REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou

Faculté Des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie - Microbiologie

THESE

En vue de l'obtention du Diplôme de Docteur en Sciences Biologiques
Option Microbiologie

Sujet

Caractérisation phénotypique et génotypique de la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds chez des souches d'*Escherichia coli* pathogènes aviaires

Présentée par

MEGUENNI Nacima

Devant le Jury :

Président :	MATI Abderahmane	Professeur	U.M.M.T.O.
Directeur de Thèse :	BAKOUR Rabah	Professeur	U.S.T.H.B. ALGER
Examinateur :	KECHA Mouloud	Professeur	Université Aberrahmane Mira de Béjaia
Examinateur :	RIBA Amar	Professeur	Université M'hamed Bougara de Boumerdès
Examinateur :	HOUALI Karim	Professeur	U.M.M.T.O.
Examinateur :	ACHOUR- BARCHICHE Nassima	MCA	U.M.M.T.O.

Remerciements

A Monsieur Le Professeur Bakour R. Directeur de Thèse,

Vous avez d'abord été notre si respecté et compétent enseignant en première post graduation, ensuite mon Directeur de Thèse de Magister. Il était inconcevable pour moi, d'entreprendre un travail de Doctorat sous une autre direction que la vôtre. Vous m'avez si souvent encouragé, éclairé et appris la rigueur, le sérieux et la passion du savoir. Je tiens, à la fin de ce parcours, à vous exprimer toute ma gratitude et mon profond respect pour votre aide, votre confiance et toutes vos valeurs humaines.

A Madame le Professeur Isabelle Kempf, directrice du Laboratoire de Ploufragan-Plouzané Unité Mycoplasmologie Bactériologie, ANSES,

Vous m'avez ouvert les portes de votre laboratoire. J'y ai effectué, sous votre supervision, toutes les manipulations de Biologie moléculaire qui ont abouti à une publication commune, élément clé de cette Thèse. Au-delà du fait que vous êtes indéniablement « une grande pointure de l'antibiorésistance chez l'animal », vous êtes pour moi, une admirable Grande Dame. Je ne peux que m'incliner et vous devoir une éternelle reconnaissance.

A Madame Leatitia Ledevandec, Ingénier au laboratoire de Ploufragan-Plouzané Unité Mycoplasmologie Bactériologie, ANSES,

Aucune technique de Biologie moléculaire n'a de secret pour vous. Votre savoir faire est légendaire au labo. Vous m'avez initié avec patience et abnégation à quelques unes de ces techniques. Je vous dois aussi l'aboutissement de ce travail.

A tous mes co-auteurs de la publication à savoir **Madame Kechih-Bounar Saliha**, Responsable du laboratoire de Bactériologie au Laboratoire Vétérinaire Régional de Draa Ben Kheda pour sa précieuse collaboration et pour avoir fourni les souches aviaires d'*E. coli*, objets de ce travail.

A Monsieur **Eric Jouy** et **Maena Le Corvec**, respectivement pour leur éclairage scientifique et pour le séquençage de nos souches.

A tous les membres du jury :

- Monsieur **le Professeur Mati A.** Président du jury qui a accepté de présider ce jury. Vous êtes la figure de proue de notre faculté et le Directeur du Laboratoire de Biochimie analytique et Biotechnologies (LABAB) qui a abrité mes travaux durant ces années de thèse. J'ai souvent sollicité votre avis et pris conseil auprès de vous, tirant profit de votre expérience, votre sagesse et votre recul sur les choses. C'est tout naturellement que nous vous avons sollicité. Merci de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse de Doctorat.

- Monsieur **le Professeur Houali K**. pour avoir accepté d'examiner ce travail malgré ses multiples occupations en tant que nouveau Doyen de notre faculté. C'est l'occasion pour moi de vous exprimer mes remerciements et toute ma gratitude pour toutes ces années où

vous n'avez eu cesse de nous aider au laboratoire, de nous prodiguer conseils et encouragements. Vous avez réussi à créer un climat propice au travail, de respect et de convivialité. Merci pour tout.

- Messieurs **les Professeurs Kecha M**. de l'université de Béjaia et **Riba A**. de l'université de Boumerdès d'avoir spontanément accepté de juger ce travail.

- Madame **le Docteur Achour-Barchiche N.** d'avoir accepté avec gentillesse de juger ce travail.

A Monsieur Samraoui F. de l'université de Annaba et **Mlle Ali Ahmed C.** de l'U.M.M.T.O. d'avoir effectué le traitement statistique des données.

A Monsieur le Professeur Derridj A. ancien Doyen de notre faculté et Recteur de l'U.M.M.T.O. de m'avoir tant de fois facilité les choses et encouragé. Merci pour votre simplicité, votre disponibilité et votre soutien indéfectible.

Durent cette période intense de thèse, j'ai certes accumulé un capital expérience professionnelle mais également une richesse sur le plan personnel grâce aux différents contacts et liens d'amitié tissés au fil des ans. Certains sont mes enseignants : **Mme Mati F., Mr Hadj Kaci A., Mme Benkeddache D**. et bien d'autres … devenus plus tard mes collègues. D'autres de ma génération, des camarades de classe ou de promotion devenus eux aussi collègues : **Mme Iratni Aiche G., Mlle Amar Khodja N., Mme Aidrous N., Mme Sadoudi D., Mme Mestar N** ; **Pr Messai Y.** de l'U.S.T.H.B. et enfin d'autres, d'anciens étudiants devenus nos collègues. Ils sont nombreux et se reconnaîtront, pardon de ne pas tous vous citer.

Dédicaces

Je dédie ce travail à mes parents et à tous les miens,

petits et grands.

Avec Toute mon affection,

Nacima

“ L'escalier de la science est l'échelle de Jacob, il ne s'achève qu'aux pieds de Dieu.”

Albert Einstein

"It's not the strongest of the species that survives, nor the most intelligent that survives.
It's the one is the most adaptable to change".

Les espèces qui survivent ne sont pas les espèces les plus fortes ni les plus intelligentes, mais celles qui s'adaptent le mieux aux changements.

Charles Darwin

Résumé
L'étude a consisté à évaluer par l'antibiogramme la sensibilité aux antibiotiques de souches aviaires d'*Escherichia coli* (n=308), de la région centre de l'Algérie, isolées de lésions de colibacilloses et de détecter les mécanismes sous tendant la résistance à deux principales familles d'antibiotiques : les bêta-lactamines et les fluoroquinolones.
Des taux de résistance variables ont été observés vis-à-vis des antibiotiques. Le taux de résistance le plus important a été observé vis-à-vis des aminopénicillines (66,2%). Des taux de résistance moyens ont été observés vis-à-vis des aminosides, des tétracyclines et de l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole (cotrimoxazole). L'imipénème et la colistine demeurent les molécules remparts avec 0% et 0,68% de résistance, respectivement. La résistance aux quinolones classiques comme l'acide nalidixique (55,2%) a été conséquente, tandis qu'elle a été plus faible vis-à-vis des fluoroquinolones. Des profils de multirésistance associant entre 3 et 17 antibiotiques et s'étendant à toutes les familles chimiques ont été observés.
Le principal mécanisme de résistance aux bêta-lactamines a été la production de bêtalactamases. Les groupes phénotypiques prédominants ont été :la production de pénicillinases à large spectre (51,9%) transférables par conjugaison et de bêtalactamases à spectre étendu (BLSE) (7,8%), non transférables ni par conjugaison, ni par électrotransformation, alors que les résistances à la tétracycline ou au triméthoprime-sulfaméthoxazole ont été transférables par électrotransformation.
L'identification moléculaire des BLSE chez 11 souches par PCR, puces à ADN et séquençage a montré qu'elles appartenaient au groupe 1 de la famille CTX-M, et l'allèle $bla_{\text{CTX-M15}}$ a été détecté chez 2 souches. Le gène bla_{TEM} a été détecté chez la plupart des souches BLSE testées.
La résistance aux quinolones associée aux BLSE n'a pas été transférable et la recherche de mutation dans les régions QRDR des gènes des sous unités GyrA de l'ADN gyrase et ParC/ParE (de la topoisomérase IV) chez 2 souches a mis évidence des mutations classiquement décrites dans les gènes des 3 sous-unités: *gyr*A : Ser83Leu, Asp87Asn; *par*C : Ser80Iso et *par*E : Ala458Ser.
Le typage moléculaire des 11 souches BLSE par leurs profils plasmidiques a montré des profils plasmidiques similaires comprenant 7 plasmides et le replicon-typing a mis en évidence des groupes d'incompatibilité IncF et IncFIB. La PFGE pratiquée sur les souches a révélé aussi des profils de macrorestriction identiques. L'analyse phylogénétique a montré leur appartenance au phylogroupe D. Tous ces résultats sont indicatifs du caractère clonal de ces souches.
Le second volet de ce travail a porté sur l'évaluation de la sensibilité de 215 souches vis-à-vis de sept métaux lourds à des concentrations critiques définissant l'état de résistance. A l'exception du cuivre, cette étude a mis en exergue des taux de résistance parfois élevés, tels que vis-à-vis du zinc (79,1%), du plomb (59,1%) et du chrome (45,6%). Des taux plus faibles ont été enregistrés vis-à-vis de l'argent, (17,7%), du cadmium (11,6 %) et du mercure (8,4%). Une diversité de profils de résistance (29) a été observée, avec 24 métallotypes de multirésistance associant jusqu'à 5 métaux simultanément et la prédominance du métallotype associant zinc, plomb et chrome (20,5%).
L'analyse des correspondances multiples (ACM) et les valeurs du test d'indépendance du χ^2 ($p<0$) a clairement établie la liaison entre la résistance aux antibiotiques et la résistance aux métaux lourds chez les souches testées. Ceci va dans le sens d'une probable pression de co-sélection, d'où une adaptation, exercée sur nos souches via un mésusage des antibiotiques et un environnement de plus en plus pollué par les métaux lourds.

Mots clés : *E. coli* aviaire pathogène, résistance antibiotiques, métaux lourds,

Sommaire **Page**

Introduction……. *1*

Revue bibliographique

L'espèce *Escherichia coli* 4

1-Historique……..... 4

2-Taxonomie…… 4

3-Caractéristiques Bactériologiques de l'espèce…….. 4

3.1 –Morphologie……. 4

3.2- Caractères culturaux…….. 5

3.3- Caractéristiques biochimiques…….. 5

3.4- Les caractères génétiques de *E. coli*……..... 5

4- Les différentes Classifications de *E.coli*…… 6

4.1- Classification selon le sérotype……. 6

4.2- Classification selon le pathotype…….. 7

4.2.1- Les *E.coli* pathogènes Intestinales (IPEC)……. 7

4.2.2- Les *E.coli* Pathogènes extra-intestinales (ExPEC)…….. 7

4.2.2.1- Les *Escherichia coli* Pathogènes Aviaires (APEC)……. 7

- La colibacillose aviaire……. 9
- Les facteurs de virulence des APEC…… 9
- Transmission des APEC et risque zoonotique……. 12

4.3- La classification phylogénique……. 13

Antibiotiques et Résistance aux antibiotiques…… 15

1. Généralités sur les antibiotiques…… 15

1.1. Notion d'antibiotique……. 15

1.2. Caractéristiques des antibiotiques……. 15

1.2.1. Toxicité sélective…… 16

1.2.2. Spectre d'activité…… 16

1.2.3. Activité antibactérienne…… 16

1.3. Utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire…….. 16

1.3.1. Médicament vétérinaire……. 17

1.3.2. Prophylaxie…… 17

1.3.3-Métaphylaxie……... 17

1.3. 4- Facteur de Croissance…… 17

2- Les antibiotiques…… 17

2.1- Les bêta-lactamines…… 17

2.1.1-Les dérivés de l'acide 6-amino-pénicillanique…… 17

2.1.2-Les dérivés de l'acide 7-amino-céphalosporanique……. 17

2.1.3-Les monobactames…… 18

2.1.4- Mécanisme d'action des bêtalactamines……. 18

3- La résistance aux antibiotiques……. 22

3.1-Fondements de l'antibiorésistance……. 22

3. 2-Support génétique de la résistance…… 23

3.3- Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques…….. 24

3.3.1- Diminution de la quantité d'antibiotique atteignant la cible……. 24

3.3.2- Modification de la cible…… 24

3.3.3-Modification ou Inactivation de l'antibiotique……. 24

4- La résistance des bactéries aux bêta-lactamines ……. 27

4.1-Fondements……. 27

4.2-Mécanisme d'action …….. 27

Page
4.3-Classification des bêtalactamases……. 29
4.3-1-La classification d'Ambler……. 29
4.3.2- Classification de Bush-Jacobi-Medeiros…….. 29
4.3.3-Les bêtalactamases de classe A…… 30
- Bêtalactamases de type TEM…… 30
- Les Bêtalactamases de type SHV (Sulfhydryl Variable)……..... 32
- Les Bêtalactamases à spectre élargi/étendu …….. 32
- Les carbapénémases…… 34

4.3.4- Les bêtalactamases de Classe B (métallo-bêtalactamases……... 35
4.3.5- Les bêtalactamases de Classe C…….. 36
4.3.6- Les bêtalactamases de Classe D……. 36
4.4- .Phénotypes de résistances naturelles des entérobactéries aux bêtalactamines…… 37
5- Mécanisme d'action et résistance aux Quinolones……. 39
5.1- Mécanisme d'action…… 39
5.2- Résistance des bactéries Gram négatif aux quinolones…… 40
6- Voies de transmission de l'antibiorésistance……. 42

Les métaux lourds et la métallorésistance…….. 47
1- Définition des métaux lourds……. 47
2- Origines naturelles et humaines des métaux lourds dans l'environnement …….. 48
3- Les métaux lourds d'importance toxicologique majeure…… 49
4- Les métaux lourds essentiels…… 50
5- Autres métaux lourds……... 50
6- Effet des métaux lourds sur la santé humaine……. 51
7- Impact des métaux lourds sur l'environnement…….. 51
8- Effets des métaux lourds sur les bactéries…… 52
9- La métallo-résistance bactérienne…… 54
9.1- Principaux mécanismes de métallo-résistance bactérienne……... 55

Partie expérimentale
Objectifs du travail…….. 61
1-Matériel …… 61
1.1-Matériel biologique…… 61
1.1.1 - Souches testées……. 61
1.1.2- Les souches de référence……. 61
2.-Méthodes 62
2.1- L'identification et le Sérotypage des isolats…… 62
2.2- Etude de la sensibilité aux antibiotiques par antibiogramme……. 62
2.3- Recherche de bêtalactamase à spectre élargi (Test de synergie)…… 63
2.4- Détermination de la concentration minimale inhibitrice des céphalosporines de troisième génération (CTX) 63
2.5-Transfert génétique par conjugaison……. 65
2.6- Transfert génétiques par électroporation (transformation)……. 67
2.6.1-Préparation des cellules compétentes…… 67
2.6.2- L'électroporation (électrotransformation)…… 67
2.7- Gènes recherchés par PCR……... 68
2.7.1-Confirmation de l'identification des souches de *E.coli* par la recherche du gène *uid* A 68
2.7.2- Recherche des bêtalactamase de type CTX-M…….. 69
2.8- Détection des gènes de résistance aux C3G par utilisation de Puces à ADN……. 69

Page
2.8.1- Extraction de l'ADN……. 69
2.8.2-Analyse par puce CHECK-MDR CT 101……. 70
2.9-Séquençage des gènes de bêtalactamase et la région QRDR (Quinolones determining region resistance) 73
2.10- Extraction et électrophorèse de l'ADN plasmidique …… 73
2-11- Typage des replicons ou « Replicon Typing » selon Carattoli *et al.* (2005) 75
2-12-Typage phylogénétique par PCR ECOR (Collection de référence *E.coli*…… 77
2-13-Typage moléculaire par Analyse des profils de macrorestriction de souches par électrophorèse en gel pulsé (PFGE) 81
- La Préparation des inserts……. 81
- Préparation de la solution SDS/ Agarose 1% en tampon TE……. 81
- Lyse des cellules bactériennes ……. 82
- Lavages……. 82
- Digestion enzymatique…… 82
- Séparation électrophorétique des fragments……. 82
- Programmation de l'électrophorèse…….. 83
- Lecture du gel…… 83
- Analyse du gel…….. 83

2-14- Etude de la métallorésistance par ensemencement en spots……. 86
2-15-Traitement statistique des données…… 87

Résultats et Discussion 88
1-Résultats……..... 88
1.1-Identification des isolats et sérotypage…….. 88
1.2- Résistance aux antibiotiques 88
1.2.1- Profils et analyse moléculaire de la résistance aux bêta-lactamines…….. 96
1.2.1.1- Analyses des profils de résistance vis-à-vis des bêta-lactamines…… 96
1.2.1.2- Caractérisation moléculaire de souches productrices de BLSE…… 102
1.1.2- Profils et analyse moléculaire de la résistance aux Quinolones…… 112
1.1.3- Profils et analyse moléculaire de la résistance aux autres antibiotiques 113
1.2- Etude de la métallorésistance…… 118
2-Discussion…… 132
Conclusion…….. 145
Références Bibliographiques…… 147
Glossaire 176
Publication et Communications
Annexes……..

Liste des figures

	Page
Figure 1 : Différents groupes de *Escherichia coli* pathogènes.	8
Figure 2 : Principaux facteurs de virulence impliqués dans le développement des processus infectieux chez les ExPEC (extraintestinal pathogenic *E. coli*)	12
Figure 3 : Dichotomie permettant de déterminer le groupe phylogénétique de souches d' *E. coli* par amplification génique (PCR)	14
Figure 4 : Structures chimiques des bêtalactamines : dérivés de l'acide -6 -amino pénicillanique.	20
Figure 5 : Structures chimiques des bêtalactamines : dérivés de l'acide 7-amino-céphalosporanique et monobactames	21
Figure 6 : Acylation du site actif sérine d'une protéine de liaison à la pénicilline (PLP) par une bêtalactamine.	22
Figure 7 : Les différents modes d'acquisition des gènes de résistance (R) aux antibiotiques chez les bactéries	23
Figure 8 : Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries	25
Figure 9 : Les Systèmes d'efflux des Antibiotiques.	26
Figure 10 : Action d'une serine bêtalactamase	28
Figure 11: Caractéristiques moléculaires et fonctionnelles des groupes majeurs de bêtalactamases	31
Figure 12 : Action des quinolones sur les topoisomérases	41
Figure 13 : Les différents mécanismes de résistance aux quinolones	43
Figure 14 : Les voies de transmission de l'antibiorésistance à travers les différents habitats	46
Figure 15 : Les différents mécanismes de résistance des bactéries contre les métaux.	56
Figure 16 : Modèle du mécanisme cellulaire des protéines RND	57
Figure 17 : Exemples de mécanismes moléculaires sous-tendant la métalo-antibio-co-sélection	58
Figure 18 : Structure schématique des ATPases de type P1 impliquées dans le transport des métaux lourds	59
Figure 19 : Etapes du kit Check points Check points MDR CT101	72
Figure 20 : Principales étapes de l'extraction plasmidique selon TAKAHASHI et NAGANO, 1984……	76
Figure 21 : Schéma récapitulatif du principe de la PFGE	84
Figure 22 : Principales étapes de la PFGE selon Chu *et al.* (1986	85
Figure 23 : Détection du gène *uid*A par PCR multiplex	89
Figure 24 : Pourcentages d'isolats d' *E. coli* sensibles et résistants aux antibiotiques	92
Figure 25 : Pourcentages d'isolats de *E.coli* mono et multi-antibioresistants	92

Figure 26 : Taux d'antibiorésistance des isolats d'*E.coli* aviaires 94

Figure 27 : Pourcentages de souches résistantes selon le nombre d'antibiotiques 95

Figure 28 : Images de synergie entre les disques amoxicilline+acide clavulanique et les céphalosporines de troisième génération chez les isolats à BLSE, E11 et E63 100

Figure 29 : Transconjugants (souches PHN) issus du transfert de la résistance à l'amoxicilline observés milieu MH additionné d'amoxicilline-rifampicine et azide de sodium (AMX-Rif- AZ) 101

Figure 30 : Détection des gènes bla_{CTX-M} par PCR sur les isolats d'*E. coli* aviaires producteurs de BLSE 103

Figure 31 : Alignements des séquences d'amplification des gènes bla_{CTXM} des souches BLSE E88 (755pb) et E174 (757pb) avec la séquence du gène $bla_{CTX-M15}$ décrit par KARIM *et al.* (2001) 105

Figure 32 : Détermination par PCR du groupe phylogénétique des isolats d'*E. coli* aviaires producteurs de BLSE 107

Figure 33 : RFLP/PFGE de l'ADN des isolats d'*E. coli* aviaires producteurs de BLSE 108

Figure 34 : Profils électrophorétiques des extraits plasmidiques d'isolats producteurs de BLSE 109

Figure 35 : Replicon typing (IncF) par PCR simplex des isolats d'*E. coli* aviaires producteurs de BLSE 110

Figure 36 : Replicon typing (IncFIA/FIB/W) par PCR multiplex des isolats d'*E.coli* aviaires producteurs de BLSE 111

Figure 37 : Mutations détectées dans les régions QRDR du gène *gyrA* de l'ADN gyrase 114

Figure 38 : Mutations détectées dans les régions QRDR des gènes *parC* et *parE* de la topoisomérase IV 115

Figure 39 : Profils plasmidiques des transformants obtenus par électroporation à partir de souches d'*E.coli* producteurs de BLSE 117

Figure 40 : Pourcentages de résistance par nombre de métaux lourds 122

Figure 41 : Croissance d'*E. coli* sur milieu minimum en présence et en absence de métal 126

Figure 42 : Croissance des isolats d'*E.coli* en présence d'argent à 50 µg/ml et de cadmium 800 µg/ml 127

Figure 43 : Croissance des souches d'*E. coli* à BLSE en présence de chrome à 50 µg/ml et de zinc à 1600 µg/ml 128

Figure 44 : Représentation graphique de l'ACM effectuée par le logiciel R (package ade4) 130

.

Liste des tableaux **Page**

Tableau I : Correspondance des principales enzymes suivant la classification structurale d'Ambler et fonctionnelle de Bush 38
Tableau II : Phénotypes de résistance naturelle des entérobactéries 39
Tableau III : Récapitulation des caractéristiques des bêtalactamines, des quinolones et d'autres d'antibiotiques 44
Tableau IV : La présence de métaux lourds dans l'environnement Humain 48
Tableau V : Impacts de quelques métaux lourds sur la santé humaine 53
Tableau VI : Liste des antibiotiques en disques utilisés 64
Tableau VII : Préparation des boites de sélection dans les transferts par conjugaison 66
Tableau VIII : Amorces des différentes PCR 78
Tableau IX : Concentrations finales de sels de métaux lourds 86
Tableau X : Taux de sensibilité et de résistance des isolats aviaires d'*E.coli* 93
Tableau XI : Profils de résistance et de production de bêtalactamases des souches d'*E.coli* aviaires 97
Tableau XII : Concentrations minimales inhibitrices du céfotaxime sur les isolats à profil BLSE. 98
Tableau XIII : Profils d'antibiorésistance de 11 souches *E.coli* productrices de BLSE 99
Tableau XIV : Résultats de l'analyse par puces à ADN (Check-MDR CT101, Biocentric) 104
Tableau XV : Caractérisation moléculaires des isolats *E.coli* BLSE 112
Tableau : XVI : Profils de résistance aux quinolones des souches d'*E.coli* aviaires 113
Tableau XVII : Catégories de comportement des isolats d'*E.coli* vis-à-vis des métaux lourds (n=215). 118
Tableau XVIII : Phénotypes de résistance aux métaux lourds des isolats d'*E.coli* 119
Tableau: XIX : Métallotypes des isolats de *E. coli* aviaires 121
Tableau XX : Nombre de métallotypes associés à la résistance aux béta-lactamines chez les isolats d'*E. coli* 123
Tableau XXI : Métallotypes des isolats d'*E. coli* producteurs de BLSE 124
Tableau XXII : Nombre de métallotypes associés à la résistance aux quinolones chez les isolats d'*E. coli* 125

Abréviations

Ala : Alanine
APEC : Avian pathogenic *E. coli* ou *E. coli* pathogène aviaire.
Asp : Asparagine
ATB : Antibiotique
BET : Bromure d'éthidium
BLSE : Bêtalactamase à spectre élargi
BSA : Bovine albumin serum
C1G, C2G, C3G et C4G : céphalosporine de première, seconde, troisième et quatrième génération
dNTP : désoxyribonucléotides
DO : Densité optique
IS : Insertion sequence ou sequence d'insertion
Leu : leucine.
PCR : Polymerase chain reaction
PHN : Pénicillinase haut niveau
RFLP : Restriction fragment length polymorphism ou polymorphisme de longueur des fragments de restriction
CA-SFM : Comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie
Ser : Serine
TBE : Tampon Tris Borate EDTA
TE : Tris EDTA

Unités

bp : base pair ou paire de base
µg : microgramme
ml : millilitre

Introduction

L'élevage avicole constitue une source non négligeable d'apport protéique dans les pays en voie de développement. En Algérie, les viandes blanches et particulièrement celle du poulet de chair, contribuent dans l'apport de protéines, bien que leur consommation soit faible : 8 à 9kg/hab./an (ALLOUI, 2011 ; ICHOU, 2012; MADR, Ministère de l'Agriculture et du développement Rural, 2012). La production annuelle de poulets de chair en Algérie est de 253 000 tonnes selon la FAO (M.A.D.R., 2012) et de 104 061 Tonnes/An (31 %) selon BELAID (2015).

La colibacillose, dont l'agent étiologique est *Escherichia coli* pathogène aviaire (APEC) est à l'origine, à travers le monde, de pertes économiques importantes dans la filière avicole dues à une mortalité, à la saisie de carcasses ou à une réduction dans la ponte. Elle est sans doute parmi les infections bactériennes les plus fréquentes et les plus importantes en pathologie aviaire (ROJAS *et al.,* 2013 ; GUABIRABA et SCHOULER, 2015).

E. coli est une bactérie de la flore intestinale commensale de l'homme et des animaux à sang chaud (KAPER, 2004). Cependant, la diversité génétique de cette espèce, due à un haut degré de plasticité génomique, confère à certaines souches la capacité d'évoluer vers la pathogénicité et causer diverses maladies intestinales et extraintestinales (CLERMONT *et al.,* 2011). La classification en pathotypes est basée sur le type de maladie provoqué ; ainsi, les souches d'*E. coli* pathogènes pour l'homme et les animaux sont classées sur la base de leurs facteurs de virulence qui conditionnent leur pouvoir pathogène spécifique. Ces souches sont classiquement divisées en souches à tropisme intestinal (InPEC: Intestinal Pathogenic *E. coli*) et à tropisme extra-intestinal (ExPEC, Extraintestinal Pathogenic *E. coli*) dont font partie les souches pathogènes aviaires (APEC, Avian Pathogenic *E. coli*) (MAINIL, 2003 ; DOBRINDT, 2005 ; BELANGER *et al.,* 2011). Les APEC appartiennent à des sérotypes bien particuliers (principalement O1, O2, O35 et O78) et sont associées au syndrome de la colibacillose, dont les lésions et les manifestations peuvent être variables suivant l'âge de l'animal (STORDER et MAINIL, 2002 ; HUJA *et al.,* 2015). Depuis leur découverte, les antibiotiques se sont révélés très précieux dans la lutte contre les maladies d'origine bactérienne touchant l'homme et les animaux. Les colibacilloses considérées comme les infections bactériennes les plus fréquentes chez la volaille représentent vraisemblablement la première cause de traitement antibiotique dans les élevages (ROBINEAU et MOALIC, 2010).

Les antibiotiques, associés à la vaccination et l'amélioration des conditions hygiéniques ont fortement contribué au développement de l'élevage dit «industriel». L'élevage avicole a été le premier à s'industrialiser et c'est aussi chez le poulet qu'a été découverte une autre propriété des antibiotiques qui est l'effet promoteur de croissance. L'usage des antibiotiques dans ce but chez les animaux a préoccupé, dès les années 60, les médecins et l'opinion publique dans la mesure où les antibiotiques utilisés pourraient favoriser l'apparition de bactéries résistantes transmissibles à l'homme. En effet, l'utilisation intensive, prolongée et inopportune des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire ainsi qu'en en agriculture a favorisé l'émergence de souches résistantes, via la pression de sélection, les échanges génétiques horizontaux et la recombinaison (DA SILVA et

MENDONCA, 2012 ; RODRIGUEZ-ROJAS, 2013). La contamination de l'homme par des souches portées par les animaux domestiques peut être à l'origine de pathologies ou de complication de pathologies (par la résistance) chez l'homme. Cette contamination peut s'effectuer à travers la consommation et la manipulation de denrées d'origines animales souillées et par contact avec l'animal ou l'environnement souillé (fèces, fumier, effluents d'abattoirs).

L'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques, tant chez l'homme que chez l'animal, est devenue une préoccupation majeure de santé publique, elle complique la prise en charge des maladies infectieuses en raison des impasses thérapeutiques. La multirésistance qui touche les souches commensales aviaires est également un trait des APEC dont les isolats sont souvent résistants aux tétracyclines, chloramphénicol, sulfamides, aminosides, fluoroquinolones et bêta-lactamines même à spectre étendu (GUABIRABA et SCHOULER, 2015).

Le principal mécanisme impliqué dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux bêta-lactamines, molécules majeures dans le traitement des colibacilloses (DENG *et al.,* 2015), est l'inactivation enzymatique par la synthèse des bêtalactamases capables d'hydrolyser le noyau bêta-lactame qui devient biologiquement inactif. Ces enzymes sont très nombreuses (1300 variants) et hétérogènes, à déterminisme chromosomique ou plasmidique (BUSH, 2012). Parmi elles, les bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) sont une grande famille très hétérogène découverte dans les années 80 en France, puis en Allemagne, elles dérivent des anciennes béta-lactamases (TEM-1, TEM-2 et SHV-1) par mutation ponctuelle touchant leurs sites actifs. Ces enzymes ont acquis la capacité d'hydrolyser les céphalosporines à large spectre et les monobactames, mais pas les céphamycines (céfoxitine) ni les carbapénèmes (imipénème) et elles sont inhibées par les inhibiteurs de bêtalactamases. Une nouvelle classe de BLSE a émergé depuis quelques années, la classe des CTX-M, pour céfotaximase, largement disséminée parmi les isolats cliniques humains hospitaliers et communautaires, et qui est de plus en plus détectée dans les aliments et les souches animales (CARATTOLI, 2008 ; EWERS *et al.,* 2013). La présence de BLSE est fréquemment associée à la résistance à d'autres familles d'antibiotiques, dont la classe majeure des quinolones (COQUE *et al.,* 2008). Classiquement, les mécanismes de résistance aux quinolones chez les entérobactéries résultent essentiellement de mutations ponctuelles affectant les gènes chromosomiques des topoisomérases et plus rarement d'une diminution de la concentration intracellulaire de ces antibiotiques par imperméabilité membranaire et/ou surexpression des systèmes d'efflux. Plus récemment, des déterminants plasmidiques de la résistance aux quinolones ont été mis en évidence ; il s'agit de la protection des topoisomérases par de protéines Qnr, inactivation enzymatique par AAC(6′)-Ib-cr et augmentation de l'efflux par QepA, OqxAB, QacBIII (NORDMANN, 2006).

Outre les antibiotiques, les volailles reçoivent souvent des métaux lourds comme le zinc et le cuivre comme suppléments dans leur alimentation à des fins nutritionnelles et de prévention des diarrhées (ZHU *et al.,* 2013 ; YAZDANKHAH *et al.,* 2014). De plus, la pollution de l'environnement par les métaux lourds s'est globalement accrue en raison de leurs nombreuses et diverses utilisations dans les domaines industriels, domestiques, agriculture, médical...., ce qui expose les bactéries à ces métaux (ABDELATEY *et al.,* 2011 ; ATIENO *et al.,* 2013).

Introduction

Pour survivre dans des conditions de stress métallique, les bactéries ont développé divers mécanismes biologiques, comprenant l'efflux des ions métalliques à l'extérieur de la cellule, l'accumulation et la complexation des ions métalliques à l'intérieur de la cellule, et la réduction des ions de métaux lourds dans un état moins toxique (ABDELATEY *et al.*, 2011 ; BENMALEK *et al.*, 2014). Cette évolution adaptative souvent médiée par des éléments génétiques mobiles est souvent à l'origine d'une pression de cosélection qui s'étend aux antibiotiques et aux biocides du fait de mécanismes ou de supports génétiques de résistance communs (BAKER-AUSTIN, 2006 ; ROSEWARNE *et al.*, 2010 ; DEREDJIAN *et al.*, 2011 ; GULLBERG *et al.*, 2014).

En Algérie, en médecine humaine, les récentes données de résistance aux antibiotiques indiquent une situation inquiétante. En effet, ces dix dernières années ont été marqué par l'émergence et la dissémination de nouveaux gènes de résistance notamment dans le nord du pays chez *E.coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* (MESSAI *et al.*, 2006 ; BABA AHMED-KAZI TANI et ARLET, 2014). En revanche, en médecine vétérinaire à l'exception de quelques informations ponctuelles, très peu de données sont disponibles sur les souches animales en général et sur leur comportement vis-à-vis des antibiotiques, en particulier de deux importantes familles : les bêta-lactamines et les fluoroquinolones. En filaire aviaire, on peut citer les quatre études phénotypiques effectuées par HAMMOUDI et AGGAD (2008) ; AGGAD *et al.* (2010) ; BENAMEUR *et al.*, (2014) sur des souches de *E.coli* de la région Ouest et de la région de Sétif (MESSAI *et al.*, 2013), isolées de volailles atteintes de colibacillose ainsi que l'étude de AGABOU *et al.* (2016) sur des souches de *E.coli* commensales de la région de Constantine.

En revanche, à notre connaissance, aucune caractérisation moléculaire de la résistance aux antibiotiques de souches d'*E. coli* pathogènes aviaires n'a été effectuée au moment où nous avions entamé ce travail.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail a été l'évaluation et la caractérisation de la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds chez des souches pathogènes d'*E. coli* responsables de colibacillose dans la région centre de l'Algérie.

Cette approche vise un apport de données, encore rares, sur l'état de la résistance aux antimicrobiens dans la filière aviaire, qui vont s'intégrer dans la stratégie globale de lutte et de contrôle du phénomène de la résistance aux antibiotiques.

Le contenu de la thèse que nous présentons s'articule comme suit :

- Une synthèse bibliographique abordant les caractéristiques de l'espèce *Escherichia coli*, notamment du pathotype aviaire pathogène ; les antibiotiques et la résistance aux antibiotiques (mécanismes d'action et mécanismes de résistance), avec un intérêt particulier pour les bêta-lactamines et les fluoroquinolones et enfin les métaux lourds, avec notamment les mécanismes de résistance.
- Le travail expérimental comprend :
    - L'évaluation phénotypique de la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds d'une collection de souches pathogènes d'*E. coli* (n=308). La détection et la caractérisation moléculaire des bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE); et l'épidémiologie des souches portant les BLSE.
    - L'investigation statistique d'un éventuel lien entre les résistances aux antibiotiques et aux métaux lourds.

Synthèse Bibliographique

L'espèce Escherichia coli

Escherichia coli (*E.coli*) est une bactérie à Gram négatif appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* colonisant le tractus gastro intestinal de l'homme, des mammifères et autres espèces animales. Les souches d' *E.coli* commensales sont localisées dans le gros intestin, spécialement dans le cæcum et le colon (DHO MOULIN et FAIRBROTHER, 1999 ; KAPER *et al.*, 2004).

1-Historique

Escherichia coli a initialement été isolé et décrit par le pédiatre allemand Théodore ESCHERICH, en 1885. Celui-ci démontra son existence comme hôte normal de l'intestin de l'enfant et pour marquer à la fois ce tropisme et la fréquence de son isolement, il l'appela *bacterium coli* commune, ce que l'on peut traduire par « bactérie commune du colon ».

C'est en 1919 que CASTELLANI et CHALMERS lui donnent son nom définitif en hommage à ESCHERICH et en 1958 officiellement, *Escherichia coli*, sur recommandation du sous-comité *Enterobacteriaceae* du Comité de Nomenclature de l'Association Internationale des Sociétés de Microbiologie.

Dès 1883, un vétérinaire Danois Carl Oluf Jensen postule que l'espèce *E.coli* comprend des souches pathogènes et d'autres non pathogènes (MAINIL, 2003 ; MAINIL, 2013).

2-Taxonomie

Escherichia coli appartient à la famille des entérobactéries qui comprend 51 genres.

Le nombre d'espèces par genre varie entre 1 à 22 espèces ; vingt deux genres ne comptent qu'une espèce tandis que sept genres ont plus de 10 espèces. Le nombre total d'espèces au sein de cette famille se situe à 238 espèces (OCTAVIA et LAN, 2014).

Le genre *Escherichia* comprend *: Escherichia albertii, Escherichia coli, Escherichia fergusonii, Escherichia hermannii* et *Escherichia vulneris* (OCTAVIA et LAN, 2014).

La classification de *E.coli*, selon la seconde Edition de Bergey's Manual of Systematic bacteriology (2004) est la suivante :

Phylum : *Proteobacteria*
Classe : *Gammaproteobacteria*
Ordre : *Enterobacteriales*
Famille *: Entreobacteriaceae*
Genre : *Escherichia*
Nom binomial : *Escherichia coli*

3- Caractéristiques bactériologiques de l'espèce

3.1 -Morphologie

E.coli est un bacille de forme cylindrique (bâtonnet) ou coccobacillaire, Gram négatif uniformément coloré, non sporulé, parfois capsulé, de 2µm à 3µm de long sur 0,7µm de large.

Les cellules de *E.coli* se présentent soit seules ou groupées, le plus souvent par deux (diplobacilles), très rarement elles sont rencontrées en amas ; elles sont mobiles grâce à une ciliature péritriche. Les colonies ont un aspect bombé, lisse et rond (GROSJEAN et PASQUIER, 2009).

3.2- Caractères culturaux

E.coli est une bactérie mésophile, son optimum de croissance est proche de la température corporelle des animaux à sang chaud (35-43°C). La limite de croissance inférieure se situe aux environs de 7°C. Les *E. coli* sont tués rapidement lorsque la température dépasse 70°C, comme dans le processus de pasteurisation.

Outre la température, le pH et l'aw peuvent aussi influencer la multiplication d'*E. coli* dont l'optimum de croissance est de 7,2 et 0,99 respectivement. La croissance d'*E. coli* est arrêtée à des pH extrêmes (<3,8 ou >9,5) et à une valeur d'aw inférieure à 0,94. Le degré d'acidité d'un produit peut donc constituer un facteur de protection pour sa sécurité.

E. coli se multiplie rapidement sur gélose ordinaire ou sélective, après 18 à 24 heures donne des colonies de 2 mm de diamètre. Le dédoublement de cellule a lieu toutes les 20 mn (COHEN et KARIB, 2006 ; JEAN *et al.*, 2007).

3.3- Caractéristiques biochimiques

E. coli possède des caractères biochimiques particuliers permettant de la différencier des espèces voisines. Cette bactérie a un métabolisme respiratoire, fermente le glucose (habituellement avec production de gaz) et le lactose (95 pourcent des souches). En ce qui concerne la fermentation des sucres, *E. coli* synthétise des gaz et de l'acide en présence de glucose, maltose, mannitol, xylose, glycérol, rhamnose, sorbitol ou d'arabinose mais pas en présence de dextrine, d'amidon ou d'inositol. Cette espèce produit de l'indole à partir du tryptophane et n'utilise pas le citrate comme source de carbone. Elle ne possède pas d'arginine dihydrolase ADH (JOLY et REYNAUD, 2006 ; FRENEY *et al* ., 2007). Par contre, elle produit une réaction positive au méthyl rouge mais négative à la réaction de Voges-Proskauer (FRENEY *et al.*, 2007).

3.4- Les caractères génétiques d'*E. coli*

Le chromosome bactérien occupe un territoire cytoplasmique (0,5 mm). Il est structuré en super-hélice, comportant 50 lobes chez *Escherichia coli* et est relié à la membrane plasmique au moins par 20 points d'attaches. Il est constitué d'une grande molécule d'ADN double brin circulaire (DUPUY et NOUGIER, 2005).

L'une des souches d'*E. coli* la mieux caractérisée est la souche K12 utilisée comme outil de travail dans la recherche scientifique, dans des études de génétique, de biologie moléculaire, de physiologie, et de biochimie. Son génome a été publié en 1997, il correspond à un unique chromosome circulaire de 4,6 millions paires de bases, sur lequel sont identifiés 4289 gènes codant des protéines, 86 gènes codant des ARNt et 22 gènes codant des ARNr rassemblés dans 7 opérons ribosomaux (DOBRINDT, 2005 ; WELCH, 2006).

Le génome de la souche *E. coli* pathogène aviaire O1:K1:H7 a été publié en 2007 : il comprend un chromosome circulaire de 5,1 Mpb et 4 plasmides totalisant ainsi un génome d'une taille de 5,6 Mpb (JOHNSON *et al*., 2007). Le chromosome de la souche aviaire O :78 séquencé en 2013 a une taille de 4,7Mpb avec deux plasmides de 217Kpb et 113Kpb (MANGIAMELE *et al.,* 2013 ; ROJAS *et al.,* 2013).

La comparaison entre les différents génomes des souches *E. coli* a mis en évidence la présence de deux fonds génomiques principaux ; « le cœur génomique » (ou fond

commun) présent dans toutes les souches d'*E. coli* et qui comprend pas moins de 2000 gènes et le fond dérivé ou « génome accessoire », très diffèrent entre les souches, qui permet l'expression de facteurs de virulence provoquant des maladies plus sévères. Le répertoire total de gènes de l'espèce est estimé, à plus de 16 000 et seulement 1% des gènes connues sont communs à toutes les souches d'*E. coli* (DOBRINDT, 2005 ; CLERMONT *et al.,* 2011 ; BLOUNT, 2015).

Les souches pathogènes d'*E. coli* possèdent jusqu'à 20% d'informations génétiques supplémentaires acquises vraisemblablement au cours de transferts horizontaux d'ADN. De nombreux gènes nouvellement acquis sont localisés sur le chromosome, mais beaucoup d'autres sont sur des réplicons extrachromosomiques, les plasmides (MAINIL, 2003).

Au cours de l'évolution, ces gènes peuvent s'intégrer dans des structures relativement indépendantes, comme les transposons ou les phages ou se regrouper pour former des îlots de pathogénicité La séquence complète du génome de plusieurs souches d'*E. coli* montre la présence de nombreuses séquences d'insertion (IS), de séquences bactériophagiques ainsi que d'autres plages de séquences inusuelles qui témoignent de l'extraordinaire plasticité du génome de ce genre bactérien (DOBRINDT, 2005).

La variabilité génétique retrouvée chez *E. coli* est due à la grande plasticité qui caractérise leur génome (THOMAS et NIELISEN, 2005). Elle se traduit par la capacité de ce dernier à moduler ces caractéristiques de façon naturelle, soit spontanée soit en réponse à un stimulus environnemental ce qui engendre des variations structurelles du génome à plus ou moins grande échelle (MAINIL, 2003). Cette plasticité génomique est à la base de l'acquisition et la sélection de gènes de virulence, envers des recombinaisons et des transferts génétiques non spécifiques.

4- Les différentes Classifications d'*E.coli*

L'espèce *E. coli* peut être divisée en trois principales catégories : les souches commensales, les souches provoquant des maladies intestinales (IPEC) et les souches responsables de maladies extra-intestinales (ExPEC) (RUSSO et JOHNSON, 2003 ; KAPER *et al*., 2004). De même, il existe différentes classifications de cette espèce : selon le sérotype, le pathotype ou le groupe phylogénique.

4.1- Classification selon le sérotype

La sérotypage de *E .coli* est une méthode utile, très utilisée mais complexe avec 173 antigènes O, 80 antigènes K et 56 antigène H. Le sérotype est la combinaison des 3 antigènes. Les antigènes somatiques O, capsulaires K et flagellaires H peuvent constituer ainsi plus de 10000 combinaisons possibles (ORSKOV et ORSKOV, 1992 ; ROBINS – BROWN et HARTLAND, 2002 ; PRAGER *et al.,* 2003). Le sérogroupe est déterminé que par l'antigène O seulement tel que O157, O111 etc..

De principaux groupes de sérotypes sont associés aux souches de *E. coli* intestinales et extra intestinales ; de ce fait, ils constituent des marqueurs épidémiologiques intéressants vu qu'ils sont associés à des facteurs de virulence spécifiques de ces groupes (ORSKOV et ORSKOV, 1992, STENUTZ et *al.,* 2006).

4.2- Classification selon le pathotype (figure 1)

Un groupe de différentes souches bactériennes appartenant à la même espèce causant la même maladie en utilisant les même facteurs de virulence est nommé pathotype (KAPER *et al.,* 2004 ; KAPER *et al.,* 2005).

4.2.1- Les *E.coli* pathogènes Intestinales (IPEC)

Les *E. coli* pathogènes intestinales ou entériques (IPEC : intestinal pathogenic *E.coli*) reconnus comme des agents responsables de syndrome diarrhéique d'origine alimentaire ou hydrique ont en commun de se multiplier dans l'intestin de leurs hôtes. Elles se retrouveront donc dans les fèces et par la suite dans les effluents animaux (élevages et abattoirs) et les effluents d'origine humaine.

Ce premier groupe de pathogènes est subdivisé en 6 pathovars majeurs selon le type de maladie engendré (figure1) (KAPER, 2004 ; CROXEN et FINLAY, 2010) :
les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), les *E. coli* entéropathogènes (EPEC), les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC), les *E.coli* entéroagrégatives (EAEC), les *E. coli* entéroinvasives (EIEC) et les *E. coli* à adhérence diffuse (EAEC) (CROXEN *et al.,* 2013).

4.2.2- Les *E.coli* Pathogènes extra-intestinales (ExPEC)

Le deuxième groupe de *E. coli,* à l'origine de maladies extra- intestinales (ExPEC), a acquis la capacité de déjouer les défenses immunitaires de l'hôte, à se propager dans l'organisme et provoquer notamment des infections urinaires et des septicémies (JOHNSON et RUSSO, 2005 ; ASLAM *et al.,* 2014). Elles posent problème autant en médecine humaine (notamment à cause des multiples résistances acquises portées le plus souvent par des plasmides), qu'en médecine animale.

A l'opposé des *E. coli* intestinales qui sont des pathogènes obligatoires, les ExPEC sont des bactéries pathogènes facultatives pouvant appartenir à la flore intestinale normale d'une fraction de la population saine où elles vivent comme des commensaux (KOHLER et DOBRINDT, 2011 ; MELLATA e*t al.,* 2013). Les pathotypes à l'origine des maladies extraintestinales (ExPEC) sont : les *E. coli* uropathogènes (UPEC), les *E. coli* associées à la méningite néonatale et à la septicémie (MNEC) et les *E. coli* pathogènes aviaires (APEC).
Cette revue bibliographique se focalisera sur les APEC, objet de cette étude.

4.2.2.1- Les *Escherichia coli* Pathogènes Aviaires (APEC)

Les *Escherichia coli* pathogènes aviaires sont à l'origine d'un large éventail d'infections localisées et systémiques couramment appelés colibacillose aviaire. Les mots clé définissant les APEC est diversité et hétérogénéité (SCHOULER *et al.,* 2012 ; MELLATA *et al.,* 2012 ; GUABIRABA et SCHOULER, 2015 ; MITCHELL *et al.,* 2015) ; ceci est reflété par la diversité des sérotypes de ce pathovar. Les souches d'*E. coli* pathogènes aviaires appartiennent principalement aux sérogroupes O1, O2, O78, O18, et O35 (MELLATA *et al.* 2012) ; en Europe ce sont les sérotypes O1, O2, O5, O8, O18 et O78) qui représentent 56,5% des APEC (SCHOULER *et al.,* 2012).

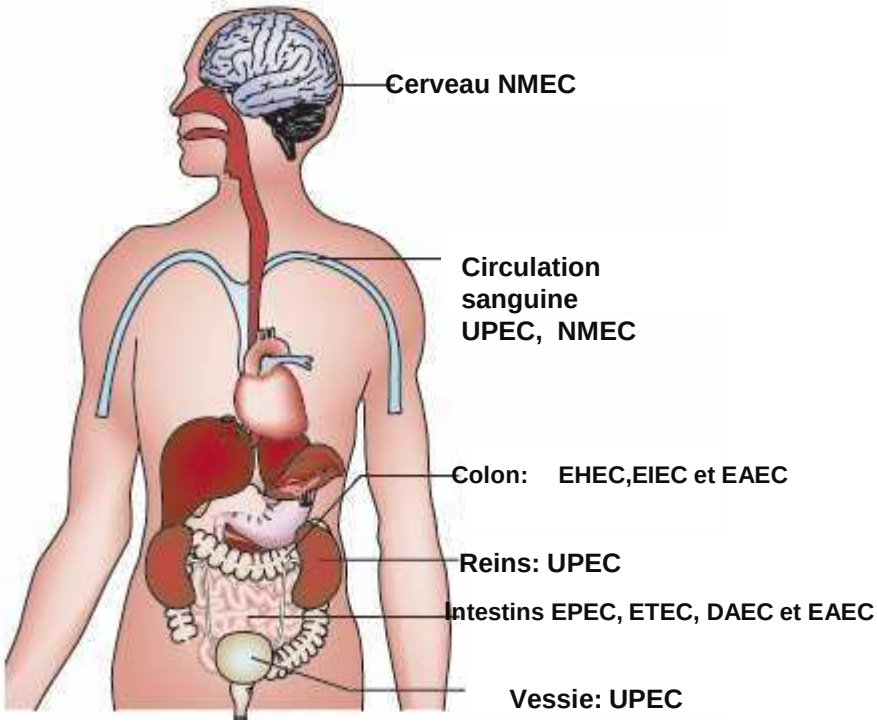


Figure 1: Différents groupes de *Escherichia coli* pathogènes.

E. coli entéropathogène (EPEC), *E. coli* entérotoxinogène (ETEC) et *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) colonisent l'intestin et sont à l'origine de diarrhées, alors que *E. coli* entérohémorragique (EHEC) et *E. coli* entéroinvasif (EIEC) colonisent plutôt le colon ; *E. coli* entéroaggrégatif (EAEC) peut coloniser les deux. *E. coli* uropathogène (UPEC) colonise le tractus urinaire jusqu'à la vessie et est à l'origine de cystites. En fonction des facteurs de virulence hébergés par les souches, les UPEC peuvent remonter jusqu'aux reins et entraîner une pyélonéphrite. De plus, les UPEC comme les *E. coli* à l'origine de méningites néonatales (NMEC) peuvent entraîner une septicémie (d'après CROXEN et FINLAY, 2010).

- **La colibacillose aviaire**

Aujourd'hui, la colibacillose aviaire est à travers le monde, l'une des principales causes de mortalité et de morbidité associée à de substantielles pertes économiques (DZIVA et STEVENS, 2008 ; MELLATA *et al.,* 2012 ; GUABIRABA et SCHOULER, 2015).

Ces pertes économiques sont dues à des diminutions des taux d'éclosion et de production d'œufs, à la mortalité, la saisie à l'abattoir et les coûts associés au traitement et à la prophylaxie (GUABIRABA et SCHOULER, 2015).

Ces dernières années, beaucoup d'efforts de recherches ont été orientés sur la possible transmission de l'animal vers l'homme des souches ExPEC (ANTAO *et al.,* 2008). La volaille est considérée comme la principale source animale de contamination des humains par les souches ExPEC (MOULIN-SCHOULEUR *et al.,* 2007 ; BELANGER *et al.,* 2011 ; BERGERON *et al.,* 2012 ; MORA *et al.,* 2013).

Les APEC sont responsables de colibacilloses, un syndrome complexe caractérisé par des lésions de multiples organes, aussi bien chez les oiseaux domestiques que sauvages et dans tous les types de productions de volaille (MOULIN-SCHOULEUR *et al.* 2006 ; EWERS *et al.,* 2009 ; MORA *et al.,* 2013 ; GUABIRABA et SCHOULER, 2015).

Les principaux signes cliniques chez la volaille associés à ce syndrome est la fièvre, la dépression, les excréments jaunâtres ou verdâtres et les lésions des organes internes (STORDEUR et MAINIL, 2002 ; MELLATA, 2013).

Les APEC peuvent causer des types localisées et systémiques de colibacilloses en agissant comme un agent pathogène primaire ou secondaire (GUABIRABA et SCHOULER, 2015).

Les formes les plus typiques de l'infection localisée en tant qu'agent primaire sont des infections de l'appareil reproducteur, l'omphalite et l'infection du sac vitellin. Les infections du tractus génital incluent la salpingite, la péritonite et la salpingopéritonite très commune chez les poules pondeuses ; la péritonite est un syndrome plus aigu et septicémique qui affecte les poules pondeuses lors de la production des œufs. La voie d'infection par les APEC semble respiratoire et vaginale (MORA *et al.,* 2013 ; GUABIRABA et SCHOULER, 2015). L'omphalite et l'infection du sac vitellin se produit par contamination fécale des œufs ou *in ovo* durant la formation des œufs quand les poules pondeuses souffrent de salpingopéritonite (GUABIRABA et SCHOULER, 2015).

L'infection initiale survient généralement 4 à 9 semaines pour les poulets de chair et chez les poules pondeuses lors du pic de la production d'œufs à environ 30 semaines (ANTAO *et al.,* 2008).

En tant que bactérie opportuniste secondaire, *E.coli* peut jouer un rôle dans certaines infections osseuses et articulaires affectant les élevages. Cependant le syndrome le plus commun et le plus étudié de la colibacillose est la forme systémique qui commence dans les voies respiratoires notamment chez le poulet et la dinde et induit une colisepticémie (MOULIN-SCHOULEUR *et al.,* 2007 ; GUABIRABA et SCHOULER, 2015).

La colisepticémie survient chez les oiseaux stressés et immunodéprimés en raison d'une détérioration de l'environnement tels que l'accumulation de poussière et de l'ammoniac, d'une infection à Mycoplasme, d'infections virales par les virus de la bronchite infectieuse et le virus de la maladie de Newcasle. Ces facteurs biotiques et abiotiques pourraient conduire à une altération de la réponse immunitaire et/ou une deciliation des cellules épithéliales trachéales.

Ce déficit dans les défenses mécaniques épithéliales favorise la colonisation du tractus respiratoire supérieur et inférieur, par les APEC présentes dans l'environnement et la survenue de l'infection respiratoire. Les APEC traversent l'épithélium respiratoire et pénètrent profondément dans la muqueuse et la sous muqueuse pour atteindre le flux sanguin causant ainsi une septicémie (GUABIRABA et SCHOULER, 2015).

Les volailles survivant à une septicémie développent une aérosacculite subaiguë fibrinopurulente, une péricardite et une périhépatite. Bien que l'aérosacculite soit observée, il est difficile de savoir si elle résulte d'une exposition respiratoire primaire ou d'extension de polysérosite. En outre, les séquelles de la colisepticémie peut également mener à l'arthrite, l'ostéomyélite, la péritonite et la salpingite (BARNES, 2008 ; DZIVA et STEVENS, 2008 ; GUABIRABA et SCHOULER, 2015).

- **Les facteurs de virulence des APEC**

Les caractéristiques génétiques qui définissent l'APEC ne sont pas complètement élucidées. Comme les ExPEC humaine, les souches APEC peuvent être génétiquement très diversifiées et avoir un répertoire distinct de gènes de virulence (MELLATA *et al.*, 2013).

Les APEC possèdent le plus souvent des gènes de virulence semblables à ceux des ExPEC humain pouvant occasionner des infections chez l'homme (JOHNSON *et al.*, 2012 ; ASLAM *et al.*, 2014 ; NANDANWAR *et al.*, 2014 ; ZHU *et al.*, 2014).

La colibacillose aviaire commence généralement comme une infection respiratoire qui évolue à l'infection généralisée résultant des lésions fibrinopurulentes des organes internes. Jusqu'à présent, les mécanismes de virulence APEC ne sont pas encore bien définis. La colonisation de la trachée et sacs d'air est considérée comme la première étape d'une infection systémique par l'APEC, suivie de la colonisation du foie et le péricarde, avec bactériémie ultérieure (GUABIRABA et SCHOULER, 2015).

Divers facteurs de virulence ont été identifiés. Pour certains d'entre eux leur implication dans la pathogénèse a été expérimentalement prouvée en utilisant des modèles d'infection expérimentales (GUABIRABA et SCHOULER, 2015 ; MITCHELL *et al.*, 2015). Cependant dans la plupart des cas la phase précise de la pathogenèse dans laquelle ils jouent un rôle reste encore inconnue (DZIVA *et al.*, 2013 ; GUABIRABA et SCHOULER, 2015).

Les facteurs de virulences potentiels associés aux APEC incluent :

- Les adhésines requises notamment pour la colonisation de la trachée et du poumon : les *fimbriae* de type 1 et P, les curli, les *fimbriae* Stg, l'autotransporter adhesion Aat, l'hémaglutinine Tsh (temperature sensitive hemaglutinin) et le pilus ECP (*E.coli* common pilus, la protéine yqi (adhesin I), les *fimbriae* Dr, l'Autotransporter AatA (Autotransporter adhesion) (EWERS *et al.*, 2003 ; ANTAO *et al.*, 2009 ; WANG *et al.*, 2011 ; GUABIRABA et SCHOULER, 2015).

- Les systèmes d'acquisition du fer tels que l'aérobactine, l'entérobactine, la salmocheline, le système de transport du fer Sit (Salmonella Iron Transporter), la protéine de transport ChuA pour l'utilisation de l'hème. Ces facteurs sont requis pour l'invasion du système vasculaire via le poumon et les sacs aériens endommagés, qui sont une porte d'entrée des bactéries, et pour la survie dans les fluides biologiques où le fer est à faibles concentrations (SABRI *et al.,* 2008 ; GAO *et al.,* 2012 ; GUABIRABA et SCHOULER, 2015).

- La résistance au sérum et l'activité anti-phagocytaire par le biais des protectines tels que les capsules (antigène K1), les lipopolisaccharides (LPS), la production de protéines de surfaces Omp A, les protéines codées par le plasmide ColV telle que le déterminant de la résistance au complément Iss (increased serum survival) et Tra T, une protéine d'exclusion de surface (MELLATA *et al.,* 2003).

- Les toxines peuvent aussi être produites par les APEC. C'est le cas des toxines CLT (Chicken Lethal Toxin*),* Vat (Vacuolating Autotransporter Toxin), l'hémolysine E, les colicines et la toxine CNF1 (cytotoxic necrotising factor 1) (DHO- MOULIN et FAIRBROTHER, 1999 ; EWERS *et al.,* 2003 ; DZIVA et STEVENS, 2008 ; NAKAZATO *et al.,* 2009).

- Dans le métabolisme, la présence du système de transport du phosphate (pts), le transporteur de nitrite (NirC), le métabolisme du sucre (Aec35-37) (GUABIRABA et SCHOULER, 2015).

- Dans des systèmes de régulation appelés TCS (two components system) comme le système RstA/RstB qui contribue à la survie extraintestinale et dans des conditions de stress ; le système PhoB/PhoR jouant un rôle dans la médiation de la détection du Phosphate inorganique et le système BarA/UvrY qui régule différents facteurs de virulence tels que la production d'hémolysine et du LPS (Lipopolysaccharide) (HERREN *et al.,* 2006 ; CREPIN et *al.,* 2008 ; GUABIRABA et SCHOULER, 2015).

Divers autres facteurs de virulence ont également été répertoriés ; on citera IbeA et IbeB (pour la résistance au stress oxidatif)) SsrA/SmpB (un système de contrôle de la traduction des protéines), Type VI le système de sécrétion de type IV (rôle dans l'expression des fimbriae de type 1), un régulateur Transcriptionnel YjjQ (impliqué dans la régulation de l'abssorption du fer), le Flagelle (FliC) (DZIVA *et al.,* 2013 ; GUABIRABA et SCHOULER, 2015).

Il apparait à travers la littérature, que les facteurs de virulence ne sont pas tous présents dans un même isolat et qu'il n'y a pas un unique ou un ensemble de gènes de virulence spécifiques systématiquement associés aux APEC, d'où la difficulté du diagnostique et de la mise en œuvre de traitement ciblant tous les isolats (SCHOULER *et al.,* 2012 ; GHUNAIM *et al.,* 2014 ; GUABIRABA et SCHOULER, 2015 ; HUJA *et al.,* 2015) (figure 2). Cependant, il a été démontré que cinq gènes localisés sur le plasmide ColV sont associés aux souches APEC, ce qui a permis d'établir un outil de diagnostic prédictif rapide. Il s'agit de : *iroN* (Salmochelin siderophore receptor gene), *ompT* (outer membrane protease gene), *hlyF (*avian hemolysin), *iss* (increased serum survival gene) et *iutA* (Aerobactin siderophore receptor gene) (JOHNSON *et al.,* 2008a). En effet, certaines combinaisons de

gènes de virulence sont de bons prédicteurs des souches APEC (GUABIRABA et SCHOULER, 2015). SCHOULER *et al.* (2012) ont établi quatre associations de gènes qui ont permis le diagnostic de 70,2% des APEC. De même l'association des facteurs de virulence *sitAP (iron acquisition locus), ompT, hlyF* and *iroN* a été établie chez 30 des 50 isolats APEC cliniques dans l'étude de DISSANAYAKE *et al.*, (2014).

- **Transmission des APEC et risque zoonotique**

Les infections de l'APEC peuvent poser un risque pour les humains, en raison de leur potentiel zoonotique de leur capacité à infecter les hôtes humains (BERGERON *et al.*, 2012 **;** MELLATA, 2013).

Les aliments contaminés et plus particulièrement les produits de la volaille (viande et œufs) semblent être un vecteur potentiel de souches ExPEC pathogènes pour l'homme (BERGERON *et al.*, 2012 ; MORA *et al.*, 2013 ; MITCHELL *et al.*, 2015). Il est probable d'en retrouver dans différentes matrices environnementales. En effet, une dissémination dans l'environnement via les effluents d'élevage, d'abattoirs urbains est tout à fait envisageable du fait que ces souches sont excrétées via les fèces. La présence d'ExPEC dans différents écosystèmes montre que la dissémination de ces pathogènes dans l'environnement est possible même dans des zones relativement isolées (BELANGER *et al.*, 2011 ; BERGERON *et al.*, 2012).

Les souches isolées de cas cliniques humains et animales de maladies extra-intestinales partagent de nombreux facteurs de virulence.

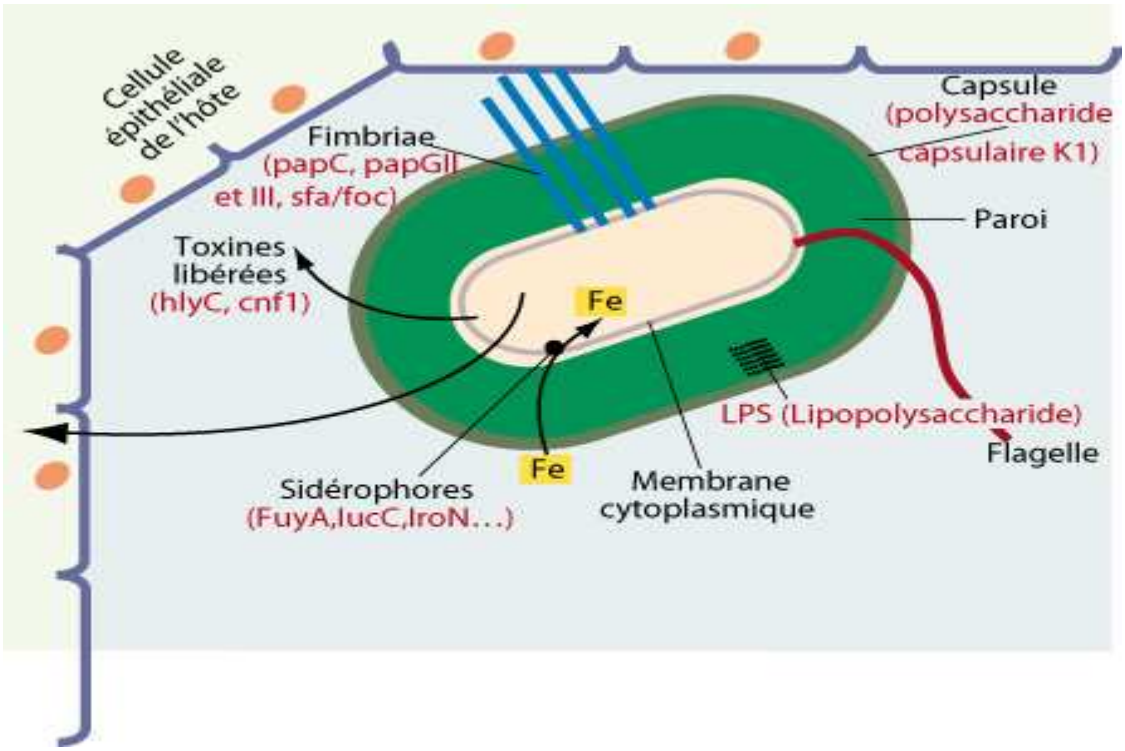


Figure 2 : Principaux facteurs de virulence impliqués dans le développement des processus infectieux chez les ExPEC (extraintestinal pathogenic *E. coli*) (JAUREGUY, 2009).

De manière générale, il semblerait que les souches APEC et UPEC ont en commun des sérogroupes impliqués dans les pathologies humaines (O1, O2, O8, O18) ainsi que de nombreux facteurs de virulence (MELLATA, 2013). Parmi ces facteurs de virulence, on retrouve les gènes codant pour les sidérophores et l'aérobactine *iutA* et son récepteur *iroN* portés par un plasmide chez les APEC ces gènes seraient donc facilement transmissibles d'une souche à l'autre (RODRIGUEZ-SIEK *et al.,* 2005). Le risque zoonotique des isolats APEC est en effet inhérent au fait que certaines ExPEC humains et aviaires ont un background phylogénique similaire et partagent des gènes communs et ce en plus de la présence de plusieurs grands plasmides, une caractéristique définissant les APEC (JOHNSON *et al.,* 2007 ; MELLATA *et al.,* 2009 ; MELLATA *et al.,* 2012 ; MELLATA, 2013 ; HUJA *et al.,* 2015). Les preuves du potentiel zoonotique des souches ExPEC portées par les volailles, oiseaux et animaux de compagnie (chien, chat) sont relativement nombreuses (BELANGER *et al.,* 2011 ; BERGERON *et al.,* 2012).

Les volailles semblent donc être un réservoir de souches potentiellement uropathogènes pour l'homme car elles présentent des facteurs de virulence communs parmi lesquels les *fimbriae* de type P, les sidérophores, la capsule de protection K2 et dans une moindre mesure les *fimbriae* S et F1C (MOULIN-SCHOULEUR *et al.,* 2007 ; BERGERON *et al.,* 2012 ; MELLATA, 2013 ; HUJA *et al.,* 2015).

4.3- La classification phylogénique

Les souches d'*E. coli* peuvent être assignées à 6 principaux groupes phylogéniques désignés A, B1, B2, D, E et F (CLERMONT *et al.,* 2011). Les souches extra-intestinales appartiennent au groupes B2 et D et portent plus de facteurs de virulence que les autres groupes (CLERMONT *et al.,* 2000 ; NOWROUZIAN *et al.,* 2005 **;** MELLATA, 2013). Les *E. coli* commensales sont la plupart groupées dans le phylogroupe A (CROXEN et FINLAY, 2010).

Cependant les pathotypes de *E.coli* ne sont pas toujours tous groupés ensemble ; ETEC a été trouvé pour le groupe avec des groupes phylogénétiques A et B1 tandis que les EAEC sont regroupés en groupes phylogéniques A, B1, B2 et D ce qui démontre le caractère disparate du génotype des *E. coli* pathogènes (CROXEN et FINLAY 2010).

Une technique d'amplification par PCR de trois fragments d'ADN (*chuA*, *yjA* et *TSPE4.C2*), PCR triplex, a été mise au point afin de déterminer plus simplement l'appartenance de certains isolats aux quatre groupes phylogénétiques majeurs (B2, D, B1 et A) **(**Figure 3) (CLERMONT et FINLAY, 2000).

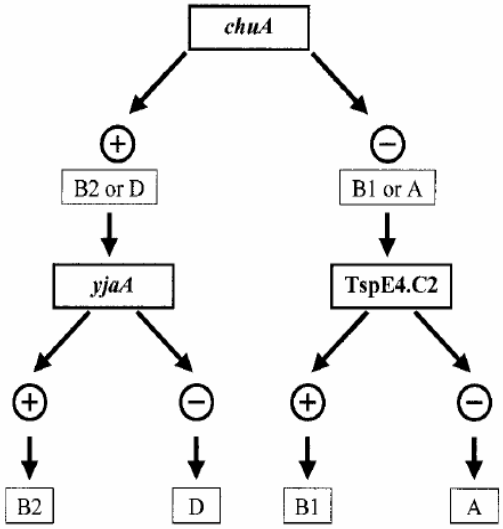


Figure 3 : Dichotomie permettant de déterminer le groupe phylogénétique de souches de *E. coli* par amplification génique (PCR) (CLERMONT *et al.*, 2000).

Chapitre 2 : Antibiotiques et Résistance aux antibiotiques

1. Généralités sur les antibiotiques

1.1-Notion d'antibiotique

Le mot antibiotique (du Grec anti : contre, bio : la vie) est défini comme étant un agent antimicrobien naturel, d'origine biologique et /ou synthétique et/ou semi synthétique (LAVIGNE, 2007) qui à faible concentration, agit sur des bactéries sans être toxique pour l'hôte.

L'importance des antibiotiques est considérée en raison de leur efficacité en médecine humaine et animale. Ils ont contribué à l'essor de l'élevage et constituent la première classe de médicaments vétérinaires dans le monde. Ils empêchent la multiplication des bactéries (bactériostase) ou entrainent leur destruction (bactéricide) par une action au niveau d'une ou plusieurs étapes métaboliques indispensables à la vie de la bactérie (LAVIGNE, 2007).

1.2- Caractéristiques des antibiotiques

1.2.1-Toxicité sélective

Pour être efficace un agent chimiothérapeutique doit avoir une toxicité sélective ; il doit tuer ou inhiber le germe pathogène en portant le moins possible préjudice à l'hôte. Cette sélectivité résulte de la présence de différences biochimiques importantes entre les bactéries et les cellules eucaryotes (NEAL, 2003).

1.2.2- Spectre d'activité

Il existe deux types de spectre :

Le spectre large : regroupe les antibiotiques qui inhibent un nombre élevé de bactéries Gram+ et Gram-.

- Le spectre étroit : attribué aux antibiotiques agissant sur un nombre limité de germes.

Le spectre d'activité peut être évolutif en fonction de l'apparition ou du développement d'un ou plusieurs mécanismes de résistance

1.2.3-Activité antibactérienne

Cette activité est définie comme étant l'effet de l'antibiotique sur une bactérie qui va de l'inhibition de la croissance bactérienne après 18 à 24h de culture à la mort de la bactérie après 18h d'incubation à 37°C (BRISABOIS *et al.*, 2006).

L'efficacité d'un agent chimiothérapeutique contre un microorganisme peut être fournie par la concentration minimale inhibitrice (CMI).

La CMI est la concentration la plus faible d'un antibiotique capable d'empêcher le développement d'un microorganisme particulier. Cet effet est réversible, c'est-à-dire que la croissance des microorganismes peut reprendre dès que l'antibiothérapie est arrêtée.

D'autre part, la concentration minimale bactéricide (CMB) est la concentration la plus faible, capable de tuer le microorganisme. Cette action dépend de deux paramètres, à savoir la concentration et le temps (YENNI, 2003).

1.3- Utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire

Les antibiotiques peuvent être utilisés de quatre façons différentes avec des objectifs variables : curatifs, préventifs et facteurs de croissance (SHWARZ et CHASLUS, 2001 ; FABREGA *et al.*, 2008).

1.3.1- Médicament vétérinaire

L'usage thérapeutique (antibiothérapie) a pour objectif l'obtention de la guérison des animaux malades et la réduction de la mortalité. Ceci contribue au développement de l'élevage industriel moderne et permet la maitrise de nombreuses pathologies, parfois transmissibles à l'Homme lors des infections zoonotiques (SHWARZ et CHASLUS, 2001).

1.3.2-Prophylaxie

Les antibiotiques peuvent, parfois, être administrés à des périodes critiques de leur vie sur des animaux soumis à une pression de contamination régulière et bien connue (après un transport ou un mélange) après contrôle de la nature de l'infection par des examens de laboratoire. Ce traitement permet d'éviter totalement l'expression clinique.

Cette modalité d'utilisation des antibiotiques est adaptée à une situation sanitaire donnée et doit être provisoire (CHAUVIN *et al*., 2006).

1.3.3-Métaphylaxie

Lorsqu'une infection collective très contagieuse se déclare dans un élevage, les animaux exposés ne présentant pas de signes cliniques (porteurs sains ou en incubation) font l'objet d'un traitement au même temps que ceux qui sont malades. Cette pratique est très fréquente chez la volaille ; la métaphylaxie est mise en oeuvre à partir d'un seuil d'atteinte des animaux au sein du lot de 10-15% de l'effectif (CHAUVIN *et al.,* 2006).

1.3.4- Facteur de Croissance

Les antibiotiques administrés à faible doses dans l'alimentation animale ont un effet préventif sur certaines infections bactériennes et modifient la composition de la microflore intestinale entrainant une meilleure assimilation des aliments pour les animaux. Ces effets protecteurs entrainent un effet zootechnique, sous forme d'une augmentation de la vitesse de croissance de quelques pourcents. Leur administration requiert leur administration à des doses sous-thérapeutiques et qui s'étale sur une longue période (SHWARZ et CHASLUS, 2001).

2- Les antibiotiques

Il existe plus de 10 000 molécules antibiotiques mais une centaine seulement est efficace et utilisables à des fins thérapeutiques. La plupart des antibiotiques sont naturels et produits par les procaryotes (actinomycètes surtout ou eubactéries), les champignons (17 % des antibiotiques), les végétaux supérieurs, les animaux et les lichens. Les antibiotiques sont divisés en familles : les bêta-lactamines, les aminosides, les macrolides, les cyclines, les quinolones, les polypeptides, les glycopeptides, les phénicolés, les nitro-furanes. Leurs modes d'action sont variables (SANDERS *et al.,* 2011). On distingue alors les antibiotiques agissant sur : la paroi bactérienne, la membrane cellulaire, la réplication de l'ADN, la synthèse protéique (sous unités ribosomiale) etc…

La suite de cette revue bibliographique abordera les familles d'antibiotiques concernés par cette étude.

2.1- Les béta-lactamines

Les bêta-lactamines constituent la famille d'antibiotiques la plus importante, aussi bien par le nombre et la diversité des molécules utilisables que par leurs indications en thérapeutique et en prophylaxie des infections bactériennes. Cette famille, qui regroupe les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames, est caractérisée par la présence constante du cycle β lactame associé à des cycles et des chaînes latérales variables qui expliquent les propriétés pharmacocinétiques et le spectre d'activité des différents produits.

Les β-lactamines demeurent à l'heure actuelle les molécules les plus utilisées dans le traitement des infections dues aux entérobactéries. Cette large utilisation est principalement liée à leur faible toxicité et à leur pouvoir bactéricide.

Les bêta-lactamines constituent une famille très complexe dont la structure du nayau de base comportant toujours le cycle β lactame, permet de distinguer trois grands groupes : les dérivés, de l'acide 6-aminopénicillanique, les dérivés de l'acide 7-aminocéphalosporanique et les monobactames (BRYSKIER, 1999 ; CAVALLO *et al.*, 2004).

2.1.1-Les dérivés de l'acide 6-amino-pénicillanique (figure 4)

Leur noyau de base associe un cycle bêtlalactame à un cycle thiazolidine, spécifique des pénicillines donnant une structure à trois nayaux. Selon que ce noyau est un péname, un pénème ou un clavame, diverses substitutions confèrent à la molécule des propriétés et une activité antibactérienne variable expliquant les variaions du spectre d'activité antibactérien.

- Les pénames ou pénicillines sont une vaste famille de produits ayant en commun le noyau péname caractéristique des pénicillines. La nature du radical fixé sur le carbone 6 permet de distinguer les produits de ce sous groupe. Il y a lieu de distinguer au moins sept sous groupes différenciés par leur structure, leur stabilité, leur spectre et leur activité antibactérienne (CAVALLO *et al.*, 2004).

- Les clavames ou oxapénames sont issus de la substitution du soufre en position 1 du noyau péname par un oxygène ; l'acide clavulanique est la seule molécule naturelle produite *Streptomyces cattleya* actuellement commercialisée dans ce groupe. L'importance de l'acide clavulanque réside plus dans son rôle d'inhibiteur des bêtalactamases de Ambler par fixation sur le site actif que de son rôle antibiotique. Cette molécule est administrée en association avec une autre bêta-lactamine comme l'amoxicilline ou la ticarcilline dont l'activité est rétablie en présence de souches bactérienne productrices de bêtalactamases (ALLAIN, 2008).

- Pour **les pénèmes** la substitution du soufre en position 1 du noyau péname par un atome de carbone est à l'origine du noyau pénème ; les carbapénèmes les plus connus sont l'imipénème, le méropénème et l'ertapénème. Ces molécules sont caractérisées par leur puissance due à leur affinité élevée aux protéines cibles, leur large spectre antibactérien et une grande stabilité vis-à-vis de la plupart des bêtalactamases (CAVALLO *et al.*, 2004 ; ZHANEL *et al.*, 2005).

2.1.2-Les dérivés de l'acide 7-amino-céphalosporanique

Leur noyau de base associe un cycle β -lactame à un cycle dihydrothiazine pour former l'acide 7-aminocéphalosporanique ou 7-ACA (noyau céphème), qui distingue les céphalosporines des pénicillines. Suivant les substituants en R3 et R4, on distingue les céphalosporines, les céphamycines et les oxacéphèmes (figure 5). La particularité du noyau céphème et les nombreux radicaux de substitution proposés expliquent les propriétés antibactériennes différentes des

céphalosporines, justifiant leur distinction fonctionnelle en plusieurs générations, de spectre et d'intérêt clinique variables (CAVALLO *et al*., 2004).

- Les céphalosporines de première génération ont un spectre limité aux cocci à Gram positif, essentiellement les streptocoques et les staphylocoques sensibles à la méthicilline et à quelques entérobactéries ne produisant pas de céphalosporinase inductible comme *E. coli*, les salmonelles, *P. mirabilis* ou *Klebsiella spp*. Elles sont hydrolysées facilement par les bêtalactamases acquises.

Les principaux produits sont la céfalotine, la céfazoline et la céfapirine pour les formes parentérales, le céfaclor, le céfadroxil et la céfalexine pour les formes orales.

- Les céphalosporines de deuxième génération ont un spectre un peu élargi au sein des entérobactéries, avec des variations suivant les molécules. Les céphamycines comme la céfoxitine et le céfotétan leur sont rattachées du fait de leur spectre très proche, étendu à certaines entérobactéries productrices de bêtalactamase à spectre étendu et aux anaérobies à Gram négatif.
- Les céphalosporines de troisième génération se distinguent par un accroissement important de leur spectre antibactérien et par leur stabilité à la plupart des bêtalactamases comme les pénicillinases de type TEM ou les céphalosporinases chromosomiques des entérobactéries, de *P. aeruginosa* et *A. baumannii*. Les principales sont le céfotaxime, la ceftriaxone, la ceftizoxime, le céfixime, la cefpodoxime et la ceftazidime (BUSH, 2001).

- Les Céphalosporines de quatrième génération possèdent une stabilité accrue contre certains types de bêtalactamases produites par *Pseudomonas aeruginosa* et d'autres bactéries entériques (les principales molécules sont le céfépime et le céfpirome).

- Les céphamycines

Les principales molécules sont la céfoxitine et le céfotétan qui sont rattachées, du fait de leurs propriétés, comme indiqué ci-dessus, aux céphalosporines de deuxième génération. Elles sont caractérisées par un radical alpha-méthoxy en position 7. Ce radical protège le noyau β -lactame de l'hydrolyse par les bêtalactamases, mais est responsable d'un effet inducteur intense sur les céphalosporinases chromosomiques.

2.1.3- Les monobactames

Leur noyau se caractérise par la présence du noyau monocyclique, azétidine, limité au cycle β -lactame. Seul l'aztréonam est à l'heure actuelle prescrit. Une série de substitutions latérales sur le noyau monobactame lui confère ses caractéristiques originales. Une chaîne latérale aminothiazolyl lui confère une très bonne activité contre les bactéries à Gram négatif aérobies et plus particulièrement contre les entérobactéries pour lesquelles il possède une activité comparable à celle des céphalosporines de troisième génération en raison de sa bonne stabilité vis-à-vis des bêtalactamases. Son activité s'étend à *P. aeruginosa*. Il n'a en revanche aucune activité sur les bacilles à Gram positif et les anaérobies (CAVALLO *et al*., 2004).

2.1.4-Mécanisme d'action des bêta-lactamines

- **Pénétration des bêta-lactamines à travers la membrane externe**

Chez les bactéries à Gram négatif, les bêta-lactamines doivent traverser la membrane externe pour atteindre les PLP cibles. Cette membrane agit comme une barrière hydrophobe et les bêta-lactamines, qui sont le plus souvent des molécules hydrophiles, vont traverser cette barrière essentiellement par la voie des porines. Les porines représentent une très forte proportion des protéines transmembranaires de la membrane externe bactérienne (environ 10^5 chez *E. coli*) et

jouent un rôle-clé dans la pénétration des bêta-lactamines. Leur regroupement en trimères pour former des canaux transmembranaires avec une structure en tonneau et un canal central hydrophile rempli d'eau permet la diffusion au travers de la membrane de divers solutés hydrophiles, dont les bêta-lactamines hydrophiles.

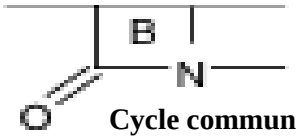
Après avoir traversé la membrane externe, les bêta-lactamines diffusent facilement à travers le peptidoglycane dont la structure laisse passer des molécules de 100 000 daltons alors que la taille des bêta-lactamines varie de 300 à 700 daltons. Toutefois elles ne peuvent atteindre leur cible que si elles ne sont pas hydrolyser par les bêtalactamases, des enzymes périplasmiques produites naturellement ou acquises (BUSCH *et al.,* 1995 ; CAVALLO *et al.,* 2004).

- **Au niveau de la membrane cytoplasmique**

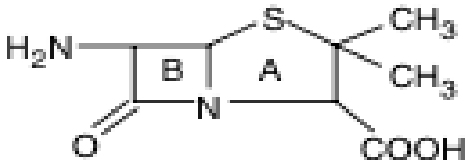
D'un point de vue stéréochimique, les bêta-lactamines sont des analogues de la terminaison D- alanine -D- alanine des précurseurs de la synthèse du peptidoglycane. Elles présentent une analogie structurale entre le noyau β -lactame et le dipeptide terminal D-alanine-D-alanine du pentapeptide constitutif du peptidoglycane. Ce sont des molécules qui interfèrent avec les étapes finales de la synthèse du peptidoglycane. Leur reconnaissance par les transpeptidases et les carboxypeptidases (PLP) présentes à la surface de la membrane cytoplasmique aboutit à la fixation du cycle β -lactame sur le site actif de ces enzymes cibles, qui comporte en général une sérine. Cette fixation entraîne une ouverture du cycle β -lactame par rupture de la liaison amide et une acylation du site actif sérine avec formation d'un complexe pénicilloyl-enzyme covalent qui aboutit à l'inactivation du site actif de l'enzyme, provoquant une inhibition de la synthèse du peptidoglycane et l'arrêt de la croissance bactérienne. La fixation est irréversible et l'antibiotique se comporte comme un substrat suicide. Les bêta-lactamines n'ont en revanche pas d'action sur la transglycosylation (figure 6).

L'arrêt de la synthèse du peptidoglycane, qui résulte de la fixation sur les PLP, va entraîner un arrêt de la croissance bactérienne qui correspond à l'effet bactériostatique de l'antibiotique. L'action bactéricide des bêta-lactamines sur les bactéries sensibles est liée à une dégradation du peptidoglycane qui conduit à une lyse de la bactérie. Si la lyse bactérienne peut théoriquement survenir par l'action des forces osmotiques sur une paroi altérée, le processus de lyse bactérienne résulte surtout de la mise en jeu d'un système faisant intervenir des autolysines. Ces autolysines sont des hydrolases endogènes présentes chez toutes les bactéries qui, sous le contrôle strict de mécanismes de régulation, peuvent dégrader à plusieurs niveaux la structure du peptidoglycane bactérien. Elles sont actives au cours de la phase de croissance bactérienne, ce qui explique que les bêta-lactamines n'ont en règle générale pas d'action bactéricide sur les bactéries en phase stationnaire, mais uniquement sur celles en phase de croissance. Les bêtalactamines activeraient des protéines bactériennes appelées holines et inactiveraient également des inhibiteurs endogènes, des hydrolases et des autolysines bactériennes.

Le système de régulation des enzymes lytiques alors perturbé, les holines formeraient activement de canaux transmembranaires, permettant ainsi des fuites membranaires, le passage des hydrolases du peptidoglycane et la lyse de la bactérie (BAYLES, 2000 ; CAVALLO *et al.,* 2004 ; WILKE *et al.,* 2005 ; ZARAH *et al.,* 2010 ; NORDMANN *et al.,* 2012).

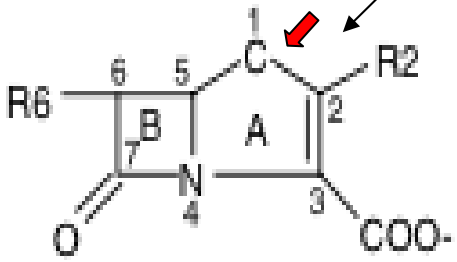


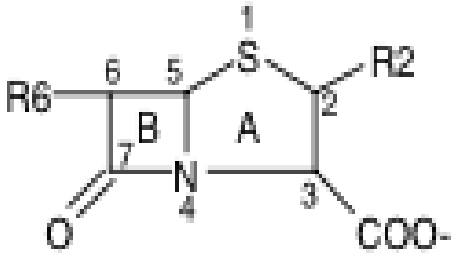
Cycle commun β-lactame (B)

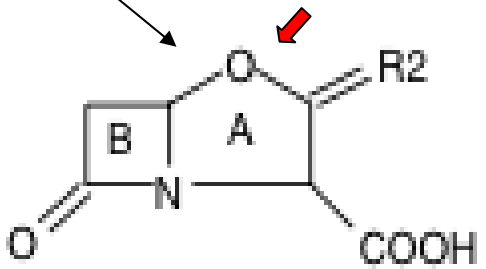


Dérivés de l'acide 6-amino-pénicillanique

Cycle β-lactame (B) + cycle thiazolidine (A)







Pénames (pénicillines)

- Pénicillines G et V sensibles aux pénicillinases
- Pénicillines antistaphylococciques résistantes aux pénicillinases : pénicillines M semi-synthétiques
- Pénicillines à large spectre (ampicilline et apparentés) et pénicillines actives sur *Pseudomonas aeruginosa* carboxypénicillines et uréidopénicillines)
- Amidinopénicillines (pivmécillinam)
- Pénicillines sulfones (sulbactam et tazobactam

Carbapénèmes

Clavames ou oxapénames

- Acide clavulanique

substitution

Figure 4 : Structures chimiques des bêtalactamines : dérivés de l'acide -6 -amino pénicillanique (CAVALLO *et al.*, 2004).

20

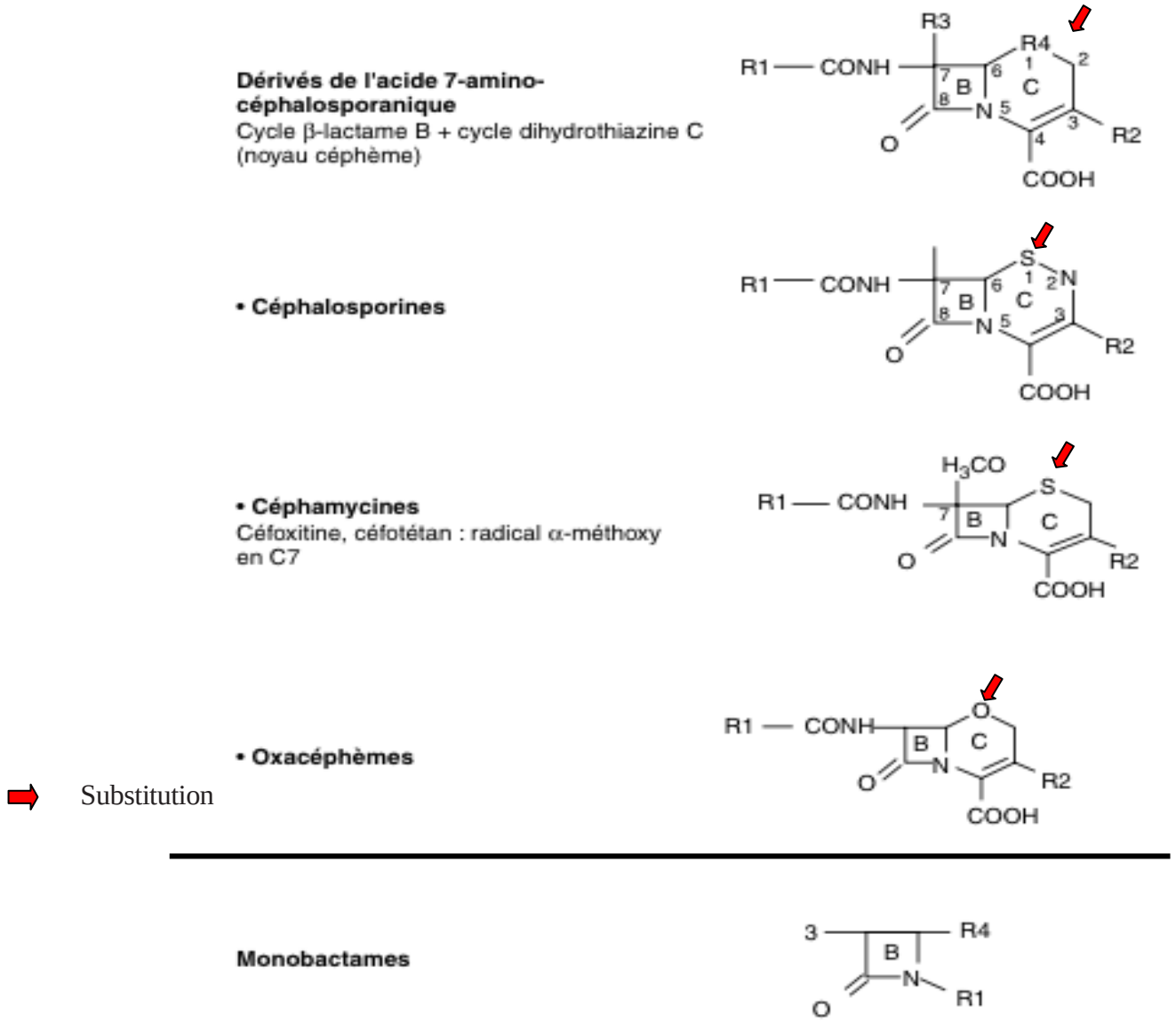


Figure 5 : Structures chimiques des bêtalactamines : dérivés de l'acide 7-amino-céphalosporanique et monobactames (CAVALLO *et al.*, 2004).

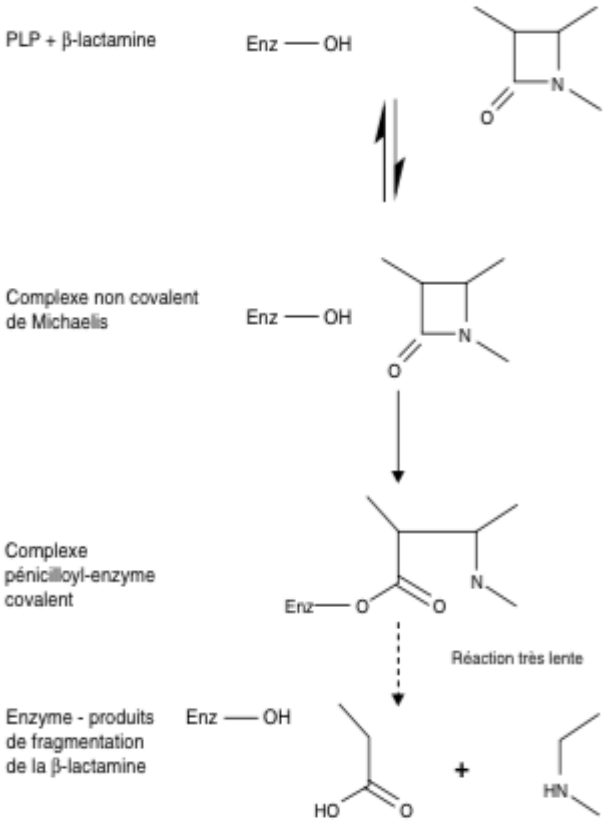


Figure 6 : Acylation du site actif sérine d'une protéine de liaison à la pénicilline (PLP) par une bêta-lactamine (CAVALLO *et al.,* 2004).

3 -La résistance aux antibiotiques

3. 1- Fondements de l'antibiorésistance

L'antibiorésistance se définit comme la capacité d'une souche bactérienne à survivre et à se multiplier, en présence d'une concentration élevée d'antibiotique. Un micro-organisme est considéré « résistant » lorsque sa concentration minimale inhibitrice (CMI) est plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce Elle apparait lorsqu'un antibiotique ne parvient plus à tuer ou à inhiber la croissance d'un microorganisme (CARLE, 2009).

La résistance est un caractère phénotypique qui peut être naturel ou acquis. La résistance naturelle concerne toutes les souches d'une espèce bactérienne. Elle détermine un phénotype sauvage. Sur le plan moléculaire, les gènes de résistance naturelle sont d'origine chromosomique. La résistance chromosomique est un caractère permanent transmissible aux cellules filles lors de la réplication bactérienne.

La résistance acquise ne concerne qu'une partie des souches d'une espèce bactérienne. L'acquisition d'un nouveau mécanisme de résistance résulte soit d'une mutation dans un gène chromosomique soit de l'acquisition d'un gène extrachromosomique (MESAROS *et al.,* 2005).

3.2- Support génétique de la résistance (figure 7)

Chacun des chromosomes, plasmides, éléments transposables ou intégrons peut être le support génétique de la résistance. Dans le premier cas, on parle de la résistance chromosomique. Dans le second cas, on parle de la résistance extra-chromosomique (PEMBROKE *et al.*, 2002 ; COCCHI *et al.*, 2007 ; CARATTOLI, 2013).

3.3-Types de résistance

- **La résistance naturelle ou intrinsèque**

Elle est programmée sur le génome bactérien, fixe et constante ; elle touche toutes les bactéries de l'espèce mais elle n'est pas ou peu transmissible sur un mode horizontal **(**MARTINEZ et BAQUERO, 2000).

- **La résistance acquise**

Elle apparait chez les bactéries jusqu'alors sensibles aux antibiotiques variés, consécutivement à des modifications dues à des mutations chromosomiques ou à une acquisition de gènes de résistance.

Lorsque la résistance est due à une mutation chromosomique, elle se caractérise par sa stabilité et son aspect héréditaire ; lors de la division bactérienne, la bactérie transmet son caractère d'antibiorésistance aux bactéries filles, elle concerne souvent une seule famille d'antibiotique. Dans le cas où la résistance résulte d'une acquisition de gènes, elle est instable en l'absence de facteur de sélection, transférable d'une bactérie à une autre appartenant parfois à des espèces différentes (MARTINEZ et BAQUERO, 2000 ; LAVIGNE *et al.*, 2009 ; COX et WRIGHT, 2013).

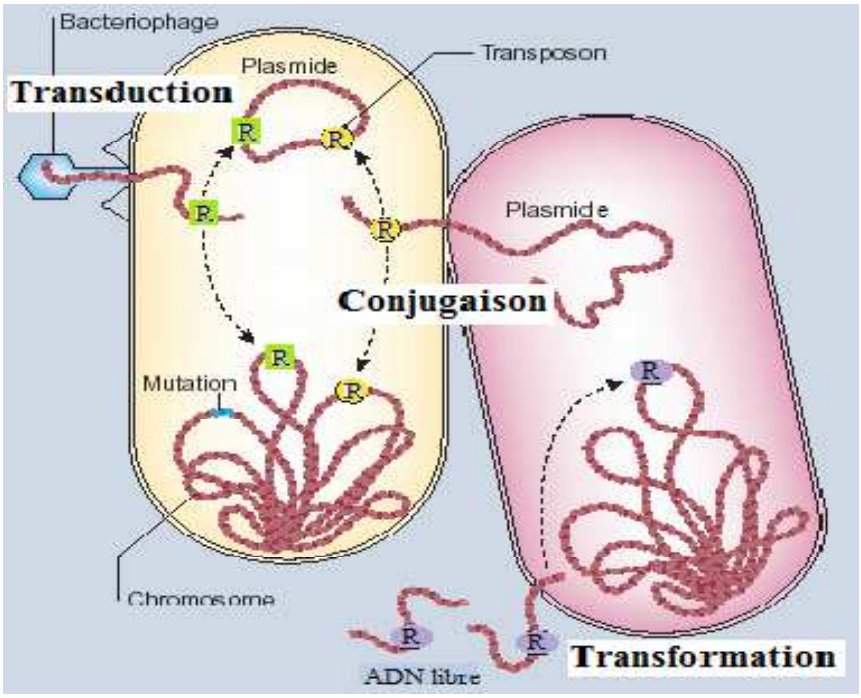


Figure 7 : Les différents modes d'acquisition des gènes de résistance (R) aux antibiotiques chez les bactéries (LEVY et MARSHALL, 2004).

3.3- Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques

Trois catégories de mécanismes président la résistance aux antibiotiques (figure 8).

3.3.1- Diminution de la quantité d'antibiotique atteignant la cible

- **Par baisse de la perméabilité membranaire**

La baisse de la perméabilité membranaire est un mécanisme de résistance rencontré essentiellement chez les bactéries à Gram négatif. Des modifications affectant la quantité ou la qualité des porines membranaires (protéines enchâssées dans la membrane externe formant des canaux transmembranaires) peuvent réduire la concentration de l'antibiotique au niveau de son site d'action.

- **Par Systèmes d'efflux** (figure 9)

Les systèmes d'efflux sont constitués de protéines jouant le rôle de pompe capable d'expulser l'antibiotique présent dans l'espace périplasmique ou dans le cytoplasme hors de la cellule. Ceux-ci être spécifiques d'un antibiotique ou d'une classe thérapeutique ou se comporter comme des systèmes de résistance multiple conférant une résistance à plusieurs groupes d'antibiotiques. Une bactérie peut posséder une multitude de pompes à efflux, constituants normal de la cellule bactérienne, similaires ou dissimilaires qui constituent des éléments majeurs de la résistance bactérienne intrinsèque au antimicrobiens (ZGURSKAYA et NIKAIDO, 2000).

3.3.2- Modification de la cible

La modification de la structure de la cible peut diminuer son affinité pour l'antibiotique. C'est un phénomène de résistance acquise fréquent qui concerne la résistance aux bêta-lactamines (PLP modifiées du pneumocoque), la résistance aux fluoroquinolones (mutations des topoisomérases II et IV), la résistance aux macrolides et antibiotiques apparentés (méthylation de la sous-unité 50S des ribosomes), la résistance aux glycopeptides (modification de la structure du précurseur du peptidoglycane).

- Protection de la cible

Il s'agit d'une protection réversible de la cible. Ce type de mécanisme est illustré par la résistance de type Qnr aux quinolones. Ces protéines protègent les topoisomérases II et IV en empêchant la fixation ultérieure des quinolones.

3.3.3-Modification ou Inactivation de l'antibiotique

C'est un mécanisme fréquemment décrit parmi les souches cliniques. L'inactivation de l'antibiotique est catalysée par des enzymes qui peuvent soit hydrolyser la molécule d'antibiotique (ex : bêta-lactamines) soit modifier sa structure en substituant de nouveaux groupements chimiques (ex : aminosides) (LAVIGNE *et al.,* 2002 ; CARLE, 2009 ; SCHMIEDER et EDWARDS, 2012 ; COX et WRIGHT, 2013).

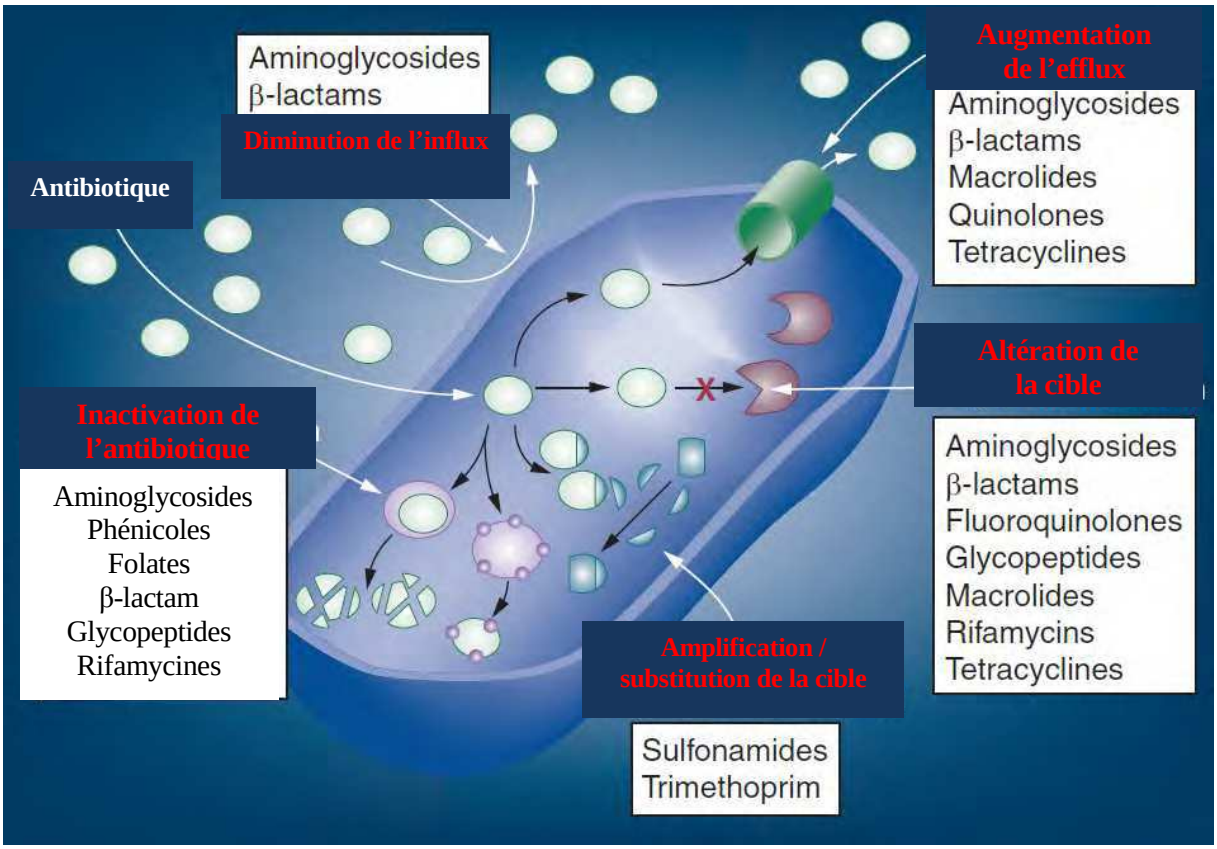
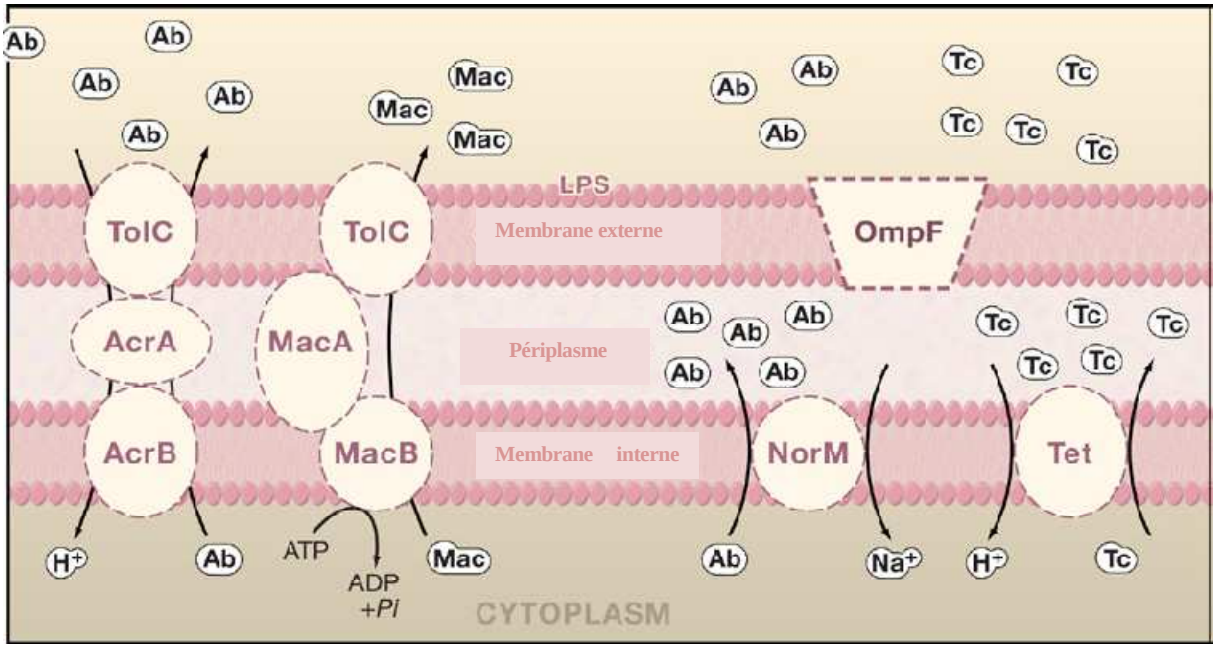


Figure 8 : Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries
(d'après SCHMIEDER et EDWARDS, 2012)



LPS, lipopolysaccharide; Ab, antibiotique ; Tc, tetracycline; Mac, macrolide ; outer membrane : membrane externe ; inner membrane : membrane interne ou cytoplasmique

Figure 9 : Les Systemes d'efflux des Antibiotiques (ALEKSHUN et LEVY, 2007)

Les systèmes Tet et AcrAB-TolC sont des transporteurs secondaires qui utilisent la force protons (H +) motrice tandis que NorM (*Vibrio* spp.), également un transporteur secondaire, exploite un gradient d'ions sodium (Na^+) pour conduire l'efflux.
MacAB est un transporteur principal qui utilise l'énergie dérivée de l'hydrolyse de l'ATP pour conduire l'efflux. Systèmes à composant unique (par exemple, NorM, Tet) transportent les substrats à travers la membrane intérieure où ils diffusent ensuite à travers les porines (par exemple, OmpF) ou la membrane externe vers le milieu extracellulaire.
Les systèmes multicomposants comme AcrAB-TolC et MacAB-TolC dirigent le transport de substrats **directement** dans le milieu extracellulaire.

4- La résistance des bactéries aux bêta-lactamines

4.1-Fondements

Chez les bacilles à Gram-négatif (BGN), trois types de mécanismes de résistance, principalement acquise, ont été identifiés : la faible affinité pour les PLP, les phénomènes d'imperméabilité et d'efflux et surtout l'inactivation enzymatique par des protéines,dénommées bêtalactamases en raison de leur affinité pour le noyau β-lactame (PHILIPPON, 2013).

La résistance enzymatique est universellement répandue au sein de très nombreux genres bactériens. Les bêtalactamases constituent le plus commun mécanisme de la résistance naturelle et acquise aux bêta-lactamines, en particulier chez des bacilles à Gram négatif (BGN) (MAJIDUDDIN *et al.*, 2002 ; VON BAUM et MARRE, 2005 ; PHILIPPON et ARLET, 2006 ; BUSH, 2010). De nombreux gènes gouvernant ces résistances sont chromosomiques ou portés par des plasmides ou de manière plus précise des gènes cassette situés dans un intégron comportant une CR (*common region*), ont été identifiées grâce à l'approche moléculaire (PHILIPPON et ARLET, 2005 ; PHILIPPON et ARLET, 2006).

Ces enzymes d'inactivation d'une considérable diversité (plus de 300 répertoriées) sont distribuées au sein de 4 classes A, B, C et D. Celles appartenant aux classes A, C et D sont des enzymes à sérine active, seule la classe B regroupant les métallo-bêta-lactamases (MBL) nécessitant les ions Zn^{++} pour leur activité (PHILLIPPON et ARLET, 2006 ; PHILIPPON, 2013).

La capacité de résistance des bactéries vis-à-vis des β-lactamines repose sur deux actions distinctes.

- Elles peuvent augmenter l'affinité des bêtalactamases produites pour les bêta-lactamines, notamment par mutation chromosomique ou par acquisition plasmidique d'enzymes précédemment mutés.
- Les bactéries peuvent également augmenter la quantité d'enzymes synthétisée, de la même façon, soit par le biais d'une mutation chromosomique (touchant le plus souvent le système de régulation du gène), soit par voie plasmidique. Les enzymes sont alors appelés enzymes à haut niveau d'expression ou déréprimés (PHILIPPON et ARLET, 2005 ; PHILIPPON et ARLET, 2006).

4.2- Mécanisme d'action

Les bêtalactamases, localisées au niveau de l'espace périplasmique chez les bactéries Gram négatif, sont des enzymes d'inactivation hydrolysant le pont amide du cycle β lactame (correspondant à la structure de base des β-lactamines) pour donner un acylenzyme qui sera ensuite dégradé en acide inactif. Ainsi, les pénicillines sont dégradées en acide pénicilloïque et les céphalosporines en acide céphalosporoïque.

La différence majeure entre les bêtalactamases et les PLP réside dans la vitesse à laquelle l'acylenzyme est hydrolysé. En effet, si les PLP ne sont capables d'hydrolyser qu'un cycle β-lactame par heure (l'acylenzyme apparaît dans ce cas comme un intermédiaire stable), les β-lactamases les plus efficaces peuvent en hydrolyser 1000 par seconde, rendant l'antibiotique totalement inactif et régénérant l'enzyme pour une nouvelle réaction d'hydrolyse (VON BAUM et MARRE, 2005).

La réaction d'hydrolyse de la liaison amide du cycle β-lactame suit trois étapes: reconnaissance du substrat, acylation d'enzyme et désacylation.
Pour les enzymes de classe B qui dégradent plus particulièrement l'imipenème, elles utilisent les ions Zn^{2+} au lieu du radical hydroxyle de la sérine active (figure10). Il y a donc formation d'un complexe non covalent, sans intermédiaire acyl-enzyme (BRYSKIER 1999 ; BRYSKIER 2000).

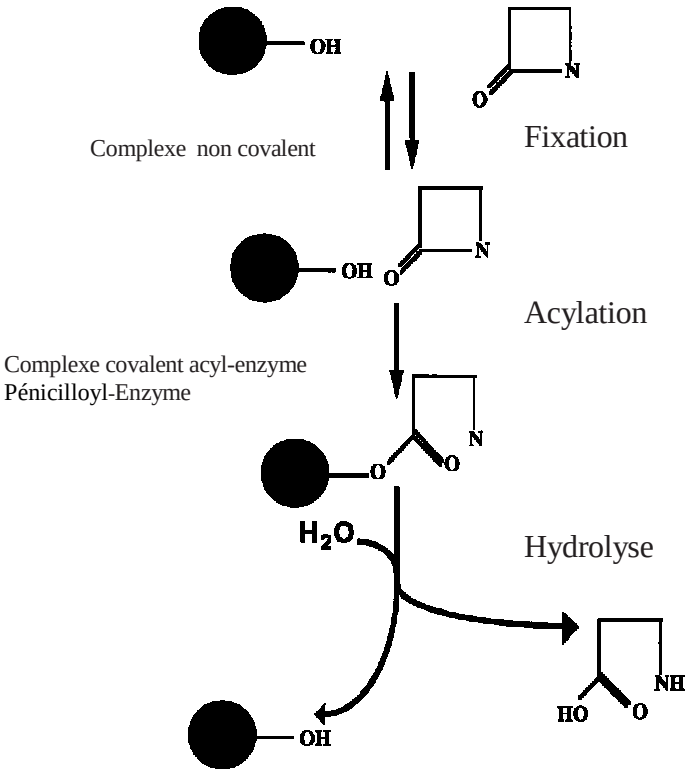


Figure 10 : Action d'une serine bêta-lactamase.

L' enzymes s'associe avec l'antibiotique et forme un complexe non covalente de Michaelis . Le cycle B - lactame est ensuite attaqué par le groupe hydroxyle libre sur la chaîne latérale d'un résidu de serine au site actif de l'enzyme , formant ainsi un ester d'acyl covalent. L'hydrolyse de l'ester libère finalement l' enzyme active et hydrolyse l'antibiotique inactif . Ce mécanisme est suivie par les bêtalactamases de classe moléculaire A, C et D mais les enzymes de la classe B utilisent un ion de zinc pour attaquer l'anneau bêta-lactamines (LIVERMORE, 1995).

4.3-Classification des bêtalactamases

Il existe de nombreuses classifications des bêtalactamases prenant comme critères : les caractéristiques physiques, le phénotype : pénicillinases, céphalosporinases etc…, la nature du site actif, la séquence d'acides aminés, l'origine (plasmidique ou chromosomique), la situation constitutive ou inductible.

Les classifications des β-lactamases considérées comme étant les plus pertinentes sont de deux types :

- La classification d'Ambler qui est une classification moléculaire basée sur la structure primaire des bêtalactamases.
- La classification de Bush-Jacobi-Medeiros considéré comme une classification fonctionnelle reposant sur l'activité hydrolytique et la sensibilité des bêtalactamases aux inhibiteurs comme le clavulanate et l'EDTA.

4.3.1- La classification d'Ambler

La première classification basée sur des critères scientifiques a été proposée en 1980 par Ambler (AMBLER, 1980). C'est la classification la plus largement utilisée qui subdivise les bêtalactamases en 4 classes : A, B, C et D, sur la base des analogies de séquence peptidique, en particulier celles du site enzymatique (HALL et BARLOW, 2005).

Ambler a initialement décrit une classe de sérine-enzymes (classe A) et une classe de métallo-enzymes (classe B) qui requiert l'ion bivalent Zn^{2+} zinc pour son activité. La classe C de céphalosporinases ou Amp C bêtalactamase (sérine-enzymes) fut décrite en 1981 par Jaurin et Grunstrom, et la classe D, regroupant les « oxacillinases ou Oxa bêtalactamase », fut dissociée des autres classes de sérine enzymes à la fin des années 80 (BUSH *et al.*, 1995 ; PHILLIPPON et ARLET, 2006).

4.3.2- Classification de Bush-Jacobi-Medeiros

Cette classification, a été proposée en 1989 et remise à jour en 1995. Elle se base sur le spectre exact des enzymes, prenant en compte le profil de substrat ainsi que le profil d'inhibition ou d'activité hydrolytique (BUSH, 1989a ; BUSH, 1989b ; BUSH, 1995). Elle reste toutefois peu utilisée en pratique médicale.

- Le groupe 1 correspond à des céphalosporinases chromosomiques peu inhibées par l'acide clavulanique.
- Le groupe 2 est composé de pénicillinases, céphalosporinases, oxacillinases, et carbapénèmases chromosomiques ou codées par des plasmides et en général inhibées par l'acide clavulanique. Ce groupe est sub-divisé en 8 sous-groupes. En 1995, en raison de l'augmentation du nombre de dérivés de bêtalactamases TEM et SHV, la classification initiale a été remise à jour et a classé ces dérivés dans différents groupes possédant le préfixe « 2b » : les groupes 2be (β-lactamases à spectre étendu), 2br (β-lactamases dérivant du groupe 2b avec une affinité réduite pour l'acide clavulanique) et le groupe 2f (carbapénèmases inhibées pas l'acide clavulanique et possédant un site actif à sérine).
- Le groupe 3 correspond à des métallo-enzymes en général retrouvés chez les *Pseudomonas.*

Cette classification a ultérieurement été actualisée en 2011 (BUSH et FISHER, 2011) et 2012 (BUSH, 2013a) avec notamment une subdivision de la classe A d'Ambler avec 8 groupes fonctionnels (figure 11, Tableaux I).

4.3.2.1-Les bêtalactamases de classe A

La classe A des bêtalactamases est la plus diversifiée comprend plus de 550 enzymes (BUSH et FISHER, 2011). Historiquement, elle était principalement représentée par les pénicillinases. Ces enzymes sont principalement actives sur les pénicillines (bêta actamase PC1 de *Staphylococcus aureus*), mais aussi, à un moindre degré sur les céphalosporines de première génération. La majorité de ces enzymes est sensible aux inhibiteurs de bêta-lactamase (acide clavulanique, sulbactam et tazobactam).
Les principaux représentants de cette classe sont les bêta-lactamases du type PC1, TEM, SHV et récemment le type CTX-M.

- **Bêta-lactamases de type TEM** (TEMONEIRA - nom du patient)

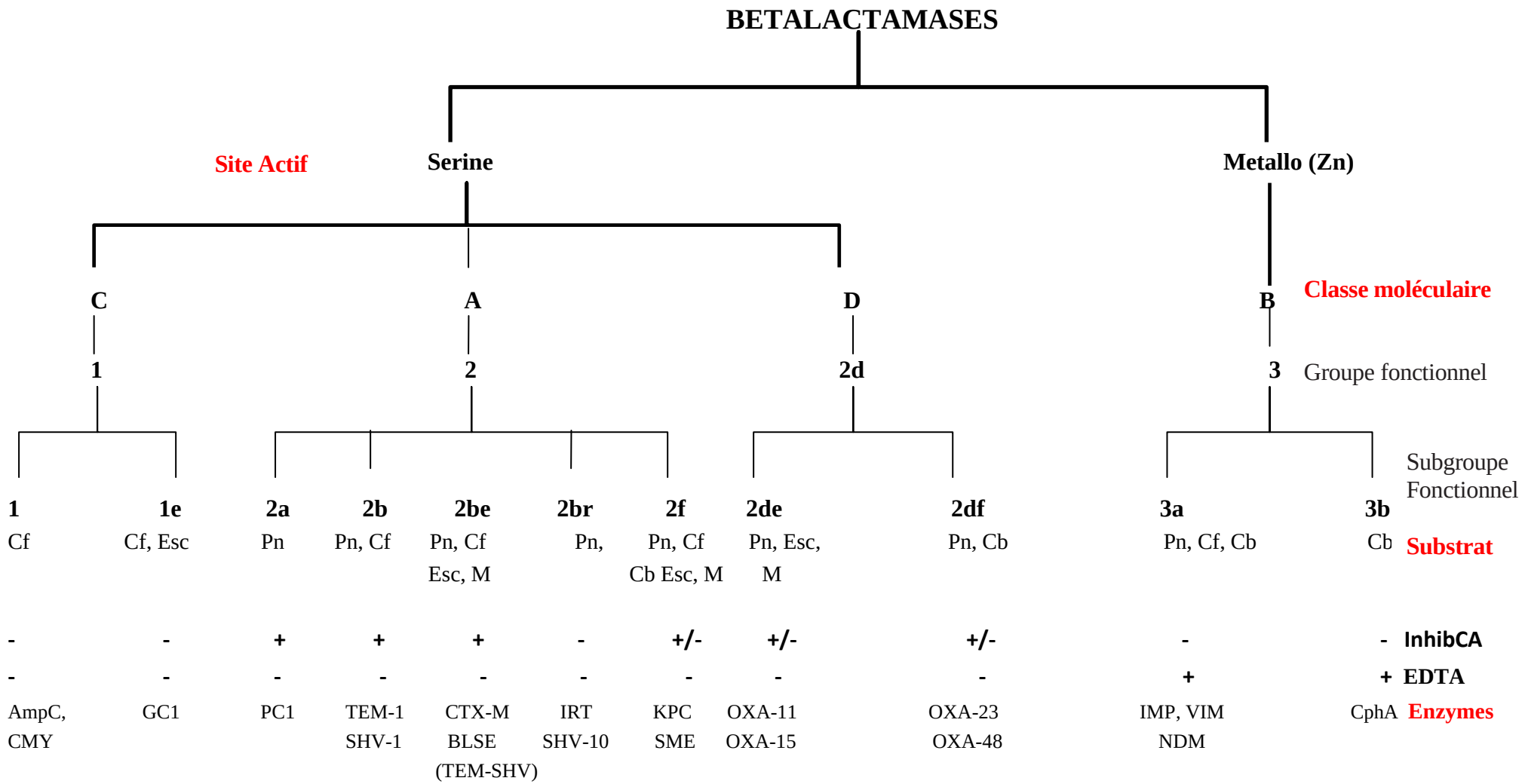
Il existe au moins quarante variants entre TEM et SHV.

Au fur et à mesure de l'introduction des bêta-lactamines ont émergé divers types enzymatiques. Ainsi, dans les années 1965, peu après l'introduction de l'ampicilline mais aussi des céphalosporines de première génération ont émergé les premières bêtalactamases (*broad-spectrum*) dénommées pénicillinases (TEM-1/2, PIT-2/SHV-1) chez diverses entérobactéries lors d'infection urinaire telles qu'*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*…
Leur déterminisme génétique de type transposon porté sur divers plasmides a permis une large diffusion dans le monde bactérien (*Pseudomonas aeruginosa* dans les années 1970, *Haemophilus influenzae* dans les années 1975 puis *Neisseria gonorrhoeae*, plus tard *Acinetobacter baumannii*) (PHILIPPON et ARLET, 2012).

Jusqu'à 90% de la résistance à l'ampicilline chez *E. coli* est due à la production de TEM-1. TEM-1 est capable d'hydrolyser l'ampicilline, et à un degré moindre l'oxacilline ou la céfalotine, et a une activité négligeable vis-à-vis des céphalosporines à spectre étendu.
Les mutations responsables de l'élargissement de spectre ont généralement lieu au niveau de quatre «hot spots» de la protéine (positions 104, 164, 238 et 240) (GNIADKOWSKI, 2008).

La première BLSE de type TEM (TEM-3) a été découverte en 1989. Depuis lors, plus de 100 dérivés de TEM ont émergé par substitution d'un ou plusieurs acides aminés à partir de TEM-1 (PATERSON et BONOMO**,** 2005 ; CARRËR et NORDMANN, 2011).

La majorité de ces nouveaux dérivés sont des BLSE le plus souvent produites par *E. coli* et *Klebsiella pneumoniae* ; ces enzymes ont été aussi mises en évidence chez les autres espèces d'entérobactéries et chez d'autres bactéries à Gram négatif (BRADFORD, 2001).
Certains dérivés de TEM (environ 30) ne sont pas des BLSE mais présentent une diminution de sensibilité aux inhibiteurs de bêtalactamases, ce sont les TRI (pour TEM Résistantes aux Inhibiteurs) (CATTOIR, 2008).



Cb : carbapénemes ; Cf : premières cephalosporines ; Inhibiteurs C : clavulanic acid et EDTA, ethylène diamine tetraacetic acid ;
Esc, cephalosporins à spectre étendu, ; M : monobactames ; Pn, : pénicillines.

Figure 11 : Caractéristiques moléculaires et fonctionnelles des groupes majeurs de bêtalactamases (BUSCH, 2013a).

- **Les Bêtalactamases de type SHV** (**S**ULF**H**YDRYL **V**ARIABLE)

Les premières enzymes de ce type comme SHV-1, sont retrouvées naturellement dans le phénotype sauvage des entérobactéries de classe 2, entre autres chez *Klebsiella pneumoniae* et *Citrobacter koseri*. Le gène codant pour SHV-1 se situe sur le chromosome pour la majorité des souches de *Klebsiella pneumoniae*, mais est habituellement porté par un plasmide chez *E. coli* (CHAVES *et al.*, 2001).

Ces enzymes hydrolysent les pénicillines A et la ticarcilline. Elles sont inhibées par les inhibiteurs des bêtalactamases que sont l'acide clavulanique et le tazobactam. Les bactéries sont donc sensibles à l'association amoxicilline-acide clavulanique (AUGMENTIN®), aux C1G dont la céfalotine, aux C2G, aux C3G et l'imipénème.

Plus de 160 variants SHV BLSE ont été décrits. SHV-12, SHV-2 et SHV-5 sont parmi les BLSE de type SHV les plus communes (PHILIPPON, 2013). La majorité des BLSE de type SHV a été détectée chez *K. pneumoniae*. Cependant, ces enzymes se sont disséminées vers d'autres entérobactéries et des épidémies à *Pseudomonas aeruginosa* et à *Acinetobacter* spp. producteurs de BLSE de type SHV ont été décrites (HAEGGMAN *et al.*, 2004 ; El HANY, 2012).

- **Les Bêtalactamases à spectre élargi/étendu**

Les BLSE (les bêtalactamases à spectre élargi/étendu) ont été nommées ainsi afin de les différencier de leurs enzymes parentales « les bêtalactamases à large spectre » qui n'hydrolysent pas les C3G. Ce type d'enzyme confère une résistance à l'ensemble des β-lactamines, à l'exception des céphamycines (céfoxitine, céfotétan, latamoxef) et des carbapénèmes (imipénème, doripénème, ertapénème, méropénème). Elles ont la particularité d'être inhibées par les inhibiteurs de bêtalactamases dont l'acide clavulanique, à la base même du principe de détection des BLSE. L'existence de ces enzymes est maintenant mondiale avec diverses épidémies rapportées dans plusieurs pays (JACOB, 2010 ; ELHANY, 2012).

- **Les BLSE de type TEM et SHV**

De nombreux mutants de TEM-1/2 (plus de 190) ont été identifiés avec un phénotype BLSE. Bien que fréquemment retrouvés chez *E. coli* et *K. pneumoniae*, ces BLSE ont été aussi observées parmi d'autres espèces d'entérobactéries comme *E. cloacae, P. mirabilis* ainsi que chez *P. aeruginosa* (PHILIPPON, 2013).

Les substitutions d'acides aminés qui ont eu lieu au niveau de l'enzyme TEM sont localisées à des positions limitées. Les substitutions d'acides aminés aux positions 104, 164, 238 ou 240 produisent un phénotype BLSE mais les BLSE de type TEM avec un plus large spectre possèdent plus d'une substitution. Beaucoup d'enzymes de type TEM induisent une résistance plus importante à la ceftazidime et à l'aztréonam qu'au céfotaxime, mais ceux qui possèdent une substitution d'une sérine à la position 238 induisent aussi une résistance au céfotaxime (ELHANI, 2012).

Simultanément au début des années 1980, en Allemagne, ont été découverts les dérivés ou mutants de SHV-1 enzyme chromosomique chez *K. pneumoniae*. Ces BLSE ont été détectées parmi de nombreuses entérobactéries (notamment *K. pneumoniae*) mais aussi chez

P. aeruginosa et *Acinetobacter spp*. Plus de 100 variants SHV BLSE ont été décrits ; SHV-12, SHV-2 et SHV-5 sont parmi les BLSE de type SHV les plus communes (CARRER et NORDMANN, 2011 ; PHILIPPON, 2013). BUSH (2013b) note toutefois que ces substitutions ne confèrent pas toujours un phénotype BLSE, si on se base sur l'activité fonctionnelle plutôt que l'analyse de structure, ce qui a conduit à des erreurs d'appelation.

- **BLSE du groupe céfotaximase-Muenchen/Munich (type CTX-M)**

- **Origine et classification**

Les BLSE de type CTX-M ont été décrites initialement en 1986 (FEC-1) au Japon, en Allemagne et en France en 1989 (CTXM- 1) ; elles ont depuis lors disséminé largement dans le monde. Le type CTX-M a en effet, remplacé les mutants TEM et SHV comme BLSE prédominantes dans plusieurs pays Européens, avec *E.coli* et *K .pneumoniae* comme hôtes majeurs (LIVERMORE *et al.,* 2007 ; LIVERMORE, 2012).

Le premier grand changement, à partir de 2003, s'est traduit par une forte augmentation de la prévalence de BLSE CTX-M, qui avait été sporadiquement enregistrées à partir de 2001 (LIVERMORE, 2012).

Depuis, plus de 126 variants CTX-M ont été décrits (GHAFOURIAN *et al.,* 2015). Ces BLSE doivent initialement leur dénomination au fait de présenter une plus forte hydrolyse du céfotaxime que des autres céphalosporines de troisième génération et ont été classés en 6 groupes phylogénétiques :

- Le groupe CTX-M-1 avec les allèles CTX M-1, 3, 10, 11, 12, 15, 22, 23, 28, 29 et 30 ;
- Le groupe CTX-M-2 avec CTXM-4, 5, 6, 7, 20 et Toho-1 ;
- Le groupe CTXM- 8 avec CTX-M-8, CTX-M-40 et CTX-M-63 ;
- Le groupe CTX-M-9 avec CTXM-13, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 27 ;
- Le groupe CTX-M-25 avec CTX-M-26 ;
- Le groupe CTX-M- 45.

(ELHANI, 2012 ; BUSH, 2013b ; PHILIPPON, 2013).

Sur la base de leur apparentement de séquences d'acides aminés, il semble qu'elles dérivent des céphalosporinases chromosomiques des bactéries du genre *Kluyvera* (RODRIGUEZ-VILLALOBOS et STRUELENS, 2006). Contrairement aux enzymes TEM et SHV, il n'y a pas de point de mutation dans CTX -M et on pense que CTX -M était en premier identifié à partir du chromosome *Kluyvera spp* avant sa transformation en plasmide (GHAFOURIAN *et al.,* 2015).

L'environnement génétique de plusieurs CTX-M a permis de découvrir l'existence des structures génétiques inconnues telle que la séquence d'insertion IS*Ecp1* apportant un promoteur ou encore l'orf513 ou *insertion sequence common region* (IS*CR1*). Enfin, on retrouve souvent de part et d'autre du gène de cette bêtaactamase, des régions correspondant au chromosome du progéniteur (*Kluyvera*) confirmant la mobilisation de tels gènes chromosomiques (PHILIPPON, 2013).

- **Activité hydrolytique**

A la différence des types précédents, les CTX-M confèrent une résistance marquée au céfotaxime (origine de son nom) et au céfépime. En revanche, l'inactivation de la ceftazidime est plus limitée, à l'exception d'enzymes récemment décrites (CTX-M-15, CTXM-16,

CTX-M-27) qui ont une forte capacité hydrolytique pour la ceftazidime. Les CTX-M sont plus fortement inhibées par le tazobactam que par l'acide clavulanique (RODRIGUEZ-VILLALOBOS et STRUELENS, 2006).

- **Bases génétiques de la diffusion des céfotaximases**

On assiste à la diffusion mondiale d'un clone uropathogène d'*E. coli* de sérotype O25 et de séquence-type ST131, producteur de CTX-M-15 (JACOB, 2010). Le variant CTX-M-15, qui hydrolyse la ceftazidime à haut niveau, est actuellement le plus couramment variant CTX-M identifié dans le monde chez les espèces d'entérobactéries. IL appartient au sous-groupe CTX-M-1 et dérive de CTX-M-3. Sa séquence protéique présente une mutation ponctuelle en position 240 qui conduit a` une plus forte hydrolyse de la ceftazidime comparée à celle du cefotaxime (CARRER et NORDMANN, 2011 ; POIREL *et al.,* 2012).

La dissémination horizontale des gènes codant pour les enzymes CTX-M s'effectue via des plasmides conjugatifs mais aussi via d'autres éléments génétiques comme les intégrons et les séquences d'insertion IS*Ecp1* et IS*CR1*. Ces enzymes sont souvent codées par des plasmides de 60–200 kb, au sein desquels coexistent fréquemment des gènes codant pour d'autres bêtalactamases comme TEM-1, TEM-2 ou OXA-1 (RODRIGUEZ-VILLALOBOS STRUELENS, 2006 ; POIREL, 2012).

En effet, la dissémination rapide des gènes *bla*CTX-M est l'un des changements spectaculaires dans l'épidémiologie des BLSE. Différents éléments génétiques ont été retrouvés à proximité des gènes $bla_{\text{CTX-M}}$ et il a été démontré que certains étaient responsables de leur mobilisation.

C'est le cas pour :

- Les séquences d'insertion IS*Ecp1*-like ont été associées à la majorité des gènes des groupes CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9 et CTX-M-25 (LARTIGUE *et al.,* 2004 ; POIREL, 2008 ; ELHANI *et al.,* 2011).

- Les éléments transposables CR1 (*commun region 1*, nommé aussi orf513) ont été associés aux gènes $bla_{\text{CTX-M-2}}$ et $bla_{\text{CTX-M-9}}$ et d'autres séquences proches des séquences de phages ont été identifiées à proximité du gène $bla_{\text{CTX-M-10}}$ en Espagne.

Il a été suggéré que l'élément IS*CR1* pourrait participer au processus de mobilisation de gènes par la réplication de type « Rolling cercle ».

La dissémination rapide de certains gènes $bla_{\text{CTX-M}}$ est due aussi à leur localisation au niveau de plasmides doués de flexibilité et de plasticité et appartenant à différents groupes d'incompatibilité : IncFI, IncFII (de 50à 200kb), IncHI2, et IncI pour les plasmides à spectre étroit d'hôtes et IncN, IncP- 1-, IncL/M, IncA/C pour les plasmides à large spectre d'hôtes (CARATTOLI *et al.,* 2009 ; EL HANI *et al.,* 2011 ; ELHANI, 2012 ; POIREL *et al.,* 2012).

- **Les carbapénémases**

La résistance aux carbapénèmes chez les entérobactéries résulte essentiellement de deux mécanismes impliquant tous deux des bêtalactamases. Le premier mécanisme associe la production d'une céphalosporinase chromosomique ou plasmidique ou une BLSE à une diminution quantitative ou qualitative de l'expression des protéines transmembranaires

que sont les porines. Le second mécanisme de résistance aux carbapénèmes est lié à l'expression de bêtalactamases à forte activité hydrolytique vis-à-vis des carbapénèmes, les carbapénèmases (NORDMANN et CARRER, 2010).

Au cours de la dernière décennie, l'émergence de souches produisant des carbapénémases parmi les entérobactéries, *Pseudomonas spp* et *Acinetobacter baumannii* est remarquable (DORTET, 2014).

Les carbapénèmases décrites chez les entérobactéries appartiennent aux quatre classes connues de bêta-lactamases (classe A, B, C, D de la classification d'Ambler).

Les carbapénèmases de classe A ont été tout d'abord rapportées dans plusieurs souches d'entérobactéries isolées de l'environnement (*Serratia*, *Enterobacter*), produisant des bêta-lactamases dont l'activité était inhibée par l'acide clavulanique (NORDMANN et CARRER, 2010). Une variété de carbapénèmases de la classe A d'Ambler ont été signalés telles que les types KPC, largement rapportée chez *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*, mais également le type GES notamment chez *Acinetobacter baumannii* (DORTET, 2014 ; PITOUT *et al.*, 2015). KPC- 1 (révélée plus tard identique à KPC- 2) a été signalé à la fin 1990 chez *K. pneumoniae* en Caroline du Nord. À ce jour, plus de 20 variants de KPC ont été décrits, même si KPC-2 et 3 restent les variants les plus communément identifiés Ceux-ci, ont toutefois également été rapportés chez d'autres espèces d'entérobactéries bactéries telles que *Enterobacter spp* (PITOUT *et al.*, 2015).

Ces enzymes hydrolysaient, à divers degrés, toutes les bêta-lactamines (NORDMANN et CARRER, 2010). Une série de rapports ont mis en évidence la présence de ces enzymes également chez des bactéries isolées à partir de sources non humaines ou de *Salmonella enterica subsp. enterica*, une espèce zoonotique (POIREL, 2014).

4.3.4- Classe B : Les métallo-bêta-lactamases

Les premières carbapénèmases de classe B (IMP) (ou métallobêta- lactamases, MBL) avaient été identifiées dans des espèces d'entérobactéries typiquement hospitalières (*Serratia*, *Citrobacter* et *Enterobacter*) au Japon. Puis d'autres MBL ont été isolées dans des entérobactéries, dans le monde entier ; il s'agit des nombreuses variétés de bêta-lactamases de type IMP , VIM, GIM-1, KHM-1 et NDM-1 avec une forte prévalence en Europe du Sud et en Asie. Les enzymes de types VIM et IMP sont les plus répandues. Leur hôte le plus habituel est *K. pneumoniae* et les niveaux d'expression de la résistance sont variables (NORDMANN, 2000 ; NORDMANN, 2010, DORTET, 2014 ; PITOUT *et al.*, 2015).

Ce sont des métallo-enzymes qui contiennent des ions zinc dans leur site actif. Ces enzymes hydrolysent fortement toutes les bêta-lactamines à l'exception de l'aztreonam. Leur activité n'est inhibée ni par l'acide clavulanique ni par le tazobactam. Les gènes de ces MBLs sont le plus souvent plasmidiques et associés au sein d'intégrons et de transposons, structures qui assurent la mobilité de ces gènes de résistance et la multirésistance aux antibiotiques des souches (NORDMANN, 2000 ; NORDMANN et CARRER, 2010). Leurs gènes sont habituellement physiquement associés à des gènes de résistance aux aminosides dans des souches souvent résistantes aux fluoroquinolones (NORDMANN, 2010).

ABRAHAM *et al*. (2014) ont mis l'accent sur le rôle possible des animaux de compagnie en tant que source de souches produisant des carbapénèmases chez les humains sur la base de deux études rapportant la présence aux Etats-Unis, chez des isolats de chiens,

de NDM-1chez *Escherichia coli* et de OXA- 48 en Allemagne, chez des isolats d'*E. coli* et *Klebsiella pneumoniae*. Cependant, compte tenu de la rareté des rapports de carbapénèmases chez les animaux et le fait que les carbapénèmes ne sont pas utilisés chez les animaux producteurs de denrées alimentaires, le risque pour la santé publique reste marginal (POIREL, 2014).

4.3.5- Les bêta-lactamases de Classe C

Les bêtalactamases à serine de la classe C (AmpC) sont codées par des gènes chromosomiques ou plasmidiques. Ces céphalosporinases sont cliniquement importantes chez *Citrobacter freundii, Enterobacter spp, Morganella morganii, Serratia marcescens, P. aeruginosa, Proteus spp* et *Providencia spp* du fait de la fréquence de mutants hyperproducteurs parmi ces espèces (RODRIGUEZ-VILLALOBOS et STRUELENS, 2006).

Les bêtalactamases AmpC sont capables d'hydrolyser les céphalosporines y compris les céphamycines (céfoxitine) ainsi que les pénicillines, mais pas le céfépime. Ces bêtalactamases sont résistantes aux inhibiteurs de bêtalactamases. Le gène AmpC constitutif est faiblement exprimé chez *E. coli* et est absent chez *Klebsiella* et *Salmonella spp*. Cependant, ces espèces peuvent acquérir différents sous-groupes d'AmpC codés par des plasmides.

Escherichia coli produit habituellement seulement de très petites quantités d'une céphalosporinase AmpC chromosomique. Sa production est constitutive. En conséquence, sa production dépend surtout de la force du promoteur du gène *amp*C. Cependant, d'autres facteurs tels que l'amplification du gène ou l'insertion de la séquence IS2 peuvent entrainer une hyperproduction de AmpC *in vitro* (CARROFF *et al.,* 2000 ; CORVEC *et al.,* 2007).
La surproduction est liée à diverses mutations dans les parties stratégiques du promoteur *amp*C conduisant à une augmentation des taux de transcription et par suite, augmentation de la production de l'enzyme et de haut niveau de résistance à de nombreuses bêta lactamines, y compris les céphalosporines de troisième génération.

4.3.6- Les bêta-lactamases de Classe D

Cette classe regroupe les bêtalactamases à serine appelées « oxacillinases » ou OXA. Une grande partie hydrolyse l'oxacilline et ses dérivés et sont faiblement inhibées par l'acide clavulanique, le tazobactam ou le sulbactam et *in vitro* par le NaCl. Ces enzymes sont le plus souvent retrouvées chez *Pseudomonas aeruginosa,* mais aussi chez d'autres bactéries à Gram négatif comme les *Acinetobacter spp* et particulièrement *Acinetobacter baumanii* (BUSCH, 2010 ; POIREL *et al.,* 2010 ; BUSCH et FISHER, 2011 ; BUSCH, 2013b).

C'est la classe de bêtalactamases la plus diversifiée avec un profil de substrat pouvant inclure des pénicillines, ou des pénicillines et céphalosporines à spectre étendu et même des carbapénèmes (POIREL *et al.,* 2010 ; BUSCH, 2013).

Cette classe représente 20% des séquences de bêtalactamases répertoriées et représente plus de 340 variants structuraux (BUSCH, 2013). Parmi les bêtalactamases de classe D, des enzymes hydrolysant les carbapénèmes ont été identifiées ; les plus connues sont les enzymes OXA-48 initialement isolée de *Klebsiella pneumoniae* (POIREL *et al.,* 2004), de OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-58, OXA-40, OXA-158, OXA-97 et OXA-23

d'*Acinetobacter baumanii*. OXA-23 dont la diffusion est mondiale, a également été trouvée chez de *Proteus mirabilis* (POIREL *et al.*, 2004 ; POIREL *et al.*, 2010 ; BUSH, 2013).

La majorité des bêtalactamases de classe D des entérobactéries et des espèces de *Pseudomonas* ont été localisées sur de grands plasmides transférables. Les gènes des bêtalactamases de classes D sont souvent associés à des cassettes de gènes d'intégrons de classe 1, de transposons de la famille de Tn3 qui mobilisent les intégrons, ou de séquences d'insertion (POIREL *et al.*, 2010).

Des plasmides possédant des gènes *bla* $_{\text{OXA-1}}$ et *bla* $_{\text{CTX-M1}}$ ont été identifiés chez des isolats d'*E. coli* chez les animaux ; des études récentes ont montré une très fréquente association de *bla* $_{\text{OXA-1}}$ avec le déterminant de BLSE mondialement diffusé CTX-M15 dans des isolats de *E. coli* humains d'origines géographiques diverses. Ceci a pour conséquence d'étendre la résistance aux inhibiteurs de bêtalactamases (POIREL *et al.*, 2010).

4.3- Phénotypes de résistances naturelles des entérobactéries aux bêta-lactamines

Le comportement des entérobactéries vis-à-vis de plusieurs bêta-lactamines (amino pénicillines, carboxy-pénicillines, céphalosporines de première génération) a permis de caractériser dans les années 1980, quatre phénotypes de résistance naturelle : G1 (sensible), G2 (pénicillinase de bas niveau), G3 (céphalosporinase) et enfin G4 (pénicillinase + céphalosporinase). Cette approche phénotypique, la plus communément utilisée, a permis de jeter les bases de la lecture interprétative (Tableau II). Cependant, l'identification de nouvelles bêta-lactamases produites par certaines espèces d'entérobactéries moins connues des biologistes, car d'isolement moins fréquent a amené à proposer jusqu'à sept phénotypes de résistance naturelle (PHILIPPON et ARLET, 2012).

Tableau I : Correspondance des principales enzymes suivant la classification structurale d'Ambler et fonctionnelle de Bush (adapté de BUSH *et al.*, 1995 ; BUSH et FISHER, 2011 ; BUSH, 2013a).

Classification moléculaire d'Ambler	Classification fonctionnelle de Bush	Type de β-lactamase	Spectre d'activité	Caractéristiques	Enzymes représentatives
SERINE BETALACTAMASES					
Classe A	**2a**	Pénicillinases plasmidiques	Bactéries à Gram positif dont Staphylocoques et entérocoques	Forte hydrolyse Pénicillines Inhibée par CLA et TZB	PC1 et autres pénicillinases des staphylocoques
	2b	β-lactamase à large spectre plasmidique (TEM) et chromosomique (SHV)	Bactéries à Gram négatif	Forte hydrolyse Pénicillines et moins pour les Céphalosporines (céphaloridine, céfazoline, céfalotine	SHV-1, TEM-1, TEM-2, TLE-1 (TEM-90)
	2be	β-lactamase à spectre élargi/étendu aux C3G et aztréonam	Bacilles à Gram négatif	Hydrolyse Pénicillines, céphalosporines à spectre élargi et monobactames Inhibée par CLA et TZB	**BLSE:** CTX-M-15, CTX-M-44 (Toho-1), PER-1, SFO-1, SHV-5, TEM-10, TEM-26, VEB-1
	2br	β-lactamase à large spectre résistant à CLA	*E.coli*, *K.pneumoniae*	Forte hydrolyse Pénicillines ; C1G et C2G Mauvaise inhibition par CLA	**TRIs** : TEM-30, TEM-76, TEM- 103, SHV-10, SHV-26
	2ber	CMT : complex mutant TEM	Bactéries à Gram négatif	Hydrolyse Pénicillines, céphalosporines à spectre élargi, monobactames Moins efficacement inhibée par CLA et TZB	CMTs: TEM-50, TEM-68, TEM-89
	2c	Carbénicillinase	Bactéries à Gram négatif	Forte hydrolyse des Carbénicillines Inhibée par CLA	PSE-1, CARB-3
	2e	Céphalosporinase	Bactéries à Gram négatif (surtout les entérobactéries)	Forte hydrolyse des céphalosporines Inhibée par CLA et TZB mais pas avec l'aztréonam	CepA
	2f	Carbapénémase	Entérobactéries *Pseudomonas aeruginosa*	Hydrolyse Carbapénémes, Céphalosporines, Pénicillines et Céphamycines ; Faiblement inhibée par CLA et TZB	IMI-1, KPC-2, KPC-3, SME-1, GES-2
Classe C	**1**	Enzyme AmpC chromosomique et plasmidique	Bactéries à Gram négatif	AmpC (*E. coli* et *P. aeruginosa)*, Inactives que sur les carbapénèmes Pas d'inhibition par CLA et TZB Forte affinité pour l'aztréonam	CMY-2, FOX-1, MIR-1, P99
	1e	β-lactamase à spectre élargi/étendu	Bactéries à Gram négatif	Hydrolyse, Pénicillines, Céphamycines, C3G, Monobactames Pas d'inhibition par CLA et TZB	GC1, CMY-37
Classe D	**2d**	Oxacillinases	Entérobactéries *Pseudomonas aeruginosa*	Forte hydrolyse pour Cloxacilline ou Oxacilline Pas toujours inhibé par CLA	OXA-1, OXA-10
	2de	β-lactamase à spectre élargi/étendu	*Pseudomonas aeruginosa* et entérobactéries	Hydrolyse Pénicillines et céphalosporines à spectre élargi Pas toujours inhibé par CLA	**BLSEs :** OXA-11, OXA15
	2df	Carbapénémases	Entérobactéries *Klebsiella pneumonia*	hydrolyse Carbapénémes et Cloxacillines ou Oxacillines Pas toujours inhibé par CLA	OXA-23, OXA-48
ZINC BETALACTAMASES (Métalloenzymes)					
Classe B	**3a**	Carbapénémases	Entérobactéries *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*	Hydrolyse tous les béta-lactames sauf les Monobactames Inhibé par EDTA et chélateurs d'ions en métal. Pas inhibé par CLA et TZB	IMP-1, L1, NDM-1, VIM-1
	3b		Bactéries à Gram négatif	Hydrolyse préférentiellement les carbapénémes Inhibé par EDTA et Chélateurs d'ions métallique Pas inhibé par CLA et TZB	CphA, Sfh-1
Non déterminé	4	Pénicillinases	*Pseudomonas cepacia*	Diverses enzymes non séquencées ne correspondant à aucun groupe	

Acide clavulanique ; TZB : Tazobactam ; TRIs : TEM résistant aux inhibiteurs ; CMT, complex mutant TEM ; C1G, C2G et C3G : céphalosporine de première, seconde et troisième génération

Tableau II : Phénotypes de résistance naturelle des entérobactéries (d'après LIVERMORE, 2004 ; PHILIPPON et ARLET, 2012).

Groupes et espèces associées	**Phénotype de résistance naturelle**	**Bêta-lactamines inactivées**
Groupe 1 *E. coli, Proteus mirabilis, Shigella sp. Salmonella sp.*	Sensible (pas de bêta-lactamase)	Aucune
Groupe 2 *Klebsiella pneumonia, K. oxytoca, Citrobacter koseri (Levinea malonatica)*	Pénicillinase bas niveau	Aminopénicllines Carboxypénicillines Uréidopénicillines (S/R)
Groupe 3 *Citrobacer freundi, Enterobacter cloacae, Enterobacter aerogenes, Proteus* indole +, *Serratia marcescens, Enterobacter agglomerans, Enterobacter. Hafniae, Providencia rettgeri, Providencia stuartii, Proteus vulgaris*	Céphalosporinase	Aminopénicillines Céphalsoporine de 1ère génération
Groupe 4 *Yersinia enterocolitica*	Pénicillinase + Céphalosporinase	Aminopénicllines Carboxypénicillines Uréidopénicillines (S/R) Céphalsop 1ere génération

5-Mécanisme d'action et résistance aux Quinolones

5.1- Mécanisme d'action

Les quinolones sont de puissants agents antibacteriens dont les cibles sont les enzymes bacteriennes, ADN gyrase et topoisomerase IV. C'est une des classes d'antibiotiques les plus prescrites dans le monde, ce qui explique l'augmentation constante des résistances bactériennes. Pour atteindre leur cible, les quinolones doivent traverser la paroi bactérienne et la membrane cytoplasmique des bactéries a Gram positif. Chez les bactéries a Gram négatif, elles doivent aussi traverser la membrane externe, mais cette étape est facilitée par une diffusion passive à travers les porines, en fonction de leur degré d'hydrophobicité et de leur poids moléculaire et éventuellement par un passage direct a travers la double couche phospholipidique. Les quinolones vont alors bloquer la synthèse de l'ADN en inhibant les enzymes cellulaires impliquées dans le maintien de la structure de l'ADN.

A cette action bacteriostatique, s'ajoute une activation du système SOS, secondaire au signal engendré par le blocage de la réplication et l'accumulation d'ADN coupé, responsable de l'effet bactéricide (JACOBY, 2005).

Les cibles des quinolones sont les topoisomérases bactériennes de type 2 (ADN gyrase et topoisomerase IV). Ces topoisomerases sont des enzymes ubiquitaires des cellules eucaryotes et procaryotes, nécessaires à la vie cellulaire. Elles sont impliquées dans le compactage de l'ADN et la régulation de la conformation de l'ADN lors de la réplication, de la transcription et de la recombinaison (figure12).

La plupart des eubactéries, comme *E. coli* , possèdent 4 topoisomerases (I, II, III, IV). Les topoisomerases de type 1 (I et III) agissent sur l'ADN simple brin, alors que les topoisomérases de type 2 agissent sur l'ADN double brin. Ces dernières sont des enzymes hétérotetramériques composées de paires de 2 sous-unités : GyrA et GyrB pour l'ADN gyrase et ParC et ParE pour la topoisomerase IV. Il s'agit de larges complexes enzymatiques constitués de deux paires de sous-unités, la protéine de 97 kDa GyrA, codée par le gène *gyrA* et la protéine de 90 kDa GyrB, codée par le gène *gyrB* pour l'ADN gyrase ; la protéine de 75 kDa (ParC) codée par le gène *parC* et la protéine de 70 kDa ParE, codée par le gène *parE* pour la topoisomérase IV (HONORE *et al.*, 2006 ; MERENS et SERVONNET, 2010 ; MUYLAERT et MAINIL, 2013).
Les cibles des quinolones sont les topoisomérases bactériennes de type 2 (ADN gyrase et topoisomérase IV). Ces topoisomerases sont des enzymes ubiquitaires des cellules eucaryotes et procaryotes, nécessaires à la vie cellulaire. Elles sont impliquées dans le compactage de l'ADN et la régulation de la conformation de l'ADN lors de la réplication, de la transcription et de la recombinaison. Ces enzymes structurellement proches catalysent le passage d'un brin d'ADN à travers un autre dans un processus ATP-dépendant. Cependant chacune a une fonction spécifique. La topoisomerase IV est spécialisée dans le desenchevêtrement de l'ADN nécessaire à la division cellulaire.

5.2- Résistance des bactéries Gram négatif aux quinolones (figure 13)

Classiquement, les mécanismes de résistance aux quinolones chez les entérobactéries résultent essentiellement de modifications ponctuelles des cibles, les topoisomérases, et plus rarement, d'une diminution de la concentration intracellulaire de ces antibiotiques par imperméabilité membranaire et/ou surexpression des systèmes d'efflux (NORDMANN, 2006).

- **Modification de la cible**

La résistance aux quinolones fait intervenir différents mécanismes. Les mécanismes les plus fréquents et les mieux connus sont les modifications des cibles, l'ADN gyrase et/ou la topo-isomérase IV, par mutation ponctuelle entraînant une substitution d'acide aminé (ex. Ser83Leu dans la sous-unité A de l'ADN gyrase ou Glu84Lys dans la sous-unité ParC de la topoisomérase IV). Ces mécanismes entraînent une résistance à toutes les quinolones, avec des augmentations de CMI parfois un peu différentes selon les molécules (HONORE *et al.*, 2006).

En fait, les mutations impliquent des substitutions en acides aminés qui apparaissent dans une région particulière des sous-unités Gyr et Par, nommée QRDR pour « *quinolone resistance determining region* ». Dans la structure tertiaire des topoisomerases, le domaine QRDR des sous unités GyrA et ParC est proche de la région impliquée dans la liaison de l'ADN aux enzymes, alors que le domaine QRDR des sous-unités GyrB et ParE se trouve à proximité de la région correspondante de *gyr*A et *par*C, suggérant la formation par les deux domaines QRDR d'une sorte de poche de liaison aux fluoroquinolones durant le cycle catalytique de l'enzyme (HONORE *et al.*, 2006 ; HOPKINS *et al.*, 2006 ; MUYLAERT et MAINIL, 2013).

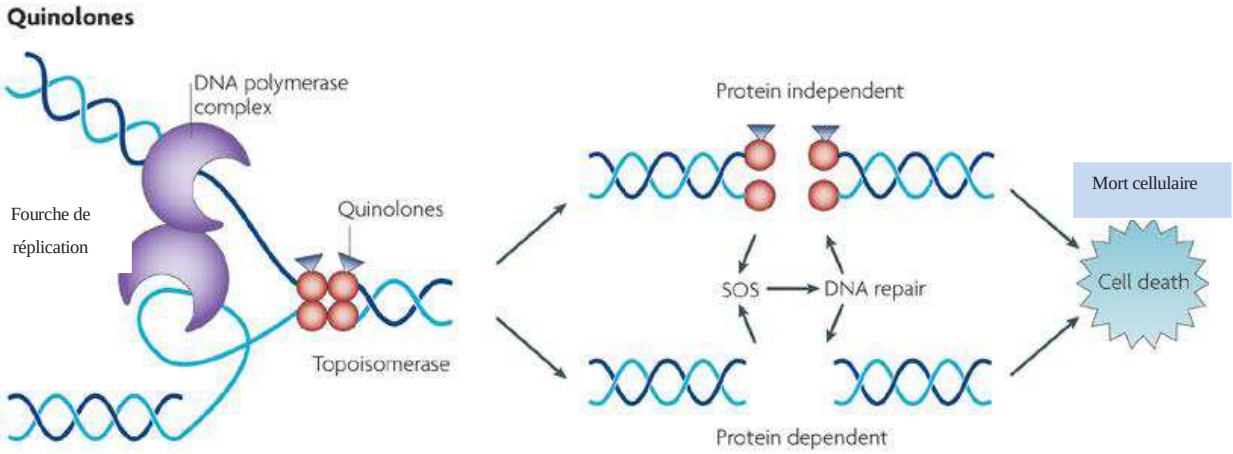


Figure 12 : Action des quinolones sur les topoisomérases (adapté de KOHANSKI *et al.*, 2010)

Ainsi, le domaine QRDR de la sous unité GyrA d'*E. coli* se situe entre les acides aminés 67 et 106, avec des *hot spots* de mutations au niveau des acides amines en positions 83 et 87. Cette QRDR est proche de la tyrosine 122 impliquée dans la liaison covalente de l'enzyme aux groupements phosphate de l'ADN (RODRIGUEZ- MARTINEZ *et al.*, 2010 ; MUYLAERT et MAINIL, 2013).

D'autres mécanismes sont aussi très souvent impliqués. Ce sont ceux liés à un défaut d'accumulation dans la bactérie, soit par une diminution de la pénétration de la paroi, soit par un efflux important de quinolones

La diminution de la concentration intracellulaire de quinolones pouvant atteindre la cible peut être liee soit a une imperméabilité par mutation des gènes régulateurs de la synthèse des porines soit à une hyperexpression de pompes d'efflux actif (MERENS et SERVONNET, 2010) .

QepA et OqxAB, toutes deux des pompes à efflux à médiation plasmidique de découverte récente, induit pour la première, une diminution de sensibilité à la norfloxacin, la ciprofloxacine et la enrofloxacine ; la seconde est également reliée à la résistance aux fluoroquinolones et à d'autres agents antibactériens tel que les dérivés de la quinoxaline, utilisés comme promoteur de croissance vétérinaire (CHEN *et al.*, 2012 ; POIREL *et al.*, 2012 ; GOUDARZI et *al.*, 2015). Dans tous les cas, ces mécanismes d'efflux confèrent une résistance de bas niveau aux fluoroquinolones, variable selon la molécule, mais pouvant se cumuler avec d'autres mécanismes pour conférer une résistance de haut niveau (MUYLAERT et MAINIL, 2013).

- **Inactivation de l'antibiotique**

L'antibiotique pénètre dans la bactérie et atteint une concentration intracellulaire normale, mais il est partiellement dégradé par une enzyme, ce qui diminue son activité sur la cible.

Ce mécanisme de découverte récente pour les quinolones (2006) n'est décrit pour l'instant que chez les entérobactéries. Il est lié à la presence d'une acetylase codée par un gène *aac-6'-Ib-cr* de support plasmidique (ROBICSEK *et al.*, 2006 ; MERENS et SERVONNET, 2010).

- **La protection de la cible**

Jusqu'en 1998, il était admis que la résistance aux quinolones était liée exclusivement à des mécanismes de résistance de support chromosomique, transmissibles verticalement.

Il s'agissait majoritairement de mécanismes de sélection de mutants résistants par accumulation de mutations ponctuelles. En 1998, un nouveau mécanisme de résistance aux quinolones fut décrit dans une souche nord-américaine de *Klebsiella. pneumoniae.* Il s'agissait d'un mécanisme de résistance jusque-là inconnu dit « Qnr » (*Quinolone Resistance*) (NORDMAN, 2006 ; POIREL *et al.*, 2012).

La molécule de quinolone arrive intacte au niveau de l'ADN gyrase et de la topoisomerase, mais une protéine à motifs pentapeptidiques (QNR) répètes de 218 acides aminés nommée Qnr, vient interférer dans le complexe ADN gyrase/ADN/quinolones et inhibe l'action des quinolones sur sa cible. En présence de la protéine Qnr, les fonctions de surenroulement, relâchement, désenchevêtrement de l'ADN gyrase sont rétablies. A ce jour, 5 déterminants différents ont été rapportés : QnrA, QnrB, QnrS, QnrC et QnrD.

Il s'agit là encore d'une résistance de bas niveau, puisque les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont multipliées par un facteur 4 à 8. Ces protéines Qnr sont codées par des gènes *qnr* de support plasmidique chez les entérobactéries, qui auraient été mobilisés à partir de gènes *qnr* chromosomiques présents chez des bactéries de l'environnement hydrique, comme les *Vibrionaceae.* Cette localisation sur un élément d'ADN mobile, explique l'association de ces gènes de type *qnr* à des gènes codant pour des résistances à d'autres familles d'antibiotiques (NORDMAN, 2006 ; MERENS et SERVONNET, 2010 ; MUYLAERT et MAINIL, 2013).

Les caractéristiques des quinolones et d'autres familles d'antibiotiques utilisés dans ce travail sont synthétisés dans le tableau III.

6- Voies de transmission de l'antibiorésistance (figure 14)

Le réservoir des gènes de résistance aux antibiotiques a deux localisations principales, à savoir les microflores commensales des organismes vivants et les bactéries environnementales. En effet, les flores commensales gastro-intestinales et de toute autre zone non stérile du corps des hommes et des animaux sont le siège de transferts permanents de gènes de résistance entre les bactéries résidentes et les germes pathogènes (SALYERS *et al*., 2004). D'ailleurs, il semblerait que ces échanges constants représentent plus un danger pour la santé publique que la pression de sélection exercée directement sur les agents pathogènes lors des traitements. En fait, le développement occasionnel *de novo* d'une résistance au sein d'un microorganisme pathogène est moins fréquent et a moins d'impact que le trafic incessant organisé depuis le vaste réservoir commensal vers le pool relativement limité constitué des bactéries pathogènes (BOERLIN et REID-SMITH, 2008).

Le second réservoir majeur des gènes de résistance aux antimicrobiens est composé des microbiotes environnementaux, où la plupart des gènes transférables de résistance aux antibiotiques sont apparus pour ensuite être acquis par les germes pathogènes et commensaux

(MUYLAERT et MAINIL, 2012). L'ère moderne d'utilisation des antibiotiques, telle que nous la connaissons aujourd'hui, représente en quelque sorte, une pression de sélection artificielle s'opérant sur les transferts naturels. En outre, l'usage intensif actuel des antibiotiques occasionne d'importantes perturbations des écosystèmes microbiens environnementaux via les nombreux résidus rencontrés dans les eaux usées, les fermes et les effluents d'aquaculture pour ne citer qu'eux (EWERS *et al.*, 2012 ; MUYLAERT et MAINIL, 2012).

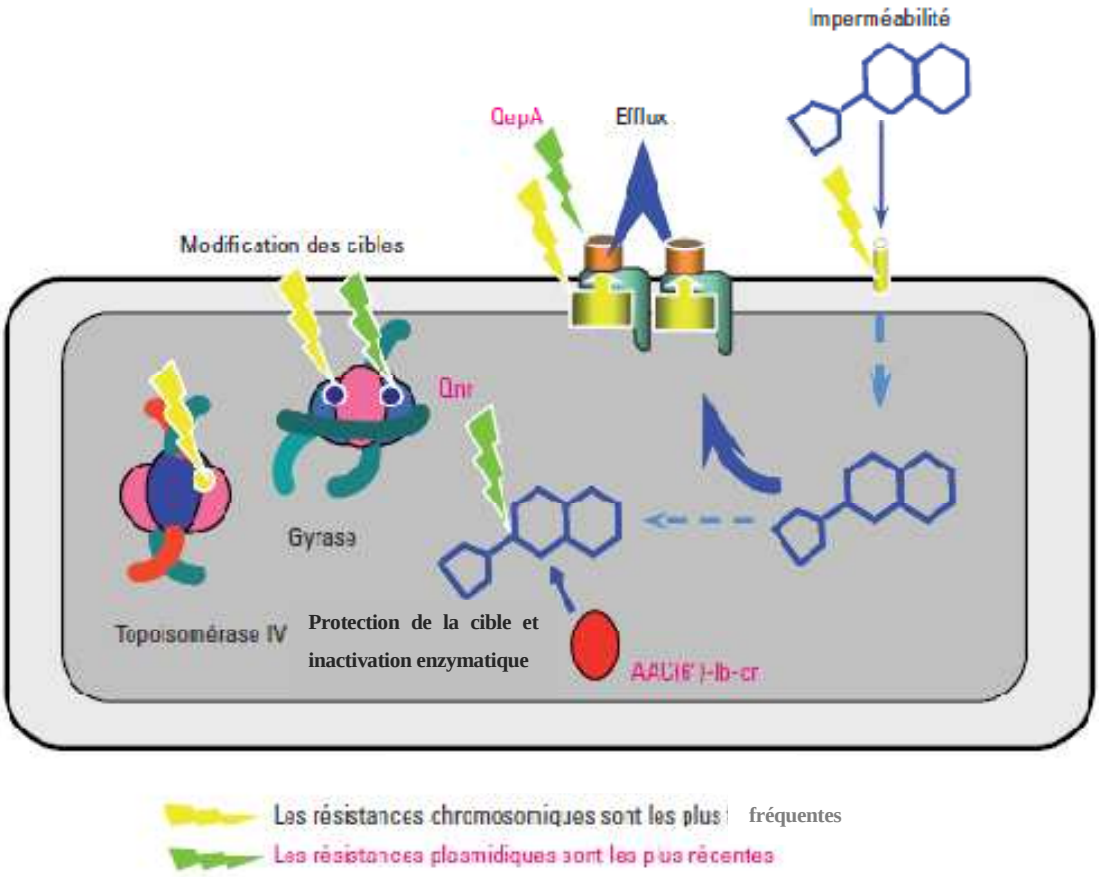


Figure 13 : Les différents mécanismes de résistance aux quinolones

(BOUTIBA –BEN BOUBAKER, 2013)

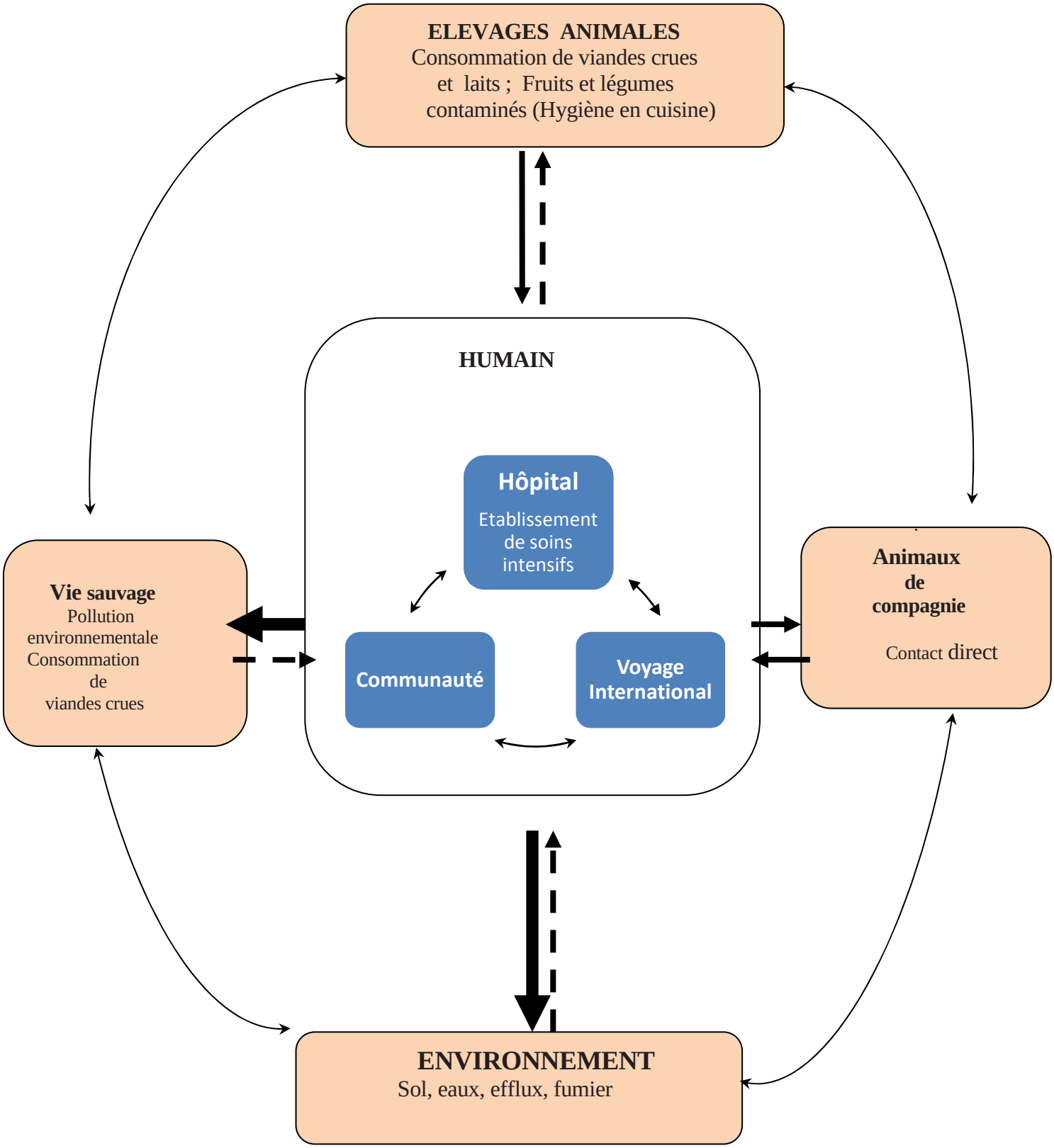
Tableau III : Récapitulation des caractéristiques des bêtalactamines, des quinolones et d'autres d'antibiotiques (BRYSKIER, 1999 ; YALA *et al.*, 2001 ; TORTORA *et al.*, 2003 ; CHEN *et al.*, 2012 ; KEMPF *et al.*, 2013).

Groupe d'antibiotiques	Membres	Mécanismes d'action	Effet primaire et spectre	Principal Mode de
Inhibition de la synthèse de la paroi				
Béta- lactamines	Pénicillines et dérivés : Pénicilline G, pénicilline V, carbénicilline...	Inhibent les enzymes de transpéptidation (PLP) impliquées dans le pontage des chaînes polysaccharidiques du peptidoglycane de la paroi bactérienne. ; Activent les enzymes lytiques de la paroi.	Bactéricide Large	Inactivation enzymatique (Bêta-lactamases) (chromoso-mique et éléments mobiles
	Céphalosporines : 1ère , 2ème 3ème et 4ème génération			
	Carbapénèmes			
	Monobactames			
Inhibition de la synthèse protéique				
Aminosides	Streptomycines, kanamycine, gentamicine, néomycine, amikacine…	Se fixe à la sous-unité 30S du ribosome pour inhiber directement la synthèse protéique et provoquer des erreurs de lecture de l'ARNm.	Bactéricide	Inactivation enzymatique (APH ; ANT AAC et RMT). Par Transposon et plasmides
Tétracyclines	Tétracycline, oxytétracycline et chlortétracycline	Fixation sur la sous-unité 30S du ribosome (site A) et inhibition de la fixation de l'aminoacyl-ARNt sur le site ribosomale spécifique.	Bactériostatique	Pompes à efflux (gènes *tet*)
Détérioration de la membrane				
Polypeptides	Polymyxines B, colistine	Désorganisation membranaire par fixation sur les phospholipides et le lypopolysaccharide de la membrane externe	Bactéricide	Modification de la cible (LPS) (Mutations)

APH : aminoside-O-phosphotransférases **; ANT :** aminoside-O-nucléotidyltransférases **; AAC :** aminoside-N-acétyltransférases ; **RMT :** 16S rRNA methylases ; **PLP** : Protéines liant Pénicillines.

Tableau III : (Suite).**Récapitulation des caractéristiques des bêtalactamines, des quinolones et d'autres d'antibiotiques (**BRYSKIER, 1999 ; YALA *et al.*, 2001 ; TORTORA *et al.*, 2003 ; CHEN *et al.*, 2012 ; KEMPF *et al.*, 2013).

Famille d'antibiotiques	Membres	Mécanismes d'action	Effet primaire et spectre	Principal Mode de résistance
Inhibition des acides nucléiques				
Quinolones et **fluoroquinolones**	Acide nalidixique, Acide pipémidique	Inhibent l'ADN gyrase et la topoisomérase IV; interférent avec la réplication de l'ADN et la transcription.	Bactéricide Etroit (Gramexcepté *Pseudomonas* sp.)	- Modification de la cible (mutations) - Diminution de la concentration en ATB - Protection de la cible des FQ (Qnr) - Pompes à efflux (Qep et OqxAB)
	Ofloxacine, norfloxacine, ciprofloxacine, péfloxacine		Large	
Inhibition de la synthèse des folates				
Sulfamides	Sulfadiazine, sulfanilamide...	Inhibent la synthèse du THF (l'acide tétrahydrofolique) par compétition avec l'acide p-aminobenzoique (PABA).	Bactériostatique Large	Présence d'intégron de classe 1 Modifications des cibles (gènes *sul*) de la dihydro--pteroate synthétase (DHPS) et (gènes *dhr*) de la dihydrofolate réductase (DHFR)
Triméthoprime	Triméthoprime	Inhibe la synthèse du THF (l'acide tétrahydrofolique) par compétition avec le substrat de la dihydrofolate réductase.		



----▶ Transmission probable

Figure 14 : Les voies de transmission de l'antibiorésistance à travers les différents habitats (adapté de EWERS *et al.*, 2012)

Les métaux lourds et la métallorésistance

Les éléments métalliques sont, sous différentes formes, toujours présents au sein de l'environnement. A l'état de traces, quelques-uns sont nécessaires voire indispensables aux êtres vivants ; à concentration élevée, en revanche, ils présentent une toxicité plus ou moins forte (PICHARD, 2002). D'autres ne sont pas nécessaires à la vie et sont préjudiciables dans tous les cas, comme le plomb (Pb) (CHIFFOLEAU, 2001). La présence de métaux lourds dans l'environnement résulte de causes naturelles et des activités humaines. Elles posent un problème particulier, car les métaux lourds ne sont pas biodégradables (CHIFFOLEAU, 2001).

Ces métaux lourds ne présentent pas tous les mêmes risques en raison de leurs effets sur les organismes, leurs propriétés chimiques, physico-chimiques et biologiques. Leur toxicité est très variable et leur impact sur l'environnement très différent.

1- Définition des métaux lourds

Les définitions des métaux lourds sont multiples et dépendent du contexte ainsi que de l'objectif de l'étude à réaliser.

D'un point de vue physique, le terme « métaux lourds » désigne les éléments métalliques naturels, métaux ou dans certains cas métalloïdes (environs 65 éléments ; tableau périodique en annexe 1), caractérisés par une forte masse volumique supérieure à 5g /cm^3 (ADRIANO, 2001 ; DESCHAMPS *et al.*, 2006).

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

D'un point de vue biologique, on distingue deux types, en fonction de leurs effets physiologique et toxique : métaux essentiels et métaux toxiques.

Le terme « élément trace métallique » est aussi utilisé pour décrire ces mêmes éléments car ils se retrouvent souvent en très faible quantité dans l'environnement (SANDAA *et al*, 2001).

L'appellation métaux lourds est une appellation courante qui n'a ni fondement scientifique ni application juridique. Les métaux lourds sont présents dans tous les compartiments de l'environnement, mais en général en quantité très faibles. On dit que les métaux sont présents en « traces » (MIQUEL, 2001 ; LAMY, 2002). La classification en métaux lourds est d'ailleurs souvent discutée car certains métaux toxiques ne sont pas particulièrement « lourds » (le zinc par exemple), tandis que certains éléments toxiques ne sont pas tous des métaux (l'arsenic par exemple). Pour ces différentes raisons, la plupart des scientifiques préfèrent à l'appellation métaux lourds, l'appellation « éléments en traces métalliques » (ETM) ou par extension « éléments traces » (KHAN et SCULLION, 2002).

2- Origines naturelles et humaines des métaux lourds dans l'environnement

Une quantité importante de métaux lourds est introduite dans l'environnement. Deux grandes catégories de sources peuvent être distinguées : les sources naturelles et les sources anthropiques qui sont liées directement à l'activité humaine (GADD, 1992).

2-1- Les origines naturelles

Parmi les importantes sources naturelles, citons l'activité volcanique, l'altération des continents et les incendies de forêts. La contribution des volcans peut se présenter sous forme d'émissions volumineuses dues à une activité explosive, ou d'émissions continues de faible volume, résultant notamment de l'activité géothermique et du dégazage du magma (DERMENDRAIL *et al.*, 2000). Selon les métaux, les réserves les plus importantes se trouvent dans les roches et/ou les sédiments océaniques et sont diffusées avec l'érosion (TCHOUNWOU *et al.,* 2012).

2.2- Origine anthropique (Tableau IV)

L'activité humaine représente la principale source d'augmentation des flux de métaux lourds dans l'environnement. Cette contamination a plusieurs origines telles que la combustion de fossiles dont un grand nombre de métaux sont émis par la combustion de charbon (cadmium,, zinc, mercure, nickel, plomb, arsenic), les gaz d'échappement des véhicules, l'incinération des déchets ménagers et de certains déchets industriels, l'activité minière et enfin certaines pratiques agricoles par l'utilisation des produits souvent riches en métaux comme les engrais, les pesticides, les boues de station d'épuration (Di BENEDETTO, 1997 ; HENGSTLER *et al.,* 2003).

Les métaux provenant d'apports anthropiques sont présents sous des formes chimiques assez réactives et entraînant de ce fait des risques très supérieurs aux métaux d'origine naturelle qui sont le plus souvent immobilisés sous des formes relativement inertes (McKENZIE *et al.*, 1997).

Tableau IV : La présence de métaux lourds dans l'environnement Humain (HUSS,2011).

Métal	Source
Aluminium	Canettes de boissons, médicaments (vaccins, pansements gastriques, céramiques orthopédiques et dentaires, colle médicales), cosmétiques crème solaire, Dentifrice, Casserole, déodorants, chaine alimentaire : eau potable, légume Additifs alimentaires (biscuits, produits laitiers).
Arsenic	Chaine alimentaire : eau potable (dépôts minéraux naturels), légumes notamment laitue, fruits de mer.
Cadmium	Produits céramiques en contact avec les denrées alimentaires, cigarettes et fumées de piles, chaine alimentaire : eau potable, légumes, fruits de mer, Foies et reins d'animaux
Mercure	Production de chlore, extraction d'or, Piles, Appareils de mesures, Amalgames dentaires, fumées de cigarettes, Chaine alimentaire : Poisson : espadons, thons, raies…
Nickel	Bijoux, pièces de monnaie, chaine alimentaire : eau potable, mollusques, chocolat, soja, noix, farine
Plomb	Batteries et accumulateurs, Peintures anciennes
Zinc organique	Suppléments vitaminiques, Shampoings antipelliculaires, déodorants

3- Les métaux lourds d'importance toxicologique majeure

Les métaux toxiques ont un caractère polluant avec des effets toxiques pour les organismes vivants même à faible concentration. Ils n'ont aucun effet bénéfique connu pour la cellule, c'est le cas du plomb (Pb), mercure (Hg), cadmium (Cd). L'effet toxique dépend de la dose absorbée, la voie de pénétration et de la durée d'exposition (JAISHANKAR *et al.,* 2014).

- **Le cadmium**

Le cadmium est un métal malléable d'aspect blanc bleuâtre. Sous-produit de la métallurgie du zinc et du plomb ; ces principaux composés minéraux sont : l'oxyde, le chlorure, le bromure, le nitrate, le cyanure etc… qui sont des stabilisants de la matière plastique (JUSTE *et al.,* 1995). Les usages industriels et l'utilisation des boues d'épandage dans les champs sont les principales causes d'augmentation des niveaux environnementaux (FRANK et LORGUE, 1992).

Le cadmium (groupe IIB de la table périodique des éléments chimiques) est un polluant ubiquitaire toxiques en raison de son influence négative sur les systèmes enzymatiques cellulaires (SANITA et GABBRIELLI, 1999).

L'exposition chronique au cadmium, par inhalation ou ingestion, se traduit par des désordres sévères au niveau des reins, des poumons, de la reproduction, du système cardiovasculaires et des os (ZHAI *et al.,* 2015). Ces effets négatifs sur la santé humaine sont dues à une vitesse d'excrétion lente (demi- vie de 15 à 20 ans) et à son accumulation dans l'organisme (BERTIN et ADVERBECK, 2006) ; une augmentation des cas de certains cancers, en particulier des poumons est observé chez les populations exposées au cadmium (WALKES, 2000 ; CHAKRABORTY *et al.,* 2013).

- **Le mercure**

Le mercure existe dans la nature sous trois formes différentes : le mercure élémentaire (Hg^0), très dense, volatile dès la température ordinaire, le cation mercurique (Hg^+) et (Hg^{++}).
L'ion mercurique transformé en méthyl mercure par activité microbienne est facilement assimilé et stocké dans les graisses animales (BOUCHESEICHE *et al*., 2000). Il peut également être méthylé en diméthyle-mercure, composé volatile qui passe dans l'atmosphère et va ensuite être ramené dans les eaux et les sols par les précipitations Le mercure pénètre préférentiellement dans l'organisme par les voies respiratoires (RAMADE, 2005). Grâce à sa solubilité dans les liquides, le mercure métallique (Hg^0) va se concentrer dans le système nerveux, surtout au niveau du cerveau entrainant un processus inflammatoire de type encéphalite (FRANK et LORGUE, 1992 ; MARTIN et GRISWOLD, 2009).
Sous forme de sels mercurique (Hg^{++}) hydrosoluble, la cible principale sera les reins, dont l'inflammation va conduire à une néphrite souvent mortelle.
Le cation méthyle mercure (CH_3 -Hg^+), grâce à sa partie lipophile va rapidement se concentrer dans le système nerveux et sa neurotoxicité engendrera une encéphalite et une polynévrite (CHAKRABORTY *et al.,* 2013).

- **Le plomb**

Le plomb est un métal mou, bleuâtre à gris, il fond à 327 °C, possède une forte densité et une ductilité élevée. C'est le métal le plus universellement répondu des métaux toxiques, la pollution a augmenté en raison des activités minières et divers usages industriels (FRANK et LORGUE, 1992).

Le seuil de plomb sanguin toxique chez les enfants qui était de 60 µg/dL dans les années 1960, a été abaissé à 10 µg /dL en 1991 (ZHAI *et al.*, 2015).

Les composés organiques du plomb, comme le plomb tétraéthyle et tétraméthyl sont facilement absorbés après inhalation provoquant des encéphalopathies. Le système hématopoïétique est extrêmement sensible aux effets de ce métal (FRANK et LORGUE, 1992 ; JAISHANKAR *et al.*, 2014).

4- Les métaux lourds essentiels

Les métaux essentiels 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 (certains peuvent devenir toxiques lorsque la concentration dépasse un certain seuil (LOUE, 1993 ; KABATA-PENDIAS et PENDIAS, 2001).

A titre d'exemples, le fer est un constituant de l'hémoglobine ; le cuivre facilite l'utilisation du fer dans la synthèse de l'hémoglobine. La déficience en l'un ou l'autre de ces métaux provoque une anémie hypochrome et microcytaire (FRANK et LORGUE, 1992).

Le zinc à la concentration du milimolaire, est un oligo-élément qui intervient dans de nombreuses réactions enzymatiques (déshydrogénase, protéinase, peptidase) (JAISHANKAR *et al.*, 2014). Le sélénium est un composant de la glutathion peroxydase, responsable de la destruction de l'H_2O_2 et des lipides peroxydes ; sa fonction est étroitement liée à celle de la vitamine E, antioxydant biologique (FRANK et LORGUE, 1992).

5- Autres métaux lourds

- L'argent

L´argent est un métal blanc, brillant et malléable. Dans la nature, il se trouve sous forme native ou dans les minerais de sulfure, de zinc et de plomb tels que l´argentite (Ag^2S), la cerargyrite (AgCl) et la pyrargyrite (Ag^3SbS^3).

Ce métal existe dans le sol, à la suite de processus géochimiques, à une teneur moyenne de 0,1mg/kg. On utilise l´argent dans les alliages de brassage et de soudure, dans la fabrication de fongicides, d´argenterie et de bijouterie. Il est également utilisé comme agent antimicrobien dans certaines installations de traitement de l´eau (HOWE et DOBSON, 2002).

- Le chrome

Ce métal fut nommé à cause des couleurs éclatantes qu'il donne à certains de ses composés. Le chrome en très faible quantité, « à l'état de trace », est essentiel pour la vie humaine. L'exposition répétée et régulière aux composés chromés peut entraîner de graves dommages pour la santé. Les quantités très importantes de chrome dispersées par certaines activités industrielles présentent aussi un réel danger pour les écosystèmes (TCHOUNWOU *et al.*, 2012).

- L'aluminium

L'aluminium est le troisième élément le plus abondant trouvé dans la croûte de la terre (GUPTA *et al* ., 2013). Avec la diminution du pH sa toxicité augmente. La mobilisation des ions aluminium toxiques (résultant de changements dans le pH du sol et de l'eau) causée par les pluies acides et l'acidification croissante de l'atmosphère ambiante, a un effet défavorable sur l'environnement et la faune aquatique et crée des déséquilibres fonctionnels systémiques chez l'Homme et l'animal (JAISHANKAR *et al.,* 2014).

6- Effet des métaux lourds sur la santé humaine (Tableau V)

Certains métaux comme le fer, le chrome et le cuivre sont nécessaires en petites quantités pour assurer la santé des êtres humains et les animaux (MOHAN *et al.,* 2006). Mais lorsqu'absorbés en trop grandes quantités, ces métaux occasionnent divers problèmes. Pour l'Homme, la problématique des métaux lourds est majeure car elle affecte toutes les caractéristiques de la vie. En effet, la cellule est l'unité biologique fondamentale la plus petite or les métaux lourds peuvent entrainer sa dégénérescence (POEY et PHILIBERT, 2000).

Certains d'entre eux sont cancérigènes, il peut donc y avoir atteinte de l'entité élémentaire de la vie. Les métaux lourds peuvent entrainer chez l'Homme des pathologies touchant à son intégrité physique et mentale. Les métaux lourds peuvent s'accumuler au sein de l'organisme et donc perturber son organisation interne. Certains métaux ont des effets tératogènes et d'autres peuvent s'accumuler au sein de l'organisme et donc perturber son organisation interne et entraîner des troubles de la fécondité. (DI BENEDETTO, 1997 ; TCHOUNWOU *et al.,* 2012). Comme résumé dans le tableau V, chaque fonction fondamentale et vitale de l'homme est mise en danger par la présence des métaux lourds dans l'environnement.

La quantité des métaux lourds absorbée par un homme influe directement sur sa santé. Elle peut présenter une toxicité aiguë (pic de pollution dans l'air ou l'eau), ou une toxicité due à un effet cumulatif (par une exposition continue au milieu pollué ou parce que l'Homme est en bout de chaine alimentaire) (TCHOUNWOU *et al.,* 2012).

7- Impact des métaux lourds sur l'environnement

La présence de métaux dans l'environnement est un fait bien connu depuis des années. Beaucoup d'entre eux sont utilisés dans des procédés industriels et arrivent dans l'environnement humain par des émissions atmosphériques, aquatiques ainsi que par des rejets solides, tels que l'arsenic, le cadmium, le chrome, le cuivre, le manganèse, le mercure, le nickel, le sélénium, ou le zinc organique (TCHOUNWOU *et al.,* 2012).
Dans les systèmes aquatiques, la pollution métallique affecte la qualité des eaux de surface et des nappes phréatiques pouvant aller jusqu'à une limitation de l'utilisation de l'eau.

Les principales sources de contamination de l'eau sont les suivantes : les eaux usées domestiques et industrielles, la production agricoles, les polluants atmosphériques, les anciennes décharges, l'utilisation de substances dangereuses pour l'eau, la navigation etc…

Dans les systèmes terrestres, les métaux s'accumulent dans les sols et peuvent contaminer les cultures, tous les végétaux sont des accumulateurs de métaux qu'ils soient

aquatiques (algues) ou terrestres (feuilles des arbres, légumes, champignons….) (SCHUHMACHER, 1996). De nombreux éléments se trouvent à l'état de traces dans des particules atmosphériques provenant de combustions à haute température, de fusion métallurgiques, des incinérateurs municipaux des véhicules etc …
Les effets biologiques, physiques et chimiques de ces particules sont fonction de la taille des particules, de leur concentration et de leur composition ; le paramètre le plus effectif sur l'environnement étant la taille de ces particules (POEY et PHILIBERT, 2000).

Dans l'air ambiant, on trouve de nombreux éléments comme le plomb, le cadmium, le zinc, le cuivre,…, dont la concentration est d'autant plus élevée que les particules sont fines (VEERESH, 2003).

La bioaccumulation est influencé par de nombreux facteurs, l'acidité est certainement le plus important puisqu'elle favorise la dissolution et le lessivage des métaux, augmente leur biodisponibilité et dans certains cas l'émergence de formes chimiques plus toxiques.
Les interactions entre les cellules bactériennes et les métaux lourds sont gouvernées par des mécanismes passifs et actifs (CHANG *et al*., 1997 ; HAFERBURG et KOTHE, 2007).

- Le premier processus (passif) est rapide, non spécifique et constitutif. Ce type de transport cationique est contrôlé par le gradient chimiosmotique à travers la membrane.
On parle alors de diffusion simple qui s'explique par des régulations d'équilibre entre les compartiments internes et externes de la cellule, induisant des transferts passifs par des porines.
- Le second processus (actif) est plus lent, inductible, impliquant une forte affinité au substrat et nécessitant souvent un apport énergétique (hydrolyse d'ATP). Ce type de transport est utilisé principalement en cas de carence ou de besoin métabolique spécifique. On parle alors de transport actif impliquant des transporteurs membranaires dont la synthèse et l'activation sont contrôlées au niveau génétique via divers systèmes de gènes (NIES and SILVER, 1995 ; NIES, 1999).

8- Effets des métaux lourds sur les bactéries

- **Nécessité des métaux lourds**

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.

Certains métaux lourds (nickel, cobalt, fer, zinc, cuivre, magnésium, manganèse molybdène) sont les cofacteurs indispensables de certaines protéines pour leur stabilisation ou leur conformation et dans certaines fonctions biochimiques et physiologiques (TCHOUNWOU *et al.*, 2012). Par exemple le nickei est un cofacteur des uréases (DOSANGH *et al*., 2007) et des hydrogénases (WU *et al*., 1994 ; HIGUCHI *et al*., 1997 ; HIGUCHI *et al*., 1999) ; le cobalt est un cofacteur chez certaines enzymes du métabolisme de la méthionine ou de la vitamine B12 (WANG *et al*., 2003).

Tableau V : Impacts de quelques métaux lourds sur la santé humaine (POEY et PHILIBERT, 2000 ; GOMBERT *et al.*, 2005)

		EFFETS	
Eléments	**Toxicité/forme la plus toxique**	**Chroniques Exposition peu intense de longue durée**	**Aigus Exposition peu intense de courte durée**
Arsenic	Formes inorganiques	Cancérigène, lésions (moelle osseuse, sang, foie, système nerveux)	Irritation des muqueuses, trouble digestif et lésion de la peau
Cadmium	Formes inorganiques (chlorure et oxyde de cadmium)	Potentiellement cancérigène, ostéoporose, lésion du rein	Troubles digestifs, pulmonaires et rénaux
Chrome	Formes inorganiques (Cr VI, trioxyde de Cr)	Effets cancérogènes (poumons), lésions du rein, troubles respiratoires et gastro-intestinaux	Irritations des muqueuses respiratoires
Cuivre	Toxicité rare sauf si exposition exceptionnelle		Lésions des muqueuses respiratoires
Mercure	Méthyl mercure	Troubles neurologiques et du comportement, tremblements	Troubles neurologiques et digestifs, irritation des voies respiratoires, lésions du rein
Fer	Toxicité rare sauf si exposition exceptionnelle (trichlorure de fer)		Troubles digestifs, lésion du rein, irritation (peau, muqueuses)
Nickel	Toxicité assez rare formes organiques (nickel tétracarbonyl)	Cancérigène, asthme, rhinites chroniques	Troubles respiratoires, digestifs et cutanés
Plomb	Formes organiques	Potentiellement cancérigène, plombémie, convulsion, troubles neurologiques et du comportement	Troubles neurologiques (enfants plus sensibles), digestifs et rénaux
Zinc	Toxicité rare sauf si exposition exceptionnelle		Irritations des muqueuses respiratoires, gastro-intestinales et cutanées, fatigue, frisson
Vanadium	Toxicité rare sauf si exposition exceptionnelle (pentoxyde de vanadium)	Bronchites chroniques, pneumonie, anémie, lésions du foie et des reins	Irritation (appareil respiratoire, peau, muqueuse)

D'autres métaux lourds, y compris le plomb, le cadmium, et le chrome n'ont aucun effet avantageux connu aux cellules bactériennes et sont toxiques même aux basses concentrations (EHRLICH, 1997).

La grande variété de métaux lourds et de leurs effets biologiques nécessite chez les bactéries une régulation fine pour le maintien (homéostasie) et le contrôle de leur concentration intracellulaire (NIES, 1999). Cette régulation évite l'expulsion des métaux essentiels présents aux concentrations homéostatiques (dans le domaine nanomolaire) ou l'entrée de métaux en quantité toxique (de l'ordre micromolaire).

Ces ions métalliques entrent dans la cellule par l'intervention de porines exprimées de manière constitutive et dépend uniquement d'un gradient chimiosmotique à travers la membrane bactérienne, ou par une concentration d'énergie souvent sous la forme d'hydrolyse de l'ATP.

Effet toxiques

La capacité d'un métal lourd, en particulier celle de l'argent et du cuivre à exercer en très petite quantité une activité antimicrobienne s'appelle action oligodynamique. Cet effet est dû à la combinaison entre les ions métalliques et les groupements sulfohydroxyles (-SH) des protéines cellulaires, celles-ci subissent une dénaturation (TORTORA *et al*., 2003).

Les sels des métaux lourds sont beaucoup plus efficaces et aussi plus utilisés dans le domaine médical comme agent antimicrobien ; les plus connus sont les sels d'argent, de mercure, de cuivre, de zinc. La biodisponibilité, la toxicité et la nécessité des ions métalliques pour la bactérie dépendent de leur caractérisation physico-chimiques et de leur concentration.

La toxicité intracellulaire des ions métalliques relève de divers mécanismes :

- L'inhibition des activités enzymatiques :

Les cations métalliques se fixent sur les résidus cystéines, acide glutamique ou acide aspartique qui font partie du site actif de plusieurs enzymes. Un grand excès d'ions métalliques peut aussi entrer en compétition avec un autre ion nécessaire à l'activité d'une enzyme et localisé dans son site actif (NIES, 1999 ; HAFERBURG et KOTHE, 2007).

- L'altération de la structure des acides nucléiques :

La fixation des cations métalliques sur les groupements phosphates des acides nucléiques peut entrainer des modifications de structure empêchant la transcription ou la traduction des gènes (HENGSTLER *et al*., 2003).

- L'interaction avec les espèces oxygénées réactives issues des processus respiratoires, ce qui entraine la formation de radicaux libres, pouvant endommager l'ADN (mutations), les protéines (en créant des pontages inter et intra moleculaires) ou encore les acides gras insaturés de la membrane cellulaire.

9- La métallo- résistance bactérienne

La toxicité d'un métal pour les micro-organismes est déterminée par sa capacité à inhiber ou perturber la croissance cellulaire. Une souche bactérienne est dite résistance à un métal donné, quand elle est capable de se développer en présence d'une concentration, significativement plus élevée que celle habituellement active sur la souche de cette espèce.

La définition de la résistance dépend de la concentration considérée en éléments toxiques choisis, de la souche étudiée mais aussi des conditions expérimentales notamment

pour les éléments métalliques dont la spéciation chimique dépend des conditions du milieu (GADD, 1992).

Sur le plan génétique, de même que pour les antibiotiques, la résistance des micro-organismes aux métaux lourds peut être naturelle (ou intrinsèque) ou acquise par mutation chromosomique, par acquisition de matériel génétique exogène (plasmides, transposons, intégrons) suite aux différents types de transfert horizontal tel que la conjugaison, la transformation et la transduction. Une co-sélection des résistance aux antibiotiques (figure 17) et des métaux lourds a largement été décrite dans de nombreux travaux (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2006).

9.1- Principaux mécanismes de résistance bactérienne aux métaux lourds

Les microorganismes, en particulier les bactéries, peuvent interagir avec les métaux lourds via différents mécanismes (figure 15) :

- Par une transformation des métaux par des processus d'oxydation/réduction ou d'alkylation. Ces modifications modifient généralement la toxicité et la mobilité du métal d'origine.
- Par accumulation des métaux par le biais de phénomènes d'adsorption passive (indépendante du métabolisme) ou par transport actif à l'intérieur de la cellule (dépendante du métabolisme).
- Par la production par les microorganismes des substances telles que des composés organiques ou des sulfures, par exemple, qui modifient la solubilité et donc la mobilité des métaux (LEDIN, 2000).

9.1.1- Résistance par système d'efflux (figure 17)

De nombreuses bactéries sont capables d'excréter les métaux par des systèmes d'efflux. L'efflux est le mécanisme principal des résistances inductibles : il réalise le transport actif des ions métalliques via deux classes de protéines :

- soit des transporteurs primaires pour lesquels le transport est directement couplé à l'hydrolyse de l'ATP (ABC-transporteur « ATP binding cassette » ; ATPase) ;
- soit des transporteurs secondaires qui utilisent un gradient électrochimique (CDF (cation diffusion facilitators), RND (resistance nodulation-cell division), MFS (Major Facilitator Superfamily). Ces types de transporteurs se caractérisent par une forte affinité au substrat et permettent de maintenir de faibles concentrations métalliques dans le cytosol (NIES and SILEVER, 1995 ; NIES, 2003).

L'un des exemples les plus connus est la bactérie *Cupriavidus metallidurans* qui a fait l'objet de nombreuses études.

Trois grandes familles de protéines responsables de l'efflux chez les microorganismes (NIES, 2003) ont été décrites :

- Les protéines de la famille « **resistance nodulation-cell division** » (RND) dont la première découverte fut la protéine *CzcCBA* de la bactérie *Cupriavidus metallidurans* CH34, qui a fait l'objet de nombreuses études (SAIER *et al*., 1994) et dont le plasmide pMOL30 permet la résistance au cobalt, zinc et cadmium (*czc*) via un mécanisme d'efflux. Les protéines RND ont d'abord été décrites comme un groupe de protéines impliquées dans

la résistance aux métaux lourds (*Cupriavidus metallidurans*), la nodulation (*Mesorhizobium meliloti*) et la division cellulaire (*E. coli*). De même pour la protéine permettant la résistance au cobalt et nickel (*cnr*) portée par le plasmide pMOL28. L'efficacité de ce système serait due au fait qu'il permet de diminuer la concentration cytoplasmique et la concentration périplasmique. Dans ce cas, les cations peuvent être excrétés avant même leur entrée dans la cellule (NIES, 2003). Ces protéines sont souvent couplées à deux autres protéines : une protéine de fusion membranaire (MFP) et un facteur de la membrane externe (OMF) (NIES, 2003). Ce type de mécanisme est appelé HME-RND lorsque le substrat est un ion ou un groupe d'ions de métaux lourds (RENSING et GRASS, 2003). L'ensemble des trois protéines forme un canal par lequel les ions sont extrudés à l'extérieur de la cellule par un système de type antiport cation-proton où le flux de cations métalliques est équilibré par un flux de protons en sens opposé (DIELS *et al*., 1995) comme le montre le modèle établi par NIES en 2003 (figure 16).

- La famille « **cation diffusion facilitators »** (CDF) dont les substrats principaux sont le zinc, le cobalt, le cadmium et le fer. Ces systèmes d'efflux sont contrôlés par le gradient de concentration. Toutes les protéines CDF décrites chez les bactéries sont impliquées dans la résistance au zinc. C'est le cas de la protéine *CzcD* chez *C.metallidurans* CH34. La protéine *ZitB* a été mise en évidence chez *E. coli*, pour son implication dans la résistance au zinc (contrôlée par le gradient de potassium et la « force motrice protonique » ; son expression est induite par la présence de Zn. Les protéines de la famille CDF sont généralement responsables de l'efflux des métaux présents dans le cytoplasme (NIES, 1999).

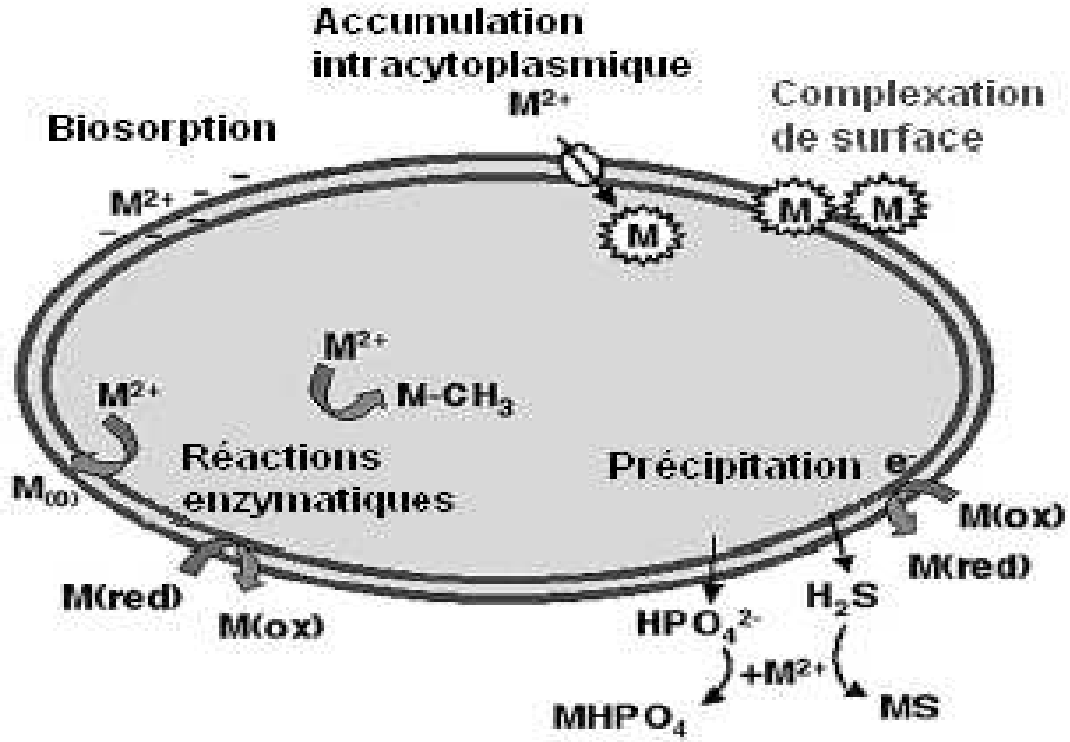


Figure 15: Les différents mécanismes de résistance des bactéries contre les métaux (M) (VALLS et LORENZO, 2002).

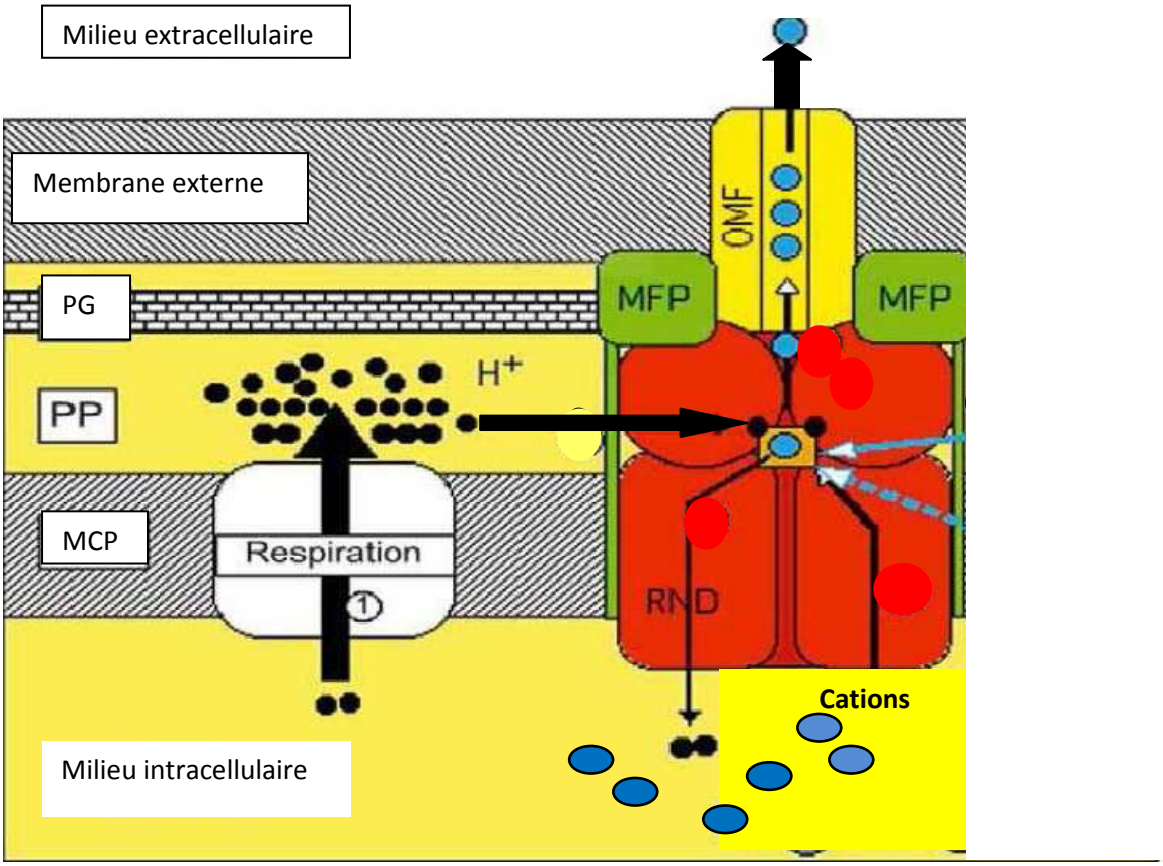
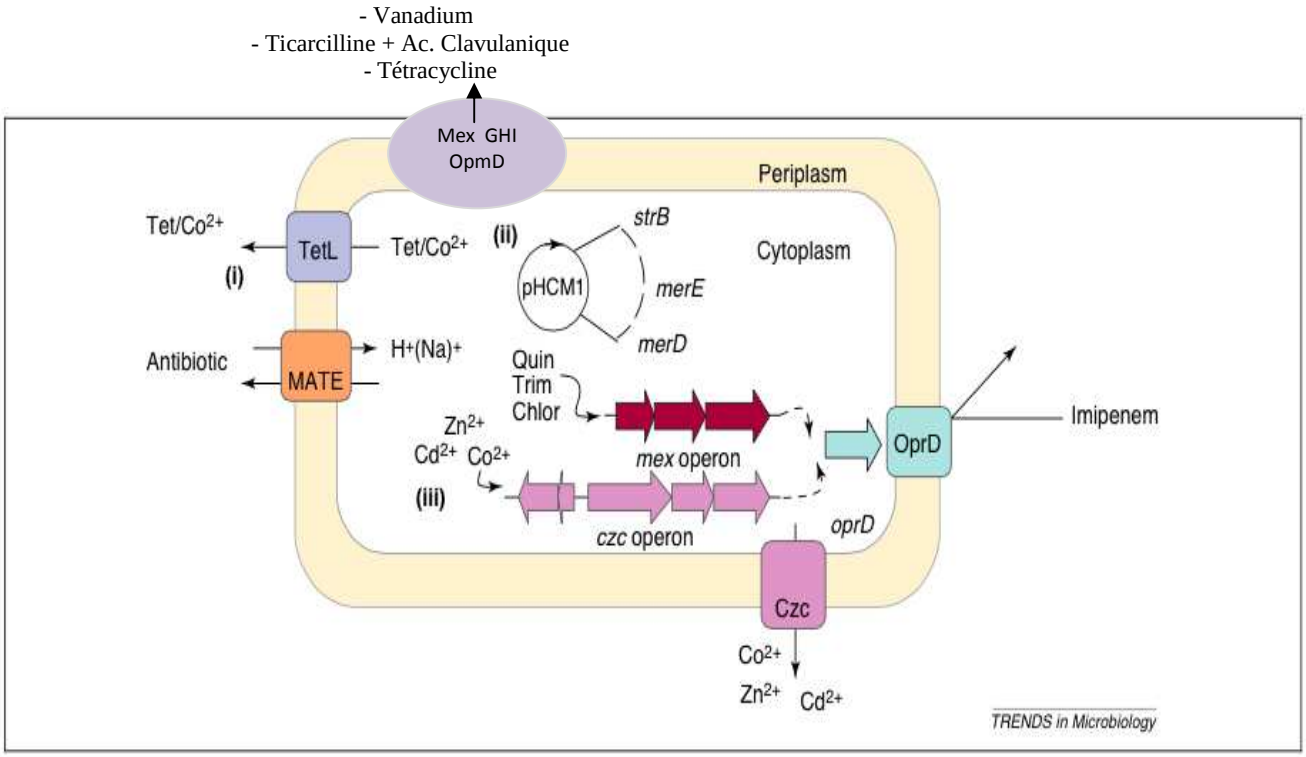


Figure 16 : Modèle du mécanisme cellulaire des protéines RND (NIES, 2003).

MFP : protéine de fusion membrannaire ; OMF : Facteur de la membrane externe ; RND : Protéines « resistance nodulation-cell division » ; PG : peptidoglycane ; PP : périplasme ; MCP : membrane cytoplasmique.

Représentation schématique d'un complexe de type **RND** composé d'une protéine de la famille des RND (en rouge) qui fonctionne comme une pompe insérée dans la membrane interne,. L'action de protéines RND est entraînée par des protons (points noirs) qui ont été précédemment expulsés par la voie de la chaine respiratoire. Elle est reliée par une protéine périplasmique de la famille des **MFP** (en vert) à une protéine insérée dans la membrane externe appartenant à la famille des OMF (en jaune). Les cations efflux par ce transporteur chimioosmotique peuvent être pris en charge au niveau du périplasme ou du cytoplasme (adapté de Nies, 2003).



Abréviations : Chlor, chloramphenicol ; MATE, multidrug and toxic compound extrusion ; merD, gène codant une protein régulatrice de l'opéron mer ; merE, gene de la protein d'efflux du mercure ; pHCM1, Salmonella typhi CT18 resistance plasmid . Quin, quinolone ; strB, gene codant pour la protéine modifiant la streptomycine ; Tet, tétracycline; TetL, protéine d'efflux de la tétracycline, Trim, trimethoprime.

Figure 17 : Exemples de mécanismes moléculaires sous-tendant la métalo-antibio-co-sélection (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2006)

La co-résistance est la liaison physique de la des déterminants de résistance par laquelle la résistance à l'un des déterminants engendre la résistance à d'autres substances toxiques. Exemple de transport simultané de la tétracycline et du cobalt par la protéine TetL. Autres exemples montrant la liaison de la résistance à la streptomycine et au mercure par les gènes de résistance portés par le plasmide pHCM1 et la liaison des opérons mex et czc conduisant à l'expression de l'efflux de métal (zinc, cadmium ou cobalt) et une résistance à l'imipénème.

.

- Les **P-type ATPases** est la troisième grande famille dans l'efflux de métaux formant une grande famille de transporteurs actifs dont l'énergie provient de l'hydrolyse de l'ATP (figure 18). Il existe des ATPases qui importent et d'autres exportent les métaux. Par exemple les Zn-CPx-type ATPases impliquées dans le transport du zinc, du cadmium et du plomb principalement du cytoplasme vers le milieu extérieur ou le périplasme. La première protéine décrite fut CadA, qui est impliquée dans l'efflux de Cadmium, découverte chez *S. aureus* (NIES, 2003).

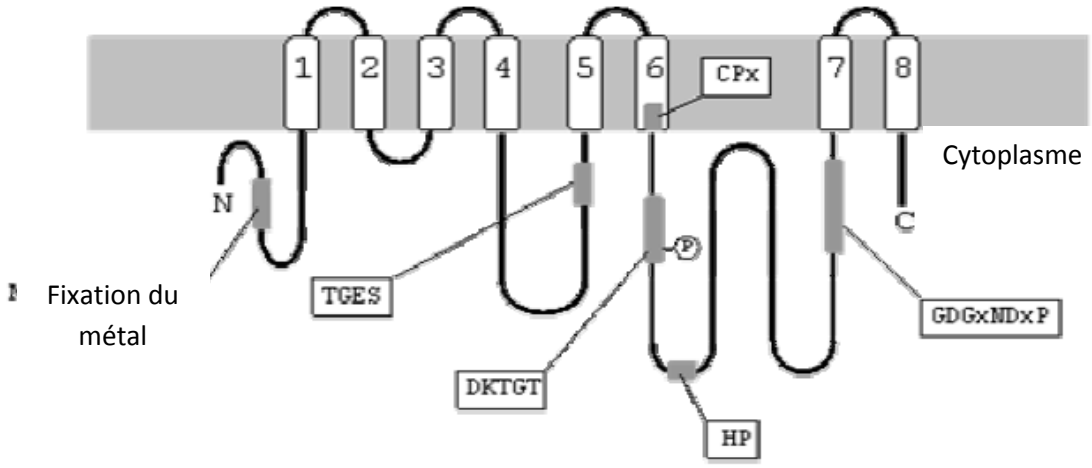


Figure 18 **:** Structure schématique des ATPases de type P1 impliquées dans le transport des métaux lourds (MONCHY, 2006).

Le site phosphate (TGES), le site de phosphorylation (DKTGT) et le site de fixation de l'ATP (GDGXNDXP) sont communs à toutes les ATPases de type P1. Les sites CPX, HP et les sites de fixation au métal (poly-His, CXXC) sont spécifiques des ATPases de type P1 impliquées dans le transport des métaux lourds**.**

9.1.2- Résistance par séquestration

Si les métaux toxiques sont entrés dans la cellule et ne peuvent pas être excrétés par des systèmes d'efflux, plusieurs organismes ont développé des mécanismes de séquestration cytologiques pour se protéger. Beaucoup d'organismes résistants aux métaux sont capables de séquestrer de grandes quantités de cations métalliques dans des composés internes comme, par exemple, des granules de polyphosphates ou des groupements thiols (contenant du soufre) (GADD, 2000 ; PAGES *et al.*, 2007). Cette bioaccumulation des métaux lourds et leur stockage dans la cellule sous forme inerte permet à la cellule de diminuer leur toxicité. C'est le cas chez *Cupriavidus metallidurans* CH34 qui réduit le sélénite sous forme de sélénium élémentaire et l'accumule sous forme de nodules dans le cytoplasme (ROUX *et al*., 2001 ; SARRET *et al*., 2005).

9.1.3-Résistance par détoxification enzymatique

Les métaux peuvent être biotransformés par des mécanismes d'oxydoréduction (exemple : le fer et le manganèse) liés à la respiration cellulaire, ou par alkylation (le mercure). Pour certaines bactéries comme les bactéries sulfato-réductrices ces transformations sont très importantes et ont une incidence sur la biodisponibilité, la mobilité et la toxicité du métal dépendant de sa spéciation Les métaux toxiques peuvent être également convertis en une forme moins toxique ou en une autre forme plus facilement et plus rapidement évacuée de la cellule par voie enzymatique, par oxydation ou réduction (SILVER et PHUNG, 1996 ; LEDIN, 2000).

9.1.4- Résistance par biosorption

La charge négative de leur enveloppe cellulaire fait que les bactéries sont capables de fixer et d'accumuler les cations métalliques dans l'environnement. De plus, du fait de leur petite taille, les bactéries présentent un ratio surface/volume important qui leur confère une grande surface de contact pour interagir avec l'environnement.

La paroi des cellules bactériennes présente de nombreux groupements fonctionnels, susceptibles de réagir avec les constituants extérieurs. En effet, étant en contact avec le milieu extérieur les différents composants présents sur la couche externe des cellules sont des lieux d'interactions privilégiés avec l'environnement (ions, métaux,…). Les groupes fonctionnels présentant des fonctions anioniques au niveau de la surface bactérienne, sont les principaux responsables de la capacité des bactéries à fixer les métaux. Ce phénomène, indépendant du métabolisme, est connu sous le terme de biosorption ou « passive uptake » (MALIK, 2004).

9-1-5- Résistance par sécrétion de substances extracellulaires

Les micro-organismes peuvent produire et rejeter vers l'extérieur des substances organiques tels que les exopolysaccharides (EPS) extracellulaires ou inorganiques (métabolites) qui sont susceptibles de modifier la mobilité des métaux (immobilisation, solubilisation) (CHEN *et al*., 1995). En effet, la précipitation extracellulaire intervient quand ces substances réagissent avec les métaux solubles pour produire un composé métallique insoluble.

Les métabolites organiques tels que des ions sulfates, carbonates ou phosphates issus principalement du métabolisme respiratoire peuvent précipiter des ions métalliques toxiques. La formation de sulfures métalliques par les bactéries sulfato-réductrices est par exemple l'un des processus d'immobilisation microbiologique les plus connus (LEDIN, 2000). Les EPS, généralement acides, très riches en groupements chargés négativement, sont des molécules très réactives avec les métaux et très mobiles et peuvent être assimilées à des ligands dissous pouvant participer ainsi à la mobilisation des métaux (CHEN *et al*., 1995).

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

Objectifs du travail

Le travail a consisté à étudier le comportement d'une collection d'isolats d'*E. coli* aviaires issues de lésions de colibacillose, isolées de la région Centre Algérien, vis-à-vis de 22 antibiotiques appartenant à sept différentes familles chimiques et de 7 métaux lourds. L'étude a porté sur la détermination phénotypique de leurs profils de résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds et une analyse génotypique sur les souches présentant des profils intéressants.

1. Matériel

1.1 - Souches testées

L'étude sur l'antibiorésistance a porté sur un total de 308 isolats d'*E. coli* d'origine aviaire isolées entre 2006 et 2011 à partir d'organes internes (foie, rate, péricarde et grappe ovarienne) de poulets atteints de colibacillose (omphalite, septicémie, coligranulomatose, chute de ponte ou syndrome respiratoire) et provenant de différents élevages de la région Centre Algérien (Bouira, Béjaia, Tizi Ouzou, Boumerdès). Les isolats d'*E. coli* nous ont été fournis par le service de Bactériologie du Laboratoire Régional Centre de Draa Ben Kheda. Les animaux, âgés de 15 à 24 mois, émanaient d'élevages industriels de volailles de ponte, de chair ou de reproducteurs, ils ont été élevés en batteries ou au sol, en bande unique et en système « all-in all out ».

Les métallo-phénotypes ont été déterminés sur 215 souches de cette même collection.
L'identification bactérienne a été effectuée par une étude macroscopique, microscopique et l'usage d'une galerie biochimique minimale (détaillée en Annexe 1) et du système de galerie API20E (Biomérieux). La recherche par PCR du gène *uid*A codant la beta-glucuronidase a été effectué pour certaines souches (BEJ *et al.*, 1991 et PERRIN-GUYOMARD *et al.*, 2008).

1.2- Souches de référence

E. coli CIP 7624 a été utilisé dans le contrôle de qualité de l'antibiogramme.

E. coli CIP 7624 et K12 BM21 (NA^R) ont été utilisées comme souches témoins pour vérifier la sensibilité aux métaux lourds.

E. coli J5 (résistante à la rifampicine : Rif^R), *E. coli* J5K12 (résistante à l'azide de sodium et à la rifampicine) et *E. coli* UA 6190 (résistante à la gentamicine et à la rifampicine) ont été utilisées comme réceptrices dans les essais de conjugaison bactérienne.
Les essais d'électroporation ont été effectués en utilisant les cellules compétentes d'*E. coli* DH5α.

2- Méthodes

2.1- Identification et sérotypage des isolats

Les différents tests morphologiques et biochimiques effectués ainsi que le principe du sérotypage sont cités en annexe 1.

2.2- Etude de la sensibilité aux antibiotiques par antibiogramme

Les antibiogrammes ont été réalisés par la méthode de diffusion en milieu gélosé selon la norme française NF U47-107 et les interprétations selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2010-2012). Cette méthode est basée sur l'observation de la croissance bactérienne en présence d'un gradient de concentration d'antibiotique obtenu par diffusion à partir des disques d'antibiotiques dans un milieu gélosé, il est inversement proportionnel à la distance par rapport aux disques. La croissance bactérienne s'arrête lorsque les bactéries sont en contact avec une concentration inhibitrice autour du disque d'antibiotiques.

2.2.1- Technique

- **Milieu utilisé**

  La gélose de Mueller Hinton (MH) est coulée en des boites de Pétri sur une épaisseur de 4 mm. Elle est séchée à l'étuve avant emploi.

- **Inoculum**

  L'inoculum est préparé dans l'eau physiologique stérile (0,9 % NaCl) à partir de colonies d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement. Le trouble de la suspension doit être équivalent à une densité optique de 0,08 à 0,1 à 625nm, ce qui correspond à une charge de 10^8 cellules/ml. La suspension est ajustée à 10^6cellules/ml et utilisée extemporanément.

- **L'ensemencement**

  L'ensemencement se fait par inondation de la surface entière de la gélose avec 2 à 5 ml de la suspension bactérienne. On prélève le surplus par aspiration à l'aide d'une micropipette. Il est nécessaire de prévoir une courte période (10 minutes) de séchage à température ambiante après ensemencement.

- **Application des disques d'antibiotiques**

  Après le séchage, les disques imprégnés d'antibiotiques de charges connues (disques Liofilchem Roseto, Italie/ Himedia Laboratories Mumbai, India) sont déposés sur la gélose à des distances déterminées. Une fois appliqué, le disque ne doit pas être déplacé. Laisser à la température ambiante (temps pour que les antibiotiques diffusent dans le milieu avant démarrage de la culture). La liste des antibiotiques testés et leurs charges sont représentées dans le tableau VI.

- **Incubation**

  Après prédiffusion des antibiotiques, les boites sont incubées 18 heures à 37ºC.

- **Lecture**

La lecture est réalisée en mesurant avec précision à l'aide d'une règle ou un pied à coulisse les diamètres des zones d'inhibition.

Les résultats seront interprétés en fonction des diamètres critiques figurant dans les recommandations du CA-SFM. La comparaison de ces résultats permet de classer les bactéries dans l'une de ces catégories: Sensible (S), Intermédiaire (I) ou Résistant (R).

Contrôle de qualité

L'activité des disques d'antibiotiques est contrôlée par l'utilisation de la souche de référence *Escherichia coli* CIP 7624 sensibles aux antibiotiques et dont les limites acceptables des diamètres d'inhibition obtenues par diffusion sur milieu gélosé sont indiquées (CA-SFM).

2.3-Recherche de bêtalactamase à spectre élargi (test de synergie)

La recherche de BLSE se fait dans les conditions standard de l'antibiogramme selon la technique DDS « Double Disk Synergy » en plaçant les disques de céphalosporine de troisième génération (C3G : céfotaxime, céftazidime) et d'aztréoname) à une distance de 25-30 mm (de centre à centre) d'un disque contenant un inhibiteur de bêtalactamases, l'acide clavulanique (AMC : acide clavulanique+amoxicilline). C'est la méthode de détection la plus utilisée et recommandée par le CA-SFM.

Lecture

Après incubation pendant 18 à 24 h à 37°C, la présence de BLSE chez les bactéries se traduit par des images de type "bouchon de champagne" indicatives d'un effet synergique entre les disques contenant l'acide clavulanique et les disques de céphalosporines de 3ème génération ou celui de l'aztréonam.

2.4-Détermination de la concentration minimale inhibitrice des céphalosporines de troisième génération (CTX)

La technique de dilution en milieu liquide sur microplaque est la méthode de référence utilisée. Elle comprend les étapes suivantes :

- **Préparation de la gamme des dilutions d'antibiotique et du milieu**

Une solution mère d'antibiotique (CTX) à 1024 µg/ml est constituée dans l'eau distillée stérile. Des dilutions semi- logarithmiques de la solution mère de raison 2, sont ensuite effectuées pour obtenir des concentrations intermédiaires allant de 512µg/ml à 0,5 µg/ml de CTX. Chaque dilution est répartie à raison de 25 µl par cupule d'une microplaque à fond rond.

- **Préparation de l'inoculum bactérien**

Une suspension de la souche à étudier est préparée dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à partir d'une culture pure de 48h, à une densité optique de 0,08-0,1 à 625nm (10^8 cellules/ ml). La suspension est ajustée au 1/10ème pour distribuer un inoculum de 10^7cellules dans chaque cupule.

Tableau VI : Liste des antibiotiques en disques utilisés

	Antibiotique		Abréviation	Charge (µg)
Bêtalactamines	Amino-pénicilline et association	Amoxicilline	AMX	30
		Ampicilline	AMP	10
		Amoxicilline + acide clavulanique	AMC	30
	Carboxy-pénicilline	Ticarcilline	TIC	75
	Carbapénème	Imipénème	IPM	10
	Monobactames	Aztréonam	ATM	30
	Céphalosporine de 1ère génération	Céfazoline	CZ	30
	Céphalosporine de 2ème génération	Céfoxitine	FOX	30
	Céphalosporine de 3ème génération	Céfotaxime	CTX	30
		Céftazidime	CAZ	30
		Céfixime	CFM	5
	Céphalosporine de 4ème génération	Céfpirome	CPO	30
	Aminosides	Kanamycine	K	30
		Gentamicine	GEN	10
	Tétracyclines	Tétracycline	TE	30
	Polypeptides	Colistine	CS	25
	Association sulfamides-Triméthoprime (cotrimoxazole)	Triméthoprime/sulfaméthoxazole	SXT	1,25/23,75
	Quinolones et Fluoroquinolones	Acide Nalidixique	NA	30
		Acide pipémidique	PA	20
		Ciprofloxacine	CIP	5
		Ofloxacine	OFX	5
		Péfloxacine	PEF	5

- **Distribution de l'inoculum bactérien**

Le bouillon MH est distribué à raison de 70µl par cupule; la concentration d'antibiotique obtenue va ainsi de 128µg/ml à 0,5µg/ml.

L'ensemencement doit se faire dans les 15mn suivant la préparation de l'inoculum ; les cupules d'antibiotiques sont ensemencées avec 5µl de la suspension bactérienne.

Un témoin sans antibiotique est réalisé pour chaque gamme de la microplaque.

- **Incubation**

La plaque recouverte d'un couvercle en plastique est incubée à 37°C pendant 18 à 24h.

- **La lecture**

La CMI de l'antibiotique testé correspond à la concentration la plus faible (première cupule claire) où aucune croissance n'est observée (pas de culture par rapport au témoin sans antibiotique).

-Contrôle de qualité

La souche *Escherichia coli* CIP 7624 sensible aux céphalosporines de troisième génération a été utilisée comme témoin de contrôle de qualité.

2.5-Transfert génétique par conjugaison

Le support plasmidique de la résistance aux antibiotiques a été recherché par des essais de transfert par conjugaison selon deux protocoles.

➢ **Méthode 1 :** Un transfert de la résistance au céfotaxime et à l'amoxicilline a été effectué sur la base du protocole de conjugaison adopté par le laboratoire national de référence de l'antibiorésistance de l'ANSES Ploufragan (France). Trois différentes souches réceptrices ont été utilisées dans ces essais :

- *E. coli* J5 (RIF^R) : Résistante à la Rifampicine
- *E. coli* J5 K12 (RIF^R AZ^R) : Résistante à la Rifampicine et à l'Azide de sodium
- *E. coli* UA 6190 : Résistante à la Gentamicine et à la Rifampicine.

Cette méthode comprend les étapes suivantes :

- Une culture des souches donatrices de *E. coli* est effectuée dans 5 ml de bouillon BHI additionnés de CTX à raison de 32 µg/ml ou d'AMX à raison de 16 µg /ml ou d'acide nalidixique à 16 µg /ml. Les souches sont incubées à 37C° pendant 18 à 24 heures.
- Un volume de 2 ml des cellules donatrices est mélangé avec 1 ml de la souche réceptrice; 1 ml de bouillon BHI neuf est également ajouté.
- Une incubation est effectuée à 37°C pendant 6 heures sous agitation (50 rpm /mn sur agitateur de type Heidolph).
- Des boites de sélection sont préparées avec le milieu Mueller Hinton additionné d'antibiotique, pour les souches donatrices, les transconjugants et la souche réceptrice.

La préparation des boites est indiquée dans le tableau VII.

- Les tubes Falcon contenant le mélange sont centrifugés à 5000 rpm (2124g) pendant 2mn.

- Les culots obtenus sont resuspendus dans 200µl d'eau physiologique stérile, puis étalés sur les boites de sélection des souches donatrices et des transconjugants. Une incubation est effectuée à 37°C pendant 18 à 24 h.

Le transfert génétique entre deux bactéries se traduit par le développement de transconjugants ayant reçu les marqueurs de la souche donatrice (CTX, AMX et NA) sur le milieu Mueller Hinton gélosé additionné d'antibiotiques sélecteurs. Le caractère de résistance est donc porté par un plasmide; dans le cas contraire, il serait chromosomique.

Tableau VII : Préparation des boites de sélection dans les transferts par conjugaison

Sélection / Souche	Donatrices				Réceptrices	TRANSCONJUGANTS		
***E.coli* J5** Marqueurs de sélection (µg/ml)	**CTX** 32 µg/ml	**AMX** 16 µg/ml	**NA** 16 µg/ml	**RIF*** 150 µg/ml	**RIF** 150 µg/ml	**CTX RIF** CTX :32 µg/ml RIF : 150µg/ml	**AMX RIF** AMX :16 µg/ml RIF : 150 µg/ml	**NA RIF** NA :16µg/ml RIF : 150µg/ml
***E.coli* J5 K12** Marqueurs de sélection (µg/ml	**CTX** 32 µg/ml	**AMX** 16 µg/ml	**NA** 16 µg/ml	**RIF*** 150 µg/ml	**RIF AZ** RIF 150µg/ml AZ :100µg/ml	**CTX RIF AZ** CTX :32 µg/ml RIF : 150µg/ml NA: 16 µg/ml	**AMX RIF AZ** AMX : 16 µg/ml RIF : 150 µg/ml AZ : 100 µg/ml	**NA –RIF-AZ** NA :16µg/ml RIF : 150µg/ml AZ : 100 µg/ml
***E.coli* UA6190** Marqueurs de sélection (µg/ml	**CTX** 32 µg/ml	**GEN** 4 µg/ml	**NA** 16 µg/ml	**RIF*** 150 µg/ml	**RIF GEN** RIF 150µg/ml GEN :4µg/ml	**CTX GEN RIF** NA : 16 µg/ml RIF 150µg/ml GEN :4µg/ml	-	**NA GEN RIF** NA : 16 µg/ml RIF 150µg/ml GEN :4µg/ml

AMX: Amoxicilline; AZ: Azide de Sodium CTX: Céfotaxime ; GEN: Gentamicine; RIF: Rifampicine

RIF***** : oite de vérification de l'absence de la résistance à la RIF chez les donatrices.

- **Méthode 2 :**

Le second protocole de conjugaison adopté est inspiré des travaux de BAKOUR *et al.* (1983) et COURVALIN *et al*. (1985) ; il se réalise sur milieu solide comme suit :

Une culture de la souche donatrice *E.coli* K12 J5 AZ^R RIF^R est effectuée sur 5ml de bouillon BHI supplémenté d'antibiotique de sélection : l'amoxicilline (AMX) à 16 µg /ml. Les souches d'*E. coli* testées sont ensemencées, puis incubées à 37°C pendant 18 heures.

Après incubation, 1 ml des souches donatrices est mélangé sur gélose Mueller Hinton avec 2 ml de la souche réceptrice *E. coli* K12 J5 AZ^R RIF^R.

Pour les boites de sélection, le milieu Mueller Hinton additionné d'antibiotique a été utilisé pour la sélection de la souche donatrice, des transconjugants et de la souche réceptrice.

Après une nuit de contact entre les souches parentales, la culture mixte est mise en suspension dans 200 µl d'eau physiologique stérile. Ce volume de culture mixte est ensuite étalé sur des boites de sélection des transconjugants.

En cas de transfert, il y a développement de transconjugants sur le milieu Mueller Hinton gélosé additionné d'antibiotiques sélecteurs.

2.6- Transformation génétique par électroporation

2.6.1-Préparation des cellules compétentes

Une colonie d'*E.coli* DHα est cultivée une nuit à 37ºC sous agitation (250 rpm) dans 5 ml de milieu Luria Bertani (LB). Un volume de 1,25ml de la culture est ensemencé dans 250 ml de milieu LB préchauffé à 37ºC. L'incubation à 37ºC se fait sous agitation jusqu'à atteindre une DO de 0,5 à 0,6 à 600 nm. La culture est ensuite mise dans des tubes froids (FalconNalgen de 250 ml) ; un maxmium de 200 ml est mis dans le flacon. Après une incubation de 15 à 20 mn dans la glace, les cultures sont centrifugées 20 mn à 3500g à 4ºC. Les surnageants sont éliminés et les culots resuspendus délicatement dans 5 ml d'eau froide. 200 ml d'eau froide sont ajoutés et l'ensemble est alors mélangé délicatement. Une seconde centrifugation (3500g) de 20 mn à 4ºC est réalisée; les culots sont resuspendus délicatement, une fois le surnageant éliminé. Cette dernière opération est renouvelée une autre fois. Ces différents lavages ont pour but l'élimination des sels qui peuvent gêner l'électroporation.

Un culot de 500µl est généralement obtenu pour 500ml de culture. Un volume équivalent d'eau froide est ajouté pour resuspendre les bactéries. Les cellules sont réparties dans la glace en aliquotes de 50 µl.

2.6.2- L'électroporation (électrotransformation)

L'électroporation consiste à produire par une impulsion électrique une ouverture temporaire de pores dans la membrane cytoplasmique des cellules compétentes afin d'introduire du matériel génétique. Cette impulsion produit une désorganisation temporaire des lipides membranaires et un changement du potentiel de membrane.

Les cuves à électroporation et des tubes de 1,5ml sont mis, environ 15 mn, dans la glace. Les cellules compétentes et les extraits plasmidiques (obtenus selon le protocole de TAKAHASHI et NAGANO, 1984) sont également placés dans la glace. Un volume de 2µl d'extrait plasmidique est mélangé doucement avec 50µl de cellules compétentes. Le mélange est mis dans la cuve à électroporation qui est mise dans l'électroporteur. Les paramètres de l'électroporateur sont réglés à 2500V; 25µF ; 200Ω et 2mm.

Après l'électroporation, un volume de 250 µl de milieu SOC froid (composition en annexe 1) est ajouté; tout le contenu est bien mélangé à la micropipette puis transféré dans les microtubes de 1,5ml.

Une incubation d'une heure est effectuée avant d'ensemencer avec 50 µl et 250 µl de mélange électroporé, deux boites de Mueller Hinton additionnés de l'antibiotique approprié à savoir :
TE à 8 µg/ml; SXT (TMP à 4 µg/ml et sulfamides à 76 µg/ml) et CIP à 1 µg/ml.

Un antibiogramme est systématiquement réalisé sur les transformants obtenus sur boite de sélection afin de vérifier l'incorporation des caractères de résistance transférés.

2.7- Gènes recherchés par PCR

2.7.1-Confirmation de l'identification des souches de *E. coli* par la recherche du gène *uid* A

Certains isolats d'*E.coli* ont été soumis à une PCR pour la recherche du gène *uid* A codant pour la β-glucuronidase selon le protocole inspiré de BEJ *et al.* (1991) et PERRIN-GUYOMARD *et al.* (2008).

Toutes les PCR effectuées ont une étape commune qui est la préparation du lysat cellulaire. Quelques colonies d'une culture de 18h à 37ºC sur milieu Mueller Hinton sont mises dans des tubes eppendorf contenant 1ml d'eau ultrapure stérile, ensuite les cellules sont lysées par un passage de 10 mn dans un bain marie à 99ºC. Le lysat récupéré par centrifugation est refroidi et maintenu en glace jusqu'à son utilisation.

La PCR effectuée est multiplex, elle consiste à amplifier, spécifiquement et en grande quantité, un fragment d'ADN à l'aide de deux couples d'amorces spécifiques : uidA1/uid A2 (Genbank, Accession No. DQ998806) et ipaH1/ipaH2 (Genbank, Accession No. M76444). Les séquences des amorces sont indiquées dans le tableau VIII.

Du fait que *Shigella* possède également le gène *uid*A, la seconde amorce spécifique du gène *ipa* (invasion plasmid antigen) codant pour la virulence chez *Shigella* permet de différencier cette dernière de *E. coli.*

E.coli est caractérisée par 1 bande à 133pb

Shigella par 2 bandes à 133pb et 101pb

La réaction de polymérisation a été effectuée sur microtubes dans un volume final réactionnel de 50µl comprenant l'ADN-cible (5 µl), les quatre dNTP (0,2mM chacun), les 4 amorces spécifiques (0,3 µM chacune), le tampon dépendant de l'enzyme utilisée (1X) et 1,25 UI de Taq polymérase (Go Taq Flexi polymerase) (voir Annexe 2 pour les volumes utilisés dans chaque PCR).

L'amplification sur thermocycleur GStorm, comprend une température de 94°C pendant 5mn afin de dénaturer l'ADN, suivi de 30 cycles (dénaturation à 94°C pendant 30s ; hybridation des amorces sur l'ADN à 57°C pendant 30s et élongation à 72°C pendant 30s) et enfin d'une extension finale à 72°C pendant 8mn.

L'ADN amplifié, à raison d'un volume de 20 µl additionné de 8 µl de bromophénol, est analysé par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 2% dans du tampon TBE à 1X et sous une tension de 125volts (500mA et 150W) pendant 75mn. La révélation se fait sous UV à 254 nm après immersion du gel une trentaine de minute dans une solution de bromure d'éthidium à 0,5µg/ml

Le marqueur de taille moléculaire utilisé est le Gene Ruler plus 1-kilobase DNA ladder (ref : SM1333 fournit par Fermentas, Villebon sur Yvette, France), à raison de 3 µl.

Les souches témoins sont : *E.coli* CIP 7624 et *Shigella sonnei* CIP 82-49; un témoin négatif (Mix sans ADN) est également utilisé à chaque PCR.

2.7.2- Recherche des bêtalactamase de type CTX-M

La recherche de cette famille de bêta-lactamases a été effectuée par PCR multiplex en utilisant des amorces spécifiques des groupes CTX-M : CTX-M-1 ; CTX-M-2 ; CTX-M-8 ; CTX-M-9 et CTX-M-25 (les amorces utilisées sont consignés dans le tableau VIII).

Cette PCR multiplex a été effectuée selon le protocole de WOODFORD *et al.* (2006) qui définit les concentrations finales suivantes pour un volume réactionnel de 23µl : 0,35 µM pour les amorces, 0,2mM pour les dNTP, le tampon Invitrogen à 1x , $MgCl_2$ à 1,5mM, le détergent W-1 Invitrogen à 0,05%, la Taq ploymérase (Invitrogen) à 5UI/µl (le détail du volume de tous les composants du mélange réactionnel est mentionné en Annexe 2).

Les conditions réactionnelles sur thermocycleur G Storm sont comme suit :
Une dénaturation de 5 mn à 90°C ;
30 cycles de94°C pendant 5s, 55°C pendant 40s et 72°C pendant 50s ;
une élongation finale de 6mn à 72°C.

L'analyse électrophorétique est réalisée avec les mêmes volumes de dépôt et concentrations cités pour la PCR précédente. La migration s'effectue sur gel d'Agarose à 2% sous une tension de 125V pendant 90mn.

2.8- Détection des gènes de résistance aux C3G par utilisation de Puces à ADN

La biotechnologie des puces à ADN (microrrays ou micromatrice) repose sur des sondes constituées de produits PCR ou d'oligonucléotides fixés en rangées ordonnées sur des lames de verre, de silicium ou de plastique. Ces lames sont ensuite hybridées avec des cibles fluorescentes (ADNc ou ADN génomique). Les molécules fluorescentes les plus couramment utilisées appartiennent à la famille des cyanines (fluorophore cyanine3 et fluorophore cyanine5). Après hybridation, les produits d'amplification hybridés sont visualisés par détection colorimétrique. Les signaux d'hybridation sont détectés à l'aide d'un scanner de fluorescence.

Une fois les intensités d'hybridation obtenues, un important travail d'analyse des données par l'outil bioinformatique est nécessaire pour en extraire les informations biologiques. En effet, chaque point (ou *spot* correspondant à de nombreuses sondes, c'est-à-dire à de nombreuses copies d'une séquence d'ADN spécifique d'un gène donné) de la puce va être analysé individuellement par un scanner à très haute résolution, et ce, à la longueur d'onde d'excitation de la Cyanine 3 puis de la Cyanine 5. L'image scannée va être traduite en niveaux de gris.

L'intensité du signal entre le vert et le rouge est comparée : en fonction de l'intensité du signal, il y aura plus ou moins de pixels pour chaque point de la puce. À chaque point (ou *spot*) est attribué une valeur d'intensité normalisée par rapport à l'ADN "étalon" : on parle de *spike*. Chacune des valeurs peut être analysée par des techniques de bio-informatique permettant l'analyse instantanée automatisé des résultats et par la même d'estimer avec plus ou moins de précision l'intensité d'expression d'un gène.

Dans ce travail, cette analyse a comporté plusieurs étapes :

2.8.1- Extraction de l'ADN

Les souches sont repiquées sur gélose MH et incubées 18 à 24 heures à 37°C.
Quelques colonies sont mélangées par vortex avec 250µl de solution de lyse A et 250µl de lyse B. Le mélange est mis au bain marie 1h à 60°C, puis 15mn à 95°C.
Après incubation au Bain Marie, 200 µl de lysat additionné du même volume d'éthanol mélangé à l'aide d'un vortex. Le mélange est ensuite pipeté en évitant le précipité, puis mis dans une colonne « DnEASY Mini spin » placé sur un tube de 2ml. Après une centrifugation à 6000g pendant 1 mn, la colonne à laquelle est ajouté 500 µl de tampon AW1 est remise dans un autre tube de 2ml. Une seconde centrifugation d'une minute à 6000g est réalisée avant de remettre la colonne additionnée de 500 µl de tampon AW2 dans un autre tube de 2 ml. Une centrifugation de 3 minutes à 20000 g permettra d'enlever un maximum d'éthanol. La colonne est de nouveau mise sur un tube de 2ml avant d'ajouter directement sur la colonne 200 µl de tampon AE. Après une incubation d'une minute à température ambiante, une dernière centrifugation de 6000g pendant 1mn est effectuée pour assurer l'élution.

2.8. 2-Analyse par puce CHECK-MDR CT 101 (Biocentric, Bandol, France)

L'analyse par les puces CHECK-MDR CT 101 permet la détection des principaux gènes de bêta-lactamases de type : carbapénémases (KPC, NDM), BLSE (TEM, SHV et CTX-M) et céphalosporinases plasmidiques (AmpC, CMY, DHA, FOX, MOX, ACC, MIR, ACT).

Le protocole du kit CHECK-MDR CT101 fourni comprend trois étapes: (figure 19).

Reconnaissance de l'ADN (étape A)

Le principe du système de diagnostic Check Point est basé sur la reconnaissance moléculaire spécifique de séquences cibles d'ADN et l'amplification avec des amorces universelles. Chaque cible d'ADN individuelle est reconnue par une sonde spécifique qui contient un code correspondant à une position unique (adresse) sur la puce. Ces codes sont utilisés pour la détection sur la puce après amplification. Les sondes sont constituées de deux segments (bras de sonde), qui sont jointes par une ligase d'ADN quand ils correspondent parfaitement avec l'ADN cible. Seuls les bras de sonde reliés généreront des produits d'amplification. Les sondes qui diffèrent de l'ADN cible ne donneront pas des produits d'amplification, même dans le cas d'une différence d'un seul nucléotide.

Dans le kit, les microtubes sont assemblés par 3. Les amorces sont différentes pour chacun des tubes. En salle pré-PCR, 5 µl de solution A sont ajoutés dans les tubes déjà prêts (fournis dans le kit). En salle de PCR sont ensuite ajoutés 10 µl d'ADN. Puis chacun des tubes est identifié.

Il est indispensable de remuer fortement : la solution doit être homogène et de couleur bleue. La PCR A est effectuée durant 2h 36mn selon le programme suivant :

PCR A

Etape	Température/temps	Cycles
1	95°C/3mn	(1x)
2	95°C/30sec	(24x)
	65°C/5mn	
3	98°C/2mn	(1x)

Conservation	4°C	

Amplification de l'ADN par PCR (étape B)

En salle pré-PCR, un mélange de solution B et C est effectué avec des volumes correspondant au nombre d'échantillons à tester (la correspondance fournie par le kit).

Après avoir vortexé, 30µl du mélange sont ajoutés et mélangés au contenu de chaque tube issue de la PCR A. Les tubes subissent le programme de la PCR B durant 1h 28mn, ses étapes sont les suivantes :

PCR B

Etape	Température/temps	Cycles
1	95°C/10mn	(1x)
2	95°C/5sec	(30x)
	55°C/30sec	
	72°C/30sec	
3	98°C/2mn	(1x)
Conservation	4°C	

A la fin de la PCR de l'étape B, les tubes sont mélangés brièvement puis éventuellement conservés 24h à 4°C (voire jusqu'à 2 semaines à -20°C).

Détection de l'ADN (étape C)

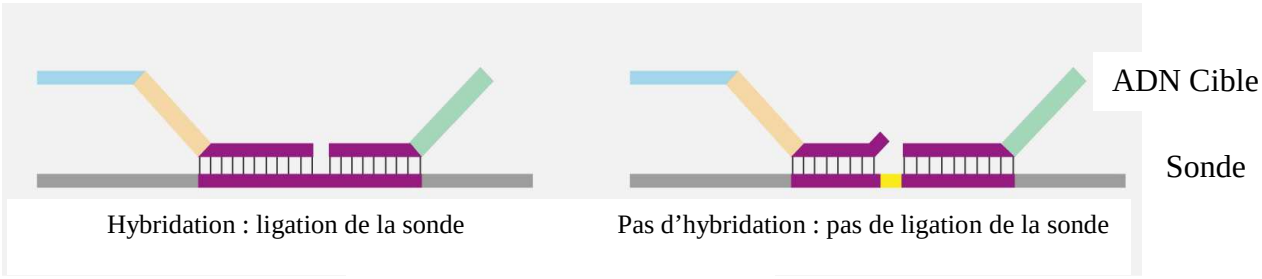
Les produits d'amplification sont hybridées à la puce à ADN et visualisés par détection colorimétrique. A cet effet, les puces à ADN contenues dans des tubes dits Tubes Array C sont insérés dans un lecteur (Check-Points Tube Reader) à la fin de la réaction de détection. Cela génère une image de la micromatrice qui sera analysée par le logiciel intégré E-Ads.

A cette étape, le protocole du kit consiste en deux incubations des tubes contenant les puces (CP Array Tube) pendant 2 mn à 400rpm sur thermomixer réglé à 50°C avec 300µl de tampon de détection (buffer detection). Une fois le tampon rejeté, un même volume de tampon est incorporé avec 10 µl d'ADN (3 souches par tube) avant d'incuber 30 minutes au thermomixer à 50°C et 400rpm. Après rejet du tampon, deux incubations avec 300 µl de « blocking buffer » sont effectuées : la première de 5 minutes à 50°C ; la seconde, après renouvèlement du tampon, à 30°C pendant 10 minutes sur thermomixer réglé à 400rpm.

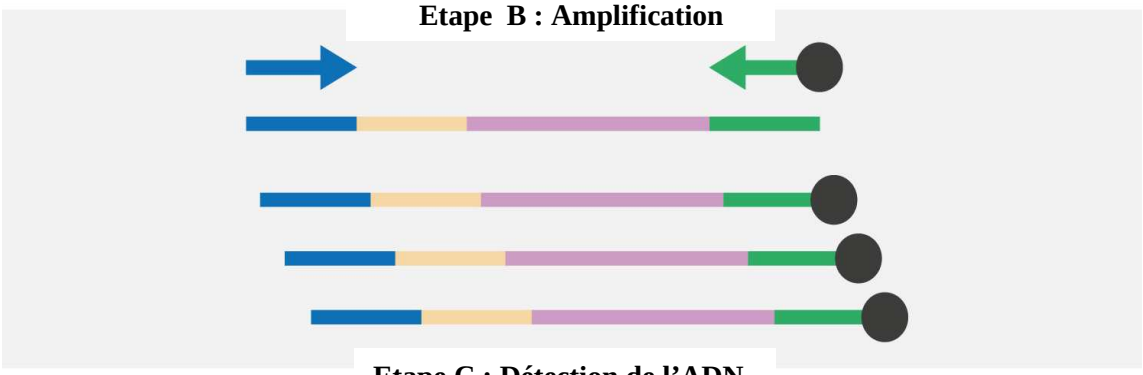
Un volume de 150 µl de dilution effectuée extemporanément (selon un tableau fourni donnant la correspondance avec le nombre de tube) entre le tampon de détection et la conjugate solution est ajouté aux tubes à puce, après retrait du précédent tampon. Les tubes à puces subissent une incubation de 15 minutes à 30°C (400rpm) et deux autres incubations de 2 mn à cette même température, en présence de 600 µl de tampon de détection.

Une dernière incubation, avant lecture et analyse, est effectuée à température ambiante après rejet du liquide et ajout de 150 µl d'une solution de coloration (staining solution).

Etape A : Reconnaissance de l'ADN



Etape B : Amplification



Etape C : Détection de l'ADN

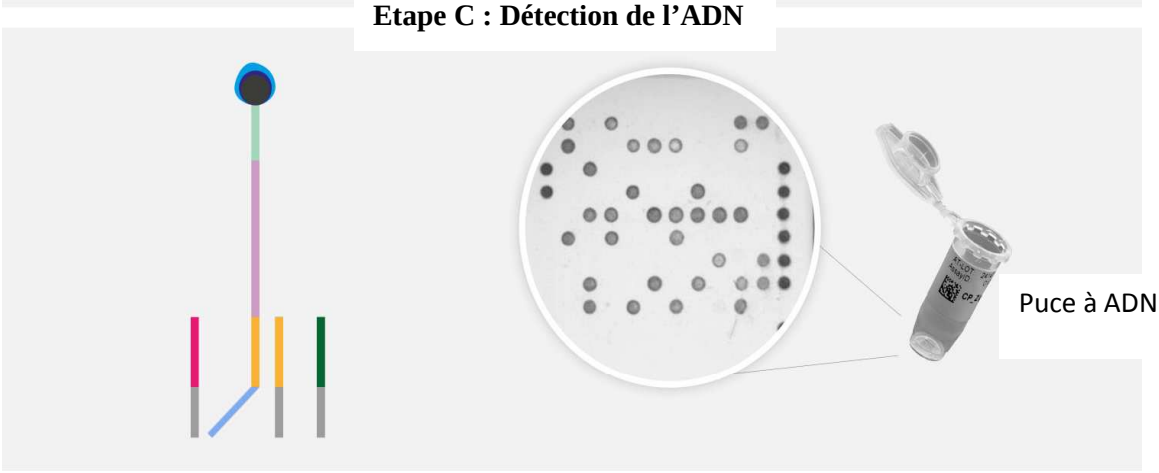


Figure 19 : Etapes du kit Check points Check points MDR CT101

2.9 -Séquençage des gènes de bêta-lactamase et de la région QRDR (Quinolones determining region resistance) des gènes topoisomérases

Le séquençage des gènes des bêta-lactamases CTX–M (bla_{CTX-M}) et de la région QRDR (*gyr*A, *gyr*B, *par*C et *par* E) de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV a été réalisé directement à partir du produit de PCR (amplification avec une DNA Taq polymérase haute fidélité d'Eurobio) après purification. L'extraction de l'ADN a été effectuée à l'aide du kit « Qiaquick PCR » (Qiagen) (Annexe 2) un volume final de 30 µl. La concentration de l'ADN estimée à l'aide du NanoDrop.

Le séquençage a été réalisé à l'Unité Génétique Virale et Biosécurité - Plate-forme Séquençage Haut débit et Transcriptomique, Anses, Laboratoire de Ploufragan.

Les produits d'amplification ont été séquencés sur un brin à l'aide du séquenceur "3130 GeneticAnalyser, Applied Biosystems" (électrophorèse capillaire**),** selon la méthode universelle de Sanger *et al.* (1992) avec un marquage permettant une détection simultanée de plusieurs fluorescences (5 fluorophores différents).

L'électrophorèse capillaire en conditions dénaturantes sépare les produits de la réaction de séquence purifiés. L'enregistrement et l'analyse spectrale de la fluorescence spécifique du ddNTP permettra alors d'assigner la base correspondante et de déterminer la séquence nucléotidique du brin matrice. Les séquences brutes sont automatiquement extraites et analysées par le logiciel « Data Analysis » au cours d'une étape appelée « Base calling » (assignation des bases). Le sous-programme Base Caller permet cette bonne assignation après plusieurs étapes.

Les séquences obtenus sont analysées avec les logiciels BLAST/FASTA du NCBI « National Center for Biotechnology Information » (http://www.ncbi.nlm.nhi.gov) permettant de les comparer avec toutes les séquences de la banque de données GenBank.

2.10- Extraction et électrophorèse de l'ADN plasmidique

L'extraction plasmidique a été effectuée selon le protocole de TAKAHASHI et NAGANO (1984). Elle se base sur le principe suivant : Les bactéries sont lysées en milieu basique et en présence de détergent. Le lysat est ensuite neutralisé par une solution saline de force ionique élevée qui permet la renaturation sélective de l'ADN plasmidique et la précipitation de l'ADN chromosomique. La purification de l'ADN plasmidique est complétée par une extraction au phénol puis au chloroforme afin d'éliminer respectivement protéines et lipides. Enfin, l'ADN plasmidique est précipité dans l'éthanol avant solubilisation dans le tampon, il peut alors être soumis à une électrophorèse.

- **Méthode d'extraction** (Figure 20).

Une colonie de la souche test est inoculée dans 12ml de milieu BHIB additionné d'un antibiotique approprié (CTX à 32 µg/ml ou AMX à 16 µg/ml). Après une incubation d'une nuit (16 à 18 heures) à 37°C dans un bain-marie sous agitation, la culture est centrifugée pendant 10mn à 5000rpm (centrifugeuse Bekman J25 rotor JA-25.15) et à 4°C.

Après élimination du surnageant, 600 µl de tampon A (dilué au 1/10ème dans de l'eau ultra-pure) sont ajoutés. Le culot est resuspendu par aspiration et refoulement afin de bien homogénéiser sans former de bulles.

Le tampon permet la fragilisation de la paroi bactérienne et empêche la dégradation de l'ADN par la complexation, sous l'action du chélateur d'ions (EDTA) qu'il contient, des ions divalents de Mg^{2+} nécessaires à l'activité des DNases.

La seconde étape consiste à la lyse cellulaire par un traitement au SDS alcalin en ajoutant 1,2ml de tampon de lyse (dilué au ½ avec du NaOH 0,4N) et en mélangeant délicatement sans vortexer par 5 à 10 retournements.

Après un repos de 5 minutes permettant la formation d'un lysat clair, un volume de 900 µl de tampon B refroidi à +4°C est ajouté et mélangé doucement, sans vortexer, par 10 à 20 retournements. Une incubation dans la glace est nécessaire pendant 5 mn avant de centrifuger 10 mn à 13500 rpm (centrifugeuse Bekman J25 rotor JA-25.15) à température ambiante. Le tube est à nouveau maintenu 10mn à +4°C. Une centrifugation de 10mn à 13500rpm (centrifugeuse Bekman J25 rotor JA-25.15) et +4°C est à nouveau effectuée et le surnageant obtenu transvasé dans un nouveau tube. Dans ces conditions, l'ADN linéaire mais pas circulaire (plasmidique) est dénaturé.

La troisième étape correspond à l'élimination des contaminants de l'ADN plasmidique : protéines, ADN chromosomique et ARN de haut poids moléculaire.

Sous une hotte, un volume égal de 2,4 ml de phénol sont additionnés avant d'émulsionner par 5 à 10 inversions. Afin de casser l'émulsion, une centrifugation de 5mn à 5000rpm et à +4°C est ensuite effectuée. La phase aqueuse supérieure obtenue, contenant l'ADN plasmidique, est transférée dans un autre tube à l'aide d'un cône tronqué en faisant attention à ne pas aspirer l'interface qui contient les protéines.

Un volume égal d'environ 2,4 ml de chloroforme est ensuite ajouté suivie d'une nouvelle centrifugation, dans les mêmes conditions.

L'ADN plasmidique est enfin précipité afin de le concentrer, par ajout au surnageant limpide de 1ml d'éthanol absolu refroidi à -20°C. Le tube doit être retourné 5 à 10 fois puis maintenu à +4°C pendant une heure (minimum 5mn et maximum une nuit). Une dernière centrifugation à 13500rpm (centrifugeuse Bekman J25 rotor JA-25.15) et à +4°C est réalisée avant d'éliminer l'alcool et laisser sécher les culots obtenus en maintenant les tubes à température ambiante. Le culot débarrassé de l'alcool est ensuite dissout dans 100µl de tampon C et éventuellement conservé à -20°C jusqu'à utilisation. L'extrait est alors analysé directement par électrophorèse ; la taille des plasmides peut être évaluée par analyse du profil d'électrophorèse.

La composition des différents tampons utilisés figure en Annexe 2.

- **Electrophorèse sur gel d'agarose**

L'électrophorèse a pour but la séparation et l'identification des fragments d'ADN chargés négativement. Le bromure d'éthidium, fluorescent aux UV est utilisé pour la visualisation sur gel.

20µl d'extrait d'ADN plasmidique additionné de 5µl de tampon de charge sont mis à migrer 4heures dans un gel d'agarose à 1% dans du tampon TBE 1X et à une tension de 125V. La révélation de l'ADN se fait sous UV à 254 nm après immersion du gel pendant une trentaine de minute dans une solution de bromure d'éthidium à 0,5µg/ml. Le marqueur de taille moléculaire utilisé (3 µl) est le Gene Ruler 1-kilobase plus DNA ladder (Fermentas, Villebon sur Yvette, France).

2.11- Typage des replicons ou « Replicon Typing » selon CARATTOLI *et al.* (2005)

Un réplicon est une unité de réplication ; il est en effet convenu d'appeler « replicon » les structures génétiques, tels que les plasmides, dont la réplication autonome est indépendante de celle du chromosome. Les plasmides sont classés en groupes d'incompatibilité en fonction de leur système de contrôle de la réplication.

La « PCR-based replicon typing » de CARATTOLI *et al.* (2005) permet d'identifier les 18 groupes d'incompatibilité les plus fréquents chez les entérobactéries (FIA, FIB FIC HI1, HI2, I1-Iγ, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F et FIIA).

Pour chaque souche testée 18 couples d'amorces ont servi à 3 PCR simplex et 5 PCR multiplex réalisées pour la recherche de ces groupes d'incompatibilité. L'amplification a été effectuées sur thermocyclers G Störm (GRI-France) et Chromo4 (Biorad) à l'aide de la Taq plymérase (Roche). Les volumes, les concentrations et les conditions réactionnelles utilisées sont récapitulés en Annexe 2.

Les conditions réactionnelles utilisées sont comme suit :

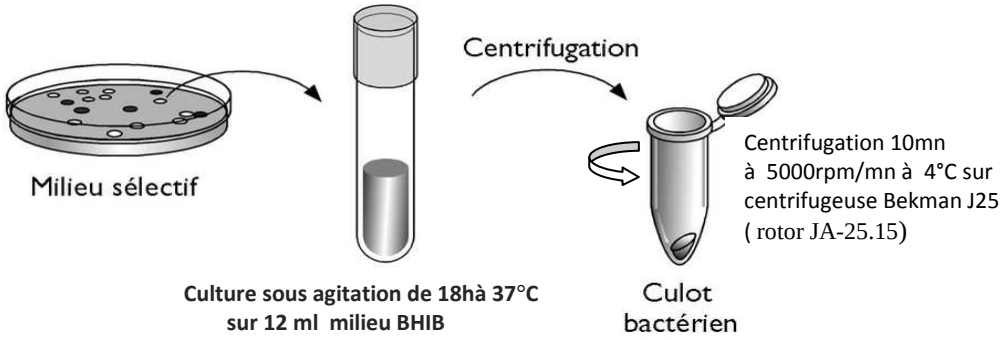
- Pour la PCR simplex 1 : 1 cycle à 94°C/5 min ; 30cycles (94°C/1 mn, 52°C/30 s, 72°C/1 mn) et 1 cycle à 72°C/5mn.
- Les PCR simplex 2 et 3 ont le même programme mais avec une température d'hybridation respectivement de 65°C et 60°C.
- Pour les PCR multiplex, les mêmes conditions de réaction sont adoptées avec une variation de la température d'hybridation qui est de : 65°C/30s pour la PCR multiplex 1 ; 60°C/30s pour la PCR 2 et 5 ; 67°C/30s pour les PCR 3 et 4.

Les dépôts sur gel d'agarose à 2% se font dans les mêmes conditions citées précédemment.
La taille des produits amplifiés est respectivement par ordre de PCR effectuées, comme suit :

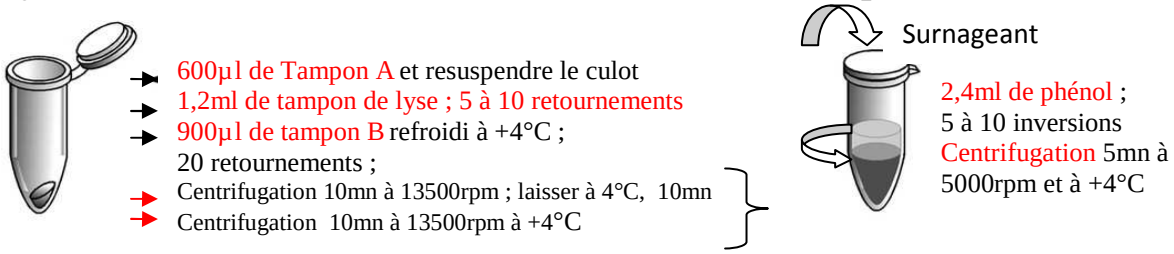
- PCR simplex : FrepB: 270pb; K: 160pb et B/O: 159pb
- PCR multiplex : HI:471pb ; HI2:644pb ; I1:139pb; X:376pb ; L/M:785pb ; N: 559pb; FIA: 462pb; FIB: 702pb; W: 242pb; Y: 765pb; P:534pb ; FIC:262pb ; A/C: 465pb ; T: 750pb et FIIs: 270pb.

Toutes les caractéristiques des amorces utilisées sont récapitulées dans le tableau VIII.

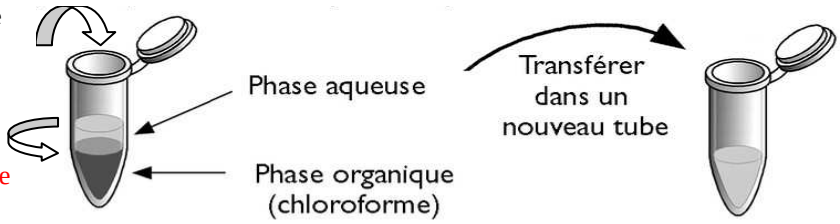
1 – Récupération du culot cellulaire



2- Lyse des cellules et élimination des membranes et des protéines

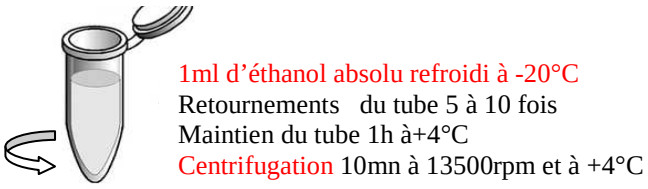


Récupération de la phase aqueuse avec des cônes tronqués



2,4ml de chloroforme
5 à 10 inversions
Centrifugation 5mn à
5000rpm et à +4°C

3- Récupération de la phase aqueuse (ADN plasmidique) et précipitation à l'alcool absolu



4 – Resuspension du culot d'ADN plasmidique

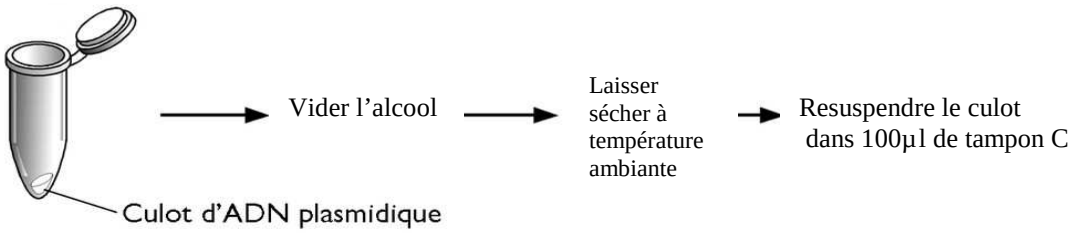


Figure 20 : Principales étapes de l'extraction plasmidique selon TAKAHASHI et NAGANO, 1984

2.12-Typage phylogénétique par PCR ECOR (Collection de référence *Escherichia coli*)

L'analyse phylogénétique a montré que *E.coli* est composée de 4 principaux groupes phylogénétiques : A, B1, B2 et D et que les souches virulentes extra-intestinales appartiennent principalement aux groupes B2 et à un moindre degré au groupe D.

Les groupes phylogénétiques des souches testées a été déterminé par PCR triplex selon CLERMONT *et al.* (2000). Elle est basé sur l'amplification de trois marqueurs phylogénétiques : le gènes *chuA* (impliqué dans le transport de l'hème), le gène *yjaA* (impliqué dans la réponse cellulaire au stress acide et peroxyde d'hydrogène) et un fragment d'ADN désigné TSPE4.C2 dont le rôle reste indéfini.

Les amorces (Tableau VIII) des trois biomarqueurs ont été utilisées à une concentration finale d'un micromolaire pour un mélange réactionnel de 23 µl. La concentration des autres composants est de 0,2mM pour les dNTP, de 1X pour le tampon Green Go Taq, de 2mM pour $MgCl_2$ et enfin de 1,25 UI pour la Taq polymérase (Go Taq Flexi). Les volumes correspondants de chacun des composants sont indiqués en annexe 2. Le volume de l'échantillon d'ADN incorporé est de 3 µl.

L'électrophorèse s'effectue en gel d'agarose à 2% avec des dépôts similaires à ceux précédemment cités et une mise sous tension à 125V pendant 90mn (500mA et 150W).

. Le marqueur de taille moléculaire utilisé (3 µl) est le Gene Ruler plus 1-kilobase DNA ladder (Fermentas, Villebon sur Yvette, France).

La bande ChuA se situe à 279pb ; la bande YjaA à 211pb et celle de TspE4C2 à 152pb.

L'assignation à un groupe phylogénétique donné s'est effectuée selon des combinaisons des trois biomarqueurs présentés dans les travaux de CLERMONT *et al.* (2000). Les souches *E.coli* coli 5010622spe B2 ; *E.coli* 5000196spe B2 ; Goren A (bande 211pb) et J5 (A) (bande 211pb) ont servis de témoins positifs.

Tableau VIII : Amorces des différentes PCR

PCR	Gène/ fragment	Séquence des amorces (5'-3')			
		Sens	**Antisens**	**Amplicons bp**	**Accession ou source**
E.coli	*uidA*	AAA ACGGCAAGAAAAAGCAG	ACGCGTGGTTACAGTCTTGCG	133	Genbank, Accession No.DQ998806).
	ipaH	TTCCTTGACCGCCTTTC	GCCAGTACCTCGTCAGTCA	101	Genbank, Accession No. M76444
CTX-M	CTX-M **Groupe 1**	AAA AAT CAC TGCGCCAGTTC	AGCTTATTCATCGCCACGTT	415	Woodford *et al.*, 2006
	CTX-M **Groupe 2**	CGACGCTAC CCCTGC TAT T	CCAGCGTCAGATTTTTCAGG	552	
	CTX-M **Groupe 9**	CAAAGAGAGTGCAACGGATG	ATTGGAAAGCGTTCATCACC	205	
	CTX-M **Groupe 8**	TCG CGTTAAGCGGATGATGC	AACCCACGATGTGGGTAGC	666	
	CTX-M Groupe 25	GCA CGATGACATTCGGG	AAC CCA CGATGTGGGTAGC	327	
PHYLOGENIE	*chuA*	GACGAACCAACGGTCAGGAT	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	279	Clermont *et al.*, 2001
	yja A	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	211	Clermont *et al.*, 2001
	TspEA.C2	GAGTAATGTCGGGGCATTCA	CGCGCCAACAAAGTATTACG	152	Clermont *et al.*, 2001

Tableau VIII (suite) : Amorces des différentes PCR

	Amorce	Séquence d'ADN	Site ciblé	EMBL accession No.	Amplicon (pb)
REPLICON TYPING	**HI1 RV**	5'GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC-3'	parA-parB	AF250878	471
	HI1 FW	5'-TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA-3'			
	HI2 FW	5'-TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC-3'	iterons	BX664015	644
	HI2 RV	5'-GGCTCACTACCGTTGTCATCCT-3'			
	I1 FW	5'-CGAAAGCCGGACGGCAGAA-3'	RNAI	M20413	139
	I1 RV	5'-TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT-3'			
	X FW	5'AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT-3'	ORI γ	Y00768	376
	X RV	5'-TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC-3'			
	L/M FW	5'-GGATGAAAACTATCAGCATCTGAAG-3'	repA,B,C	U27345	785
	L/M RV	5'-CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG-3'			
	N FW	5'-GTCTAACGAGCTTACCGAAG-3'	repA	NC_003292	559
	N RV	5'-GTTTCAACTCTGCCAAGTTC-3'			
	FIA FW	5'-CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG-3'	iterons	J01724	462
	FIA RV	5'-GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG-3'			
	FIB FW	5'-GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG-3'	repA	M26308	702
	FIB RV	5'-CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT-3'			
	W FW	5'-CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG-3'	repA	U12441	242
	W RV	5'-GGTGCGCGGCATAGAACCGT-3'			
	Y FW	5'-GCGAGAATGGACGATTACAAAACTTT-3'	repA	K02380	765
	Y RV	5'-AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG-3'			
	P FW	5'-CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA-3'	Iterons	M20134	534
	P RV	5'-TCACGCGCCAGGGCGCAGCC-3'			

Tableau VIII (suite) : Amorces des différentes PCR

	Amorc	Séquence d'ADN	Site ciblé	EMBL accession No.	Amplicon (pb)
REPLICON TYPING	**FIC FW**	5'-GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG-3'	repA2	AH003523	262
	FIC RV	5'-TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT-3'			
	A/C FW	5'-GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA-3'	repA	X73674	465
	A/C RV	5'-ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT-3'			
	T FW	5'-TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT-3'	repA	K00053	750
	T RV	5'-CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC-3'			
	FII_S FW	5'-ctgtcgtaagctgatggc-3'	repA	AE006471	270
	FII_S RV	5'-ctctgccacaaacttcagc-3'			
	F_{repB} FW	5'-TGATCGTTTAAGGAATTTTG-3'	RNAI/repA	AY234375	270
	F_{repB} RV	5'-GAAGATCAGTCACACCATCC-3'			
	K/B FW	5'-GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC-3'			
	K RV	5'-TCTTTCACGAGCCCGCCAAA-3'	RNAI	M93063	160
	B/O RV	5'-TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA-3'	RNAI	M28718	159

2.13-Typage moléculaire par Analyse des profils de macrorestriction des souches par électrophorèse en gel pulsé (PFGE)

Le typage moléculaire par analyse des profils de macrorestriction de tout le génome permet d'établir un éventuel lien génétique entre les isolats.

Cette méthode se base sur l'intégration des bactéries dans des blocs d'agarose (plugs), leur lyse in situ avant leur digestion par une endonucléase de restriction à faible nombre de coupure permettant d'obtenir de longs fragments d'ADN dits fragments de macrorestriction qui seront séparés par PFGE (figure 21).

La PFGE est une méthode à pouvoir discriminant important pouvant être appliqué à plusieurs souches. L'électrophorèse en champ pulsé permet ainsi de séparer des fragments d'ADN d'une taille supérieure à 50 kb. Le principe de l'électrophorèse en champ pulsé consiste à alterner l'orientation du champ électrique au cours du temps. Chaque changement de champ électrique réoriente la molécule d'ADN dans le gel parallèlement au champ augmentant ainsi la probabilité que la molécule d'ADN soit orientée de façon à passer à travers les mailles du gel selon un déplacement en zig zag. Cette probabilité dépend de la taille de la molécule et la vitesse de migration d'un fragment d'ADN dans le gel varie dans le sens inverse de sa taille.

Cette technique, adoptée de Chu *et al.* (1986), **comprend les étapes suivantes** (figure 22) :

- La première étape est la mise en culture des souches d' *E.coli* sur gélose Mueller Hinton, 24h à 37ºC.

- Préparation des inserts

A l'aide d'une öese, quelques colonies de la culture bactérienne sont ratissées et émulsionnées dans 1ml du tampon CBS préalablement mis dans une cuve à usage unique pour spectrophotomètre. La densité optique de la suspension cellulaire doit être ajustée entre 1,3 et 1,6 à 600nm.

Un volume de 400 µl de la suspension bactérienne ajustée est introduit dans un tube Eppendorf puis additionnés de 20 µl de protéinase K (à 20mg/ml). Les moules à inserts sont préparés par obstruction du fond par un ruban adhésif. Un rebord est laissé dépassé sur le côté afin d'y noter la référence de la souche.

- Préparation de la solution SDS/ Agarose 1% en tampon TE

Une solution de SDS/Agarose de 10ml est préparée, en portant à ébullition dans un micro-onde jusqu'à dissolution, 0,1g d'agarose dans 9ml de tampon TE (à pH8) additionné de 1ml de SDS à 10%. La solution est ensuite maintenue en surfusion dans un bain marie à 50ºC. Un volume 400µl de solution SDS/agarose 1% en TE est ensuite mélangé, par aspiration-refoulement afin d'éviter les bulles, avec un même volume de suspension bactérienne. Le mélange obtenu est rapidement pipeté et déposé dans les moules à insert sans faire de bulles, puis laissés refroidir 10 à 15 mn à température ambiante ou 5 mn au réfrigérateur.

- Lyse des cellules bactériennes

A l'aide d'une oëse, les inserts sont démoulés dans des tubes Falcon de 50ml numérotés. Une solution de lyse dans un volume de 1,935ml d'eau distillée est préparée en mélangeant 150 µl d'une solution molaire de Tris (pH4,6) avec 600µl d'EDTA à 250mM (pH8), 300 µl de Sarcosine à 10% et 15 µl de protéinase K à 20mg/l. Ces volumes sont donnés pour le traitement d'une souche.

La solution de lyse est répartie, à raison de 3ml, dans chaque tube Falcon en s'assurant de bien y tremper que les inserts. Puis des bouchons à tamis sont vissés avant de visser les bouchons des tubes Falcon. La lyse s'effectue pendant 2heures sous agitation à 54ºC.

- Lavages

Après élimination de la solution de lyse, les inserts sont rincés 10mn sous agitation au bain marie à 50ºC, avec 10ml d'eau distillée chaude préalablement portée à 50ºC. Cette opération est renouvelée une seconde fois. Quatre lavages renouvelés au tampon TE sont ensuite effectués. Ils consistent à verser dans chaque tube 8ml de tampon TE (à pH8) préalablement chauffé à 50ºC et à mettre sous agitation pendant 15 mn au Bain Marie réglé à 50ºC. A l'issue des lavages, les bouchons tamisés contenant les inserts sont vidés dans des tubes remplis de 5 ml de tampon TE (pH8).

- Digestion enzymatique

Dans un tube Eppendorf de 2ml, chaque insert est plongé dans 100 µl de solution de digestion et subit une digestion de 5h à 37°C (+/-1°C). La solution de digestion est une solution tampon contenant l'endonucléase de restriction Xbal (Roche) et du BSA (1mg/l) préparée (selon des volumes valables pour une souche, en annexe 2) avec 89 µl d'eau ultra pure stérile, 10 µl de tampon 10X et 1 µl d'enzyme Xbal.

- Séparation électrophorétique des fragments

L'électrophorèse s'est effectué sur un appareil à électrophorèse en champ pulsé CHEF-DRIII (BIORAD).

Cette étape commence par la préparation de 2l de tampon TBE à 0,5X et d'une solution de 150ml d'agarose à 1% (maintenue en surfusion à 50ºC) dans du TBE à 0,5X. Le bloc ou dispositif de coulage du gel est préparé au préalable.

Le tampon TBE 0,5X est placé dans la cuve à électrophorèse après avoir vérifié le niveau et le refroidissement à la température souhaitée pour la migration (14°C). Pour ce faire, le système de refroidissement doit être mis en marche à l'avance. Les inserts sont ensuite déposés sur le peigne avant de couler délicatement le gel d'agarose sans faire de bulles. Le gel est laissé « prendre en masse » pendant environ 30mn. Il est ensuite extrait du bloc de coulage en le laissant sur sa plaque et en veillant à bien enlever les morceaux de gélose tout autour et en dessous avant d'être placé dans la cuve à électrophorèse remplie de tampon. Le phage lambda et *Salmonella* Branderup ont servi de marqueurs de taille.

- Programmation de l'électrophorèse

Le programme de la PFGE est fixé comme suit : une tension de 6 Volts/cm, un angle de réorientation de 120 º, un temps de pulse initial de 2s, un temps de pulse final de 54s et une migration de 25h. L'ampérage est de 120A au démarrage et ne doit pas dépasser les 160A en fin de migration.

-Lecture du gel

Le gel est mis à colorer 20 à 30 mn dans une solution de bromure d'ethidium (BET) à 0,5µg/ml. L'agitation du bac contenant le BET permet une meilleure diffusion. Le gel est ensuite rincé avec l'eau distillée (le gel peut rester quelques minutes dans l'eau sous agitation, pour enlever le bruit de fond laissé par le BET). Le gel est ensuite observé et photographié sous ultra-violet.

- Analyse du gel

Après lecture, le logiciel d'analyse BioGene (fournit par Biorad) permet la comparaison des différentes souches.

Communément l'analyse visuelle se base sur les critères de TENOVER *et al*. (1995) à savoir :

- Profil identique: souches indifférenciables ;
- Différence de 1 à 3 bandes (1 événement génétique) : parenté probable ;
- Différence de 4 à 6 bandes (2 événements génétiques) : parenté possible ;
- Différence > 6 bandes (plus de 3 événements génétiques) : souches non reliées.

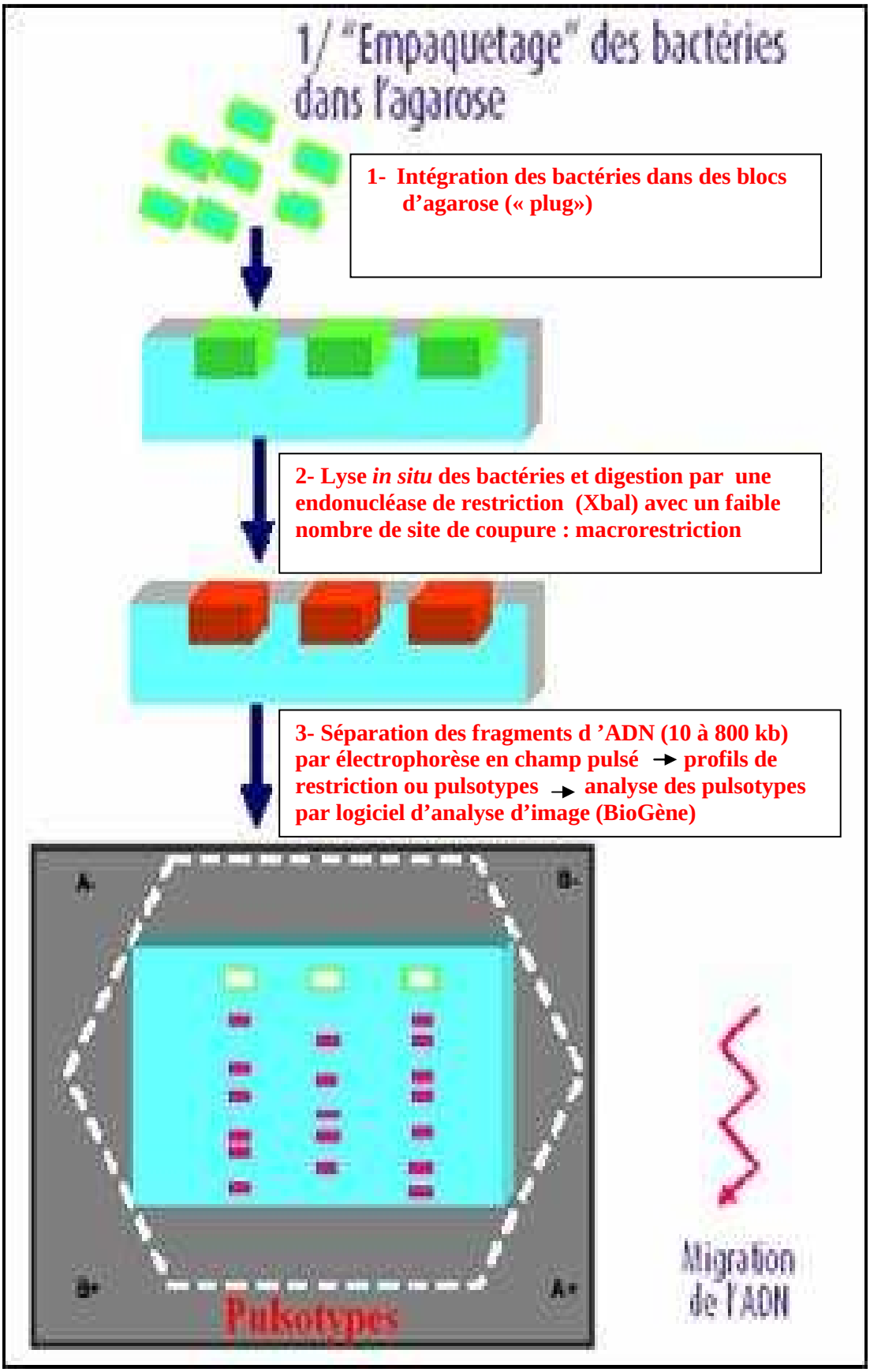


Figure 21 : Schéma récapitulatif du principe de la PFGE

PREPARATION DES INSERTS

Cultures de *E.coli* sur gélose MH 18h à 37ºC.
Suspension bactérienne à une DO de 1,3 et 1,6 à 600nm
et ajout de 20µl de protéinase K (à 20mg/ml).
Solution 400µl de SDS/agarose 1% en TE mixée avec 400µl de la suspension
Dépôt dans les moules à Plugs sans faire de bulles. 10-15mn à température ambiante
ou 5 mn au réfrigérateur

↓

LYSE DES CELLULES BACTERIENNES

Démoulage des plugs à l'aide d'une oëse dans des tubes Falcon de 50ml à tamis
Répartition de 3ml de solution de lyse dans chaque flacon
Incubation 2 heures en agitation à 54°C (+/- 1°C)

↓

LAVAGES

2 Rinçages des inserts par ajout de 10ml d'eau distillée chaude et incubation sous agitation 10mn à 50°C
4 lavages successifs par ajout de 8 ml de tampon TE et incubation sous agitation 10mn à 50°C
Stockage des inserts à 4°C dans des tubes contenant 5ml de TE pH8.

↓

DIGESTION ENZYMATIQUE PAR L'ENZYME XBAL

100µl de solution d'enzyme (Roche) dans un tube Eppendorf de 2ml
Un insert est plongé dans la solution de restriction.
Incubation de 5h à 37°C (+/-1°C)

↓

SEPARATION ELECTROPHORETIQUE DES FRAGMENTS

Préparation d'une solution de150ml d'agarose à 1% dans du TBE 0,5X
Dépôt des plugs sur le peigne et coulage du gel.
Prise en masse du gel pendant environ30mn
Extraction du gel du bloc à coulage et mise sur la plaque noire de la PFGE
Migration 25 h (Volts/cm:6 ; Included angle:120º ; Temps initial:2s ; Temps final: 64s)
Lecture du gel après immersion 30mn dans le BET (0,5µg/ml)

↓

ANALYSE DU GEL PAR LE LOGICIEL D'ANALYSE BIOGENE (BIORAD)

Figure 22 : Principales étapes de la PFGE selon CHU *et al.* (1986)

2-14 - Etude de la métallorésistance par ensemencement en spots

Dans cette étude, des seuils de concentrations critiques ont été utilisés pour étudier le comportement vis-à-vis de sept métaux lourds de 215 souches issues de la collection de *Escherichia coli* aviaire.

Les métaux étudiés sont le Cadmium (Cd), le Mercure (Hg), l'Argent (Ag), le Cuivre (Cu), le Zinc (Zn), le plomb (Pb) et le Chrome (Cr).

Les seuils de concentrations maximales des métaux lourds ont été obtenus par plusieurs essais au laboratoire ; nous nous sommes basés sur les travaux réalisés par NAKAHARA *et al*. (1977), TREVORS (1985), DEVICENTE *et al.* (1990), CARDONHA *et al.*, 2005 et LOPEZ-SANDOVAL (2008). La concentration maximale utilisée pour chaque métal est décrite dans le tableau IX.

Technique :

- **Préparation de la solution métallique**

Les métaux lourds utilisés sont sous forme de sels. A partir des solutions mères des métaux lourds (réalisées en eau distillée stérile), des volumes précis sont prélevés, permettant d'obtenir, sur milieu minimum, les concentrations finales métalliques indiquées dans le tableau IX.

Tableau IX : Concentrations finales de sels de métaux lourds

Métal	**Cd Cl_2**	**$HgCl_2$**	**$AgNO_3$**	**$CuCl_2$**	**$ZnCl_2$**	**$Pb(CH_3COO)_2$**	**CrO_4^{2-}**
Concentrations Utilisées µg/ml	800	54,3	50	1600	1800	3200	75

$CdCl_2$: Chlorure de Cadmium ; $HgCl_2$: Chlorure de Mercure; $AgNO_3$: Nitrate d'argent; $CuCl_2$: Chlorure de Cuivre; $ZnCl_2$: Chlorure de Zinc; $Pb(CH_3COO)_2$: Acétate de plomb; CrO_4^{2-} : Chromate(VI).

- **Inoculum**

Une suspension bactérienne est obtenue par dilution dans 5ml d'eau physiologique stérile de quelques colonies d'*E. coli* d'une culture de 18h à 37˚C sur gélose de LURIA-BERTANI, après revivification sur bouillon BHIB pendant 18h à 37˚C.

Cette suspension est ajustée à une valeur de densité optique comprise entre 0,08 et 0,1 à 625 nm, correspondant à 10^8 cellules/ml. L'inoculum est encore ajusté par dilution au 1/10 à 10^7cellules /ml.

- **Ensemencement**

L'ensemencement doit se faire dans un délai maximum de 15 mn qui suit la préparation de l'inoculum. Les boites contenant 20ml de milieu minimum additionné du métal testé sont ensemencées en spot par 5 µl des dilutions préalablement préparées. Plusieurs souches peuvent être testées simultanément sur la même boite et ce en délimitant chaque spot par des quadrans préalablement tracé sur la boite (jusqu'à 9 souches par boite). Les boites sont ensuite incubées à 37˚C pendant 24h.

Les souches *Escherichia coli* CIP 7624 et K12 BM21 ont été utilisées comme souches témoins pour vérifier la sensibilité aux métaux lourds et la croissance sur milieu minimum sans métal. A cet effet, chaque boite test est également ensemencée par les souches témoins.

Lecture

Après incubation, la souche est considérée comme tolérante ou résistante à la concentration métallique testée s'il y a croissance au niveau des spots; en absence de croissance, la souche est considérée comme sensible.

2.15-Traitement Statistique des données

L'outil statistique a été utilisé afin de faire ressortir un lien éventuel ou une correspondance entre le comportement de notre collection d'*E.coli* aviaires pathogènes vis-à-vis des antibiotiques et vis-à-vis des métaux lourds.

Pour ce faire, le choix du traitement statistique des données a porté sur la réalisation d'une analyse des correspondances multiples (ACM) effectuée par le logiciel R (package ade4). L'ACM a été réalisé sur un tableau complet comportant en colonnes les variables qualitatives représentées par trois modalités d'expression (Résistant: A ; Intermédiaire : B et Sensible : C). En ligne, les individus représentent les souches qui ont subi les différents traitements. Le but de l'analyse est de déterminer s'il y a ou non une dépendance (ou relation d'influence) entre les variables (antibiotiques et métaux lourds) d'une part et d'autre part de voir s'il y a formation de groupes d'individus partageant un comportement commun vis-à-vis de ces variables.

L'ACM trouve toute son interprétation dans le choix judicieux des axes à choisir pour l'interprétation. En effet, comme toute représentation dans l'espace, il est important de choisir les plans bidimensionnels (formés de deux axes) qui offrent l'information la plus complète mais aussi la plus proche possible de la réalité. Chaque plan donnera un nuage de points dont chacun aura comme coordonnées les valeurs données par les lignes et les colonnes de la matrice originelle. Ainsi deux points peuvent sembler très éloignés sur un plan alors qu'en réalité il suffit de changer de plan pour les voir très proches et inversement. Les axes intéressants sont ceux que l'on peut interpréter, au regard des contributions des variables actives. En pratique, on se contente souvent d'interpréter le premier plan principal (LEBART *et al.,* 2006 ; ESCOFIER *et al.,* 2008).

L'analyse de nos données a été effectué via le test du χ^2 d'indépendance (par logiciel logiciel R) permettant de vérifier l'absence de lien statistique entre deux variables X et Y (respectivement résistances ATB et métaux lourds). Ces variables X et Y sont dits indépendants lorsqu'il n'existe aucun lien statistique entre elles : autrement dit la connaissance de X ne permet en aucune manière de se prononcer sur Y. L'hypothèse nulle (H_0) de ce test est la suivante : les deux variables X et Y sont indépendantes. En termes de valeur-p, l'hypothèse nulle est généralement rejetée lorsque $p \leq 0{,}05$. Dans ce cas, les variables sont dépendantes.

De même, un test de comparaison de proportions a été utilisé pour établir une significativité des pourcentages de souches résistantes et sensibles pour chacun des antibiotiques et métaux lourds testés.

1-Résultats

1.1-Identification et sérotypage

Une collection de 308 souches d'origine aviaire isolées de lésions de colibacillose a été identifiée sur la base des principales caractéristiques morphologiques et biochimiques des entérobactéries et de l'espèce *Escherichia coli* par utilisation de la galerie biochimique classique et de la galerie API20E. Certaines souches ont également été confirmées par PCR par la mise en évidence du gène *uid*A via la présence d'une seule bande de 133pb sur l'ensemble des isolats (figure 23 et 23 bis).

Le sérotypage des souches à l'aide des antisérums anti O1, O2 et O78 (LDA22, France) a montré que 11 isolats producteurs de bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) n'appartenaient à aucun de ces sérogroupes pathogènes communs des volailles (O1, O2 ou O78).

1.2-Résistance aux antibiotiques

Les résultats de l'étude de la sensibilité de 308 isolats de *E. coli* issus de lésions de collibacillose vis-à-vis de 22 antibiotiques appartenant à 7 familles chimiques ont révélé la sensibilité à l'ensemble des antibiotiques de 72 isolats (23,38%), 20 isolats (6,5%) se sont avérés résistants à une seule molécule d'antibiotique et 216 isolats (70, 12%) à plus de deux antibiotiques (figures 24 et 25).

Les profils de sensibilité et de résistance des isolats testés sont récapitulés dans le tableau X. La figure 28 indique les niveaux de résistance par famille d'antibiotique.

Concernant les bêta-lactamines, les résultats ont montré que l'imipénème, de la famille des carbapénèmes, est la seule molécule active sur l'ensemble des isolats testés. Les taux de résistance les plus élevés ont été observés vis-à-vis des aminopénicllines représentés par l'ampicilline et l'amoxicilline et de la ticarcilline du groupe des carboxypénicillines avec respectivement 60,2 %, 60,1% et 59,6%. Des taux moyens ont été notés vis-à-vis des autres bêta-lactamines telles que l'aztréonam (10%) et la céfazoline (31,25%), respectivement du groupe des monobactames et des céphalosporines de première génération. Les taux de résistance les plus bas ont été enregistrés chez les céphalosporines de seconde (céfoxitine), troisième (céfixime 8,4%) et quatrième génération (cefpirome 4%) avec un extrême (1,78%) enregistré vis-à-vis de la céfoxitine (figure 26).

Il est à signaler que la résistance aux bêta-lactamines est associée à la résistance à toutes les autres familles chimiques avec la prédominance de l'association aux aminosides (49 souches) et l'association béta-lactamines-aminosides-quinolones (44 souches). La multirésistance a concerné entre au moins 3 antibiotiques (11,4%) à 17 antibiotiques (figure 27).

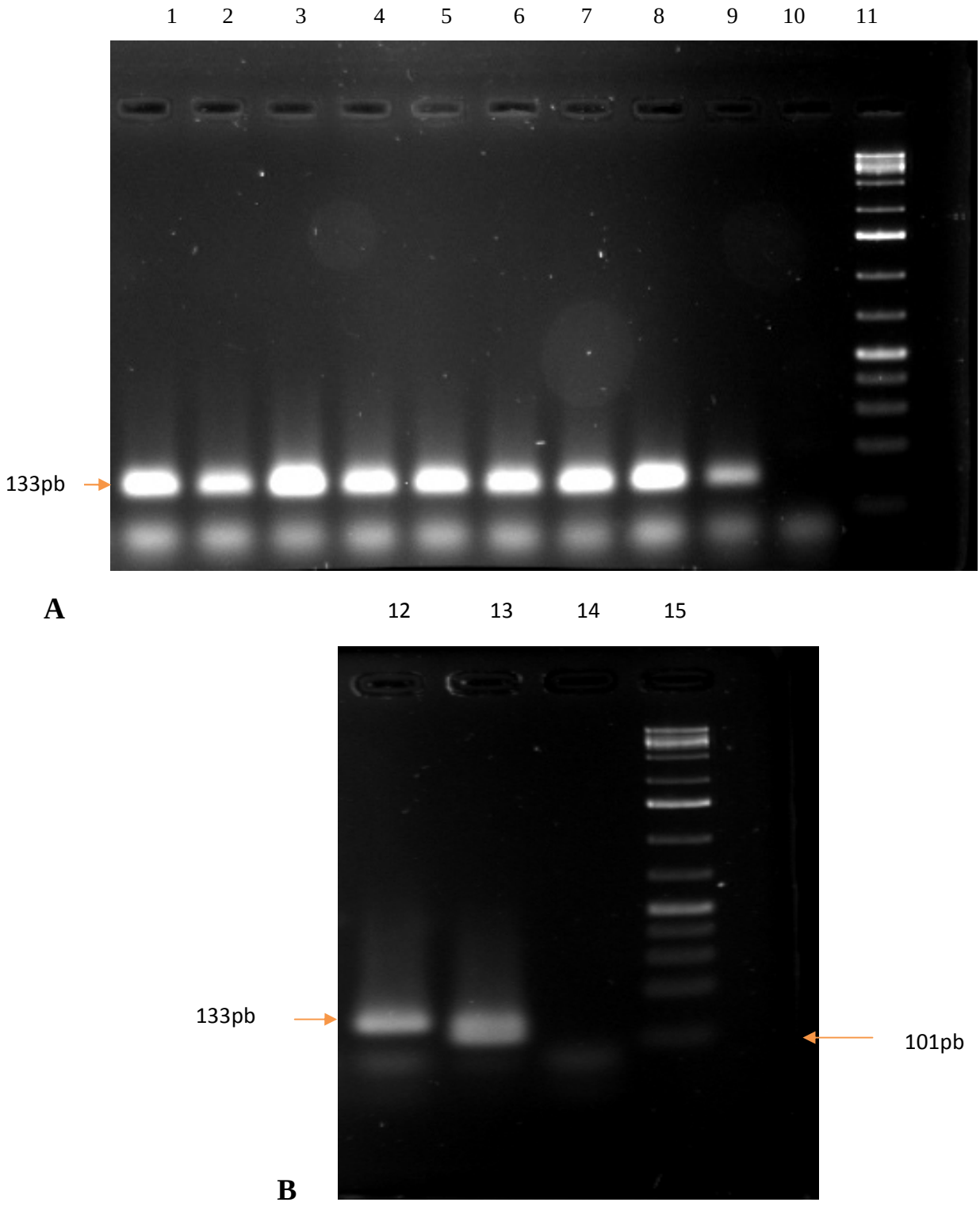


Figure 23 : Détection du gène *uid*A par PCR multiplex

A- Puits 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 : souches *E.coli* aviaires E63, E65, E69, E74, E88, E165, E173, E174 et E201. Puits 10 et 11 : Témoins négatifs et marqueur de masse moléculaire (Gene ruler 1-kilobase plus DNA ladder Fermentas, Villebon sur Yvette, France).

B- Puits 12, 13, 14 et 15: *E.coli* CIP 7624, *Shigella sonnei* CIP 82-49, témoin négatif et marqueur de masse moléculaire

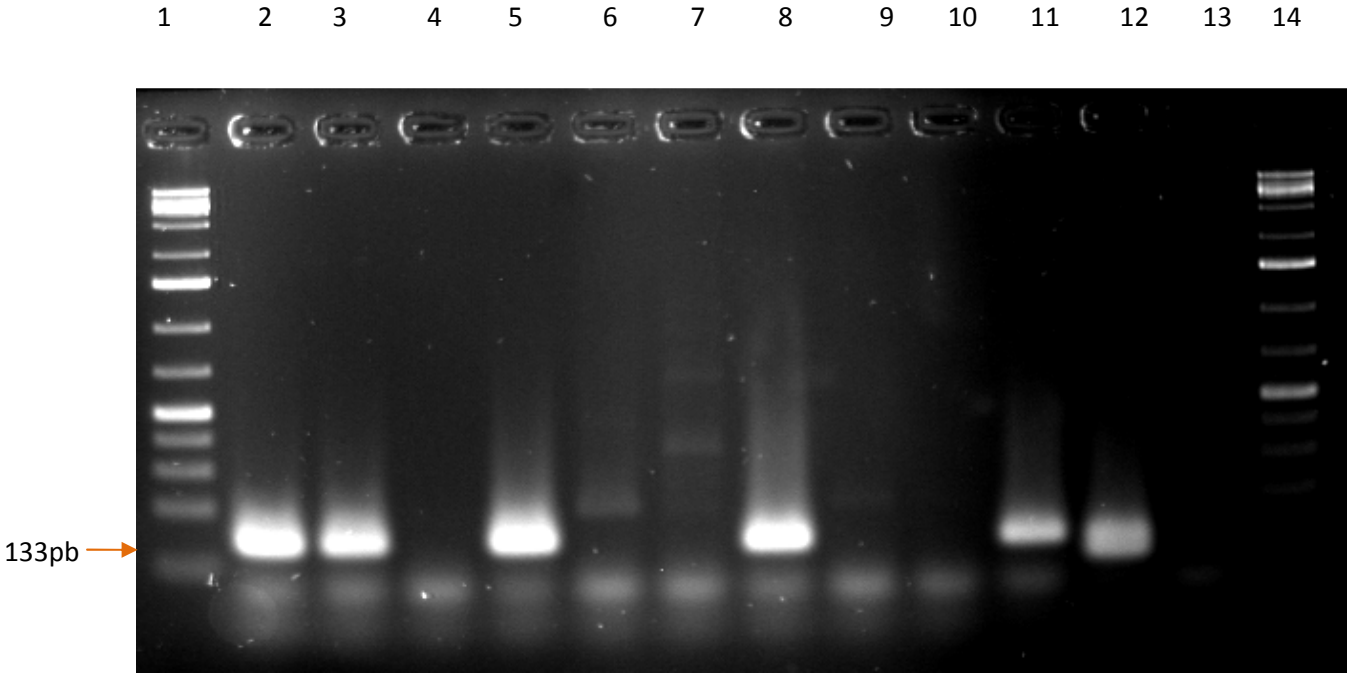


Figure 23 (bis) : Détection du gène *uidA* par PCR multiplex.
Puits1 : marqueur de masse moléculaire (Gene ruler 1-kilobase plus DNA ladder Fermentas, Villebon sur Yvette, France) ;
Puits 2, 3, 5 et 8: souches *E. coli* aviaires E11, E21, E48, E69,
Puits 10, 11 et 12 : Témoin négatif, *E.coli* CIP 7624 et *Shigella sonnei* CIP 82-49

Pour la famille des aminosides, les résultats ont montré que la gentamicine est active sur une majorité des isolats d'*E. coli*, avec une très faible résistance des souches estimée à 1,4%. En revanche, la kanamycine s'est révélée moins active avec un taux de résistance de 17,6%.

La résistance à la tétracycline et à l'association sulfamide-triméthoprime a également été observée dans la collection testée avec des taux moyens respectifs de résistance de 28,37% et 41, 75%.

La colistine de la famille des polymixines demeure très efficace sur tous les isolats à l'exception deux souches.

La résistance aux quinolones a également été observée : il en ressort que les taux de résistance les plus élevés ont été observés vis-à-vis des quinolones classiques, l'acide nalidixique et l'acide pipémidique (55,2% et 41,8%). Des taux plus modérés ont concerné les fluoroquinolones avec par ordre décroissant 26,1%, 19% et 17% respectivement pour l'ofloxacine, la ciprofloxacine et la péfloxacine.

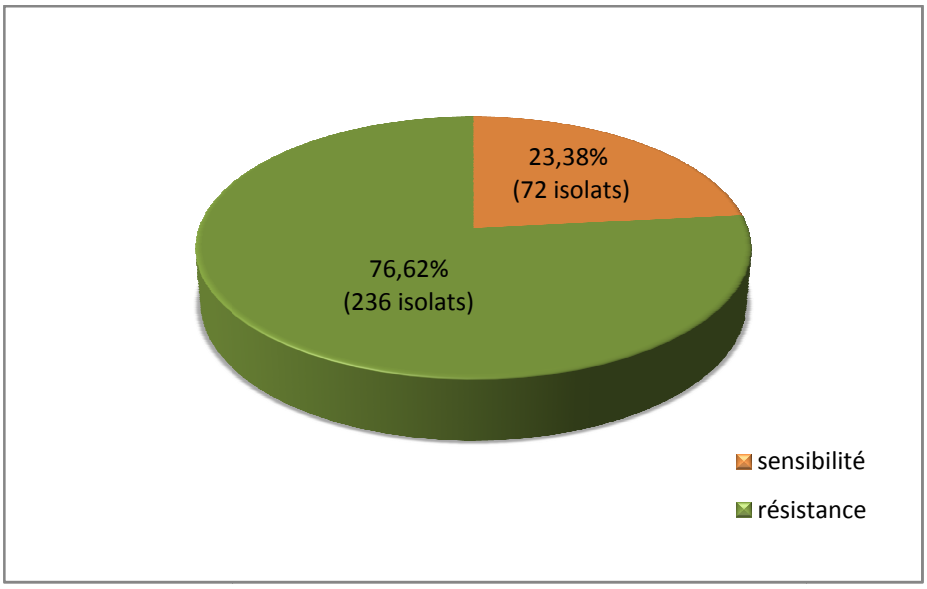


Figure 24 : Pourcentages d'isolats d' *E. coli* sensibles et résistants aux antibiotiques

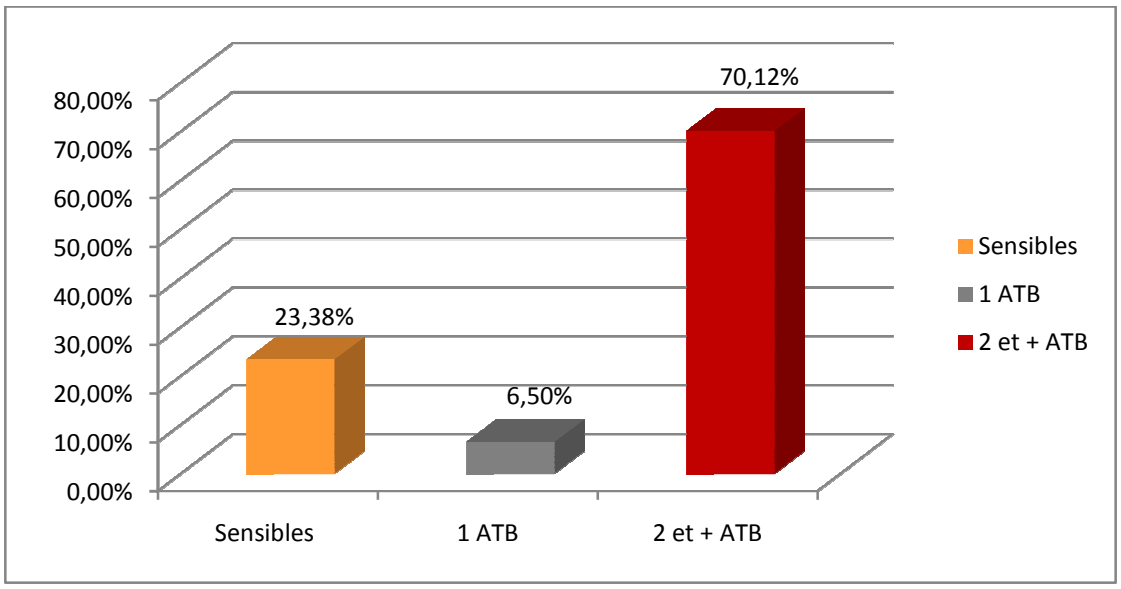
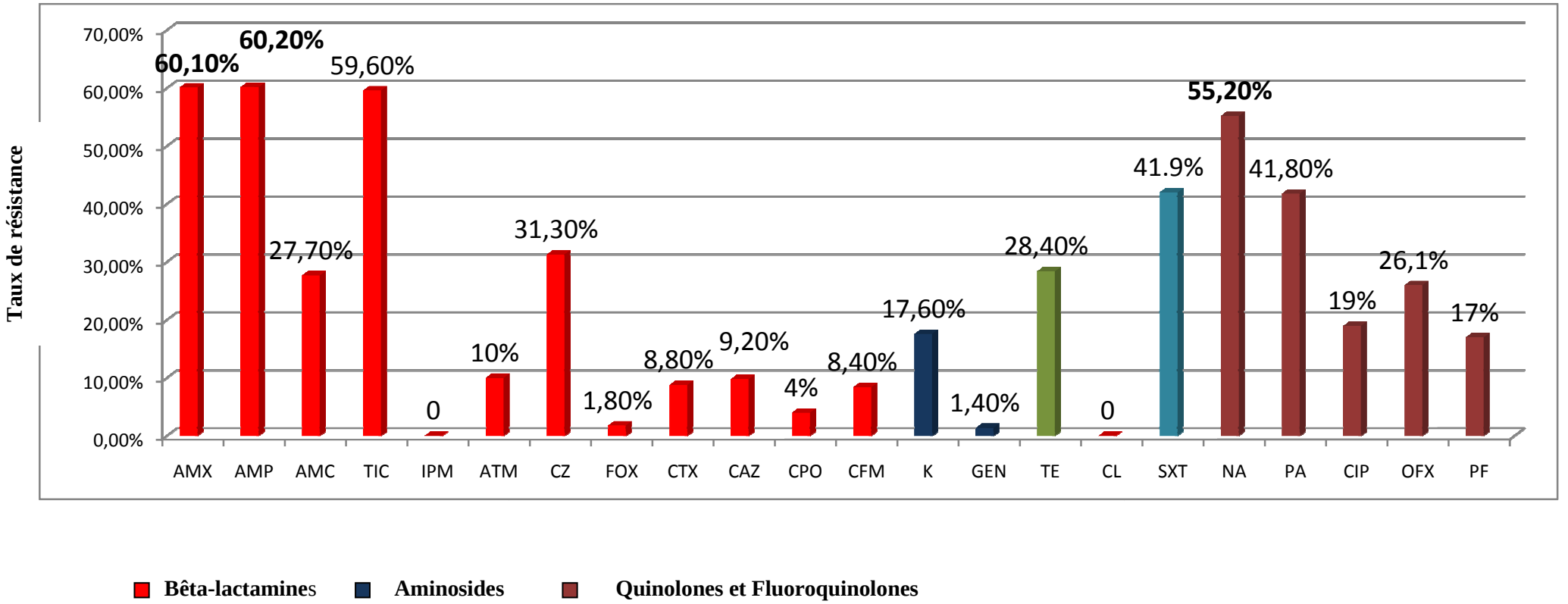


Figure 25 : Pourcentages d'isolats d'*E. coli* mono et multi-antibioresistants

Tableau X : Taux de sensibilité et de résistance des isolats aviaires d'*E. coli*

	ATB	Diamètres critiques (en mm) S	R	Nombre de souches testées	PHENOTYPES Nombre et pourcentage de souches sensibles S	Nombre et pourcentage de souches intermédiaires I	Nombre et pourcentage de souches résistantes R	Valeur de *p*
Bêta-lactamines	**Amoxicilline AMX**	≥21	<16	308	109 **(35,4%)**	14 **(4,5%)**	185 **(60, 1%)**	$3,64810^{-10***}$
	Ampicilline AMP	≥ 19	<16	304	111 **(36,5%)**	10 **(3,3%)**	183 **(60, 2 %)**	$2,87710^{-9***}$
	Amoxicilline + acide clavulanique AMC	≥ 21	<16	307	149 **(48,5%)**	73**(23,8%)**	85 **(27,7%)**	$3,28310^{-9***}$
	Ticarcilline TIC	≥ 24	<22	307	112 **(36,5%)**	12 **(3,9%)**	183 **(59,6%)**	$5,03410^{-09***}$
	Imipénème IPM	≥ 19	<17	308	308 **(100%)**	0	0	$< 2,210^{-16***}$
	AztréonamATM	≥ 27	<21	270	228 **(84,4%)**	15 **(5,6%)**	27 **(10%)**	$< 2,210^{-16***}$
	Céfazoline CZ	≥ 18	<12	304	155 **(50,9%)**	54 **(17,8%)**	95 **(31,3%)**	$8,02510^{-08***}$
	Céfoxitine FOX	≥ 22	<15	280	243 **(86,8%)**	32 **(11,4%)**	5 **(1,8%)**	$< 2,210^{-16***}$
	Céfotaxime CTX	≥ 26	<23	308	276 **(89,6%)**	5 **(1,6%)**	27 **(8,8%)**	$< 2.210^{-16***}$
	Céftazidime CAZ	≥ 26	<21	306	269 **(87,9%)**	9 **(2,9%)**	28 **(9,2%)**	$< 2,210^{-16***}$
	Céfixime CFM	≥ 25	<22	285	255 **(89,5%)**	6 **(2,1%)**	24 **(8,4%)**	$< 2,210^{-16***}$
	Cefpirome CPO	≥ 24	<17	177	168 **(94,9%)**	2 **(1,1%)**	7 **(4%)**	$< 2,210^{-16***}$
Aminosides	**Kanamycine K**	≥ 17	<15	289	232 **(80,3%)**	6 **(2,1%)**	51 **(17, 6%)**	$< 2,210^{-16***}$
	Gentamicine GEN	≥ 18	<16	292	284 **(97,2%)**	4 **(1,40%)**	4 **(1, 4%)**	$< 2,210^{-16***}$
Quinolones	**Tétracycline TE**	≥ 19	<17	289	202 **(69,9%)**	5 **(1.7%)**	82 **(28,4%)**	$< 2,210^{-16***}$
	Colistine CL	≥ 15	<15	293	293 (100%)	0	2 **(0, 68%)**	$< 2,21010^{-16***}$
	Triméthoprime +Sulfamide SXT	≥16	<13	303	170 **(56,1 %)**	6 **(2%)**	127 **(41, 9%)**	$0,0004177^{***}$
	Acide nalidixique NA	≥ 20	<15	308	106 **(34,4%)**	32 **(10,4%)**	170 **(55,2%)**	$5,09310^{-08***}$
	Acide pipémidique PA	≥19	<14	297	132 **(44,4%)**	41 **(13,8%)**	124 **(41,8%)**	0,4795
	Ciprofloxacine CIP	≥ 25	<22	300	224 **(74,7%)**	19 **(6,3%)**	57 **(19%)**	$< 2.210^{-16***}$
	Ofloxacine OFX	≥ 25	<22	306	193 **(63,1%)**	33 **(10,8%)**	80 **(26, 1%)**	$< 2.210^{-16***}$
	Pefloxacine PF	≥ 25	<16	300	213 **(71%)**	36 **(12%)**	51 **(17%)**	$< 2,210^{-16***}$

Remarque : Le Test du χ^2 de comparaison de proportions effectué pour une valeur de α égale à 5% ; *** valeurs très hautement significatives.



AMX : Amoxicilline ; **AMP :** Amicilline ; **AMC** : Association acide clavulanique ; **TIC** : Ticarcilline ; **IPM** : Imipénème ; ATM : Aztréonam ; **CZ :** Céfazoline ; **FOX** : Céfoxitine **CTX** : Céfotaxime ; **CAZ** : Céftazidime ; **CPO :** Cefpirome ; **CFM** : Céfixime ; **K :** Kanamycine ; **GEN** : Gentamicine ; **TE** : Tétracycline ; **CL** : colistine ; **SXT :** Triméthoprime +Sulfamide ; **NA** : Acide nalidixique ; **PA :** Acide pipémidique ; **CIP** : Ciprofloxacine ; **OFX** : Ofloxacine ; **PF** : Pefloxacine.

Figure 26 : Taux d'antibiorésistance des isolats d'*E. coli* aviaires

94

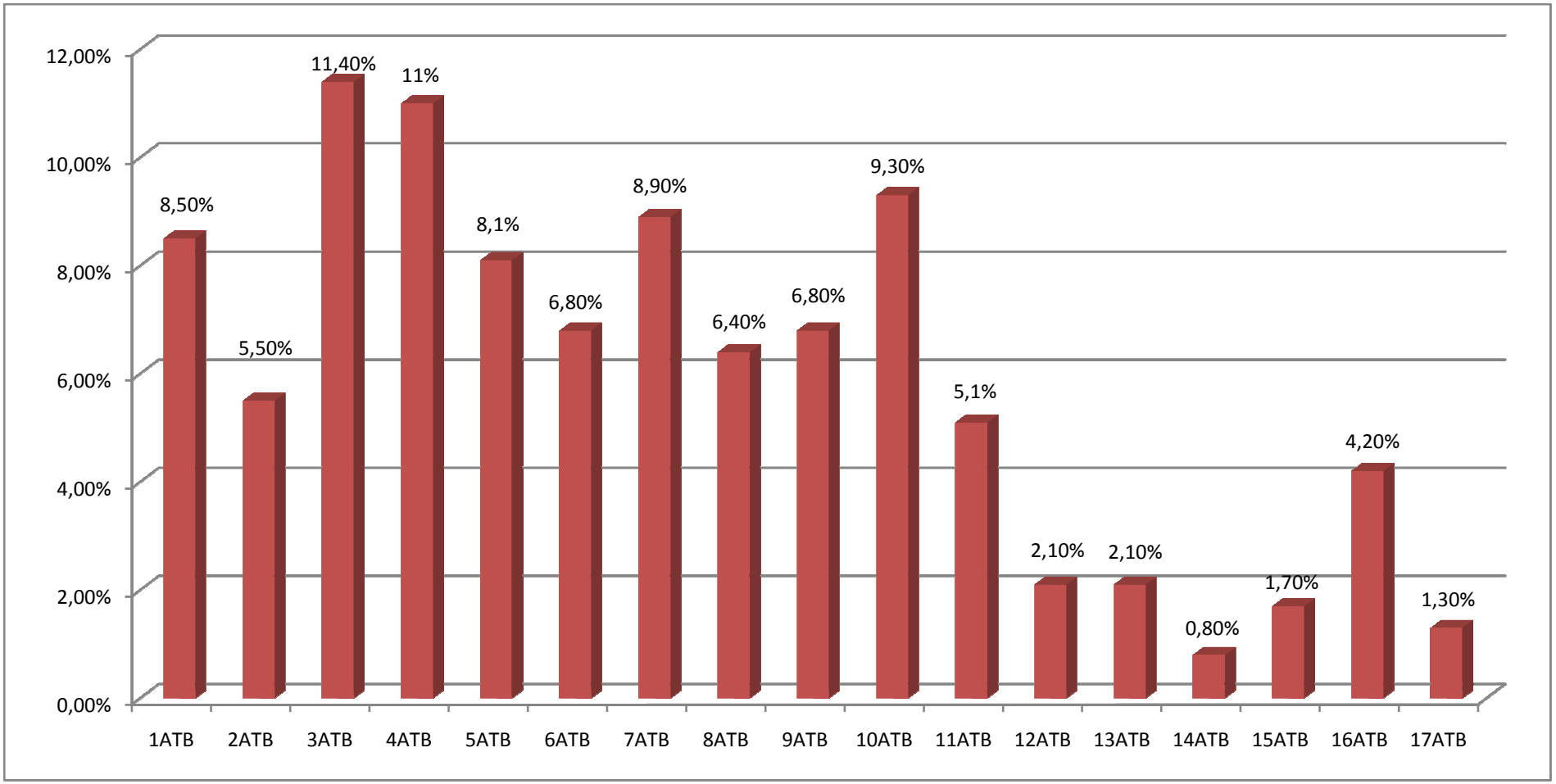


Figure : 27 : Pourcentages de souches résistantes selon le nombre d'antibiotique

1.2.1-Profils et analyse moléculaire de la résistance aux bêta-lactamines

1.2.1.1-Analyse des profils de résistance vis-à-vis des bêta-lactamines

L'analyse des profils de résistance des isolats d'*E.coli* aviaires a mis en évidence la présence de 190 souches résistantes aux bêta-lactamines réparties sur 17 profils évocateurs de la production de bêtalactamases.

Sur la base des recommandations de VEDEL (1997), LIVERMORE (2001) et le CA-SFM (2012), quatre groupes ont émergé ; ils correspondent au phénotype de Pénicllinase Bas Niveau (PBN), de Pénicillinase Haut Niveau (PHN), de Bêta-Lactamase à Spectre Etendu (BLSE) et de Céphalosporinase Haut Niveau AmpC (CHN) ou hyperproduite (Tableau XI).

- Le premier et le second groupe (dominants avec 160 souches) comprennent des souches résistantes aux pénicillines (une souche) et dans certains cas à l'acide clavulanique et aux céphalosporines à spectre étroit (céfazoline).

- Le troisième groupe regroupe les souches résistantes aux céphalosporines de troisième (céfotaxime, ceftazidime et céfixime) et quatrième génération (cefpirome), dont l'activité est restaurée par l'acide clavulanique. Des images de synergie (entre les C3G/Aztreonam et l'acide clavulanique) prédictives de la présence de bêtalactamases à spectre étendu ont été observées sur différents isolats, comme présenté dans la figure 28. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) du céfotaxime ont varié entre 8 et plus de 128 µg/ml (Tableau XII).

- Le quatrième groupe correspond aux souches (4 souches) présentant une résistance à la céfoxitine, l'acide clavulanique et aux céphalosporines de troisième génération avec une CMI du céfotaxime supérieure à 32 µg/ml.

- Le dernier groupe est constitué d'une seule souche résistante à l'amoxicilline, à l'association amoxicilline-acide clavulanique et à la céfoxitine, avec cependant un test de synergie négatif. Ceci augure d'un phénomène d'imperméabilité membranaire.

Les essais de transfert, par deux méthodes de conjugaison, sur 18 souches à profil PHN ont permis de mettre en évidence le transfert de la résistance à l'amoxicilline chez l'ensemble des souches testées. En revanche, aucun transfert de la résistance au céfotaxime de 11 différents isolats à profil BLSE (sur les 24 positifs au test de synergie) n'a été observé avec les trois souches receveuses utilisées et ce, aussi bien par conjugaison que par électroporation. Le profil complet de ces onze souches ainsi que des 18 souches PHN sont détaillés dans le tableau XIII ci-dessous et en annexe 3 pour les souches PHN. Les résultats de la conjugaison sont regroupés par souches receveuses en annexe 3 et présentés en figure 29.

Tableau XI : Profils de résistance et de production de bêtalactamases des souches d'*E.coli* aviaires

Profils de résistance	Nombre de souches	Test de synergie	**Mécanisme de résistance** n (%)
Sensibles à toutes les bêta-lactamines	118	-	118 (38, 3 %)
Résistantes aux bêta-lactamines	190		190 (61,7%)
• AMX	1 (E59)	-	Production de Pénicllinase Bas Niveau **(PBN)** **1(0,3 %)**
• AMX AMP TIC • AMX AMP AMC TIC CZ • AMX AMP TIC CZ • AMX AMP AMC TIC • AMX TIC CZ • AMX AMP AMC TIC CZ	65 43 25 25 1 1	-	Production de Pénicillinase Haut Niveau **(PHN)** 160 (51,9 %)
• AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CFM , CPO (E174) • AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CFM (E2, E11, E42, E47, E 48, E63, E65, E69, E74, E88, E92, E101, E173, E182, E190, E 201) • AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CPO (E24) • AMX, AMP, TIC, ATM, CTX, CAZ CFM, CPO (E16) • AMX, AMP, TIC, ATM, CTX, CFM (E164) • AMX, AMP, AMC, TIC, ATM, CTX, CFM (E127) • AMX, AMP, AMC, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CPO (E94) • AMX, AMP, AMC, TIC, ATM, CTX, CAZ, CFM (E26, E32)	1 16 1 1 1 1 1 2	+	Production de Bêta-Lactamases à Spectre Etendu **(BLSE)** 24 **(**7,8%)
• AMX, AMP, AMC, TIC, ATM, CZ, FOX, CTX, CAZ, CFM (E7, E68, E76) • AMX, AMP, AMC, TIC, ATM, CZ, FOX, CTX, (E282)	3 1	-	Production de Céphalosporinase Haut Niveau AmpC (**CHN)** ou hyperproduite 4 **(**1,2%)
• AMX, AMP(I), AMC, TIC, CZ, FOX (E135)	1	-	imperméabilité membranaire 1(0,3 %)

Tableau XII : Concentrations minimales inhibitrices du céfotaxime sur les isolats à profil BLSE.

SOUCHE BLSE	**CMI µg/ml**
E.coli CIP 7624	0.5
E2	128
E11	>128
E16	64
E24	64
E26	64
E32	64
E42	64
E47	64
E48	128
E63	64
E65	>128
E69	8
E74	64
E88	64
E92	128
E94	64
E101	64
E127	64
E164	64
E173	>128
E174	>128
E182	64
E190	128
E201	>128

Résultats et Discussion

Tableau XIII : Profils d'antibiorésistance de 11 souches *E. coli* productrices de BLSE

	Souche *	AMX	AMP	AMC	TIC	IPM	ATM	CZ	FOX	CTX	CAZ	CFM	CPO	K	GEN	TE	CL	SXT	NA	PA	CIP	OFX	PF
		≥21S <16R	≥19S <16R	≥21S <16R	≥24S <22R	≥24S <17R	≥27S <21R	≥18S <12R	≥22S <15R	≥26S <23R	≥26S <21R	≥25S <22R	≥24S <17R	≥17S <15R	≥18S <16R	≥19S <17R	≥15S <15R	≥16S <13R	≥20S <15R	≥19S <14R	≥25S <22R	≥25S <22R	≥22S <16R
1	**E11**	0 **R**	0 **R**	16 I	8 **R**	31 S	20 **R**	6 **R**	24 S	0 **R**	16 **R**	0 **R**	ND	8 **R**	24 S	0 **R**	15 S	0 **R**	7 **R**	14 **R**	15 **R**	14 **R**	13 **R**
2	**E48**	0 **R**	0 **R**	16 I	15 **R**	32 S	20 **R**	0 **R**	19 I	0 **R**	16 **R**	0 **R**	ND	8 **R**	24 S	0 **R**	15 S	0 **R**	7 **R**	13 **R**	15 **R**	14 **R**	13 **R**
3	**E63**	0 **R**	0 **R**	16 I	20 **R**	30 S	11 **R**	0 **R**	22 S	14 **R**	12 **R**	0 **R**	ND	9 **R**	23 S	0 **R**	15 S	0 **R**	0 **R**	0 **R**	0 **R**	7 **R**	7 **R**
4	**E65**	10 **R**	13 **R**	16 I	20 **R**	31 S	8 **R**	8 **R**	26 S	11 **R**	17 **R**	9 **R**	ND	7 **R**	23 S	0 **R**	16 S	0 **R**	7 **R**	7 **R**	8 **R**	9 **R**	7 **R**
5	**E69**	0 **R**	14 **R**	17 I	12 **R**	39 S	7 **R**	0 **R**	22 S	10 **R**	16 **R**	8 **R**	ND	9 **R**	27 S	12 **R**	15 S	0 **R**	0 **R**	7 **R**	7 **R**	10 **R**	7 **R**
6	**E74**	0 **R**	0 **R**	16 I	15 **R**	25 S	7 **R**	0 **R**	20 I	0 **R**	16 **R**	0 **R**	ND	9 **R**	30 S	0 **R**	15 S	0 **R**	0 **R**	0 **R**	9 **R**	13 **R**	7 **R**
7	**E88**	0 **R**	0 **R**	16 I	15 **R**	30 S	7 **R**	7 **R**	22 S	11 **R**	16 **R**	9 **R**	ND	10 **R**	26 S	9 **R**	15 S	0 **R**	0 **R**	0 **R**	0 **R**	7 **R**	7 **R**
8	**E173**	0 **R**	0 **R**	16 I	7 **R**	25 S	0 **R**	8 **R**	21 I	7 **R**	16 **R**	8 **R**	ND	8 **R**	21 S	0 **R**	15 S	0 **R**	0 **R**	7 **R**	0 **R**	7 **R**	7 **R**
9	**E174**	0 **R**	0 **R**	16 I	0 **R**	24 S	0 **R**	7 **R**	22 S	9 **R**	16 **R**	0 **R**	12 **R**	0 **R**	27 S	0 **R**	15 S	0 **R**	0 **R**	0 **R**	0 **R**	0 **R**	0 **R**
10	**E190**	0 **R**	0 **R**	17 I	16 **R**	31 S	7 **R**	7 **R**	19 I	0 **R**	16 **R**	8 **R**	ND	9 **R**	27 S	0 **R**	15 S	0 **R**	0 **R**	7 **R**	0 **R**	10 **R**	7 **R**
11	**E201**	0 **R**	11 **R**	18 I	16 **R**	32 S	0 **R**	7 **R**	20 I	7 **R**	17 **R**	8 **R**	ND	9 **R**	27 S	0 **R**	15 S	0 **R**	0 **R**	0 **R**	0 **R**	0 **R**	0 **R**

*** Souche :** numéro de collection ; **0 :** aucune zone d'inhibition ; le diamètre du disque d'antibiotique étant de 6mm.

AMX : Amoxicilline ; AMP : Ampicilline ; AMC : Amoxicilline + acide clavulanique ; TIC : Ticarcilline ; IMP : Imipénème ; ATM : Aztreonam ; CZ : Céfazoline ; FOX : cefoxitine ; CTX : cefotaxime ; CAZ : ceftazidime ; CPO : Céfpirome ; CFM : Céfixime ; K : Kanamycine ; GEN : Gentamicine ; TE : Tétracycline ; CL : colistine ; SXT : Triméthoprime/sulfaméthoxazole (cotrimoxazole) ; NA : Acide nalidixique ; PA : Acide pipémidique ; CIP : ciprofloxacine ; OFX : Ofloxacine ; PF : Péfloxacine ; ND : non déterminé

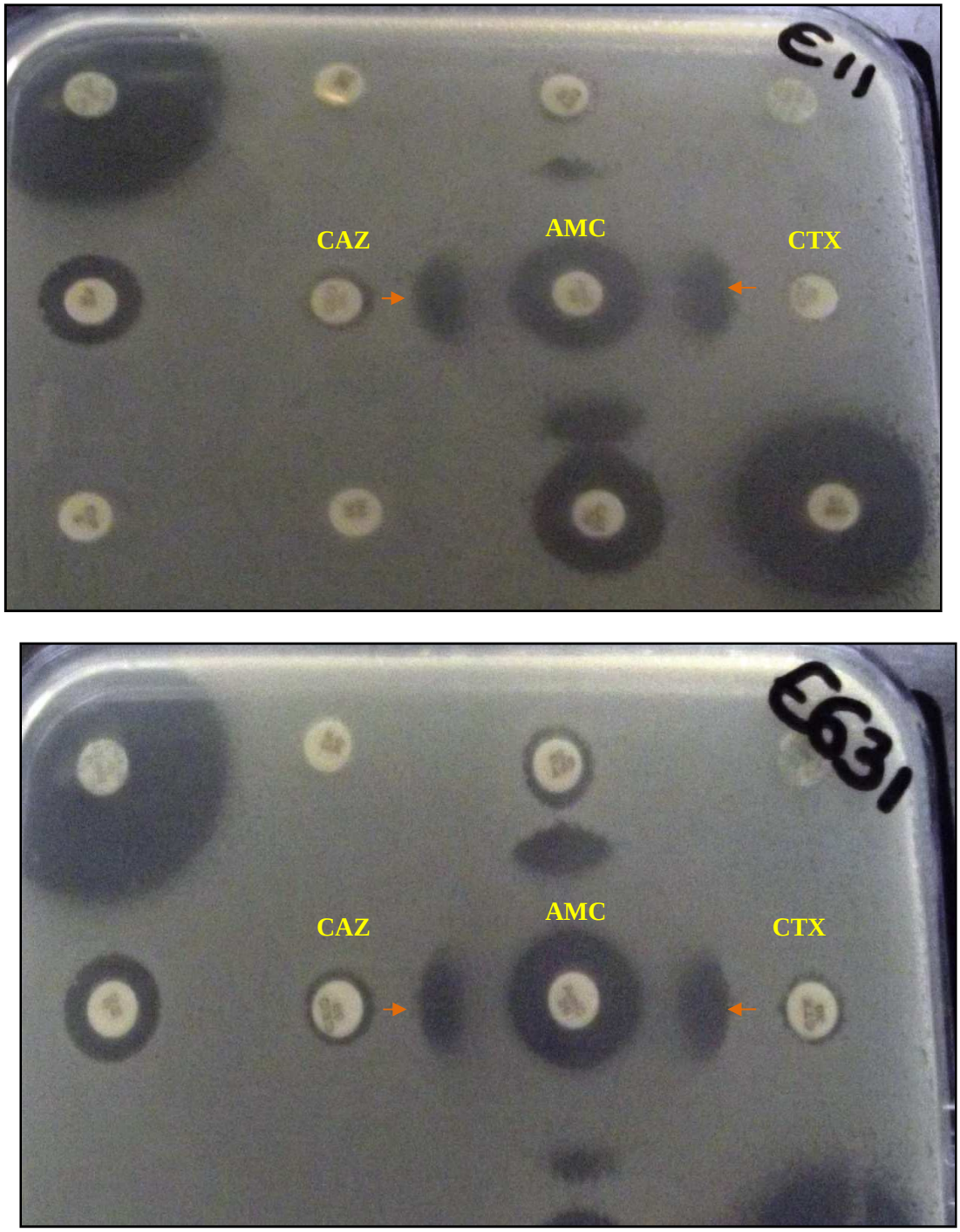


Figure 28 : Images de synergie entre les disques amoxicilline+acide clavulanique et les céphalosporines de troisième génération chez les isolats à BLSE, E11 et E63

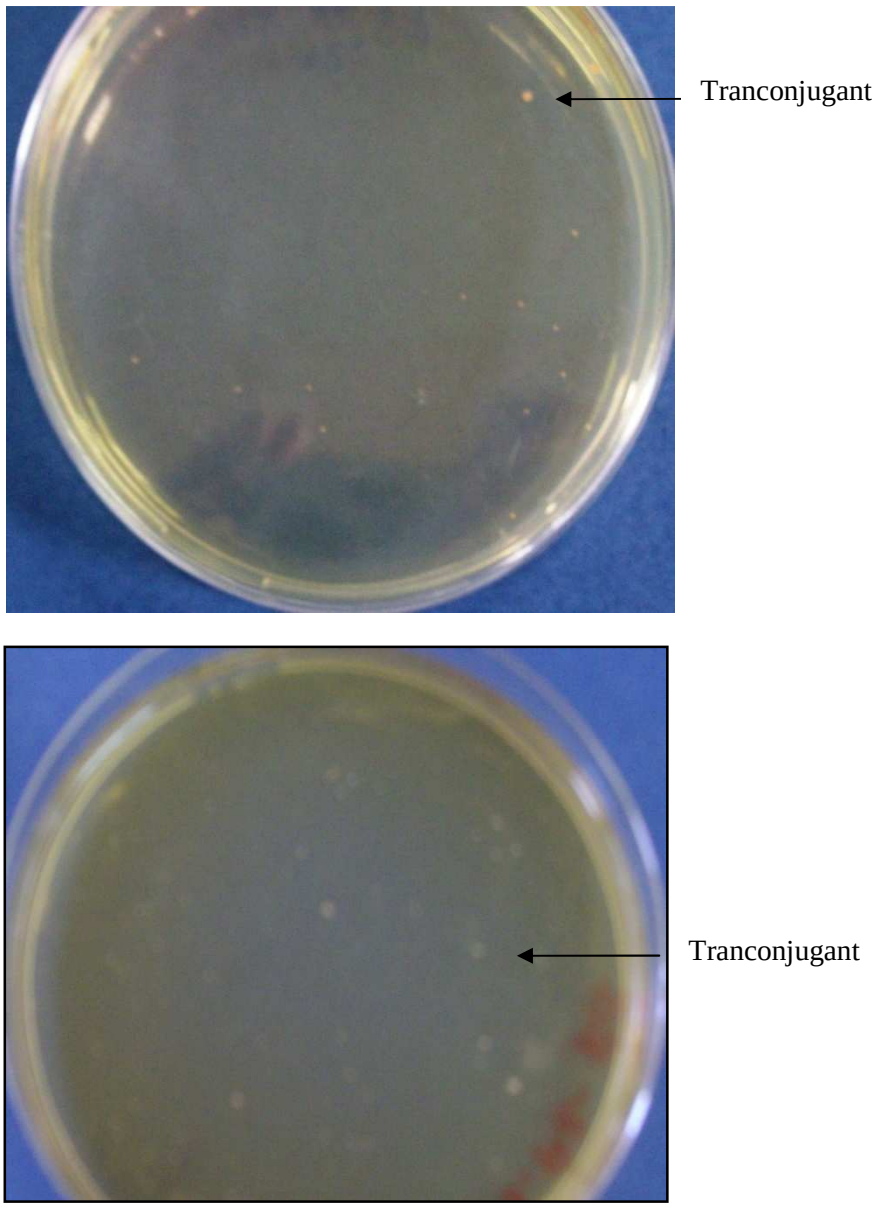


Figure 29 : Transconjugants (souches PHN) issus du transfert de la résistance à l'amoxicilline observés milieu MH additionné d'amoxicilline-rifampicine et azide de sodium (AMX-Rif- AZ)

1.2.1.2-Caractérisation moléculaire de souches productrices de BLSE.

Onze isolats parmi les 24 positifs au test de synergie ont fait l'objet d'une caractérisation moléculaire. Les essais de transfert du caractère BLSE n'ont pas été concluants ni par conjugaison ni par électroporation.

La recherche par PCR du gène $bla_{\text{CTX-M}}$ réalisée avec les amorces spécifiques des groupes CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 et CTX-M-25, a révélé la présence chez l'ensemble des souches analysées d'une bande de 415pb, correspondant au groupe CTX-M-1 (figure 30). Ce résultat a été confirmé par l'analyse des onze souches par puces à ADN (Check-MDR CT101, Biocentric) qui a montré la présence d'un gène $bla_{\text{CTX-M}}$, associé avec un gène bla_{TEM} chez huit isolats (tableau XIV). Par ailleurs, le séquençage et l'alignement des produits d'amplification de deux souches E88 et E174, de respectivement 755 et 757pb, ont révélé une identité de 99% et 100% avec le gène $bla_{\text{CTX-M-15}}$. Les séquences et leur alignements BLAST sont donnés en figure 31 et 31bis.

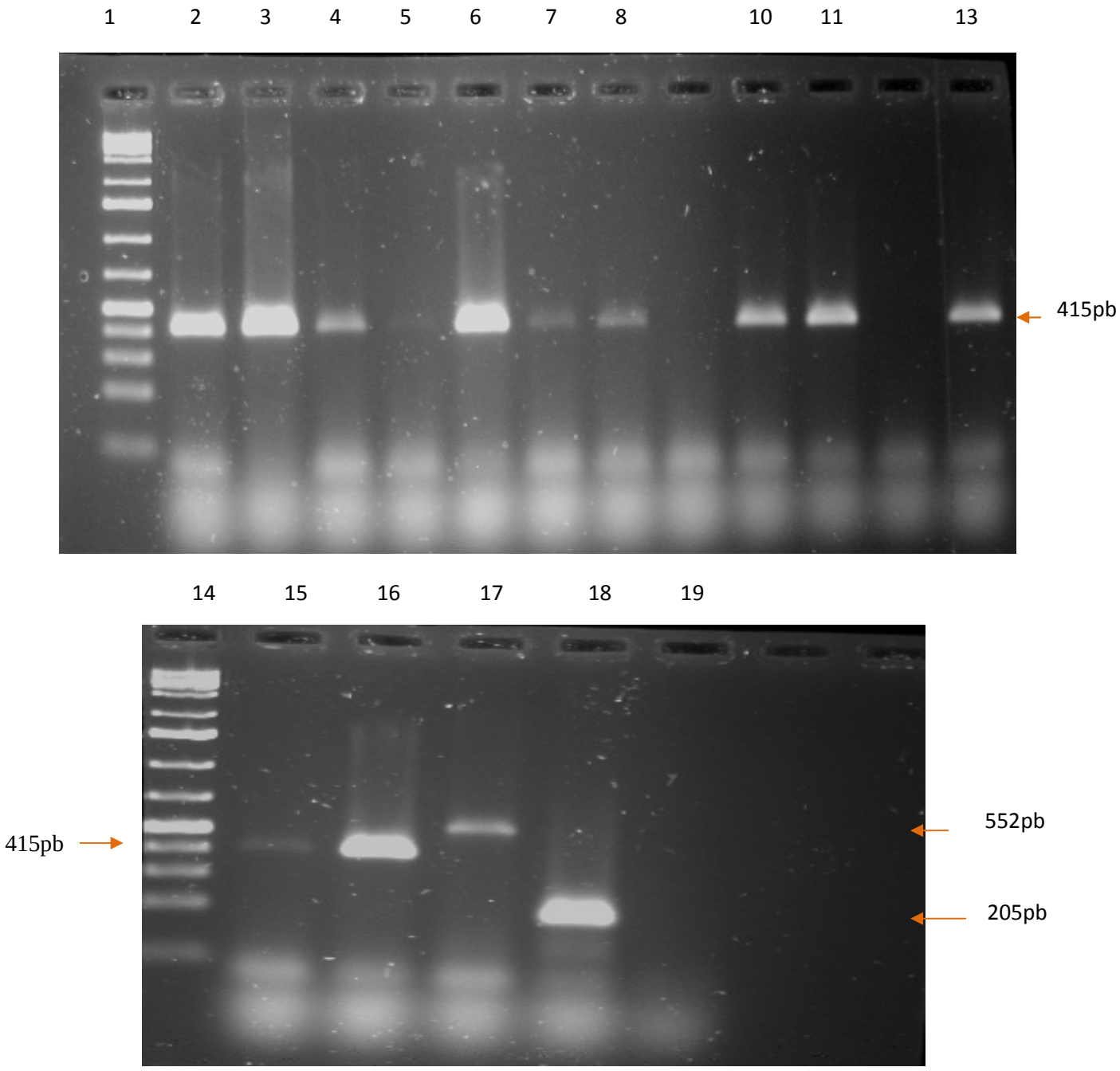


Figure 30 : Détection des gènes *bla*$_{CTX-M}$ par PCR sur les isolats d'*E. coli* aviaires producteurs de BLSE

Puits 1 et 14 : marqueur de masse moléculaire (Gene ruler 1-kilobase plus DNA ladder Fermentas, Villebon sur Yvette, France).
Puits 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13 et 15: isolats E11, E48, E63, E65, E69, E74, E88, E173, E174, E190 et E201.
Puits 16: Témoin CTX-M-1 à 415pb.
Puits 17: Témoin CTX-M-8 à 552pb.
Puits 18: Témoin CTX-M-9 à 205pb.
Puits 19: Témoin négatif.

Tableau XIV : Résultats de l'analyse par puces à ADN (Check-MDR CT101, Biocentric)

Souche	BLSE	CTX-M-1	TEM	Autres bêtâ-lactamases
E11	-	-	-	-
E48	Y	Y	Y	-
E63	Y	Y	-	-
E65	Y	Y	-	-
E69	Y	Y	Y	-
E74	Y	Y	Y	-
E88	-	-	Y	-
E173	Y	Y	Y	-
E174	Y	Y	Y	-
E190	-	-	Y	-
E201	Y	Y	Y	-

Autres bêta-lactamases : TEM- E104K ; TEM -R164C; TEM-R164H ; TEM-G238C ; SHV-238G ; SHV-G238S ; SHV-238A ; SHV-240E ; SHV-240K ; CTX-M1 ; CTX-M-2 ; CTX-M-9 ; CTX-M-8, CTX-M-25 ; AmpC (plasmidique) ; CMY2 ; DHA ; ACT-MIR ; CMY_I ; IMOX ; ACC ; FOX.

Y: présence ; BLSE: bêta-lactamase à spectre étendu.

Results for: lcl|Query_38867 2012-05-24_88R_C12.ab1(755bp) **E88**
Sequence ID: ref|NG_048935.1|Length: 980Number of Matches: 1
Range 1: 159 to 911GenBankGraphics Next Match Previous Match First Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1346 bits(1492)	0.0()	753/755(99%)	2/755(0%)	Plus/Minus	

Features:

```
Query  1    GTTGAGGCTGGGTGAAGTAAGTGACCAGAATCAGCGGCGCACGATCTTTTGGCCAGATCA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  911  GTTGAGGCTGGGTGAAGTAAGTGACCAGAATCAGCGGCGCACGATCTTTTGGCCAGATCA  852

Query  61   CCGCGATATCGTTGGTGGTGCCATAGCCACCGCTGCCGGTTTTATCCCCCACAACCCAGG  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  851  CCGCGATATCGTTGGTGGTGCCATAGCCACCGCTGCCGGTTTTATCCCCCACAACCCAGG  792

Query  121  AAGCAGGCAGTCCAGCCTGAATGCTCGCTGCACCGGTGGTATTGCCTTTCATCCATGTCA  180
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  791  AAGCAGGCAGTCCAGCCTGAATGCTCGCTGCACCGGTGGTATTGCCTTTCATCCATGTCA  732

Query  181  CCAGCTGCGCCCGTTGGCTGTCGCCCAATGCTTTACCCAGCGTCAGATTCCGCAGAGTTT  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  731  CCAGCTGCGCCCGTTGGCTGTCGCCCAATGCTTTACCCAGCGTCAGATTCCGCAGAGTTT  672

Query  241  GCGCCATTGCCCGAGGTGAAGTGGTATCACGCGGATCGCCCGGAATGGCGGTGTTTAACG  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  671  GCGCCATTGCCCGAGGTGAAGTGGTATCACGCGGATCGCCCGGAATGGCGGTGTTTAACG  612

Query  301  TCGGCTCGGTACGGTCGAGACGGAACGTTTCGTCTCCCAGCTGTCGGGCGAACGCGGTGA  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  611  TCGGCTCGGTACGGTCGAGACGGAACGTTTCGTCTCCCAGCTGTCGGGCGAACGCGGTGA  552

Query  361  CGCTAGCCGGGCCGCCAACGTGAGCAATCAGCTTATTCATCGCCACGTTATCGCTGTACT  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  551  CGCTAGCCGGGCCGCCAACGTGAGCAATCAGCTTATTCATCGCCACGTTATCGCTGTACT  492

Query  421  GTAGCGCGGCCGCGCTAAGCTCAGCCAGTGACATCGTCCCATTGACGTGCTTTTCCGCAA  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  491  GTAGCGCGGCCGCGCTAAGCTCAGCCAGTGACATCGTCCCATTGACGTGCTTTTCCGCAA  432

Query  481  TCGGATTATAGTTAACAAGGTCAGATTTTTTGATCTCAACTCGCTGATTTAACAGATTCG  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  431  TCGGATTATAGTTAACAAGGTCAGATTTTTTGATCTCAACTCGCTGATTTAACAGATTCG  372

Query  541  GTTCGCTTTCACTTTTCTTCAGCACCGCGGCCGCGGCCATCACTTTACTGGTGCTGCACA  600
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  371  GTTCGCTTTCACTTTTCTTCAGCACCGCGGCCGCGGCCATCACTTTACTGGTGCTGCACA  312

Query  601  TCGCAAAGCGCTCATCAGCACGATAAAGTATTTGCGAATTATCTGCTGTGTTAATCAATG  660
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  311  TCGCAAAGCGCTCATCAGCACGATAAAGTATTTGCGAATTATCTGCTGTGTTAATCAATG  252

Query  661  CCACACCCAGTCTGCCTCCCGACTGCCGCTCTAATTCGGCAAGTTTTTGCTGTACGTCCC  720
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||
Sbjct  251  CCACACCCAGTCTGCCTCCCGACTGCCGCTCTAATTCGGCAAGTTTTTGCTGTACGT-CC  193

Query  721  GCCGTTTGCGCATACAGCGGCACACTTCCCTAACA  755
            |||||||||||||||||||||||||| ||||||| 
Sbjct  192  GCCGTTTGCGCATACAGCGGCACACTT-CCTAACA  159
```

Figure 31 : Alignements des séquences d'amplification des gènes *bla*$_{CTXM}$ des souches BLSE E88 (755pb) et E174 (757pb) avec la séquence du gène *bla*$_{CTX-M15}$ décrit par KARIM *et al.* (2001)

Results for: lcl|Query_8255 2012-05-24_174R_D12.ab1(757bp) **E174**
Sequence ID: ref|NG_048935.1|Length: 980Number of Matches: 1
Range 1: 161 to 917GenBankGraphics Next Match Previous Match First Match

Alignment statistics for match #1

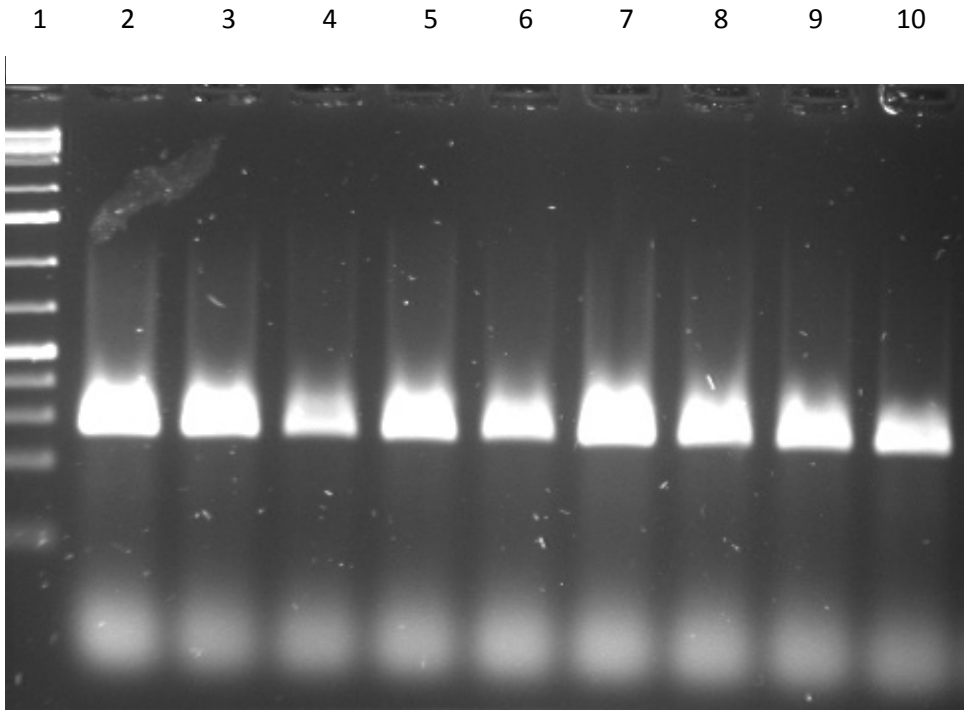
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1366 bits(1514)	0.00	757/757(100%)	0/757(0%)	Plus/Minus	

Features:

```
Query  1    CCTTAGGTTGAGGCTGGGTGAAGTAAGTGACCAGAATCAGCGGCGCACGATCTTTTGGCC  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  917  CCTTAGGTTGAGGCTGGGTGAAGTAAGTGACCAGAATCAGCGGCGCACGATCTTTTGGCC  858

Query  61   AGATCACCGCGATATCGTTGGTGGTGCCATAGCCACCGCTGCCGGTTTTATCCCCCACAA  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  857  AGATCACCGCGATATCGTTGGTGGTGCCATAGCCACCGCTGCCGGTTTTATCCCCCACAA  798

Query  121  CCCAGGAAGCAGGCAGTCCAGCCTGAATGCTCGCTGCACCGGTGGTATTGCCTTTCATCC  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  797  CCCAGGAAGCAGGCAGTCCAGCCTGAATGCTCGCTGCACCGGTGGTATTGCCTTTCATCC  738

Query  181  ATGTCACCAGCTGCGCCCGTTGGCTGTCGCCCAATGCTTTACCCAGCGTCAGATTCCGCA  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  737  ATGTCACCAGCTGCGCCCGTTGGCTGTCGCCCAATGCTTTACCCAGCGTCAGATTCCGCA  678

Query  241  GAGTTTGCGCCATTGCCCGAGGTGAAGTGGTATCACGCGGATCGCCCGGAATGGCGGTGT  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  677  GAGTTTGCGCCATTGCCCGAGGTGAAGTGGTATCACGCGGATCGCCCGGAATGGCGGTGT  618

Query  301  TTAACGTCGGCTCGGTACGGTCGAGACGGAACGTTTCGTCTCCCAGCTGTCGGGCGAACG  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  617  TTAACGTCGGCTCGGTACGGTCGAGACGGAACGTTTCGTCTCCCAGCTGTCGGGCGAACG  558

Query  361  CGGTGACGCTAGCCGGGCCGCCAACGTGAGCAATCAGCTTATTCATCGCCACGTTATCGC  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  557  CGGTGACGCTAGCCGGGCCGCCAACGTGAGCAATCAGCTTATTCATCGCCACGTTATCGC  498

Query  421  TGTACTGTAGCGCGGCCGCGCTAAGCTCAGCCAGTGACATCGTCCCATTGACGTGCTTTT  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  497  TGTACTGTAGCGCGGCCGCGCTAAGCTCAGCCAGTGACATCGTCCCATTGACGTGCTTTT  438

Query  481  CCGCAATCGGATTATAGTTAACAAGGTCAGATTTTTTGATCTCAACTCGCTGATTTAACA  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  437  CCGCAATCGGATTATAGTTAACAAGGTCAGATTTTTTGATCTCAACTCGCTGATTTAACA  378

Query  541  GATTCGGTTCGCTTTCACTTTTCTTCAGCACCGCGGCCGCGGCCATCACTTTACTGGTGC  600
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  377  GATTCGGTTCGCTTTCACTTTTCTTCAGCACCGCGGCCGCGGCCATCACTTTACTGGTGC  318

Query  601  TGCACATCGCAAAGCGCTCATCAGCACGATAAAGTATTTGCGAATTATCTGCTGTGTTAA  660
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  317  TGCACATCGCAAAGCGCTCATCAGCACGATAAAGTATTTGCGAATTATCTGCTGTGTTAA  258

Query  661  TCAATGCCACACCCAGTCTGCCTCCCGACTGCCGCTCTAATTCGGCAAGTTTTTGCTGTA  720
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  257  TCAATGCCACACCCAGTCTGCCTCCCGACTGCCGCTCTAATTCGGCAAGTTTTTGCTGTA  198

Query  721  CGTCCGCCGTTTGCGCATACAGCGGCACACTTCCTAA  757
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  197  CGTCCGCCGTTTGCGCATACAGCGGCACACTTCCTAA  161
```

Figure 31 (bis) : Alignements des séquences d'amplification des gènes *bla*$_{CTXM}$ des souches BLSE E88 (755pb) et E174 (757pb) avec la séquence du gène *bla*$_{CTX-M15}$ décrit par KARIM *et al.* (2001)

Le groupage phylogénétique des 11 isolats producteurs de BLSE a révélé la présence d'une seule bande de 279pb caractéristique du groupe phylogénétique D selon CLERMONT *et al.* (2000) (figure 32). La comparaison génétique des souches par RFLP/PFGE a montré que tous les isolats présentaient un profil d'ADN commun de 12 bandes de tailles comprises entre moins de 48,5kb et 669kb (figure 33).



Puits 1, 11 et 15 : marqueur de masse moléculaire (Gene ruler 1-kilobase plus DNA ladder, Fermentas, Villebon sur Yvette, France).

Puits 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 et 13: isolats E173, E174, E201, E63, E65 E69, E74, E88, E190, E11 et E48

Puits 16: *E. coli* 5010622spe B2 ; Puits 17 : témoin négatif

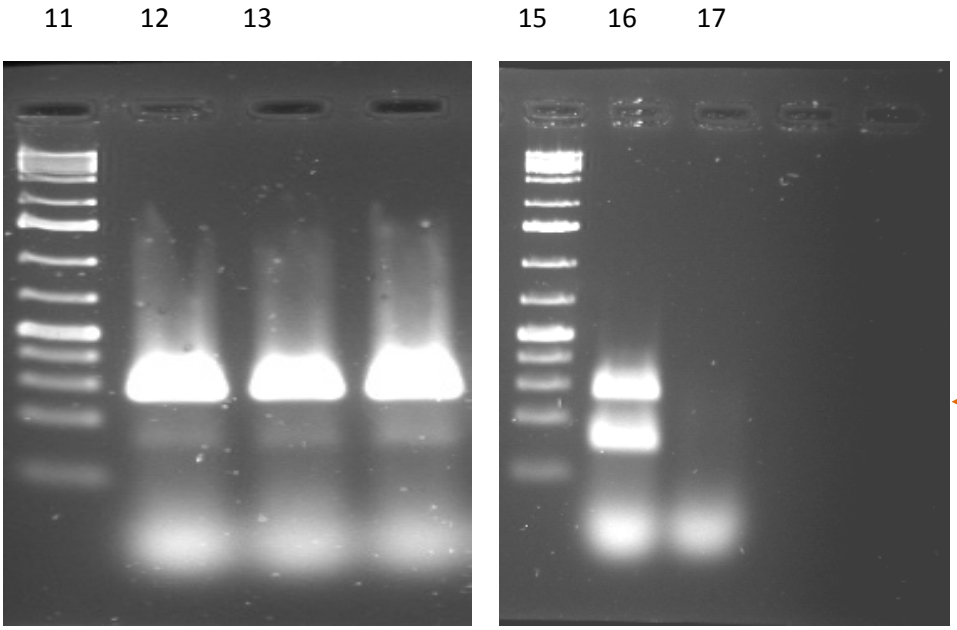


Figure 32 : Détermination par PCR du groupe phylogénétique des isolats d'*E. coli* aviaires producteurs de BLSE

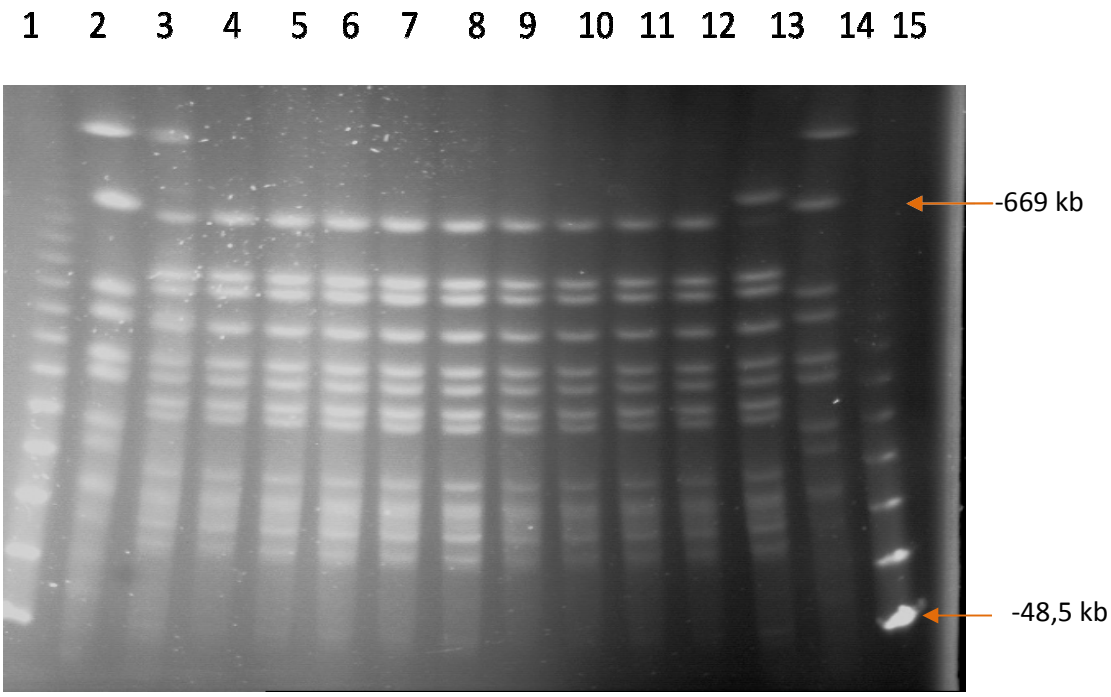


Figure 33 : RFLP/PFGE de l'ADN des isolats d'*E. coli* aviaires producteurs de BLSE

Puits 1 et 15: marqueur de masse moléculaire Lambda (Biolabs, Evry, France)
Puits 2 et 14: *Salmonella* Braenderup
Puits 3 à 13: Isolats E11, E48, E63, E65, E69, E74, E88, E173, E174, E190 et E201

L'analyse des extraits plasmidiques des onze souches BLSE par électrophorèse (figure 34) a révélé des profils identiques pour toutes les souches. Les résultats du replicon typing (figures 35 et 36) ont montré que les onze souches testées possédaient un réplicon de type F (bande à 270pb) avec ou sans FIB (bande à 702pb).

Sept plasmides de différentes tailles sont présents dans chacun des isolats testés :

- 3 plasmides de grande taille, supérieure à 20kb (27,5 kb ; 31,6 kb et 100 kb) ;
- 2 plasmides de moins de 5kb (2,5kb et 4,4kb) ;
- 2 plasmides de moins de 1,5kb (environ 1,4kb et 1 kb).

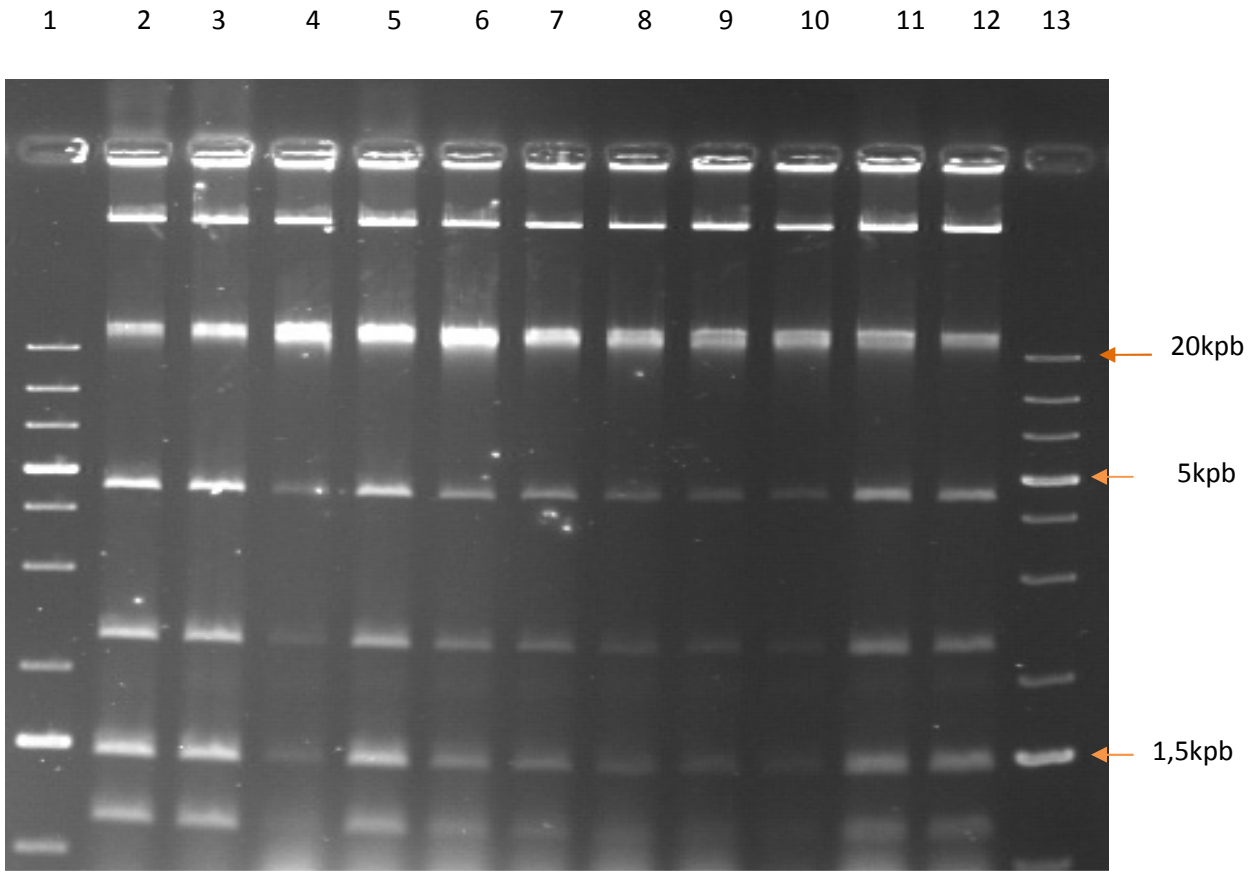


Figure 34 : Profils électrophorétiques des extraits plasmidiques d'isolats producteurs de BLSE

Puits 2 à 12 : isolats E11, E48, E63, E65, E69, E74, E88, E173, E174, E190 et E201.
Puits 1 et 13: marqueurs de masse moléculaire (Gene ruler 1-kilobase plus DNA ladder Fermentas, Villebon sur Yvette, France).

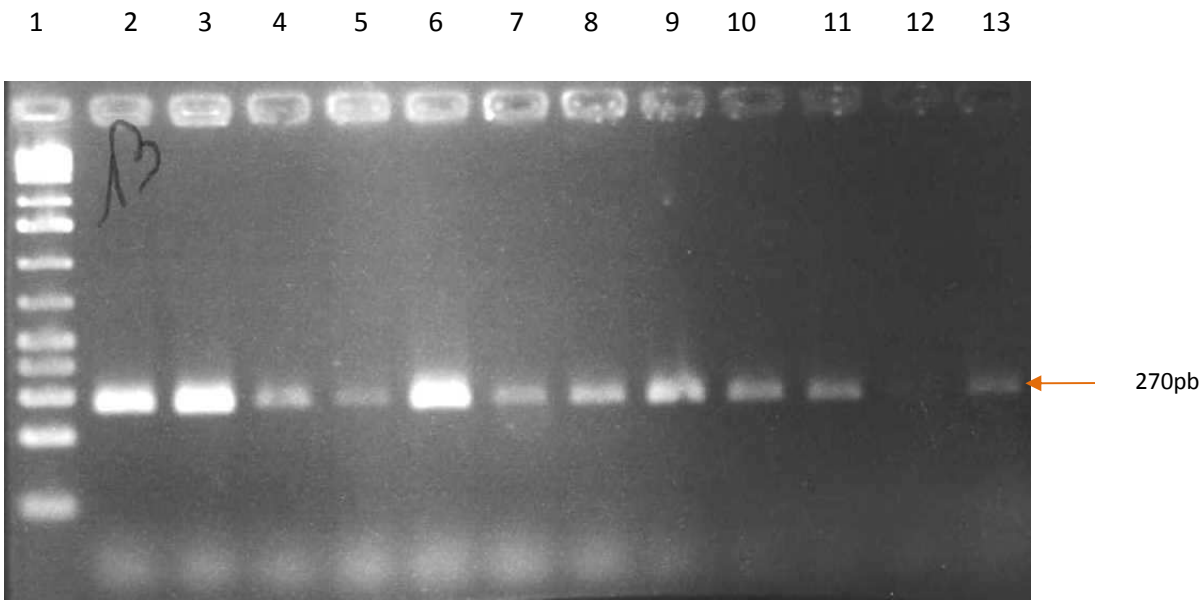


Figure 35 : Replicon typing (IncF) par PCR simplex des isolats d'*E. coli* aviaires producteurs de BLSE

Puits 1 : marqueur de masse moléculaire (Gene ruler1-kilobase plusDNA ladder Fermentas, Villebon sur Yvette, France) ;
Puits 2 à 12 : isolats APEC de *E. coli* E11, E48, E63, E65, E69, E74, E88, E173, E174, E190 et E201.
Puits 13 : réplicon type F.

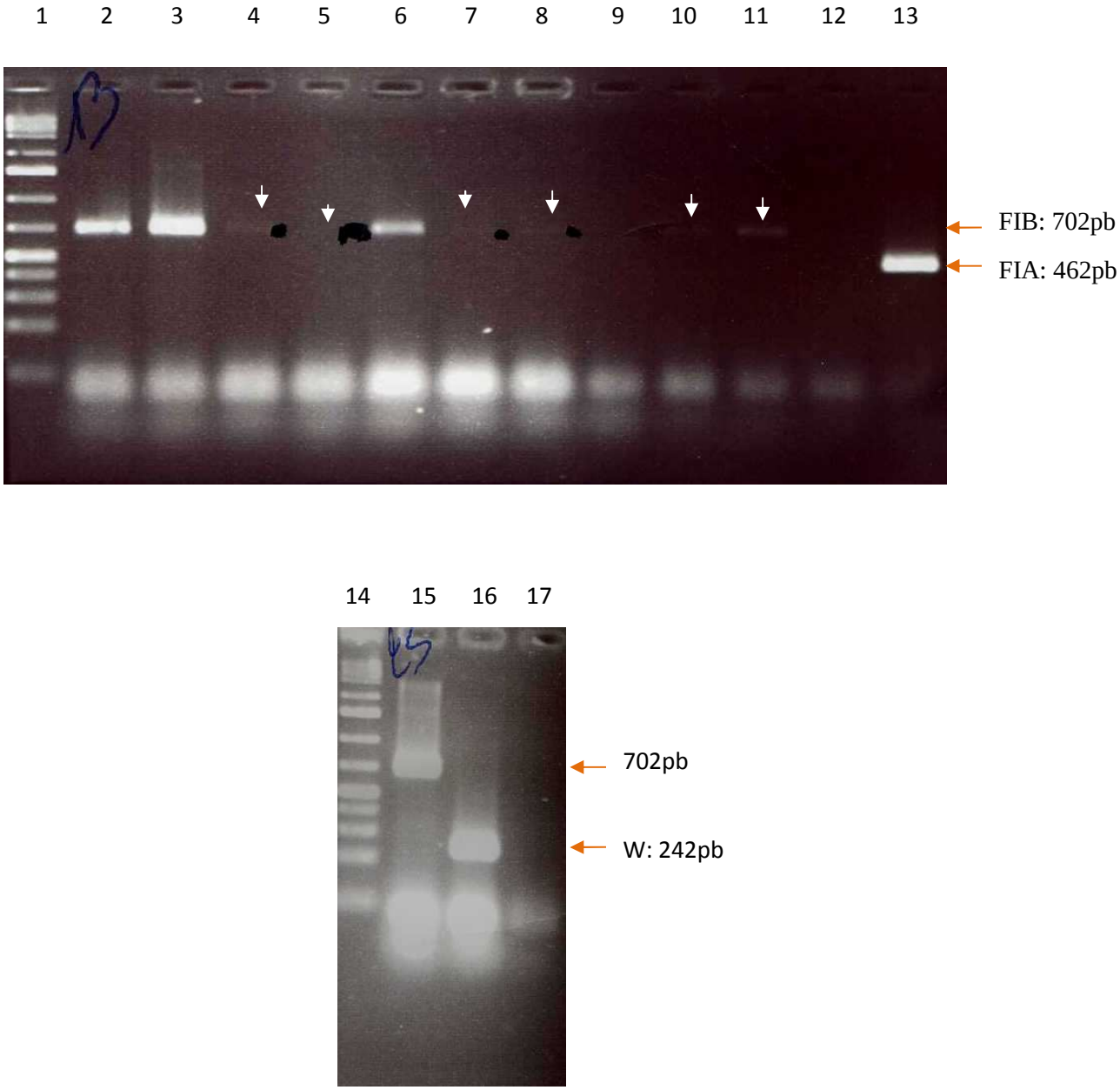


Figure 36 : Replicon typing (IncFIA/FIB/W) par PCR multiplex des isolats d'*E .coli* aviaires producteurs de BLSE

Puits 1 et 14: marqueur de masse moléculaire (Gène ruler1-kilobase plus DNA ladder Fermentas, Villebon sur Yvette, France) ;
Puits 2 à 12 : isolats E11, E48, E63, E65, E69, E74, E88, E173, E174, E190 et E201.
Puits 13: réplicon type FIA
Puits 15, 16 et 17: réplicon FIB, W et témoin négatif

Les résultats de la caractérisation moléculaire des onze isolats aviaires producteurs de BLSE sont récapitulés dans le Tableau XV :

Tableau XV : Caractérisation moléculaires des isolats *E.coli* BLSE

		PCR typage phylogénique				PCR Replicon typing							
	PCR CTX-M	ChuA	YjaA	Tspe	**Groupe**	M1	M2	**M3**	M4	M5	**S1**	S2	S3
E11	Groupe CTX-M1	+	-	-	D	-	-	FIB	-	-	F	-	-
E48	Groupe CTX-M1	+	-	-	D	-	-	FIB	-	-	F	-	-
E63	Groupe CTX-M1	+	-	-	D	-	-	FIB	-	-	F	-	-
E65	Groupe CTX-M1	+	-	-	D	-	-	FIB	-	-	F	-	-
E69	Groupe CTX-M1	+	-	-	D	-	-	FIB	-	-	F	-	-
E74	Groupe CTX-M1	+	-	-	D	-	-	FIB	-	-	F	-	-
E88	Groupe CTX-M1	+	-	-	D	-	-	FIB	-	-	F	-	-
E173	Groupe CTX-M1	+	-	-	D	-	-	-	-	-	F	-	-
E174	Groupe CTX-M1	+	-	-	D	-	-	FIB	-	-	F	-	-
E190	Groupe CTX-M1	+	-	-	D	-	-	FIB	-	-	F	-	-
E201	Groupe CTX-M1	+	-	-	D	-	-	-	-	-	F	-	-

M1-2-3-4-5 : PCR multiplex 1, 2, 3, 4 et 5 ; **S1-2-3 :** PCR simplex 1, 2 et 3.

1.1.2- Profils et analyse moléculaire de la résistance aux quinolones

L'analyse des profils de résistance des souches a mis en évidence 170 souches résistantes aux quinolones réparties sur 8 différents profils. La résistance aux quinolones de première génération prédomine avec 42 souches résistantes exclusivement à l'acide nalidixique et 47 souches simultanément à l'acide nalidixique et à l'acide pipémidique. Certains profils de résistance se sont étendus aux fluoroquinolones, ofloxacine, ciprofloxacine et péfloxacine. Les profils de résistance aux quinolones sont présentés dans le tableau XVI.

Tableau XVI : Profils de résistance aux quinolones des souches d'*E.coli* aviaires

Profils de résistance aux quinolones	Nombre de souches (%)
NA	42 (24,7%)
NA PA	47 (27,7%)
NA OFX	2 (1,2%)
NA PA OFX	19 (11,2%)
NA PA OFX PF	4 (2,4%)
NA PA CIP OFX	7 (4,1%)
NA CIP OFX PF	1 (0,5%)
NA PA CIP OFX PF	48 (28,2)
Total	170 (100%)

Aucun transfert, par conjugaison et électroporation, de la résistance à l'acide nalidixique et à la ciprofloxacine, n'a été observé aussi bien pour les souches BLSE que PHN, ce qui est indicatif d'une résistance chromosomique.

L'analyse par séquençage des gènes cibles des fluoroquinolones de deux souches productrices de BLSE (E88 et E174) a mis en évidence la présence de mutations dans les régions QRDR (quinolone resistance determining region) des gènes *gyrA* de l'ADN gyrase et *parC* et *parE* de la topoisomérase IV, expliquant ainsi la résistance à haut niveau des souches aux quinolones et fluoroquinolones. Les substitutions détectées étaient les suivantes : pour le gène *gyrA:* Ser83Leu et Asp87Asn, pour le gène *parC* : Ser80Iso et pour le gène *parE*: Ala458Ser. Les alignements de séquences des gènes cibles *gyr*A, *parC* et *parE et* les substitutions détectées sont présentées en annexe 4 et en figure 37, 38 et 38bis.

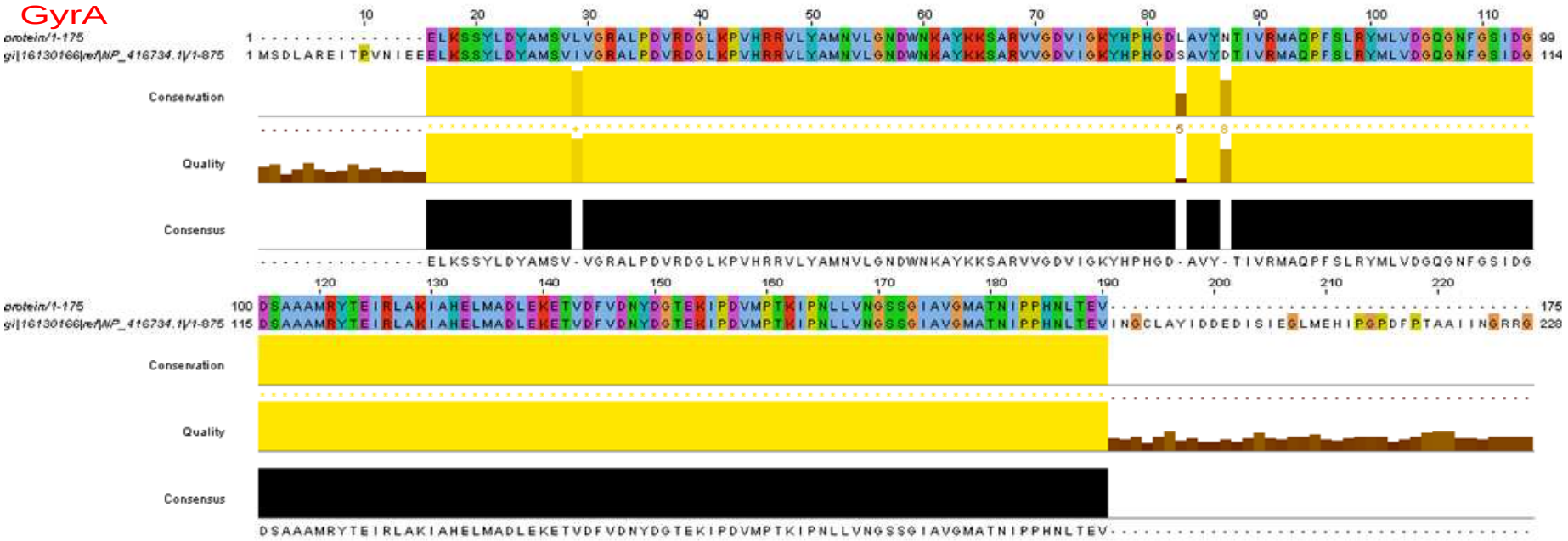
1.1.3- Profils et analyse moléculaire de la résistance aux autres antibiotiques

Concernant la famille des aminosides, trois types de profils de résistance ont été observés : l'un incluant 48 souches résistantes à la kanamycine, le second avec 4 souches résistantes à la gentamicine et le dernier associant les deux antibiotiques, observé sur trois souches.

Dans notre collection, la résistance à la tétracycline est associée aux autres familles d'antibiotiques chez 23 souches. 39 souches ont, par contre, simultanément été résistantes au cotrimoxazole, bêta-lactamines et quinolones.

Les résistances à la tétracycline et au cotrimoxazole ont pu être transférées avec succès par électroporation à partir des souches productrices de BLSE, révélant ainsi le caractère plasmidique de la résistance à ces deux molécules. La confirmation physique de ce transfert par l'analyse des profils électrophorétiques des extraits plasmidiques des transformants a montré que les résistances à la tétracycline et au cotrimoxazole chez les souches BLSE étaient portées sur les mêmes grands plasmides de plus de 20kb (figure 39).

Ala : alanine ; Asp acide aspartique ; Asn : asparagine ; Leu : leucine. ; Ser : serine ;



Séquence du haut: séquences souches testées
Séquence du bas: séquence de référence NCBI Reference Sequence: NP_416734.1
Mutations
Aa29 isoleucine ➔leucine (erreur de séquençage non présente dans les autres séquences)
aa 83 serine➔leucine
Aa 87 aspartate➔asparagine

Figure 37 : Mutations détectées dans les régions QRDR du gène *gyrA* de l'ADN gyrase

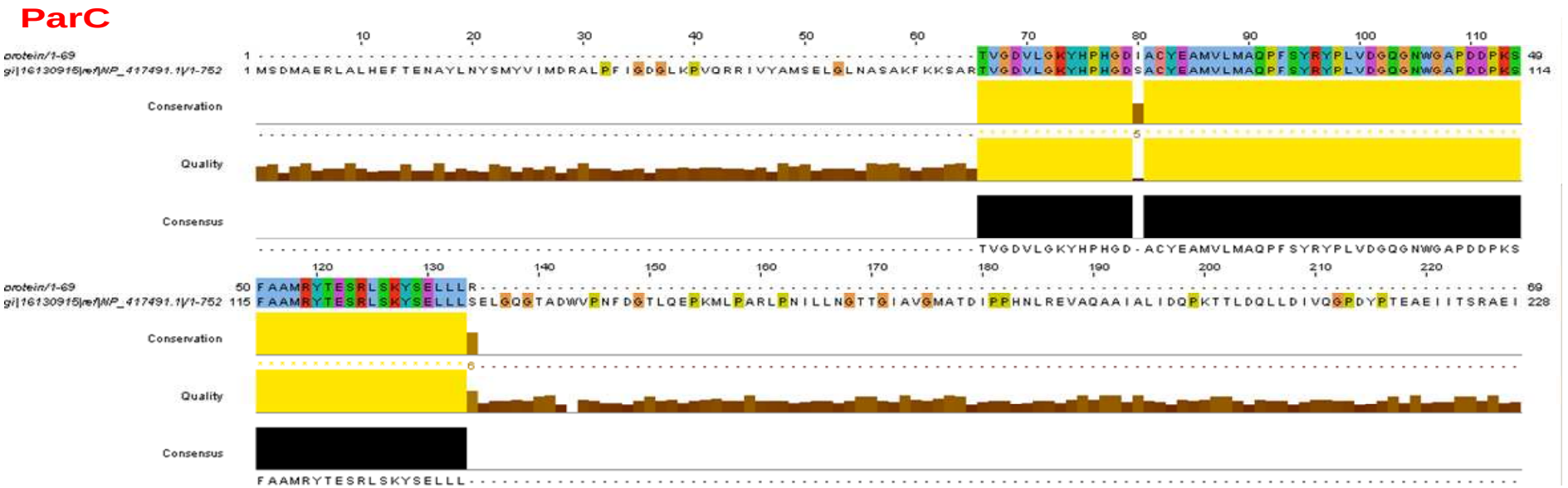
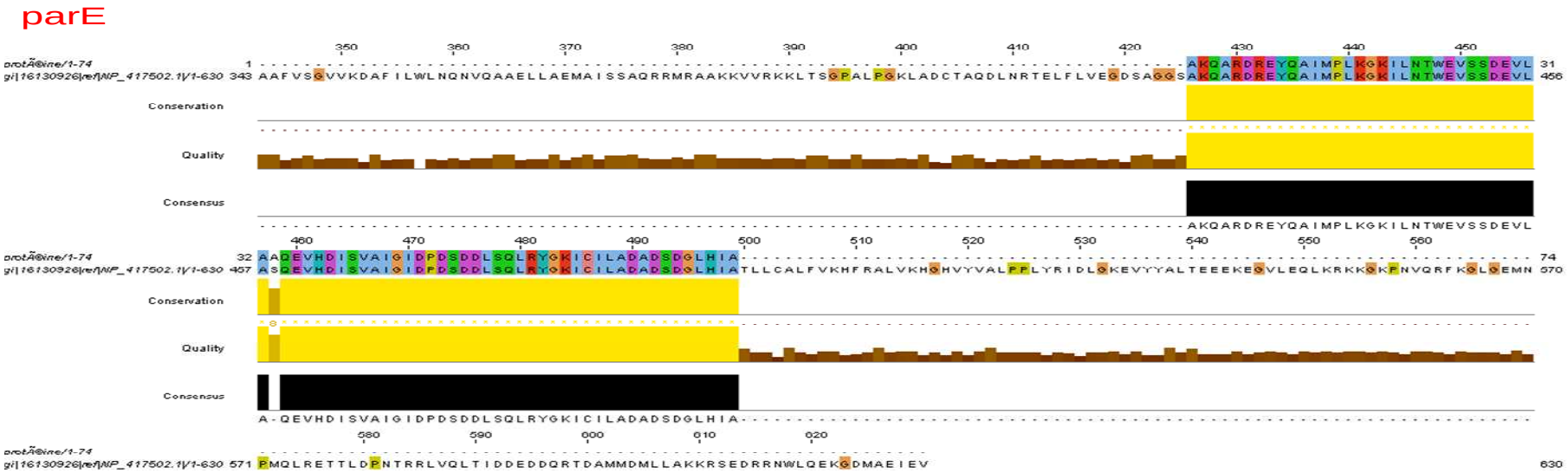


Figure 38 : Mutations détectées dans les régions QRDR des gènes *parC* et *parE* de la topoisomérase IV



Séquence du haut: séquences tests
Séquence du bas: séquence de référence NCBI Reference Sequence: NP_417502.1

Mutation:
Aa 458: alanine➔Serine

Figure 38 (bis) : Mutations détectées dans les régions QRDR des gènes *parC* et *parE* de la topoisomérase IV

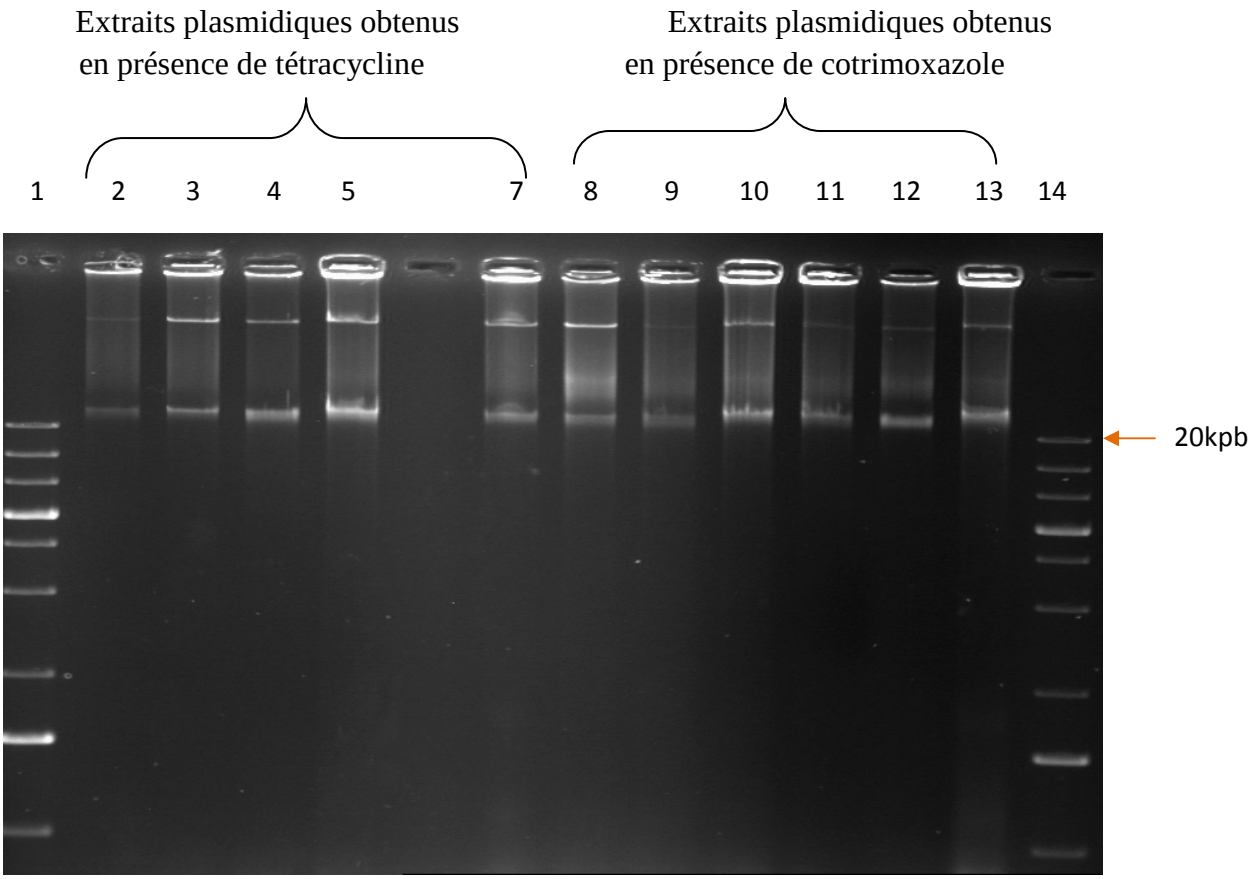


Figure 39 : Profils plasmidiques des transformants obtenus par électroporation à partir de souches d'*E. coli* producteurs de BLSE

Puits 1 et 14 : marqueur de masse moléculaire (Gène Ruler 1-kilobase DNA plus ladder Fermentas, Villebon sur Yvette, France) ;
Puits 2, 3, 4, 5, 6 et 7: Transformants tétracycline-résistants des souches E11, E48, E63, E65, E69 et E174
Puits 8, 9, 10, 11, 12 et 13 : Transformants cotrimoxazole-résistants des souches E11, E48, E63, E65, E69 et E174

1.2- Etude de la résistance aux métaux lourds

Les résultats de l'étude de la sensibilité de 215 isolats de *Escherichia coli* vis-à-vis de concentrations critiques de 7 métaux lourds ont montré que 187 (87%) isolats présentaient une tolérance ou résistance à au moins un métal. En revanche, 28 (13%) isolats se sont avérés totalement sensibles à tous les métaux lourds testés. La récapitulation de l'ensemble des résultats est présentée dans le Tableau XVII.

L'analyse par métal lourd, a révélé qu'à l'exception du cuivre, qui semble toxique pour toutes les souches, les isolats testés ont présenté une tolérance aux autres métaux lourds. En effet, une tolérance importante au zinc et au plomb a été observée avec des taux de résistance respectifs de 79,1% et 59,1%. Des taux de résistance moyens ont été constatés vis-à-vis du chrome (45,6%), l'argent (17,7%) et le cadmium (11,6 %). Le plus bas taux de résistance a été enregistré vis-à-vis du mercure (8,4%) (Tableau XVIII).

Tableau XVII : Catégories de comportement des isolats d'*E. coli* vis-à-vis des métaux lourds (n=215).

Catégories	**Nombre et pourcentage**
Nombre et pourcentage de souches sensibles	28 (13 %)
Nombre et pourcentage de souches résistantes	187 (87 %)
Nombre de métallotypes observés	29
Nombre de profils de multi-résistance	24

Tableau XVIII : Phénotypes de résistance aux métaux lourds des isolats d'*E.coli* (n=215)

Métal lourd	**Nombre et pourcentage de souches sensibles**	**Nombre et pourcentage de souches résistantes**	**Valeur de *p***
Zinc	45 (20,9%)	**170(79,1%)**	$< 2.210^{-16***}$
Plomb	88 (40,9%)	**127 (59,1%)**	$0,0001689^{***}$
Chrome	117 (54,4%)	**98 (45,6%)**	0,06687
Argent	177 (82,3%)	**38 (17,7%)**	$< 2.210^{-16***}$
Cadmium	190 (88,4%)	**25 (11,6 %)**	$< 2.210^{-16***}$
Mercure	197 (91,6 %)	**18 (08,4%)**	$< 2.210^{-16***}$
Cuivre	216 (100%)	**0%**	$< 2.210^{-16***}$

Remarque : Le Test du χ^2 de comparaison de proportions effectué pour une valeur de α égale à 5% ;
*** : valeurs très hautement significatives.

L'analyse des profils de métallorésistance a mis en évidence 29 métallotypes différents (résistance à au moins un des métaux lourds) dont 24 sont des métallotypes de multirésistance incluant 2 à 5 métaux lourds, et qui concernent 181 isolats soit 84,2 % des souches testées (Tableaux XVIII et XIX, Figure 40). L'association de trois métaux lourds prédomine avec 31,2% des souches testées. Deux métallotypes de multirésistance prédominent associant trois métaux lourds : le zinc, le plomb et le chrome (20,5%) et deux métaux : zinc et plomb (16,3%). La multirésistance associant 5 métaux lourds a été observée sur trois métalloprofils dont le profil dominant (7 souches) concerne l'association des résistances au mercure, argent, zinc, plomb et chrome (Tableau XIX). Les profils de métallorésistance par souche sont détaillés en annexe 5. Les figures 41, 42 et 43 illustrent le comportement des souches témoins de sensibilité et de certaines souches testées.

A l'exception de 29 isolats d'*E. coli*, la résistance aux métaux lourds est fréquemment associée à la résistance aux antibiotiques de l'ensemble des familles chimiques étudiées avec un trait particulier vis-à-vis des bêta-lactamines et des quinolones.

Les métallo-antibiotypes observés pour les bêta-lactamines et les quinolones détaillés par souche et par nombre d'antibiotiques et de métaux lourds sont consignés en annexe 5. Cependant, en ce qui concerne les bêta-lactamines, les résultats récapitulés par profil d'antibiotique et nombres de métallotypes associés ont montré que les profils d'*E.coli* producteurs de PHN sont prépondérants, notamment avec le profil le plus répandu qui associe les résistances aux aminopénicillines et ticarcilline avec celles aux métaux lourds (16 métallotypes associés).

Le métallotype zinc-plomb est le plus souvent associé aux souches à phénotypes PHN et BLSE (Tableaux XX et XXI, résultats détaillés en annexe 5).

Tableau XIX : Métallotypes des isolats d'*E. coli* aviaires

PROFIL	Nombre de métaux	SOUCHES	Nombre de souche
Zn	1	E26, E30, E34, E52, E75, E76, E82, E84, E115, E117, E149, E158, E159, E212, E217, E237, E243, E250, E261, E270, E282, E348	22 (10,2%)
Pb	1	E67, E92, E226, E354	4 (1,9%)
Cr	1	E210, E235, E236, E268	4 (1,9%)
Ag	1	E31, E33, E228	3 (1,4%)
Cd	1	E109	1 (0,5%)
Zn Pb	2	E8, E10, E11, E16, E48, E50, E53, E61, E65, E69, E74, E88, E90, E93, E100, E107, E114, E125, E139, E166, E179, E183, E186, E188, E216, E238, E239, E240 , E251, E274, E285, E287, E304, E340, E343	**35 (16,3%)**
Zn Cr	2	E38, E39, E41, E42, E46, E168, E191, E195, E211, E213, E229, E246, E252, E349	14 (6,5 %)
Ag Zn	2	E6, E29, E345	3 (1,4%)
Ag Pb	2	E87	1 (0,5%)
Cd Pb	2	E335, E336	2 (1%)
Hg Ag	2	E57	1 (0,5%)
Pb Cr	2	E234	1 (0,5%)
Zn Pb Cr	3	E13, E15, E20, E22, E23, E24, E43, E44, E45, E66, E73, E124, E167, E170, E173, E174, E175, E176, E184, E190, E197, E201, E214 E232, E233, E247, E249, E255, E262, E263, E266, E271, E281, E292, E299, E300, E301, E302, E312, E317, E320, E321, E322, E329	**44 (20,5%)**
Cd Zn Pb	3	E18, E21, E25, E63, E169, E177, E185, E204, E278	9 (4,2%)
Ag Zn Cr	3	E171, E227, E264	3 (1,4%)
Ag Zn Pb	3	E54, E265	2 (1%)
Ag Pb Cr	3	E338, E341	2 (1%)
Hg Ag Zn	3	E5, E83, E129	3(1,4%)
Cd Zn Cr	3	E164, E187	2 (1%)
Cd Hg Cr	3	E352	1 (0,5%)
Hg Zn Cr	3	E3	1 (0,5%)
Ag Zn Pb Cr	4	E225, E241, E258, E283, E284, E333, E337	7 (3,3%)
Cd Zn Pb Cr	4	E165, E206, E215, E269, E279, E280	6 (2,8%
Hg Ag Zn Pb	4	E86, E95, E276	3 (1,4%)
Hg Zn Pb Cr	4	E328, E330	2 (1%)
Cd Hg Ag Zn	4	E347	1(0,5%)
Hg Ag Zn Pb Cr	5	E14, E51, E59, E224, E248, E319, E334	7 (3,3%)
Cd Ag Zn Pb Cr	5	E332, E339	2 (1%)
Cd Hg Zn Pb Cr	5	E254	1 (0,5%)

Ag : Argent ; **Cd** : cadmium ; **Cr** : Chrome ; **Hg** : Mercure ; **Pb** : plomb ; **Zn** : zinc

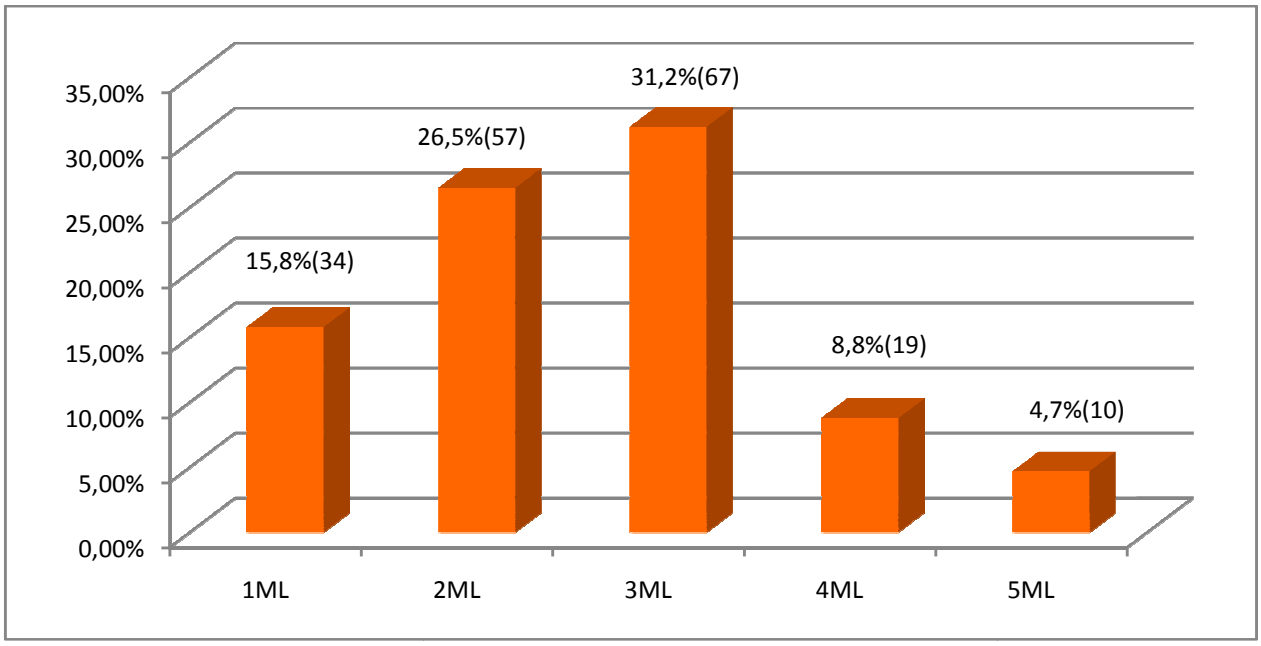


Figure 40 : Pourcentages de résistance par nombre de métaux lourds

Tableau XX : Nombre de métallotypes associés à la résistance aux béta-lactamines chez les isolats d'*E. coli*

Profil de résistance aux bêta-lactamines*		Nombre de métallotypes associés
PHN	**AMX AMP TIC**	**16**
	AMX, AMP, AMC, TIC, CZ	**8**
	AMX AMP TIC CZ	**5**
	AMX AMP AMC TIC	**10**
	AMX TIC CZ	**2**
BLSE	**AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CPO, CFM**	**1**
	AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CFM	**4**
	AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CPO	**1**
	AMX, AMP, TIC, ATM, CTX, CAZ, CPO, CFM	**1**
	AMX, AMP, AMC, TIC, ATM, CTX, CAZ, CFM	**1**
	AMX, AMP, TIC, ATM, CTX, CFM	**1**
AmpC	**AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, FOX, CTX, CAZ, CFM**	**1**
	AMX, AMP, AMC, TIC, ATM, CZ, FOX, CTX, CAZ	**1**

AMX : amoxicilline ; **AMP** : ampicilline ; **TIC** : ticarcilline ; **ATM** : azrtréonam ; **CZ** : céfazoline ; **FOX** : céfoxitine ; **CTX** : céfotaxime ; **CAZ** : céftazidime ; **CPO** : cefpirome ; **CFM** : cefixime

*****Profils classés selon leur prépondérance dans la collection de souches (décrits en tableau XI).

Tableau XXI : Métallotypes des isolats d'*E. coli* producteurs de BLSE

Métal / Souche	Cadmium 800 µg /ml	Argent 50 µg/ml	Mercure 54,3 µg/ml	Cuivre 1600µg/ml	Zinc 1600µg/ml	Plomb 3000µg/ml	Chrome 50µg/ml
E11	-	-	-	-	+	+	-
E48	-	-	-	-	+	+	-
E63	+	-	-	-	+	+	-
E65	-	-	-	-	+	+	-
E69	-	-	-	-	+	+	-
E74	-	-	-	-	+	+	-
E88	-	-	-	-	+	+	-
E165	+	-	-	-	+	+	+
E169	+	-	-	-	+	+	-
E173	-	-	-	-	+	+	+
E174	-	-	-	-	+	+	+
E190	-	-	-	-	+	+	+
E201	-	-	-	-	+	+	+
CIP	-	-	-	-	-	-	-
CIP sur milieu Minimum sans métal	+						

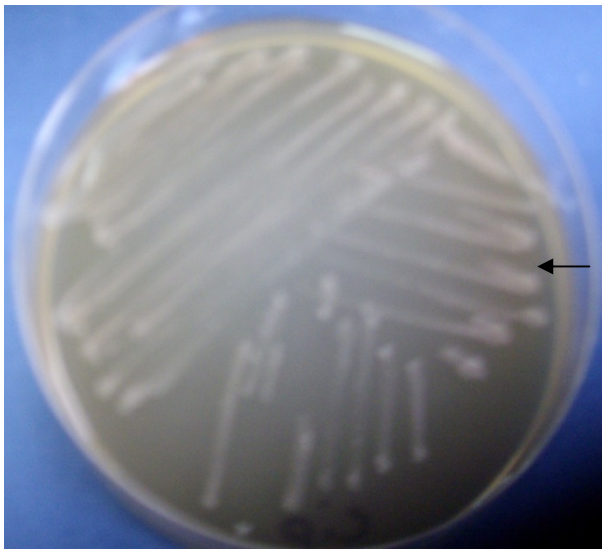
+ : croissance de l'isolat ; - : pas de croissance

Pour les quinolones, les résultats ont montré que le profil d'antibiorésistance comprenant une résistance aux 5 molécules de quinolones testées (NA, PA, CIP OFX PF) est le plus fréquemment associé aux métaux lourds avec 13 métallotypes observés. Le profil dominant associe, comme pour les bétalactamines, le zinc et le plomb (12 souches). Les résultats sont récapitulés dans le tableau XXII et détaillés en annexe 5.

Tableau XXII : Nombre de métallotypes associés à la résistance aux quinolones chez les isolats d'*E. coli*

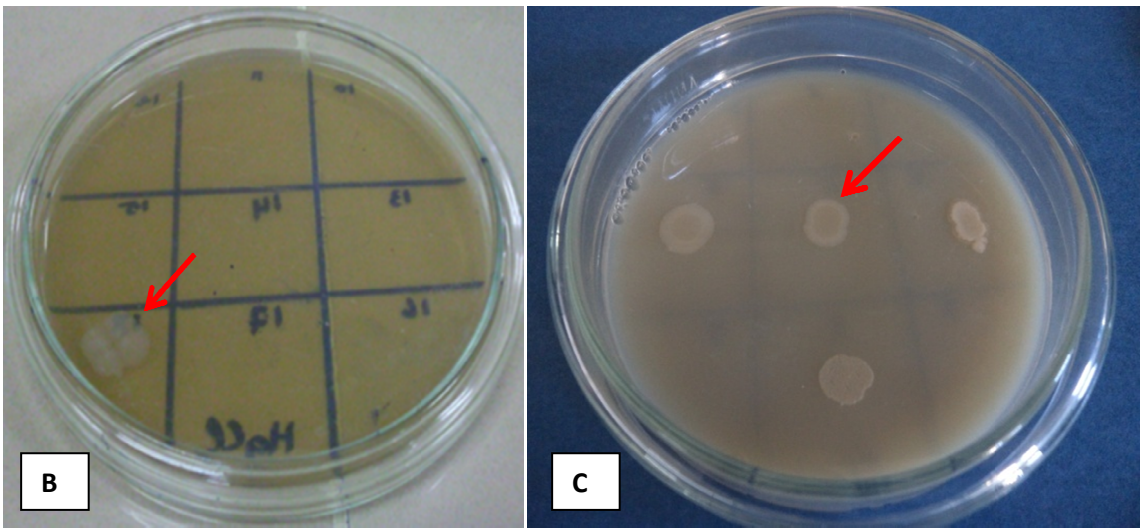
Profil de résistance aux quinolones	Nombre de métallotypes associés
NA	**12**
NA PA	**11**
NA OFX	**2**
NA PA OFX	**6**
NA PA, CIP OFX	**3**
NA PA OFX PF	**2**
NA CIP OFX PF	**1**
NA PA, CIP OFX PF	**13**

NA : acide nalidixique ; **PA** : acide pipémidique ; **CIP** : ciprofloxacine ; **OFX** : ofloxacine ; **PF** : péfloxacine



Souche CIP7624

A



B

C

Figure 41 : Croissance d'*E. coli* sur milieu minimum en présence et en absence de métal

A : Croissance de la souche *E.coli* CIP sur milieu minimum exempt de métal.
B : Croissance des isolats d'*E.coli* en présence de mercure à 54,3 µg/ml
C : Croissance des isolats d'*E.coli* en présence de plomb à 3000 µg/ml

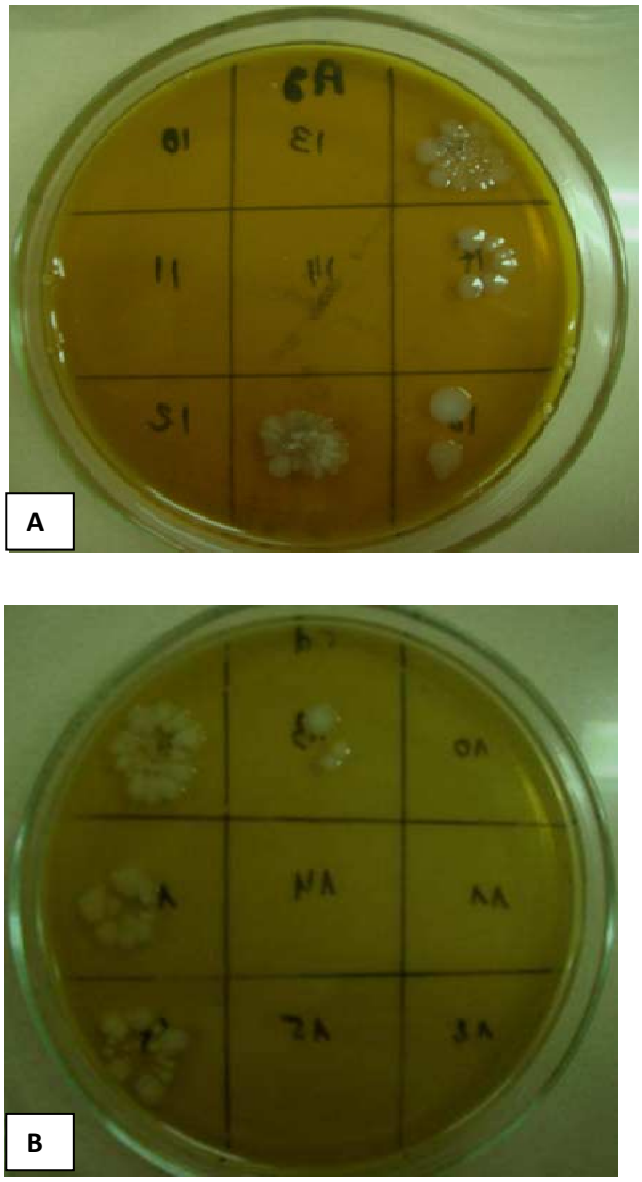


Figure 42 : Croissance des isolats d'*E. coli* en présence de métal
A : argent à 50 µg/ml ;
B : cadmium 800 µg/ml

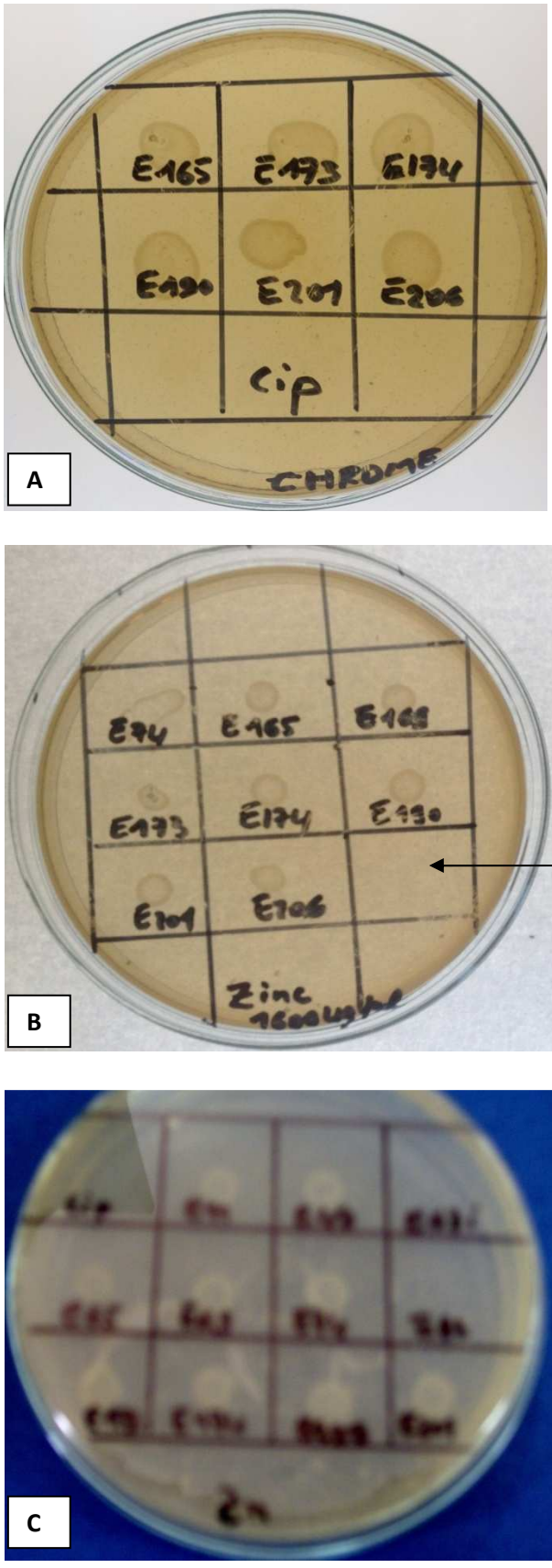


Figure 43: Croissance des souches d'*E. coli* à BLSE en présence de chrome à 50 µg/ml (A) et de zinc à 1600 µg/ml (B-C)

Le traitement statistique des donnés par ACM (analyse en composantes multiples) par le biais du logiciel R (package ade4) a permis d'établir un lien et de confirmer la correspondance entre la résistance aux antibiotiques et la résistance aux métaux lourds de l'ensemble des souches testées, ce qui suggère un effet de cosélection entre les deux types d'antimicrobiens.

Les résultats de l'ACM (figure 44 et 44 bis) font ressortir un premier plan exprimant 28% de la variabilité totale avec une valeur propre de 8,20. Nous jugeons l'information contenue sur ce plan suffisante, en dépit de faibles valeurs d'inerties qui sont en général moins intéressantes qu'en ACP (analyse en composantes principales). L'axe1 exprime le maximum de variabilité avec 20,33% ($\mu = 0,35$) suivi de l'axe2 avec une variabilité de 8,183 %.

La définition des axes est basée sur les valeurs de contribution des variables (Résistant: A ; Intermédiaire : B et Sensible : C) et des individus (les souches qui ont subi les différents traitements). Nous remarquons au final que deux axes à eux seuls expriment plus de 28% de variabilité, ce qui fait d'eux le principal support de notre interprétation.

Sur la représentation graphique, un premier plan c'est-à-dire l'axe**1** va exprimer les regroupements des variables entre elles en blocs d'affinité. Nous remarquons une forme en **U** où les deux extrémités correspondent aux caractères résistant et sensible alors que le fond du **U** représente le caractère intermédiaire. On dit alors qu'il y a un gradient qui se forme et qui va du caractère résistant vers le sensible en passant par l'intermédiaire.

Sur l'axe 2, il y a une répartition des individus en fonction des caractères qu'ils partagent à savoir la résistance, la sensibilité et l'intermédiaire, ce qui donne une allure également en U. Afin de faire une représentation qui fait interagir à la fois les individus et les variables, il est alors intéressant de superposer les deux axes. Ce plan issu de cette superposition exprimera l'expression de dépendance entre les variables et catégories.

Par ailleurs, le test du χ^2 d'indépendance a fait apparaitre des valeurs de $p \leq 0,05$, appuyant l'hypothèse d'une dépendance des variables comportement de résistance aux antibiotiques (de différentes familles) et aux métaux lourds (notamment l'argent, le zinc, le plomb et le chrome). L'ensemble des valeurs figure en annexe 6.

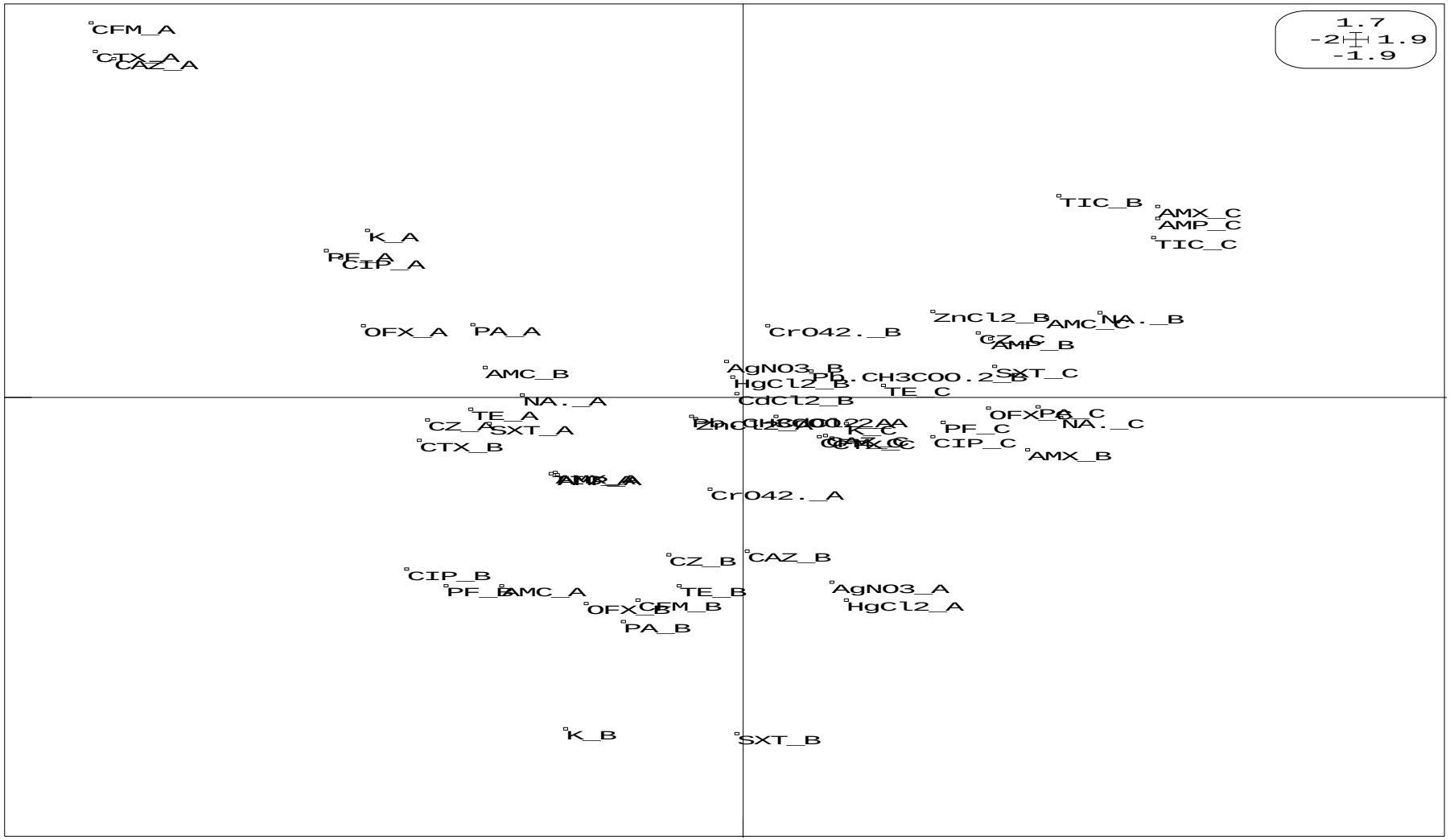


Figure 44 : Représentation graphique de l'ACM effectuée par le logiciel R (package ade4)
A : Plan F1F2 ACM variables

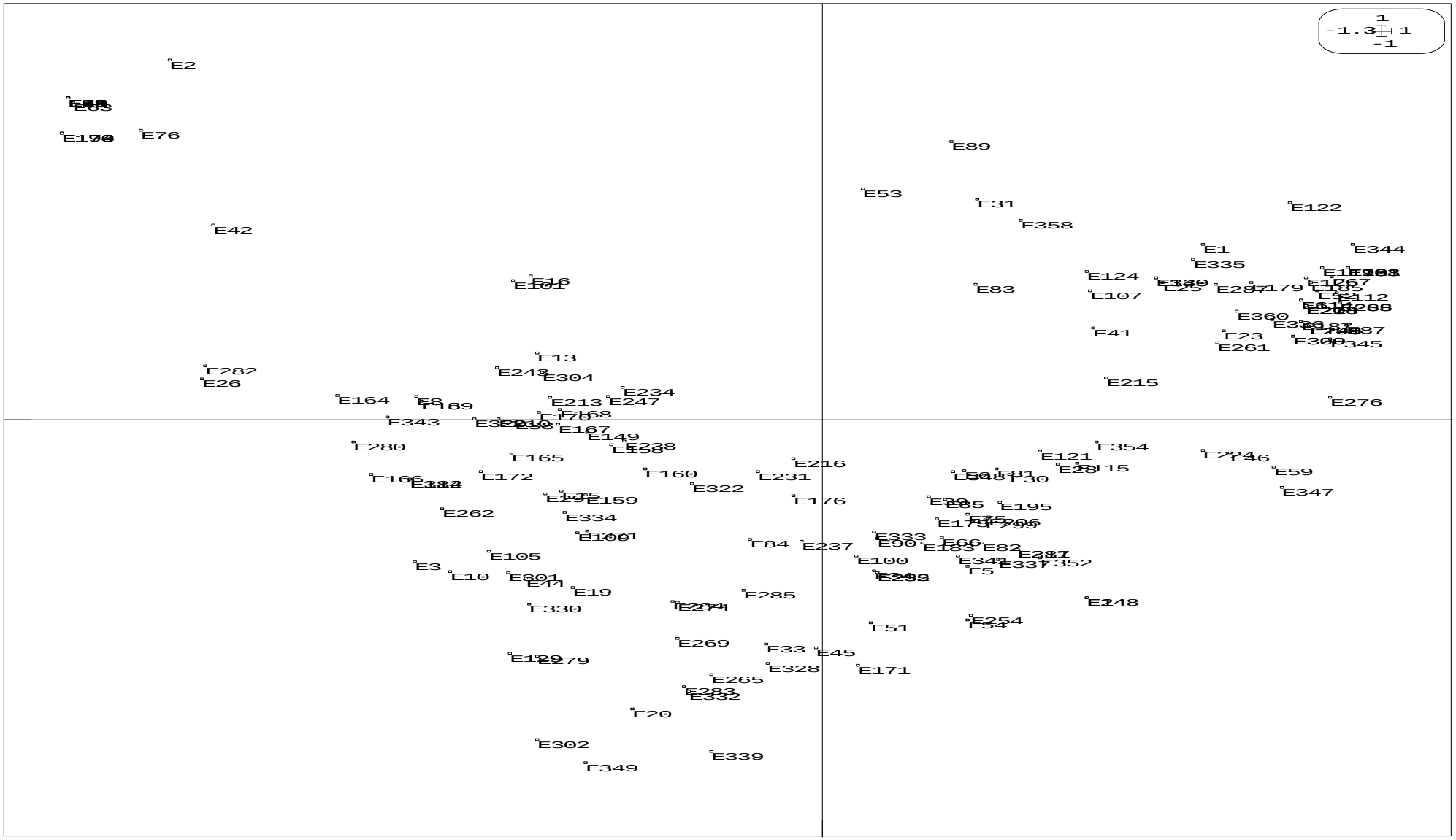


Figure 44 (bis) : Représentation graphique de l'ACM effectuée par le logiciel R (package ade4)
B : Plan F1F2 ACM Individus (souches)

Discussion

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques de 308 isolats d'*E.coli* aviaires issues de lésions de colibacillose a mis en évidence une résistance variable à différentes familles chimiques. Concernant les bêta-lactamines, à l'exception de l'imipénème actif sur tous les isolats, des taux élevés de résistance ont été observés vis-à-vis de l'amoxicilline (60,1%), l'ampicilline (60,2 %) et la ticarcilline (59,6%). Des taux moins importants (49%) de résistance à l'amoxicilline et l'ampicilline ont été signalés par HAMMOUDI et AGGAD, (2008) sur 251 souches d'*E. coli* APEC de la région Ouest. Plus récemment, toujours dans cette région et sur les APEC, AGGAD et *al.* (2010) n'ont signalé aucune résistance à l'ampicilline. Ces taux sont nettement plus élevés dans les observations de MESSAI *et al.* (2013) qui ont signalé 87,8% et 84,5% de résistance vis-à-vis de l'amoxicilline et de l'ampicilline, respectivement. Des taux élevés de résistance aux aminopénicillines ont été rapportés en Egypte (97,3%) par AHMED *et al.* (2013) sur des souches pathogènes aviaires, et récemment en Chine dans deux études de GAI *et al.* (2015) et LI *et al.* (2015) avec respectivement 66,67% et 97,7%, ainsi qu'en Iran (94%) par KAZEMNIA et *al.* (2014). En France, le rapport annuel de 2014 du réseau de surveillance de l'antibiorésistance de l'ANSES a estimé la résistance à l'amoxicilline et l'ampicilline chez les poules et poulets (toutes pathologies confondues) à 32% et 31 %, respectivement (ANSES, 2015).

Dans notre étude, l'association amoxicilline-acide clavulanique s'est avérée relativement efficace avec un taux de résistance de 27,7% ; des taux avoisinants (35,6%) ont été signalés en Egypte (AHMED *et al.,* 2013). Une tendance à la baisse a été par contre notée en France, avec seulement 5% de résistance en 2014 (ANSES, 2015).

Les céphalosporines à spectre étroit (de première et seconde génération) ont globalement montré une bonne activité avec des taux de résistance respectifs de 31,3% et 1,8% envers la céfazoline et la céfoxitine. Un tel constat a été rapporté en France dans le rapport de l'année 2014 de l'ANSES qui a signalé des sensibilités quasi-totales vis-à-vis de ces molécules. En revanche, des taux plus élevés ont été rapportés notamment en Egypte (65.8%) (AHMED *et al.,* 2013) et en Chine (61,5%) dans une étude effectuée entre 2011 et 2013 sur 130 poulets malades (CHEN *et al.,* 2014).

Les céphalosporines de troisième génération se sont avérées actives. En moyenne de faibles taux de résistance (environ 7,6%) ont été enregistrés pour les quatre molécules testées avec une légère supériorité de la céftazidime et du céfotaxime. Une nette tendance à la baisse de la résistance aux C3G a été constatée en France où le taux de résistance est passé à 5% en 2014 (ANSES, 2015). En Egypte, le taux de résistance vis-à-vis du céfotaxime de souches d'*E.coli* issues de septicémie a été de 23,3% (AHMED *et al.,* 2013) ; celui-ci a atteint en Chine une valeur de 46,2% selon l'étude de CHEN *et al.* (2014) et un taux plus élevé (58,6%), sur un total de 87 APEC isolées de cas septicémiques dans la région de Hebei (LI et *al.,* 2015).

Concernant la famille des aminosides, notre étude a mis en relief l'activité de la gentamicine (1,4% de résistance) sur la majorité des isolats. Ce taux reste également relativement modéré à l'encontre de la kanamycine (17,6%). Les taux de résistance à la gentamicine indiqués dans l'Ouest Algérien (AGGAD *et al.,* 2010) et dans la région de Sétif (MESSAI *et al.,* 2013) ont été également faibles ; ils sont compris entre 3% et 5,5%, respectivement. Dans plusieurs études effectuées en Asie, la résistance aux aminosides était significativement plus élevée. Des taux de 44,7%, 61,95% et 51,8% ont été observés vis-à-vis de la gentamicine, respectivement au Vietnam (USUI *et al.,* 2014) et en Chine (ZHANG *et al.,* 2012a ; SUN *et al.,* 2012). Des taux importants ont également été signalés dans ce continent vis à vis de la kanamycine avec 44.9% au Vietnam (USUI *et al.,* 2014) ; 78.05% dans le Nord de la Chine (ZHANG *et al.,* 2012a) et 55,8% dans la province Chinoise du Shandong (SUN *et al.,* 2012). En Europe, les aminosides demeurent un bon rempart contre la résistance des souches d'*E. coli* aviaires. En France, un faible taux de résistance estimé à 5% a été signalé par le réseau RESAPATH (Réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales) (ANSES, 2015) ; elle a été estimée à 1 à 4% globalement en Europe (de JONG *et al.,* 2012). Une recrudescence semble toutefois s'amorcer en Espagne si l'on considère le taux de 13% rapporté par SOLA-GINES *et al.* (2015).

Le principal mécanisme de résistance aux aminoglycosides est la modification de l'antibiotique par différentes classes d'enzymes (SUN *et al.,* 2012). La résistance à la kanamycine relève de l'activité APH(3')-I et APH(3')-II qui affectent également la néomycine. La résistance à la gentamicine est souvent détectée chez les entérobactéries, *Acinetobacter* et *Pseudomonas* ; l'enzyme AAC(3)-I est dans ce cas largement distribuée (NGUYEN et LAMBERT, 2012). Ce type d'enzymes a été décrit chez des souches aviaires pathogènes (WANG X. *et al.,* 2014 ; ZHANG *et al.,* 2014 ; LI *et al.,* 2015).

En ce qui concerne les quinolones, les isolats d'*E. coli* testés ont montré des niveaux de résistance élevés à l'acide nalidixique (55,2%) et à l'acide pipémidique (41,8%). Les fluoroquinolones ont été en revanche globalement plus efficaces, notamment la ciprofloxacine avec un taux de résistance de 19%. Ce même constat a été signalé dans les études de HAMMOUDI et AGGAD, (2008), AGGAD *et al.* (2010), MESSAI *et al*. (2013) et BENAMEUR *et al.* (2014) En Europe, la résistance aux quinolones semble bien maitrisée dans certains pays tel que la France avec une sensibilité de 59% vis-à-vis de l'acide nalidixique et de plus de 80% pour les fluoroquinolones (ANSES, 2015). Par contre, des taux de résistance élevés à l'acide nalidixique (72,8%) et à la ciprofloxacine (24,5%) ont été signalés en Italie par VANNI *et al.,* (2014) et en Espagne (22% pour ciprofloxacine) par de JONG *et al.* (2012). Par ailleurs, des taux de résistance très alarmants, vis-à-vis des fluoroquinolones, ont été signalés dans diverses études : une résistance complète en Egypte dans une étude de MOHAMMED *et al.* (2014) effectuée sur un lot de 96 souches APEC et des taux respectifs de 93,1% et 94,3% vis-à-vis de l'ofloxacine et de la ciprofloxacine dans une étude en Chine, effectuée sur un lot de 87 poulets atteints de septicémie (LI *et al.,* 2015). La recherche du cotransfert de la résistance aux quinolones lors

des essais de transfert par conjugaison de la résistance aux bêta-lactamines s'est avérée négative, ce qui en accord avec le caractère totalement chromosomique des mécanismes impliqués dans la résistance de haut niveau aux quinolones (mutations des topoisomérases, imperméabilité cellulaire, surexpression des systèmes d'efflux).

Notre étude a montré un niveau de résistance moyen à la tétracycline (28,4%). Un taux beaucoup plus élevé (90,35%) a été observé en Algérie dans l'étude de BENAMEUR *et al*. (2014). La tétracycline semble être l'antibiotique le moins actif, en France, si l'on tient compte du niveau de sensibilité en 2014 (55% pour *E. coli* issu de poules et poulets, toutes pathologies confondues) (ANSES, 2015). De nombreux travaux en Chine (JIANG *et al.,* 2011 ; ZHANG *et al.,* 2102b ; CHEN *et al.,* 2014 ; LI *et al.,* 2014 ; DOU *et al.,* 2016), en Egypte (AHMED *et al.,* 2013), au Zimbabwe (SAIDI *et al.,* 2012) et en Espagne (de JONG *et al.,* 2012 ; SOLA-GINES *et al.,* 2015) ont mis en évidence une résistance quasi-totale ou totale de souches APEC vis-à-vis de la tétracycline. Dans la filière aviaire, les principaux gènes déterminant la résistance à la tétracycline sont les gènes *tet*A et *tet*B codant des pompes à efflux (ZHANG *et al.,* 2012b ; AL BAHRY *et al.,* 2013).

L'association Sulfaméthoxazole-Triméthoprime s'est avérée moyennement active, avec un taux de résistance de 41,9%. Un taux similaire (42%) a été constaté dans l'Ouest Algérien à travers l'étude de HAMMOUDI et AGGAD (2008), alors qu'ils étaient plus élevés (82,2% et70,17%) respectivement pour MESSAI *et al* (2013) et BENAMEUR *et al*. (2014). En Iran, l'étude de TALEBIYAN *et al.* (2014) enregistre également un taux moyen de 39,62%. Cette association était beaucoup plus efficace en France où le réseau RESAPATH (ANSES, 2015) a enregistré une sensibilité de 81% chez des APEC. Par contre, des taux de résistance plus importants, d'environ 57%, ont été signalés dans le reste de l'Europe tels qu'en Allemagne et en Grande Bretagne (de JONG *et al.,* 2012). La résistance vis-à-vis de cette association était plus accentuée en Egypte où un taux de 82% a été successivement signalé dans les études d'AHMED *et al.* (2013) et MOHAMED *et al.* (2014). De même en Chine, des taux de 66,1 ; 81,5% % et 91%, ont été rapportés respectivement par JIANG *et al.* (2011), CHEN *et al.,* (2014) et GAI *et al.* (2015).

Les gènes de la famille *sul* (*sul1, sul2 et sul3*), dont la volaille serait un réservoir important (SOUFI *et al.,* 2011) et les gènes *dhfr* codent respectivement pour une dihydroptéroate synthétase et une dihydrofolate réductase non inhibées par les sulfamides et le trimethoprime, respectivement. Ces enzymes sont impliquées dans les voies de biosynthèse du tétrahydrofolate, précurseur des acides nucléiques (SKÖLD, 2001 ; HO *et al.,* 2009 ; KOZAK *et al.,* 2009 ; SOUFI *et al.,* 2011). Ces gènes de résistance sont souvent inclus dans les cassettes des intégrons de classe 1 (HO *et al.,* 2009 ; VASILAKOPOULOU *et al.,* 2009 ; CAVICCHIO *et al.,* 2015).

La colistine demeure une alternative thérapeutique intéressante dans la mesure où les taux de résistance globalement rapportés dans la littérature, de même que celui observé dans notre étude (0,68%), sont bas ; en effet, seuls deux de nos isolats ont montré une résistance. Ceci rejoint les observations de HAMMOUDI et AGGAD (2008), AGGAD *et al.* (2010) et

MESSAI *et al.,* (2013) signalant des taux de résistance vis-à-vis de la colistine ne dépassant pas 3% à 5,5%. En Europe, la synthèse des donnés effectuée par KEMPF et *al.* (2013) a signalé des taux de résistance très bas en Europe variant entre 0 et 0,5 %. Le taux le plus élevée a été atteint en Belgique. En revanche, le niveau de résistance à la colistine avait tendance à s'élever dans certains pays asiatiques tels que le Japon (2.3%) et la Chine (12,9%) (KEMPF *et al.,* 2013). Dans l'étude de MOHAMMED *et al.* (2014) en Egypte, 14 isolats APEC de poulets sur un total de 25 (soit 56%), se sont avérés résistants à la colistine. La colistine a récemment été réintroduite dans le circuit thérapeutique pour le traitement des bactéries Gram négatif résistantes aux carbapènèmes et a acquis un statut d'antibiotique de dernier recours dans de nombreux pays (KEMPF *et al.,* 2015 ; QUESADA *et al.,* 2015). Cependant, les bactéries peuvent devenir résistantes à la colistine par modification de leur lipopolysaccharide. En effet, les produits des gènes *pmr* (polymyxine resistance) favorisent la modification covalente du lipopolysaccharide, d'où la fixation réduite des polymyxines à la membrane externe des bactéries à Gram négatif (KEMPF *et al.,* 2015 ; QUESADA *et al.,* 2015). Par ailleurs, alors que la résistance à la colistine était jusqu'à présent exclusivement à médiation chromosomique, il a été récemment révélé l'émergence chez une souche d'*E. coli* d'origine porcine, d'une médiation plasmidique de cette résistance, *via* le gène *mcr*-1. MCR-1 est une enzyme de la famille des phosphoéthanolamine transférases, dont l'expression chez *E. coli* aboutit à l'addition du phosphoethanolamine sur le lipide A du LPS (LIU *et al.* 2015).

Dans la présente étude, la multirésistance a été fréquente Des résistances concomitantes à 2 jusqu'à 17 antibiotiques appartenant à une ou plusieurs familles chimiques (bêta-lactamines, quinolones, aminosides, tétracycline et cotrimoxazole) ont été observés. Ceci va dans le sens des observations de AGGAD *et al.,* 2010 et BENAMEUR *et al.* (2014) d'une multirésistance s'étendant à quatre familles chimiques, sur un lot de 80 APEC isolés de la région de Tiaret et à au moins 6 antibiotiques chez 28% des souches d'*E. coli*. Le même constat a été fait dans de nombreuses autres études telles que celles de HAMMOUDI et AGGAD (2008) ; AHMED *et al.* (2013) ; MOHAMED et *al.* (2014) et TALEBIYAN *et al.,* (2014). On notera en particulier, les études Chinoises de JIANG *et al*. (2011) et CHEN *et al.* (2014) qui ont révélé une résistance d'isolats APEC vis à vis de 6 et 5 classes d'antibiotiques, respectivement. Les taux de résistance (notamment vis-à-vis des bêta-lactamines) et de mutirésistance élevés chez nos souches dénotent d'une utilisation intensive ou d'un mésusage des antibiotiques en élevage et thérapie aviaire, comme le signale une abondante littérature sur l'usage des antibiotiques en élevage aviaire (SCHWARZ et CHALSUS-DANCLA, 2001 ; MELLATA *et al.,* 2013).

La production des bêtalactamases augurée par les profils de résistance constitue le principal mécanisme de résistance aux bêta-lactamines chez nos souches. En effet, un profil pénicillinase haut niveau (PHN) à large spectre a été détecté chez la majorité des isolats (n=160) avec principalement une résistance aux aminopenicillines (amoxicilline et ampicilline) et à la ticarcilline chez 65 souches. Les essais de transfert par conjugaison de l'amoxicilline, un des principaux marqueurs de ce type de mécanisme, effectués sur 18 souches, ont révélé le caractère transférable, donc à médiation plasmidique, de cette

résistance. Chez les souches PHN ayant montré une résistance étendue à la céfazoline et à l'association clavulanante-amoxicilline, le mécanisme serait dû à l'hyperproduction de pénicillinase à médiation plasmidique de type TEM-1, TEM-2 ou SHV-1 comme cela a été décrit par MARTINEZ *et al.* (1989) ; BUSH *et al.* (2001) ; MESSAI *et al.* (2006) ; BUSCH et FISHER (2011).

Le profil comprenant la résistance à la céfoxitine, à l'association amoxicilline-clavulanante ainsi qu'aux C3G, notamment au céfotaxime, détecté chez quatre souches évoque une surproduction de céphalosporinases de type AmpC (chromosomique ou plasmidique) caractérisées par l'hydrolyse des céphalosporines à spectre étendu, des céphamycines et une résistance à l'acide clavulanique (MESSAI *et al.,* 2006 ; MULVEY *et al.,* 2005). Le phénotype AmpC résulte ainsi d'une surexpression chromosomique de l'enzyme AmpC (c-AmpC) ou de l'acquisition d'un plasmide transférable codant pour le gène *ampC* (p-AmpC) (OTEO *et al.,* 2010 ; OLSEN *et al.,* 2014). En effet, *Escherichia coli* possède un gène chromosomique *ampC* à promoteur faible, ainsi qu'un atténuateur de transcription. Les souches porteuses du gène de type sauvage produisent une faible quantité d'AmpC et sont sensibles à l'ampicilline. Le promoteur de *ampC* et les régions d'atténuation sont souvent porteuses de mutations conduisant à la surproduction de l'enzyme (CARROFF *et al*., 2000 ; CORVEC *et al.,* 2002 ; CORVEC *et al.,* 2007). Ces souches surproduisant AmpC ne sont pas seulement résistantes à l'ampicilline mais ont une sensibilité généralement réduite aux céphalosporines à large spectre. Génétiquement, les mutations les plus communes sont celles qui créent un promoteur fort et des mutations qui déstabilisent l'atténuateur (CARROFF *et al*., 2000 ; CORVEC *et al.,* 2002 ; MULVEY *et al.,* 2005). Dans l'élevage aviaire en Europe, le gène $bla_{\text{CMY-2,}}$ codant pour une céphalosporinase à médiation plasmidique, est le gène le plus fréquemment détecté chez l'espèce *E. coli* (EFSA, 2011 ; BOËRJESSON *et al.,* 2013 ; CHAUVIN *et al.,* 2013 ; DIERIKX C. *et al.,* 2013 ; REICH *et al.,* 2013 ; MO *et al*., 2014). Une prévalence de 33% dans la filière aviaire a été rapportée en Europe, par EWERS *et al.* (2012). Ce gène a également été détecté en Tunisie et en Egypte (BENSALLEM *et al.,* 2012 ; AHMED *et al.,* 2013) et ailleurs dans le Monde, comme au Brésil (BOTELHO *et al.,* 2015) et au Japon (KAMEYAMA *et al.,* 2013). Cependant, des mutations du promoteur du gène *amp*C ont également été détectées chez des souches fécales d'*E. coli* (KOJIMA *et al.*, 2005).

Par ailleurs, un profil de résistance à la céfoxitine associé à une sensibilité aux C3G a été observé chez une souche ; ceci pourrait refléter une diminution de la perméabilité consécutive à une faible expression de porines (BRIAN *et al.,* 2003 ; CLARKE *et al.,* 2003 ; BOYER *et al.,* 2012). De plus amples investigations sont nécessaires pour l'élucidation des mécanismes de résistance à la céfoxitine détectés chez nos isolats.

Un profil de bêtalactamase à spectre étendu (BLSE) a été détecté sur 24 de nos isolats (7,8%), révélé par une synergie C3G/association amoxicilline-clavulanate. De hauts niveaux de résistance au céfotaxime ont été décelés chez ces souches, traduits par des CMI supérieures à 128µg/ml.

Un taux de BLSE similaire a été rapporté chez des *E.coli* aviaires pathogènes en Egypte dans l'étude de AHMED *et al.* (2013). Des prévalences plus importantes (de 12% à 59,1%) sur

des souches aviaires pathogènes ou non pathogènes ont été rapportées dans de nombreux travaux (LI *et al.,* 2010 ; RANDALL *et al.,* 2011 ; BENSALLEM *et al.,* 2012 ; TOSZEGHY *et al.,* 2012 ; ZHENG *et al.,* 2012 ; ABREU *et al.,* 2014 ; LI *et al.,* 2014).

En Algérie, les souches d'*E. coli* aviaires ont très peu été caractérisées tant sur le plan de la virulence que de l'antibiorésistance, notamment les bêtalactamases à spectre étendu (BLSE) des souches animales en général, très peu décrites jusqu'à présent. Les premiers travaux publiés ont concerné des souches d'*E. coli* pathogènes humaines (TOUATI *et al.,* 2006 *;* MESSAI *et al*., 2006 ; RAMDANI-BOUGUESSA, 2006).

L'analyse moléculaire de 11 isolats BLSE, par PCR et puces ADN, a révélé la présence d'un gène $bla_{\text{CTX-M}}$ du groupe 1. Certaines des souches possédaient également un gène de type bla_{TEM} non BLSE. Le séquençage effectué sur deux souches a mis en évidence l'allèle $bla_{\text{CTX-M-15}}$. Il est établi depuis 2001 que les BLSE les plus répandues parmi les souches humaines dans le monde sont du groupe 1 et notamment du type CTX-M-15 (PEIRANO et PITOUT, 2010), tandis que le type de BLSE le plus fréquemment détecté en filière aviaire, aussi bien chez *E. coli* que chez *Salmonella,* est CTX-M-1 (EFSA, 2011; CHAUVIN *et al.,* 2013 ; GRAMI *et al.,* 2013; OLSEN *et al.,* 2014).

Si CTX-M-15 a été communément rapporté chez les souches cliniques et environnementales en Algérie (TOUATI *et al.,* 2006 *;* MESSAI *et al*., 2006 ; RAMDANI-BOUGUESSA, 2006 ; ALOUACHE *et al*., 2011; ANSSOUR *et al.,* 2014 ; YAHIAOUI *et al.,* 2015) par contre, c'est la première, dans cette présente étude, que CTX-M-15 a été rapporté sur des souches animales, en Algérie.

A travers le monde, la présence de CTX-M-15 dans la filière aviaire a été rapportée chez des isolats intestinaux d'*E. coli* en Belgique (SMET, 2008), en Chine (LI L. *et al.,* 2010; LI J. *et al.,* 2010 ; ZHENG *et al.,* 2012), en Grande Bretagne (RANDALL *et al.,* 2011), au Japon (HIROI *et al.,* 2012 ; SHAHADA *et al.,* 2013) et en Tunisie (MAAMAR *et al.,* 2016). Cette BLSE a également été rapportée dans la viande de poulet au détail (LEVERSTEIN-VAN HALL *et al.,* 2011), chez des poulets malades (RANDALL *et al.,* 2012), notamment atteints de colibacillose (LI *et al.,* 2015) et des poulets sains (TOSZEGHY *et al.,* 2012 ; TONG *et al.,* 2015).

Il est aussi important de signaler que le variant CTX-M-15, prépondérant en milieu clinique, reste relativement peu fréquent chez les souches animales (FISCHER *et al.,* 2014) ; par conséquent, sa présence chez toutes nos souches, de différents élevages, sites et années, laisse suggérer une endémicité de cette BLSE, à l'instar de ce qui a été déjà signalé en Algérie chez les souches cliniques humaines hospitalières et communautaires (TOUATI *et al.,* 2006 ; MESSAI *et al*., 2006 ; RAMDANI-BOUGUESSA, 2006 ; YAHIAOUI *et al.,* 2015). A cet effet, une analyse plus approfondie du fond génétique de nos souches nous renseignerait sur une éventuelle relation phylogénétique entre les souches animales et humaines, indicatrice d'une transmission animal-homme.

Le groupage phylogénétique des 11 souches BLSE a permis de les assigner au phylogroupe D. Il est globalement admis que les souches d'*E.coli* pathogènes extraintestinales humaines (ExPEC) appartiennent aux groupes phylogénétiques B2 et D alors que les souches

commensales et de l'environnement sont du groupe A et B1 (JOHNSON *et al.,* 2001; CARLOS *et al.,* 2010 ; CHAUDHURI et HENDERSON, 2012 ; MELLATA, 2013).

Selon JOHNSON *et al.* (2008b), HUSSEIN *et al.* (2013) ainsi que BARBIERI *et al.* (2015), les APEC sont majoritairement du groupe B1, A et D.

A notre connaissance, l'une des premières mises en évidence du gène *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ chez des isolats d'*E. coli* du groupe D responsables de colibacilloses aviaires a été rapportée au Japon par ASAI *et al.* (2011). Des isolats du groupe D multi-résistants ont également été rapportés en Egypte (HUSSEIN *et al.,* 2013) sur des APEC à l'origine de colisepticémie, en Iran (SALEHI et GHANBARPOUR, 2010) et en Chine (WANG *et al.,* 2010). Il est à noter que BRANGER *et al.* (2005) ont signalé que les *E. coli* à CTX-M émergeant chez les ExPEC appartenaient au groupe D et qu'elles étaient fréquemment résistantes aux fluoroquinolones.

Il est également établi que les souches d'*E. coli* aviaires appartiennent principalement aux sérogroupes O1, O2, O18 et O78 (LA RAGIONE et WOODWARD**,** 2002 ; EWERS *et al.,* 2004 ; MELLATA *et al.,* 2013 ; WANG S. *et al.,* 2014 ; DOU *et al.,* 2016) ; cependant le sérotypage de nos souches ciblant ces sérogroupes à été négatif. L'appartenance des souches APEC, dont celles du groupe D, à d'autres sérogroupes n'est pas à exclure et a été décrite dans de nombreuses études, particulièrement pour les sérogroupes O5, O6, O7, O8, O9, O11, O15, O19, O20, O25, O26, O35, O36, O54, O65, O68 O73, O88, O92, O100, O101, O103, O106, O108, O109, O111, O115, O120, O150, O153 et 0156 (DIAS da SILVEIRA *et al.,* 2002 ; WANG et *al.,* 2010 ; MALUTA *et al.,* 2014).

Contrairement à ce qui est le plus souvent observé (TOSZEGHY *et al.,* 2012 ; CHAUVIN *et al.,* 2013 ; LI *et al.,* 2015 ; TONG *et al.,* 2015), il est remarquable que pour la majorité de nos 11 isolats, la résistance aux C3G médiée par une BLSE de type CTM-15, ne semble pas transférable aussi bien par conjugaison que par électroporation. Cette particularité a été observée par RANDALL *et al.* (2011) et FISCHER *et al.* (2014) sur des souches non pathogènes de volailles et par MESSAI *et al.* (2008) sur des souches CTX-M-15 humaines. Ce phénomène est sans doute lié à la présence de gène sur le chromosome, comme cela a été mis en évidence chez des souches d'*E. coli* pathogènes humaines dans les études de GALANI *et al.* (2006) ; COQUE *et al.* (2008) ; CERQUETTI *et al.* (2010) ; HIRAI *et al.* (2013); RODRIGUEZ *et al.* (2014) et des souches intestinales aviaires (SHAHADA *et al.,* 2013 ; FISCHER *et al.,* 2014). De tels réarrangements de CTX-M15 sur le chromosome ont également été investigués sur des souches de *Salmonella enterica* sérotype Concord (FABRE, 2009), des souches cliniques de *Klebsiella pneumoniae* (COELHO *et al.,* 2010), de *Proteus mirabilis* (SONG *et al.,* 2011 ; MAHROUKI *et al.,* 2012) et de *Morganella morganii* (MAHROUKI *et al.,* 2012). Des réarrangements similaires sur le chromosome ont été décrits pour d'autres variants CTX-M tels que CTX-M-14, CTXM-9 et CTX-M-51 chez des souches cliniques d'*E. coli* (KIM *et al.,* 2011 ; RODRIGUEZ *et al.,* 2014) et CTX-M-2 associé à la résistance aux quinolones chez des souches intestinales de poulets sains (FERREIRA *et al.,* 2014). Ces réarrangements sont liés au fait que CTX-M-15 est associé aux séquences d'insertion IS*Ecp1*, localisées en amont du gène, très efficaces en termes de mobilisation et d'expression. Elles permettent

la transposition de ce gène et ont certainement contribué à sa grande dissémination en particulier via les plasmides du groupe IncF (ECKERT *et al.,* 2006; El HANY, 2012 ; D'ANDREA *et al.,* 2013 ; LAHLAOUI *et al.,* 2014), voire à son intégration dans le chromosome (COQUE *et al.,* 2008 ; POIREL *et al.,* 2008 ; FISCHER *et al.,* 2014 ; ZURFLUH *et al.,* 2015). Malgré que les enzymes CTX-M soient principalement plasmidiques, il apparait que des gènes *bla*$_{CTXM}$ localisés sur le chromosome ont également été décrits et que ce phénomène ne parait pas aussi rare que l'on pourrait penser (RODRIGUEZ *et al.,* 2014). Dans ce cas, la localisation sur le chromosome renforcerait la stabilité et la maintenance du gène dans la bactérie même en absence de pression de sélection et sa dissémination sera de type clonal (RODRIGUEZ *et al.,* 2014).

L'analyse électrophorétique des extraits plasmidiques des 11 souches BLSE a révélé des profils plasmidiques identiques augurant du caractère clonal de ces souches. Nos isolats hébergeaient de grands plasmides de plus de 20Kb et de petits plasmides dont la taille va jusqu'à moins de 1,5kb. Les résultats du replicon typing ont montré que toutes ces souches possédaient un réplicon de type IncF, ainsi que IncFIB pour certaines. Un des traits caractéristiques des APEC est leur possession de grands plasmides pouvant coder pour des gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques (JOHNSON et NOLAN, 2009 ; JOHNSON *et al.,* 2012 ; OLSEN *et al.,* 2012) dont la taille varie entre 30 et 200kb (RODRIGUEZ *et al.,* 2014 ; YANG *et al.,* 2015). De plus, les types de réplicons les plus fréquemment détectés chez les entérobactéries portant des résistances aux antibiotiques sont IncF, A/C, L/M, I1, HI2 et N (CARATTOLI, 2009 ; ZURFLUH, *et al.,* 2015). Le groupe IncF est potentiellement le contribuant majeur dans la diffusion, à travers le monde, de différents gènes de résistance (CARATTOLI, 2009 ; OLSEN *et al.,* 2012 ; KILLANI *et al.,* 2015). Les plasmides IncF sont souvent des plasmides à faible nombre de copies pouvant contenir plus d'un réplicon (FII, FIA et FIB) promouvant la réplication (COQUE *et al.,* 2008 ; CARATTOLI *et al.,* 2009 ; CARATTOLI *et al.,* 2013 ; RODRIGUEZ *et al.,* 2014 ; YANG *et al.,* 2015). De même, selon JOHNSON et NOLAN (2009), les plasmides codant pour des traits associés à la virulence appartiennent quasi exclusivement au groupe IncF. COQUE *et al.* (2008) ont souligné que les plasmides IncF constituent une famille hétérogène et largement diffusée chez *E.coli*, pouvant acquérir le gène *bla* $_{CTX-\ M15.}$ Selon ces auteurs, les plasmides *bla*$_{CTX-M15}$ négatifs mais avec ce gène localisé dans le chromosome suggèrent aussi un échange dynamique entre le chromosome et les plasmids résidents. De même des évènements de recombinaison entre plasmides IncF sont fréquents et pourraient avoir contribué à leur grande diversité (contenu en réplicons variables, gènes d'antibirésistance, taille…), leur évolution et leur persistance dans diverses lignées d'*E.coli* (COQUE *et al.,* 2008).

Nos résultats ont également révélé que pour ces mêmes 11 isolats BLSE, la résistance à la tétracycline et au cotrimoxazole s'est avérée transférable et portée par de grands plasmides (plus de 20kb). Ceci va dans le sens de diverses études, notamment sur des souches d'*E. coli* aviaires pathogènes ou commensales, qui rapportent que les plasmides de la famille

IncF peuvent intégrer et transférer des gènes de résistance de diverses classes d'antibiotiques, à savoir les tétracyclines, sulfaméthoxazole, aminosides, quinolones et chloramphénicol (BORTOLAIA *et al.,* 2010 ; TOSZEGHY *et al.,* 2012 ; LIAO *et al.,* 2013 ; LIU *et al.,* 2013 ; LI *et al.,* 2015 ; YANG *et al.,* 2015 ; ZURFLUH, *et al.,* 2015).

Nous avons signalé plus haut, l'absence du cotransfert de la résistance aux quinolones avec le phénotype PHN et de son non transfert lors des essais sur les souches BLSE conforte son caractère chromosomique. Le séquençage des gènes cibles des fluoroquinolones a mis en évidence, chez 2 isolats BLSE, la présence de plusieurs mutations dans les QRDR (quinolone resistance determining region) dans les gènes de la sous-unité GyrA de l'ADN gyrase et des sous-unités ParC et ParE de la topoisomérase IV. Les mutations détectées étaient pour GyrA: Ser83Leu et Asp87Asn, pour ParC: Ser80Iso et pour ParE: Ala458Ser. La résistance de haut niveau aux fluoroquinolones observée chez nos isolats BLSE peut être inhérente aux différentes mutations dans les gènes gyrA et parC (GIRAUD *et al.,* 2001 ; ZHAO *et al.,* 2005 ; PATERSEN *et al.,* 2006). En effet, UCHIDA *et al.* (2010) et ABDI-HACHESOO (2013) signalent qu'au moins trois mutations sont nécessaires dans l'ADN gyrase ou la topoisomérase IV pour générer des résistances aux fluoroquinolones, avec Ser83Leu, Asp87Asn sur GyrA et Ser80Iso sur ParC comme mutations les plus efficaces ; elles sont par ailleurs communément retrouvées. La mutation additionnelle Ala458Ser sur ParE a été associée à des niveaux élevés de résistance à la ciprofloxacine chez des isolats cliniques humains (SOLOZANO, 2007 ; MORGAN *et al.,* 2009 ; MOON *et al.,* 2010 ; UCHIDA *et al.,* 2010) et d'origine animale, souvent aviaire (YANG *et al.,* 2004 ; LEE *et al.,* 2005 ; ZHAO et *al.,* 2005 ; KARCZMARCZYK *et al.,* 2011 ; ABDI-HACHESOO *et al.,* 2013 ; VANNI et *al.,* 2014).

La résistance simultanée aux céphalosporines à spectre étendu et aux fluoroquinolones chez les *E. coli* pathogènes aviaires est relativement rare ; mais, elle a toutefois été rapportée en Italie sur des souches intestinales produisant les variants CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-14 ou SHV-12 (GIUFRE *et al.,* 2012). En Grande Bretagne, des BLSE CTX-M-1 et CTX-M-14 associées à des mutations sur GyrA ont été décelées sur des isolats intestinaux de dindes (RANDALL *et al.,* 2013). Elle a également été détectée en Chine sur des souches intestinales combinant des gènes bla_{TEM206}, $bla_{CTX\text{-}M}$ avec le déterminant plasmidique qnrS parfois associé au gènes aac(6')-1b-cr (aminoglycoside 6'N acetyltransférase type1b Cr) (LI *et al.,* 2014). Une étude sur des isolats d'*E. coli* issus de carcasses de poulets a permis de déceler 6 sub-types de BLSE CTX-M associées à une résistance aux fluoroquinolones due à des mutations QRDR combinées à l'acquisition de gènes PMQR (oqxAB, aac(6')-Ib-cr, qnrS1 et qnrS2) (LIN *et al.* (2010). De même, des souches issues de colibacillose recelant l'association de différents mécanismes de résistance aux fluroquinolones, modification de cibles et gènes PMQR, ont été détectés en Chine (XIE *et al.,* 2014). Dans le même sens, AHMED *et al.* (2013) en Egypte et LI *et al.* (2015) en Chine ont décrit des souches possédant différentes bêtalactamases dont des BLSE, incluant CTX-M-15, associées à des gènes PMQR (gènes plasmidiques de résistance aux quinolones).

Le typage moléculaire par RFLP/PFGE effectué sur nos 11 isolats BLSE, résistants simultanément aux C3G, aux fluoroquinolones, à la tétracycline et aux aminosides (kanamycine), a révélé une similitude de leurs pulsotypes, en accord avec ce qui a été observé au niveau des profils plasmidiques. Ceci est indicatif d'une relation clonale entre nos isolats et donc d'une dissémination clonale de la résistance, notamment de $bla_{\text{CTX-M-15}}$, ceci est d'autant plus vraisemblable que les souches proviennent de prélèvements effectués sur différents élevages et sur différentes années.

L'existence ou l'émergence de clones chez les ExPEC a été souvent décrite dans la littérature. C'est le cas du clone multirésistant pandémique uropathogène humain *E. coli* B2:O25:H4-ST131 exprimant CTX-M-15 souvent associé à la résistance aux fluoroquinolones (CLERMONT *et al.,* 2008 ; RODRIGUEZ *et al.,* 2014 ; MATHERS *et al.,* 2015 ; ZURFLUH *et al.,* 2015) et récemment retrouvé dans des cas de colisepticémie aviaire (BARBIERI *et al.,* 2015) ; du clone humain majeur ST38 (groupe D) responsable de la dissémination de CTX-M-15 et CTX-M-14 (COQUE *et al.,* 2008 ; RODRIGUEZ *et al.,* 2014). Un clone virulent pandémique *E. coli* ST405-O102:H6-D a émergé et propagé le variant CTX-M-15 entre l'homme, les oiseaux sauvages, les animaux de compagnie et l'environnement (NASEER et SUNDSFJORD, 2011 ; SCHAUFLER *et al.,* 2016). RODRIGUEZ *et al.* (2014) ont décrit une localisation chromosomique de CTX-M-15 chez ce nouveau clone. Avec le clone *E.coli* ST131, deux autres clones multirésistants (ST69 et ST23) ont été souvent isolés de sources non humaines incluant les animaux d'élevage, de compagnie, l'eau et les aliments (WOODFORD *et al.,* 2011). Sur au moins 8 pays de l'est asiatique, USCHIDA *et al.* (2010) ont décelé un clone clinique humain d'*E. coli* résistant à la ciprofloxacine et contenant de multiples mutations QRDR. Dans cette région du monde (en Inde), une étude récente détecté chez le poulet une lignée commune de souches intestinales d'*E. coli* productrices de BLSE de type CTX-M (KAR *et al.,* 2015). En grande Bretagne, RANDALL *et al.* (2013) ont détecté, sur 27 élevages de canards, une relation clonale entre des isolats intestinaux persistants d'*E. coli* porteurs de CTX-M-1 et CTX-M-14 et de la résistance à la ciprofloxacine. De même deux clones *E. coli* CC10 et CC23 appartenant au groupe phylogénétique A et résistants à la ciprofloxacine ont été dépistées en Italie, simultanément chez l'Homme et dans la filière aviaire (GIUFRE *et al.,* 2012).

Comme évoqué précédemment, la caractérisation moléculaire de nos souches productrices de BLSE, a mis en exergue une relation clonale entre les isolats analysés n'excluant pas ainsi l'hypothèse d'une transmission verticale de ce trait de résistance notamment à travers la pyramide de production, souvent même sans pression de sélection (CHRISTENSEIN *et al.,* 2003 ; GIOVANARDI *et al*., 2005 ; PATERSEN *et al.,* 2006 ; BORTOLAIA *et al.,* 2010 ; DIERIKX C.M. *et al.,* 2013 ; INGRAM *et al.,* 2013 ; NILSSON *et al.,* 2014). Par ailleurs la transmission horizontale via divers éléments génétiques mobiles pourrait concerner d'autres phénotypes de résistance telle que la résistance aux aminopénicillines, la tétracycline et le cotrimoxazole (CARATTOLI *et al.,* 2009 ; BORTOLAIA *et al.,* 2010 ; STOKES et GILLINGS, 2011 ; HUSSEIN *et al.,* 2011 ; WOODFORD *et al.,* 2011 ; TOSZEGHY *et al.,* 2012 ; AHMED *et al*., 2013 ; CARATTOLI *et al.,* 2013, RANDALL *et al.,* 2013).

L'usage abusif et inopportun des antibiotiques reste un facteur déterminant dans l'émergence et la diffusion de la résistance par la pression de sélection et promotion des échanges génétiques (EL RAMI *et al.,* 2012). Ainsi, cet état de fait pose le problème de la menace d'un potentiel risque zoonotique (EWERS et *al.,* 2012 ; GIUFRE *et al.,* 2012 ; AHMED *et al*., 2013 ; HUSSEIN *et al.,* 2013 ; FICSHER *et al.,* 2014). En effet, la littérature a largement rapporté que la production animale notamment aviaire serait un important réservoir de gène de résistance permettant la transmission entre animaux ou de l'animal à l'Homme (SCHROEDER *et al.,* 2004 ; FABREGA *et al.,* 2008 ; VASILAKOPOULOU *et al.,* 2009 ; BORTOLAIA *et al.,* 2010 ; LEVERSTEIN-VAN HALL *et al.,* 2011 ; EWERS *et al.,* 2012 ; GIUFRE *et al.,* 2012 ; JOHNSON *et al.,* 2012 ; MANGES *et al.,* 2012 ; MORA *et al.,* 2013 ; CHANTZIARAS *et al.,* 2014).
Par ailleurs, le phénomène de cosélection de la résistance, également largement documenté doit être évoqué. En effet, cette cosélection liée à la communauté de support génétique des caractères de résistance peut se produire via les antibiotiques (FRIMODT-MØLLER et KOLMOS, 2011 ; INGRAM *et al.,* 2013 ; ZHU *et al.,* 2013 ; DENG *et al.,* 2015), les métaux lourds (BAKER-AUSTIN *et al.,* 2006 ; SEILER et BERENDONK, 2012 ; ZHU *et al.,* 2013 ; GULLBERG *et al.,* 2014 ; BECERRA-CASTRO *et al.,* 2015) ou les antiseptiques et désinfectants (POOLE *et al.,* 2002 ; MULLAPUDI *et al.,* 2008 ; WALSH et FANNING, 2008 ; OOSTERIK *et al.,* 2014).

Dans ce contexte, notre étude a également porté sur la tolérance de nos souches d'*E. coli* aviaire à 7 métaux lourds. A l'exception du cuivre, nos observations ont fait apparaitre des résistances et tolérances importantes des isolats, particulièrement vis-à-vis du zinc, du plomb et du chrome. Une tolérance moindre a été constatée vis-à-vis de l'argent, du cadmium et du mercure.

La plupart des descriptions de la résistance aux métaux lourds chez les bactéries concerne des souches provenant de l'environnement. De même, toute comparaison avec d'autres travaux reste difficile, du fait de la différence d'origine des souches, des seuils de concentrations, de la méthodologie et des normes de résistance ou de sensibilité adoptées. Toutefois, toutes proportions gardées, des souches à Gram positif et à Gram négatif résistantes à des teneurs de 100 à 1500 µg/ml de zinc et d'autres métaux lourds ont été isolées des eaux usées de Oued El Harrach dans l'étude de BENMALEK *et al.* (2012). Ces souches se sont avérées résistantes également aux antibiotiques. Ces auteurs ont également détecté des souches de *Klebsiella* et *Pseudomonas* isolées d'effluents hospitaliers tolérant des concentrations de 250 à 950 µg/ml de cadmium et corésistantes au zinc et au mercure (BENMALEK *et al.,* 2014). HABI et DABA (2009) ont détecté des entérobactéries d'eaux de surface de la région de Sétif résistantes à des concentrations critiques de 8 ; 32 et 4096 µg/ml de mercure, cadmium et plomb, respectivement. Ces souches étaient également résistantes à différents antibiotiques dont la tétracycline. Des coliformes fécaux isolés d'eaux usées d'abattoirs au Kenya, ont montré des résistances au zinc à un seuil maximal de 10mM, au plomb et au nickel à un seuil de 15mM, au mercure à 1mM, au cuivre et au cobalt à 10mM. Un taux de 11% de ces souches ont présenté des métallotypes associant jusqu'à

5 métaux et 7 types de familles d'antibiotiques (ATIENO *et al.,* 2013). De même, une étude Indienne effectuée par sur des isolats d'*E. coli* provenant d'eaux usées issues d'un hôpital a montré que ces isolats toléraient des concentrations de cadmium et de chrome de 100 à 1600 µg/ml (ALAM et IMRAN, 2014). Diverses autres études ont fait également mention de bactéries à Gram négatif tolérantes au cadmium isolées du sol (ABDELATEY *et al.,* 2011) ; de sols agricoles en Inde irrigués avec des eaux usées avec des résistance à 50 µg/ml de mercure, 200 µg/ml de cadmium, 1600 µg/ml de zinc, 2400 µg/ml de plomb, 800 µg/ml de chrome, 1600 µg/ml de cuivre et de nickel, et ce, avec 38,2% des souches résistantes simultanément à des combinaisons de 6 métaux (AHEMAD et ABDEL MALIK, 2014).

A partir de l'eau de mer (de la baie Iskenderun bay en Turquie), des bactéries à Gram négatif se sont avérées résistantes à des teneurs de 3200 µg/ml de plomb, de plus de 3200 µg/ml de chrome et de zinc et à un ensemble d'antibiotiques dont la céfazoline, le nitrofurane, le cefuroxime et le triméthoprime–sulfaméthoxazole (MATAYAR *et al.,* 2010). Par ailleurs, des souches d'*E. coli* humaines responsables de diarrhée, portant des BLSE de type CTX-M et le gène *sil*E de la résistance à l'argent ont présenté des CMI dépassant 512 µg/ml (SÜTTERLIN *et al.,* 2014).

La résistance bactérienne vis-à-vis du mercure est sans doute l'une des premières résistances aux métaux lourds signalée dans la littérature et ce, dès les années 70. C'est le cas des travaux de NAKAHARA *et al*. (1977) qui ont enregistré une résistance de *Pseudomonas aeruginosa* à une concentration de 10µg/ml pour le $HgCl_2$. Une étude réalisée par CARDONHA *et al*. (2005) a permis de noter une résistance de 18,4% de souches à une concentration de 50µg/ml du chlorure de mercure. POIATA *et al*. (2000) ont étudié la résistance de 363 souches d'entérobactéries vis-à vis du mercure ; 29,2% des souches se sont avérées résistantes. De même, les travaux de LIMA-BITTENCOURT (2007) rapportent un taux de 61% de résistance. Une étude récente effectuée en Egypte par HELAL El-SAYED *et al.* (2016) sur des effluents industriels a détecté des bactéries à Gram négatif du genre *Acinetobacter* montrant une résistance élevée au mercure (75-100 µg/ml), ainsi qu'au cadmium, plomb et chrome à des teneurs respectives de 200 µg/ml ; 125-175 µg/ml et 200-250 µg/ml.

L'analyse des profils de métallorésistance a montré que la résistance de nos isolats d'*E. coli* aux métaux testés comprend souvent le chlorure de zinc. De plus, le métallotype le plus observé est celui avec une résistance simultanée au Zn, Pb et Cr, ce qui augure d'un support génétique commun de la résistance aux métaux lourds chez ces souches. En effet, il est établi à travers de nombreux travaux sur les entérobactéries, y compris d'origine animale (DENG *et al.,* 2015), que les gènes de résistance aux métaux sont souvent portés par des plasmides souvent transférables, des transposons, en particulier le transposon Tn21 chez les APEC qui code pour la résistance au mercure (BASS *et al.,* 1999), et des intégrons (POHL *et al.,* 1977 ; FOSTER, 1983 ; BASS *et al.*1999 ; CABALLERO-FLORES *et al.,* 2012 ; DENG *et al.,* 2015). Ainsi, il suffirait qu'une concentration sélectrice d'un seul métal soit atteinte pour maintenir la présence d'un plasmide responsable d'une multirésistance.

De récentes études telles celles de GULLBERG *et al.* (2014) et CHEN *et al.* (2015) avancent que les concentrations subinhibitrices d'antibiotiques et de métaux lourds

contribuent à la co-sélection de gènes de résistance. Les faibles concentrations d'antibiotiques et de métaux lourds présents dans des environnements externes pollués et chez les animaux et les humains traités pourraient permettre la sélection et l'enrichissement des bactéries avec des plasmides de multirésistance, ce qui contribuerait à l'émergence, l'entretien et la transmission de la résistance aux antibiotiques aux bactéries pathogènes (GULLBERG *et al.*, 2014). En agriculture, il faut savoir que le zinc et le cuivre sont utilisés comme promoteur de croissance dans les élevages et comme protection contre la diarrhée (JACOB *et al.*, 2010 ; BEDNORZA *et al.*, 2013 ; YAZDANKHAH *et al.*, 2014). Diverses études ont dans ce contexte, établi le pouvoir sélecteurs de ces métaux (JACOB *et al.*, 2010 ; SILVEIRA *et al.*, 2013 ; HOBMAN et CROSSMAN, 2014 ; BECERRA-CASTRO *et al.*, 2015) et de celui du mercure (SKURNIK *et al.*, 2010).

Nos résultats ont montré que les antibiotiques les plus souvent associés aux métaux lourds sont principalement les bêta-lactamines, l'association sulfométoxazole-triméthoprime et la tétracycline. Les profils PHN et BLSE sont en majorité associés simultanément au zinc et au plomb et dans une moindre mesure à l'association zinc, plomb et chrome. Le même constat a été fait pour les profils de résistance aux quinolones.

L'analyse statistique a clairement établi une correspondance entre l'antibiorésistance et la métallo-résistance chez nos souches, ce qui laisse supposer un phénomène de cosélection probablement dû à une communauté de support génétique.

La littérature a amplement fait référence à l'association des métaux lourds à divers antibiotiques en particulier de la famille des bêta-lactamines, des sulfamides, des aminosides et des quinolones (ciprofloxacine, en particulier) (BASS *et al.*, 1999 ; POIATA *et al.*, 2000 ; KARBASIZAED *et al.*, 2003 ; MATYAR *et al.*, 2008 ; BEAN, *et al.*, 2009 ; DEVIKA *et al.*, 2013 ; ALAM et IMRAN, 2014 ; BENMALEK *et al.*, 2014 ; MAO *et al.*, 2015). Ainsi, il est souvent établi à travers de nombreux travaux que la résistance bactérienne aux antibiotiques est fortement corrélée à la résistance aux métaux lourds (GULLBERG et *al.*, 2014 ; MAO *et al.*, 2015 ; HELAL El-SAYED *et al.*, 2016) et aux biocides (PAL *et al.*, 2014). L'étude de MAO *et al.* (2015) a par exemple mis en évidence une corrélation entre la présence des gènes *tet* de la résistance aux tétracyclines et la présence de concentrations élevées en métaux lourds dont les mécanismes de résistance, telles que les pompes à efflux, sont similaires. Les travaux de PAL *et al.* (2015) ont démontré que sur 4582 séquences plasmidiques analysées, les gènes de résistances aux antimicrobiens (antibiotiques, métaux lourds et biocides) étaient plus communs sur les plasmides de souches humaines et d'animaux domestiques que sur ceux de souches de l'environnement. De même, une forte corrélation a été établie par ROSEWARNE *et al.* (2010) entre la présence d'intégrons de classe 1 chez des *Proteobacteria* de bassins d'eaux douces avec la présence de métaux lourds tels que le zinc, le mercure, le plomb et le cuivre. A l'inverse, l'étude de DEREDJIAN *et al.* (2011) effectuée sur des *Pseudomonas* de différentes provenances (hospitalières et environnement) n'a pas établi de corrélation entre la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds. Cet effet de non co-sélection est attribué au fait que l'étude a été menée sur des environnements originellement peu pollués.

Conclusion

Ce travail a permis l'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques de souches aviaires d'*E. coli* (n=308), de la région centre d'Algérie, isolées de lésions de colibacilloses et de détecter les mécanismes sous tendant la résistance à deux principales familles d'antibiotiques : les bêta-lactamines et les fluoroquinolones.

Il ressort à travers les résultats que des taux de résistance variables ont été observés vis-à-vis des antibiotiques utilisés. A l'exception de l'imipénème qui reste totalement actif, toutes les molécules de bêta-lactamines ont été moins actives. Les taux de résistance les plus importants ont été enregistrés vis-à-vis des aminopénicillines (60,2%), alors que les taux les plus bas ont été observés vis-à-vis de l'ensemble des céphalosporines, avec la valeur minimale de résistance enregistrée pour la céfoxitine (1,8%).

Concernant les autres familles d'antibiotiques, des taux de résistance moyens ont été observés vis-à-vis des aminosides, des tétracyclines et de l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole (cotrimoxazole). La colistine demeure une molécule rempart avec quasiment aucune résistance (0,68%) chez les isolats d'*E. coli*.

La résistance aux quinolones comme l'acide nalidixique (55,2%) a été conséquente, tandis qu'elle a été de moindre mesure vis-à-vis des fluoroquinolones (26% comme taux de résistance maximum pour l'ofloxacine). Des profils de multirésistance associant entre 3 et 17 antibiotiques et s'étendant à toutes les familles chimiques ont été observés.

Le principal mécanisme de résistance aux bêta-lactamines développé par nos isolats a été la production de bêtalactamases. Les groupes phénotypiques dominants décelés ont été : la production de pénicillinases à large spectre (51,9 %), transférables par conjugaison et de bêtalactamases à spectre étendu (BLSE), à connotation céfotaximase (7,8%), non transférables ni par conjugaison, ni par électrotransformation, alors que les résistances à la tétracycline ou au triméthoprime-sulfaméthoxazole ont été transférables par électrotransformation.

La caractérisation moléculaire des BLSE a montré que celles-ci appartenaient au groupe1 de la famille CTX-M. Le séquençage effectué sur deux souches a permis d'identifier l'allèle $bla_{\text{CTX-M15}}$. Le gène bla_{TEM} a été détecté chez la plupart des souches BLSE testées (8/11).

Le typage moléculaire des 11 souches BLSE par leurs profils plasmidiques a montré des profils plasmidiques similaires comprenant 7 plasmides et le replicon-typing a mis en évidence des groupes d'incompatibilité IncF et IncFIB. La PFGE pratiquée sur les souches a révélé aussi des profils de macrorestriction identiques. L'analyse phylogénétique a montré leur appartenance au phylogroupe D. Tous ces résultats sont indicatifs du caractère clonal de ces souches.

La résistance des isolats producteurs de BLSE s'est également étendue à d'autres familles d'antibiotiques comme les quinolones et fluoroquinolones, cette résistance était non transférable. La recherche de mutation dans les régions QRDR des gènes des sous unités GyrA de l'ADN gyrase et ParC et ParE (de la topoisomérase IV) chez 2 souches a mis

en évidence des mutations classiquement décrites dans les gènes des 3 sous-unités: *gyrA :* Ser83Leu, Asp87Asn; *parC* : Ser80Iso et *parE* : Ala458Ser.

Le second volet de ce travail a porté sur l'évaluation de la sensibilité de 215 souches vis-à-vis de sept métaux lourds à des concentrations spécifiques définissant l'état de résistance. A l'exception du cuivre, cette étude a mis en exergue des taux de résistance parfois élevés, tels que vis-à-vis du zinc (79,1%), du plomb (59,1%) et du chrome (45,6%). Des taux plus faibles ont été enregistrés vis-à-vis de l'argent (17,7%), du cadmium (11,6 %) et du mercure (8,4%). Une diversité de profils de résistance (29) a été observée, avec 24 métallotypes de multirésistance associant jusqu'à 5 métaux simultanément et la prédominance du métallotype associant zinc, plomb et chrome (20,5%).
La résistance aux métaux lourds a fréquemment été associée à la résistance aux antibiotiques, en particulier vis-à-vis des bêta-lactamines et des quinolones.
Les souches à phénotype PHN ont été celles qui ont présenté le plus de résistance aux métaux avec 16 métallotypes associés. Le métallotype zinc-plomb a été le plus souvent associé aux souches à phénotypes PHN et BLSE.
Concernant les quinolones, le profil de résistance comprenant les cinq molécules de quinolones et fluoroquinolones testées (NA PA, CIP, OFX, PF) est le plus fréquemment associé aux métaux lourds, avec 13 métallotypes observés, avec également la prédominance du profil zinc-plomb (12 souches).
L'analyse des correspondances multiples (ACM) via le traitement des donnés par le logiciel R (package ade4) et les valeurs du test d'indépendance du χ^2 ($p<0$) a clairement établie la liaison entre la résistance aux antibiotiques et la résistance aux métaux lourds chez les souches testées. Ceci va dans le sens d'une probable pression de co-sélection, d'où une adaptation, exercée sur nos souches via un mésusage des antibiotiques et un environnement de plus en plus pollué par les métaux lourds.

Cette étude a fait ressortir des taux de résistance et des profils de multirésistance préoccupants de souches pathogènes pour la volaille et à potentiel zoonotique ; à cet effet, il est nécessaire de :
- Réduire et d'utiliser avec discernement les antibiotiques en médecine vétérinaire et en conduite des élevages ;
- Surveiller l'évolution de l'antibiorésistance dans le monde animal et caractériser ses mécanismes ;
- Lutter contre toutes les formes de pollution par les métaux lourds et les biocides.

Les perspectives de ce travail seraient :
- D'analyser l'environnement génétique du gène $bla_{\text{CTX-M-15}}$ positionné sur le chromosome ;
- De typer par MLST (multi locus sequence type) ce clone producteur de BLSE ;
- De compléter la caractérisation moléculaire des autres phénotypes de résistance ;
- Et enfin, de détecter phénotypiquement et génotypiquement les facteurs de virulence associés à ces souches multirésistantes.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

ABDELATEY L. M., AGDY KHALIL A. K. B., THANAA H. ALI T.H. and MAHROUS K. (2011). Heavy metal resistance and gene expression analysis of Metal resistance genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria present in Egyptian soils. *J Appl Sc Environ San.* 6(2): 201-211.

ABDI-HACHESOO B., ASASI K. and SHARIFIYAZDI H. (2013). Rapid detection of *Escherichia coli* gyrA and parC mutants in one-day-old broiler chicks in Iran. *Vet Ital.* 49(3): 291-297.

ABRAHAM S., WONG H.S., TURNIDGE J., JOHNSON J.R. and TROTT D.J. (2014). Carbapenemase-producing bacteria in companion animals: a public health concern on the horizon. *J Antimicrob Chemother.* May;69(5): 1155-1157.

ABREU R., CASTRO B., ESPIGARES E., RODRIGUEZ-ÁLVAREZ C., LECUONA M., MORENO E., ESPIGARES M. and ARIAS A. (2014). Prevalence of CTX-M-Type extended-spectrum β-lactamases in *Escherichia coli* strains isolated in poultry farms. *Foodborne Pathog Dis.* Nov;11(11): 868-873.

ADRIANO D.C. (2001). Trace elements terrestrial environnements : biochemistry, bioavailability and risks of metals, pp 867. Springer-Verlag, New York.

AGABOU A., LEZZAR N., OUCHENANE Z., KHEMISSI S., SATTA D., SOTTO A., LAVIGNE J.P., PANTEL A. (2016). Clonal relationship between human and avian ciprofloxacin resistant *Escherichia coli* isolates in North-Eastern Algeria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* Feb;35(2): 227-234.

AGGAD H., AHMED AMMAR Y., HAMMOUDI A. and KIHAL M. **(2010).** Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis. *Glob Veterinaria,* 4(3): 303-306.

AHEMAD M. and ABDUL MALIK (2014). Prevalence of Heavy Metal and Antibiotic Resistance in Bacterial Isolates from Metal Polluted Soils. *Microbiol J.* 4: 12-2.1

AHMED A. M., SHIMAMOTO T. and SHIMAMOTO T. (2013). Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers. *Int J Med Microbiol.* 303(8): 475-483.

ALAM M. and IMRAN M. (2014). Multiple antibiotic resistances in metal tolerant *E. coli* from hospital waste water. *Bioinformation* 10(5): 267-272.

AL-BAHRY S.N., AL-MASHANI B M., AL-ANSARI A.S., ELSHAFIE A. E. and MAHMOUD I.Y. (2013). *Escherichia coli* tetracycline efflux determinants in relation to tetracycline residues in chicken. *Pacific Journal of Tropical Medicine*, 718-722.

ALLAIN P. (2008). Bêta-lactamines, pénicillines et céphalosporines. Les médicaments. 3ème édition.C. Vernozy-Rozand, S. Roze. 220 p.

ALEKSHUN M.N. and LEVY S.B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell.* Mar 23;128(6): 1037-1050.

ALLOUI N. (2011). Situation actuelle et perspectives de modernisation de la filière avicole en Algérie Neuvièmes Journées de la Recherche Avicole, Tours, 29 et 30 mars 2011.

ALOUACHE S., KADA M., MESSAI Y., ESTEPA V., TORRES C., and BAKOUR R. (2011). Antibiotic resistance and extended-spectrum b-lactamases in isolated bacteria from seawater of Algiers beaches (Algeria). *Microbes Environ.* 27: 80–86.

AMBLER R .P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; 289: 321–331.

ANSSOUR L., Y. MESSAI M. DERKAOUI S. ALOUACHE V. ESTEPA S. SOMALO TORRES C. and BAKOUR R. (2014). ESBL, plasmidic AmpC, and associated quinolone resistance determinants in coliforms isolated from hospital effluent: first report of qnrB2, qnrB9, qnrB19, and blaCMY-4 in Algeria. *J Chemother*. 26: 74-79.

ANSES (2015). Agence Nationale de sécurité sanitaire alimentation environnement travail. Résapath Réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales. Bilan 2014. Edition scientifique.

ANTÃO E.M., WIELER L.H. et EWERS C. (2009). Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli. Gut Pathogens*, 1:22

ASAI T., MASANI K., SATO C., HIKI M., USUI M., BABA K., OZAWA M., HARADA K., AOKI H. and SAWADA T. (2011). Phylogenetic groups and cephalosporin resistance genes of *Escherichia coli* from diseased food-producing animals in Japan. *Acta Vet Scand*. Oct 12;53:52.

ASLAM M., TOUFEER M., NARVAEZ BRAVO C., LAI V, REMPEL H., MANGES A. and DIARRA M.S. (2014). Characterization of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* isolated from retail poultry meats from Alberta, Canada**.** *Int J Food Microbiol.* May 2;(177): 49-56.

ATIENO N.R., OWUOR O.P. and OMWOYO O. (2013). Heavy metal and associated antibiotic resistance of fecal coliforms, fecal streptococci and pathogens isolated from waste waters of abattoirs in Nairobi, Kenya. *J Appl Biosci.* 64(2013).

AUQUIER V. (2006). Identification et caractérisation de proteines membrannaires impliquées dans les systèmes de résistance aux métaux lourds chez *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Biometals* 22(1):141–148.

BABA AHMED-KAZI TANI Z. et ARLET G. (2014). Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie Z. *Pathol Biol.* 6: 169–178.

BAKOUR R., LAROCHE Y. and CORNELIS G. (1983). Studies of the incompatibility and replication of the 70Kb virulence plasmids of *Yersinia*. *Plasmid*. 10: 279-289.

BAKER-AUSTIN C., WRIGHT M.S., STEPANAUSKAS R. and McARTHUR J.V. (2006). Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.* 2006 Apr;14(4): 176-182.

BARBIERI N.L., ALINE LUI´SA DE OLIVEIRA A.L., MOREIRA TEJKOWSKI T., DANIEL BRISOTTO PAVANELO D.B. MATTER L. B., SCHINCARIO S.R., Pinheiro, T., MARA IBELLI VAZ M.I NOLAN L.K., LOGUE C.M., GUIMARA˜ES DE BRITO B. and HORN F. (2015). Molecular Characterization and Clonal Relationships Among *Escherichia coli* Strains Isolated from Broiler Chickens with Colisepticemia. *Foodborne Pathog Dis*. Volume 0, Number 0.

BARNES H.J., NOLAN L.K. and VAILLANCOURT J-P. (2008). Colibacillosis. In: Saif YM, Fadly AM, Glisson JR(eds). *Diseases of Poultry*. Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing, 691–737.

BASS L., LIEBERT C.A., LEE M.D., SUMMERS A.O., WHITE D.G., THAYER S.G. and MAURER J. J. (**1999).** Incidence and Characterization of Integrons, Genetic Elements Mediating Multiple-Drug Resistance, in Avian *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. Dec; 43(12): 2925–2929.

BAYLES K. W. (2000). The bactericidal action of penicillin: new clues to an unsolved mystery. *Trends Microbiol.* 8: 274- 278.

BEAN D.C., DAVID M. LIVERMORE D.M and HALL L. M. C. (2009). Plasmids Imparting Sulfonamide Resistance in *Escherichia coli* : Implications for Persistence *Antimicrob Agents Chemother*. Mar;53(3): 1088-1093.

BECERRA-CASTRO C., MACHADO R.A., VAZ-MOREIRA I. and MANAIA C.M. (2015). Assessment of copper and zinc salts as selectors of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Sci Total Environ.* Oct 15; 367-372.

BEDNORZA C., OELGESCHLÄGER K., KINNEMANN B., HARTMANN S., NEUMANN K., PIEPER R., BETHEA A., SEMMLERT., TEDINA K., SCHIERACKE P., LOTHAR H. WIELERA L.H. and GUENTHER S. (2013). The broader context of antibiotic resistance : Zinc feed supplementation of piglets increases the proportion of multi-resistant *Escherichia coli in vivo*. *Int J Med Microbiol.* 303: 396–403.

BEJ A. K., McCARTY S. C. and ATLAS R. M. (1991). Detection of coliform bacteria and *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction: comparison with defined substrate and plating methods for water quality monitoring. *Appl Environ Microbiol.* 57: 2429-2432.

BELAID D. (2015). L'élevage avicole en Algérie. Collection dossiers agronomiques. Chapitre 1 : Analyse de la filière pp 7.

BELANGER L., GARENAUX A., HAREL J., BOULIANNE M., NADEAU E. and DOZOIS C. M. (2011). *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. FEMS *Immunol Med Microbiol.* 62: 1–10.

BENMALEK, Y., BENAYAD T. and FARDEAU M. L . (2012). Isolation and screening of heavy metal resistant bacteria from wastewater : a study of heavy metal co-resistance and antibiotics resistance. *Water Sci Technol*. 66(10): 2041-2048.

BENMALEK Y., BENAYAD T., MADOUR L., HACENE H. and FARDEAU M.L. (2014). Study on Cadmium Resistant-Bacteria Isolated from Hospital Wastewaters. *Adv in Bioscience and Biotech.* 5: 718-726.

BENSALLEM R., BEN SLAMA, K., SA´ENZ Y., ROJO-BEZARES B., ESTEPA V., JOUINI A., GHARSA H., KLIBI N., BOUDABOUS A. and TORRES C. (2012). Prevalence and Characterization of Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) and CMY-2 Producing *Escherichia coli* Isolates from Healthy Food Producing Animals in Tunisia. *Foodborne Pathog Dis*. Dec ; 9(12): 1137-1142.

BERGERON C.R., PRUSSING C., BOERLIN P., DAIGNAULT D., DUTIL L., REID-SMITH R.J., ZHANEL G.G. and MANGES A.R. (2012). Chicken as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in humans, Canada. *Emerg Infect Dis.* Mar;18(3): 415-421.

BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY (2004). The Proteobacteria. Volume 2 : Procaryotic Domains. pp 21-26 Krieg, Noel R. Editors: Garrity**,** George (Ed.)

BERTIN G. and AVERBECK D. (2006). Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (aviem). *Biochimie*, 88: 1549-1559.

BLOUNT Z.D. (2015). The unexhausted potential of *E. coli* eLife ;4:e05826.

BOËRJESSON S., JERNBERG C., BROLUND A., EDQUIST P., FINN M., LANDE´ N. A., OLSSON-LILJEQUIST B., WISELL K.T., BENGTSSON B. and ENGLUND S. **(2013).** Characterization of plasmid-mediated AmpC-producing *E. coli* from Swedish broilers and association with human clinical isolates. *Clin Microbiol Infect.* 19: E309–E311.

BOERLIN P. and REID-SMITH R.J. (2008). Antimicrobial resistance: its emergence and transmission. *Anim Health Res Rev*. Dec; 9(2): 115-126.

BORTOLAIA V., BISGAARD M. and MIKI BOJESEN A. (2010). Distribution and possible transmission of ampicillin- and nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* within the broiler industry. *Vet Microbiol*. 142: 379–386.

BOTELHO L.A., KRAYCHETE G.B., COSTA E SILVA J.L., REGIS D.V., PICÃO R.C., MOREIRA B.M., BONELLI R.R. (2015). Widespread distribution of CTX-M and plasmid-mediated AmpC β-lactamases in *Escherichia coli* from Brazilian chicken meat. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Apr;110(2): 249-254.

BOUCHESEICHE C., CREMILLE E., PELTE T. et POJER K. (2002). L'agence de l'eau Rhône méditerranée et corse publiait le «guide technique n°7-pollution toxique et écotoxicologie: notion de base». p35.

BOUTIBA –BEN BOUBAKER I. (2013). Les mécanismes de résistance aux fluoroquinolones. 23 ème congrès de la Société Tunisienne de Pathologie infectieuse.

BOYER M., BIGNON A., DESSEIN R., FAURE K., GUERY B. et KIPNIS E. (2012). Céfoxitine et BLSE. Médecine et maladies infectieuses, 42: 126–128.

BRADFORD P.A. (2001). Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*. 14**:** 933-951.

BRANGER C., ZAMFIR O., GEOFFROY S., LAURANS G. , ARLET G., THIEN H.V., GOURIOU S., PICARD B. and DENAMUR E (2005). Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum beta-lactamase type. *Emerg Infect Dis*. 11:54-61

BRIAN C., HILTZ M., MUSGRAVE H. and FORWARD K.R. (2003). Cephamycin Resistance in Clinical Isolates and Laboratory-derived Strains of *Escherichia coli*. *Emerg Infect Diseases*. 9(10).

BRISABOIS A., KEMPF I., MEUNIER D., MILLEMANN Y., SANDERS P et TOUTAIN P.L. (2006). Impact de l'usage des antibiotiques sur la résistance chez l'animal (incluant la surveillance de la résistance bactérienne chez l'animal). In: D Guillemot, *Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine* (p. 214). Maisons-Alfort, FRA : AFSSA Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.

BRYSKIER A. (1999). Les bêtalactamines **:** Antibiotiques, agents antimicrobiens et antifongiques. Ed, Ellips, pp.669-680.

BRYSKIER A. (2000). Perfecting the ring and extending the antibacterial spectrum: the multiple Generations. *Clin Microbiol Infect.* 6(3): 13-21

BUSH K. (1989a). Classification of beta-lactamases : groups 1, 2a, 2b, and 2b9. *Antimicrob. Agents Chemother*. 33**:**264–270.

BUSH K. (1989b). Classification of betalactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3, and 4. *Antimicrob Agents Chemother*. 33:271–276.

BUSH K., JACOBY G. A. and MEDEIROS A. A. (1995). A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 39**:**1211-1233.

BUSH K. (2001). New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis.* Apr 1;32(7):1085-1089.

BUSH K. and JACOBY G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 54:969-76.

BUSH K. and FISHER J.F. (2011). Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β-lactamases from gram-negative bacteria. *Ann Rev Microbiol*. 65: 455-78.

BUSH K. **(2013a).** Proliferation and significance of clinically relevant β-lactamases**.** *Ann N Y Acad Sci.* Jan;1277: 84-90.

BUSH K. (2013b). The ABCD's of β -lactamase nomenclature. *Infect Chemother*. 19:549–559

CABALLERO-FLORES G.G., ACOSTA-NAVARRETE Y.M., RAMÍREZ-DÍAZ M.I., SILVA-SÁNCHEZ J. and CERVANTES C. (2012). Chromate resistance genes in plasmids from antibiotic resistant nosocomial enterobacterial isolates. *FEMS Microbiol Lett*. Feb;327(2): 148-154.

CARATTOLI, A., BERTINI A., VILLA L., FALBO V., HOPKINS K. L. and THRELFALL E. J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol*. Methods 63:219–228.

CARATTOLI A. (2009). Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 53: 2227–2238.

CARATTOLI A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. *Int JMed*. *Microbiol*. 303: 298–304.

CARDONHA A.M., VIEIRA R.H., PEIRANO G., RODRIGUES DDOS P. (2005). Resistance to antibiotics and heavy metals from *Escherichia coli* isolated from sea water and pluvial galleries. *Acta Cir Bras*. 20 Suppl 1:253-256.

CARLE S. (2009). La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important ! Pharmactuel, 42 Supplement 2: 6-21.

CARLOS C., PIRES M.M., STOPPE N.C., HACHICH E.M., SATO M.I.Z., GOMES T.A.T., AMARAL L.A. and OTTOBONI L.M.M. (2010). *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiol.* 10:161.

CAROFF N., ESPAZE E., GAUTREAU D., RICHET H. and REYNAUD. A. (2000). Analysis of the effects of 42 and 32 *ampC* promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing AmpC. *J Antimicrob. Chemother*. 45:783–788.

CARRËR A. and NORDMANN P. (2011). CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* : a change in the epidemiology of ESBL]. *Pathol Biol* (Paris). Dec;59(6):e133-5. Review.

CATTOIR V. (2008). Les nouvelles beta-lactamases à spectre étendu (BLSE). Pathologie infectieuse en réanimation. MAPAR: 205-209.

CAVALLO J.D., FABRE R., JEHL F., RAPP C. et GARRABE E. (2004). Bêta-lactamines. EMC-Maladies infectieuses. 1: 129-202.

CAVICCHIO L., DOTTO G., GIACOMELLI M., GIOVANARDI D., GRILLI G., FRANCIOSINI M.P., TROCINO A. and PICCIRILLO A. (2015). Class 1 and class 2 integrons in avian pathogenic *Escherichia coli* from poultry in Italy. *Poult Sci*. Jun;94(6): 1202-1208.

CERQUETTI M. M., GIUFRE A., GARCIA-FERNANDEZ M., ACCOGLI D., FORTINI LUZZI I. and CARATTOLI A. (2010). Ciprofloxacin-resistant, CTX-M-15- producing *Escherichia coli* ST131 clone in extraintestinal infections in Italy. *Clin Microbiol Infect.* 16: 1555–1558.

CHAKRABORTY S., DUTTA A.R., SURAL S., GUPTA D. and SEN S. (2013). Ailing bones and failing kidneys: a case of chronic cadmium toxicity. *Ann Clin Biochem*. 50(5):492–495.

CHANG J.S., LAW R. and CHANG C.C. (1997). Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. *Water Research*, **31**(7):1651-1658.

CHANTZIARAS I., BOYEN F., CALLENS B. and DEWULF J. (2014). Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *J Antimicrob Chemother*. 69:827–834.

CHAUDHURI R.R. **and HENDERSON I.R. (2012).** The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infect Genet Evol*. Mar;12(2): 214-226.

CHAUVIN C., COLIN P., GUILLOT J.F., LAVAL A., MILLEEMANN Y., MOULIN G. and PELLANNE I. (2006). Usage des antibiotiques chez l'animal ; in : « usage vétérinaire des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquence pour la santé humaine ». Agence Française de sécurité des aliments. AFSSA.

CHAUVIN C., LE DEVENDEC L., JOUY E., LE CORVEC M., FRANCART S., MAROIS-CREHAN C. and KEMPF I. (2013). National prevalence of resistance to third-generation cephalosporin in *E. coli* isolated from French layer flocks. *Antimicrob Agents Chemother*. Dec**;**(12): 6351-6353.

CHAVES J., LADONA M.G., SEGURA C., COIRA A., REIG R. and AMPURDANÉS C. (2001). SHV-1 beta-lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. Oct;45(10):2856-2861.

CHEN X., ZHANG W., PAN W., YIN J., PAN Z., GAO S. and XINAN J. (2012). Prevalence of *qnr*, *aac(6=)-Ib-cr*, *qepA*, and *oqxAB* in *Escherichia coli* Isolates from Humans, Animals, and the Environment. *Antimicrob Agents and Chemother.* June; 56(6): 3423–3427.

CHEN X., ZHANG W., YIN J., ZHANG N., GENG S., ZHOU X., WANG Y., GAO S. and JIAO X. (2014). *Escherichia coli* isolates from sick chickens in China: changes in antimicrobial resistance between 1993 and 2013. *Vet J.* Oct;202(1):112-115.

CHEN S., LI X., SUN G., ZHANG Y., SU J. and YE J. (2015). Heavy Metal Induced Antibiotic Resistance in Bacterium LSJC7. *Int J. Mol Sci. 16*, 23390-23404.

CHIFFOLEAU J.F., DIDIER C., COSSA D., FICHT A., GONZALEZ J.L., GUYOT T., MICHEL P., MIRAMAND P., OGER C. et PETIT F. (2001). La contamination métallique,. Programme Seine Aval, fascicule n°8, Editions Ifremer, Plouzane (France). 39 p.

CHRISTENSEN, J.P., CHADFIELD, M.S., BOJESEN, A.M. and BISGAARD, M. (2003). Investigations on the clonality of *E. coli* infections in industrial poultry production. In: Proceedings from the XIII Congress of the World Veterinary Poultry Association, Denver, USA, p. 83.

CHU, G., VOLLRATH D. and DAVIS R.W. (1986). Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science,* 234:1582–1585.

CLARKE B., HILTZ M., MUSGRAVE H. and FORWARD K.R. (2003). Cephamycin resistance in clinical isolates and laboratory derived strains of *Escherichia coli,* Nova Scotia, Canada. *Emerg Infect Dis.* Oct;9(10): 1254-1259.

CLERMONT, O., BONACORSI S. and E. BINGEN. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ Microbiol*. 66**:** 4555–4558.

CLERMONT O., OLIER M., HOEDE C., DIANCOURT L., BRISSE S., KEROUDEAN M., GLODT J., PICARD B., OSWALD E. and DENAMUR E. (2011). Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic Backgrounds. *Infect Genet Evol.* 11: 654–662.

COCCHI S., GRASSELLI E. and GUTACKER M. (2007). Distribution and characterization of integrons in *Escherichia coli* strains of animal and human origin. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 50: 126-132.

COELHO, A., GONZALEZ-LOPEZA J.J., MIRO E., ALONSO-TARRES C., MIRELISB B., NIEVES LARROSA M., BARTOLOME R.M., ANDREU A., NAVARRO F., JOHNSON J.R. and PRATSA G. (2010). Characterisation of the CTX-M-15-encoding gene in *Klebsiella pneumonia* strains from the Barcelona metropolitan area: plasmid diversity and chromosomal integration. *Int J of Antimirob. Agents.* 36:73–78.

COHEN N. et KARIB H. (2006). Risque hygiénique lié à la présence des *Escherichia coli* dans les viandes et les produits carnés : un réel problème de santé publique. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II. Les technologies de laboratoire. 1: 5-9.

COQUE T.M., NOVAIS A., CARATTOLI A., POIREL L., PITOUT J., PEIXE L., BAQUERO F., CANTON R. and NORDMANN P. (2008). Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis.* Feb;14(2):195-200.

CORVEC S., CAROFF N. ESPAZE E. MARRAILLAC J. and REYNAUD A. (2002). Mutation in the *ampC* promoter increasing resistance to beta-lactams in a clinical *Escherichia coli* strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 46: 3265–3267.

CORVEC S., PRODHOMME A., GIRAUDEAU C., DAUVERGNE S., REYNAUD A. and CAROFF N. (2007). Most *Escherichia coli* strains overproducing chromosomal AmpC beta-lactamase belong to phylogenetic group A. *J Antimicrob Chemother*. 60:872–876.

COX G. and WRIGHT G.D. (2013). Mini Review Intrinsic antibiotic resistance : Mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol.* 303: 287– 292.

COURVALIN P GOLDSTEIN F PHILIPPON et SIROT J. (1985). L'antibiogramme Ed. MPC-Vigot. Paris-Bruxelles.

CREPIN S., LAMARCHE M.G., GARNEAU P., SEGUIN J., PROULX J., DOZOIS C.M. and HAREL J. (2008). Genome-wide transcriptional response of an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) *pst* mutant *BMC Genomics*, 9:568.

CROXEN M. A. and FINLAY. B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* 8: 26-38.

CROXEN M.A., LAW R. J., SCHOLZ R., KEENEY K.M., WLODARSKA M. ET FINLAY B. B. (2013). Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Reviews.* Oct;26(4): 822–880.

D'ANDREA M.M., ARENA F., PALLECCHI L. et ROSSOLINI G.M. **(2013).** CTX-M-type β-lactamases: a successful story of antibiotic resistance Aug;303(6-7):305-317.

DA SILVA G.J. and MENDONÇA N. (2012). Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. *Virulence,* Jan-Feb;3(1): 18-28.

De JONG A., STEPHAN B. and SILLEY P. (2012). Fluoroquinolone resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* from healthy livestock and poultry in the EU. *J Appl Microbiol.* Feb;112(2):239-245.

DENG H., BINSI H., -YIZENG S., XINGFANG L., SHIYANG R., HONGLIU Y.A. and PINGLIAO X. (2015). Prevalence of extended-spectrum cephalosporin resistant *Escherichia coli* farrowing farm :ST1121 clone harboring IncHI2 plasmid contributes to the dissemination of *bla*CMY-2. *Front Microbiol.* Nov 3;6:1210

DEREDJIAN A., COLINON C., BROTHIER E., FAVRE-BONTE S., COURNOYER B. and NAZARET S. (2011). Antibiotic and metal resistance among hospital and outdoor strains of *Pseudomonas aeruginosa* . *Res Microbiol.* Sep;162(7): 689-700.

DERMONDRAIL D., BAIZE D., BARBIER J., FEREYSSINET P., MOUVET C., SALPETEUR I. et WAVRER P. (2000). Fonds géochimique naturel : état des connaissances à l'échelle nationale, BRGM/RP-50518-FR, pp 93.

DESCHAMPS T., BENZAAZOUA M., BUSSIÈRE B. , BELEME T. et MBONIMPA M. (2006). Mécanismes de rétention des métaux lourds en phase solide : cas de la stabilisation des sols contaminés et des déchets industriels Vertigo - la revue électronique en sciences de l'environnement. 7: (2).

DE VICENTE A., AVILES M., CODINA J.C., BORREGO J.J. and ROMERO P. (1990). Resistance to antibiotics and heavy metals of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from natural waters. *J Appl Bacteriol.* Jun;68(6): 625-32.

DEVIKA L. R., RAJARA M. and MATHIVANAN K (2013). Multiple Heavy Metal and Antibiotic Tolerance Bacteria Isolated from Equatorial Indian Ocean. *Inter J of Microbiol Res.* 4(3):212-218.

DHO-MOULIN M. and FAIRBROTHER J.M. (1999). Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res*. Mar-Jun; 30(2-3): 299-316.

DIAS da SILVEIRA W., FERREIRA A., BROCCHI M., MARIA DE HOLLANDA L., PESTANA DE CASTRO A.F., TATSUMI YAMADA A. and LANCELLOTTI M. (2002). Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. *Vet Microbiol*. Feb 26;85(1): 47-53.

DI BENEDETTO M. (1997). Méthodes spectrométriques d'analyse et de caractérisation, les métaux lourds, dossier SAM, Ecole Nationale Supérieure des Mines, Saint-Etienne. pp6-13

DIERIKX, C., VAN DER GOOT J., FABRI, T., VAN ESSEN-ZANDBERGEN A., SMITH, H. and MEVIUS D. (2013). Extended-spectrum-beta-lactamase- and AmpC-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers. *J Antimicrob. Chemother*. 68: 60–67.

DIERIKX C.M., VAN DER GOOT J.A., SMITH H.E., KANT A. and MEVIUS D.J. (2013). Presence of ESBL/AmpC -Producing *Escherichia coli* in the Broiler Production Pyramid: A Descriptive Study. Plos One. Nov 7: 8(11).

DIELS L., DONG Q., VAN DER LELIE D., BAEYENS W. and MERGEAY M. (1995). The czc operon of *alcaligenes eutrophus* CH34 : from resistance mechanism to the removal of heavy metals**.** *J Ind Microbiol.* feb;14(2): 142-153.

DISSANAYAKE D.R., OCTAVIA S. and LAN R. (2014). Population structure and virulence content of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from outbreaks in Sri Lanka. *Vet Microbiol.* 168: 403–412.

DOBRINDT U. (2005). (Patho-) Genomics of *Escherichia coli. Int J Med Microbiol.* 295:357–371.

DORTET L., POIREL L. and NORDMANN P. (2014). Rapid detection of extended-spectrum-β-lactamase-producing enterobacteriaceae from urine samples by use of the ESBL NDP test. *J Clin Microbiol*. Oct;52(10): 3701-3706.

DOSANGH N.S., HAMMERBACHER N.A. and MICHEL S.L. (2007). Characterization of the *Helcebacter pylori* NIKA-P (ure A) DNA Interaction : metal on requirements and sequence specifity. *Biochemistry* 46: 2520-2529.

DOU X., GONG J., HAN X., XU M., SHEN H., ZHANG D., ZHUANG L., LIU J. and ZOU J. (2016). Characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated in eastern China, Gene, Jan 15;576: 244-248.

DUPUY Y. et NOUGIER P. (2005). Les micro-organismes : du gène à la biosphére (Coll. Sciences de la vie et de la Terre). Editions LAVOISIER S.A.S. Ellipses Marketing. pp15.

DZIVA F. and STEVENS M.P. (2008). Colibacillosis in poultry : unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathol*. 37: 355–366.

DZIVA F., HAUSER H., CONNOR T.R., VAN DIEMEN P.M., PRESCOTT G., LANGRIDGE G.C., ECKERT S., CHAUDHURI R.R., EWERS C., MELLATA M., MUKHOPADHYAY S., CURTISS R., DOUGAN G., WIELER L.H., THOMSON N.R., PICKARD D.J, and STEVENS M.P. (2013). Sequencing and functional annotation of avian pathogenic *Escherichia coli* serogroup O78 strains reveal the evolution of *E. coli* lineages pathogenic for poultry via distinct mechanisms. *Infect Immun*. Mar;81(3): 838-849.

ECKERT C., GAUTIER V. and ARLET G. (2006). DNA sequence analysis of the genetic environment of various bla_{CTX-M} genes. *J Antimicrob Chemother*. 57: 14-23.

E.F.S.A. (2011). Scientific opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum beta-lactamases and/or AmpC beta-lactamases in food and food-producing animals. EFSA Journal 9: 2322.

ELHANI D., BAKIR L. and AOUNI M. (2011). Changement de l'épidémiologie de *Klebsiella pneumoniae* productrice de bêtalactamases à spectre élargi. *Ann Biol Clin. (Paris)*; 69: 523-529.

EL HANI D. **(2012).** The widening challenge of extended spectrum β-lactamases. *Ann Biol Clin.* (Paris). Mar-Apr;70(2): 117-140.

EL-SAYED M.H. (2016). Multiple Heavy Metal and Antibiotic Resistance of *Acinetobacter baumannii* Strain HAF – 13 Isolated from Industrial Effluents. *American J of Microbiol Res*. 4(1): 26-36.

EL-RAMI F. E., SLEIMAN F.T. and ABDELNOOR A.M. (2012). Identification and antibacterial resistance of bacteria isolated from poultry. *Pol J Microbiol.* 61(4): 323-326.

EHRLICH H.L. (1997). Microbs and metals, Mini-Review, *Appl Microbio Biotechnol*. 48: 687-692.

ESCOFIER B. et PAGES J. (2008). Analyses factorielles simples et multiples Collection: Sciences Sup, Dunod- 4ème édition - 328 pages.

EWERS C., JANSSEN T. and WIELER L.H. (2003). Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. Sep-Oct;116(9-10): 381-395.

EWERS C., JANSSEN T., KIESSLING S., PHILIPP H.C. and WIELER L.H. (2004). Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Vet Microbiol*. Nov 30;104(1-2): 91-101.

EWERS C., ANTÃO E.M., DIEHL I., PHILIPP H.C. and WIELER L.H. (2009). Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. *Appl Environ Microbiol*. Jan;75(1): 184-192.

EWERS C., BETHE A., SEMMLER T., GUENTHER S. and WIELER L.H. (2012). Extended-spectrum beta-lactamase producing and AmpC producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin Microbiol Infect*. 18:646–655.

FABRE, L., DELAUNE A., ESPIE E., NYGARD K,. PARDOS M., POLOMACK L., GUESNIER F., GALIMAND M., LASSEN J. and WEILL F. X. (2009). Chromosomal integration of the extended-spectrum beta-lactamase gene blaCTX-M-15 in *Salmonella enterica* serotype Concord isolates from internationally adopted children. *Antimicrob Agents Chemother*. 53:1808–1816.

FABREGA A., SANCHEZ-CESPEDES J., SOTO S. and VILA J. (2008). Quinolone resistance in the food chain. *J Int J Antimicrob Agents*. Apr; 31(4):307-315.

FERREIRA J.C., PENHA FILHO R.A., ANDRADE L.N., BERCHIERI A .JR, and DARINI A.L. (2014). Detection of chromosomal *bla*CTX-M-2 in diverse *Escherichia coli* isolates from healthy broiler chickens. *Clin Microbiol Infect*. Oct;20(10): 623-626.

FISCHER J., RODRÍGUEZ I., BAUMANN B., GUIRAL E., BEUTIN L., SCHROETER A., KAESBOHRER A., PFEIFER Y., HELMUTH R. and GUERRA B. (2014). *bla*CTX-M-15-carrying *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from livestock and food in Germany *Antimicrob Chemother*. 69: 2951–2958.

FOSTER T. J. (1983). Plasmid determined resistance to Antimicrobial Drugs and toxic Metal ions in Bacteria. *Microbiological reviews*, Sept; 361-409.

FRENEY J., RENAUD F., LECLERCQ R et RIEGEL P. (2007). Précis de bactériologie clinique. Ed. ESKA. , Paris, pp.990, 991, 4(992), 993, 994,995.

FRIMODT-MØLLER N. and KOLMOS H.J. (2011). Selection and spreading of antibiotic resistance in bacteria. Nov 7;173(45):2885-8. *Ugeskr Laeger*. Nov 7;173(45):2885-8.

FRANK C.LU et LORGUE G. (1992). Toxicologie : données générales, procédures d'évaluation, organes cibles, évaluation du risque. Ed. C Masson. Paris. pp5.

GADD G.M. (1992). Metals and microorganisms : a problem of definition. *FEMS Microbiol Lett.* **79**(1-3): 197-203.

GAI W., WANG J., WANG J., CUI Z., QU Z., CUI J., DU X., HUANG X. and ZHAO J. **(2015).** Molecular classification and drug resistance analysis of *Escherichia coli* isolated from poultry in China. *Int J Clin Exp Med*. 8(1): 836-844.

GAO Q., WANG X., XU H., XU Y., LING J., ZHANG D., GAO S. and LIU X. (2012). Roles of iron acquisition systems in virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* : salmochelin and aerobactin contribute more to virulence than heme in a chicken infection model. *BMC Microbiol*. 12:143.

GIOVANARDI, D., CAMPAGNARI E., RUFFONI L. S., PESENTE P., ORTALI G., and FURLATTINI V. (2005). Avian pathogenic *Escherichia coli* transmission from broiler breeders to their progeny in an integrated poultry production chain. *Avian Pathol.* 34:313–318.

GIRAUD, E., LEROY-SETRIN S., FLAUJAC G., CLOECKAERT A., DHO-MOULIN M. and CHASLUS-DANCLA E. (2001). Characterization of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* O78:K80 isolated from turkeys. *J Antimicrob. Chemother*. 47:341–343.

GIUFRE M., GRAZIANI C., ACCOGLI M., LUZZI I., BUSANI L. and CERQUETTI M. (2012). *Escherichia coli* of human and avian origin : detection of clonal groups associated with fluoroquinolone and multidrug resistance in Italy. *J Antimicrob Chemother*. 67: 860–867.

GHAFOURIAN S., SADEGHIFARD N., SOHEILI S. and SEKAWI Z. (2015). Extended Spectrum Beta-lactamases : Definition, Classification and Epidemiology. *Curr Issues Mol Biol*. 17:11-21.

GHUNAIM H., ABU-MADI M.A. and KARIYAWASAM S. (2014). Advances in vaccination against avian pathogenic *Escherichia coli* respiratory disease : Potentials and limitations. *Vet Microbiol.* 172: 13–22.

GNIADKOWSKI M. (2008). Evolution of extended-spectrum beta-lactamases by mutation. *Clin Microbiol Infect*.14:11-32.

GOMBERT S. (2005). Pollution atmosphérique par les métaux, expertise environnement. Editions ADEME. pp125.

GOUDARZI M., AZAD M., and SEYEDJAVADI S.S. (2015). Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants and OqxAB Efflux Pumps among Extended-Spectrum β-Lactamase Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Patients with Nosocomial Urinary Tract Infection in Tehran, Iran. *Scientifica* (Cairo). 2015:518167.

GRAMI R., MANSOUR W., DAHMEN S., MEHRI W., HAENNI M., AOUNI M. and MADEC J.Y. (2013). The *bla*CTX-M-1 IncI1/ST3 plasmid is dominant in chickens and pets in Tunisia. *J Antimicrob Chemother*. Dec;68(12): 2950-2952.

GROSJEAN J. et PASQUIER C. (2009). Bactériologie et virologie pratique.11ème édit De Boeck s.a, Bruxelles, p.128.

GUABIRABA R. and SCHOULER C. (2015). Avian colibacillosis : still many black holes. *FEMS Microbiol Lett.* Aug;362(15):fnv118.

GULLBERG E., ALBRECHT L.M., KARLSSON C., SANDEGREN L. and ANDERSSON D.I. (2014). Selection of a Multidrug Resistance Plasmid by Sublethal Levels of Antibiotics and Heavy Metals. MBio 14 . Oct 7;5(5):e01918-14.

GUPTA N., GAURAV S.S. and KUMAR A. (2013). Molecular Basis of Aluminium Toxicity in Plants: A Review. *Am J of Plant Sci.* 4: 21–37.

HABI S. and DABA (2009). Plasmid incidence, antibiotic and metal resistance among Enterobacteriacea isolated from Algerian stream. *Pakistan J Biol sci.* 12 (22): 1474- 1482

HAEGGMAN S., LÖFDAHL S., PAAUW A., VERHOEF J. and BRISSE S. (2004). Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 48:2400-2408.

HAFERBURG G. and KOTHE E. (2007). Microbes and metals: interactions in the environment. *J of Basic Microbiol*. 47(6): 453-467.

HALL B.G. and BARLOW M. (2005). Revised Ambler classification of b-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. Jun;55(6): 1050-1051.

HAMMOUDI A. and AGGAD H. (2008). Antibioresistance of *Escherichia coli* Strains Isolated from Chicken Colibacillosis in Western Alger. *Turkish J Vet and Anim Sci*. 32(2): 123-126.

HASSAN B., FARUQUE R., DROBNI M., WALDENSTRÖM J., SADIQUE A., AHMED K.U., ISLAM Z., PARVEZ M.B., OLSEN B. and ALAM M. (2011). High prevalence of antibiotic resistance in pathogenic *Escherichia coli* from large- and small-scale poultry farms in Bangladesh. *Avian Dis*. Dec;55(4): 689-692.

HELAL EL-SAYED M. (2016). Multiple Heavy Metal and Antibiotic Resistance of *Acinetobacter baumannii* Strain HAF – 13 Isolated from Industrial Effluents. *American J Microbiol Res*. 4(1):26-36.

HENGSTLER J.G., BOLM-AUDROFF U., FALDUM A., JANSSEN K., REIFENRATH M., GOTTE W., JUNG D., MAYER-POPKEN O., FUCHS J., GEBHARD S., BIENFAIT H.G., SCHLINK K., DIETRICH C., FAUST D., EPE B. and OESCH F. (2003). Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposure to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. *Carcinogenesis*, 24(11):1853-1854.

HERREN C.D., MITRA A., PALANIYANDI S.K. COLEMAN A., ELANKUMARAN S., and MUKHOPADHYAY S. (2006). The BarA-UvrY two component system regulates virulence in avian pathogenic *Escherichia coli* O78:K80:H9. *Infect Immun.* 74: 4900–4009.

HIGUCHI Y., YAGI T. and YASUOKA N. (1997). Unusual ligand structure in Ni-Fe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray, structure analysis. *Structure*, 5: 1671-1680.

HIGUCHI Y., OGATA H., MIKI K., YASUOKA N. and YAGI T. (1999). Removal of the bridging ligand atom at the Ni-Fe active site of (NiFe) hydrogenase upon reduction with H2, as revealed by X-ray structure analysis at 1.4 A resolution. *Structure*, **7**(5):549-556.

HIRAI I., FUKUI N., TAGUCHI M., YAMAUCHI K., NAKAMURA T., OKANO S. and YAMAMOTO Y. (2013). Detection of chromosomal *bla*CTX-M-15 in *Escherichia coli* O25b-B2-ST131 isolates from the Kinki region of Japan. *Int J Antimicrob Agents.* Dec;42(6): 500-506.

HIROI M., YAMAZAKI F., HARADA T., TAKAHASHI N., IIDA N., NODA Y., YAGI M., NISHIO T., KANDA T., KAWAMORI F., SUGIYAMA K., MASUDA T., HARA-KUDO Y., OHASHI N. (2012). Prevalence of extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in food-producing animals. *J Vet Med Sci.* Feb;74(2): 189-195.

HO P.L., WONG R.C., CHOW K.H and QUE T.L. (2009). Distribution of integron-associated trimethoprim–sulfamethoxazole resistance determinants among *Escherichia coli* from humans and food-producing animals. *Lett Appl Microbiol.* 49: 627–634.

HOBMAN J. L. and CROSSMAN L. C. (2014). Bacterial antimicrobial metal ion resistance *J Medical Microbiol.* 64:471–497.

HONORE S., LASCOLS C., MALIN D., TARGAOUCHI R., CATTOIR V., LEGRAND P., SOUSSY C.-J. et CAMBAU E. (2006). Émergence et diffusion chez les entérobactéries du nouveau mécanisme de résistance plasmidique aux quinolones Qnr (résultats hôpital Henri-Mondor 2002–2005). *Pathologie Biologie*, 54: 270–279.

HOPKINS K. L., DAVIES R. H., and THRELFALL E. J. (2005). Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. *Int J Antimicrob Agents.* 25:358–373.

HOWE P.D. **and DOBSON S. (2002).** Silver and silver compounds: environmental aspects. Concise International Chemical Assessment Document 44. World Health Organization Geneva, pp1-35.

HUJA S., OREN Y., TROST E., BRZUSZKIEWICZ E., BIRAN D. , BLOM J., GOESMANN A., GOTTSCHALK G., HACKER J., RON EZ. and DOBRINDT U. (2015). Genomic avenue to avian colisepticemia. *MBio.* Jan 13;6(1).

HUSS J. M. (2011). Les risques sanitaires des métaux lourds et d'autres métaux. DOC 126 13 Rapport. Commission des questions sociales, de la santé et de la famille. Conseil de l'Europe.

HUSSEIN A.H., GHANEM I.A., EID A.A., ALI M.A., SHERWOOD JS., LI G., NOLAN L.K. and LOGUE C.M. **(2013).** Molecular and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolated from broiler chicken flocks in Egypt. *Avian Dis.* Sep;57(3): 602-611.

HYLAND R. M., SUN J., GRIENER T. P., MULVEY G. L., KLASSEN J. S., DONNENBERG M. S. and ARMSTRONG G. D. (2008). The bundlin pilin protein of enteropathogenic *Escherichia coli* is an Nacetyl lactosamine specific lectin. *Cell Microbiol.* 10:177-187.

ICHOU S. (2012). La filière avicole en Algérie.10èmes JSV Alger, 27 et 28 mai 2012 « La filière avicole : développement et promotion ».

INGRAM P.R., ROGERS B.A., SIDJABAT H.E., GIBSON J.S and INGLIS T.J. (2013). Co-selection may explain high rates of ciprofloxacin non-susceptible Escherichia coli from retail poultry reared without prior fluoroquinolone exposure. *J Med Microbiol*. 62: 1743–1746.

JACOB G. (2010). Émergence des entérobactéries sécrétrices de bêta-lactamases à spectre élargi. *OptionBio,* n° 438.

JACOBY G. A. (2005). Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clin Infect Dis.* 41: S120–126.

JAISHANKAR M., TSETEN T., ANBALAGAN N., MATHEW B. B., BEEREGOWDA K. N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip Toxicol.* June;7(2): 60–72.

JAUREGUY F. (2009). Déterminants cliniques et bactériens au cours des infections extra-intestinales dues à *Escherichia coli. Med Sci* (Paris). March; 25(3): 221–223.

JEAN F., FRANÇOIS R., ROLAND L. and PHILIPE R. **(2007).** Précis de Bactériologie clinique 2éme édition, ESKA.

JIANG H.X., LÜ D.H., CHEN Z.L., WANG X.M., CHEN J.R., LIU Y.H., LIAO X.P0, LIU J.H. and ZENG Z.L. (2011). High prevalence and widespread distribution of multi-resistant *Escherichia coli* isolates in pigs and poultry in China. *Vet J*. 187: 99–103.

JOLY B. et REYNAUD A. (2006). Entérobactéries : Systématiques et méthodes de diagnostic .Ed. TEC § DOC. Paris, pp.4(28), 2(29- 30), 3(31 37,38).

JOHNSON J.R., DELAVARI P., KUSKOWSKI M. **and STELL A.L. (2001).** Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli. J Infect Dis.* 183:78-88.

JOHNSON, J. R. and RUSSO T. A. (2005). Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli. Int J Med Microbiol.* 295:383□404.

JOHNSON T.J., KARIYAWASAM S., WANNEMUEHLER Y., MANGIAMELE P., JOHNSON S.J., DOETKOTT C., SKYBERG J.A., LYNNE A.M., JOHNSON J.R. and NOLAN L.K. (2007). The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *J Bacteriol.* Apr;189(8):3228-3236.

JOHNSON T.J., WANNEMUEHLER Y., DOETKOTT C., JOHNSON S.J., ROSENBERGER S.C. and NOLAN L.K. (2008a). Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *J Clin Microbiol*. 46:3987–3996.

JOHNSON T.J, WANNEMUEHLER Y., JOHNSON S.J., STELL A.L., DOETKOTT C., JOHNSON J.R., KIM K.S, SPANJAARD L. and NOLAN L.K (2008b). Comparison of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* strains from Human and Avian sources reveals a mixed Subset representing potential zoonotic pathogens. *Appl Environ Microbiol.* Nov;74(22):7043-50.

JOHNSON T.J. and NOLAN L.K. (2009). Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli. Microbiol Mol Biol Rev*. Dec;73(4):750-774. Review.

JOHNSON T.J., WANNEMUEHLER Y., KARIYAWASAM S., JOHNSON J.R., LOGUE C.M. and NOLAN L.K. (2012). Prevalence of Avian-Pathogenic *Escherichia coli* Strain O1 Genomic Islands among Extraintestinal and Commensal *E. coli* Isolates**.** *J Bacteriol*. Jun;194(11):2846-2853.

JUSTE C., CHASSIN P., GOMEZ A., LINERES M. et MOCQUOT B. (1995). Les micropolluants métalliques dans les boues résiduaires des stations d'épuration urbaines. Convention *Ademe/I.N.R.A.* (contrat INRA n° 22/92, 039.Contrat Ademe n°2750007).

KABATA-PENDIAS A. and PENDIAS H. (2001). Trace elements in soils and plants. CRC. Press London. p104.

KAMEYAMA M., CHUMA T., YABATA J., TOMINAGA K., IWATA H. and OKAMOTO K. J. (2013). Prevalence and Epidemiological Relationship of CMY-2 AmpC β-Lactamase and CTX-M Extended-Spectrum β-Lactamase Producing *Escherichia coli* Isolates from Broiler Farms in Japan. *Vet Med Sci* 75(8): 1009–1015.

KAPER J.B., NATARO J.P. and MOBLEY H.L (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. Feb;2(2): 123-140.

KAPER J.B. (2005). Pathogenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol*. Oct;295(6-7): 355-356.

KAR D., BANDYOPADHYAY S., BHATTACHARYYA D., SAMANTA I., MAHANTI A., NANDA P.K., MONDAL B., DANDAPAT P., DAS A.K., DUTTA T.K., **BANDYOPADHYAY S. and SINGH R.K. (2015).** Molecular and phylogenetic characterization of multidrug resistant extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolated from poultry and cattle in Odisha, India. *Infect Genet Evol*. Jan; 29:82-90.

KARCZMARCZYK, M., MARTINS, M., QUINN, T., LEONARD, N. and FANNING S. (2011). Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from food-producing animals. *Appl Environ Microbiol*. Oct; 7113–7120.

KAZEMNIA A., AHMADI M. and DILMAGHANI M. (2014). Antibiotic resistance pattern of different *Escherichia coli* phylogenetic groups isolated from human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Iran Biomed J*. 18(4): 219-224.

KEMPF I., FLEURY M.A , DRIDER D., BRUNEAU M., SANDERS P., CHAUVIN C., MADEC J.Y. and JOUY E. (2013). What do we know about resistance to colistin in *Enterobacteriaceae* in avian and pig production in Europe? *Int J Antimicrob Agents.* Nov;42(5): 379-383.

KHAN, M. and SCULLION, J. (2002). Effects of metal (Cd, Cu, Ni, Pb or Zn) enrichment of sewage-sludge on soil micro-organisms and their activities. Applied Soil Ecology, 20:145–155.

KILANI H., ABBASSI M.S., FERJANI S., MANSOURI R., SGHAIER S., BEN SALEM R., JAOUANI I., DOUJA G., BRAHIM S., HAMMAMI S., BEN CHEHIDA N. and BOUBAKER I.B. (2015). Occurrence of *bla* $_{\text{CTX-M-1}}$, qnrB1 and virulence genes in avian ESBL-producing *Escherichia coli* isolates from Tunisia., *Front Cell Infect Microbiol*. May 5;5:38.

KIM J., BAE I.K., JEONG S.H, CHANG C.L., LEE C.H and LEE K. (2011). Characterization of IncF plasmids carrying the *bla*CTX-M-14 gene in clinical isolates of *Escherichia coli* from Korea. *J Antimicrob Chemother*. 66: 1263–1268.

KOHANSKI M.A., DWYER D.J. and COLLINS J.J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol*. Jun;8(6):423-435.

KÖHLER C.D. and DOBRINDT U. (2011). What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli? J Med Microbiol*. (301): 642–647.

KOJIMA A., ISHII Y., ISHIHARA K., ESAKI H., ASAI T., ODA C., TAMURA Y., TAKAHASHI T. and YAMAGUCHI K. (2005). Extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *Antimicrob Agents Chemother.* Aug;49(8): 3533-3537.

KOZAK G.K., PEARL D.L., PARKMAN J., REID-SMITH R.J., DECKERT A. and BOERLIN P (2009). Distribution of Sulfonamide Resistance Genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* Isolates from Swine and Chickens at Abattoirs in Ontario and Quebec, Canada. *J Appl Environ Microbiol,* Sept; 5999–6001.

LAHLAOUI H., BEN HAJ KHALIFA A. and BEN MOUSSA M. (2014). Epidemiology of *Enterobacteriaceae* producing CTX-M type extended spectrum β-lactamase (ESBL). *Med Mal Infect*. Sep;44(9): 400-404. Review.

LAMY I. **(2002).** Réactivité des matières organiques des sols vis-à-vis des métaux. Journées nationales de l'étude des sols. pp 22.

LARTIGUE M.F., POIREL L. and NORDMANN P. (2004). Diversity of genetic environment of *bla*(CTX-M) genes**.** *FEMS Microbiol Lett*. May 15;234(2): 201-207.

LA RAGIONE R. M. and WOODWARD M. J. **(2002).**Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res Vet Sci*. 73: 27–35.

LAVIGNE J. F., SOTTO A., MERLE C., JOURDAN J., SOUSSY C. J. et SIROT D. (2009). Résistance enzymatique d'*Escherichia coli* aux béta-lactamases et prévalence en clinique, *Pathologie Biologie*, 50(6):388-393.

LEBART L., PIRON M. et MORINEAU A. (2006). Statistique exploratoire multidimensionnelle Collection: Sciences Sup, Dunod - 4ème édition -pp 480.

LEDIN M. (2000). Accumulation of metals by microorganisms-processes and importance for soils systems. *Earth-Science Reviews*, 51(1-4): 1-31.

LEE Y.J, CHO J.K., KIM K.S., TAK R.B., KIM A.R., KIM J.W., IM S.K. and KIM B.H. (2005). Fluoroquinolone resistance and gyrA and parC mutations of *Escherichia coli* isolated from chicken. *J Microbiol*. Oct;43(5): 391-397.

LE MINOR L. et VERON M. (1982). Bactériologie médicale. p244. Editions Flammarion. Médecine-Sciences.

LEVERSTEIN-VAN HALL M.A., DIERIKX C.M., COHEN STUART J., VOETS G.M., VAN DEN MUNCKHOF M.P., VAN ESSEN-ZANDBERGEN A, PLATTEEL T, LEVERSTEIN-VAN HALL M.A., DIERIKX C.M., COHEN STUART J., VOETS G.M., VAN DEN MUNCKHOF M.P., VAN ESSEN-ZANDBERGEN A., PLATTEEL T., FLUIT A.C., VAN DE SANDE-BRUINSMA N., SCHARINGA J., BONTEN M.J., MEVIUS D.J. and NATIONAL ESBL SURVEILLANCE GROUP. (2011). Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin Microbiol Infect.* Jun;17(6): 873-880.

LEVY S.B. and MARSHALL B. (2004). Antibacterial resistance worldwide : causes, challenges and responses. *Nat Med*. 10: 122-129.

LI J., MA Y., HU C., JIN S., ZHANG Q., DING H., RAN L., CUI S. (2010). Dissemination of cefotaxime-M-producing *Escherichia coli* isolates in poultry farms, but not swine farms, in China. *Foodborne Pathog Dis.* Nov;7(11):1387-1392.

LI L., JIANG Z.G., XIA L.N., SHEN J.Z., DAI L., WANG Y., HUANG S.Y. and WU C.M. (2010). Characterization of antimicrobial resistance and molecular determinants of beta-lactamase in *Escherichia coli* isolated from chickens in China during 1970–2007. *Vet Microbiol.* 144: 505–510.

LI L., WANG B., FENG S., LI J., WU C., WANG Y., RUAN X. and ZENG M. (2014). Prevalence and Characteristics of Extended-Spectrum b- Lactamase and Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolated from Chickens in Anhui Province, China. PLoS One, 2014 Aug 20;9(8):e104356.

LI Y., CHEN L., WU X. and HUO S. (2015). Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers. *Poult Sci.* Apr. 94(4):601-611.

LIAO X.P., LIU B.T., YANG Q.E, SUN J., LI L., FANG L.X and LIU Y.H. (2013). Comparison of plasmids coharboring 16srrna methylase and extended- spectrum beta-lactamase genes among *Escherichia coli* isolates from pets and poultry. *J Food Prot*. 76: 2018–2023.

LIMA-BITTENCOURT C.L., CURSINO L., GONCALRES-DORNELAS H., PONTES D.S., NARDI R.M., CALISTO M., CHARTON-SOUZA E. et NASCIMENTO A.M. (2007). Multiple antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* isolates from pristine fresh- water. *Genet Mol Res.* 6(3):510-521.

LIU B.T., YANG Q.E., LI L., SUN J., LIAO X.P. and FANG L.X. (2013). Dissemination and characterization of plasmids carrying *oqxAB bla*$_{\text{CTX-M}}$ genes in *Escherichiacoli* isolates from food producing animals. *PlosONE* 8:e73947.

LIU Y.Y., WANG Y., WALSH T.R., YI L.X., ZHANG R., SPENCER J., DOI Y., TIAN G., DONG B., HUANG X., YU L.F., GU D., REN H., CHEN X., ZHOU H., LIANG Z. and LIU J.H. (2015). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and

human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* Feb;16(2): 161-168.

LIVERMORE D.M. (**1995).** Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* Oct;8(4):557-584. Review.

LIVERMORE D.M., CANTON R., GNIADKOWSKI M., NORDMANN P., ROSSOLINI G.M., ARLET G., AYALA J, COQUE T.M., KERN-ZDANOWICZ I., LUZZARO F., POIREL L. and WOODFORD N. (2007). CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother*. Feb;59(2): 165-174.

LIVERMORE D.M. (2012). Fourteen years in resistance. *Int J Antimicrob Agents.* Apr; 39(4):283-294.

LOPEZ-SANDOVAL H., LONDONO-LEMOS M.E., GAZA-VELASCO R., POBLA- NO-MELENDEZ I., GRANADA-MACIAS P., GRACTA-MORA F. et BARBA- BEHRENS N. (2008). Synthesis, structure and biological activites of cadmium and zinc coordination compounds With 2-benzimidazole derivatives. *J Inorg Biochem*. 102(5): 342-347.

LOUE A. (1993). Oligoélement en agriculture. *Ed. Vathan* (ed). pp45-177.

MAAMAR E., HAMMAMI S., ALONSO C.A., DAKHLI N., ABBASSI M.S., FERJANI S., HAMZAOUI Z., SAIDANI M., TORRES C. and BOUTIBA-BEN BOUBAKER I. (2016). High prevalence of extended-spectrum and plasmidic AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from poultry in Tunisia. *Int J Food Microbiol.* May 3 (231): 69-75.

M.A.D.R. (2012). Ministère de l'agriculture et du développement rural, Avant projet d'une charte de qualité et pacte de croissance encadrant et engageant les activités des Professionnels de la filière avicole pour la Structuration et la modernisation de l'aviculture Nationale. p33.

MALIK A. (2004). Metal bioremediation through growing cells. *Environment International*, **30**(2): 261-278.

MAJIDUDDIN F.K., MATERON I.C. and PALZKILL T.G. (2002). Molecular analysis of beta-lactamase structure and function. *Int J Med Microbiol.* Jul;292(2): 127-137.

MAHROUKI S., BELHADJ O., CHIHI H., MOHAMED B.M., CELENZA G., AMICOSANTE G. and PERILLI M. (2012). Chromosomal $bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$ associated with ISEcp1 in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii* isolated at the Military Hospital of Tunis, Tunisia. *J of Med Microbiol.* 6: 1286–1289.

MAINIL, J. G. (2000). Le point des connaisances sur les enterites à *Escherichia coli* chez le veau. *Ann Med Vet.* 144**:** 121-136.

MAINIL, J. G. (2003). Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* : I) les adhésines et facteurs de colonisation *Ann Méd Vét.* 147: 105-126.

MAINIL, J. (2013). *Escherichia coli* virulence factors. *Vet Immunol Immunopathol.* Mar 15;152(1-2): 2-12.

MALUTA R.P., LOGUE C.M., CASAS M.R., MENG T., GUASTALLI E.A., ROJAS T.C., MONTELLI A.C., SADATSUNE T., DE CARVALHO RAMOS M., NOLAN L.K., and da SILVEIRA W.D. (2014). Overlapped Sequence Types (STs) and Serogroups of Avian Pathogenic (APEC) and Human Extra-Intestinal Pathogenic (ExPEC) *Escherichia coli* Isolated in Brazil. PLoS One. Aug 12;9(8):e105016.

MANGIAMELE P., NICHOLSON B., WANNEMUEHLER Y., SEEMANN T., LOGUE C.M., LI G., TIVENDALE K.A and NOLAN L.K. (2013). Complete genome sequence of the Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strain APEC O78. *Genome Announc*. Mar 21;1(2).e0002613.

MANGES A.R. and JOHNSON J.R. (2012). Food-Borne Origins of *Escherichia coli* Causing Extraintestinal Infections. *Clin Infect Dis*. Sep;55(5): 712-719.

MAO D., YU S., RYSZ M., LUO Y., YANG F., LI F., HOU J., MU Q. and ALVAREZ P.J (2015). Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants. *Water Res.* Nov15;85: 458-466.

MARTIN S. and GRISWOLD W. (2009). Human health effects of heavy metals. *Environmental Science and Technology Briefs for Citizens,* (15): 1–6.

MARTÍNEZ, J.L., VICENTE, M.F., DELGADO-IRIBARREN, A., PÉREZ-DÍAZ, J.C. and BACQUERO, F. (1989). Small plasmids are involved in amoxicillin-clavulanate resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. Apr;33(4):595.

MARTINEZ J.L. and BAQUERO F. (2000). Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. Jul;44(7):1771-1777.

MATHERS A.J, PEIRANO G. and PITOUT J.D. **(2015).** The role of epidemic resistance plasmids and international high risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Rev*. Jul;28(3): 565-591.

MATYAR F., AKKAN T., UÇAK Y. and ERASLAN B. (2010). *Aeromonas* and *Pseudomonas* : antibiotic and heavy metal resistance species from Iskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea). *Environ Monit Assess.* 167: 309–320.

McKENZIE A.B., FARMER J.G., SUGDEN C.L. (1997). Isotope evidence of the relative retention and mobility of lead, and radio caesium in Scottish ombrotrophic peats. *The science of the total environment*, 203(2):115-127.

MELLATA M., MADDUX J.T., NAM T., THOMSON N., HAUSER H., STEVENS M.P., MUKHOPADHYAY S., SARKER S., CRABBÉ A., NICKERSON C.A., SANTANDER J. and CURTISS R R.D. (2012). New insights into the bacterial fitness associated mechanisms revealed by the characterization of large plasmids of an avian pathogenic *E. coli*. PLoS One.;7(1):e29481.

MELLATA M. (2013). Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* : infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. *Foodborne Pathog Dis.* Nov;10(11): 916-932.

MERENS A. et SERVONNET A. (2010). Mécanismes et épidémiologie de la résistance aux fluoroquinolones en 2010 - Revue francophone des laboratoires RFL, mai 40 (422): 33-41.

MESAROS N., VAN BAMBEKE F., GLUPCZYNSKI Y., VANHOOF R. and TULKENS P.M. (2005). L'efflux des antibiotiques : un mécanisme ubiquitaire conduisant à la résistance. Etat de la question et implications microbiologiques et cliniques**.** Louvain Médical ; 124(8): 308-320.

MESSAI Y., BENHASSINE T., NAIM M., PAUL G. and BAKOUR R. (2006). Prevalence of beta-lactams resistance among *Escherichia coli* clinical isolates from a hospital in Algiers *Rev Esp Quimioterap,* June;19 (2): 144-151.

MESSAI, Y., IABADENE H., BENHASSINE T, ALOUACHE S., TAZIR M., GAUTIER V., ARLET G. and BAKOUR R. (2008). Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). *Pathol Biol.* 56: 319–325.

MESSAI C.R., KHELEF D., BOUKHORS K.T., RADJI N., GOUCEM R. and HAMDI T.M. (2013). Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens affected by colibacillosis in Setif. *Afr J Microbiol. Res* May;7(21): 2668-2672.

MICKAEL M. et JOHN M. (2007). Biologie des microorganismes, 11ème édition, Broeck pp. 665-665.

MIQUEL G. (2001). Rapport sur les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé, l'office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques. Rapport d'information n° 261 (2000-2001)**.** pp11-12.

MITCHELL N.M., JOHNSON J.R., JOHNSTON B., CURTISS R. and MELLATA M. (2015). Zoonotic potential of *Escherichia coli* isolates from retail chicken meat products and eggs. *Appl Environ Microbiol*. Feb;81(3): 1177-87.

MO S.S., NORSTRÖM M., SLETTEMEÅS J.S., LØVLAND A., URDAHL A.M. and SUNDE M (2014). Emergence of AmpC producing *Escherichia coli* in the broiler production chain in a country with a low antimicrobial usage profile. *Vet Microbiol.* Jul 16;171(3-4): 315-320.

MOHAMED M.A., SHEHATA M.A. and RAFEEK E. (2014). virulence genes content and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* from Broiler Chickens. *Vet Med Int.* 2014:195189.

MOHAN D., PITTMAN C.U. and STEELE P.H. (2006). Single, binary and multi component adsorption of copper and cadmium from aqueous solutions on Kraft lignin a biosorbent. *Journal of colloid and interface science*, 297: 489-504.

MONCHY S., VALLAEYS T., BOSSUS A. and MERGEAY, M. (2006). Metal transport ATPase genes from *Cupriavidus metallidurans* CH34: a transcriptomic approach. *Int Environ Anal Chem.* 86(9): 677-692.

MOON D.C., SEOL S.Y., GURUNG M., JIN J.S., CHOI C.H., KIM J., LEE Y.C., CHO D.T. and LEE J.C (2010). Emergence of a new mutation and its accumulation in the topoisomerase IV gene confers high levels of resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* isolates. *Int J Antimicrob Agents.* Jan;35(1): 76-79.

MORA A., VISO S., LOPEZ C., ALONSO M.P., GARCIA-GARROTE F., DABHI G, MAMANI R., HERRERA A., MARZOA J., BLANCO M., BLANCO J.E., MOULIN-SCHOULEUR M. SCHOULER C. and BLANCO J. (2013). Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45:K1:H7-B2-ST95 in humans J *Vet Microbiol.* Dec 27;167(3-4):506-512.

MORGAN-LINNELL S.K., BECNEL BOYD L., STEFFEN D. and ZECHIEDRICH L. (2009). Mechanisms accounting for fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. Jan;53(1):235-241.

MOULIN-SCHOULEUR M., SCHOULER C. and TAILLIEZ P. (2006). Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. *J Clin Microbiol*. 44: 3484–3492.

MOULIN-SCHOULEUR M., REPERANT M., LAURENT S., BREE A., MIGNON-GRASTEAU S., GERMON P., RASSCHAERT D. and SCHOULER C. (2007). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J Clin Microbiol.* 45: 3366-3376.

MULLAPUDI S., SILETZKY R.M. and KATHARIOU S. (2008). Heavy metal and benzalkonium chloride resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from the environment of turkey processing plants. *Appl Environ Microbiol*. Mar;74(5): 1464-1468.

MULVEY M.R., BRYCE E., BOYD D.A., OFNER-AGOSTINI M, LAND A.M., SIMOR A.E. and PATON S. (2005). Molecular characterization of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* from Canadian Hospitals *Antimicrob Agents Chemother*. Jan;49(1): 358-365.

MUYLAERT A. et MAINIL J.G (2013). Résistances aux fluoroquinolones : la situation actuelle. *Ann Méd Vét.*157: 15-26.

NAKAHARA H., ISHIKAWA T., SARAI Y., KONDO I., KOZUKUE H. and SILVER S. (1977). Linkage of mercury, cadmium and arsenate and drug résistance in clinical isolates of *P. aeruginosa*. *Appl Environ Microbial*. 33(4): 975-976.

NANDANWAR N., JANSSEN T., KÜHL M., AHMED N., EWERS C. and WIELER L.H. (2014). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) of human and avian origin belonging to sequence type complex 95 (STC95) portray indistinguishable virulence features. *Int J Med Microbiol.* Oct;304(7): 835-842.

NASEER U. and SUNDSFJORD A. (2011). The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. *Microb Drug Resist*. Mar;17(1): 83-97.

NATARO J.P. and KAPER J.B. **(1998).** Diarrheagenic *Escherichia coli***.** *Clin Microbiol Rev*. Jan; 11(1): 142-201.

NGUYEN J.C. et LAMBERTA T. (2012). Interprétation phénotypique de l'antibiogramme vis-à-vis des aminosides. *Revue francophone des laboratoires* - Septembre-Octobre- N° 445.

NIES D.H. and SILVER S (1995). Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J Ind Microbiol.* Feb;14(2): 186-199.

NIES D.H. (1999). Microbial heavy-metal resistance, *Appl Microbiol and Biotech*. 51(6): 730-750.

NILSSON O., BÖRJESSON S., LANDÉN A. and BENGTSSON B. (2014). Vertical transmission of *Escherichia coli* carrying plasmid-mediated AmpC (pAmpC) through the broiler production pyramid. *J Antimicrob Chemother*. 69: 1497–1500.

NORDMANN P. (2006). L'émergence de la résistance plasmidique aux quinolones chez les entérobactéries. *Éditorial, Path Biol.* 54: 7–9.

NORDMANN P. and CARRER A**. (2010).** Carbapenemases in enterobacteriaceae. *Arch Pediatr*. Sep;17 Suppl 4:S154-162.

NORDMANN P. et DORTET L. and POIREL L. (2012). Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae* : here is the storm! *Trends Mol Med.* May;18(5): 263-272.

OCTAVIA S. and LAN R. (2014). Rosenberg *et al.* (eds.), The Prokaryotes – *Gammaproteobacteria: the family Enterobacteriaceae p226-286*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

OGER C., BERTHE T., QUILLET L., BARRAY S., CHIFFOLEAU J.F. and PETIT F. **(2001).** Estimation of the abundance of the cadmium resistance gene *cadA* in microbial communities in polluted estuary water**.** *Res. Microbiol*. 152:671–678.

OLSEN RH., CHRISTENSEN H. and BISGAARD M. (2012). Comparative genomics of multiple plasmids from APEC associated with clonal outbreaks demonstrates major similarities and identifies several potential vaccine-targets. *Vet Microbiol*. 158: 384–393.

OLSEN R.H., BISGAARD M., LÖHREN U., ROBINEAU B. and CHRISTENSEN H. (2014). Extended-spectrum β-lactamase producing *Escherichia coli* isolated from poultry: a review of current problems, illustrated with some laboratory findings. *Avian Path.* 43:(3): 199–208.

OOSTERIK LH., PEETERS L., MUTUKU I., GODDEERIS B.M. and BUTAYE P. **(2014).** Susceptibility of avian pathogenic *Escherichia coli* from laying hens in Belgium to antibiotics and disinfectants and integron prevalence. *Avian Dis*. Jun;58(2): 271-278

ORSKOV F. and et ORSKOV I. (1992). *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can J Microbiol.* Jul;38(7): 699-704.

OTEO J., CERCENADO E., CUEVAS O., BAUTISTA V., DELGADO-IRIBARREN A., ORDEN B., PÉREZ-VÁZQUEZ M., GARCÍA-COBOS S. and CAMPOS J. (2010). AmpC β-lactamases in *Escherichia coli* : emergence of CMY-2–producing virulent phylogroup D isolates belonging mainly to STs 57, 115, 354, 393, and 420, and phylogroup B2 isolates belonging to the international clone O25b–ST131. *Diagn Microbiol Infect Dis*. Jul;67(3): 270–276.

PAL C., PALME J. B., KRISTIANSSON E. and JOAKIM LARSSON D. G. (2015). Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC Genomics*, 16:964.

PAGÈS D., SANCHEZ L., CONROD S., GIDROL X., FEKETE A., SCHMITTKOPPLIN P. and ACHOUAK W. (2007). Exploration of intraclonal adaptation mechanisms of *Pseudomonas brassicacearum* facing cadmium toxicity. *Env Microbiol.* 9(11): 2820-2835.

PATERSON D.L. and BONOMO R.A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* Oct;18(4): 657-686.

PEIRANO G. and PITOUT J.D. (2010). Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M beta-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *Int J Antimicrob Agents*. Apr;35(4): 316-321. Review.

PEMBROKE J. T., MacMAHON C. and MCGRATH B. (2002). The role of conjugative transposons in the *Enterobacteriaceae* CMLS, *Cell. Mol. Life Sci*. 59: 2055–2064.

PERRIN-GUYOMARD A., GICQUEL-BRUNEAU M., LOUAPRE P., LAURENTIE M. and SANDERS P. (2008) Caracterization of *Escherichia coli* by polymerase chain reaction for French monitoring programme on antimicrobial resistance in indicator bacteria. 4th conference on AAVM, Prague, August 24-28

PETERSEN A., CHRISTENSEN J. P., KUHNERT P., BISGAARD M. and OLSEN J. E. (2006). Vertical transmission of a fluoroquinolone resistant *Escherichia coli* within an integrated broiler operation. *Vet Microbiol.* 116: 120–128.

PHILIPPON A. et ARLET G (2005). Les β-lactamases chez les bacilles à Gram négatif : que de nouveautés en 15ans! Antibiotiques; 7:247-259

PHILIPPON A. et ARLET G (2006). Les bêta-lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel ! *Ann Biol Clin.* 64(1): 37-51.

PHILIPPON A. et ARLET G. (2012). Entérobactéries et bêta-lactamines : phénotypes de résistance naturelle. *Path Biol* 60:112–126.

PHILIPPON A. (2013). Les bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu(BLSE**).** *J immbio.* 04.006.

PITOUT JD, NORDMANN P. and POIREL L (2015). Carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob Agents Chemother*. Oct;59(10): 5873-84.

POEY J.A et PHILIBERT C. (2000). La toxicité des métaux Revue Française des Laboratoires, mai/juin (323): 35–43.

POHL P., GHYSEL S.G., THOMAS J., MOURY J. and CHASSEUR M.L. (1977). Résistance aux antibiotiques et aux métaux et pouvoir colicinogène de la flore bactrienne des eaux. *Méd Malad Infect.* 7(7): 334-338.

POIATĂ A., BĂDICUȚ I., INDREȘ M., BIRO M. and BUIUC D. (2000). Mercury resistance among clinical isolates of *Escherichia coli. Roum Arch Microbiol Immunol.* Jan-Jun;59(1-2): 71-79.

POIREL L., PHAM J.N., CABANNE L., GATUS B.J., BELL SM, NORDMANN P. (2004). Carbapenem hydrolysing metallo-beta-lactamases from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolated in Australia. *Pathology*, Aug;36(4):366-367.

POIREL L., NAAS T. et NORDMANN P. (2008). Genetic support of extended spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* Jan;14 Suppl 1:75-81.

POIREL L., NAAS T. and NORDMANN P. (2010). Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* Jan;54(1): 24-38.

POIREL L., CATTOIR V. and NORDMANN P. (2012). Plasmid mediated quinolone resistance ; interactions between human, animal, and environmental ecologies. *Front Microbiol.* Feb 2(3):24. 1-7.

POOLE K. (2002). Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *J Appl Microbiol. Symposium* Supplement, 92: 55S–64S.

PRAGER R., STRUTZ U., FRUTH A. and TSCHÄPE H. (2003). Subtyping of pathogenic *Escherichia coli* strains using flagellar (H)antigens: serotyping versus fliC polymorphisms. *Int J Med Microbiol.* Feb;292(7-8): 477-486.

QUESADA A., PORRERO M.C., TÉLLEZ S., PALOMO G., GARCÍA M. and DOMÍNGUEZ L. (2015). Polymorphism of genes encoding PmrAB in colistin resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine. *J Antimicrob Chemother*. 70: 71–74.

RAMADE F. (2005). Elément d'écologie, écologie appliqué, 7ème édition. Ed. Dunod. pp307-309.

RAMDANI-BOUGUESSA N, MENDONÇA N, LEITÃO J, FERREIRA E, TAZIR M, CANIÇA M. (2006). CTX-M-3 and CTX-M-15 extended spectrum beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* from a hospital in Algiers, Algeria. *J Clin Microbiol.* Dec;44(12): 4584-4586.

RANDALL L. P., CLOUTING R. A., HORTON N. G., COLDHAM G., WU F. A., CLIFTON-HADLEY R., DAVIES H. and TEALE. C. J. (2011). Prevalence of *Escherichia coli* carrying extended spectrum beta-lactamases (CTX-M and TEM-52) from broiler chickens and turkeys in Great Britain between 2006 and 2009. *J. Antimicrob. Chemother.* 66: 86–95.

RANDALL L., WU G., PHILLIPS N., COLDHAM N., MEVIUS D. and TEALE C. (2012). Virulence genes in blaCTX-M *Escherichia coli* isolates from chickens and humans. *Res Vet Sci.* Aug;93(1): 23-27.

REICH F., ATANASSOVA V. and KLEIN, G., (2013). Extended spectrum beta-lactamase and AmpC producing *Enterobacteria* in healthy broilers chickens, Germany. *Emerg Infect Dis*. 19:1253–1259.

RENSING C. and GRASS G. (2003). *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol. Rev*.; 27:197–213.

ROBICSEK A., STRAHILEVITZ J., JACOBY G.A., MACIELAG M., ABBANAT D. and PARK C.H. **(2006).** Fluoroquinolone modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med*. 12: 83-88.

ROBINEAU B. et MOALIC P. Y. (2010). Une maladie d'actualité en production aviaire : La colibacillose. *Bull. Acad. Vét*. France. 163(3): 207-212.

ROBINS-BROWNE R.M. and HARTLAND E.L. (2002). *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. *J Gastroenterol Hepatol.* Apr;17(4): 467- 475.

RODRÍGUEZ I., THOMAS K., VAN ESSEN A., SCHINK A.K., DAY M., CHATTAWAY M., WU G., MEVIUS D., HELMUTH R. and GUERRA B. (2014). Chromosomal location of $bla_{\text{CTX-M}}$ genes in clinical isolates of *Escherichia coli* from Germany, The Netherlands and the UK. *Int J Antimicrob Agents.* Jun;43(6): 553-557.

RODRÍGUEZ-ROJAS A., RODRÍGUEZ-BELTRÁN J., COUCE A. and BLÁZQUEZ J. (2013). Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution. *Int J Med Microbiol.* Aug;303(6-7): 293-297.

RODRIGUEZ-SIEK K.E., GIDDINGS C.W., DOETKOTT C., JOHNSON T.J., FAKHR M.K. NOLAN and L.K. (2005). Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiol* 151: 2097-2110.

RODRIGUEZ-VILLALOBOS H. et STRUELENS M.J. (2006). Résistance bactérienne par β-lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimateur. Réanimation, 15: 205–213.

ROJAS T.C., MALUTA R.P., PARIZZI L.P., KOENIGKAN L.V., YANG J., YU J. and PEREIRA G.A. (2013). Genome sequences of avian pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from brazilian commercial poultry. *Genome Announc*. Mar 21;1(2): e0011013.

ROSEWARNE C.P., PETTIGROVE V., STOKES H.W. and PARSONS Y.M. **(2010).** Class1integrons in benthic bacterial communities: abundance, association with Tn402-like transposition modules and evidence for coselection with heavy-metal resistance. *FEMS Microbiol Ecol.* 72: 35–46.

ROUX M., SARRET G., PIGNOT-PAINTRAND I., FONTECAVE M. et COVES J. (2001). Mobilization of selenite by *Ralstoniametallidurans* CH34. *Appl and Env Microbiol.* **67**(2): 769-773.

RUSSO T.A. and JOHNSON J.R. (**2003).** Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect*. Apr;5(5): 449-456. Review.

SABRI M., CAZA M., PROULX J., LYMBEROPOULOS M.H., BREE A., MOULIN-SCHOULEUR M., CURTISS R and DOZOIS C.M. (2008). Contribution of the SitABCD, MntH, and FeoB metal transporters to the virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain chi7122. *Infect Immun*. Feb;76(2): 601-611.

SANDAA, R.A., TORSVIK, V. and ENGER, Ø. (2001). Influence of long-term heavy metal contaminations on microbial communities in soil. *Soil Biol. Biochem.* 33: 287-295.

SAIDI B., MAFIRAKUREVA P. and MBANGA J. (2013). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis in and around Harare, Zimbabwe. *Avian Dis.* Mar;57(1): 152-154.

SAIER M.H., TAM R., REIZER A. and REIZER J. (1994). Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Molec Microbiol.* 11(5):841-847.

SALEHI M. and GHANBARPOUR R. (2010). Phenotypic and genotypic properties of *Escherichia coli* isolated from colisepticemic cases of Japanese quail. *Trop Anim Health Prod.* Oct;42(7):1497-504

SALYERS AA., GUPTA A. and WANG Y. (2004). Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol.* Sep;12(9):412-416. Review.

SANDERS P., BOUSQUET-MELOU A., CHAUVIN C. and TOUTAIN P.-L. (2011) Utilisation des antibiotiques en élevage et enjeux de santé publique *INRA Prod. Anim., 24 (2): 199-204.*

SANITA DI T. and GABRIELLI. (1999). Response to cadmium in higher plants. *environ exp. Bot*, 41:105-130.

SARRET G., AVOSCAN L., CARRIERE M., COLLINS R., GEOFFROY N., CARROT F., COVES J. and GOUGET B. (2005). Chemical forms of Selenium in the Metal-Resistant Bacterium *Ralstonia metallidurans* CH34 exposed to Selenite and Selenate. *Appl and Env Microbiol.* 71(5): 2331-2337.

SCHAUFLER K., SEMMLER T., WIELER L.H., WÖHRMANN M., BADDAM R., AHMED N., MÜLLER K., KOLA A., FRUTH A., EWERS C. and GUENTHER S. (2016). Clonal spread and interspecies transmission of clinically relevant ESBL producing *Escherichia coli* of ST410 another successful pandemic clone? *FEMS Microbiol Ecol.* Jan;92(1).

SCHMIEDER, R. and EDWARDS R. (2012). Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. *Future Microbiol.* 7:73-89.

SCHOULER C., SCHAEFFER B., BREE A., MORA A., DAHBI G., BIET F., OSWALD E., MAINIL J., BLANCO J. and MOULIN-SCHOULEUR M. (2012). Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. *J Clin Microbiol*. 50: 1673–1678.

SCHROEDER C.M., WHITE D.G. and MENG J.H. (2004). Retail meat and poultry as a reservoir of antimicrobial-resistant *Escherichia coli. Food Microbiol.* 21:249–255.

SCHUHMACHER M., GRANERO S., BELLES M., LLOBET J.M. and DOMINGO J.L., (1996). Levels of metals in soils and vegetation in the vicinity of a municipal solid waste incinerator. *Toxicol Env Chem.* 56: 119-132.

SKURNIK D., RUIMY R., READY D., RUPPE E., BERNÈDE-BAUDUIN C., DJOSSOU F., GUILLEMOT D., PIER G.B. and ANDREMONT A. (2010). Is exposure to mercury a driving force for the carriage of antibiotic resistance genes? *J Med Microbiol.* Jul;59(7): 804-807.

SEILER C. and BERENDONK T.U. (2012). Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front Microbiol.* Dec 14;3:399.

SHAHADA F., CHUMA T., KOSUGI G., KUSUMOTO M., IWATA T. and AKIBA M. (2013). Distribution of extended-spectrum cephalosporin resistance determinants in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from broilers in southern Japan *Sci Poult* .92: 1641–1649.

SHWARZ et CHASLUS-DANCLA E. (2001). Usage des antibiotiques ; in « Usage vétérinaire des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine ». Healthcare associated infection, 3ème edition, pp. 2.

SILVEIRA E., FREITAS A.R., ANTUNES P., BARROS M. and NOVAIS C. (2014). Co-transfer of resistance to high concentrations of copper and first-line antibiotics among *Enterococcus* from different origins (humans, animals, the environment and foods) and clonal lineages. *J Antimicrob Chemother.* Apr;69(4):899-906.

SILVER S. and PHUNG L.T (1996). Bacterial heavy metal resistance: new surprises**.** *Annu Rev Microbiol.* 50: 753-789.

SKÖLD O. (2001). Resistance to trimethoprim and sulfonamides *Vet. Res.* 32:261–273.

SMET A., MARTEL A., PERSOONS D., DEWULF J., HEYNDRICKX M., CATRY B., HERMAN L., HAESEBROUCK F. and BUTAYE P. (2008). Diversity of extended-spectrum beta-lactamases and class C beta-lactamases among cloacal *Escherichia coli* Isolates in Belgian broiler farms. *Antimicrob Agents Chemother*. Apr;52(4): 1238-1243.

SOLÀ-GINÉS M., CAMERON-VEAS K., BADIOLA I., DOLZ R, MAJÓ N., DAHBI G., VISO S., MORA A., BLANCO J., PIEDRA-CARRASCO N., GONZÁLEZ-LÓPEZ J.J. and MIGURA-GARCIA L. (2015). Diversity of multi-drug resistant avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) causing outbreaks of colibacillosis in broilers during 2012 in Spain. PLoS One, Nov 23;10(11).

SONG W., KIM J., BAE I.K., JEONG S.H., SEO Y.H., SHIN J.H., JANG S.J., UH Y., SHIN J.H., LEE M.K. and LEE K (2011). Chromosome-encoded AmpC and CTX-M extended spectrum β-lactamases in clinical isolates of *Proteus mirabilis* from Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* Apr;55(4):1414-1419.

SORLOZANO, A., GUTIERREZ J., JIMENEZ A., DE DIOS LUNA J. and MARTINEZ J. L. (2007). Contribution of a new mutation in parE to quinolone resistance in extended spectrum-beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 45: 2740–2742.

SOUFI L., SÁENZ Y., VINUÉ L., ABBASSI M.S., RUIZ E., ZARAZAGA M., BEN HASSEN A., HAMMAMI S. and TORRES C. (2011). *Escherichia coli* of poultry food origin as reservoir of sulphonamide resistance genes and integrons. *Int J Food Microbiol*. Jan 5;144(3): 497-502.

STENUTZ, R., WEINTRAUB A. and WIDMALM G. (2006). The structures of *Escherichia coli* O polysaccharide antigens. *FEMS Microbiol Rev.* 30**:**382-403.

STOKES H.W and GILLINGS M.R. (2011). Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* 35:790–819.

STORDEUR P. et MAINIL J (2002). La colibacillose aviaire. *Ann. Méd. Vét.* 146:11-18.

SUN H., LI S., XIE Z., YANG F., SUN Y., ZHU Y., ZHAO X. and JIANG S. (2012). A novel multidrug resistance plasmid isolated from an *Escherichia coli* strain resistant to aminoglycosides. *J Antimicrob Chemother*. 67: 1635–1638.

SÜTTERLIN S., EDQUIST P., SANDEGREN L., ADLER M., TÄNGDÉN T., DROBNI M., OLSEN B. and MELHUS A. (2014). Silver Resistance Genes Are Overrepresented among *Escherichia coli* Isolates with CTX-M Production. *Appl Environ Microbiol.* Nov;80(22): 6863-6869.

TAKAHASHI, S. and NAGANO Y. (1984). Rapid procedure for isolation of plasmid DNA and application to epidemiological analysis. *J Clin Microbiol.* 20: 608–613.

TALEBIYAN R., KHERADMAND M., KHAMESIPOUR F. and RABIEE-FARADONBEH M. (2014). Multiple antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from chickens in Iran. *Vet Med Int.* 2014:491418.

TCHOUNWOU P.B., YEDJOU C.G., PATLOLLA A.K. and SUTTON D.J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. *EXS.* 101:133-64. Review.

TENOVER F.C., ARBEIT R.D., GOERING R.V., MICKELSEN P.A., MURRAY B.E., PERSING D.H. and SWAMINATHAN B. (1995). Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *J Clin Microbiol.* Sep;33(9): 2233-2239.

THOMAS C.M and NIELSEN KM. (2005). Mechanisms of, and barriers to horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol.* Sep;3(9): 711-721.

TONG P., SUN Y., JI X., DU X., GUO X., LIU J., ZHU L., ZHOU B., ZHOU W., LIU G. and FENG S. (2015). Characterization of antimicrobial resistance and extended-spectrum β-lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from chickens. *Foodborne Pathog Dis.* Apr;12(4): 345-352.

TORTORA G. J., FUNKE B. R. et CASE C. L. (2003). Introduction à la microbiologie. Ed. Du Renouveau pédagogique Inc., pp. 186, 604, 770.

TOSZEGHY M., PHILLIPS N., REEVES H., WU G., TEALE C., COLDHAM N. and RANDALL L. (2012). Molecular and phenotypic characterisation of extended spectrum beta-lactamase CTX-M *Escherichia coli* from farm animals in Great Britain. *Res Vet Sci*. Dec;93(3): 1142-1150.

TOUATI A., BENALLAOUA S., FORTE D., MADOUX J., BRASME L. and DE CHAMPS C. (2006). First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Béjaia, Algeria. *Int J Antimicrob Agents.* May;27(5): 397-402.

TREVORS J. F. (1985). Mercury bacteria isolted from sediments. *Bull Environ Toxicol*. 36(40): 465-472.

UCHIDA Y., MOCHIMARU T., MOROKUMA Y., KIYOSUKE M., FUJISE M., ETO F., HARADA Y., KADOWAKI M., SHIMONO N. and KANG D. (2010). Geographic distribution of fluoroquinolone resistant *Escherichia coli* strains in Asia. *Int J Antimicrob Agents.* Apr;35(4): 387-391.

USUI M., OZAWA S., ONOZATO H., KUGE R., OBATA Y., UEMAE T., NGOC P.T., HERIYANTO A., CHALEMCHAIKIT T., MAKITA K., MURAMATSU Y. and TAMURA Y. (2014). Antimicrobial susceptibility of indicator bacteria isolated from chickens in southeast asian countries (Vietnam, Indonesia and Thailand). *J Vet Med Sci.* 76(5): 685–692.

VALLS M. et LORENZO V. (2002). Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiol Rev*. 26: 327-338.

VANNI M., TOGNETTI R., CAGNARDI P., MONTESISSA C., PICCIRILLO A., ROSSI A.M., DI BELLO D. and INTORRE L. (2014). Fluoroquinolone resistance and molecular characterization of *gyrA* and *parC* quinolone resistance determining regions in *Escherichia coli* isolated from poultry. *Poult Sci.* 2014 Apr;93(4): 856-863.

VASILAKOPOULOU A., PSICHOGIOU M., TZOUVELEKIS L., TASSIOS P.T., KOSMIDIS C., PETRIKKOS G., ROMA E.S., CHARVALOS E., PASSIOTOU M, AVLAMI A. and DAIKOS G.L. (2009). Prevalence and characterization of class 1 integrons in *Escherichia coli* of poultry and human origin. *Foodborne Pathog Dis.* Dec;6(10): 1211-1218.

VON BAUM H. and MARRE R. (2005). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. *Int J Med Microbiol.* Oct;295(6-7): 503-511.

VEERESH H. (2003). Sorption and distribution of adsorbed metals in soils of India. Applied and environmental Geochemistry, 18: 1723-1731.

WALKES M.P. (2000). Cadmium carcinogenesis in review. *J Inong, biochimie* . 79: 241-244.

WALSH C. and FANNING S. (2008). Antimicrobial resistance in foodborne pathogens a cause for concern? *Curr Drug Targets.* Sep;9(9): 808-815.

WANG Q.R., CUI Y.S. LIU X.M., DONG Y.T. and CHRISTIE P. (2003). Soil contamination and plant uptake of heavy metals at polluted sites in China. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*.38 :823-838.

WANG X.M., LIAO X.P., ZHANG W.J., JIANG H.X., SUN J., ZHANG M.J., HE X.F., LAO D.X. and LIU Y.H. (2010). Prevalence of serogroups, virulence genotypes, antimicrobial resistance, and phylogenetic background of avian pathogenic *Escherichia coli* in south of China. *Foodborne Pathog Dis.* Sep;7(9): 1099-1106.

WANG S., XIA Y., DAI J., SHI Z., KOU Y., LI H., BAO Y. and LU C. (2011). Novel roles for autotransporter adhesion AatA of avian pathogenic *Escherichia coli*: colonization during infection and cell aggregation. *FEMS Immunol Med Micr.* 63: 328–338.

WANG S., MENG Q., DAI J., HAN X., HAN Y., DING C., LIU H. and YU S. (2014). Development of an allele-specific pcr assay for simultaneous sero typing of avian pathogenic *Escherichia coli* predominant O1, O2, O18 and O78 strains. PLoSOne. May7;9(5).

WANG, X., HAO H., XU Z., ZHENG H., LIU C., WEI L., ZHANG R., BI D., CHEN H., and TAN C. (2014). Plasmid-mediated multidrug resistance and virulence in an avian pathogenic *Escherichia coli* strain isolated in China. *J Global Antimicrobiol Resist.* 1:57–58.

WELCH R. A. (2006). The Genus *Escherichia* in Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria. Third Edition, Springer, CHAPTER 3.3.3 6:60–71.

WILKE M.S., LOVERING A.L. and STRYNADKA N.C. (2005). Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol.* Oct;8(5): 525-33.

WOODFORD N., FAGAN E. J. and ELLINGTON. M. J. (2006). Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 57: 154–155.

WOODFORD N., CARATTOLI,A., KARISIK E., UNDERWOOD A., ELLINGTON M.J. and LIVERMORE D.M. **(2009).** Complete Nucleotide Sequences of Plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, Encoding CTX-M Enzymes in Three Major Escherichia coli Lineages from the United Kingdom, All Belonging to theInternational O25:H4-ST131 Clone *Antimicrob Agents Chemother*. 53 (10), 4472-4482.

WOODFORD N., TURTON J.F. and LIVERMORE D.M. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 35:736–755.

WU L F., NAVARRO C., DE PINA K. and QUENARD M. (1994). Antagonistic effect of nickel on the fermentative growth of *Escherichia coli* K-12 and comparison of nickel and cobalt toxicity on the aerobic and anaerobic growth. *Environ Health Persp.* 102(3): 297-300.

XIE R., HUO S., LI Y., CHEN L., ZHANG F. and WU X. (2014). Molecular epidemiological survey on quinolone resistance genotype and phenotype of *Escherichia coli* in septicemic broilers in Hebei, China. *Poult Sci.* Feb;93(2): 335-339.

YAHIAOUI M., ROBIN F, BAKOUR R, HAMIDI M, BONNET R. and MESSAI Y. (2015). antibiotic resistance, virulence, and genetic background of community acquired uropathogenic *Escherichia coli* from Algeria. *Microb Drug Resist.* 21(5):516-526.

YALA D., MERAD A.S., MAHAMEDI D. et OUAR-KOROCHI M.N. (2001). Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine de Maghreb,* 9:15-16.

YANG H., CHEN S., WHITE D.G., ZHAO S., McDERMOTT P., WALKER R. and MENG J. (2004). characterization of multiple antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *J Clin Microbiol.* Aug;42(8):3483-3489.

YANG Q.E., SUN J., LI L., DENG H., LIU B.T., FANG L.X., LIAO X.P. and LIU Y.H. (2015). IncF plasmid diversity in multi-drug resistant *Escherichiacoli* strains from animals in China. *Front Microbiol.* Sep 22;6:964.

YAZDANKHAH S., RUDI K. and BERNHOFT A. (2014). Zinc and copper in animal feed development of resistance and co-resistance to antimicrobial agents in bacteria of animal origin. *Microbial Ecology in Health and Disease,* Sep 26, 25: 25862. Review.

YENNI P. (2003). Pathologie infectieuse. Médecine Science, 3ème Ed. , FLAMMARION, Paris, pp. 237-246.

ZGURSKAYA HI and NIKAIDO H. (2000). Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Mol Microbiol.* Jul; 37(2):219-225. Review.

ZAHAR J.R., GRALL I. et KOUATCHET A.T. (2010). Carbapénèmes : Nouvelles molécules, différentes indications? La lettre de l'infectiologue, 25 (4): 142-146.

ZHAI Q., NARBAD A. and CHEN W. (2015). Dietary strategies for the treatment of cadmium and lead toxicity. *Nutrients* 7: 552-571.

ZHANG T., WANG C.G., JIANG G.E., LV J.C. and ZHONG X.H. (2012a). Molecular epidemiological survey on aminoglycoside antibiotics resistant genotype and phenotype of avian *Escherichia coli* in North China. *Poult Sci.* 91: 2482–2486.

ZHANG T., WANG C.G., LV J.C., WANG R.S. and ZHONG X.H. (2012b). Survey on tetracycline resistance and antibiotic-resistant genotype of avian *Escherichia coli* in North China. *Poult Sci.* Nov:91(11): 2774-2777.

ZHANG, F.Y., HUO S.Y., LI Y. R., XIE R., WU X. J., CHEN L. G. and Y. GAO H. (2014). A survey of the frequency of aminoglycoside antibiotic-resistant genotypes and phenotypes in *Escherichia coli* in broilers with septicaemia in Hebei, China. *Br. Poult Sci.* 55: 305–310.

ZHANEL G.G., JOHANSON C., EMBIL J.M., NOREDDIN A., GIN A., VERCAIGNE L. and HOBAN D.J. (2005). Ertapenem : review of a new carbapenem. *Expert Rev Anti Infect Ther.* Feb;3(1): 23-39. Review.

ZHAO S., MAURER J.J., HUBERT S., DE VILLENA J.F., MCDERMOTT P.F., MENG J., AYERS S., ENGLISH L. and WHITE D.G. (2005). Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Vet Microbiol.* May20; 107(3-4): 215-224.

ZHENG H., ZENG Z., CHEN S., LIU Y., YAO Q., DENG Y., CHEN X., LV L., ZHUO C., CHEN Z. and LIU JH. (2012). Prevalence and characterisation of CTX-M β-lactamases amongst *Escherichia coli* isolates from healthy food animals in China. *Int J Antimicrob Agents.* Apr;39(4): 305-310.

ZHU YG., JOHNSON T.A., SU J.Q., QIAO M., GUO G.X., STEDTFELD R.D., HASHSHAM S.A. and TIEDJE J.M. (2013). Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proc Natl Acad Sci* U S A. Feb 26;110(9): 3435-40.

ZHU G.E.X., JIANG J., PAN Z., HU L., WANG S, WANG H., LEUNG F.C., DAI J. and FAN H. (2014). Comparative genomic analysis shows that avian pathogenic *Escherichia coli* isolate IMT5155 (O2:K1:H5; ST complex 95, ST140) shares close relationship with ST95 APEC O1:K1 and human ExPEC O18:K1 strains**.** PLoS One. Nov 14;9(11):e112048.

ZURFLUH K., GLIER M., HÄCHLER H. and STEPHAN R. (2015). Replicon typing of plasmids carrying $bla_{\text{CTX-M-15}}$ among *Enterobacteriaceae* isolated at the environment, livestock and human interface. *Sci Total Environ.* Jul; 521-522: 75-528.

Sites consultés

BOUTIBA –BEN BOUBAKER I. (2013)

http://www.infectiologie.org.tn/pdf/diaporama/inf_bacterienne/resistance_fluoroquinolones.pdf

Glossaire

- **Aérosacculite :** Inflammation des sacs aériens des oiseaux par infection.
- **Arthrite :** Inflammation aiguë ou chronique d'une articulation.
- **Coligranulomatose :** Elle se caractérise par une ascite et des lésions de granulomes multiples dans les parois intestinales et d'autres organes : cœcum, foie, etc.. Ils sont dus à une réaction de l'organisme autour d'amas de colibacilles, *Escherichia coli*.
- **Omphalite :** maladie caractérisée par l'infection du sac vitellin et une Infection de la cicatrice ombilicale.
- **Périhépatite :** Inflammation de la capsule du foie ou du péritoine qui l'entoure.
- **Péritonite :** Inflammation aiguë ou chronique du péritoine.
- **Polysérosite :** Inflammation généralisée des séreuses avec effusions.
- **Salpingite :** Inflammation de l'oviducte.

Publication et Communications

Communications

Le présent travail a également fait l'objet de deux communications affichées :

1- « Caractérisation moléculaire de souches d'*E.coli* aviaires productrices de BLSE, isolées de la région Centre d'Algérie ».
Meguenni N., Le Devendec L., Jouy E., Bounar-Kechih S., Bakour R. et Kempf I.
A la **32è Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. (RICAI)**
Le 22 et 23 novembre 2012 au CNIT, Paris La Défense, France.

2 – « Caractérisation phénotypique de la métallo-antibiorésistance d'*E.coli* aviaires pathogènes isolées de la région Centre Algérien ».
Meguenni N., Boumghar T., Bounouar D., Kechih-Bounar S. et Bakour R.
Séminaires International sur les Sciences Alimentaires.
Le 14-16 Octobre 2014 Constantine, Algérie.

BioOne RESEARCH EVOLVED

First Description of an Extended-Spectrum Cephalosporin- and Fluoroquinolone-Resistant Avian Pathogenic *Escherichia coli* Clone in Algeria

Author(s): Nacima Meguenni, Laetitia Le Devendec, Eric Jouy, Maena Le Corvec, Saliha Bounar-Kechih, Rabah Bakour, and Isabelle Kempf
Source: Avian Diseases, 59(1):20-23.
Published By: American Association of Avian Pathologists
DOI: http://dx.doi.org/10.1637/10804-022414-Reg.1
URL: http://www.bioone.org/doi/full/10.1637/10804-022414-Reg.1

BioOne (www.bioone.org) is a nonprofit, online aggregation of core research in the biological, ecological, and environmental sciences. BioOne provides a sustainable online platform for over 170 journals and books published by nonprofit societies, associations, museums, institutions, and presses.

Your use of this PDF, the BioOne Web site, and all posted and associated content indicates your acceptance of BioOne's Terms of Use, available at www.bioone.org/page/terms_of_use.

Usage of BioOne content is strictly limited to personal, educational, and non-commercial use. Commercial inquiries or rights and permissions requests should be directed to the individual publisher as copyright holder.

BioOne sees sustainable scholarly publishing as an inherently collaborative enterprise connecting authors, nonprofit publishers, academic institutions, research libraries, and research funders in the common goal of maximizing access to critical research.

AVIAN DISEASES 59:20–23, 2015

First Description of an Extended-Spectrum Cephalosporin- and Fluoroquinolone-Resistant Avian Pathogenic *Escherichia coli* Clone in Algeria

Nacima Meguenni,[AB] Laetitia Le Devendec,[BC] Eric Jouy,[BC] Maena Le Corvec,[BC] Saliha Bounar-Kechih,[D] Rabah Bakour,[E] and Isabelle Kempf[BCF]

[A]Département de Biochimie Microbiologie, Faculté des Sciences biologiques et Agronomiques, Université Mouloud Mammeri, 16000 Tizi Ouzou, Algeria
[B]ANSES-Laboratoire de Ploufragan-Plouzané Unité Mycoplasmologie Bactériologie, 22440 Ploufragan, France
[C]Université Européenne de Bretagne, 35000 Rennes, France
[D]Laboratoire vétérinaire régional de Draa Ben Khedda, Wilaya de Tizi Ouzou, 1500 Algeria
[E]Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Faculté des Sciences Biologiques, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, 16110 Bab-Ezzouar, Alger, Algeria

Received 25 February 2014; Accepted 24 August 2014 and revised Published ahead of print 29 August 2014

SUMMARY. Eleven avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains isolated from 2006 to 2010 from different farms in Algeria and resistant to cephalosporins were studied. Their susceptibility to antimicrobials was determined by disk diffusion, and the genes responsible for resistance to critical antimicrobials were studied by PCR, sequencing, and conjugation. Their genetic profiles were compared by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). All strains were resistant to extended-spectrum cephalosporins, ciprofloxacin, tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole, and neomycin and showed the same PFGE profile. For most of them, resistance was encoded by a nontransferable group 1 $bla_{\text{CTX-M}}$ gene, and multiple mutations were detected in the quinolone resistance–determining regions. The clonal dissemination of this resistant APEC is worrying for animal and public health.

RESUMEN. Primera descripción de un clon de *Escherichia coli* patogénico para las aves, originario de Argelia y con resistencia contra cefalosporinas de espectro extendido y contra fluoroquinolonas.

Se estudiaron once cepas de *Escherichia coli* patógena para las aves (APEC) aisladas entre el año 2006 al 2010 de diferentes granjas en Argelia y resistentes a las cefalosporinas. Su susceptibilidad a los antimicrobianos se determinó por difusión en disco y los genes responsables de la resistencia a los antimicrobianos críticos fueron estudiados por PCR, por secuenciación y por conjugación. Sus perfiles genéticos fueron comparados mediante electroforesis en gel con campos de pulsaciones (PFGE). Todas las cepas fueron resistentes a las cefalosporinas de espectro extendido, a la ciprofloxacina, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol y a la neomicina y mostraron el mismo perfil de PFGE. Para la mayoría de ellas, la resistencia fue codificada por un gene $bla_{\text{CTX-M}}$, del grupo 1 no transferible y se detectaron múltiples mutaciones en las regiones que determinan resistencia a las quinolonas. La diseminación clonal de esta cepa resistente de *E. coli* patógena para las aves es preocupante para la salud pública y animal.

Key words: avian pathogenic *Escherichia coli*, cephalosporin, fluoroquinolone, resistance

Abbreviations: APEC = avian pathogenic *Escherichia coli*; bp = base pair; CA-SFM = Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie; CIP = ciprofloxacin; ESBL = extended-spectrum beta-lactamase; ESC = extended-spectrum cephalosporin; MH = Mueller Hinton; PFGE = pulsed-field gel electrophoresis; QRDR = quinolone resistance–determining region

Colibacillosis caused by avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) is a major cause of morbidity and mortality in poultry. It is responsible for important economic losses and is characterized by an initial respiratory syndrome in chickens aged 3–12 wk, usually followed by a systemic infection with airsacculitis, perihepatitis, pericarditis, or septicemia. Other forms such as omphalitis, chick septicemia, and genital infections in layers are also encountered.

In Algeria, avian *E. coli* has been very poorly characterized regarding its antimicrobial resistance. Similarly, until now, extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in general, and those from animal strains in particular, have rarely been described. The published reports are limited to human pathogenic strains of *E. coli* (22,25,30). This work reports for the first time ESBL-producing Algerian APEC strains.

MATERIALS AND METHODS

In total, 220 *E. coli* isolates were obtained from 2006 to 2011 from internal organs (spleen, liver, pericardium, or ovary) of birds suffering from avian colibacillosis (omphalitis, septicemia, coligranulomatosis, egg drop, or respiratory syndromes in broilers, layers, or breeders), from different farms located in various regions of central Algeria (the provinces of Bouira, Béjaia, Tizi Ouzou, and Boumerdès). All farms were all-in all-out intensive systems, either in cages or on litter floors. The isolates had been isolated in the Veterinary Laboratory of Draa Ben Khedda, Wilaya de Tizi Ouzou, Algeria, and a first screening to detect resistance to extended-spectrum cephalosporin (ESC) was conducted at the University Mouloud Mammeri of Tizi Ouzou by disk diffusion according to Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) recommendations procedures (8). In total, 11 isolates exhibiting resistance to third generation cephalosporins were transferred to Anses laboratory for characterization. These isolates had been obtained from 2006 to 2010, from 11 different farms. In Anses Ploufragan, the identity of *E. coli* isolates was confirmed by PCR (4), and the isolates were tested by agglutination with O1, O2, and O78 antisera (LDA22, Ploufragan, France), before disk diffusion and categorization according to CA-SFM (8). *Escherichia coli* CIP7624 was used as a reference strain. The antibiotics tested were amoxicillin, 25 µg; amoxicillin-clavulanic acid, 20/10 µg; cephalothin, 30 µg; cefotaxime, 30 µg; cefquinom, 30 µg; ceftiofur, 30 µg; ceftazidime, 30 µg; cefepime, 30 µg; tetracycline, 30 µg; trimethoprim-sulfamethoxazole, 1.25/23.75 µg; cefoxitin, 30 µg; ertapenem, 10 µg; gentamicin, 15 µg; neomycin 30 UI; nalidixic acid, 30 µg; and ciprofloxacin (CIP), 5 µg.

[F]Corresponding author. E-mail: isabelle.kempf@anses.fr

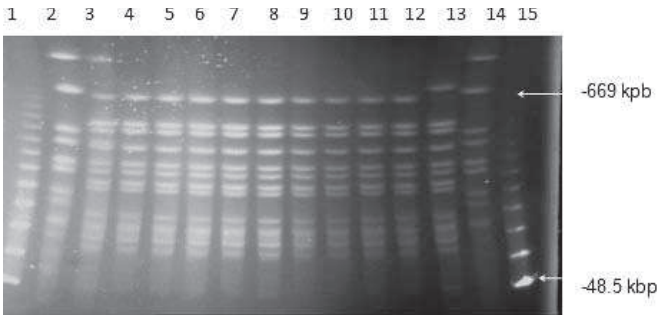


Fig. 1. PFGE analysis of *Xba*I-digested genomic DNAs of ESBL-producing APEC strains. Lanes 1 and 15: molecular weight markers Lambda PFGE marker (Biolabs, Evry, France); Lanes 2 and 14: *Salmonella* Braenderup; Lanes 3–13: APEC isolates E11, E43, E63, E65, E69, E74, E88, E173, E174, E190, and E201.

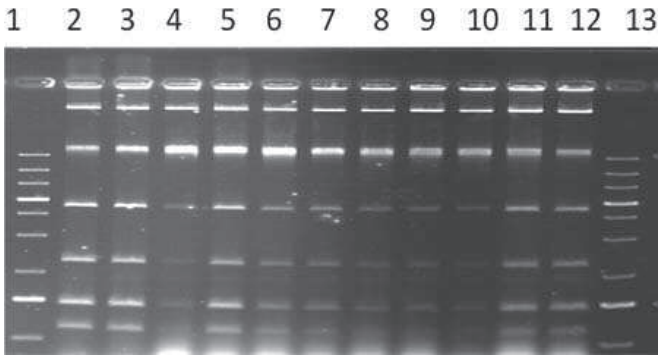


Fig. 2. Gel electrophoresis of plasmids. Lanes 1 and 13: molecular weight markers (1-kilobase DNA ladder, Fermentas, Villebon sur Yvette, France); Lanes 2–12: APEC isolates E11, E43, E63, E65, E69, E74, E88, E173, E174, E190, and E201.

Antibiotic discs were provided by Bio-Rad (Marnes la Coquette, France), except for cephalothin, cefotaxime, ceftazidime, neomycin, gentamicin, cefquinom, nalidixic acid, ciprofloxacin, tetracycline (all from Mast, Amiens, France) and trimethoprim-sulfamethoxazole (Oxoid, Dardilly, France). Conjugative transfer of ESC resistance was carried out with *E. coli* J5, J5K12 and *E. coli* UA 6190 using Mueller Hinton (MH) media containing cefotaxime (32 mg/L) and either rifampicin (150 mg/L), sodium azide (100 mg/L), or gentamicin (4 mg/L) according to previously described methods (13). Plasmids were prepared according to Takahashi and Nagano (29) and used to transform *E. coli* DH5alpha on MH agar containing either cefotaxime (4 mg/L), tetracycline (8 mg/L), or trimethoprim-sulfamethoxazole (4/76 mg/L). ESC resistance genes were detected with the use of microarrays (Check-MDR CT101, Biocentric, Bandol, France) according to the manufacturer's instructions and multiplex PCR (33), and sequencing of the $bla_{\text{CTX-M}}$ gene was conducted as described previously (13,32). Phylogenetic groups and replicons were identified according respectively to Clermont *et al.* (12) and Carattoli *et al.* (9), and the profiles of the strains were analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) after restriction with *Xba*I (11). The sequences of quinolone resistance–determining regions (QRDRs) of the *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* genes were determined as previously described (13).

RESULTS

No isolate belonged to main poultry pathogenic serogroups (O1, O2, or O78). Disk diffusion showed that the 11 *E. coli* strains shared the same multiresistance profile with synergy between amoxicillin-clavulanic acid and ESC characteristic of ESBL production. These 11 isolates also proved to be resistant to nalidixic acid, ciprofloxacin, tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole, and neomycin.

All 11 isolates belonged to phylogenetic group D and shared the same PFGE profile (Fig. 1). For 10 of the 11 isolates, no ESC resistance transfer could be obtained after repeated conjugation and transformation assays, whereas tetracycline or trimethoprim-sulfamethoxazole resistances could be transferred by electrotransformation (data not shown). Only the E174 isolate allowed the conjugative transfer of ESC, tetracycline, and trimethoprim-sulfamethoxazole resistances to *E. coli* J5K12.

DNA microarrays showed the presence of a $bla_{\text{CTX-M}}$ gene in all 11 isolates and for some of them a non–ESBL bla_{TEM} gene. Multiplex PCR confirmed the presence of a 415-base pair (bp) product characteristic of group 1 $bla_{\text{CTX-M}}$ genes. Sequencing of E88 and E174 isolates highlighted a 771-bp fragment 100% identical to the $bla_{\text{CTX-M-15}}$ gene. All 11 isolates had an F or FIB replicon type; their plasmid electrophoresis profiles were identical (Fig. 2). QRDR sequences of E88 and E174 isolates showed several mutations (*gyr*A: Ser83Leu, Asp87Asn; *parC*: Ser80Iso; and *par*E: Ala458Ser), usually involved in fluoroquinolone resistance.

DISCUSSION

This study provides a description of a series of APEC strains isolated from different farms in Algeria over several years that all belong to the same phylogenetic group D; they do not belong to avian pathogenic serogroups O1, O2, or O78; and they present the same PFGE and plasmid profiles, with the same plasmidic resistances (tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole) as well as resistances to the critical antimicrobials ESC and fluoroquinolones, coded by the $bla_{\text{CTX-M-15}}$ gene and substitutions in QRDR, respectively. Our results highlight for the first time the presence of a $bla_{\text{CTX-M-15}}$ gene in APEC strains in Algeria.

Data concerning ESC resistance in Algeria are scarce. CTX-M-15 was first described in three urinary strains of *E. coli* obtained from patients in the same hospital of Béjaia but from different medical wards. These clonally related strains were also resistant to gentamicin and trimethoprim-sulfamethoxazole but susceptible to ciprofloxacin. In this same study, CTX-M-15 was also detected on a *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from the urine of a treated patient (30). CTX-M-15 was subsequently reported on *E. coli* isolates from various pathologic samples (ascitic fluid, urine, blood, cerebrospinal fluid, wound) in two different hospitals in the Algiers area (25). The PFGE profiles of five of these CTX-M-15–producing isolates obtained from a neonatal ward were indistinguishable, suggesting an epidemic clone; four of them were also resistant to gentamicin, tobramycin, and trimethoprim-sulfamethoxazole.

The $bla_{\text{CTX-M-15}}$ gene was also detected on pathologic isolates from urine, blood, and pus, such as *Enterobacter cloacae*, carrying *qnr* genes and originating from provinces in central and western Algeria (19,20); hospital strains of *K. pneumoniae* from urine (23) and pus (19); urinary strains of *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens* (19); and, for the first time, in *Salmonella* Kedougou (31). In addition, a transmissible $bla_{\text{CTX-M-15}}$ gene was detected in an environmental *E. coli* isolated from seawater on a site adjacent to a populated area and an offshore shellfish farming site, east of Algiers (1).

More widely in the Maghreb, $bla_{\text{CTX-M-15}}$ was also detected in Tunisia in 2006 on the chromosome of urinary *E. coli* isolates belonging to the international epidemic *E. coli* CIP-resistant clone, and also on plasmids in clonally unrelated strains. Also in Tunisia, ESBLs including mainly CTX-M-1 and to a lesser extent TEM-52,

were detected in the feces of healthy volunteers (5). In fecal samples collected from healthy chickens on farms, ESBLs were most often CTX-M-1 and sometimes CMY-2 (6). In Morocco, $bla_{\text{CTX-M-15}}$ was the most frequent genotype in a collection of community urinary strains of *E. coli* isolated from across a large part of the country (3). However, to our knowledge, there is no report of ESBLs in isolates of animal origin in Morocco.

Worldwide, in human strains, the most widespread ESBL is CTX-M-15, whereas in poultry CTX-M-1 is more frequent (14). CTX-M-15 has only been incidentally reported in broiler retail meat or fecal samples from healthy poultry (14). To our knowledge, one of the first descriptions of the $bla_{\text{CTX-M-15}}$ gene on a phylogenetic group D APEC was reported in Japan (2).

It is noteworthy that for the majority of our isolates, ESC resistance could not be transferred, contrary to what is most commonly observed (14). The chromosomal location of the ESC resistance gene will have to be confirmed by hybridization of plasmid profiles or I-Ceu PFGE patterns of the isolates. However, this absence of transfer of $bla_{\text{CTX-M-15}}$ was also observed in nonpathogenic poultry (26) and human strains (23) and could be related to the chromosomal location of $bla_{\text{CTX-M-15}}$ in *E. coli* (10) and in *Salmonella enterica* Concord (15).

The resistance to fluoroquinolones observed in our isolates can be related to the different mutations in *gyr*A and *par*C (17). Moreover, the additional Ala458Ser mutation in *parE* has been associated with an increased level of CIP resistance (28).

To our knowledge, resistance to both fluoroquinolones and ESC in pathogenic *E. coli* from poultry is relatively rare but has been reported for intestinal strains producing CTX-M-1, CTX-M-2, or CTX-M-13, or SHV-12 (18) in Italy. The description in Algeria of an APEC clone resistant to fluoroquinolones and ESC, as well as to tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole, and neomycin, constitutes a threat for animal health. It is possible that this clone was selected by a heavy use of antibiotics in certain poultry sectors and has spread horizontally. Another hypothesis would be its selection in breeders and its vertical transmission in the poultry production pyramid as described previously (7,16,24). Further epidemiologic investigations are now necessary to explore these hypotheses. The presence of this multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *E. coli* clone could also be of great concern for public health. Indeed, many observations lead to the hypothesis that chicken products could be a source of foodborne multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *E. coli* infections (21). It is noteworthy that the clone we describe here does not belong to the B2 group and has a PFGE profile different from that of the B2 group *E. coli* sequence type ST131 (O25b:H4) isolates (data not shown); this human pandemic clone was also detected in companion animals, noncompanion animals, and foods (27). Nevertheless, it will be important to investigate the presence in Algeria, among human ExPEC isolates, of ciprofloxacin-resistant *E. coli*, producing CTX-M-15 and belonging to the D phylogenetic group.

REFERENCES

1. Alouache, S., M. Kada, Y. Messai, V. Estepa, C. Torres, and R. Bakour. Antibiotic resistance and extended-spectrum β-lactamases in isolated bacteria from seawater of Algiers beaches (Algeria). Microbes Environ. 27:80–86. 2011.

2. Asai, T., K. Masani, C. Sato, M. Hiki, M. Usui, K. Baba, M. Ozawa, K. Harada, H. Aoki, and T. Sawada. Phylogenetic groups and cephalosporin resistance genes of *Escherichia coli* from diseased food-producing animals in Japan. Acta Veterinaria Scandinavica 2011 53:52. doi:10.1186/1751-0147-53-52

3. Barguigua, A., F. El Otmani, M. Talmi, K. Zerouali, and M. Timinouni. Prevalence and types of extended spectrum beta-lactamases among urinary *Escherichia coli* isolates in Moroccan community. Microb. Pathog. 61–62:16–22. 2013.

4. Bej, A. K., R. J. Steffan, J. DiCesare, L. Haff, and R. M. Atlas. Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. Appl. Environ. Microbiol. 56:307–314. 1990.

5. Ben Sallem, R., K. Ben Slama, V. Estepa, A. Jouini, H. Gharsa, N. Klibi, Y. Sáenz, F. Ruiz-Larrea, A. Boudabous, and C. Torres. Prevalence and characterisation of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates in healthy volunteers in Tunisia. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 31:1511–1516. 2012.

6. Ben Sallem, R., K. Ben Slama, Y. Sáenz, B. Rojo-Bezares, V. Estepa, A. Jouini, H. Gharsa, N. Klibi, A. Boudabous, and C. Torres. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)- and CMY-2-producing *Escherichia coli* isolates from healthy food-producing animals in Tunisia. Foodborne Pathog. Dis. 9:1137–1142. 2012.

7. Bortolaia, V., M. Bisgaard, and A. M. Bojesen. Distribution and possible transmission of ampicillin- and nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* within the broiler industry. Vet. Microbiol. 142:379–386. 2010.

8. [CA-SFM] Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2012. Société Française de Microbiologie, Paris, France. 2012.

9. Carattoli, A., A. Bertini, L. Villa, V. Falbo, K. L. Hopkins, and E. J. Threlfall. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. J. Microbiol. Methods 63:219–228. 2005.

10. Cerquetti, M., M. Giufre, A. Garcia-Fernandez, M. Accogli, D. Fortini, I. Luzzi, and A. Carattoli. Ciprofloxacin-resistant, CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST131 clone in extraintestinal infections in Italy. Clin. Microbiol. Infect. 16:1555–1558. 2010.

11. Chu, G., D. Vollrath, and R. W. Davis. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. Science 234:1582–1585. 1986.

12. Clermont, O., S. Bonacorsi, and E. Bingen. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Appl. Environ. Microbiol. 66:4555–4558. 2000.

13. Dheilly, A., L. Le Devendec, G. Mourand, E. Jouy, and I. Kempf. Antimicrobial resistance selection in avian pathogenic *E. coli* during treatment. Vet. Microbiol. 166:655–658. 2013.

14. European Food Safety Authority Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β-lactamases and/or AmpC β-lactamases in food and food-producing animals. EFSA J. 9:2322–2417. doi:10.2903/j.efsa.2011.2322. 2011.

15. Fabre, L., A. Delaune, E. Espie, K. Nygard, M. Pardos, L. Polomack, F. Guesnier, M. Galimand, J. Lassen, and F. X. Weill. Chromosomal integration of the extended-spectrum beta-lactamase gene blaCTX-M-15 in *Salmonella enterica* serotype Concord isolates from internationally adopted children. Antimicrob. Agents Chemother. 53:1808–1816. 2009.

16. Giovanardi, D., E. Campagnari, L. S. Ruffoni, P. Pesente, G. Ortali, and V. Furlattini. Avian pathogenic *Escherichia coli* transmission from broiler breeders to their progeny in an integrated poultry production chain. Avian Pathol. 34:313–318. 2005.

17. Giraud, E., S. Leroy-Setrin, G. Flaujac, A. Cloeckaert, M. Dho-Moulin, and E. Chaslus-Dancla. Characterization of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* O78:K80 isolated from turkeys. J. Antimicrob. Chemother. 47:341–343. 2001.

18. Giufrè, M., C. Graziani, M. Accogli, I. Luzzi, L. Busani, and M. Cerquetti. *Escherichia coli* of human and avian origin: detection of clonal groups associated with fluoroquinolone and multidrug resistance in Italy. J. Antimicrob. Chemother. 67:860–867. 2012.

19. Iabadene, H., Y. Messai, H. Ammari, S. Alouache, C. Verdet, R. Bakour, and G. Arlet. Prevalence of plasmid-mediated AmpC β-lactamases among Enterobacteriaceae in Algiers hospitals. Int. J. Antimicrob. Agents 34:340–342. 2009.

20. Iabadene, H., Y. Messai, H. Ammari, N. Ramdani-Bouguessa, S. Lounes, R. Bakour, and G. Arlet. Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria. J. Antimicrob. Chemother. 62:133–136. 2008.

21. Mellata, M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. Foodborne Pathog. Dis. 10:916–932. 2013.

22. Messai, Y., T. Benhassine, M. Naim, G. Paul, and R. Bakour. Prevalence of β-lactams resistance among *Escherichia coli* clinical isolates from a hospital in Algiers. Revista Espanola de Quimioterapia 19:144–151. 2006.

23. Messai, Y., H. Iabadene, T. Benhassine, S. Alouache, M. Tazir, V. Gautier, G. Arlet, and R. Bakour. Prevalence and characterization of extended-spectrum β-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). Pathol. Biol. 56:319–325. 2008.

24. Petersen, A., J. P. Christensen, P. Kuhnert, M. Bisgaard, and J. E. Olsen. Vertical transmission of a fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* within an integrated broiler operation. Vet. Microbiol. 116:120–128. 2006.

25. Ramdani-Bouguessa, N., N. Mendonça, J. Leitão, E. Ferreira, M. Tazir, and M. Caniça. CTX-M-3 and CTX-M-15 extended-spectrum β-lactamases in isolates of *Escherichia coli* from a hospital in Algiers, Algeria. J. Clin. Microbiol. 44:4584–4586. 2006.

26. Randall, L. P., C. Clouting, R. A. Horton, N. G. Coldham, G. Wu, F. A. Clifton-Hadley, R. H. Davies, and C. J. Teale. Prevalence of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum beta-lactamases (CTX-M and TEM-52) from broiler chickens and turkeys in Great Britain between 2006 and 2009. J. Antimicrob. Chemother. 66:86–95. 2011.

27. Rogers, B. A., H. E. Sidjabat, and D. L. Paterson. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. J. Antimicrob. Chemother. 66:1–14. 2011.

28. Sorlozano, A., J. Gutierrez, A. Jimenez, J. de Dios Luna, and J. L. Martinez. Contribution of a new mutation in parE to quinolone resistance in extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates. J. Clin. Microbiol. 45:2740–2742. 2007.

29. Takahashi, S., and Y. Nagano. Rapid procedure for isolation of plasmid DNA and application to epidemiological analysis. J. Clin. Microbiol. 20:608–613. 1984.

30. Touati, A., S. Benallaoua, D. Forte, J. Madoux, L. Brasme, and C. de Champs. First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 β-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Béjaia, Algeria. Int. J. Antimicrob. Agents 27:408–413. 2006.

31. Touati, A., S. Benallaoua, A. Gharout, A. A. Amar, E. Le Magrex Debar, L. Brasme, J. Madoux, C. De Champs, and F. X. Weill. First report of CTX-M-15 in *Salmonella enterica* serotype kedougou recovered from an Algerian hospital. Pediatr. Infect. Dis. J. 27:479–480. 2008.

32. Vachee, A., E. Varon, E. Jouy, D. MeunierConseil Scientifique de l'Onerba. Antibiotics susceptibility of *Streptococcus* and *Enterococcus*: data of Onerba network. Pathol. Biol. 57:240–244. 2009.

33. Woodford, N., E. J. Fagan, and M. J. Ellington. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. J. Antimicrob. Chemother. 57:154–155. 2006.

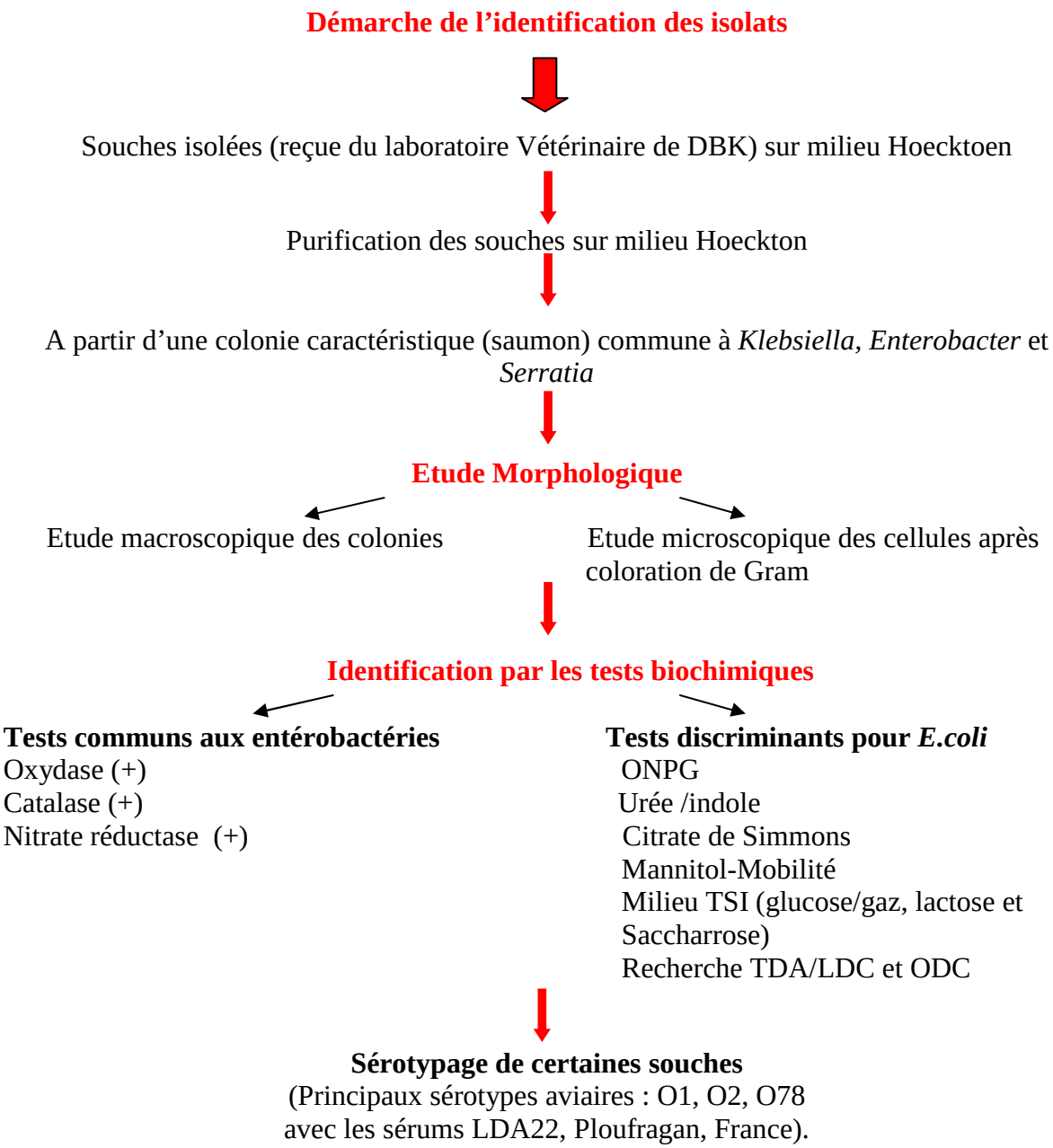
ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Côtes d'Armor General Council and the agency for the development of international cooperation in the areas of agriculture, food and rural space. We are very grateful to M. Llagostera, UAB, Barcelona, Spain, for providing *E. coli* strain HB101 UA6190 and to A. Carattoli, ISS, Rome, Italy, for providing reference strains and protocols for replicon typing.

Annexes

Annexe 1 : Identification d'*E.coli* et Sérotypage

Démarche adoptée pour l'identification des isolats de *E.coli* :



Annexe 1

Le sérotypage de bacilles Gram

Le but est de différencier les souches de microorganismes en fonction de leur composition antigénique (sérotype/sérovar) grâce à une technique sérologique (qui utilise des anticorps).

Principe :

La recherche est basée sur la mise en évidence d'une réaction spécifique entre un anticorps présent dans un sérum test et un antigène porté par le microorganisme étudié. Cette réaction est visualisée par une agglutination qui est le résultat macroscopique de la réaction antigène-anticorps.

Caractères Biochimiques différentiels des principaux genres et espèces d'entérobactéries (Le MINOR et VERON 1982).

	Salmonella	*Salmonellla Arizonae*	*Citrobacter*	*Shigella*	*Escherichia*	*Klebsiella pneunoniaee*	*Enterobacter*	*Erwinia*	*Serratia*	*Proteus*				*Providencia*	*Edwardsiella*	*Levinea*
										vulgaris	*mirabiliss*	*morganii*	*rettegeri*			
Mobilité	+	+	+	-	+/-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gaz en glucose	+	+	+	-	+	+	+	d	d	+	+	+	d	d	+	+
Lactose	-	+ou x	+ou x	-	+	+	+/x	d	-oux	-	-	-	-	-	-	+
ONPG	-	+	+	d	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
H_2S	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
Uréase	-	-	-(+)	-	-	(+)	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
Indole	-	-	-	d	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
LDC	+	+	-	-	d	+	d	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Citrate	+	+	+	-	-	+	+	+	+	d	d	-	+	+	-	+
Gelatinase	-	(+)	-	-	-	-	d	+	+	+	+	-	-	-	-	d
KCN	-	-	+	-	-	+	+	d	+	+	+	+	+	+	-	d
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+		-	-	+	d	-	+
Adonitol	-	-	-	-	-	+	d	-	d		-	-	+	d	-	d
Saccharose	-	-	d	-	d	+	+	d	+	-	x	d	d	d	-	d
Salicine	-	-	d	-	d	+	+		+	-	d	-	d	-	-	(+)
Inositol	d	-	-	-	-	+	d	-	d	-	-	-	+	d	-	-
Dulcitol	+	-	d	d	d	d	-	d	-	-	-	-	-	-	-	d
RM	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	d	-				
Malonate	-	+	-	-	-	+	d	d	-	-	-	-	-	-	-	-
TTR	+	+	+	-	-	-	-	-	d	+	+	-	-	-	-	d
ADH	+	+	-	d	d	-	d	-	-(+)	-	-	-	-	-	-	-
ODC	d	+	-	d	d	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+
Mucate	+	d	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-	-	-	-	+

+ : Positif en 1 ou 2jours ; - : négatif ; x : tardivement et irrégulièrement positif ; (+) : positif tardivement ; d : différents types biochimiques ; - /(+) : - en général, exceptionnellement positif tardivement ; LDC : lysine decarboxylase ; ADH : arginine dihydrolase ; TDA : tryptophane

Annexe 1

Principaux milieux de culture utilisés

Composition des milieux

- **Bouillon coeur-cervelle (BHIB)**

.

Composition en g/l

- Infusion de cervelle de veau	12,5
- Infusion de coeur de boeuf	5
-Protéase-peptone	10
-Phosphate disodique	2,5
-Chlorure de sodium	5
-Glucose …	2
-Eau distillée qsp	1000ml

pH : 7,2±0,2
Stérilisation 20 minutes à 120°C

- **Milieu Minimum**

Composition en g/l

- Dihydrogèno-phosphate de potassium (KH_2Po_4)	13,6
-Sulfate d'ammonium $(NH_4)2So_4$	2
-Sulfate de fer ($FeSo_4$)	0,5
-Agar	15
-Glucose	4
Eau distillée qsp	1000ml

-pH : 7
Stérilisation : 20 minutes à 120°C.

- **Milieu Mueller Hinton**

Composition en g/l

- Infusion de viande de boeuf	2
-Hydrolysat Amidon de caséine	17,5
–Amidon	1,5
-Agar	17
-Eau distillée qsp	1000ml

pH : 7,4.
Stérilisation : 20 minutes à 120°C.

- **Milieu SOC pour l'electroporation qsp 1l**

-Bactotryptone	20g
- Extrait de levure	5g
-NaCl	10 mM
-Glucose	20 mM
-KCl	2,5 mM
$-MgCl_2, 6H_2O$	10 mM

Stérilisation : 20 minutes à 120°C.

Annexe 1

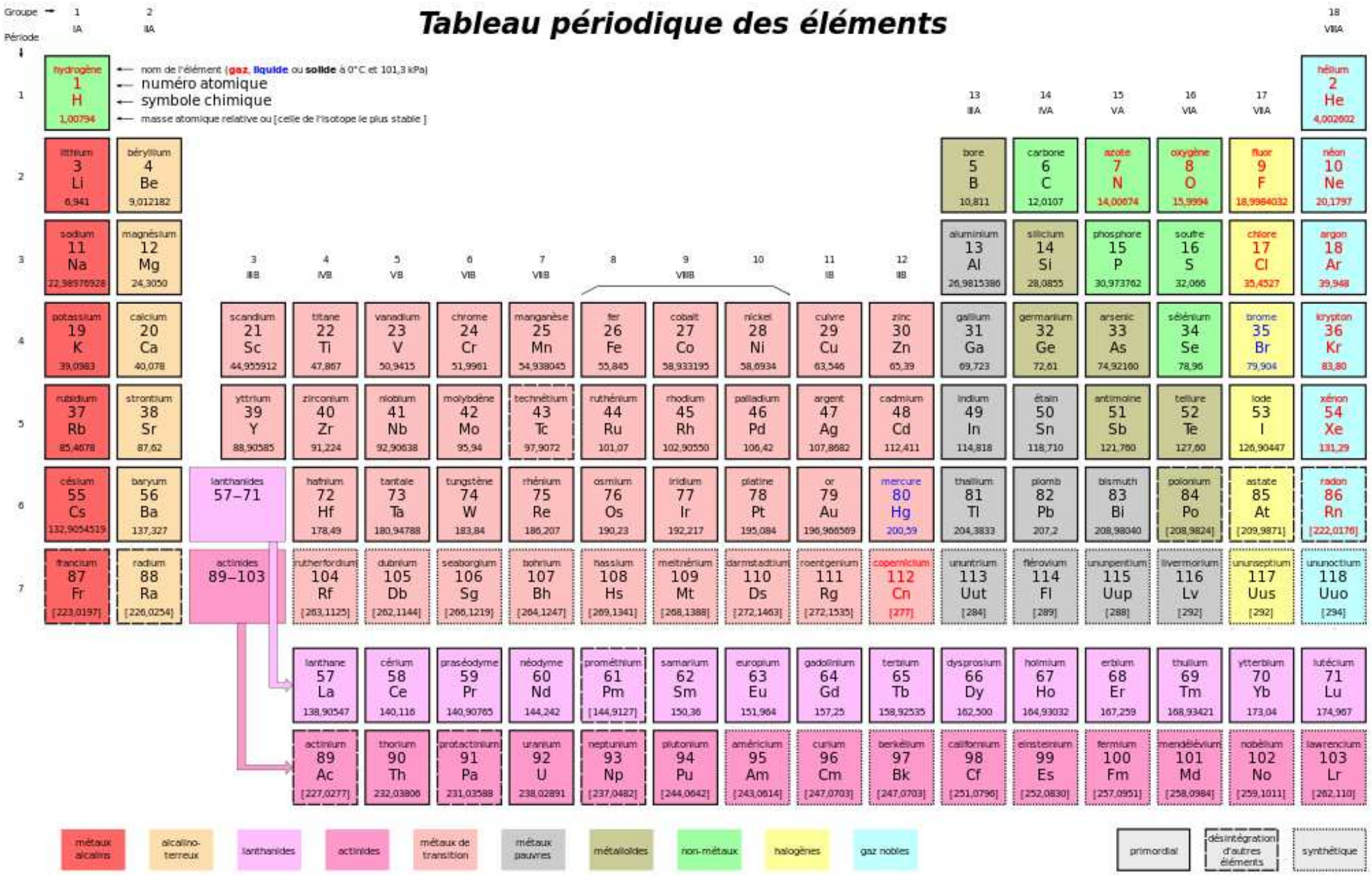


Tableau périodique des éléments
Groupe
Période
nom de l'élément (gaz, liquide ou solide à 0°C et 101,3 kPa)
numéro atomique
symbole chimique
masse atomique relative ou [celle de l'isotope le plus stable]
métaux alcalins
alcalino-terreux
lanthanides
actinides
métaux de transition
métaux pauvres
métalloïdes
non-métaux
halogènes
gaz nobles
primordial
désintégration d'autres éléments
synthétique

Annexe 2 : Protocoles et solutions de Biologie Moléculaire

1- PCR recherche des gènes *uid* A/ ipaH

Composition du MIX (45µl):

	Ci	Cf	N= 1
Amorce **uidA1**	10µM	0,3µM	1,35
Amorce **uidA2**	10µM	0,3µM	1,35
Amorce **ipaH1**	10µM	0,3µM	1,35
Amorce **ipaH2**	10µM	0,3µM	1,35
dNTP	10mM	0,2mM	0,9
Tp Green Go Taq Flexi	5X	1X	9
MgCl2 Flexi	25mM	2mM	3,6
Go Taq Flexi	5UI/µl	1,25UI	0,25
Eau			**25,85**
ADN			5µl

Conditions réactionnlelles

Dénaturation	94°C	5 min
30 cycles	94°C	30 s
	57°C	30s
	72°C	30s
Elongation	72°C	8min
	10°C	∞

2- PCR CTX-M

Composition du MIX:(23µl

	Ci	Cf	N= 1(µl)
CTX-M1-F	10µM	0,35 µM	0,87
CTX-M1-R	10µM	0,35 µM	0,87
CTX-M2-F	10µM	0,35 µM	0,87
CTX-M2-R	10µM	0,35 µM	0,87
CTX-M9-F	10µM	0,35 µM	0,87
CTX-M9-R	10µM	0,35 µM	0,87
CTX-M8-F	10µM	0,35 µM	0,87
CTX-M25-F	10µM	0,35 µM	0,87
CTX-M8 et 25R	10µM	0,35 µM	0,87
dNTP	10mM	0,2mM	0,5
Tpn Invitrogen10X			2,5
MgCl2	50 mM	1,5 mM	0,75
W1 Invitrogen à 1%			1,25
Taq Pol		5U/µl	0,125
Eau			10,045
ADN	**2µL**		**2**

Conditions réactionnelles

Dénaturation	94°C	5 min
30 cycles	94°C	25 s
	55°C	40 s
	72°C	50s
Elongation	72°C	6 min
	10°C	∞

3- PCR phylogénique

Composition du MIX (20µl):

	Ci	Cf	N= 1(µl)	**50**
Amorce **chuA F**	50µM	1µM	0,4	20
Amorce **chuA R**	50µM	1µM	0,4	20
Amorce **YjaA F**	50µM	1µM	0,4	20
Amorce **YjaA R**	50µM	1µM	0,4	20
Amorce **TspE4C2 F**	50µM	1µM	0,4	20
Amorce **TspE4C2 R**	50µM	1µM	0,4	20
dNTP	10mM	0,2mM	0,4	20
Tp Green Go Taq Flexi	5X	1X	4	200
MgCl2 Flexi	25mM	2mM	1,6	80
Go Taq Flexi	5UI/µl	1,25UI	0,25	12,5
Eau		ADN: 3µl	**11,35**	567,5

Conditions réactionnelles

Dénaturation	94°C	4 min
30 cycles	94°C	5s
	59°C	10s
Elongation	72°C	5min
	10°C	∞

4- Les PCR "Replicon Typing"

PCR simplex 1 :

Composition du MIX (23µl):

	Cf	Ci	N= 1 (µl)
FrepB FW	0,4µM	10µM	1
FrepB RV	0,4µM	10µM	1
Tpn 10X	1X	10X	2,5
dNTP	200µM	10mM	0,5
Taq Pol Roche	1U	5U/µl	0,2
Eau	Qsp 25µL		17,8
ADN	**2µL**		**2**

Conditions réactionnelles

Dénaturation	94°C	5 min
30 cycles	94°C	1 min
	52°C	30 s
	72°C	1 min
Elongation	72°C	5min
	10°C	∞

PCR simplex 2 :

Composition du MIX (23µl):

	Cf	Ci	N= 1 (µl)
K/B FW	0,4µM	10µM	1
K RV	0,4µM	10µM	1
Tpn 10X	1X	10X	2,5
dNTP	200µM	10mM	0,5
Taq Pol Roche	1U	5U/µl	0,2
Eau	Qsp 25µL		17,8
ADN	**2µL**		**2**

Conditions réactionnelles

Dénaturation	94°C	5 min
30 cycles	94°C	1 min
	65°C	30 s
	72°C	1 min
Elongation	72°C	5min
	10°C	∞

PCR simplex 3 :

Composition du MIX (23µl):

	Cf	Ci	N= 1(µl)
K/B FW	0,4µM	10µM	1
B/O RV	0,4µM	10µM	1
Tpn 10X	1X	10X	2,5
dNTP	200µM	10mM	0,5
Taq Pol Roche	1U	5U/µl	0,2
Eau	Qsp 25µL		17,8
ADN	**2µL**		**2**

Conditions réactionnelles

Dénaturation	94°C	5 min
30 cycles	94°C	1 min
	60°C	30 s
	72°C	1 min
Elongation	72°C	5min
	10°C	∞

PCR multiplex 1

Composition du MIX (23µl)

	Cf	Ci	N= 1 (µL)
HI1 FW	0,4µM	10µM	1
HI1 RV	0,4µM	10µM	1
HI2 FW	0,4µM	10µM	1
HI2 RV	0,4µM	10µM	1
I1FW	0,4µM	10µM	1
I1RV	0,4µM	10µM	1
Tpn 10X	1X	10X	2,5
dNTP	200µM	10mM	0,5
Taq Pol Roche	1U	5U/µl	0,2
Eau	Qsp 25µL		13,8
ADN	**2µL**		**2**

Conditions réactionnelles

Dénaturation	94°C	5 min
30 cycles	94°C	1 min
	65°C	30 s
	72°C	1 min
Elongation	72°C	5min
	10°C	∞

PCR multiplex 2

Composition du MIX (23µl)

	Cf	Ci	N= 1 (µL)
X FW	0,4µM	10µM	1
X RV	0,4µM	10µM	1
L/M FW	0,4µM	10µM	1
L/M RV	0,4µM	10µM	1
N FW	0,4µM	10µM	1
N RV	0,4µM	10µM	1
Tpn 10X	1X	10X	2,5
dNTP	200µM	10mM	0,5
Taq Pol Roche	1U	5U/µl	0,2
Eau	Qsp 25µL		13,8
ADN	**2µL**		**2**

Conditions réactionnelles

Dénaturation	94°C	5 min
30 cycles	94°C	1 min
	60°C	30 s
	72°C	1 min
Elongation	72°C	5min
	10°C	∞

PCR multiplex 3 :

Composition du MIX (23µl)

	Cf	Ci	N= 1(µL)
FIA FW	0,4µM	10µM	1
FIA RV	0,4µM	10µM	1
FIB FW	0,4µM	10µM	1
FIB RV	0,4µM	10µM	1
W FW	0,4µM	10µM	1
W RV	0,4µM	10µM	1
Tpn 10X	1X	10X	2,5
dNTP	200µM	10mM	0,5
Taq Pol Roche	1U	5U/µl	0,2
Eau	Qsp 25µL		13,8
ADN	**2µL**		**2**

Conditions réactionnelles

Dénaturation	94°C	5 min
30 cycles	94°C	1 min
	67°C	30 s
	72°C	1 min
Elongation	72°C	5min
	10°C	∞

PCR Multiplex 4

Composition du MIX (23µl):

	Cf	Ci	N= 1 (µL)
Y FW	0,4µM	10µM	1
Y RV	0,4µM	10µM	1
P FW	0,4µM	10µM	1
P RV	0,4µM	10µM	1
FIC FW	0,8µM	10µM	2
FIC RV	0,8µM	10µM	2
Tpn 10X	1X	10X	2,5
dNTP	200µM	10mM	0,5
Taq Pol Roche	1U	5U/µl	0,2
Eau	Qsp 25µL		11,8
ADN	**2µL**		**2**

Conditions réactionnelles

Dénaturation	94°C	5 min
30 cycles	94°C	1 min
	67°C	30 s
	72°C	1 min
Elongation	72°C	5min
	10°C	∞

PCR multiplex 5

Composition du MIX (23µl):

	Cf	Ci	N= 1(µL)
A/C FW	0,4µM	10µM	1
A/C RV	0,4µM	10µM	1
T FW	0,4µM	10µM	1
T RV	0,4µM	10µM	1
FIIsFW	0,4µM	10µM	1
FIIsRV	0,4µM	10µM	1
Tpn 10X	1X	10X	2,5
dNTP	200µM	10mM	0,5
Taq Pol Roche	1U	5U/µl	0,2
Eau	Qsp 25µL		13,8
ADN	**2µL**		**2**

Conditions réactionnelles

Dénaturation	94°C	5 min
30 cycles	94°C	1 min
	60°C	30 s
	72°C	1 min
Elongation	72°C	5min
	10°C	∞

2-Compositions des solutions et des Tampons

2-1 -Extraction et électrophorèse plasmidique (protocole de TAKAHASHI et NAGANO (1984)

Solution tampon A : Acide Tris-acétique 400nM pH=8
EDTA disodique 20nM

Peser 2,422g de Tris base et 0,3725g d'EDTA disodique, ajuster le pH à 8,0 avec de l'acide acétique puis compléter le volume à 50ml avec de l'eau ultra-pure.
Cette solution mère est diluée 10fois avec de l'eau ultra-pure au moment de l'emploi.

-Solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) 0,4N

-Solution de lyse : Tris 100mM
SDS 4%

Peser 0,2425g de Tris base et 0,8g de SDS puis compléter le volume à 20ml avec de l'eau ultra-pure.
Conserver à température ambiante.
Cette solution est diluée extemporanément au demi avec (NaOH) 0,4N.

-Solution tampon B : Acétate de sodium 3M pH=5,5
Dissoudre 40,82g d'acétate de sodium dans environ 70ml d'eau ultra-pure, ajuster le pH à 5,5 avec de l'acide acétique puis compléter le volume à 100ml avec de l'eau ultra-pure.

-**Solution tampon C :** Acide Tris-acétique 10mM pH=8
EDTA 2mM

Peser 0,0605g de Tris base et 0,0372g d'EDTA, ajuster le pH à 8,0 avec de l'acide acétique puis compléter le volume à 50ml avec de l'eau ultra-pure.
-Ethanol absolu refroidi à -20°C
- Phénol saturé en eau (Aquaphénol) conservé à +4°C
-Chloroforme R.P. pour analyse
-Solution de RNAse à 10g.l^{-1} conservée à -20°C
-Solution de bromure d'éthydium (BEt) à 10g.l^{-1}

-Agarose standart qualité biologie moléculaire.
Peser l'agarose en poudre, ajouter le tampon d'électrophorèse, porter à ébullition et refroidi à 60°C.
Pour la coloration, ajouter directement 2 gouttes (50µg) de BEt par 100ml de gel pour l'analyse de restriction, ou préparer un bain de BEt avec 50µl pour 1 litre d'eau déminéralisée soit (0,5mg.l^{-1}) pour l'analyse des plasmides natifs.

-Tampon d'électrophorèse :

- TBE

- Tris 0,09M
- Acide borique 0,09M
- EDTA 0,04M pH8

Tampon TBE (pour Tris, Borate, EDTA)
Pour la préparation d'un tampon TBE (1x) pH 8,0 peser :
(qsp 1L)

- 10,78 g (89 mM) TRIS
- 5,50 g (89 mM) Acide borique
- 0,58 g (2 mM) EDTA disodium salt

Mettre dans une fiole jaugée et mettre la quantité suffisante pour 1000 ml d'eau distillée. Pour une concentration 10x, multiplier les quantités par 10.

- **Tampon TE** :

- Tris-HCl (1/00) pH 7,5 10 mmol/l
- EDTA 1 mmol/l

-Solution d'alourdisseur :

- Pourpre de bromocrésol à 0,1%
- Glycérol 50%
- Eau ultra-pure QSP 100%

2-2- PFGE (Protocole de Chu *et al.* 1986)

- **Solution SDS/agarose 1% en TE :**

Pour 10ml : 0.1g d'agarose dans 9ml de TE pH8
1ml de SDS 10%
Porter à ébulition au micro-onde afin de bien dissoudre l'agarose et placer le flacon en surfusion dans un bain-marie à 50°C.

- **Tampon CSB :**

Pour 1 litre de tampon CSB pH8 (100mM Tris, 100mM EDTA) :

- 100ml de Tris 1M pH7.6

- 200ml d'EDTA 0.5M

Dissoudre dans 600ml d'eau ultra pure stérile, ajuster le pH à 8 puis compléter à 1L.

- Solution de lyse

Nombre de souches	Tris 1M pH7.6	EDTA 250mM pH8	Sarcosine 10%	Eau distillée	Protéinase K (20mg/l)
1	150µl	600µl	300µl	1.935ml	15µl

-

- **Tableau de digestion pour l'enzyme XbaI (Roche) contenant du BSA 1mg/l**

Réactif	Volume par souche (µl)
Eau stérile	89
Tampon 10X	10
Enzyme XbaI	1
Volume total	100

3- Séquençage Protocole du Kit : QIAQUICK PCR PURIFICATION - QIAGEN

But : purifier un produit amplifié de suite après la PCR.

1- Ajouter **5** volumes de **Buffer PB** à **1** volume de produit de PCR (exemple : volume PCR =100µl ajouter 500µl de Buffer PB).

Si le mélange est orange-violet, il faut ajouter 10µl d'acétate de sodium 3M pH5 et mélanger. Le mélange doit devenir jaune.

2- Placer une colonne dans un tube collecteur (« collection tube »). La remplir avec l'échantillon et centrifuger 1 mn (13000rpm sur centrifugeuse Thermo Scientific MicroCL™).

3- Vider le tube collecteur et replacer la colonne sur le même tube collecteur.

4- Ajouter 750µl de Buffer PE pour laver la colonne. **Attendre 2-3 mn**. Centrifuger 1 mn (13000rpm).

5-Vider le tube collecteur et y replacer la colonne - **Recentrifuger 1 mn** (13000rpm).

6- Placer la colonne dans un tube propre de 1,5 ml.

7- Ajouter 30µl de Buffer EB (ou eau Ultra Pure) au centre de la membrane pour éluer**.** Attendre 1mn et centrifuger 1 mn (13000rpm).

Annexe 3 : Donnés et Résultats des essais de transferts par conjugaison et électroporation

Tableau I : Données sur les souches *E.coli* BLSE

Isolat	Année d'isolement	Nature de l'isolement	Origine
E11 BLSE	2010	Lésion de colibacillose	Région Centre*
E48 BLSE	2006	Lésion de colibacillose	Région Centre*
E63 BLSE	2006	Lésion de colibacillose	Région Centre*
E65 BLSE	2006	Lésion de colibacillose	Région Centre*
E69 BLSE	2008	Lésion de colibacillose	Région Centre*
E74 BLSE	2008	Lésion de colibacillose	Région Centre*
E88 BLSE	2006	Lésion de colibacillose	Région Centre*
E173 BLSE	2010	Lésion de colibacillose	Région Centre*
E174 BLSE	2010	Lésion de colibacillose	Région Centre*
E190 BLSE	2010	Lésion de colibacillose	Région Centre*
E201 BLSE	2009	Lésion de colibacillose	Région Centre*

Région Centre* : Région couverte par le Labo Vétérinaire Régional Centre : Wilaya de Bouira, Béjaia, TiziOuzou et Boumerdès.

Annexe 3

Tableau II : Résultats des essais de transfert de la résistance au céfotaxime et à l'acide nalidixique des souches BLSE

						TRANSCONJUGANTS Souche *E.coli* J5		TRANSCONJUGANTS Souche *E.coli* J5 K12		TRANSCONJUGANTS *E.coli* UA6190	
ATB			RIF	NA	CTX	CTX -RIF	NAL -RIF	CTX –RIF-A	NA-RIF-AZ	CTX GEN RIF	NA GEN RIF
SOUCHES DONNATRICES	E11	E11 CTX	-		+	-		-		-	
		E11 NA	-	+			-		-		-
	E48	E48 CTX	-		+	-		-		-	
		E48 NA	-	+			-		-		-
	E63	E63 CTX	-		+	-		-		-	
		E63 NA	-	+			-		-		-
	E65	E65 CTX	-		+	-		-		-	
		E65 NA	-	+			-		-		-
	E69	E69 CTX	-		+	-		-		-	
		E69 NA	-	+			-		-		-
	E74	E74 CTX	-		+	-		-		-	
		E74 NA	-	+			-		-		-

+ : développement d'où présence du caractère de résistance ; - : absence de développement.

Annexe 3

Tableau II (suite): Résultats des essais de transfert de la résistance au céfotaxime et à l'acide nalidixique des souches BLSE

						TRANSCONJUGANTS Souche *E.coli* J5		TRANSCONJUGANTS Souche *E.coli* J5 K12		TRANSCONJUGANTS *E.coli* UA6190	
ATB			RIF	NA	CTX	CTX -RIF	NAL -RIF	CTX –RIF-AZ	NA-RIF-AZ	CTX GEN RIF	NA GEN RIF
SOUCHES DONNATRICES	E88	E88 CTX	-		+	-		-		-	
		E88 NA	-	+			-		-		-
	E173	E173 CTX	-		+	-		-		-	
		E173 NA	-	+			-		-		-
	E174	E174 CTX	-		+	-		-		-	
		E174 NA	-	+			-		-		-
	E190	E190 CTX	-		+	-		-		-	
		E190 NA	-	+			-		-		-
	E201	E201 CTX	-		+	-		-		-	
		E201 NA	-	+			-		-		-

+ : développement d'où présence du caractère de résistance ; - : absence de développement.

AMX : Amoxicilline ; CTX : céfotaxime ; NA : acide nalidixique ; GEN : gentamicine ; AZ : azide de sodium

Annexe 3

Tableau III : Profils d'antibirésistances des souches *E.coli* PHN testées par conjugaison

	Souche *	AMX	AMP	AMC	TIC	IPM	ATM	CZ	FOX	CTX	CAZ	CPO	CFM	K	GEN	TE	CL	SXT	NA	PA	CIP	OFX	PF
		≥21S <16R	≥19S <16R	≥21S <16R	≥24S <22R	≥24S <17R	≥27S <21R	≥18S <12R	≥22S <15R	≥26S <23R	≥26S <21R	≥24S <17R	≥25S <22R	≥17S <15R	≥18S <16R	≥19S <17R	≥15S <15R	≥16S <13R	≥20S <15R	≥19S <14R	≥25S <22R	≥25S <22R	≥22S <16R
1	E8	0 R	0 R	19 I	8 R	31 S	27 S	11 R	26 S	29 S	28 S	35 S	30 S	30 S	25 S	8 R	16 S	0 R	0 R	0 R	15 R	12 R	10 R
2	E10	0 R	0 R	9 R	10 R	30 S	30 S	12 R	23 S	32 S	30 S	33 S	24 I	16 I	19 S	18 I	15 S	24 S	10 R	13 R	14 R	13 R	12 R
3	E13	0 R	0 R	18 I	0 R	26 S	27 S	26 S	23 S	27 S	26 S	25 S	25 S	11 R	28 S	20 S	16 S	36 S	0 R	0 R	0 R	11 R	0 R
4	E15	0 R	16 R	21 R	21 R	30 S	27 S	15 I	22 S	26 S	26 S	28 S	25 S	22 S	19 S	18 I	17 S	32 S	10 R	15 R	17 R	14 R	15 R
5	E18	12 R	12 R	16 I	11 R	34 S	30 S	11 R	28 S	30 S	30 S	33 S	38 S	23 S	27 S	0 R	15 S	0 R	10 R	11 R	17 R	18 R	16 R
6	E19	0 R	0 R	18 I	0 R	24 S	27 S	17 I	18 I	26 S	26 S	ND	31 S	9 R	23 S	0 R	15 S	0 R	0 R	15 I	25 S	22 I	19 I
7	E21	13 R	0 R	33 S	19 R	37 S	27 S	0 R	39 S	26 S	26 S	ND	27 S	ND	17 I	31 S	15 S	28 S	0 R	0 R	26 S	23 I	25 S
8	E38	11 R	13 R	16 I	10 R	28 S	27 S	21 S	22 S	26 S	26 S	24S	26 S	7 R	20 S	24 S	15 S	30 S	0 R	14 R	16 R	21 R	21 I
9	E39	12 R	10 R	17 I	16 R	30 S	27 S	26 S	22 S	29 S	26 S	ND	25 S	24 S	23 S	29 S	24 S	20 S	13 R	19 S	28 S	25 S	28 S
10	E115	18 R	15 R	20 S	12 R	35 S	28 S	24 S	23 S	26 S	28 S	ND	28 S	20 S	26 S	34 S	15 S	10 R	20 S	19 S	29 S	30 S	28 S
11	E165	0 R	0 R	20 I	12 R	38 S	28 S	17 I	27 S	36 S	32 S	ND	32 S	21 S	23 S	8 R	17 S	21 S	0 R	8 R	17 R	18 R	15 R
12	E169	0 R	0 R	19 I	11 R	38 S	30 S	15 R	23 S	34 S	31 S	ND	38 S	23 S	24 S	0 R	16 S	0 R	0 R	11 R	21 R	20 R	ND

*** Souche :** numéro de collection ; **0 :** aucune zone d'inhibition, le diamètre du disque d'antibiotique étant de 6mm.

AMX : Amoxicilline ; AMP : Ampicilline ; AMC : Amoxicilline + acide clavulanique ; TIC : Ticarcilline ; IMP : Imipénème ; ATM : Aztreonam ; CZ : Céfazoline ; FOX : cefoxitine ; CTX : cefotaxime ; CAZ : ceftazidime ; CPO : Céfpirome ; CFM : Céfixime ; K : Kanamycine ; GEN : Gentamicine ; TE : Tétracycline ; CL : colistine ; SXT : Triméthoprime/sulfaméthoxazole (cotrimoxazole) ; NA : Acide nalidixique ; PA : Acide pipémidique ; CIP : ciprofloxacine ; OFX : Ofloxacine ; PF : Pefloxacine

Annexe 3

Tableau III (Suite) : Profils d'antibirésistances des souches *E.coli* PHN testées par conjugaison

	Souche *	AMX	AMP	AMC	TIC	IPM	ATM	CZ	FOX	CTX	CAZ	CPO	CFM	K	GEN	TE	CL	SXT	NA	PA	CIP	OFX	PF
		≥21S <16R	≥19S <16R	≥21S <16R	≥24S <22R	≥24S <17R	≥27S <21R	≥18S <12R	≥22S <15R	≥26S <23R	≥26S <21R	≥24S <17R	≥25S <22R	≥17S <15R	≥18S <16R	≥19S <17R	≥15S <15R	≥16S <13R	≥20S <15R	≥19S <14R	≥25S <22R	≥25S <22R	≥22S <16R
13	E172	0 R	0 R	14 R	15 R	26 S	28 S	8 R	23 S	30 S	29 S	ND	27 S	15 I	19 S	26 S	15 S	12 R	14 R	14 R	13 R	13 R	15 R
14	E188	0 R	0 R	0 R	9 R	34 S	30 S	11 R	ND	26 S	27 S	25 S	28 S	26 S	31 S	ND	24 S	0 R	0 R	0 R	15 R	11 R	0 R
15	E206	0 R	0 R	18 I	17 R	38 S	28 S	18 S	24 S	34 S	31 S	ND	25 S	36 S	30 S	26 S	15 S	30 S	23 S	32 S	35 S	35 S	38 S
16	E211	0 R	0 R	0 R	9 R	33 S	27 S	17 I	ND	28 S	28 S	23 S	25 S	18 S	27 S	ND	18 S	0 R	21 S	21 S	25 S	26 S	24 S
17	E269	0 R	0 R	13 R	13 R	40 S	26 S	0 R	22 S	26 S	28 S	ND	25 S	17 S	30 S	14 R	16 S	0 R	0 R	19 S	26 S	22 I	28 S
18	E302	9 R	11 R	13 R	0 R	31 S	28 S	11 R	16 I	30 S	30 S	30 S	29 S	19 S	22 S	30 S	16 S	0 R	10 R	15 I	23 I	23 I	17 I

*** Souche :** numéro de collection ; **0 :** aucune zone d'inhibition, le diamètre du disque d'antibiotique étant de 6mm.

AMX : Amoxicilline ; AMP : Ampicilline ; AMC : Amoxicilline + acide clavulanique ; TIC : Ticarcilline ; IMP : Imipénème ; ATM : Aztreonam ; CZ : Céfazoline ; FOX : cefoxitine ; CTX : cefotaxime ; CAZ : ceftazidime ; CPO : Céfpirome ; CFM : Céfixime ; K : Kanamycine ; GEN : Gentamicine ; TE : Tétracycline ; CL : colistine ; SXT : Triméthoprime/sulfaméthoxazole (cotrimoxazole) ; NA : Acide nalidixique ; PA : Acide pipémidique ; CIP : ciprofloxacine ; OFX : Ofloxacine ; PF : Pefloxacine

Annexe 3

Tableau IV : Résultats des essais de transfert de la résistance à l'amoxicilline et de l'acide nalidixique de souches *E.coli* PHN

						TRANSCONJUGANTS** Souche *E.coli* J5		TRANSCONJUGANTS** Souche *E.coli* J5 K12	
ATB			RIF	NA	AMX	NAL -RIF	AMX- RIF	AMX RIF AZ	NA-RIF-AZ
SOUCHES DONNATRICES	E8	E8 AMX	-		+		+	+	
		E8 NA	-	+		-			-
	E18	E18 AMX	-		+		+	+	
		E18 NA	-	+		-			-
	E21	E21 AMX	-				+	+	
		E21 NA	-	+	+	-			-
	E169	E169 AMX	-				+	+	
		E169 NA	-	+		-			-
	E206	E206 AMX	-				+	+	

** Transconjugants vérifiés par antibiogramme et PCR phylogénique (souche réceptrice du groupeA).

Annexe 3

Tableau V : Résultats des essais de transfert par conjugaison (méthode 1 et 2) de la résistance à l'amoxicilline de souches *E.coli* PHN

		DONATRICES		TRANSCONJUGANTS*
ATB		RIF	AMX	AMX RIF AZ
SOUCHES DONNATRICES E10	E10 AMX	-	+	+
E13	E13 AMX	-	+	+
E15	E15 AMX	-	+	+
E19	E19 AMX	-	+	+
E38	E38 AMX	-	+	+
E39	E39 AMX	-	+	+
E115	E115 AMX	-	+	+
E165	E165 AMX	-	+	+
E172	E172 AMX	-	+	+
E188	E188 AMX	-	+	+
E206	E206 AMX	-	+	+
E211	E211 AMX		+	+
E269	E269 AMX	-	+	+
E302	E302 AMX		+	+

*Transconjugants vérifiés par antibiogramme

Annexe 3

ESSAIS DE TRANSFERT PAR ELECTROPORATION

Tableau VI : Résultats des essais de transfert de la résistance à la ciprofloxacine par électroporation

	E11-CIP	E48-CIP	E63I-CIP	E65-CIP	E69-CIP	E174-CIP
50µl	-	-	-	-	-	-
250µl	-	-	-	-	-	-

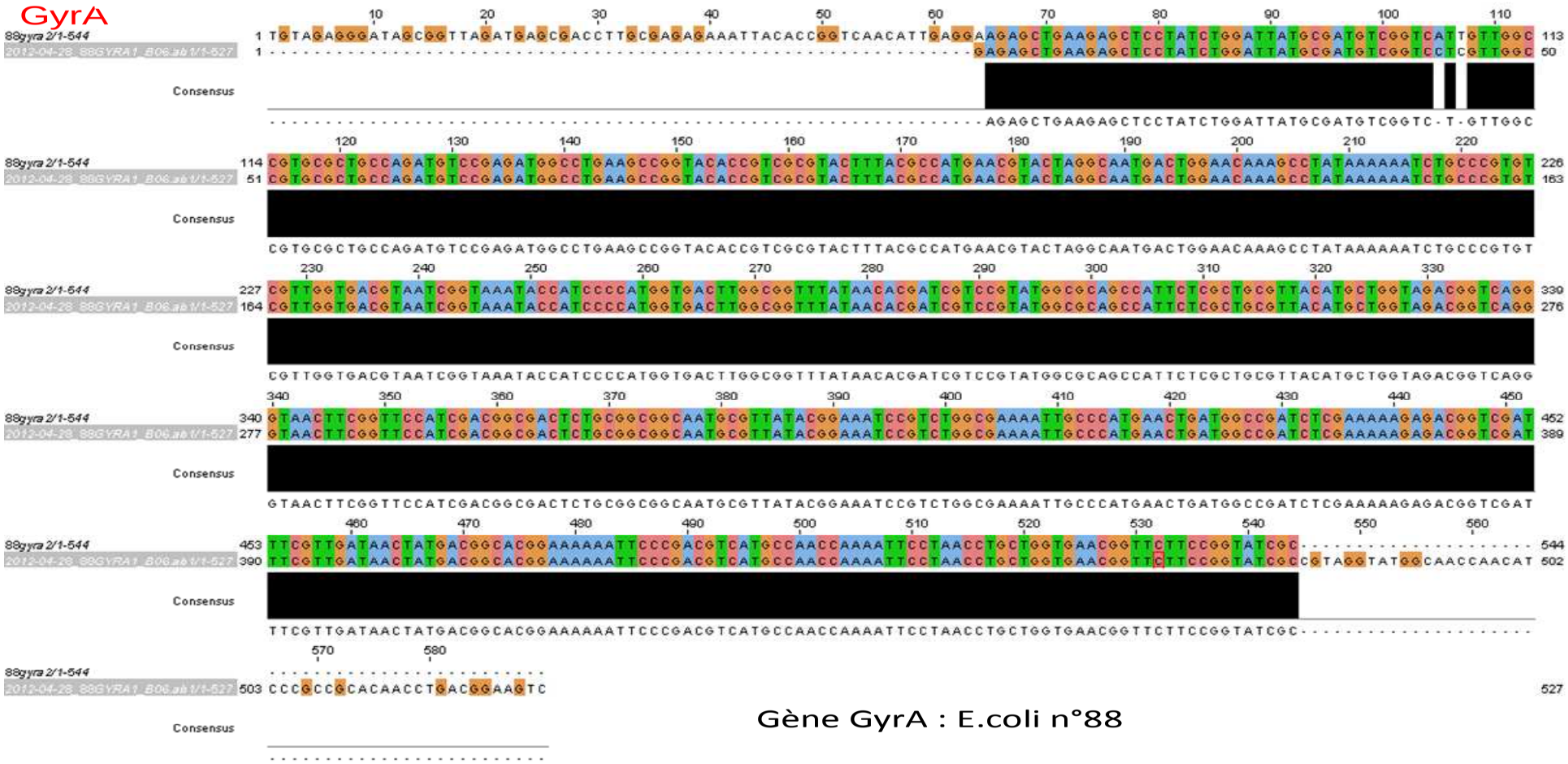
- **:** aucun développement sur milieu Mueller Hinton additionné de CIP à 1 µg/ml.

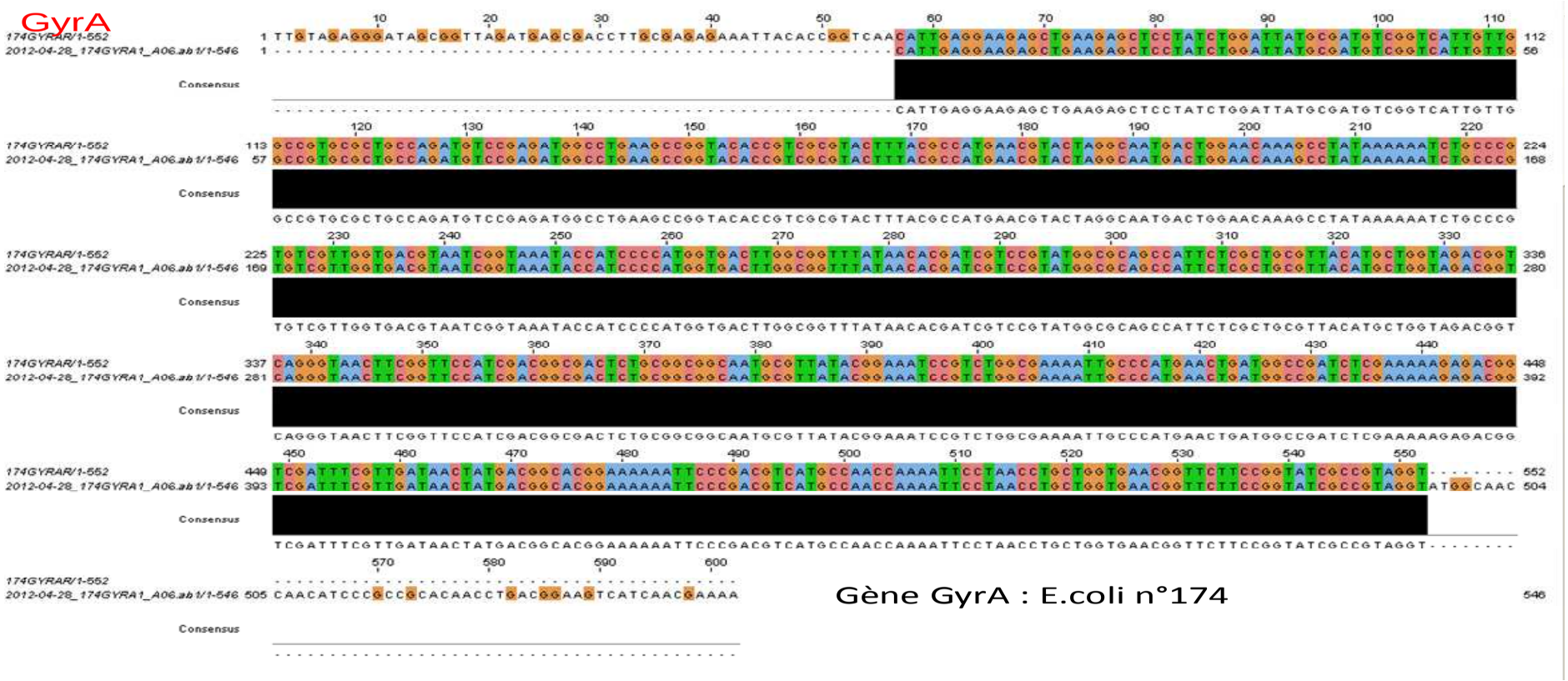
Tableau VII : Résultats des essais de transfert de la résistance à la Tétracycline et au Cotrimoxazole par électroporation

	E11-TE	E48-TE	E63I-TE	E65-TE	E69-TE	E174-TE	E11-SXT	E48-SXT	E63I-SXT	E65-SXT	E69-SXT	E174-SXT
50µl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
250µl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : développement sur milieu Mueller Hinton additionnés de TE à 8 µg/ml et SXT (TMP à 4 µg/ml et sulfamides à 76 µg/ml)

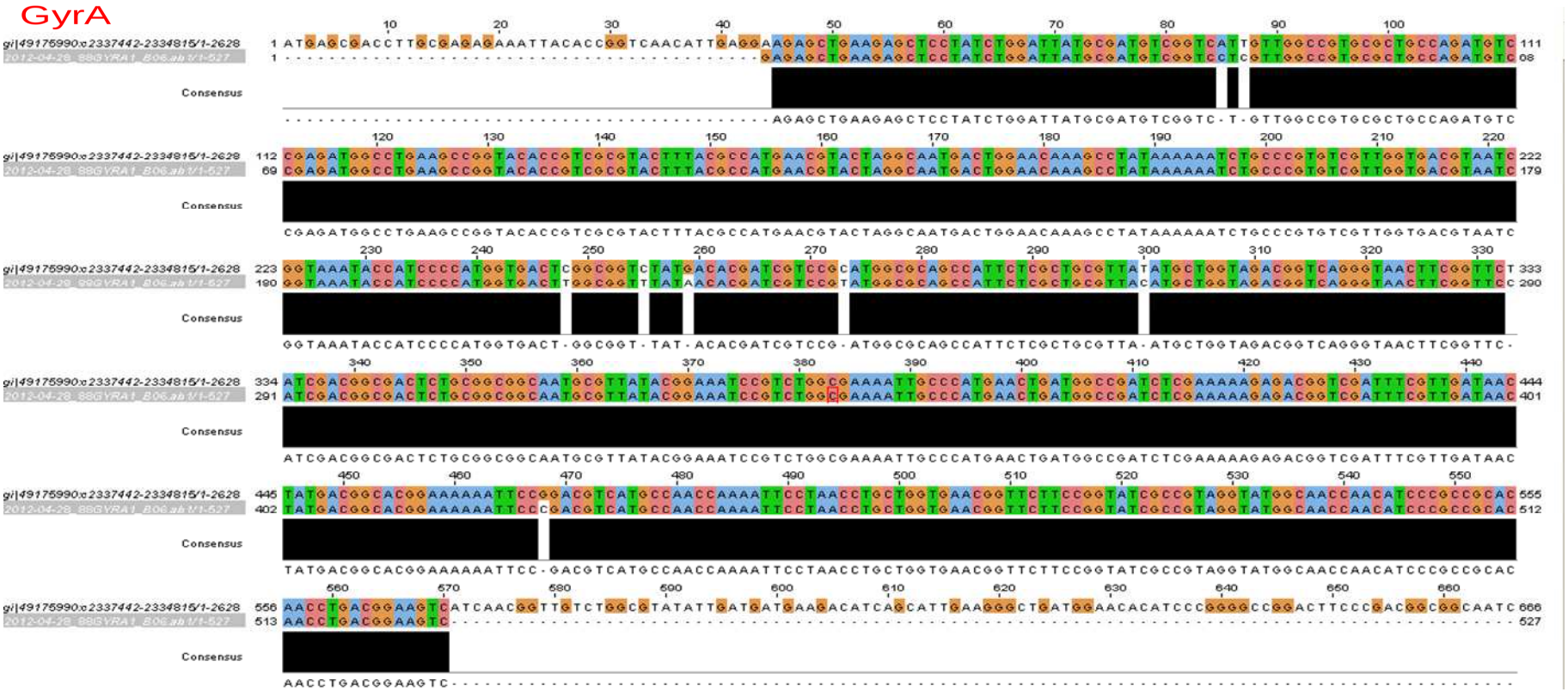
Annexe 4 : Séquences des gènes *gyr*A de l'ADN Gyrase et *par*C, *par*E de la Topoisomérase IV de deux souches *E.coli*



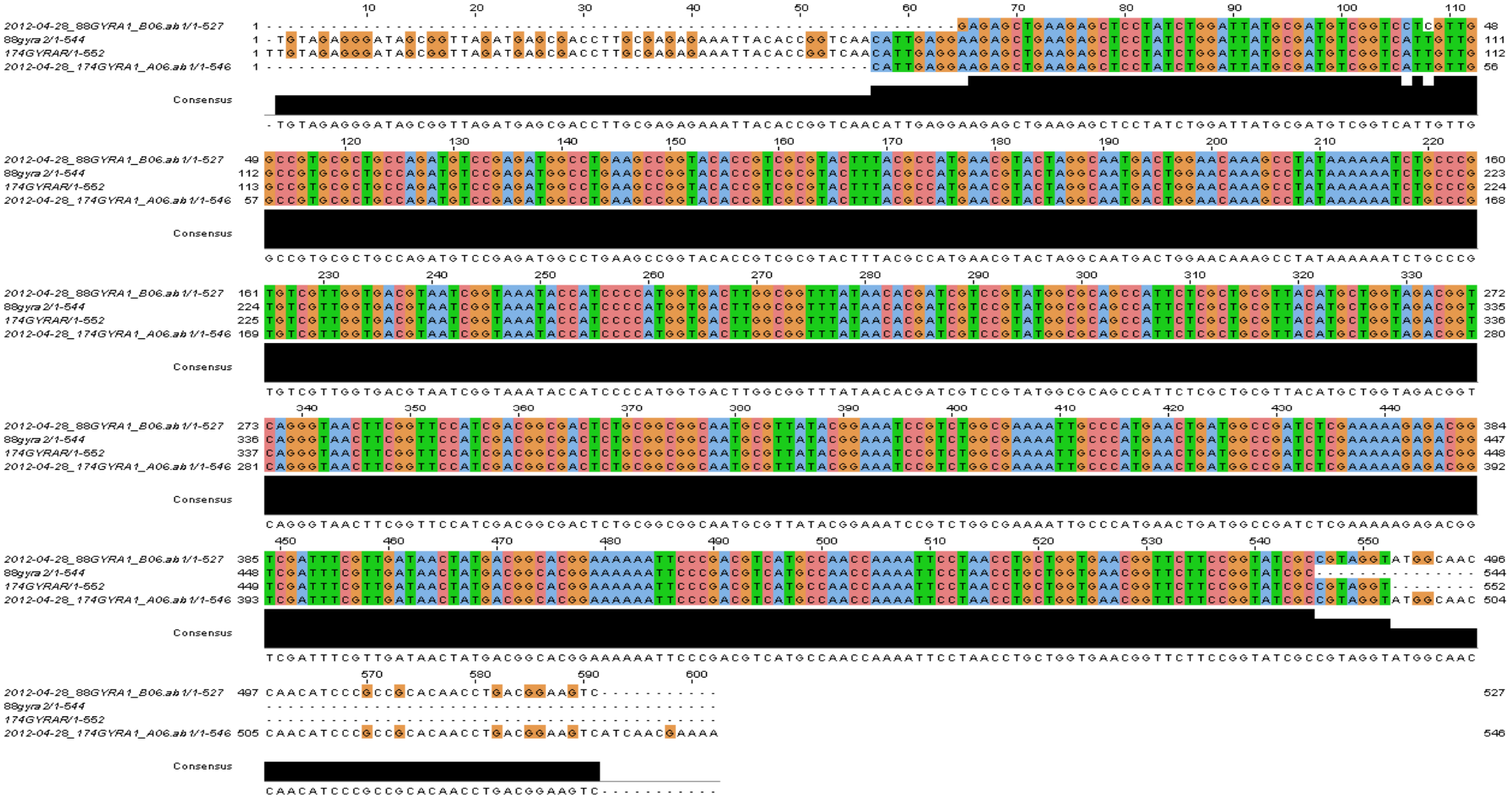

GyrA
174GYRAR/1-552
2012-04-28_174GYRA1_A06.ab1/1-546
Consensus
Gène GyrA : E.coli n°174

II

III



Séquence du haut: séquence de référence NCBI Reference Sequence: NC_000913.2
Séquence du bas: séquences E88

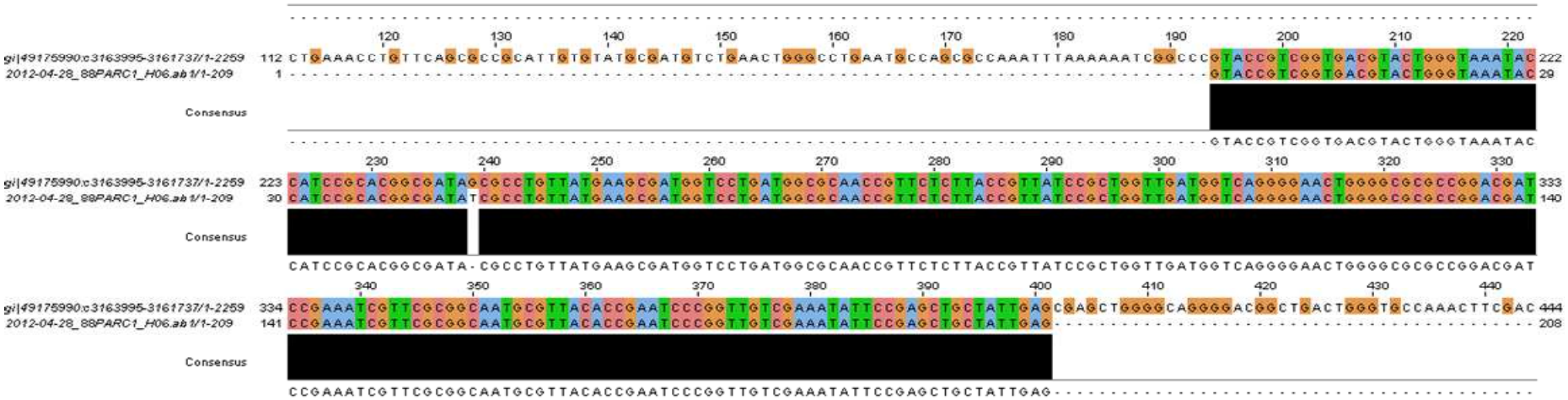


Alignements des séquences *gyr*A des souches 88 et 174

➔Les deux souches ont une séquence identique

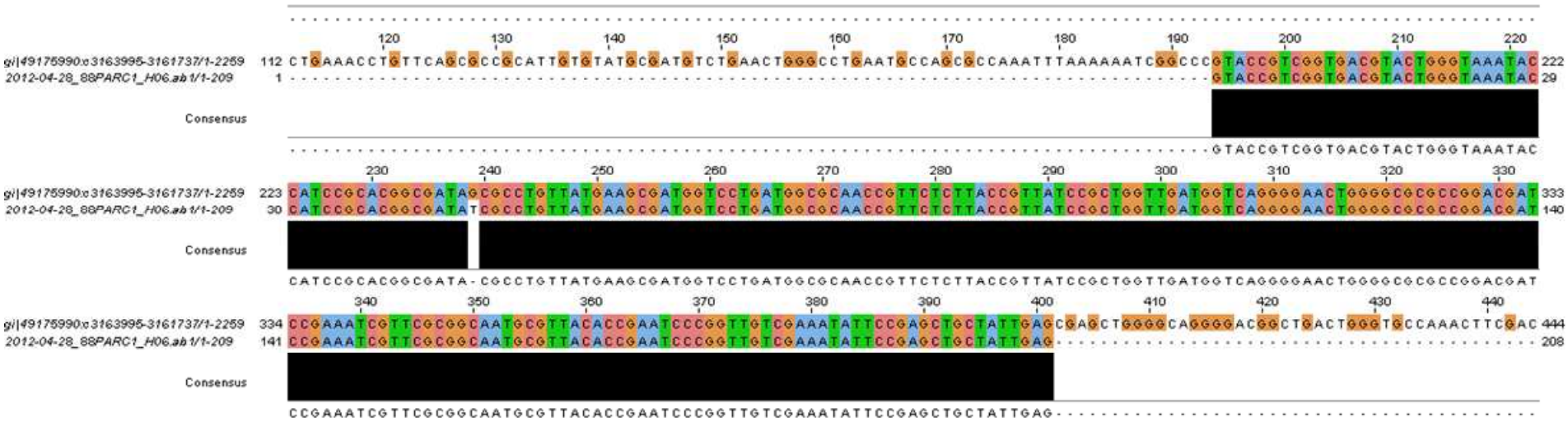
Séquence du haut: séquence de référence NCBI Référence Séquence: NC_000913.2
Séquence du bas: séquences testée

ParC

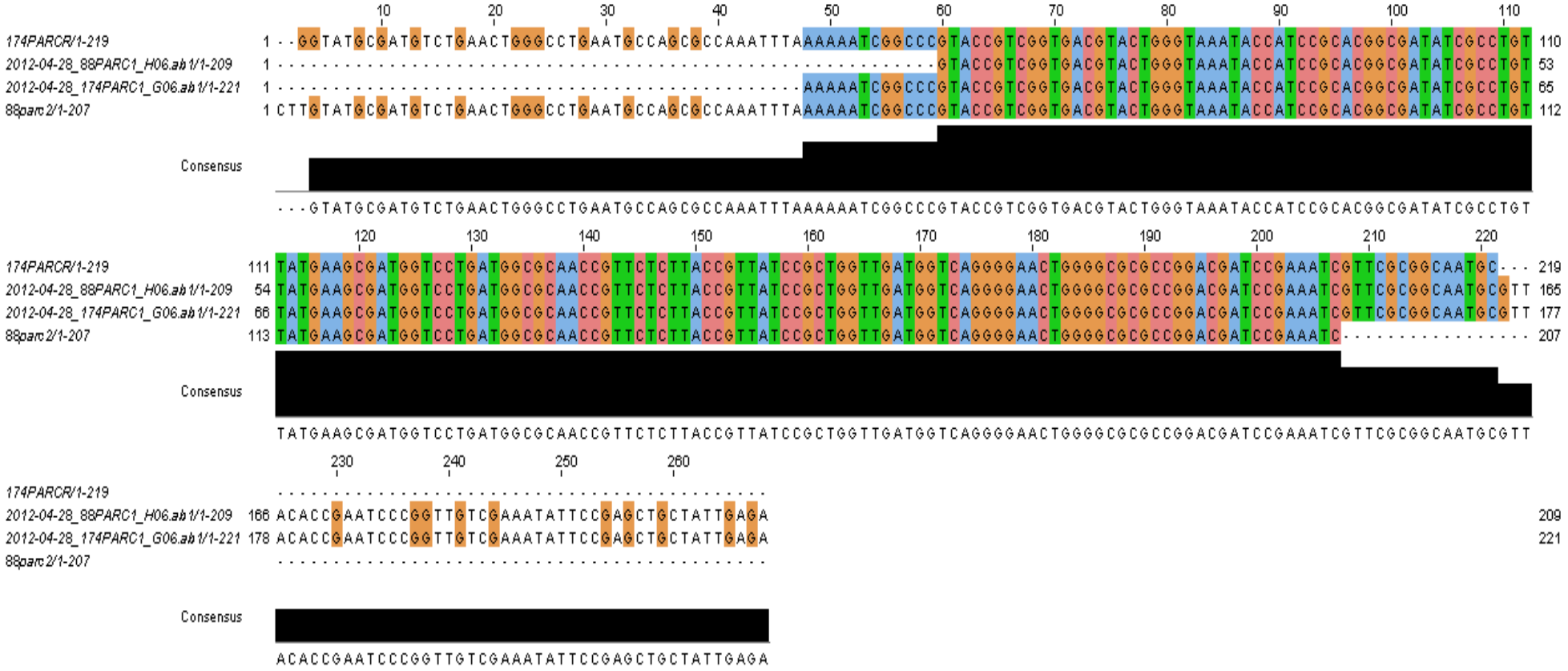


Séquence du haut: séquence de référence NCBI Reference Sequence: NC_000913.2
Séquence du bas: séquences E174

ParC



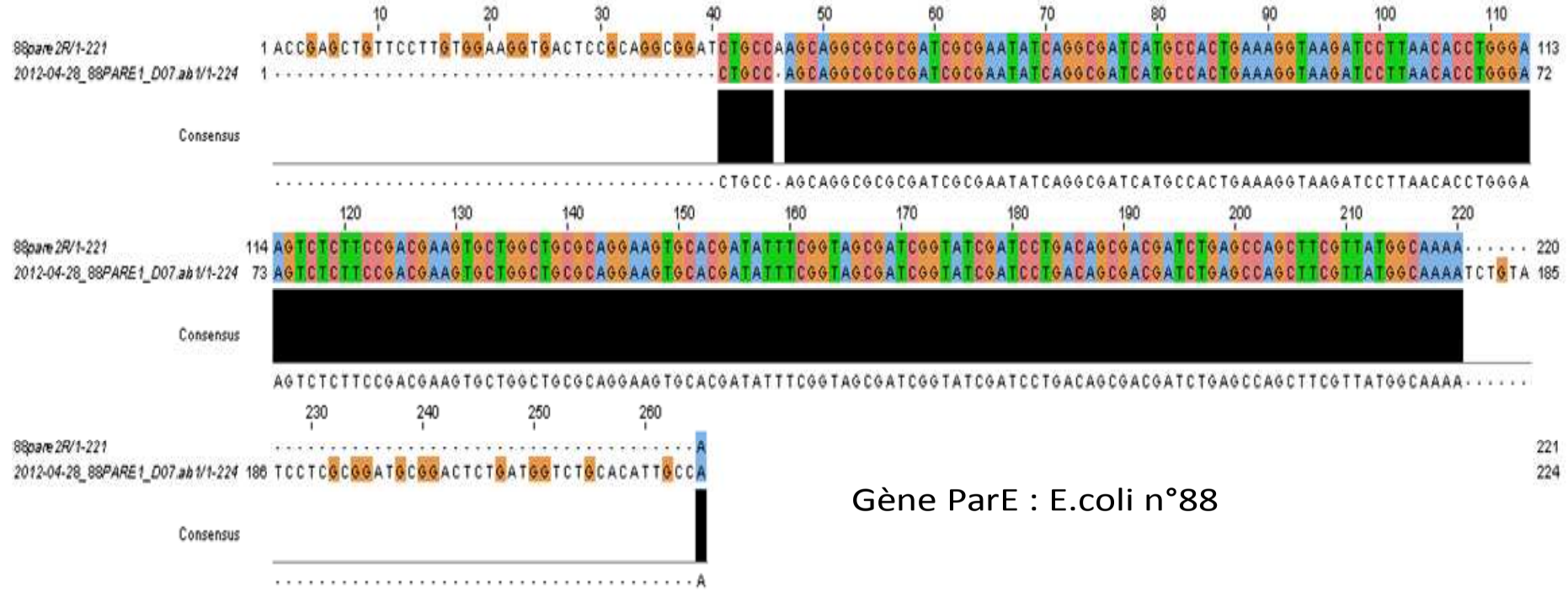
Séquence du haut: séquence de référence NCBI Reference Sequence: NC_000913.2
Séquence du bas: séquences E88/E174



Alignements des séquences parC des souches 88 et 174

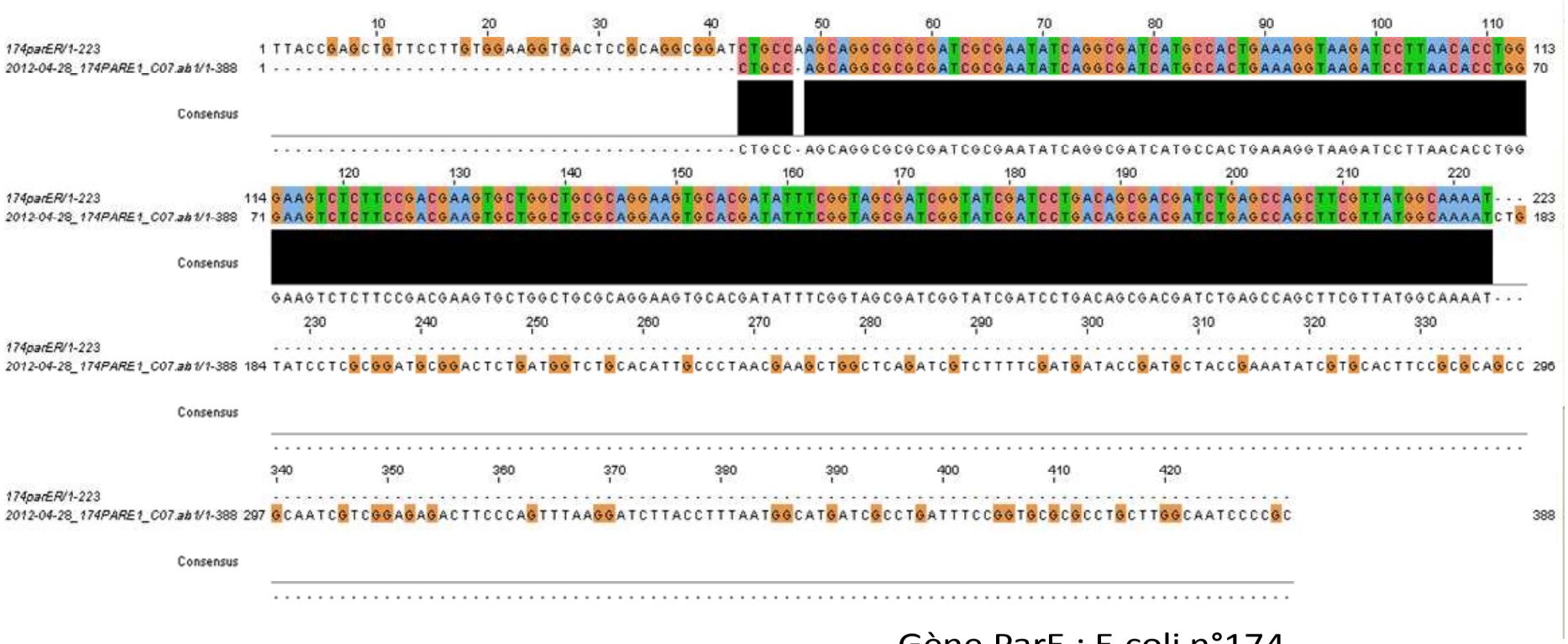
➔Les deux souches ont une séquence identique

parE



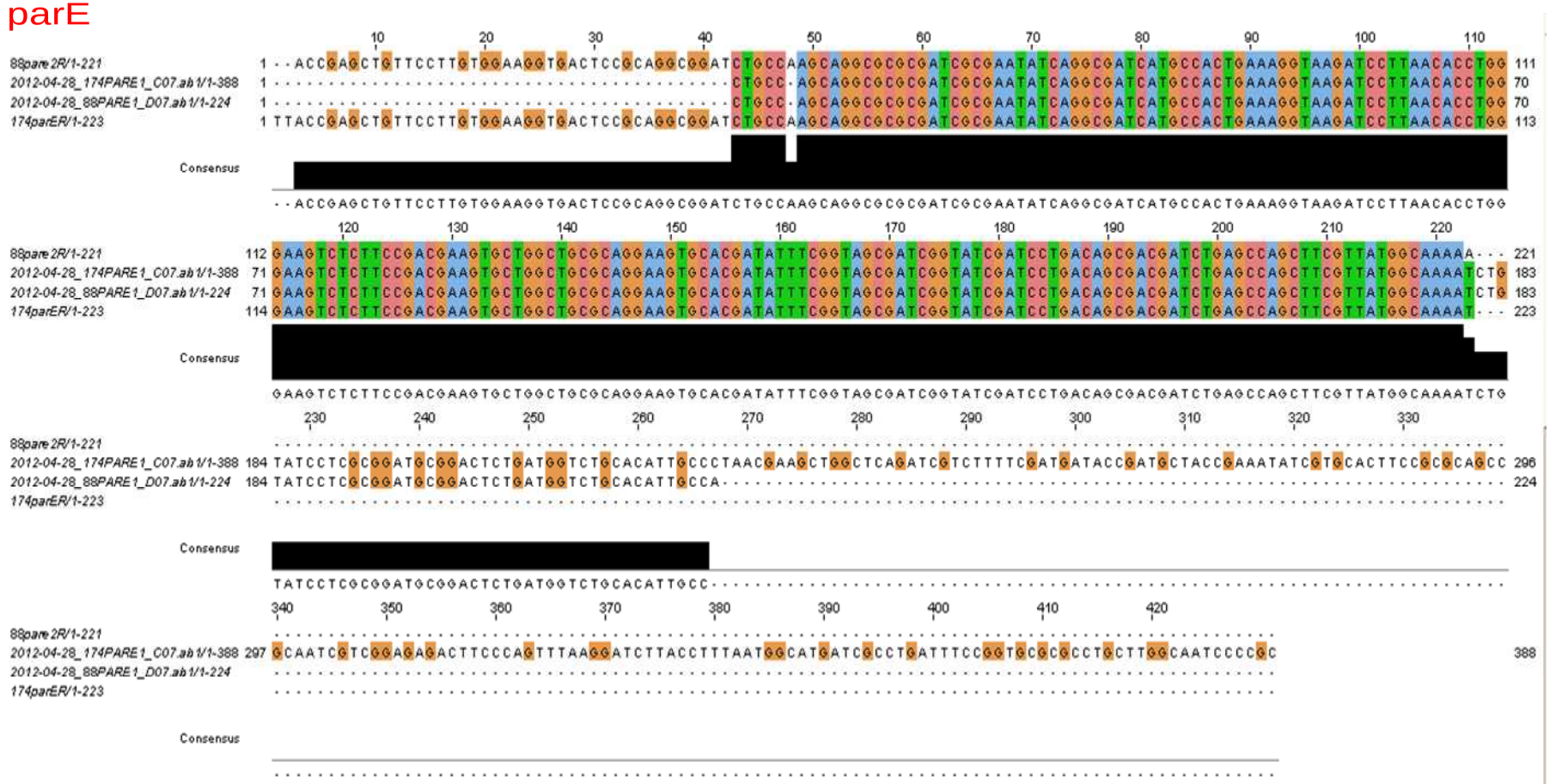
Gène ParE : E.coli n°88

parE



Gène ParE : E.coli n°174

parE



Alignements des séquences parE des souches 88 et 174
➔les deux souches ont une séquence identique

Annexe 5 : Phénotypes de la métallo-antibiorésistance de la collection de souches d'*E.coli* aviaires

TABLEAUX I : METALOTYPES - ANTIBIOTYPES

Souche	Métallotype	Nombre de métaux	Antibiotype	Nombre d'ATB
E3	Hg Zn Cr	3	AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, K, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX	12
E5	Hg Ag Zn	3	AMX, AMP, TIC, CZ, NA	5
E6	Ag Zn	2	AMX, AMP, TIC, SXT, NA	5
E8	Zn Pb	2	AMX, AMP, TIC, CZ, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX PF	11
E10	Zn Pb	2	AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, NA, PA, CIP, OFX, PF	10
E11	Zn Pb	2	AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CFM, K, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	16
E13	Zn Pb Cr	3	AMX, AMP, TIC, K, NA, PA, CIP, OFX, PF	9
E14	Hg Ag Zn Pb Cr	5	AMX, AMP, TIC	3
E15	Zn Pb Cr	3	AMX, AMP, AMC, TIC, NA, PA, CIP, OFX PF	9
E16	Zn Pb	2	AMX, AMP, TIC, ATM, CTX, CAZ, CPO, CFM, SXT NA	10
E18	Cd Zn Pb	3	AMX, AMP, TIC CZ, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	11
E20	Zn Pb Cr	3	AMX, AMP, TIC, NA	4
E21	Cd Zn Pb	3	AMX, AMP, TIC, CZ, NA, PA	6
E22	Zn Pb Cr	3	-	0
E23	Zn Pb Cr	3	NA	1
E24	Zn Pb Cr	3	AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CP0, SXT, NA, PA	11
E25	Cd Zn Pb	3	NA, PA	2
E26	Zn	1	AMX, AMP, AMC, TIC, ATM, CTX, CAZ, CFM, TE, SXT, NA, PA	12
E29	Ag Zn	2	AMX, AMP, AMC, TIC, NA, PA, CIP , OFX PF	9
E30	Zn	1	AMX, TIC, CZ	3
E31	Ag	1	NA, PA	2
E33	Ag	1	AMX, AMP, AMC, TIC, SXT, NA, PA	7

Annexe 5

TABLEAUX I (suite) : METALOTYPES - ANTIBIOTYPES

Souche	Métallotype	Nombre de métaux	Antibiotype	Nombre d'ATB
E34	Zn	1	AMX, AMP, TIC, SXT	4
E38	Zn Cr	2	AMX, AMP, TIC, K, NA, PA, CIP, OFX	8
E39	Zn Cr	2	AMX, AMP, TIC, NA	4
E41	Zn Cr	2	K, TE, NA	3
E42	Zn Cr	2	AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CFM, SXT, NA, CIP, OFX, PF	13
E43	Zn Pb Cr	3	K, NA, PA	3
E44	Zn Pb Cr	3	AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, K, TE, SXT, NA, OFX	10
E45	Zn Pb Cr	3	AMP, TIC, CZ, NA	4
E46	Zn Cr	2	_	0
E48	Zn Pb	2	AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CFM, K, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	16
E50	Zn Pb	2	AMX, AMP AMC, TIC, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	10
E51	Hg Ag Zn Pb Cr	5	AMX, AMP, TIC, CZ, NA	5
E52	Zn	1	_	0
E53	Zn Pb	2	TE, NA	2
E54	Ag ZnPb	3	AMX, AMP, AMC, TIC	4
E57	Hg Ag	2	_	0
E59	Hg Ag Zn Pb Cr	5	AMX	1
E61	Zn Pb	2	_	0
E63	Cd Zn Pb	3	AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CFM, K, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	16
E65	Zn Pb	2	AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CFM, K, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	16
E66	Zn Pb Cr	3	AMX, AMP, TIC, SXT	4
E67	Pb	1	_	0
E69	Zn Pb	2	AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CFM, K, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	16

Annexe 5

TABLEAUX I (suite) : METALOTYPES - ANTIBIOTYPES

Souche	Métallotype	Nombre de métaux	Antibiotype	Nombre d'ATB
E73	Zn Pb Cr	3	SXT	1
E74	Zn Pb	2	AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CFM, K, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	16
E75	Zn	1	AMX, AMP, TIC	3
E76	Z n	1	AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, FOX, CTX, CAZ, CFM, K, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	17
E82	Zn	1	AMX, AMP, AMC, TIC, CZ	4
E83	Hg Ag Zn	3	SXT	1
E84	Zn	1	AMX, AMP, TIC, TE, NA, PA	6
E86	Hg Ag Zn Pb	4	AMX, AMP, AMC, TIC, TE	5
E87	Ag Pb	2	_	0
E88	Zn Pb	2	AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CFM, K, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	16
E90	Zn Pb	2	AMX, AMP, TIC, NA	4
E92	Pb	1	AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CFM, NA, PA, CIP, OFX, PF	13
E93	Zn Pb	2	AMX, AMP, TIC, CZ, SXT	5
E95	Hg Ag Zn Pb	4	_	0
E100	Zn Pb	2	AMX, AMP, AMC, TIC, CL, SXT	6
E107	Zn Pb	2	SXT, NA, PA	3
E109	Cd	1	AMX, AMP, TIC, SXT, NA, PA, OFX	7
E114	Zn Pb	2	_	0
E115	Zn	1	AMP, TIC, SXT	3
E117	Zn	1	_	0
E124	Zn Pb Cr	3	K, NA , PA	3
E125	Zn Pb	2	_	0
E129	Hg Ag Zn	3	AMX, AMP, AMC, TIC, K, SXT, NA, PA, OFX	9
E139	Zn Pb	2	NA, PA	2

Annexe 5

TABLEAUX I (suite) : METALOTYPES - ANTIBIOTYPES

Souche	Métallotype	Nombre de métaux	Antibiotype	Nombre d'ATB
E149	Zn	1	AMX, AMP, TIC, K, SXT, NA, PA, OFX	8
E158	Zn	1	AMX, AMP, TIC, K, SXT, NA, PA, OFX	8
E159	Zn	1	AMX, AMP,TIC, SXT, NA, OFX	6
E164	Cd Zn Cr	3	AMX AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CPO, CFM, SXT, NA	11
E165	Cd Zn Pb Cr	4	AMX, AMP, TIC, TE, NA, PA, CIP, OFX, PF	9
E166	Zn Pb	2	AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, K, TE, SXT, NA, PA, OFX	11
E167	Zn Pb Cr	3	AMX, AMC, AMP, TIC, TE, NA	6
E168	ZnCr	1	AMX, AMP, AMC, TIC, TE, NA	6
E169	Cd Zn Pb	3	AMX, AMP, TIC, CZ, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX	10
E170	Zn Pb Cr	3	AMX, AMP, TIC, SXT, NA	5
E171	Ag Zn Cr	3	AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, TE	6
E173	Zn Pb Cr	3	AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CFM, K, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	16
E174	Zn Pb Cr	3	AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CPO, CFM, K, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	17
E175	Zn Pb Cr	3	AMX, AMP, TIC, TE, SXT	5
E176	Zn Pb Cr	3	AMX, AMP, TIC, TE, SXT, NA, PA	7
E177	Cd Zn Pb	3	AMX, AMC, AMP, TIC, CZ, K, NA, PA, CIP, OFX	10
E179	Zn Pb	2	TE	1
E183	Zn Pb	2	AMX, AMP, AMC, TIC, CZ	5
E184	Zn Pb Cr	3	AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	12

Annexe 5

TABLEAUX I (suite) : METALOTYPES - ANTIBIOTYPES

Souche	Métallotype	Nombre de métaux	Antibiotype	Nombre d'ATB
E185	Cd Zn Pb	3	_	0
E186	Zn Pb	2	AMX, AMP, TIC, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	10
E187	Cd Zn Cr	3	_	0
E188	Zn Pb	2	AMX, AMP AMC, TIC, CZ, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	11
E190	Zn Pb Cr	3	AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CFM, K, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	16
E191	Zn Cr	2	_	0
E195	Zn Cr	2	AMX, AMP, TIC	3
E197	Zn Pb Cr	3	AMX, AMP, TIC, K, SXT, NA, PA	7
E201	Zn Pb Cr	3	AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CFM, K, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	16
E204	Cd Zn Pb	3	_	0
E206	Cd Zn Pb Cr	4	AMX, AMP, TIC	3
E210	Cr	1	AMX, AMP , TIC, CZ, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	10
E211	Zn Cr	2	AMX, AMP , AMC, TIC, SXT	5
E212	Zn	1	AMX, AMP, AMC, TIC, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	10
E213	Zn Cr	2	AMX, AMP, TIC, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF,	9
E214	Zn Pb Cr	3	TE, SXT	2
E215	Cd Zn Pb Cr	4	SXT	1
E216	Zn Pb	2	AMX, AMP, TIC, TE, NA, PA	6

Annexe 5

TABLEAUX I (suite) : METALOTYPES - ANTIBIOTYPES

Souche	Métallotype	Nombre de métaux	Antibiotype	Nombre d'ATB
E217	Zn	1	AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, SXT, NA, PA	8
E224	Hg Ag Zn Pb Cr	5	TE, SXT	2
E225	Ag Zn Pb Cr	4	_	0
E226	Pb	1	TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	7
E227	Ag Zn Cr	3	AMX, AMP, AMC, TIC, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	10
E228	Ag	1	_	0
E229	Zn Cr	2	_	0
E232	Zn Pb Cr	3	AMX, AMP, TIC, SXT	4
E233	Zn Pb Cr	3	AMX, AMP, TIC	3
E234	Pb Cr	2	AMX, AMP, TIC, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	9
E235	Cr	1	_	0
E236	Cr	1	AMX, AMC, TIC, CZ, K, SXT, NA, PA	8
E237	Zn	1	AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, SXT, NA	7
E238	Zn Pb	2	AMX, TIC, K, TE, SXT, NA, PA	7
E239	Zn Pb	2	AMX, AMP, TIC, CZ	4
E240	Zn Pb	2	AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	11
E241	Ag Zn Pb Cr	4	AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	10
E243	Zn	1	AMX, AMP, AMC, TIC, K, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	11
E246	Zn Cr	2	_	0
E247	Zn Pb Cr	3	AMX, AMP, TIC, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	9
E248	Hg Ag Zn Pb Cr	5	AMX, AMP, TIC	3

Annexe 5

TABLEAUX I (suite) : METALOTYPES - ANTIBIOTYPES

Souche	Métallotype	Nombre de métaux	Antibiotype	Nombre d'ATB
E249	Zn Pb Cr	3	AMX, AMP, TIC, K, SXT, NA, PA	7
E250	Zn	1	_	0
E251	Zn Pb	2	NA	1
E252	Zn Cr	2	AMX, AMP, TIC, SXT, NA, PA	6
E254	Cd Hg Zn Pb Cr	5	AMX, AMP, TIC, SXT	4
E255	Zn Pb Cr	3	AMX, AMP, TIC, SXT	4
E258	Ag Zn Pb Cr	4	_	0
E261	Zn	1	TE	1
E262	Zn Pb Cr	3	AMX, AMP, AMC, TIC, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	11
E263	Zn Pb Cr	3	_	0
E264	Ag Zn Cr	3	_	0
E265	Ag Zn Pb	3	AMX, AMP, AMC, TIC, TE, SXT, NA	7
E266	Zn Pb Cr	3	_	0
E268	Cr	1	_	0
E269	Cd Zn Pb Cr	4	AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, TE, SXT, NA	8
E270	Zn	1	TE	1
E271	Zn Pb Cr	3	AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, K, TE, SXT, NA, PA	10
E274	Zn Pb	2	AMX, AMP AMC, TIC, CZ, TE, SXT NA	8
E276	Hg Ag Zn Pb	4	_	0
E278	Cd Zn Pb	3	_	0

Annexe 5

TABLEAUX I (suite) : METALOTYPES - ANTIBIOTYPES

Souche	Métallotype	Nombre de métaux	Antibiotype	Nombre d'ATB
E279	Cd Zn Pb Cr	4	AMX, AMP AMC, TIC, CZ, TE, SXT NA, PA	9
E280	Cd Zn Pb Cr	4	AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, K, TE, SXT, NA, PA, OFX, PF	12
E281	Zn Pb Cr	3	AMX, AMP, TIC	3
E282	Zn	1	AMX, AMP, AMC, TIC, ATM, CZ, FOX, CTX, CAZ, K, TE, SXT, NA, PA, OFX	15
E283	Ag Zn Pb Cr	4	AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, TE, SXT, NA	8
E284	Ag Zn Pb Cr	4	AMX, AMP,TIC, TE, SXT, NA	6
E285	Zn Pb	2	AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, TE, NA	7
E287	Zn Pb	2	K, GEN	2
E292	Zn Pb Cr	3	AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, GEN, TE, NA	8
E299	Zn Pb Cr	3	AMX, AMP, TIC, CZ, TE	5
E300	Zn Pb Cr	3	_	0
E301	Zn Pb Cr	3	AMX, AMP, AMC, TIC, TE, SXT, NA, PA, OFX, PF	10
E302	Zn Pb Cr	3	AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, SXT, NA	7
E304	Zn Pb	2	AMX, AMP, TIC, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	9
E312	Zn Pb Cr	3	AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	12
E317	Zn Pb Cr	3	AMX, AMP, TIC	3
E319	Hg Ag Zn Pb Cr	5	K, NA, PA	3
E320	Zn Pb Cr	5	AMX, AMP, TIC, CZ, TE, NA, PA, CIP, OFX, PF	10
E321	Zn Pb Cr	5	AMX, AMP, TIC, SXT, NA, PA, OFX	7
E322	Zn Pb Cr	5	AMX, AMP, TIC, SXT, NA, PA, OFX	7

Annexe 5

TABLEAUX I (suite) : METALOTYPES - ANTIBIOTYPES

Souche	Métallotype	Nombre de métaux	Antibiotype	Nombre d'ATB
E328	Hg Zn Pb Cr	4	AMX, AMP, TIC, SXT, NA	5
E329	Zn Pb Cr	3	_	0
E330	Hg Zn Pb Cr	4	AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, TE, SXT, NA, PA, OFX	10
E332	Cd Ag Zn Pb Cr	5	AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, TE, SXT, NA	8
E333	Ag Zn Pb Cr	4	AMX, AMP, TIC, TE, NA, PA	6
E334	Hg Ag Zn Pb Cr	5	AMX, AMP, TIC, CZ, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	10
E335	Cd Pb	2	NA, PA	2
E336	Cd Pb	2	_	0
E337	Ag Zn Pb Cr	4	AMX, AMP, TIC	3
E338	Ag Pb Cr	3	TE	1
E339	Cd Ag Zn Pb Cr	5	AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, TE, SXT	7
E340	Zn Pb	2	NA, PA	2
E341	Ag Pb Cr	3	AMX, AMP, TIC, CZ	4
E345	Ag Zn	2	_	0
E347	Cd Hg Ag Zn	4	_	0
E348	Zn	1	AMX, AMP, TIC, TE	4
E349	Zn Cr	2	AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, TE, SXT, NA	8
E352	Cd Hg Cr	3	AMX, AMP, TIC	3
E354	Pb	1	AMX, AMP, TIC	3

Annexe 5

Tableau II : Profils d'antibiotiques associés par métallotype

Métallotype	Nombre de métaux	Nombre de souches	Antibiotype associé	Nombre d'ATB	Nombre de souches	Nombre d'antibiotype associé par métallotype
Hg Ag Zn Pb Cr	5	7	AMX, AMP, TIC, CZ, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	10	**1** (334)	**6**
			AMX, AMP, TIC, CZ, NA	5	**1** (E51)	
			AMX, AMP, TIC	3	**2** (E14, E 248)	
			K, NA, PA	3	**1 (**E319)	
			TE SXT	2	**1** (E224)	
			AMX	1	**1** (E59)	
Cd Ag Zn Pb Cr	5	2	AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, TE, SXT, NA	8	**1** (E332)	**2**
			AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, TE, SXT	7	**1** (E339)	
Cd Hg Zn Pb Cr	5	1	AMX, AMP, TIC, SXT	4	**1** (E254)	**1**
Ag Zn Pb Cr	4	7	AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	10	**1** (E241)	**6**
			AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, TE, SXT, NA	8	**1** (E283)	
			AMX, AMP,TIC, TE, SXT, NA	6	**1** (E284)	
			AMX, AMP, TIC, TE, NA, PA	6	**1** (E333)	
			AMX, AMP, TIC	3	**1** (E337)	
			-	0	**2 (**E225, E258)	
Cd Zn Pb Cr	4	6	AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, K, TE, SXT, NA, PA, OFX, PF	12	**1** (E280)	**6**
			AMX, AMP, TIC, TE, NA, PA, CIP, OFX, PF	9	**1** (E165)	
			AMX, AMP AMC, TIC, CZ, TE, SXT NA, PA	9	**1** (E279)	
			AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, TE, SXT, NA	8	**1** (E269)	
			AMX, AMP, TIC	3	**1** (E206)	
			SXT	1	**1** (E215)	

Annexe 5

Tableau II (Suite) : Profils d'antibiotiques associés par métallotype

Métallotype	Nombre de métaux	Nombre de souches	Antibiotype associé	Nombre d'ATB	Nombre de souche	Nombre d'antibiotype associé par métallotype
Hg Ag Zn Pb	4	3	AMX, AMP, TIC, TE, SXT, NA, PA	7	**1** (E276)	**3**
			AMX, AMP, AMC, TIC, TE	5	**1** (E86)	
			-	0	**1** (E95)	
Hg Zn Pb Cr	4	2	AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, TE, SXT, NA, PA, OFX	10	**1** (E330)	**2**
			AMX, AMP, TIC, SXT, NA	5	**1** (E328)	
Cd Hg Ag Zn	4	1	-	0	**1** (E347)	**1**
Zn Pb Cr	3	44	AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CPO, CFM, K, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	17	**1** (E174)	**35**
			AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CFM, K, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	16	**3** (E173, E190, E201)	
			AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	12	**2** (E184, E312)	
			AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CP0, SXT, NA, PA	11	**1** (E24)	
			AMX, AMP, AMC, TIC, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	11	**1** (E262)	
			AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, K, TE, SXT, NA, OFX	10	**1** (E44)	
			AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, K, TE, SXT, NA, PA	10	**1** (E271)	
			AMX, AMP, AMC, TIC, TE, SXT, NA, PA, OFX, PF	10	**1** (E301)	
			AMX, AMP, TIC, CZ, TE, NA, PA, CIP, OFX, PF	10	**1 (**E320)	
			AMX, AMP, AMC, TIC, NA, PA, CIP, OFX PF	9	**1** (E15)	
			AMX, AMP, TIC, K, NA, PA, CIP, OFX, PF	9	**1** (E13)	
			AMX, AMP, TIC, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	9	**1** (E247)	
			AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, GEN, TE, NA	8	**1** (E292)	

Annexe 5

Tableau II (Suite) : Profils d'antibiotiques associés par métallotype

Métallotype	Nombre de métaux	Nombre de souches	Antibiotype associé	Nombre d'ATB	Nombre de souche	Nombre d'antibiotype associé par métallotype
Zn Pb Cr	3	44	AMX, AMP, TIC, K, SXT, NA, PA	7	**2** (E197, E249)	**35**
			AMX, AMP, TIC, TE, SXT, NA, PA	7	**1** (E176)	
			AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, SXT, NA	7	**1** (E302)	
			AMX, AMP, TIC, SXT, NA, PA, OFX	7	**1** (E321)	
			AMX, AMP, TIC, SXT, NA, PA, OFX	7	**1 (**E322)	
			AMX, AMP, TIC, CZ, NA, PA	6	**1** (E22)	
			AMX, AMC, AMP, TIC, TE, NA	6	**1** (E167)	
			AMX, AMP, TIC, CZ, TE	5	**1** (E299)	
			AMX, AMP, TIC, SXT, NA	5	**1 (**E170)	
			AMX, AMP, TIC, TE, SXT	5	**1 (**E175)	
			AMX, AMP, TIC, NA	4	**1** (E20)	
			AMP, TIC, CZ, NA	4	**1** (E45)	
			AMX, AMP, TIC, SXT	4	**2 (**E255, E66)	
			AMX, AMP, TIC, SXT	4	**1 (**E232)	
			K, NA, PA	3	**2** (E43, E124)	
			AMX, AMP, TIC	3	**3**(E233, E281, E317)	
			TE, SXT	2	**1** (E214)	
			NA	1	**1** (E23)	
			SXT	1	**1(** E73)	
			–	0	**4** (E263, E266, E300, E329)	

Annexe 5

Tableau (Suite) : Profils d'antibiotiques associés par métallotype

Métallotype	Nombre de métaux	Nombre de souches	Antibiotype associé	Nombre d'ATB	Nombre de souche	Nombre d'antibiotype associé par métallotype
Cd Zn Pb	3	9	AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CFM, K, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	16	**1**(E63)	**6**
			AMX, AMP, TIC CZ, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	11	**1** (E18)	
			AMX, AMP, TIC, CZ, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX	10	**1** (E169)	
			AMX, AMC, AMP, TIC, CZ, K, NA, PA, CIP, OFX	10	1 (E177)	
			NA, PA	2	**1**(E25)	
			_	0	**4** (E21, E185, E204, E278)	
Ag Zn Cr	3	3	AMX, AMP, AMC, TIC, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	10	**1** (E227)	**3**
			AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, TE	6	**1**(E171)	
			-	0	**1**(E264)	
Ag Zn Pb	3	2	AMX, AMP, AMC, TIC, TE, SXT, NA	7	**1** (E265)	**2**
			AMX, AMP, AMC, TIC	4	**1**(E54)	
Hg Ag Zn	3	3	AMX, AMP, AMC, TIC, K, SXT, NA, PA, OFX	9	**1** (E129)	**3**
			AMX, AMP, TIC, CZ, NA	5	**1** (E5)	
			SXT	1	**1**(E83)	
Ag Pb Cr	3	2	AMX, AMP, TIC, CZ	4	**1 (**E341)	**2**
			TE	1	**1** (E338)	
			AMX, AMP, AMC, TIC	4	**1** (E54)	

Annexe 5

Tableau II (Suite) : Profils d'antibiotiques associés par métallotype

Métallotype	Nombre de métaux	Nombre de souches	Antibiotype associé	Nombre d'ATB	Nombre de souche	Nombre d'antibiotype associé par métallotype
Cd Zn Cr	3	2	AMX AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CPO, CFM, SXT, NA	11	**1** (E164)	**2**
			-	0	**1** (E187)	
Cd Hg Cr	3	1	AMX, AMP, TIC	3	**1** (E352)	**1**
Hg Zn Cr	3	1	AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, K, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX	12	**1** (E3)	**1**
Zn Pb	2	35	AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CFM, K, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	16	**6** (E11, E48, E65, E69, E74, E88)	**26**
			AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, K, TE, SXT, NA, PA, OFX	11	**1** (E166)	
			AMX, AMP, TIC, CZ, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX PF	11	**1** (E8)	
			AMX, AMP AMC, TIC, CZ, SXT, NA, PA, CIP, OFX PF	11	**2** (E188, E240)	
			AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, NA, PA, CIP, PF, OFX	10	**1** (E10)	
			AMX, AMP, TIC, ATM, CTX, CAZ, CPO, CFM, SXT NA	10	**1** (E16)	
			AMX, AMP, AMC, TIC, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	10	**1** (E50)	
			AMX, AMP, TIC, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	10	**1** (E186)	
			AMX, TIC, CZ, K, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX	10	**1** (E343)	
			AMX, AMP, TIC, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	9	**1** (E304)	
			AMX, AMP AMC, TIC, CZ, TE, SXT, NA	8	**1** (E274)	
			AMX, TIC, K, TE, SXT, NA, PA	7	**1** (E238)	
			AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, TE, NA	7	**1** (E285)	
			AMX, AMP, AMC, TIC, CL, SXT	6	**1** (E100	
			AMX, AMP, TIC, TE, NA, PA	6	**1** (E216)	

Annexe 5

Tableau II (Suite) : Profils d'antibiotiques associés par métallotype

Métallotype	Nombre de métaux	Nombre de souches	Antibiotype associé	Nombre d'ATB	Nombre de souche	Nbre d'antibiotype associé par métallotype
Zn Pb	2	35	AMX, AMP, TIC, CZ, SXT	5	**1** (E93)	**26**
			AMX, AMP, AMC, TIC, CZ	5	**1** (E183)	
			AMX, AMP, TIC, CZ	4	**1** (E239)	
			AMX, AMP, TIC, NA	4	**1** (E90)	
			SXT, NA, PA	3	**2** (E107, E114)	
			TE, NA	2	**1** (E53)	
			NA, PA	2	**2** (E139, E340)	
			K, GEN	2	**1**(E287)	
			TE	1	**1** (E179)	
			NA	1	**1** (E251)	
			_	0	**2** (E61, E125)	
Zn Cr	2	14	AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CFM, SXT, NA, CIP, OFX, PF	13	**1** (E42)	**11**
			AMX, AMP, TIC, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	9	**1** (E213)	
			AMX, AMP, TIC, K, NA, PA, CIP, OFX	8	**1** (E38)	
			AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, TE, SXT, NA	8	**1** (E349)	
			AMX, AMP, TIC, SXT, NA, PA	6	**1** (E252)	
			AMX, AMP, AMC, TIC, TE, NA	6	**1** (E168)	
			AMX, AMP, AMC, TIC, SXT	5	**1** (E211)	
			AMX, AMP, TIC, NA	4	**1** (E39)	
			K, TE, NA	3	**1** (E41)	
			AMX, AMP, TIC	3	**1** (E195)	
			_	0	**4** (E46, E191, E229, E246)	

Annexe 5

Tableau II (Suite) : Profils d'antibiotiques associés par métallotype

Métallotype	Nombre de métaux	Nombre de souches	Antibiotype associé	Nombre d'ATB	Nombre de souche	Nombre d'antibiotype associé par métallotype
Ag Zn	2	3	AMX, AMP, AMC, TIC, NA, PA, CIP , OFX PF	9	**1** (E29)	**3**
			AMX, AMP, TIC, SXT, NA	5	**1** (E6)	
			_	0	**1** (E345)	
Ag Pb	2	1	_	0	**1** (E87)	**1**
Cd Pb	2	2	NA, PA	2	**1** (E335)	**1**
			_	0	**1** (E336)	
Hg Ag	2	1	_	0	**1** (E57)	**1**
Pb Cr	2	1	AMX, AMP, TIC, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	9	**1** (E234)	**1**
Zn	1	22	AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, FOX, CTX, CAZ, CFM, K, TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	17	**1** (E76)	**22**
			AMX, AMP, AMC, TIC, ATM, CZ, FOX, CTX, CAZ, K, TE, SXT, NA, PA, OFX	15	**1** (E282)	
			AMX, AMP, AMC, TIC, ATM, CTX, CAZ, CFM, TE, SXT, NA, PA	12	**1** (E26)	
			AMX, AMP, AMC, TIC, K, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	11	**1** (E243)	
			AMX, AMP, AMC, TIC, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	10	**1** (E212)	
			AMX, AMP, TIC, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	9	**1** (E250)	
			AMX, AMP, TIC, K, SXT, NA, PA, OFX	8	**1** (E149)	

Annexe 5

Tableau II (Suite) : Profils d'antibiotiques associés par métallotype

Métallotype	Nombre de métaux	Nombre de souches	Antibiotype associé	Nombre d'ATB	Nombre de souche	Nombre d'antibiotype associé par métallotype
Zn	**1**	**22**	AMX, AMP, TIC, K, SXT, NA, PA, OFX	8	**1** (E158)	**22**
			AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, SXT, NA, PA	8	**1** (E217)	
			AMX, AMP, AMC, TIC, CZ, SXT, NA	7	**1 (**E237)	
			AMX, AMP, TIC, TE, NA, PA	6	**1** (E84)	
			AMX, AMP, TIC, SXT, NA, OFX	6	**1** (E159)	
			AMX, AMP, TIC, SXT	4	**1**(E34)	
			AMX, AMP, AMC, TIC, CZ	4	**1** (E82)	
			AMX, AMP, TIC, TE	4	**1** (E348)	
			AMP, TIC, SXT	3	**1** (E115)	
			AMX, AMP, TIC	3	**1** (E75)	
			AMX, TIC, CZ	3	**1** (E30)	
			TE	1	**1** (E261, E270)	
			_	0	**2** (E117, E250)	
			_	0	**1**(E52)	
Pb	**1**	**4**	AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CFM, NA, PA, CIP, OFX, PF	13	**1** (E92)	**4**
			AMX, AMP , TIC, CZ, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	10	**1** (E210)	
			AMX, AMC, TIC, CZ, K, SXT, NA, PA	8	**1** (E236)	
			TE, SXT, NA, PA, CIP, OFX, PF	7	**1** (E226)	

Annexe 5

Tableau II (Suite) : Profils d'antibiotiques associés par métallotype

Métallotype	Nombre de métaux	Nombre de souches	Antibiotype associé	Nombre d'ATB	Nombre de souche	Nombre d'antibiotype associé par métallotype
Cr	**1**	**4**	AMX, AMP, TIC	3	**1** (E354)	**3**
			_	0	**1** (E67)	
			_	0	**2** (E235, E268)	
Ag	**1**	**3**	AMX, AMP, AMC, TIC, SXT, NA, PA	7	**1** (E33)	**3**
			NA, PA	2	**1** (E31)	
			_	0	**1** (E228)	
Cd	**1**	**1**	AMX, AMP, TIC, SXT, NA, PA, OFX	7	**1** (E109)	**1**

Annexe 5

Tableau III (suite) : Profils de bêta-lactamines associés aux métaux lourds

Profil associé aux Bêtalactamines	Métallotype associé	Nombre de métaux	Nombre de souches	Nombre de métallotypes Associés
AMX AMP TIC	**Hg Ag Zn Pb Cr**	5	**2** (E14, E 248)	**16**
	Cd Hg Zn Pb Cr	5	**1** (E 254)	
	Cd Zn Pb Cr	4	**2** (E165, E206)	
	Hg Ag Zn Pb	4	**1** (E276)	
	Hg Zn Pb Cr	4	**1** (E328)	
	Zn Pb Cr	3	**4** (E13, E176, E 197, E249)	
	Hg Ag Zn	3	**1** (E5)	
	Ag Pb Cr	3	**1 (**E341)	
	AMX, AMP, TIC	3	**1** (E352)	
	Zn Pb	2	**9** (E90, E93, E186, E195, E213, E216**,** E239, E252, E304)	
	Zn Cr	2	**5** (E38, E39, E195, E213, E252)	
	Ag Zn	2	**1** (E6)	
	Pb Cr	2	**1** (E234)	
	Zn	1	**8** (E34, E75, E84, E149, E158, E159 E250, E348)	
	Pb	1	**1** (E354)	
	Cd	1	**1** (E109)	

Annexe 5

Tableau III (suite) : Profils de bêta-lactamines associés aux métaux lourds

Profil associé aux Bêtalactamines	Métallotype associé	Nombre de métaux	Nombre de souches	Nombre de métallotypes associés
AMX, AMP, AMC, TIC, CZ	**Cd Ag Zn Pb Cr**	5	**1** (E232, E339)	**8**
	Cd Zn Pb Cr	4	**2**(E280, E269)	
	Hg Zn Pb Cr	4	**1** (E330)	
	Zn Pb Cr	3	**6 (** E44, E184, E271, E292**,** E302, E312)	
	Ag Zn Cr	3	**1** (E171)	
	Hg Zn Cr	3	**1** (E3)	
	Zn Pb	2	**7** (E166, E183, E188, E240, E274, E 285, E349)	
	Zn	1	**3** (E82 , E217, E237)	
AMX AMP TIC CZ	**Hg Ag Zn Pb Cr**	5	**1** (E51)	**5**
	Hg Ag Zn	3	**1** (E5)	
	Ag Pb Cr	3	**1 (**E341)	
	Zn Pb	2	**2** (E93, E239)	
	Cr	1	**2** (E210, E236)	

Annexe 5

Tableau III (suite) : Profils de bêta-lactamines associés aux métaux lourds

Profil associé aux Bêtalactamines	Métallotype associé	Nombre de métaux	Nombre de souches	Nombre de métallotypes associés
AMX AMP AMC TIC	**Hg Ag Zn Pb**	4	**1** (E86)	**10**
	Zn Pb Cr	3	**4** (E15, E167, E262, E301)	
	Ag Zn Cr	3	**1** (E227)	
	Ag Zn Pb	3	**1** (E54)	
	Hg Ag Zn	3	**1** (E129)	
	Ag Zn Pb	3	**1** (E265)	
	Zn Pb	2	**2** (E50, E100)	
	Zn Cr	2	**2** (E211, E168)	
	Ag Zn	2	**1** (E29)	
	Zn	1	**5** (E26, E33, E82, E212, E243)	
AMX TIC CZ	**Zn Pb**	2	**1** (E343)	**2**
	Zn	1	**1** (E30)	
AMX AMP AMC CZ	ND	ND	**1** (E 104)	**_**
AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CPO, CFM	**Zn Pb Cr**	3	**1** (E174)	**1**

ND : non determiné

Annexe 5

Tableau III (suite) : Profils de bêta-lactamines associés aux métaux lourds

Profil associé aux Bêtalactamines	Métallotype associé	Nombre de métaux	Nombre de souches	Nombre de métallotypes associés
AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CFM	**Cd Zn Pb**	3	**1** (E63)	**4**
	Zn Pb Cr	3	**4** (E42, E173, E190, E201)	
	Zn Pb	2	**6** (E11, E 48, E65, E69, E74, E88)	
	Pb	1	**1** (E92)	
AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, CTX, CAZ, CPO	**Zn Pb Cr**	3	**1** (E24)	**1**
AMX, AMP, TIC, ATM, CTX, CAZ, CPO, CFM	**Zn Pb**	2	**1** (E16)	**1**
AMX, AMP, AMC, TIC, ATM, CTX, CAZ, CFM	**Zn**	1	**1** (E26)	**1**
AMX, AMP, TIC, ATM, CTX, CFM	**Cd Zn Cr**	3	1(E164)	**1**
AMX, AMP, TIC, ATM, CZ, FOX, CTX, CAZ, CFM	**Zn**	1	1(E76)	**1**
AMX, AMP, AMC, TIC, ATM, CZ, FOX, CTX, CAZ	**Zn**	1	1 (E282)	**1**

Annexe 5

Tableau IV (suite) : Profils de quinolones associés aux métaux lourds

Profil associé aux Quinolones	Métallotype associé	Nombre de métaux	Nombre de souches	Nombre de métallotypes associés
NA	**Hg Ag Zn Pb Cr**	5	**2** (E51, E328)	**12**
	Cd Ag Zn Pb Cr	5	**1** (E332)	
	Ag Zn Pb Cr	4	**2** (E283, E284)	
	Cd Zn Pb Cr	4	**1**(E269)	
	Cd Zn Cr	3	**1** (E164)	
	Hg Ag Zn	3	**1**(E5)	
	Zn Pb Cr	3	**7** (E20, E23, E45, E167, E170, E292, E302**)**	
	Ag Zn Pb	3	**1**(E265)	
	Zn Pb	2	**4** (E8, E16, E53, E90, E274)	
	Ag Zn	2	**1 (**E6)	
	Zn Cr	1	**4** (E39, E41, E168, E349)	
	Zn	1	**2** (E237, E251)	
NA PA	**Hg Ag Zn Pb Cr**	5	**1**(E319)	**11**
	Cd Zn Pb Cr	4	**1**(E279)	
	Ag Zn Pb Cr	4	**1**(E333)	
	Cd Zn Pb	3	**1** (E25)	
	Zn Pb Cr	3	**8** (E22, E24, E43, E124, E176, E197, E249, E271)	
	Cd Pb	3	**1**(E335)	
	Zn Pb	2	**4** (E139, E216, E238, E340)	
	Zn Cr	2	**1**(E252)	

Annexe 5

Tableau IV (suite) : Profils de quinolones associés aux métaux lourds

Profil associé aux Quinolones	Métallotype associé	Nombre de métaux	Nombre de souches	Nombre de métallotypes associés
NA PA	**Ag**	1	**2** (E31, E33)	**11**
	Cr	1	**1** (E236)	
	Zn	1	**2** (E84, E217)	
NA OFX	**Zn Pb Cr**	3	**1**(E44)	**2**
	Zn	1	**1**(E159)	
NA PA OFX	**Hg Ag Zn Pb Cr**	5	**2** (E321, E322)	**6**
	Hg Ag Zn Cr	4	**1** (E330)	
	Hg Ag Zn	3	**1** (E129)	
	Zn Pb	2	**1** (E166)	
	Zn	1	**3** (E149, E158, E282)	
	Cd	1	**1** (E109)	
NA PA, CIP OFX	**Cd Zn Pb**	3	**2** (E169, E177)	**3**
	Zn Cr	2	**2** (E3, E38)	
	Zn Pb	2	**1** (E343)	
NA PA OFX PF	**Cd Zn Pb Cr**	4	**1 (**E280)	**2**
	Zn Pb Cr	3	**1** (E301)	
NA CIP OFX PF	**Zn Cr**	2	**1** (E42)	**1**
NA PA, CIP OFX PF	**Hg Ag Zn Pb Cr**	5	**1** (E334)	**13**
	Ag Zn Pb Cr	4	**1** (E241)	
	Cd Zn Pb Cr	4	**1** (E165, E280)	
	Zn Pb Cr	3	**9** (E13, E15, E173, E174, E174, E190, E201, E247, E 262)	
	Cd Zn Pb	3	**2** (E18, E63)	
	Ag Zn Cr	3	**1** (E227)	

Annexe 5

Tableau IV (suite) : Profils de quinolones associés aux métaux lourds

Profil associé aux Quinolones	Métallotype associé	Nombre de métaux	Nombre de souches	Nombre de métallotypes associés
NA PA, CIP OFX PF	**Ag Zn**	2	**1** (E29)	**13**
	Zn Pb	2	**12** (E10, E48, E50, E65, E69, E74, E76, E88, E186, E188, E240, E304)	
	Pb Cr	2	**1** (E234)	
	Zn Cr	2	**1** (E213)	
	Cr	1	**1** (E210)	
	Pb	1	**2** (E92, E226)	
	Zn	1	**2** (E212, E243)	

ANNEXE 6

Test du χ^2 d'indépendance

L'hypothèse nulle (variables indépendantes) est généralement rejetée lorsque $p \leq 0{,}05$.

Les valeurs en fond vert concernent le χ^2 des variables résistance métaux lourds (**21 :** Cd, **22 :** Hg, **23 :** Ag, **24 :** Zn, **25** : Pb et **26 :** Cr) versus résistance ATB (dans l'ordre **1 :** AMX, **2 :** AMP, **3 :** AMC, **4 :** TIC, **5 :** IPM, **6 :** CZ, **7 :** FOX**, 8 :** CTX**, 9 :** CAZ, **10 :** CFM, **11 :** K, **12 :** GEN, **13 :** TE, **14 : CL, 15 :** SXT, **16 :** NA, **17** : PA, **18 :** CIP, **19 :** OFX et **20 :** PEF) Les valeurs $p \leq 0{,}05$ sont surlignées en jaune.

Var 2 versus var 1:Khi2 = 1.7733e+02 ddl = 4 Proba = 0.000000

Var 3 versus var 1:Khi2 = 8.9190e+01 ddl = 4 Proba = 0.000000
Var 3 versus var 2:Khi2 = 9.2257e+01 ddl = 4 Proba = 0.000000

Var 4 versus var 1:Khi2 = 1.6875e+02 ddl = 4 Proba = 0.000000
Var 4 versus var 2:Khi2 = 1.6379e+02 ddl = 4 Proba = 0.000000
Var 4 versus var 3:Khi2 = 8.2380e+01 ddl = 4 Proba = 0.000000

Var 5 versus var 1:Khi2 = 4.7236e-01 ddl = 2 Proba = 0.792695
Var 5 versus var 2:Khi2 = 4.5962e-01 ddl = 2 Proba = 0.797583
Var 5 versus var 3:Khi2 = 1.2019e+00 ddl = 2 Proba = 0.553703
Var 5 versus var 4:Khi2 = 4.7236e-01 ddl = 2 Proba = 0.792695

Var 6 versus var 1:Khi2 = 5.6932e+01 ddl = 4 Proba = 0.000000
Var 6 versus var 2:Khi2 = 6.1238e+01 ddl = 4 Proba = 0.000000
Var 6 versus var 3:Khi2 = 6.8541e+01 ddl = 4 Proba = 0.000000
Var 6 versus var 4:Khi2 = 5.5474e+01 ddl = 4 Proba = 0.000000
Var 6 versus var 5:Khi2 = 1.9766e+00 ddl = 2 Proba = 0.373868

Var 7 versus var 1:Khi2 = 2.0465e+00 ddl = 4 Proba = 0.730276
Var 7 versus var 2:Khi2 = 2.9756e+00 ddl = 4 Proba = 0.564637
Var 7 versus var 3:Khi2 = 1.0818e+01 ddl = 4 Proba = 0.028447
Var 7 versus var 4:Khi2 = 2.9760e+00 ddl = 4 Proba = 0.564571
Var 7 versus var 5:Khi2 = 1.2742e-01 ddl = 2 Proba = 0.937825
Var 7 versus var 6:Khi2 = 2.2405e+01 ddl = 4 Proba = 0.000210

Var 8 versus var 1:Khi2 = 1.1876e+01 ddl = 4 Proba = 0.018267
Var 8 versus var 2:Khi2 = 1.1556e+01 ddl = 4 Proba = 0.020895
Var 8 versus var 3:Khi2 = 2.5462e+01 ddl = 4 Proba = 0.000058
Var 8 versus var 4:Khi2 = 1.1876e+01 ddl = 4 Proba = 0.018267
Var 8 versus var 5:Khi2 = 1.5055e-01 ddl = 2 Proba = 0.926992
Var 8 versus var 6:Khi2 = 3.4295e+01 ddl = 4 Proba = 0.000001
Var 8 versus var 7:Khi2 = 4.6562e+01 ddl = 4 Proba = 0.000000

Var 9 versus var 1:Khi2 = 1.1207e+01 ddl = 4 Proba = 0.024181
Var 9 versus var 2:Khi2 = 1.0838e+01 ddl = 4 Proba = 0.028217
Var 9 versus var 3:Khi2 = 2.9550e+01 ddl = 4 Proba = 0.000010
Var 9 versus var 4:Khi2 = 1.0246e+01 ddl = 4 Proba = 0.036083
Var 9 versus var 5:Khi2 = 1.7464e-01 ddl = 2 Proba = 0.915934
Var 9 versus var 6:Khi2 = 3.2664e+01 ddl = 4 Proba = 0.000003
Var 9 versus var 7:Khi2 = 4.2024e+01 ddl = 4 Proba = 0.000000
Var 9 versus var 8:Khi2 = 1.6159e+02 ddl = 4 Proba = 0.000000

Var 10 versus var 1:Khi2 = 1.0052e+01 ddl = 4 Proba = 0.039107
Var 10 versus var 2:Khi2 = 9.7806e+00 ddl = 4 Proba = 0.043745
Var 10 versus var 3:Khi2 = 3.6378e+01 ddl = 4 Proba = 0.000001
Var 10 versus var 4:Khi2 = 9.1975e+00 ddl = 4 Proba = 0.055595
Var 10 versus var 5:Khi2 = 1.2742e-01 ddl = 2 Proba = 0.937825
Var 10 versus var 6:Khi2 = 3.6001e+01 ddl = 4 Proba = 0.000001
Var 10 versus var 7:Khi2 = 3.3040e+01 ddl = 4 Proba = 0.000002
Var 10 versus var 8:Khi2 = 1.4110e+02 ddl = 4 Proba = 0.000000
Var 10 versus var 9:Khi2 = 1.6181e+02 ddl = 4 Proba = 0.000000

Var 11 versus var 1:Khi2 = 9.2018e+00 ddl = 4 Proba = 0.055498
Var 11 versus var 2:Khi2 = 1.0948e+01 ddl = 4 Proba = 0.026948
Var 11 versus var 3:Khi2 = 3.1471e+01 ddl = 4 Proba = 0.000005
Var 11 versus var 4:Khi2 = 9.7586e+00 ddl = 4 Proba = 0.044144
Var 11 versus var 5:Khi2 = 3.0179e-01 ddl = 2 Proba = 0.860710
Var 11 versus var 6:Khi2 = 2.1080e+01 ddl = 4 Proba = 0.000367
Var 11 versus var 7:Khi2 = 1.5103e+01 ddl = 4 Proba = 0.004667
Var 11 versus var 8:Khi2 = 3.6195e+01 ddl = 4 Proba = 0.000001
Var 11 versus var 9:Khi2 = 3.6084e+01 ddl = 4 Proba = 0.000001
Var 11 versus var 10:Khi2 = 4.4034e+01 ddl = 4 Proba = 0.000000

Var 12 versus var 1:Khi2 = 1.0051e+00 ddl = 4 Proba = 0.908196
Var 12 versus var 2:Khi2 = 2.0546e+01 ddl = 4 Proba = 0.000461
Var 12 versus var 3:Khi2 = 3.9514e+00 ddl = 4 Proba = 0.413534
Var 12 versus var 4:Khi2 = 8.9590e-01 ddl = 4 Proba = 0.923699
Var 12 versus var 5:Khi2 = 1.8180e-02 ddl = 2 Proba = 0.991675
Var 12 versus var 6:Khi2 = 3.9061e+00 ddl = 4 Proba = 0.419859
Var 12 versus var 7:Khi2 = 8.4235e+01 ddl = 4 Proba = 0.000000
Var 12 versus var 8:Khi2 = 8.7183e+00 ddl = 4 Proba = 0.067606
Var 12 versus var 9:Khi2 = 8.2696e+00 ddl = 4 Proba = 0.081081
Var 12 versus var 10:Khi2 = 9.2273e+00 ddl = 4 Proba = 0.054920
Var 12 versus var 11:Khi2 = 1.2587e+01 ddl = 4 Proba = 0.013545

Var 13 versus var 1:Khi2 = 1.7920e+01 ddl = 4 Proba = 0.001408
Var 13 versus var 2:Khi2 = 1.6015e+01 ddl = 4 Proba = 0.003167
Var 13 versus var 3:Khi2 = 2.8590e+01 ddl = 4 Proba = 0.000016
Var 13 versus var 4:Khi2 = 1.9727e+01 ddl = 4 Proba = 0.000653
Var 13 versus var 5:Khi2 = 5.3956e-01 ddl = 2 Proba = 0.767383
Var 13 versus var 6:Khi2 = 3.6652e+01 ddl = 4 Proba = 0.000001
Var 13 versus var 7:Khi2 = 6.1408e+00 ddl = 4 Proba = 0.187440
Var 13 versus var 8:Khi2 = 1.4861e+01 ddl = 4 Proba = 0.005172
Var 13 versus var 9:Khi2 = 1.2305e+01 ddl = 4 Proba = 0.015255
Var 13 versus var 10:Khi2 = 3.5574e+01 ddl = 4 Proba = 0.000001
Var 13 versus var 11:Khi2 = 3.1075e+01 ddl = 4 Proba = 0.000006
Var 13 versus var 12:Khi2 = 8.1446e-01 ddl = 4 Proba = 0.934602

Var 14 versus var 1:Khi2 = 4.7236e-01 ddl = 2 Proba = 0.792695
Var 14 versus var 2:Khi2 = 4.5962e-01 ddl = 2 Proba = 0.797583
Var 14 versus var 3:Khi2 = 3.2442e+00 ddl = 2 Proba = 0.195381
Var 14 versus var 4:Khi2 = 4.7236e-01 ddl = 2 Proba = 0.792695
Var 14 versus var 5:Khi2 = 5.9878e-03 ddl = 1 Proba = 0.936189
Var 14 versus var 6:Khi2 = 1.9766e+00 ddl = 2 Proba = 0.373868
Var 14 versus var 7:Khi2 = 1.2742e-01 ddl = 2 Proba = 0.937825
Var 14 versus var 8:Khi2 = 1.5055e-01 ddl = 2 Proba = 0.926992
Var 14 versus var 9:Khi2 = 1.7464e-01 ddl = 2 Proba = 0.915934
Var 14 versus var 10:Khi2 = 1.2742e-01 ddl = 2 Proba = 0.937825
Var 14 versus var 11:Khi2 = 3.0179e-01 ddl = 2 Proba = 0.860710
Var 14 versus var 12:Khi2 = 1.8180e-02 ddl = 2 Proba = 0.991675
Var 14 versus var 13:Khi2 = 5.3956e-01 ddl = 2 Proba = 0.767383

Var 15 versus var 1:Khi2 = 6.6461e+01 ddl = 4 Proba = 0.000000
Var 15 versus var 2:Khi2 = 4.7269e+01 ddl = 4 Proba = 0.000000
Var 15 versus var 3:Khi2 = 4.3380e+01 ddl = 4 Proba = 0.000000
Var 15 versus var 4:Khi2 = 4.8979e+01 ddl = 4 Proba = 0.000000
Var 15 versus var 5:Khi2 = 1.0179e+00 ddl = 2 Proba = 0.606972
Var 15 versus var 6:Khi2 = 3.5827e+01 ddl = 4 Proba = 0.000001
Var 15 versus var 7:Khi2 = 1.7889e+01 ddl = 4 Proba = 0.001427
Var 15 versus var 8:Khi2 = 1.7681e+01 ddl = 4 Proba = 0.001559
Var 15 versus var 9:Khi2 = 1.7495e+01 ddl = 4 Proba = 0.001688
Var 15 versus var 10:Khi2 = 2.0749e+01 ddl = 4 Proba = 0.000423
Var 15 versus var 11:Khi2 = 1.8509e+01 ddl = 4 Proba = 0.001096
Var 15 versus var 12:Khi2 = 3.0421e+00 ddl = 4 Proba = 0.553416
Var 15 versus var 13:Khi2 = 2.5830e+01 ddl = 4 Proba = 0.000049
Var 15 versus var 14:Khi2 = 1.0179e+00 ddl = 2 Proba = 0.606972

Annexe 6

Var 16 versus var 1:Khi2 = 3.3208e+01 ddl = 4 Proba = 0.000002
Var 16 versus var 2:Khi2 = 2.8642e+01 ddl = 4 Proba = 0.000015
Var 16 versus var 3:Khi2 = 4.4154e+01 ddl = 4 Proba = 0.000000
Var 16 versus var 4:Khi2 = 3.1695e+01 ddl = 4 Proba = 0.000004
Var 16 versus var 5:Khi2 = 1.9766e+00 ddl = 2 Proba = 0.373868
Var 16 versus var 6:Khi2 = 2.6698e+01 ddl = 4 Proba = 0.000034
Var 16 versus var 7:Khi2 = 1.1267e+01 ddl = 4 Proba = 0.023581
Var 16 versus var 8:Khi2 = 1.7452e+01 ddl = 4 Proba = 0.001719
Var 16 versus var 9:Khi2 = 1.5618e+01 ddl = 4 Proba = 0.003750
Var 16 versus var 10:Khi2 = 1.3321e+01 ddl = 4 Proba = 0.009936
Var 16 versus var 11:Khi2 = 2.2829e+01 ddl = 4 Proba = 0.000175
Var 16 versus var 12:Khi2 = 1.0218e+00 ddl = 4 Proba = 0.905735
Var 16 versus var 13:Khi2 = 2.6351e+01 ddl = 4 Proba = 0.000040
Var 16 versus var 14:Khi2 = 1.9766e+00 ddl = 2 Proba = 0.373868
Var 16 versus var 15:Khi2 = 3.8231e+01 ddl = 4 Proba = 0.000000

Var 17 versus var 1:Khi2 = 2.8351e+01 ddl = 4 Proba = 0.000017
Var 17 versus var 2:Khi2 = 2.6759e+01 ddl = 4 Proba = 0.000033
Var 17 versus var 3:Khi2 = 3.3782e+01 ddl = 4 Proba = 0.000002
Var 17 versus var 4:Khi2 = 3.1694e+01 ddl = 4 Proba = 0.000004
Var 17 versus var 5:Khi2 = 1.2310e+00 ddl = 2 Proba = 0.545693
Var 17 versus var 6:Khi2 = 1.6969e+01 ddl = 4 Proba = 0.002110
Var 17 versus var 7:Khi2 = 1.1746e+01 ddl = 4 Proba = 0.019292
Var 17 versus var 8:Khi2 = 2.0838e+01 ddl = 4 Proba = 0.000407
Var 17 versus var 9:Khi2 = 1.6020e+01 ddl = 4 Proba = 0.003161
Var 17 versus var 10:Khi2 = 1.3430e+01 ddl = 4 Proba = 0.009486
Var 17 versus var 11:Khi2 = 3.0421e+01 ddl = 4 Proba = 0.000007
Var 17 versus var 12:Khi2 = 1.5994e+00 ddl = 4 Proba = 0.810928
Var 17 versus var 13:Khi2 = 2.5403e+01 ddl = 4 Proba = 0.000059
Var 17 versus var 14:Khi2 = 1.2310e+00 ddl = 2 Proba = 0.545693
Var 17 versus var 15:Khi2 = 5.4863e+01 ddl = 4 Proba = 0.000000
Var 17 versus var 16:Khi2 = 1.2857e+02 ddl = 4 Proba = 0.000000

Var 18 versus var 1:Khi2 = 2.3369e+01 ddl = 4 Proba = 0.000139
Var 18 versus var 2:Khi2 = 1.9804e+01 ddl = 4 Proba = 0.000632
Var 18 versus var 3:Khi2 = 2.7186e+01 ddl = 4 Proba = 0.000028
Var 18 versus var 4:Khi2 = 2.3839e+01 ddl = 4 Proba = 0.000114
Var 18 versus var 5:Khi2 = 4.8533e-01 ddl = 2 Proba = 0.787750
Var 18 versus var 6:Khi2 = 2.5696e+01 ddl = 4 Proba = 0.000052
Var 18 versus var 7:Khi2 = 2.6345e+01 ddl = 4 Proba = 0.000040
Var 18 versus var 8:Khi2 = 3.0930e+01 ddl = 4 Proba = 0.000006
Var 18 versus var 9:Khi2 = 2.6402e+01 ddl = 4 Proba = 0.000039
Var 18 versus var 10:Khi2 = 2.8319e+01 ddl = 4 Proba = 0.000017
Var 18 versus var 11:Khi2 = 2.5831e+01 ddl = 4 Proba = 0.000049
Var 18 versus var 12:Khi2 = 3.4198e+00 ddl = 4 Proba = 0.492119
Var 18 versus var 13:Khi2 = 1.4560e+01 ddl = 4 Proba = 0.005879
Var 18 versus var 14:Khi2 = 4.8533e-01 ddl = 2 Proba = 0.787750
Var 18 versus var 15:Khi2 = 2.6558e+01 ddl = 4 Proba = 0.000036
Var 18 versus var 16:Khi2 = 5.6259e+01 ddl = 4 Proba = 0.000000
Var 18 versus var 17:Khi2 = 9.2728e+01 ddl = 4 Proba = 0.000000

Var 19 versus var 1:Khi2 = 3.6560e+01 ddl = 4 Proba = 0.000001
Var 19 versus var 2:Khi2 = 3.3354e+01 ddl = 4 Proba = 0.000002
Var 19 versus var 3:Khi2 = 4.5769e+01 ddl = 4 Proba = 0.000000
Var 19 versus var 4:Khi2 = 3.6104e+01 ddl = 4 Proba = 0.000001
Var 19 versus var 5:Khi2 = 7.2880e-01 ddl = 2 Proba = 0.699952
Var 19 versus var 6:Khi2 = 2.2735e+01 ddl = 4 Proba = 0.000182
Var 19 versus var 7:Khi2 = 1.5498e+01 ddl = 4 Proba = 0.003947
Var 19 versus var 8:Khi2 = 2.3423e+01 ddl = 4 Proba = 0.000136
Var 19 versus var 9:Khi2 = 1.7635e+01 ddl = 4 Proba = 0.001590
Var 19 versus var 10:Khi2 = 1.7958e+01 ddl = 4 Proba = 0.001385
Var 19 versus var 11:Khi2 = 3.3910e+01 ddl = 4 Proba = 0.000002
Var 19 versus var 12:Khi2 = 2.3372e+00 ddl = 4 Proba = 0.677253
Var 19 versus var 13:Khi2 = 2.0165e+01 ddl = 4 Proba = 0.000542
Var 19 versus var 14:Khi2 = 7.2880e-01 ddl = 2 Proba = 0.699952
Var 19 versus var 15:Khi2 = 4.2190e+01 ddl = 4 Proba = 0.000000
Var 19 versus var 16:Khi2 = 7.9034e+01 ddl = 4 Proba = 0.000000
Var 19 versus var 17:Khi2 = 1.0961e+02 ddl = 4 Proba = 0.000000
Var 19 versus var 18:Khi2 = 1.4406e+02 ddl = 4 Proba = 0.000000

Var 20 versus var 1:Khi2 = 2.9563e+01 ddl = 4 Proba = 0.000010
Var 20 versus var 2:Khi2 = 2.8513e+01 ddl = 4 Proba = 0.000016
Var 20 versus var 3:Khi2 = 3.7807e+01 ddl = 4 Proba = 0.000000
Var 20 versus var 4:Khi2 = 3.0345e+01 ddl = 4 Proba = 0.000007
Var 20 versus var 5:Khi2 = 5.2563e-01 ddl = 2 Proba = 0.772565
Var 20 versus var 6:Khi2 = 2.4670e+01 ddl = 4 Proba = 0.000080
Var 20 versus var 7:Khi2 = 1.3282e+01 ddl = 4 Proba = 0.010102
Var 20 versus var 8:Khi2 = 2.7780e+01 ddl = 4 Proba = 0.000022
Var 20 versus var 9:Khi2 = 2.4900e+01 ddl = 4 Proba = 0.000073
Var 20 versus var 10:Khi2 = 2.9398e+01 ddl = 4 Proba = 0.000011
Var 20 versus var 11:Khi2 = 2.5323e+01 ddl = 4 Proba = 0.000061
Var 20 versus var 12:Khi2 = 6.8935e+00 ddl = 4 Proba = 0.140143
Var 20 versus var 13:Khi2 = 1.7228e+01 ddl = 4 Proba = 0.001891
Var 20 versus var 14:Khi2 = 5.2563e-01 ddl = 2 Proba = 0.772565
Var 20 versus var 15:Khi2 = 2.7578e+01 ddl = 4 Proba = 0.000024
Var 20 versus var 16:Khi2 = 5.6101e+01 ddl = 4 Proba = 0.000000
Var 20 versus var 17:Khi2 = 7.9239e+01 ddl = 4 Proba = 0.000000
Var 20 versus var 18:Khi2 = 1.9617e+02 ddl = 4 Proba = 0.000000
Var 20 versus var 19:Khi2 = 1.5440e+02 ddl = 4 Proba = 0.000000

Var 21 versus var 1:Khi2 = 9.8820e-01 ddl = 2 Proba = 0.616000
Var 21 versus var 2:Khi2 = 2.2392e+00 ddl = 2 Proba = 0.326905
Var 21 versus var 3:Khi2 = 4.4346e-01 ddl = 2 Proba = 0.803822
Var 21 versus var 4:Khi2 = 1.0179e+00 ddl = 2 Proba = 0.606993
Var 21 versus var 5:Khi2 = 1.7464e-01 ddl = 1 Proba = 0.679355
Var 21 versus var 6:Khi2 = 6.0877e-01 ddl = 2 Proba = 0.742081
Var 21 versus var 7:Khi2 = 5.0566e-01 ddl = 2 Proba = 0.780057
Var 21 versus var 8:Khi2 = 9.7295e-01 ddl = 2 Proba = 0.620676
Var 21 versus var 9:Khi2 = 3.1797e-01 ddl = 2 Proba = 0.853993
Var 21 versus var 10:Khi2 = 5.0566e-01 ddl = 2 Proba = 0.780057
Var 21 versus var 11:Khi2 = 2.4811e+00 ddl = 2 Proba = 0.288827
Var 21 versus var 12:Khi2 = 5.3025e-01 ddl = 2 Proba = 0.770845
Var 21 versus var 13:Khi2 = 1.0547e+00 ddl = 2 Proba = 0.595961
Var 21 versus var 14:Khi2 = 1.7464e-01 ddl = 1 Proba = 0.679355
Var 21 versus var 15:Khi2 = 2.2187e-01 ddl = 2 Proba = 0.894859
Var 21 versus var 16:Khi2 = 6.3068e-01 ddl = 2 Proba = 0.734231
Var 21 versus var 17:Khi2 = 1.2991e-01 ddl = 2 Proba = 0.936647
Var 21 versus var 18:Khi2 = 2.9246e-01 ddl = 2 Proba = 0.864610
Var 21 versus var 19:Khi2 = 2.4141e+00 ddl = 2 Proba = 0.298917
Var 21 versus var 20:Khi2 = 1.2330e-01 ddl = 2 Proba = 0.939776

Var 22 versus var 1:Khi2 = 1.8395e+00 ddl = 2 Proba = 0.400970
Var 22 versus var 2:Khi2 = 4.7321e-01 ddl = 2 Proba = 0.792369
Var 22 versus var 3:Khi2 = 1.4672e+00 ddl = 2 Proba = 0.484452
Var 22 versus var 4:Khi2 = 5.0461e-01 ddl = 2 Proba = 0.780450
Var 22 versus var 5:Khi2 = 9.7982e-02 ddl = 1 Proba = 0.752669
Var 22 versus var 6:Khi2 = 2.8631e-01 ddl = 2 Proba = 0.867190
Var 22 versus var 7:Khi2 = 2.0851e+00 ddl = 2 Proba = 0.353727
Var 22 versus var 8:Khi2 = 3.1154e+00 ddl = 2 Proba = 0.208695
Var 22 versus var 9:Khi2 = 2.4285e+00 ddl = 2 Proba = 0.296711
Var 22 versus var 10:Khi2 = 2.0851e+00 ddl = 2 Proba = 0.353727
Var 22 versus var 11:Khi2 = 1.1109e+00 ddl = 2 Proba = 0.579492
Var 22 versus var 12:Khi2 = 2.9749e-01 ddl = 2 Proba = 0.862504
Var 22 versus var 13:Khi2 = 1.7117e+00 ddl = 2 Proba = 0.427923
Var 22 versus var 14:Khi2 = 9.7982e-02 ddl = 1 Proba = 0.752669
Var 22 versus var 15:Khi2 = 1.7158e-01 ddl = 2 Proba = 0.917329
Var 22 versus var 16:Khi2 = 3.4798e+00 ddl = 2 Proba = 0.173203
Var 22 versus var 17:Khi2 = 3.1356e+00 ddl = 2 Proba = 0.206547
Var 22 versus var 18:Khi2 = 1.4922e+00 ddl = 2 Proba = 0.478363
Var 22 versus var 19:Khi2 = 5.0912e-01 ddl = 2 Proba = 0.778753
Var 22 versus var 20:Khi2 = 2.7896e+00 ddl = 2 Proba = 0.246597
Var 22 versus var 21:Khi2 = 3.5410e-01 ddl = 1 Proba = 0.559285

Var 23 versus var 1:Khi2 = 1.4597e+00 ddl = 2 Proba = 0.486292
Var 23 versus var 2:Khi2 = 1.0032e+00 ddl = 2 Proba = 0.611434

Annexe 6

Var 23 versus var 3:Khi2 = 4.0025e+00 ddl = 2 Proba = 0.132666
Var 23 versus var 4:Khi2 = 7.8607e-01 ddl = 2 Proba = 0.680602
Var 23 versus var 5:Khi2 = 1.9127e-01 ddl = 1 Proba = 0.665972
Var 23 versus var 6:Khi2 = 1.4136e-02 ddl = 2 Proba = 0.993624
Var 23 versus var 7:Khi2 = 6.5816e-01 ddl = 2 Proba = 0.724483
Var 23 versus var 8:Khi2 = 3.9857e+00 ddl = 2 Proba = 0.133808
Var 23 versus var 9:Khi2 = 5.5788e+00 ddl = 2 Proba = 0.059811
Var 23 versus var 10:Khi2 = 4.0703e+00 ddl = 2 Proba = 0.128166
Var 23 versus var 11:Khi2 = 7.6779e+00 ddl = 2 Proba = 0.021140
Var 23 versus var 12:Khi2 = 5.8073e-01 ddl = 2 Proba = 0.752240
Var 23 versus var 13:Khi2 = 5.8309e-01 ddl = 2 Proba = 0.751380
Var 23 versus var 14:Khi2 = 1.9127e-01 ddl = 1 Proba = 0.665972
Var 23 versus var 15:Khi2 = 1.2998e+00 ddl = 2 Proba = 0.527136
Var 23 versus var 16:Khi2 = 1.9073e+00 ddl = 2 Proba = 0.387328
Var 23 versus var 17:Khi2 = 3.9187e+00 ddl = 2 Proba = 0.138448
Var 23 versus var 18:Khi2 = 2.8871e+00 ddl = 2 Proba = 0.234582
Var 23 versus var 19:Khi2 = 2.1406e+00 ddl = 2 Proba = 0.343818
Var 23 versus var 20:Khi2 = 3.0415e+00 ddl = 2 Proba = 0.216744
Var 23 versus var 21:Khi2 = 3.4558e-01 ddl = 1 Proba = 0.564065
Var 23 versus var 22:Khi2 = 4.0341e+01 ddl = 1 Proba = 0.000000

Var 24 versus var 1:Khi2 = 1.0439e+01 ddl = 2 Proba = 0.005586
Var 24 versus var 2:Khi2 = 1.2314e+01 ddl = 2 Proba = 0.002315
Var 24 versus var 3:Khi2 = 6.6969e+00 ddl = 2 Proba = 0.034266
Var 24 versus var 4:Khi2 = 8.8100e+00 ddl = 2 Proba = 0.012189
Var 24 versus var 5:Khi2 = 3.9942e+00 ddl = 1 Proba = 0.043095
Var 24 versus var 6:Khi2 = 3.7886e+00 ddl = 2 Proba = 0.147943
Var 24 versus var 7:Khi2 = 5.9637e-01 ddl = 2 Proba = 0.746560
Var 24 versus var 8:Khi2 = 2.6838e+00 ddl = 2 Proba = 0.260337
Var 24 versus var 9:Khi2 = 4.4215e+00 ddl = 2 Proba = 0.107221
Var 24 versus var 10:Khi2 = 1.3797e+00 ddl = 2 Proba = 0.506349
Var 24 versus var 11:Khi2 = 1.1928e+00 ddl = 2 Proba = 0.556231
Var 24 versus var 12:Khi2 = 7.6921e-01 ddl = 2 Proba = 0.686249
Var 24 versus var 13:Khi2 = 1.1422e+01 ddl = 2 Proba = 0.003512
Var 24 versus var 14:Khi2 = 2.5335e-01 ddl = 1 Proba = 0.620899
Var 24 versus var 15:Khi2 = 2.6238e+00 ddl = 2 Proba = 0.268461
Var 24 versus var 16:Khi2 = 4.2964e+00 ddl = 2 Proba = 0.114250
Var 24 versus var 17:Khi2 = 1.1698e+00 ddl = 2 Proba = 0.562696
Var 24 versus var 18:Khi2 = 3.1738e+00 ddl = 2 Proba = 0.202550
Var 24 versus var 19:Khi2 = 4.5520e+00 ddl = 2 Proba = 0.100354
Var 24 versus var 20:Khi2 = 2.4207e+00 ddl = 2 Proba = 0.297906
Var 24 versus var 21:Khi2 = 1.2033e+00 ddl = 1 Proba = 0.272137
Var 24 versus var 22:Khi2 = 4.7154e-01 ddl = 1 Proba = 0.499519
Var 24 versus var 23:Khi2 = 5.1176e-02 ddl = 1 Proba = 0.816068

Var 25 versus var 1:Khi2 = 7.8356e+00 ddl = 2 Proba = 0.019571
Var 25 versus var 2:Khi2 = 2.5300e+00 ddl = 2 Proba = 0.281680
Var 25 versus var 3:Khi2 = 7.1011e-01 ddl = 2 Proba = 0.706372
Var 25 versus var 4:Khi2 = 8.2536e+00 ddl = 2 Proba = 0.015963
Var 25 versus var 5:Khi2 = 1.3885e+00 ddl = 1 Proba = 0.236790
Var 25 versus var 6:Khi2 = 4.1921e+00 ddl = 2 Proba = 0.120464
Var 25 versus var 7:Khi2 = 3.0755e+00 ddl = 2 Proba = 0.213005
Var 25 versus var 8:Khi2 = 7.0437e-01 ddl = 2 Proba = 0.708354
Var 25 versus var 9:Khi2 = 4.4776e+00 ddl = 2 Proba = 0.104213
Var 25 versus var 10:Khi2 = 3.9369e-01 ddl = 2 Proba = 0.823340
Var 25 versus var 11:Khi2 = 1.5818e+00 ddl = 2 Proba = 0.457128
Var 25 versus var 12:Khi2 = 1.4462e+00 ddl = 2 Proba = 0.489618
Var 25 versus var 13:Khi2 = 1.4829e+01 ddl = 2 Proba = 0.000728
Var 25 versus var 14:Khi2 = 7.2880e-01 ddl = 1 Proba = 0.397743
Var 25 versus var 15:Khi2 = 1.3396e+00 ddl = 2 Proba = 0.516673
Var 25 versus var 16:Khi2 = 3.7347e+00 ddl = 2 Proba = 0.152066
Var 25 versus var 17:Khi2 = 1.6851e+00 ddl = 2 Proba = 0.433751
Var 25 versus var 18:Khi2 = 7.3152e+00 ddl = 2 Proba = 0.025257
Var 25 versus var 19:Khi2 = 6.6836e-01 ddl = 2 Proba = 0.720896
Var 25 versus var 20:Khi2 = 3.8284e+00 ddl = 2 Proba = 0.144974
Var 25 versus var 21:Khi2 = 3.9072e+00 ddl = 1 Proba = 0.045396
Var 25 versus var 22:Khi2 = 5.0890e-01 ddl = 1 Proba = 0.482567
Var 25 versus var 23:Khi2 = 3.2644e-01 ddl = 1 Proba = 0.575073
Var 25 versus var 24:Khi2 = 2.8433e+01 ddl = 1 Proba = 0.000001

Var 26 versus var 1:Khi2 = 9.0060e+00 ddl = 2 Proba = 0.011088
Var 26 versus var 2:Khi2 = 7.5415e+00 ddl = 2 Proba = 0.022602
Var 26 versus var 3:Khi2 = 2.5958e+00 ddl = 2 Proba = 0.272334
Var 26 versus var 4:Khi2 = 9.1298e+00 ddl = 2 Proba = 0.010446
Var 26 versus var 5:Khi2 = 7.8358e-01 ddl = 1 Proba = 0.379804
Var 26 versus var 6:Khi2 = 1.3365e+00 ddl = 2 Proba = 0.517488
Var 26 versus var 7:Khi2 = 1.6346e+00 ddl = 2 Proba = 0.445035
Var 26 versus var 8:Khi2 = 1.5643e+00 ddl = 2 Proba = 0.461186
Var 26 versus var 9:Khi2 = 2.4518e+00 ddl = 2 Proba = 0.293195
Var 26 versus var 10:Khi2 = 3.2836e+00 ddl = 2 Proba = 0.191483
Var 26 versus var 11:Khi2 = 3.0512e+00 ddl = 2 Proba = 0.215673
Var 26 versus var 12:Khi2 = 8.1272e-01 ddl = 2 Proba = 0.671756
Var 26 versus var 13:Khi2 = 4.1626e+00 ddl = 2 Proba = 0.122286
Var 26 versus var 14:Khi2 = 7.8358e-01 ddl = 1 Proba = 0.379804
Var 26 versus var 15:Khi2 = 1.5091e+00 ddl = 2 Proba = 0.474287
Var 26 versus var 16:Khi2 = 4.2470e+00 ddl = 2 Proba = 0.117152
Var 26 versus var 17:Khi2 = 3.0385e+00 ddl = 2 Proba = 0.217081
Var 26 versus var 18:Khi2 = 9.7162e-01 ddl = 2 Proba = 0.621087
Var 26 versus var 19:Khi2 = 5.3666e-03 ddl = 2 Proba = 0.997644
Var 26 versus var 20:Khi2 = 1.6073e+00 ddl = 2 Proba = 0.451244
Var 26 versus var 21:Khi2 = 8.0406e-01 ddl = 1 Proba = 0.373367
Var 26 versus var 22:Khi2 = 3.5009e+00 ddl = 1 Proba = 0.058075
Var 26 versus var 23:Khi2 = 8.4913e-01 ddl = 1 Proba = 0.359672
Var 26 versus var 24:Khi2 = 1.1816e+01 ddl = 1 Proba = 0.000732
Var 26 versus var 25:Khi2 = 1.4421e+01 ddl = 1 Proba = 0.000221

Annexe 6

cm/MCA: Multiple correspondence analysis
Uniform row weights
Marginal distributions by variable:

Variable number 1 has 3 categories
---
[1] Category: 1 Weight: 0.679
[2] Category: 2 Weight: 0.0417
[3] Category: 3 Weight: 0.28

Variable number 2 has 3 categories
---
[4] Category: 1 Weight: 0.685
[5] Category: 2 Weight: 0.0238
[6] Category: 3 Weight: 0.292

Variable number 3 has 3 categories
---
[7] Category: 1 Weight: 0.238
[8] Category: 2 Weight: 0.31
[9] Category: 3 Weight: 0.452

Variable number 4 has 3 categories
---
[10] Category: 1 Weight: 0.679
[11] Category: 2 Weight: 0.0238
[12] Category: 3 Weight: 0.298

Variable number 5 has 3 categories
---
[13] Category: 1 Weight: 0.339
[14] Category: 2 Weight: 0.155
[15] Category: 3 Weight: 0.506

Variable number 6 has 3 categories
---
[16] Category: 1 Weight: 0.107
[17] Category: 2 Weight: 0.0238
[18] Category: 3 Weight: 0.869

Variable number 7 has 3 categories
---
[19] Category: 1 Weight: 0.113
[20] Category: 2 Weight: 0.0357
[21] Category: 3 Weight: 0.851

Variable number 8 has 3 categories
---
[22] Category: 1 Weight: 0.101
[23] Category: 2 Weight: 0.0119
[24] Category: 3 Weight: 0.887

Variable number 9 has 3 categories
---
[25] Category: 1 Weight: 0.196
[26] Category: 2 Weight: 0.0357
[27] Category: 3 Weight: 0.768

Variable number 10 has 3 categories
---
[28] Category: 1 Weight: 0.333
[29] Category: 2 Weight: 0.0179
[30] Category: 3 Weight: 0.649

Variable number 11 has 3 categories
---
[31] Category: 1 Weight: 0.494
[32] Category: 2 Weight: 0.00595
[33] Category: 3 Weight: 0.5

Variable number 12 has 3 categories
---
[34] Category: 1 Weight: 0.595
[35] Category: 2 Weight: 0.0714
[36] Category: 3 Weight: 0.333

Variable number 13 has 3 categories
---
[37] Category: 1 Weight: 0.435
[38] Category: 2 Weight: 0.119
[39] Category: 3 Weight: 0.446

Variable number 14 has 3 categories
---
[40] Category: 1 Weight: 0.268
[41] Category: 2 Weight: 0.0595
[42] Category: 3 Weight: 0.673

Variable number 15 has 3 categories
---
[43] Category: 1 Weight: 0.339
[44] Category: 2 Weight: 0.0833
[45] Category: 3 Weight: 0.577

Variable number 16 has 3 categories
---
[46] Category: 1 Weight: 0.244
[47] Category: 2 Weight: 0.101
[48] Category: 3 Weight: 0.655

Variable number 17 has 2 categories
---
[49] Category: 1 Weight: 0.149
[50] Category: 2 Weight: 0.851

Variable number 18 has 2 categories
---
[51] Category: 1 Weight: 0.0893
[52] Category: 2 Weight: 0.911

Variable number 19 has 2 categories
---
[53] Category: 1 Weight: 0.161
[54] Category: 2 Weight: 0.839

Variable number 20 has 2 categories
---
[55] Category: 1 Weight: 0.798
[56] Category: 2 Weight: 0.202

Variable number 21 has 2 categories
---
[57] Category: 1 Weight: 0.577
[58] Category: 2 Weight: 0.423

Variable number 22 has 2 categories
---
[59] Category: 1 Weight: 0.435
[60] Category: 2 Weight: 0.565

- Valeurs sans fond concernent les ATB
  Valeurs en rose concernent les métaux lourds

Annexe 6

Correlation ratios after a MCA

Variable : 1
> Categ= 1 Weight= 0.679 -0.510 -0.326 -0.119
> Categ= 2 Weight= 0.042 0.772 -0.227 0.725
> Categ= 3 Weight= 0.280 1.122 0.824 0.180
----------> r= 0.554 0.264 0.040

Variable : 2
> Categ= 1 Weight= 0.685 -0.500 -0.337 -0.105
> Categ= 2 Weight= 0.024 0.670 0.251 0.847
> Categ= 3 Weight= 0.292 1.120 0.770 0.177
----------> r= 0.548 0.252 0.034

Variable : 3
> Categ= 1 Weight= 0.238 -0.654 -0.818 0.285
> Categ= 2 Weight= 0.310 -0.699 0.128 -0.350
> Categ= 3 Weight= 0.452 0.823 0.343 0.089
----------> r= 0.559 0.218 0.061

Variable : 4
> Categ= 1 Weight= 0.679 -0.516 -0.331 -0.091
> Categ= 2 Weight= 0.024 0.854 0.870 0.962
> Categ= 3 Weight= 0.298 1.109 0.686 0.131
----------> r= 0.565 0.232 0.033

Variable : 5
> Categ= 1 Weight= 0.339 -0.854 -0.100 -0.119
> Categ= 2 Weight= 0.155 -0.203 -0.683 0.050
> Categ= 3 Weight= 0.506 0.635 0.276 0.064
----------> r= 0.458 0.114 0.007

Variable : 6
> Categ= 1 Weight= 0.107 -1.752 1.492 -0.123
> Categ= 2 Weight= 0.024 -0.878 -0.187 0.068
> Categ= 3 Weight= 0.869 0.240 -0.179 0.013
----------> r= 0.397 0.267 0.002

Variable : 7
> Categ= 1 Weight= 0.113 -1.703 1.460 -0.101
> Categ= 2 Weight= 0.036 0.009 -0.669 -0.019
> Categ= 3 Weight= 0.851 0.226 -0.166 0.014
----------> r= 0.371 0.281 0.001

Variable : 8
> Categ= 1 Weight= 0.101 -1.765 1.614 -0.220
> Categ= 2 Weight= 0.012 -0.283 -0.876 -0.471
> Categ= 3 Weight= 0.887 0.205 -0.172 0.031
----------> r= 0.353 0.299 0.008

Variable : 9
> Categ= 1 Weight= 0.196 -1.014 0.720 0.263
> Categ= 2 Weight= 0.036 -0.481 -1.434 0.291
> Categ= 3 Weight= 0.768 0.282 -0.118 -0.081
----------> r= 0.271 0.186 0.022

Variable : 10
> Categ= 1 Weight= 0.333 -0.735 -0.053 -0.046
> Categ= 2 Weight= 0.018 -0.175 -0.814 -0.419
> Categ= 3 Weight= 0.649 0.382 0.050 0.035
----------> r= 0.275 0.014 0.005

Variable : 11
> Categ= 1 Weight= 0.494 -0.687 -0.118 0.103
> Categ= 2 Weight= 0.006 -0.015 -1.456 -0.418
> Categ= 3 Weight= 0.500 0.679 0.134 -0.096
----------> r= 0.464 0.028 0.011

Variable : 12
> Categ= 1 Weight= 0.595 -0.596 0.007 0.157
> Categ= 2 Weight= 0.071 0.963 0.361 0.801
> Categ= 3 Weight= 0.333 0.857 -0.090 -0.451
----------> r= 0.522 0.012 0.128

Variable : 13
> Categ= 1 Weight= 0.435 -0.733 0.310 0.095
> Categ= 2 Weight= 0.119 -0.324 -0.972 0.685
> Categ= 3 Weight= 0.446 0.799 -0.043 -0.275
----------> r= 0.531 0.155 0.094

Variable : 14
> Categ= 1 Weight= 0.268 -1.089 0.598 -0.264
> Categ= 2 Weight= 0.060 -0.909 -0.743 2.480
> Categ= 3 Weight= 0.673 0.514 -0.172 -0.114
----------> r= 0.545 0.149 0.394

Variable : 15
> Categ= 1 Weight= 0.339 -1.028 0.305 -0.069
> Categ= 2 Weight= 0.083 -0.421 -0.892 1.699
> Categ= 3 Weight= 0.577 0.665 -0.050 -0.204
----------> r= 0.628 0.099 0.266

Variable : 16
> Categ= 1 Weight= 0.244 -1.124 0.634 -0.411
> Categ= 2 Weight= 0.101 -0.802 -0.817 1.814
> Categ= 3 Weight= 0.655 0.543 -0.110 -0.127
----------> r= 0.567 0.173 0.385

Variable : 17
> Categ= 1 Weight= 0.149 0.091 -0.082 -0.129
> Categ= 2 Weight= 0.851 -0.016 0.014 0.023
----------> r= 0.001 0.001 0.003

Variable : 18
> Categ= 1 Weight= 0.089 0.280 -0.875 -0.709
> Categ= 2 Weight= 0.911 -0.027 0.086 0.069
----------> r= 0.008 0.075 0.049

Variable : 19
> Categ= 1 Weight= 0.161 0.243 -0.801 -0.426
> Categ= 2 Weight= 0.839 -0.046 0.153 0.082
----------> r= 0.011 0.123 0.035

Variable : 20
> Categ= 1 Weight= 0.798 -0.130 -0.093 -0.159
> Categ= 2 Weight= 0.202 0.511 0.367 0.626
----------> r= 0.066 0.034 0.099

Variable : 21
> Categ= 1 Weight= 0.577 -0.137 -0.083 -0.468
> Categ= 2 Weight= 0.423 0.187 0.113 0.640
----------> r= 0.026 0.009 0.300

Variable : 22
> Categ= 1 Weight= 0.435 -0.087 -0.399 -0.507
> Categ= 2 Weight= 0.565 0.067 0.306 0.390
----------> r= 0.006 0.122 0.198

- Valeurs sans fond concernent les ATB
  Valeurs en rose concernent les métaux lourds