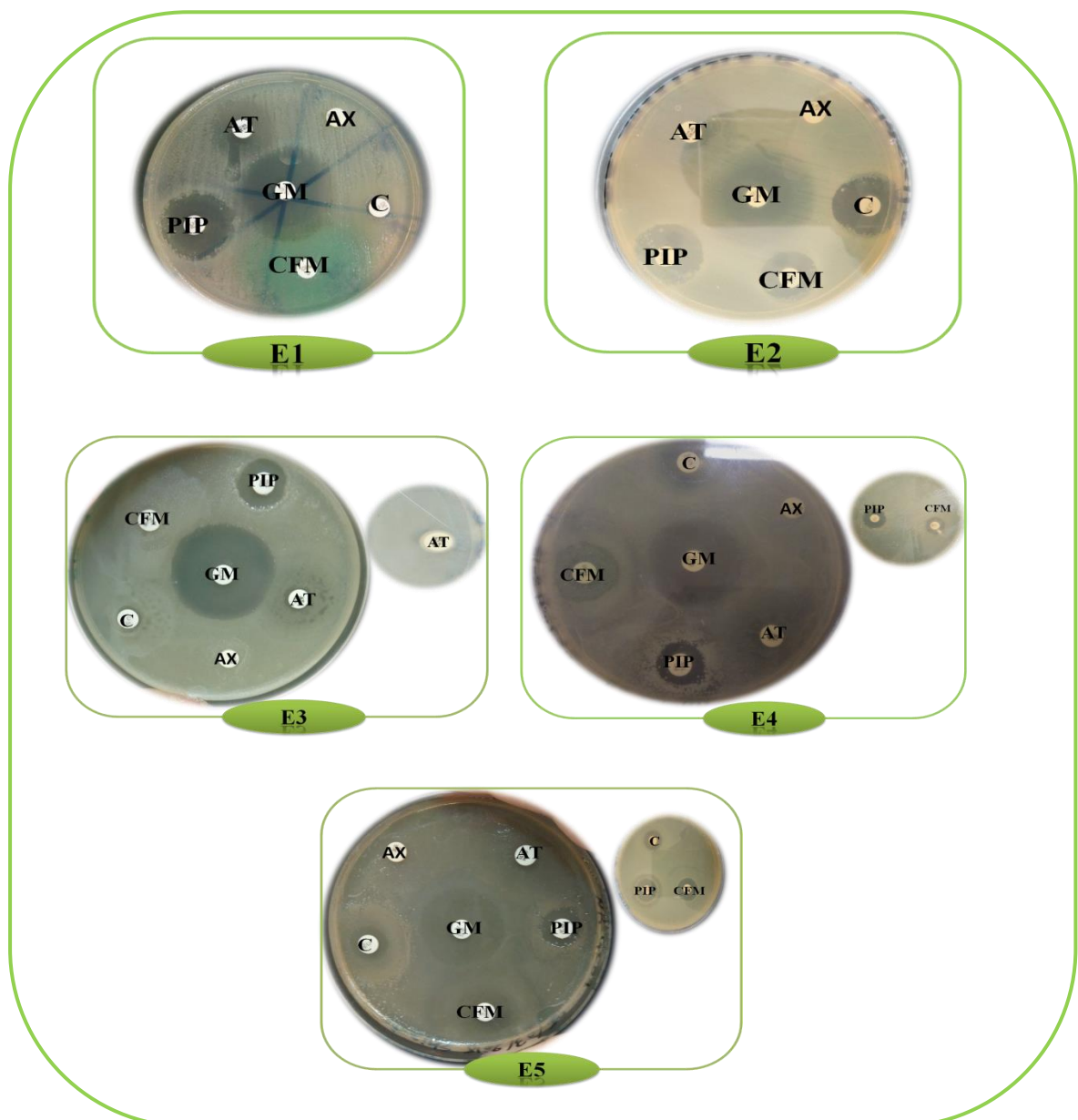


Planche 1: Antibiogramme des différentes souches d'entérobactéries étudiées.

Les résultats obtenus montrent que toutes les entérobactéries étudiées sont des bactéries multi-résistantes (BMR). Ces BMR représentent un problème de santé publique majoré par une utilisation abusive et non contrôlée des antibiotiques (Schwaber *et al.*, 2006). En Algérie, les entérobactéries (surtout productrices de β -lactamases à spectre élargi (EBLSE) sont les BMR majoritaires aussi bien en milieu hospitalier qu'en milieu aquatique (Chabani, 2004 ; Touati, 2006 ; Touati *et al.*, 2006 ; Messai *et al.*, 2008 ; Benamaouche *et al.*, 2009 ; Benslimani, 2009 ; Belmonte *et al.*, 2010).

La présence de souches multi-résistantes dans les eaux de surface est décrite dans plusieurs études (Toroglu *et al.*, 2005; Zahid *et al.*, 2009 ; Masters *et al.*, 2011). Les réacteurs biologiques contribueraient à l'émergence des BMR dans les écosystèmes aquatiques sont les eaux usées (Wright, 2010), les animaux d'élevage (Mesa *et al.*, 2006), les effluents d'élevage (Gyles, 2007) et même les animaux de compagnie (Dahmen *et al.*, 2013).

La résistance des entérobactéries étudiées aux β -lactamines (amoxicilline, pipéracilline et céfixime) pourrait s'expliquer d'une part, par des résistances naturelles chez certaines espèces (*Klebsiella pneumoniae* résiste naturellement à la PIP, *Proteus vulgaris* résiste naturellement à l'AMC) (CA-SFM, 2016), et par des résistances acquises suite au large usage de ces antibiotiques d'autre part (Courvalin *et al.*, 2006). La résistance aux B-lactamines est associée à plusieurs mécanismes, dont la production de pénicillinases, la production de céphalosporinases AmpC, mais le plus important étant la production de B-lactamases à spectre étendu (BLSE) (David *et al.*, 2008). L'implication des systèmes d'efflux dans la résistance aux β -lactamines a été aussi clairement identifiée dans plusieurs études en particulier chez *K. pneumoniae* (Bialek *et al.*, 2010 ; Bialek *et al.*, 2011).

Nos résultats montrent qu'aucune souche ne présente une résistance aux aminosides (gentamicine). Ces antibiotiques sont le plus souvent actif vis-à-vis aux entérobactéries (Courvalin *et al.*, 2006).

La résistance de toutes les entérobactéries étudiées (à l'exception d'*E. coli*) à l'azithromycine pourrait s'expliquer par deux mécanismes de résistances observées chez ces bactéries : la réduction de la perméabilité membranaire et l'hyper-mutation (déficience dans la réparation de l'ADN) (Courvalin *et al.*, 2006).

Le chloramphénicol est un antibiotique à large spectre utilisé en médecine humaine. En Europe, il est interdit d'utilisation à cause de ses résidus qui sont réputés être cancérigènes et provoquer des troubles génétiques (Faure, 2009). Nos résultats montrent des taux importants de résistance (100 %) à cet antibiotique chez les entérobactéries ce qui peut constituer un risque réel pour la santé.

II.2. Staphylocoques

L'antibiogramme des staphylocoques montre une résistance totale à la pénicilline, à l'érythromycine, au co-trimoxazole, à la vancomycine et au nitrofurane (100%). Cependant, aucune résistance n'est détectée à la gentamicine (Fig. 6).

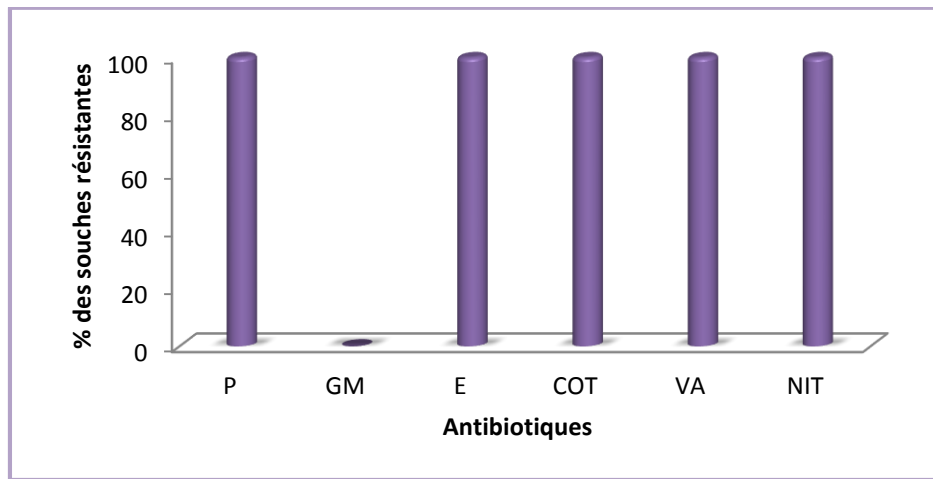


Figure 6 : Résistance aux antibiotiques des staphylocoques étudiés.

P : pénicilline ; GM : gentamicine ; E : érythromycine;
COT : co-trimoxazole ; VA : vancomycine ; NIT : nitrofurane.

Le tableau 10 montre que toutes les souches étudiées présentent des résistances à 5 antibiotiques.

Tableau 10 : Profils antibiotypiques associés aux staphylocoques étudiés.

Profils de résistance	Nombre d'antibiotiques	Nombre des souches	Souches résistantes
P/E/COT/VA/NIT	5	5	S1, S2, S3, S4, S5

P : pénicilline ; GM : gentamicine ; E : érythromycine;
COT : co-trimoxazole ; VA : vancomycine ; NIT : nitrofurane.

Les résultats de l'antibiogramme des staphylocoques étudiés sont illustrés dans la planche 2.

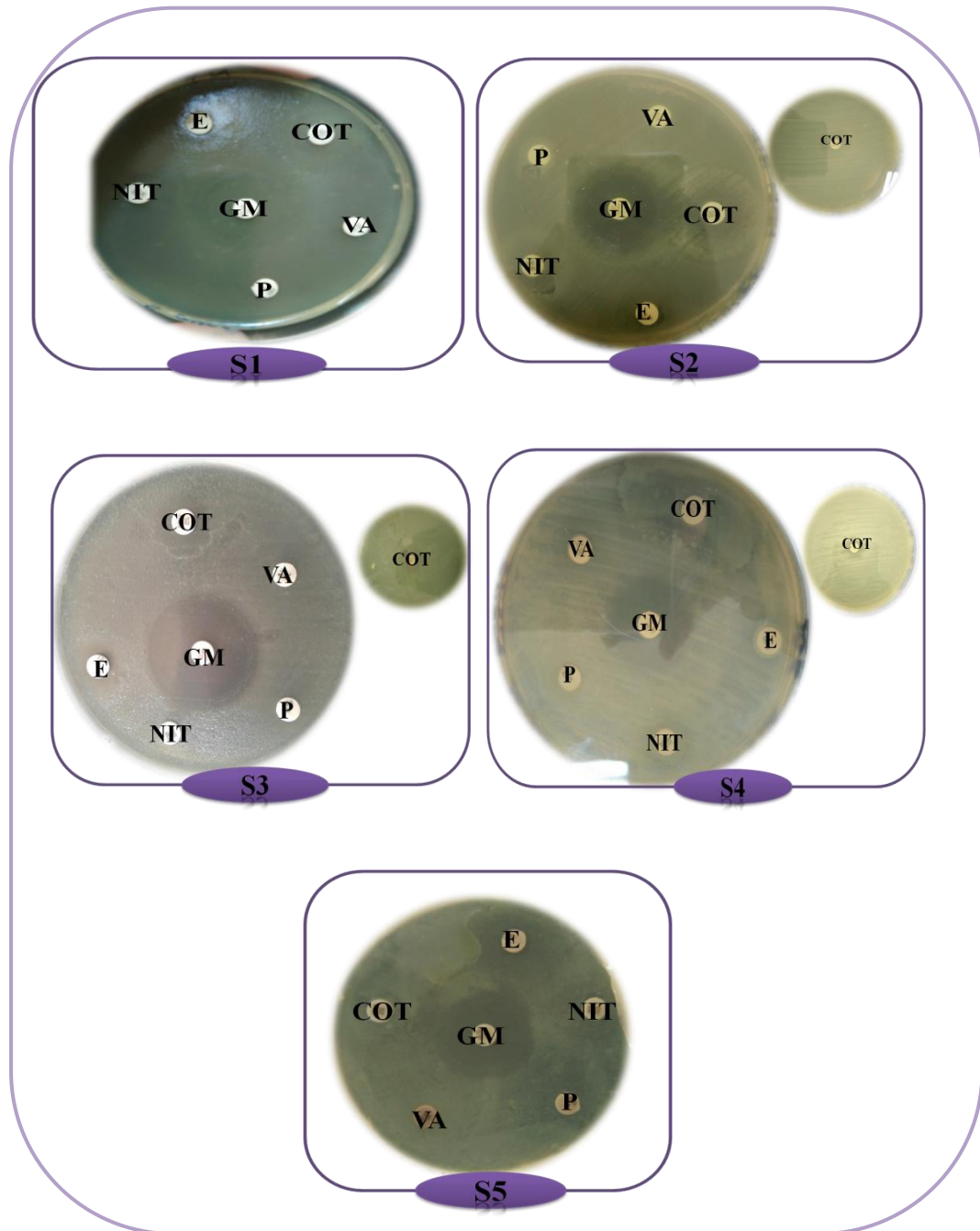


Planche 2: Antibiogramme des différentes souches de staphylocoques étudiées.

La présente étude montre que toutes les souches de staphylocoques sont des BMR. De même, des études réalisées par [Faria et al. \(2009\)](#) et [Harakeh et al. \(2006\)](#) rapportent que les souches de staphylocoques isolées des eaux usées, des eaux de mer et des eaux potables sont multi- résistantes.

Deux mécanismes expliquent la résistance des staphylocoques aux β -lactamines : la production de β -lactamases (Pénicillinase vis-à-vis de la pénicilline G) et la modification de cible. Pratiquement toutes les souches de *S. aureus* étaient sensibles à la pénicilline G, mais en 1944, la première preuve de résistance de *S. aureus* à la pénicilline avait déjà paru. Aujourd'hui presque toutes les souches de *S. aureus* sont résistantes aux pénicillines naturelles ([Courvalin et al., 2006](#)).

Selon la littérature, la résistance des espèces de *Staphylococcus* étudiées à l'erythromycine est due à deux mécanismes : la modification de la cible de cet antibiotique qui est le mécanisme le plus répandu ([Quincampoix et Mainardi, 2001](#)) et le mécanisme d'efflux actif ([Leclercq, 2002](#)).

La résistance des souches de staphylococques principalement *Staphylococcus aureus* à la co-trimoxazole est due à une modification qualitative des séquences nucléotidiques des gènes codés pour la cible du sulfamide et du triméthoprim ([Courvalin et al., 2006](#)).

Les glycopeptides (vancomycine) sont utilisés en alternative aux bêta-lactamines dans le traitement des infections à staphylocoques ce qui pourrait expliquer la résistance totale (100 %) des souches étudiées. Le mécanisme de résistance à la vancomycine est lié à un épaississement de la paroi bactérienne qui piège les glycopeptides dans les couches superficielles en les empêchant d'atteindre la membrane cytoplasmique ([Avril et fauchère, 2002](#)). Nos résultats se concorde avec ceux rapportés par [Noble et al. \(1992\)](#), [Aouati \(2009\)](#) et [Rebiahi et al. \(2012\)](#) qui ont confirmés la résistance des souches de staphylocoques à la vancomycine.

La résistance croissante des bactéries aux antibiotiques couramment utilisés tels que les fluoroquinolones et le co-trimoxazole a renforcé l'intérêt porté au nitrofurane ([Garau, 2008](#)), donc l'utilisation massive de cet antibiotique peut expliquer l'apparition de certaines

bactéries résistantes. **Phuong et al. (2005)** ont montré la résistance de 65% des bactéries isolées des eaux de surfaces (parmi les quelles des staphylocoques) au nitrofurane.

La sensibilité des staphylocoques étudiés à la gentamicine montre que cet antibiotique garde une excellente activité et reste très actifs sur les staphylocoques ; La gentamicine agisse par perturbation de la synthèse protéique au niveau des ribosomes bactériens (**Freney et al., 2000**).

III. Tolérance aux métaux lourds

III.1. Entérobactéries

L'effet du cuivre et du cadmium sur les bactéries étudiées a été déterminé par mesure des diamètres des zones d'inhibition (mm) (Tableau 11).

Les résultats obtenus montrent que le cuivre et le cadmium n'ont pas un effet sur la croissance des entérobactéries qu'à partir de la concentration 800 µg/ml. La zone d'inhibition la plus importante est enregistrée avec la souche de référence *E. coli* K12 aussi bien vis-à-vis du cuivre que le cadmium.

Tableau 11 : Effet du cuivre et du cadmium sur les souches d'entérobactéries.

Métal	Bactérie	Zone d'inhibition (moyenne ± ecartype)							
		12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	400 µg/ml	800 µg/ml	1600 µg/ml
Cuivre	K12	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	6,85 ± 0,25	6,42 ± 0,89
	E1	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	2,85 ± 0,52	4,15 ± 1,85
	E2	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	0,25 ± 0,2	0,28 ± 0,25
	E3	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	4,66 ± 0,4	4,25 ± 0,91
	E4	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	3,92 ± 0,42	4,65 ± 0,6
	E5	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	2,9 ± 0,18	4,65 ± 0,65
Cadmium	K12	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	5,25 ± 1,73	2,58 ± 1,52
	E1	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	4,85 ± 0,52	4,25 ± 1,00
	E2	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	0,78 ± 0,5	0,83 ± 0,52
	E3	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	2,82 ± 0,25	3,65 ± 0,52
	E4	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	2,91 ± 1,17	6,38 ± 1,02
	E5	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	2,75 ± 1,32	4,75 ± 1,32

K12 : *Escherichia Coli* K12 ATCC 10798.

Le calcul du taux de tolérance aux métaux permet de visualiser leur effet sur la croissance des entérobactéries (Fig. 7 et 8).

Toutes les souches des entérobactéries tolèrent à 100 % les concentrations allant de 12,5 à 400 µg/ml de métal (cuivre et cadmium). En ce qui concerne les concentrations 800 et 1600 µg/ml, c'est l'espèce *Klebsiella pneumoniae* (E2) qui présente le taux de tolérance le plus élevé (plus de 99 % vis-à-vis du cuivre et plus de 98 % vis-à-vis du cadmium).

Des taux de tolérance importants sont enregistrés pour les autres souches avec des valeurs comprises entre 82 et 90,1 % et entre 82,86 et 97,87 % vis-à-vis du cuivre et du cadmium respectivement.

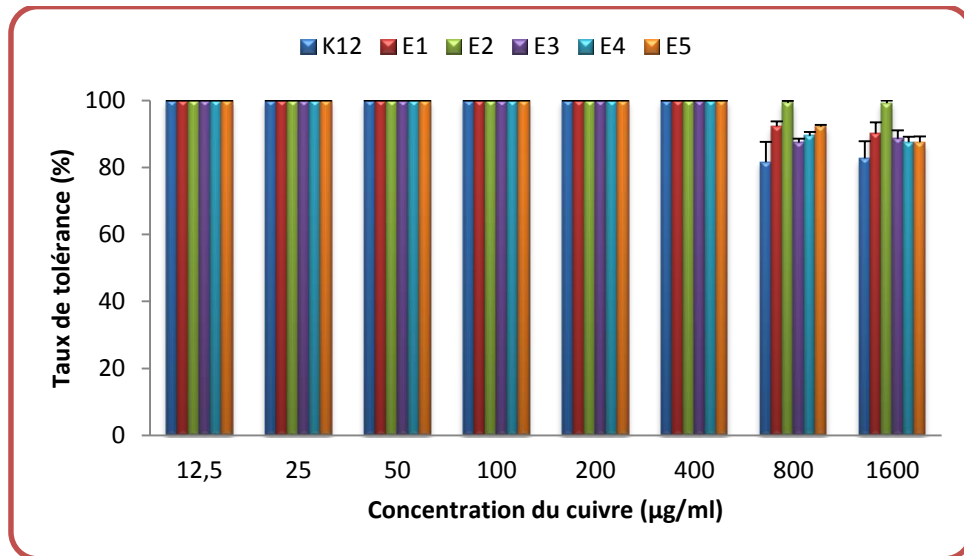


Figure 7: Taux de tolérance des entérobactéries vis-à-vis du cuivre.
K12 : *Escherichia Coli* K12 ATCC 10798.

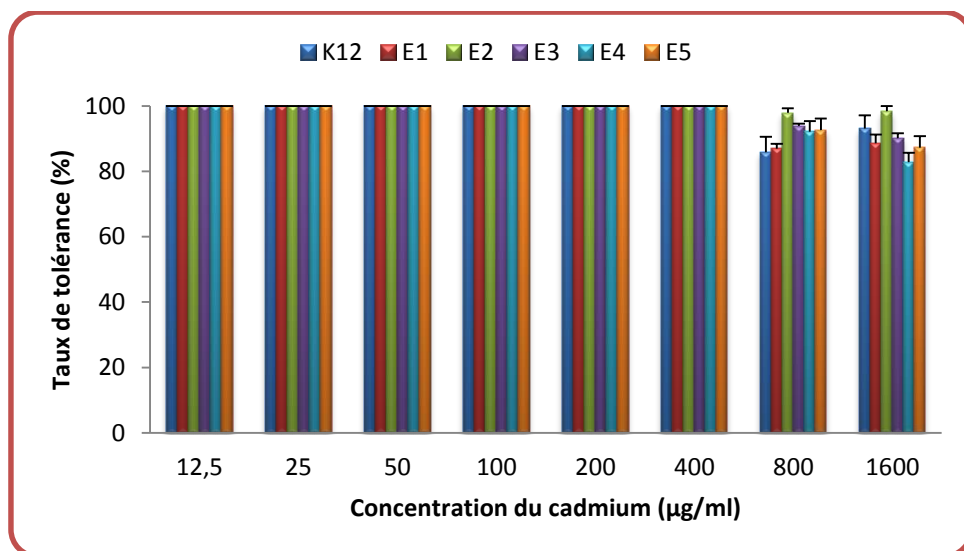


Figure 8: Taux de tolérance des entérobactéries vis-à-vis du cadmium.
K12 : *Escherichia Coli* K12 ATCC 10798

III.2. Staphylocoques

Les résultats représentés dans le tableau 12 montrent que presque la totalité des staphylocoques étudiés sont résistants aux deux métaux de la concentration 12,5 jusqu'à 400 µg/ml. L'espèce *Staphylococcus aureus* (S1) semble être la plus sensible au cuivre et au cadmium avec une zone d'inhibition de l'ordre de $0,08 \pm 0,14$ et $8,25 \pm 0,2$ mm vis-à-vis des concentrations 400 µg/ml de cuivre et 800 µg/ml de cadmium respectivement.

Tableau 12 : Effet du cuivre et du cadmium sur les souches de staphylocoques.

Métal	Bactérie	Zone d'inhibition (moyenne ± écartype)							
		12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	400 µg/ml	800 µg/ml	1600 µg/ml
Cuivre	S. ATCC	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	9,49 ± 0,69	12,25 ± 1,00
	S1	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	0,08 ± 0,14	8,31 ± 0,41	11,03 ± 1,34
	S2	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	3,6 ± 0,61	5,61 ± 0,4
	S3	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	0,73 ± 0,5	0,19 ± 0,12
	S4	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	3,31 ± 0,9	3,98 ± 1,1
	S5	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	2,3 ± 0,37	3,18 ± 0,9
Cadmium	S. ATCC	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	7,98 ± 0,64	11,41 ± 0,29
	S1	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	8,25 ± 0,2	12,25 ± 0,2
	S2	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	3,78 ± 0,5	3,2 ± 0,18
	S3	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	0,5 ± 0,68	0,55 ± 0,6
	S4	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	4,51 ± 0,64	3,11 ± 0,4
	S5	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00	5,08 ± 0,38	6,28 ± 0,9

S. ATCC : *Staphylococcus aureus* ATCC 25932.

Les figures 9 et 10 représentent les taux de tolérance des staphylocoques vis-à-vis des différentes concentrations testées du cuivre et du cadmium respectivement.

Excepté un seul cas, des taux de tolérances égales à 100 % sont enregistrés vis-à-vis des concentrations allant de 12,5 à 400 µg/ml de métal (cuivre et cadmium).

La souche *Staphylococcus lentus* (S3) est l'espèce la plus tolérante aux concentrations 800 et 1600 µg/ml du cuivre ainsi que du cadmium.

Un pourcentage de 66,67 % des staphylocoques étudiés présentent un taux de tolérance supérieur à 80 % vis-à-vis de la concentration la plus élevée des métaux testés (1600 µg/ml).

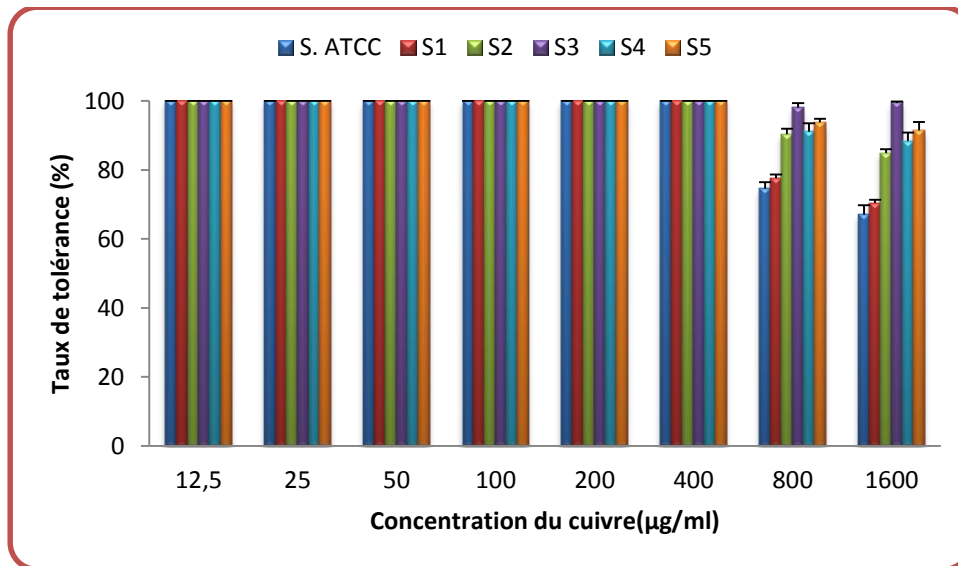


Figure 9: Taux de tolérance des staphylocoques vis-à-vis du cuivre.
S. ATCC : *Staphylococcus aureus* ATCC 25932.

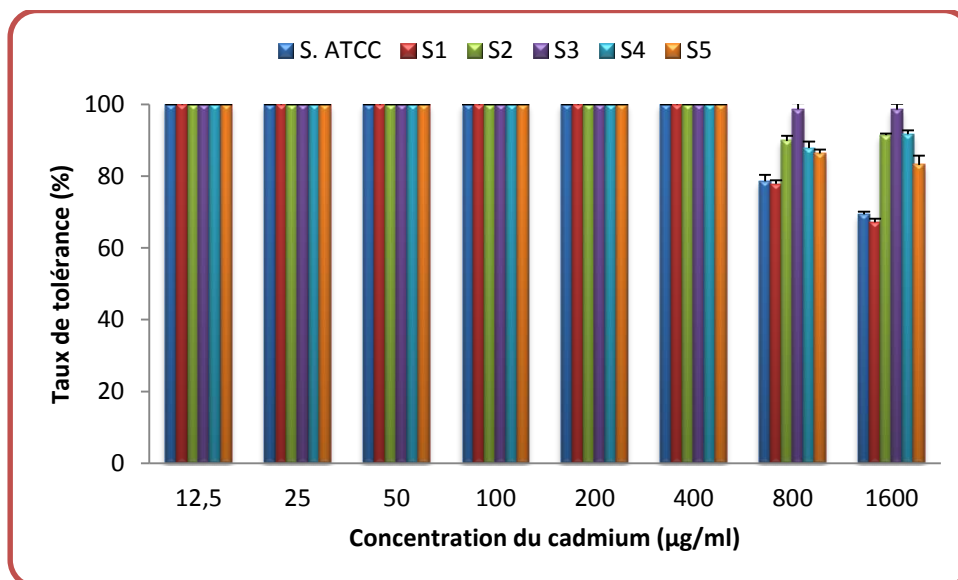


Figure 10: Taux de tolérance des staphylocoques vis-à-vis du cadmium.
S. ATCC : *Staphylococcus aureus* ATCC 25932.

- la planche 3 illustre la tolérance de certaines souches étudiées vis-à-vis du cuivre et du cadmium.

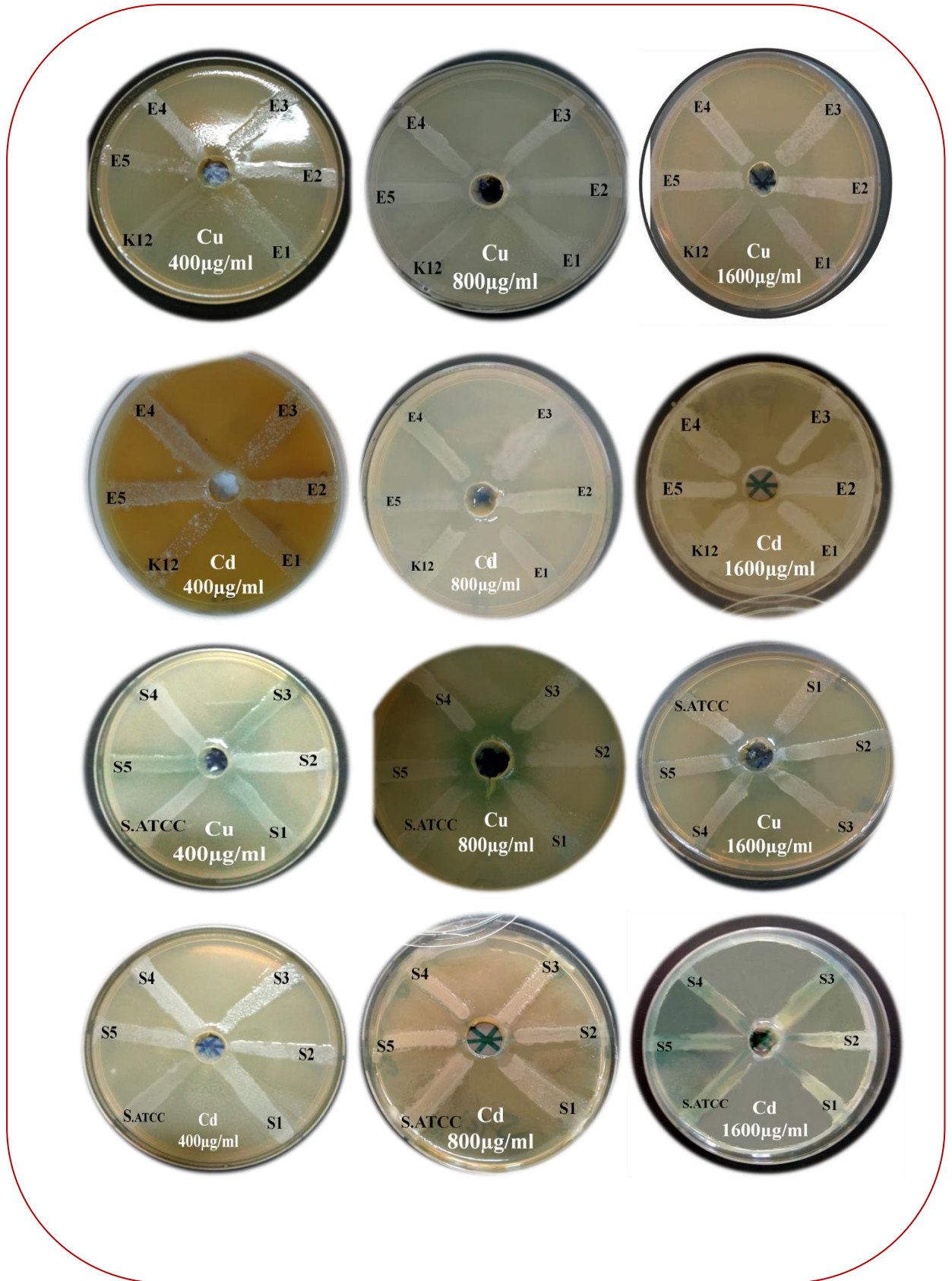


Planche 3: Tolérance des entérobactéries et des staphylocoques au cuivre et au cadmium

Les résultats de l'étude de la tolérance des bactéries isolées des eaux de surface de la région de Guelma aux métaux lourds montrent que les entérobactéries et les staphylocoques présentent des taux de tolérance très importants vis-à-vis du cuivre ainsi que du cadmium, notant que les espèces *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus lentus* sont les plus tolérantes. Plusieurs études ont montré la résistance des entérobactéries au cuivre et au cadmium, **Karbasizaed et al. (2003)** ont isolés des souches d'entérobactéries nosocomiales et de fèces humains qui sont tolérantes à 200 µg/ml de cadmium. **Piotrowska-Segeta et al. (2005)** ont isolés, à partir de sols pollués par des métaux lourds, deux souches d'entérobactéries, *Serratia fonticola* et *Providencia stuartii*, ces souches présentèrent une tolérance à une concentration de 0,1mM de cadmium. **Espirito Santo et al. (2008)** ont montré la tolérance d'*E.coli* au cuivre. En revanche, **Noyce et Keevil (2006)** ont montré une grande tolérance de l'effet antibactérien du cuivre des staphylocoques résistants à la méthicilline.

La forte capacité bactérienne de résistance au cuivre pourrait s'expliquer par le fait que la plupart des micro-organismes ont dû s'adapter à la présence du cuivre dans leur habitat en se dotant de mécanismes de tolérance au cuivre et en modifiant les structures de protéines déjà existantes (**Castresana, Lubben et al., 1994**). Aujourd'hui, plus d'une trentaine de protéines à cuivre est répertoriée. Ces protéines peuvent être impliquées dans de nombreux processus biologiques tels que la respiration où le cuivre fait parti du site actif des oxydases terminales lieu de la réduction de l'oxygène en eau.

Dans la cellule, le cuivre est soit séquestré par du glutathion (**Ascone, Longo et al., 1993**) soit par des chaperonnes (CopZ, Atx1,..) soit associé à des enzymes en tant que cofacteur pour assurer des multiples fonctions indispensables à la survie des cellules (**Kim, Nevitt et al., 2008**). En cas d'excès de cuivre dans la cellule, un système d'efflux se met en place pour extraire le cuivre dans le milieu extracellulaire. La majorité des études concernant l'homéostasie du cuivre a été réalisée chez *E. coli*. Le système d'homéostasie du cuivre d'*E. coli* est considéré comme un modèle de référence *E. coli* possède deux systèmes d'efflux (*Cue* et *Cus*) qui assurent l'efflux du cuivre en excès vers le milieu extracellulaire lui conférant ainsi une forte tolérance au cuivre. Les opérons qui codent pour les systèmes *Cue* et *Cus* sont portés par le chromosome. Ces deux opérons sont régulés différemment en réponse à la concentration intracellulaire du cuivre et à la

disponibilité en oxygène (Rensing and Grass 2003 ; Outten et al., 2001). Ces systèmes d'efflux mettent en jeu principalement l'ATPase CopA pour transporter le cuivre du périplasma vers le milieu extracellulaire est notamment identifié chez *Salmonella typhimurium* (Espariz et al., 2007 ; Raimunda et al., 2010).

En ce qui concerne la tolérance au cadmium, elle est aussi basée principalement sur des systèmes d'efflux (Silver et Phung, 2005). Chez les bactéries à Gram négatif le Cd semble être détoxifié par des systèmes P-type ATPase comme l'ATPase CadA découverte chez *S. aureus* (Silver et Phung, 2005), ou bien par le complexe *czc* découvert chez *Cupriavidus metallidurans*, qui est principalement un transporteur de Zn (Bruins et al., 2000; Nies, 2003). Rensing et al. (1997) ont montré que la protéine ZntA d'*E. coli*, qui fait partie de la famille des ATPases, contribue à la tolérance de la bactérie au cadmium et au plomb, ainsi qu'au maintien de concentrations intracellulaires à des niveaux non toxiques.

Certaines bactéries résistantes au Cd présentaient un mécanisme de séquestration intracellulaire. Ce mécanisme est lié à des gènes codant pour des plasmides de résistance. Bien que les mécanismes précis d'accumulation intracellulaire ne soient pas élucidés, il semblerait que la production de métallothionéines soit une explication probable (Roane et al., 2001).

IV. Dosage de la Métallothionéine

Les concentrations de la métallothionéine chez *Klebsiella pneumoniae* (E2) et *Staphylococcus lentus* (S3) sont représentées dans le tableau 13.

Nous notons que les concentrations les plus élevées sont enregistrées chez la souche E2. Il est également intéressant de souligner que l'expression de MT est plus élevée après une contamination par le cadmium que par le cuivre.

Tableau 13: Dosage de la métallothionéine chez des bactéries tolérantes aux métaux lourds.

	Sans métal	1600 µg/ml Cu	1600 µg/ml Cd
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (E2)	0	0,61 ± 0,05	0,71 ± 0,1
<i>Staphylococcus lentus</i> (S3)	0	0,24 ± 0,03	0,39 ± 0,02

Cu : cuivre ; Cd : cadmium

Les résultats obtenus ont montré la capacité de séquestration des métaux par les MTs puisque les bactéries exposées à une contamination aux métaux lourds expriment des concentrations moyennes comprises entre 0,24 et 0,71 nmol de MT / g de biomasse bactérienne, par contre, l'absence des métaux n'a pas permis de trouver des MTs. De nombreux travaux montrent l'induction de MTs après une contamination par les métaux lourds (cadmium, cuivre, zinc...) ([Butler et Roesijadi, 2001](#); [Chowdhury et al., 2005](#); [Silvestre et al., 2005](#)). La sur-expression des gènes de MTs induite par la contamination métallique suggère un effet de protection de ces protéines vis-à-vis des métaux lourds. Les thionéines (formes T) représentant environ 50% de la concentration en MT totales dans de nombreux tissus ([Yang et al., 2001](#)), de ce fait, quand des tissus sont contaminés par des métaux, les T représentent un pouvoir tampon, évitant ainsi l'augmentation de la concentration en métaux libres dans les cellules.

Chez *Klebsiella pneumoniae*, la MT est surexprimée par rapport à l'espèce *Staphylococcus lentus*, ceci pourrait s'expliquer par le fait que le niveau d'induction de la MT est influencé d'une part par la dose et la cytotoxicité du métal ([Butler et Roesijadi, 2001](#)) et de la sensibilité du micro-organisme d'autre part, rappelant que la structure et la composition de la paroi des micro-organismes jouent un rôle important dans la résistance aux agents antimicrobiens.

La quantité de MT déterminée après une contamination par le cadmium est dans tous les cas supérieure à la détermination faite après contamination par le cuivre.

Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le cadmium est plus toxique par rapport au cuivre, donc il a le plus fort pouvoir d'induction de formation des MTs (Butler et Roesijadi, 2001). Odawara *et al.* (1995) ont montré que chez *E. coli*, la MT fixe bien le cadmium mais pas le zinc ni le cuivre. En effet, une augmentation de la concentration en MTs dans des bactéries contaminées au cadmium a déjà été décrite et expliquée par une stabilisation des MTs par liaison du cadmium (des complexes MT-Cd qui seraient non toxiques) (Kille *et al.*, 1990).

V. Interaction entre l'antibio-résistance et la tolérance aux métaux lourds

D'après les résultats représentés dans les parties précédentes (§ II et § III), nous avons noté que les souches d'entérobactéries et de staphylocoques multi-résistantes (E2 à E5 et S1 à S5) présentent des taux de tolérance importants vis-à-vis des métaux testés.

Diverses études ont pu mettre en évidence dans des sols, des sédiments ou des milieux aquatiques contaminés aux métaux, une plus forte proportion de bactéries résistantes dont les mécanismes cellulaires responsables de ces résistances font intervenir des systèmes semblables à ceux impliqués dans la résistance aux antibiotiques tels que des systèmes d'efflux, de séquestration, de réduction de la perméabilité membranaire ou de modification de spéciation de l'élément (Roane and Kellogg, 1996 ; Nies, 1999 ; Nazaret *et al.*, 2003).

Baker-Austin *et al.* (2006) ont montré qu'il existe une corrélation positive entre la présence de métaux dans un écosystème et la résistance à la fois à ces métaux et aux antibiotiques chez les bactéries ; Cette co-sélection peut se faire selon trois mécanismes :

- La co-résistance est observée lorsque les gènes de résistance aux métaux et aux antibiotiques sont positionnés sur le même élément génétique mobile (plasmide, transposon) ;
- La résistance croisée est observée lorsque le même mécanisme de résistance permet à la fois la résistance à un métal et à un antibiotique. C'est notamment le cas de certaines pompes à efflux ;
- La co-régulation, quant à elle, s'observe lorsque la régulation d'un mécanisme, induite par la présence d'un métal ou d'un antibiotique, régule également un autre mécanisme, permettant ainsi les deux résistances.

Calomiris et al. (1994) a étudié sur des souches bactériennes à Gram négatif et à Gram positif, l'association entre la résistance aux métaux (Hg^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Sn^{2+} Al^{3+}) et la résistance aux antibiotiques en utilisant la technique des répliques. Ils ont observé que la multi-tolérance au Cu^{2+} , au Pb^{2+} , et au Zn^{2+} est associée de manière, significative aux germes multi-résistants aux antibiotiques mais pas aux germes sensibles. De même, la résistance à la kanamycine est liée à la tolérance au Cu^{2+} , au Pb^{2+} , et au Zn^{2+} . Des souches de *Staphylococcus pasteurii* isolées du système de distribution d'eau se sont révélées simultanément résistantes au Hg et aux β -lactamines (**Faria et al., 2009**).

Conclusion et Perspectives

Conclusion

Les résultats de l'étude de l'antibiorésistance et de la tolérance aux métaux lourds (cuivre et cadmium) de certaines souches d'entérobactéries et de staphylocoques provenant des eaux de surface de la région de Guelma, permettent de tirer les conclusions suivantes :

- La majorité des entérobactéries étudiées sont multi-antibio-résistantes ;
- Toutes les souches de staphylocoques sont des BMR ;
- Une tolérance totale de toutes les bactéries étudiées aux concentrations allant de 12,5 à 400 µg/ml de métal (cuivre / cadmium) ;
- Les espèces *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus lentus* sont les plus tolérantes aux concentrations 800 et 1600 µg/ml de métal (cuivre / cadmium) ;
- Les espèces *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus lentus* expriment des concentrations de métallothéionine après une exposition à une concentration de 1600 µg/ml de métal (cuivre / cadmium) ;
- L'expression de la métallothéionine est plus élevée après une contamination par le cadmium que par le cuivre ;
- Une forte probabilité de l'existence d'une interaction entre l'antibiorésistance et la tolérance aux métaux testés.

Perspectives

Il serait important de :

- Tester un nombre important des souches bactériennes ;
- Utiliser des méthodes génotypiques afin de maîtriser la diffusion de la multirésistance aux antibiotiques ;
- Rechercher les gènes de tolérance aux métaux afin de les comparer avec ceux de la résistance aux antibiotiques;
- Doser des biomarqueurs comme la GSH et la GST qui peuvent être impliqués dans la tolérance aux métaux.

Références Bibliographiques

A

- [Adriano D. \(2001\)](#). Trace éléments in terres trial environnements: Biochemistry, Bioavailability and risks of metals-Springer-Verlag, New York.
- [Akinbowale O., Peng H., Grant P., Barton M. \(2007\)](#).Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 30: 77-82.
- [Almeida I., Gusmao L., Figueira P. \(2006\)](#). Heavy metal toxicity in *Rhizobium leguminosarum biovarviciae* isolated from soils subjected to different sources of heavy-metal contamination: Effects on protein expression. *Appl. Soil Ecol.* 33,286-293
- [Andujar P., Bensefa L., Descatha A. \(2010\)](#). Intoxication aiguë et chronique au cadmium. *La Revue de médecine interne* 31 (2010) 107–115.
- [Arris S. \(2008\)](#) « Etude expérimentale de l'élimination des polluants organiques et inorganiques par adsorption sous produits de céréale » Thèse de doctorat de l'université de Constantine- Algérie.
- [Ascone I., Longo A., Dexpert H., Ciriolo MR., Rotilio G., Desideri A. \(1993\)](#) An X-ray absorption study of the reconstitution process of bovine Cu, Zn superoxide dismutase by Cu(I)-glutathione complex. *FEBS Lett* 322:165–167
- [Aouati H. \(2009\)](#). Isolement des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicillines : étude de leur sensibilité aux autres familles d'antibiotiques. Mémoire de Magistère, Université Mentouri Costantine. p: 8,9.
- [Avril J., Fauchère J. \(2002\)](#). Bactériologie générale et médicale. Ed Ellipses, p: 249-250.

B

- [Babic M., Hujer A., Bonomo R. \(2006\)](#). What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist Updat.* 9(3):142-56.
- [Badot P., Crini G. \(2007\)](#).Traitement et épuration des eaux industrielles polluées: Procédés membranaires, bioadsorption et oxydation chimique, Presses Univ.Franche-Comté, 356 pages
- [Baize D. \(1997\)](#). Teneurs totales en élément traces métalliques dans les sols (France). Références et stratégies d'interprétation. INRA. Editions, 410 p.
- [Baker-Austin C., Wright M., Stepanauskas R., McArthur J. \(2006\)](#). Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol* 14: 176-182.
- [Baghdadi M. \(2012\)](#). Pollution de l'environnement marin et santé humaine : Mesure, évaluation et Impact des contaminants chimiques et biologiques dans les produits de

la pêche au niveau du littoral marocain. Thèse. Tanger. Université Abdelmalek Essaadi faculté des sciences et techniques – tanger. P184.

Barrial, K., Scotet, J. (2006). Classification raisonnée des β -lactamases chez les bacilles Gram négatif. Perspective d'évolution. *Tigaud de bactériologie*. 3-10

Belmonte O., Drouet D., Alba J., Moiton M-P., Kuli B., Lugagne-Delpon N., Mourlan C. et Jaffar-Bandjee M-C . (2010). Evolution de la résistance des entérobactéries aux antibiotiques sur l'île de la Réunion : émergence des beta-lactamases spectre élargi. *Pathologie Biologie*. 58 :18-24

Benamrouche N., Hadjila L., Rahal K. (2009). Mécanismes de résistance aux antibiotiques des bactéries résistantes en Algérie. *Revue bibliographique*. In : Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 11^{eme} rapport d'évaluation (Janvier à Décembre 2009). 198P.

Benguedda W. (2012). Contribution à l'étude de la bioaccumulation métallique dans les sédiments et différents maillons de la chaîne trophique du littoral extrême ouest algérien. Thèse de doctorat. *Ecologie et environnement*. p. 149.

Benslimani A. (2009). MRSA, entérobactéries BLSE, *Acinetobacter* spp. et *P. aeruginosa* résistants à l'imipénème, à la ceftazidime et à la ciprofloxacine. In : Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 11^{eme} rapport d'évaluation (Janvier à Décembre 2009). 198P.

Benedetto M. (1997). Méthodes spectrométriques d'analyse et de caractérisation, métaux lourds, Axe " Génie des Procédés", centre SPIN, Ecole des Mines de Saint-Etienne.

Bobba S., Ponnaluri V., Mukherji M., Gutheil W. (2011). Microtiter Plate-Based Assay for Inhibitors of Penicillin-Binding Protein 2a from Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 55(6):27837.

Bialek W., Mora T., Walczak AM. & Callan C. (2010), Maximum entropy models for antibody diversity. *Proc Nat'l Acad Sci (USA)* 107, 5405–5410.

Bialek-Davenet S., Marcon E., Leflon-Guibout V., Lavigne J., Bert F., Moreau R., and Nicolas-Chanoine M. (2011). In vitro selection of ram R and sox R mutants overexpressing.

Bismith R., Leclercq R. (2000). *Staphylococcus aureus* et antibiotiques. In: Précis de bactériologie clinique. ESKA, p: 611-918.

Braymer J., Giedroc P. (2014). Recent developments in copper and zinc homeostasis in bacterial pathogens. *Curr Opin Chem Biol* 19, 59–66.

Bryskier S., 1999. Antibiotique. Agent antibactériens et antifongiques. Ellipses ; Paris.p : 54-436-445.

Butler R., Roesijadi G. (2001). Disruption of metallothionein expression with antisense oligonucleotides abolishes protection against cadmium cytotoxicity in molluscan hemocytes. *Toxicol. Sci.* 59, 101-107.

C

CA-SFM, comite de l'antibiogramme de la societe française de microbiologie. (2016). Recommandation .p: 12-15, 18,23-25, 27,39-48,56-63.

Calomiris J., Armstrong L., Seidler J. (1994). Association of metal tolerance with multiple antibiotic resistance of bacteria isolated from drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:1238-1242.

Castresana J. and Saraste M. (1995). Evolution of energetic metabolism: the respiration-early hypothesis. *Trends Biochem Sci* 20:443-448.

Chalus D., Schwarz E. (2001) . "Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance." *Vet Res.* 32(3-4): 201-225.

Chbani F., Zoughaghi L., Taouragt K., Aarab H. et Benaouda A. (2004). *Acinetobacter Baumannii* : épidémiologie et résistance aux antibiotiques. *Prat.*14(2):23-4.

Chiffolleau JF., Claisse D., Cossa D., Ficht A., Gonzalez L., Guyot T., Michel P., Miramand P., Oger C., Petit F. (2001). La contamination métallique. Programme Seine Aval , fascicule n°8, Editions Ifremer, Plouzané (France). ISBN 2-84433-028-2, 39 p.

Chiffolleau JF. La contamination métallique. Ifremer. 2004 ; 39.

Chopra I., O'Neill A., Miller K.(2003). The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resist Updates.* 6: 137-145.

Chowdhury M., Baldisserotto B., Wood C. (2005). Tissue-specific cadmium and metallothionein levels in rainbow trout chronically acclimated to waterborne or dietary cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 381-390.

Claire F. (2012). Rôle des *Pseudomonas* fluorescents dans la biodisponibilité des métaux contaminant les minéraux du sol : application à la phytoremédiation. Thèse de Doctorat. Université de Strasbourg.

Clemens S. (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 2/2,475-486.

Courvalin P., Leclercq R., Bingen E. (2006).Antibiogramme 2eme édition. ESKA, p: 117, 141, 163, 279, 299, 341,349.

Coyle P., Philcox J., Carey C. (2002). Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci.* **59**, 627-47.

D

Dahmen S., Haenni M., Châtre P. (2013). Characterization of blaCTXM IncFII plasmids and clones of *Escherichia coli* from pets in France. *J.Antimicrob. Chemother.* **68**: 797-801.

Davies J. (1997). Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. *207*:15-27.

Delarras C. (2000). Microbiologie de l'environnement avec législation :travaux pratiques. Gaetan moriu éditeur.Paris.P :231.

Delarras C. (2007). Microbiologie pratique pour laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Tec & DOC, p: 289- 476

Delarras C. (2014). Pratique en Microbiologie de laboratoire, recherche des bactéries et de levures-moisissures. TEC & DOC. Lavoisier, p : 260.

Dameron C., Howe P. (1998). Copper Environmental Health criteria n°200. Geneva, World Health Organization.

Duchaufour P. (1997). Pédologie : sol, végétation et environnement. Abrégés de Pédologie. Masson 5e édition, 291 p.

E

Espariz M., Checa K., Audero E., Pontel B. & Soncini C.(2007). Dissecting the Salmonella response to copper. *Microbiology* **153**, 2989–2997.

Espirito S., Taudte N., Nies D., Grass G. (2008). « Contribution of Copper Ion Resistance to Survival of *Escherichia coli* on Metallic Copper Surfaces». *Appl. Environ Microbiol.* **3**: 977-986.

F

Fagan M., Jr M. (1994) P-type ATPases of eukaryotes and bacteria: Sequence analyses and construction of phylogenetic trees. *J. Mol. Evol.* **38**: 57–99.

Faure S. (2009). Transfert d'un gène de résistance aux β -lactamines blaCTX-M-9 entre *Salmonella* et les entérobactéries de la flore intestinale humaine : impact d'une antibiothérapie ». Thèse de Doctorat. Université de Rennes 1. 167 p

Faria C., Vaz-Moreira I., Serapicos E., Nunes O., Manaia C. (2009). Antibiotic resistance in coagulase negative staphylococci isolated from wastewater and drinking water. *Science of the Total Environment.* **407**: 3876–3882.

Flandrois C., Courco L., Lemeland J., Ramuc M., Sirot J., Souny J. (1997). Bacteriologie médicale. Presses Universitaire de Lyon. ISBN 2 7297 05678.

Francois P., Pittet D., Bento M., Pepey B., Vaudaux P., Lew D., Schrenzel J. (2003). Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from sterile or nonsterile clinical samples by a new molecular assay. *J Clin Microbiol* 41, 254–260.

Freney J., Reanaud F., Hansen W., Bollet C. (2000). Précis de bactériologie clinique. ESKA, p: 557,583, 597,611

G

Gadd M. (1992). “Metals and microorganisms: A problem definition”. *FEMS Microb. Lett.* **100**:197-204.

Garau J. (2008). Other antimicrobials of interest in the era of extended-spectrum β -lactamases: fosfomycin, nitrofurantoin and tigecycline », *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 14, n° Supplément s1, janvier, p. 198-202

Garin A., Simon, O. (2004) Cadmium 109 et environnement, fiche radionucléide. Direction de l'environnement et de l'intervention, service d'étude du comportement des radionucléides dans les écosystèmes. IRSN.

Gaudy C. (2005). Antibiotiques : pharmacologie et thérapeutiques. Elsevier, p: 269.

Giller K., Witter E., McGrath S. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol. Biochem.*, **30**:1389–1414.

Georgopapadakou N. (1993). Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to β -lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 2045-205

Gogny M., Puty D., Pellerin L. (2001) Classification des principes actifs. L'arsenal thérapeutique vétérinaire, Edition le point vétérinaire. P 165-168.

Guettaf A. (2015). « Caractérisation hydro chimique et évaluation des indicateurs de pollution dans l'environnement: cas de l'oued Seybouse et ses effluents dans le sous bassin de Guelma (Nord-est Algérien) ». Thèse de doctorat, Faculté des sciences de la nature et de la vie ; science biologique. Guelma. 149p.

Guillemot D., Leclercq R. (2005). Impact de l'exposition des populations sur le risque bactérienne. *Med Mal Infect.* ; 35(Suppl. 3) ; 212-20.

Guinote B., Matos R., Freire P., Arraiano M. (2011). BolA affects cell growth, and binds to the promoters of penicillin-binding proteins 5 and 6 and regulates their expression. *J Microbiol Biotechnol.*; 21(3):243-51.

Guiraud J. (2003). Microbiologie alimentaire. Dunod, p : 185-265.

Gyles L. (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J. Anim. Sci.* 85:45-62.

H

Habi S., Daba H. (2009). Plasmid incidence, antibiotic and metal resistance among enterobacteriaceae isolated from algerian streams. *Pak. J. Biol. Sci.*, 12: 1474-1482.

Hall L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53, 1-11.

Hassen A., Saidi N., Cherif M., Boudabous A. (1998). Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresource Technology* 64 : 7-15

Harakeh S., Yassine H., Hajjar S., El-Fadel M. (2006). Isolates of *Staphylococcus aureus* and *saprophyticus* resistant to antimicrobials isolated from the Lebanese aquatic environment. *Marine Pollution Bulletin.* 52: 912–919.

Hengstler G., Bolm-Audorff U., Faldum A., Janssen K., Reifenrath M., Gotte W., Jung D., Mayer-Popken O., Fuchs J., Gebhard S., Bienfait G., Schlink, K., Dietrich C., Faust D., Epe B., Oesch F. (2003). Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. *Carcinogenesis* 24, 63-73.

Hermann T. (2005). Drugs targeting the ribosome. *Corrent opinion in Microbiology.* 15,355-366.

Huynh T. (2009). Impacts des métaux lourds sur l'interaction plante/ ver de terre/microflore tellurique. Thèse de doctorat en écologie microbienne. Université Paris Est.

I

Ineris (2004). Fiche de données toxicologiques et environnementales de le Sulfate de cuivre / CAS 7758-98-7, 55p.

J

Jacques B. (2010) ; « Les métaux toxiques », édition Holosys, Paris –France.

Jean N., guy L. (2001) : Microbiologie technique1; 3ème édition , Pp (193,194,198).

Joachim S., Morin A., Thybaud E. (2009). Effet du cuivre sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques. *L'actualité chimique* - n° 334. p : 55-58.

Joffin J., Leyral. (2006). Microbiologie technique, Tome1 dictionnaire des techniques 4ème Ed. scérén. Crdp. aquiraine, p: 22-23.

K

Kachur, A.V., Koch, C., Biaglow, J.E. (1998) Mechanism of copper-catalyzed oxidation of glutathione. *Free Radic. Res.*28: 259–269.

Karbasizaed V., Badami N., Emtiazi G. (2003). Antimicrobial, heavy metal resistance and plasmid profile of coliforms isolated from nosocomial infections in a hospital in Isfahan, Iran. *Af. J. of Biotechn.* 2: 379-383.

Kille P., Stephens P., Cryer A., Kay J. (1990). The expression of a synthetic rainbow trout metallothionein gene in *E. coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1048, 178-186.

Kim B., Nevitt T., et al. (2008). "Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation." *Nat Chem Biol* 4(3): 176-85.

Kühlbrandt W. (2004). Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 282–295.

Kumar A., Schweizer H. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Delivery Rev.* 57: 1486-1513.

L

Larpent J. (1997). Microbiologie des eaux d'alimentaire : Technique de labo. Edition Tec et Doc, p: 294-300.

Leclercq R. (2002). Résistance des staphylocoques aux antibiotiques. *Ann. Fr. Anesth. Réanim.* 21: 375-383.

Ledin M. (2000). Accumulation of metals by microorganisms — processes and importance for soil systems. *Earth-Science Reviews* 51, 1-31

Lennette, E., Balows A., Hausler, W., Shadomy, H. (1985). Manual of Clinical Microbiology. Fourth Edition: American Society for Microbiology. Washington, D. ZC.

Lepape A. (2007). Impact de la résistance bactérienne sur les prescriptions d'antibiotiques. Congrès national d'anesthésie et de réanimation 2007. Conférences d'actualisation. P : 227-237.

Liao V., Dong J., Freedman, J. (2002). Molecular characterization of a novel, cadmium-inducible gene from the nematode *Caenorhabditis elegans*. A new gene that contributes to the resistance to cadmium toxicity. *J. Biol Chem.* 277: 42049-42059.

Livermore D. (2003). "Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology, and Impact," An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 36(1): 11–23.

Loué A. (1993). Oligo-éléments en agriculture- Ed. Nathan (Ed), 45-177p.
Mckenzie A. B, 1997-Isotope evidence of the relative retention and mobility of lead, and radiocesium in Scottish ombrophic peats- *Sci Total Environ*, 203(2), 115-127p.

M

Malik A. (2004). Metal bioremediation through growing cells, *Environment International* 30, 261-278.

- Masters N., Wiegand A., Ahmed W., Katouli M. (2011). *Escherichia coli* virulence genes profile of surface waters as an indicator of water quality. *Water Research*. 45:6321-6333.
- Martinez L., Fajardo A., Garmendia L., Hernandez A., Linares J., Martinez-Solano L Sanchez M. (2009). A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 33: 44-65.
- Mayer K., Opal S., Medeiros A.(2000). Mechanisms of antibiotic resistance.
- Maynaud G. (2012) . Adaptation aux métaux lourds de populations de rhizobia impliquées dans la phytostabilisation de déblais miniers : Identification des mécanismes d'adaptation au Zn et au Cd, et structuration des populations de rhizobia adaptées aux sites miniers. Thèse de Doctorat. Université de Montpellier II.
- Mc Ardle H.(1995). The metabolism of copper during pregnancy. *A review.Food Chem*.54: 79-84.
- Mesa R., Blanc V., Blanch A. (2006). Extended-spectrum betalactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J Antimicrob Chemother*. 58: 21–25.
- Messai Y., Iabadene H., Benhassine T., Alouache S., Tazir M., Gautier V., Arlet G. Bakour R. (2008). Prevalence and characterization of extended-spectrum b lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). *Pathologie Biologie* .56: 319–325.
- Mevius D., Rutter M., Hart C., Imberechts H., Kempf G., Lafont P., Luthman J., Moreno A., Pantosti A., Pohl P., Willadsen M . (1999). Antibiotic resistance in the European Union associated with therapeutic use of veterinary medicines.Report and qualitative risk assessment by the committee for veterinary medicinal products, Edition Le point vétérinaire.p1-57.
- Miquel G., et al. (2001).Rapport d'information n° 261. Office parlementaire d'évaluation des choix scient. Tech., 344 p.
- Mohan E., Ziska L., Schlesinger H., Thomas B., Sicher C., George K., Clark J. (2006). Biomass and toxicity responses of poison ivy (*Toxicodendron radicans*) to elevated atmospheric CO₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 103:9086–9089.
- Monchy S. (2007). Organisation et expression des gènes de résistance aux métaux lourds chez *Cupriavidus metallidurans* CH34.thèse de doctorat,Pp (13.33).

N

- Naseem R., Tahir S. (2001). Removal of Pb (II) from aqueous/acidic solutions by using bentonite as an adsorbent. *Water Res*. 35 (16), p 3982–3986.

Nazaret S., Brothier E., Ranjard L. (2003). Shifts in diversity and microscale distribution of the adapted bacterial phenotypes due to Hg(II) spiking in soil. *Microb Ecol* 45: 259-269.

Nies H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* 51: 730-750.

Nies et Silver. (1995). Ion efflux système involved in bacterial metal resistance J. Ind Microbiol 14 Pp (186.199).

Nikaido H. (2000). "Crossing the envelope: how cephalosporins reach their targets." *Clin Microbiol Infect.* 6: 22-26.

Nilius M., Ma Z. (2002). Ketolides : the future of microlides ? *Current Opinion in pharmacology.* 2,1-8

Noble W., Virani Z., Cree R. (1992). Co-transfer of vancomycin and other resistant genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett.* 93: 95–98.

Noyce O., Michels H., Keevil W. (2006). Potential use of copper surfaces to reduce survival of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the healthcare environment. *J Hosp Infect.* 4: 289-297.

O

Odawara F., Kurasaki M., Suzuki-Kurasaki M. (1995). Expression of human metallothionein-2 in *Escherichia coli*: cadmium tolerance of transformed cells. *J. Biochem. Tokyo* 118, 1131-1137.

Ogawara H. (1981). Antibiotic resistance in pathogenic and producing bacteria with special reference to betalactam antibiotic. *Microbiol. Rev.* 45 (4), 591-619.

Outten F., Outten C., Hale J., O'Halloran T. (2000) Transcriptional activation of an *Escherichia coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, CueR. *J Biol Chem* 275:31024–31029

Oxoby M. (2002) Etudes sur la synthèse totale des antibiotiques naturels de la famille des angucyclinones, Thèse de docteur en chimie organique de l'université Bordeaux 1, école doctorale des sciences chimiques. p3-12.

P

Paul H., Roy. (1997). Dissémination de la résistance aux antibiotiques: le génie génétique à l'oeuvre chez les bactéries. *Médecine/ science* n° 8-9, Vol. 13

Perron K., Caille O., Rossier C., Van Delden C., Dumas JL., Kohler T. (2004). CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 279: 8761-8768.

Phuong T., Oanh T. H., Dung T., Sinh X. (2005). Bacterial resistance to antimicrobials use in shrimps and fish farms in the Mekong Delta, Viet Nam. In *Proceedings of the international workshop on antibiotic resistance in Asian aquaculture environments*. Chiang May, Thaïlande. ISBN: 88-901344-3-7.

Piotrowska-Seget Z., Cycoń J., Kozdró J. (2005). Metal-tolerant Bacteria Occurring in Heavily Polluted Soil and Mine Spoil. *Appl Soil Ecol*. 28: 237–246.

Poole K. (2004). "Resistance to beta-lactam antibiotics." *Cell Mol Life Sci*. 61(17): 2200-2223.

Prescott M., Harley P., Klein A. (1999). *Microbiologie*. De Boeck. Université, 981p.

Prescott M., Harley P., Klein A. (2010). *Microbiologie 2ème édition*. De Boeck, p: 800- 845.

Q

Quincampoix J., Mainardi J. (2001). Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. *Réanimation*. 10 : 267-275.

R

Rahal K. (2013). *Les antibiotiques*. Office des publications universitaires. Alger. P : 15,47,79,80,101,133 .

Raimunda D., Gonzalez-Guerrero M. (2010). "The transport mechanism of bacterial Cu(+)-ATPases: distinct efflux rates adapted to different function." *Biometals*.

Rensing C., Grass G. (2003) *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol Rev* 27:197–213

Roane T., Kellogg T. (1996). Characterization of bacterial communities in heavy metal contaminated soils. *Can J Microbiol* 42: 593-603.

Robin F., Gibold L., Bonnet R. (2012). Résistances naturelles et acquises aux β -lactamines chez les entérobactéries : comment les identifier en pratique quotidienne. *Revue Francophone des laboratoires*. 445 : 47-58.

Rodier J. (1996). *L'analyse de l'eau ; eaux naturelles, Eaux Résiduelles, Eaux de Mer*. 8ième édition. Paris. P :1383.

Rodier J., Bazin C., Broutin P., Chambon P., Champsaur H., Rodi L. (2005). *L'analyse de l'eau: Eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer*. Chimie, physico-chimie, microbiologie, biologie, interprétation des résultats. Ed. Dunod. 8ème Edition. Paris.

Rebiahi A. (2012). Caractérisation des souches de *Staphylococcus aureus* et étude de leur antibiorésistance au niveau du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen. Thèse de Doctorat, Université de Tlemcen. p:1-32.

S

Sam (1997). Dossier les métaux lourds. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne. P12

Seck R. (2005). Résistance des souches d'Escherichia coli et de Klebsiella pneumoniae isolées d'infections urinaires. Thèse de doctorat. Université Cheikh Anta Diop de Dakar. P : 22-27

Schwaber J., Navon-Venezia S., Kaye S., Ben-Ami R., Schwartz D. & Carmeli Y. (2006). Clinical and economic impact of bacteremia with extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agent. Chemother.* 50(4):1257-1262.

Silver S. (1996). Bacterial Resistances to Toxic Metal Ions - a review. *Gene* 179:9-19.

Silver S., Phung T. (2005). Bacterial heavy metal resistances: new surprises. *Ann. Rev. Microbiol.*, 50, 753-789.

Silvestre F., Duchene C., Trausch G., Devos P. (2005). Tissue-specific cadmium accumulation and metallothionein-like protein levels during acclimation process in the Chinese crab *Eriocheir sinensis*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 140, 39-45.

Soussou S. (2013). Adaptation de la symbiose Fabacées-rhizobium aux sites miniers : Absorption du zinc par *Anthyllis vulneraria* et analyse de la diversité des bactéries symbiotiques de *Hedysarum coronarium*. Thèse de Doctorat. Université de Sousse.

Soussy J. (2007). Résistance bactérienne aux antibiotiques. Monographies en urologie. P: 21-46.

T

Toroglu S., Dincer S., Korkmaz H. (2005). Antibiotic resistance in gram negative bacteria isolated from Aksu River in Turkey. *Annals of Microbiology.* 55: 229-233.

Tortora J., Funk R. Case C. (2003). Introduction à la microbiologie. Eddition Renouveau Pédagogique Inc. 945 p.

Touati A. (2006). Caractérisation des phénotypes de résistances des entérobactéries aux β -lactamines isolées en milieu hospitalier : cas de deux hôpitaux de la wilaya de Bejaia. Thèse de doctorat. Université A/Mira de Bejaia. 91P.

Touati A., Benallaoua S., Forte D., Madoux J., Brasme L., De Champs C. (2006). First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 beta -lactamases among clinical isolates of enterobacteriaceae in Bejaia, Algeria. *Antimicrobial Agents Journal.* 27: 397-402.

U

Ünalı CoralN., Kormaz H., Arıkan B., Coral G. (2005). Plasmid mediated heavy metal resistances in *Enterobacter* spp. isolated from Sofulu Landfill, in Adana, Turkey. *An. Microbiol.* 55:175-179.

V

Vanassche F., Clijsters H. (1990). Effects of metals on enzyme-activity in plants. *Plant Cell Environ.* 13, 195-206.

Viarengo A., Ponzano E., Dondero F., Fabbri R. (1997). A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application in Mediterranean and Atlantic molluscs. *Mar. Environ. Res.*, 44 : 69 - 84.

W

Walsh C. (2003). Antibiotics: actions, origins, resistance. American Society for Microbiology press. Washington

Wright G. (2010). Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Curr. Opin. Microbiol.* 13: 589–594.

Y

Yala M., Mered A., Mohamedi D., Ouar M. (2001). Classification et modes d'action des antibiotiques. *Méd.Maghreb.* 91:13-14.

Yang Y., Maret W., Vallee L. (2001). Differential fluorescence labeling of cysteinyl clusters uncovers high tissue levels of thionein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 5556-5559

Z

Zahid H., Mahal Z., Chowdhury, M. (2009). Prevalence of multiple antibiotic resistant bacteria and chromosomal determinants in surface water of Bangladesh. *African Journal of Biotechnology.* 8: 148-154.

Zeba B. (2005). Overview of beta-lactamase incidence on bacterial drug resistance. *African journal of biotechnology*,4 (13),1559-1562.

Zhao W.,Byrne M., WangY., Krane M. (2000). Osteocyte And osteoblast apoptosis and excessive bone deposition accompany failure of collagenase cleavage of collagen. *JClia, Invest*,106,941-949.

Annexes

Annexe I

- **Composition des milieux de culture** (Guiraud, 2003 ; Rodier *et al.*, 2005 ; Delarras, 2014)

1. Gélose Hektoen (g/ litre d'eau distillée)

Protease peptone	12
Extrait de levure	3
Chlorure de sodium	5
Thiosulfate de sodium	5
Sels biliaries	9
Citrate de ferrique ammoniacale	1.5
Salicine	2
Saccharose	12
Lactose	2
Fuchsine acide	0.04
Bleu de brothynol	0.06
Agar agar	1.4
pH= 7.5	

2. Gélose SS, *Salmonella-Shigella* (g/ litre d'eau distillée)

Peptone	5
Extrait de viande	5
Lactose	10
Citrate de sodium	10
Citrate de fer (III)	1
Désoxycholate	8.5
Vert brillant	0.3
Rouge neutre	25
Na ₂ S ₂ O ₃	8.5
Agar-agar	15
pH = 7.2 / autoclavage à 120°C pendant 15 minutes.	

3. Chapman (g/ litre d'eau distillée)

Peptone trypsique de caséine	10
Extrait de viande	1
Chlorure de sodium	75
Mannitol	10
Rouge de phénol	0.025
Agar-agar	15
pH = 7.6 / autoclavage 20 min à 121°C.	

4. Gélose Mueller-Hinton (g/ litre d'eau distillée)

Infusion de viande de bœuf	3.0
Peptone de caséine	17.0
Amidon de maïs	1.5
Agar-agar	17.0
pH= 6.7/ autoclavage 15 min à 121°C.	

5. Bouillon Mueller-Hinton (g/ litre d'eau distillée)

Hydrolysât acide de caséine	17.5
Infusion de viande	2.0
Amidon soluble	1.5
Peptone	1.5
pH= 6.7/ autoclavage 15 min à 121°C.	

6. Bouillon Nutritif (g/ litre d'eau distillée)

Peptone	5.0
Extrait de viande	1.0
Extrait de levure	2.0
Chlorure de sodium	5.0
pH=7.4 ± 0.2 à 25 °C / autoclavage à 121° C pendant 15 min	

7. API Staph medium (g/ litre d'eau distillée)

Extrait de levure	0.5
Bactopeptone(origine bovine/porcine)	10.0
NaCl	5.0
Oligo-éléments	10.0
pH de 7 à 7.4 (ce milieu est disponible en ampoules de 6 ml)	

- Composition des réactifs et des colorants (Guiraud, 2003 ; Rodier *et al.*, 2005)**

1. Violet de Gentiane

Violet de gentiane	1g
Ethanol à 90%	1ml
Phénol	2g

Eau distillée	100ml
---------------	-------

2. Lugol

Iode	1g
Iodure de potassium	2g
Eau distillée	100ml

3. Fuchshine

Fuchshine basique	1g
Alcool éthylique	100ml
Phéno	15g
Eau distillée	100ml

4. Réactif TDA (pour la recherche de tryptophane désaminase)

Perchlorure de fer	3.4g
Eau distillée	100ml

5. Réactif Kovacs (pour la recherche de l'indole)

Paradiméthylaminobenzaldéhyde	5.0 g
Alcool isoamylique	75.0 ml
HCL 37%	25.0 ml

6. Réactif VPI (pour la recherche de l'acétoïne)

Hydroxyde de potassium	40g
Eau distillée	100ml

7. Réactif VP II (pour la recherche de l'acétoïne)

Alpha naphthol	6g
Ethanol	100ml

8. Réactif NIT I (pour la recherche du nitrate réductase)

Acide sulfamilique	0.8 g
Acide acétique 5N	100 ml

9. Réactif NIT II (pour la recherche du nitrate réductase)

Naphtylamine	0.5 g
Acide acétique 5N	100 ml

10. Réactif ZYM A

Tris-hydroxyméthyl-aminométhane	25 g
Acide chlorhydrique à 37 %	11 ml
Laurylsulfate Na	10 g
H ₂ O	100 ml

11. Réactif ZYM B

Fast Blue BB	0.35 g
2-méthoxy éthanol	100 ml

Annexe II

Tableau 14: Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 E (source : <http://www.biomerieux.com>).

Test	Groupements active	Réactions / Enzymes	Résultats	
			Negative	Positive
ONPG	Ortho-nitro-phényle-B-D-Galactopyranoside	Beta-galactosidase	Incolore	jaune
			Jaune	Rouge-Orangé
ADH	L-Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge-Orangé
LDC	L-Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Rouge-Orangé
ODC	L-Orthine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge-Orangé
[CIT]	TriSodium citrate	Utilisation de citrate	Vert	Bleu-vert/orange
H₂S	Thiosulfate de sodium	Production de H ₂ S	Incolore	Noir
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge-Orangé
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Jaune	Marron
IND	Tryptophane	Production d'indole	Incolore	Rose
[VP]	Pyruvate de sodium	Production d'acétoine	VP1+ VP2	
			Incolore	Rose/rouge
[GEL]	Gélatine (origine bovine)	Gélatinase	Pas de diffusion de pigment noir	Diffusion de pigment noir
GLU	Glucose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune/jaune-gris
MAN	D-Mannitol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
SOR	D-Sorbitol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
RHA	L-Rhamnose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
SAC	D-Saccharose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
MEL	D- Melibiose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
ARA	L-arabinose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
Réduction des nitrates (GLU tube)	Potassium nitrate	Production de NO ₂	NIT 1+NIT 2, 2-3 min	
			Jaune	Rouge
		Réduction au N ₂	Zn / 5 min	
			Orange-rouge	jaune
OF-O	glucose	Oxydation du glucose	vert	jaune
OF-F	glucose	Fermentation du glucose sous l'huile	vert	jaune

Tableau 16: Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api Staph (source : <http://www.biomerieux.com>).

Tests	Substrats	Caractère recherché	Résultats	
			Négative	Positive
0	Aucun	Témoin négatif	Rouge	-
GLU	D-glucose	Témoin négatif	Rouge	Jaune
FRU	D-fructose	Acidification à partir du carbohydrate		
MNE	D-mannose			
MAL	Maltose			
LAC	Lactose			
TRE	D-tréhalose			
MAN	D-mannitol			
XLT	Xylitol			
MEL	D-melibiose			
NIT	Nitrate de potassium		Réduction des nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 10 mn
			Incolore/Rose	Rouge
PAL	β -naphtyl. phosphate	Phosphatase alcaline	ZYM A + ZYM B / 10 mn	
			Jaune	Violet
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétyl méthyl-carbonyl	VP 1 + VP 2 / 10 mn	
			Incolore/rose	Violet/rose
RAF	Raffinose	Acidification à partir du carbohydrate	Rouge	Jaune
XYL	Xylose			
SAC	Saccharose			
MDG	α -méthyle-D-glucopyranoside			
NAG	N-acétyl-glucosamine			
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange/rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/violet

Tableau 17: Limites acceptables des diamètres d'inhibition (mm) obtenus par diffusion en gélose pour les souches de référence utilisées pour le contrôle de qualité (CA-SFM, 2016).

Antibiotiques	Charge du disque	<i>Escherichia coli</i> CIP 7624	<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 7625
Amoxicilline	20	22-23	-
Pipéracilline	30	21-27	-
Cefixime	5	23-27	-
Gentamicine	10	19-26	19-25
Azithromycine	-	-	-
Chloramphénicol	30	21-27	20-28
Pénicilline G	1Unité	-	12-18
Erythromycine	15	-	23-29
Co-trimoxazole	25	-	-
Vancomycine	30	-	-
Nitrofurane	100	-	17-23

Annexe III

- **Réactifs et Tampons de dosage de la métallothionéine (Viarengo *et al.*, 1997).**

Tampon d'homogénéisation**Composants**

- Saccharose.....0,5 M
- β -mercaptoéthanol.....0,01 %
- Tampon Tris-HCl (pH = 8,6).....20 mM :
 - Dissoudre 1,21 g du Tris dans 500 ml d'eau distillée.
 - Mélanger puis ajuster le pH à 8,6 avec quelques gouttes d'HCl.
 - Solution stable pendant plusieurs semaines à 4 °C.

Préparation

- Pour la préparation de 150 ml de tampon d'homogénéisation, dissoudre dans 150 ml du tampon Tris : 25,67 g de saccharose, 15 μ l de β -mercaptoéthanol
- Solution à préparer en quantité juste nécessaire à la série d'analyse.

1. Solution de lavage**Composants**

- Éthanol.....87 %
- Chloroforme.
- Tampon d'homogénéisation.

Préparation

- Pour la préparation de 100 ml de tampon de lavage, ajouter à 87 ml d'éthanol, 1 ml de chloroforme et 12 ml tampon d'homogénéisation.
- Conserver le flacon à - 20 °C.

Solution stable pendant plusieurs mois.

2. Solution de chlorure de sodium à 0,25 M**Composants**

- Chlorure de sodium (NaCl).

Préparation

- Dissoudre 1,46 g de NaCl dans 80 ml d'eau distillée.
- Mélanger, puis compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.

Solution stable durant plusieurs mois à 4 °C.

3. Solution d'acide chlorhydrique (1 N) contenant 4 mM d'EDTA

Composant

- Acide chlorhydrique (HCl)..... 37 %
- Acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA).....4 mM

Préparation

- Pour la préparation d'une solution d'HCl (1N), diluer 7,66 ml d'HCl dans 250 ml d'eau distillée.
- Dissoudre 0,292 g d'EDTA dans la solution HCl (1N), puis agiter au vortex pendant quelques secondes jusqu'à la dissolution complète de l'EDTA.
Solution à préparer en quantité juste nécessaire à la série d'analyse.

4. Réactif d'Ellman à 0,43 mM

Composants

- Chlorure de sodium (NaCl).....2 M
- Acide 5, 5'- dithiobis-2-nitrobenzoïque (DTNB).....0,43 mM
- Tampon phosphate (pH = 8).....0,2 M :
 - Dissoudre 27,21 g de KH_2PO_4 dans 1000 ml d'eau distillée (Solution A). Dissoudre 34,82 g de K_2HPO_4 dans 1000 ml d'eau distillée (Solution B). Ajuster le pH de la solution (B) à l'aide de la solution (A).
 - Solution stable pendant plusieurs semaines à 4 °C.

Préparation

- Pour la préparation de 100 ml du réactif d'Ellman, dissoudre dans 80 ml du tampon phosphate à 0,2 M (pH = 8); 11,65 g de NaCl et 17,04 mg de DTNB.
- Mélanger, puis compléter à 100 ml avec du tampon phosphate.
- Agiter au vortex pendant quelques secondes jusqu'à la dissolution complète du DTNB.
- Solution instable à préparer en quantité juste nécessaire à la série d'analyse.

Annexe IV Appareillage



Figure 11: Processeur Ultrason sonics (vibracell 75185)

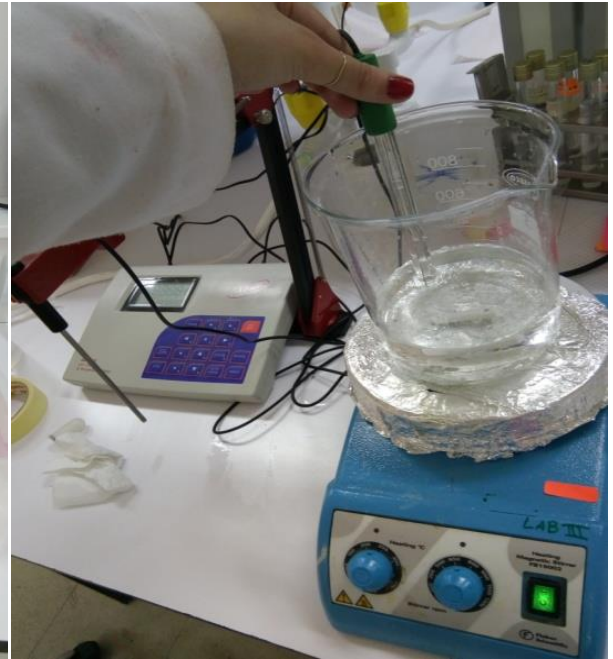


Figure 12 : pH-mètre (BENCH AD 1030)



Figure 13 : Étuve a agitation Edmund Buhler (GmbH 6445 1346)



Figure 14 : Centrifugeuse réfrigérée (SIGMA2-16KI)



Figure 15 :Spectrophotomètre
(Spectrum SP – UV 2005)



Figure 16 :balance de précision
(ABS 220-4)