

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE Ministère de
l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID TLEMCEM
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers



**Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au
Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE)**

Département de Biologie



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie
Fondamentale

Thème :

Caractérisation des gènes de résistance des biocides par PCR chez les Entérocoques

Présenté par : CHALLAT Meriem

ZITOUNI Fatima Zahra

Soutenu le 14/10/2020, devant le jury composé de :

Président	Mr. TEFIANI Choukri	Maître de conférences A	Université/Tlemcen
Encadreur	Mr. REBIAHI Sid Ahmed	Maître de conférences A	Université/Tlemcen
Examineur	Mr. BELYAGOUBI Larbi	Maître de conférences B	Université/Tlemcen

Année Universitaire: 2019/2020

Dédicace

Avec l'aide de Dieu tout-puissant, Je dédie ce mémoire qui est le fruit de tout un long chemin d'étude à:

Mes chers parents

Qui ont été toujours à mes côtés pour me soutenir et me donner le courage pour terminer mes études.

Ma très chère mère

Les mots ne peuvent pas exprimer ma mère, car tu es le symbole d'amour et d'honnêteté, et tu n'as jamais cessé de m'encourager tout au long de mon cursus.

A mon très cher Père

Quoi que je fasse, je ne pourrai même pas offrir un petit quelque chose que vous nous avez donné et vos sacrifices pour mener une vie décente.

Mes chères sœurs et frères

Inesse, Rania, Mohammed Essalah et Abderrahim

Toute ma famille.

Mon binôme Fatima Zahra:

Pour sa gentillesse et sa patience.

Toutes mes amies

Toute la promotion de microbiologie fondamentale 2019/2020

Et enfin : A tout (es) ceux (celles) qui aiment me voir réussir.

Meriem

Avec l'aide de Dieu le tout puissant, j'ai pu achever ce modeste travail que je dédie :

A mes chers parents pour leur soutien et compréhension, pour tout ce que je ne parviendrai à leur rendre.

Ma très chère mère

Affable, honorable aimable : tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager.

A mon très cher Père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi.

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon bien être. Ce travail est le fruit de tout ce que tu as sacrifié pour m'élever.

Mon oncle : Zitouni Mohamed. Zitouni ouassini

Les femmes de mes oncles : Masmoudi rachida, masmoudi mbarka.

A mes chers frères et sœur : Ahmed, sofyane, Youssef, Hichame, Hanane.

Les fils de mes frères et sœurs : fathiya, Abd rahmen, Halima, Ikrame, Abir, Abd kader.

A toute la famille Zitouni.

A mon binôme Meriem:

Pour son support continuel, soutien, encouragement.

A toute ma promotion 2019 /2020

A mes amies : Ziane fatima zahra, Zitouni Maryam

Et enfin : A tout (es) ceux (celles) qui aiment me voir réussir.

Fatima Zahra

Remerciements

Tout d'abord, nous exprimons notre sincère et profonde gratitude de connaître notre encadreur Mr REBIAHI Sid Ahmed, maitre de conférences au département de biologie à l'Université Abou Bekr BELKAID de Tlemcen, qui a été un exemple unique de patience et gentillesse.

Nous adressons tous nos remerciements à Mr BELYAGOUBI Larbi, maitre de conférences au département de biologie à l'Université Abou Bekr BELKAID de Tlemcen, pour l'aider à choisir l'encadreur.

Nous offrons tous nos remerciements à Mr TEFIANI Choukri, maitre de conférences au département d'agronomie à l'Université Abou Bekr BELKAID de Tlemcen, pour son acceptation de la présidence du jury, pour juger notre mémoire de fin d'études.

Nous adressons tous nos remerciements aux travailleurs du laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE) pour leur respect et leur assistance malgré l'échec des travaux en raison de la pandémie de virus corona.

En fin nous tenons aussi à adresser nos vifs remerciements à tous les enseignants qui ont contribué à notre formation.

Table des matières

Introduction	2
Synthèse bibliographique	3
Chapitre 1 : Généralité sur les entérocoques	4
1. Classification	5
2. Caractéristiques	6
3. Habitat	6
4. Virulence et pathogenèse des entérocoques	6
Chapitre 2 : Polymérase Chain Réaction (PCR)	8
1. Historique	9
2. Définition de la PCR	11
3. Les constituants de la PCR	11
3.1. Le fragment à amplifier(ADN)	11
3.2. Les amorces (sens et anti sens)	11
3.3. L'ADN polymérase et ses inhibiteurs	12
3.4. Les nucléotides dNTPs	12
3.5. Le Magnésium (Mg ++)	12
4. Les étapes de la réaction	12
4.1. Extraction	12
4.2. Amplification	13
4.2.1. La dénaturation thermique	13
4.2.2. Hybridation des amorces.....	13
4.2.3. Elongation	13
5. Les types de PCR.....	15
5.1. La PCR en point final	15
5.2. La PCR en temps réel (real-time PCR) ou PCR quantitative (ou qPCR).....	15
5.3. PCR nichée ou nested PCR	15
5.4. Le PCR multiplex.....	15
5.5. PCR compétitive	15
5.6. PCR asymétrique.....	16
5.7. La RT-PCR	16
6. Avantages et inconvénients de la PCR	16
6.1. Les avantages	16

6.2. Les inconvénients.....	16
Chapitre 3 : Lutte antimicrobienne.....	17
1. Les méthodes	18
1.1. L'antisepsie	18
1.2. La désinfection	18
2. Les produits	18
2.1. Les biocides	18
2.2. Les antiseptiques	20
2.3. Les désinfectants	20
2.4. Classification des biocides	20
2.5. Mode d'action des biocides	22
Chapitre 4 : La résistance aux biocides.....	24
1. Mécanismes de la résistance bactérienne aux biocides	25
1.1. Résistance intrinsèque	25
1.2. La résistance acquise	27
1.2.1. Les mécanismes d'acquisition de la résistance	27
1.2.1.1. La résistance acquise chromosomique	27
1.2.1.2. La résistance acquise Plasmidique (ou extra chromosomique)	28
1.2.1.2.1. Les plasmides	28
1.2.1.2.2. Les intégrons de résistance	29
1.2.1.2.3. Les éléments transposables bactériens	29
2. Les gènes codant la résistance aux biocides	30
3. La résistance chez les entérocoques	30
3.1. Résistance aux ammoniums quaternaires	30
3.1.1. Résistance au Chlorure de benzalkonium	30
3.1.1.1. Objectif	30
3.1.1.2. Matériels et méthodes	30
3.1.1.2.1. Détermination du CMI	31
3.1.1.2.2. Construction de la souche EF-SAVE1	31
3.1.1.2.3. RT – PCR	32
3.1.1.3. Résultats et discussion	32
3.1.1.4. Conclusions.....	34
3.1.2. Résistance au chlorure de didécyldiméthylammonium	34

3.1.2.1. Objectif	34
3.1.2.2. Matériels et méthodes.....	34
3.1.2.2.1. Isolement et identification d' <i>E. faecalis</i>	34
3.1.2.2.2. Sensibilité au (DDAC)	34
3.1.2.2.3. Détection des gènes <i>qac</i>	36
3.1.2.3. Résultats et discussion.....	38
3.2. Résistance aux alcools.....	39
3.2.1. Objectifs	39
3.2.2. Résultats et discussion	40
3.2.2.1. Pertinence clinique d' <i>E. faecium</i> tolérance à l'alcool	40
3.2.2.2. Identification des facteurs génétiques bactériens liés à la tolérance à l'alcool....	40
3.2.2.3. Validation des facteurs génétiques bactériens liés à la tolérance à l'alcool	41
Conclusion et perspectives.....	44
Références bibliographiques.....	46

Liste des abréviations

PCR : Polymérase Chain Réaction

ADN : Acide désoxyribonucléique

dNTPs : Désoxyribonucléoside triphosphate

CMI : Concentration minimale inhibitrice

pH : Potentiel hydrogène

T_m : Température de fusion

UV : le rayonnement ultraviolet

QACs : Ammoniums quaternaire

DDAC : Chlorure de didécyl diméthylammonium

SDS : Dodécylsulfate de sodium

UFC: Unité formant colonie

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

Table des figures

Figure 1: Photos d'évolutions des machines de PCR.....	10
Figure 2: Cycle d'amplification PCR	13
Figure 3: Schéma de principe de la technique de PCR.....	14
Figure 4: Sites d'action des molécules antiseptiques et désinfectantes selon les micro-organismes.....	23
Figure 5: Classification des micro-organismes selon leur sensibilité aux biocides	26
Figure 6: Confirmation fonctionnelle des gènes associés à la tolérance à l'isopropanol chez <i>E. faecium</i>	42

Liste des tableaux

Tableau 1: Groupes phylogénétiques des espèces du genre <i>Enterococcus</i> selon les analyses génétiques de l'ARNr 16S et de l'espace intergénique 16S-23S	5
Tableau 2: Liste des différents types de produits biocides d'après le règlement n°528/2012 du parlement et du conseil européen selon JOUE en 2012	19
Tableau 3: Les majeurs antiseptiques et désinfectant	20
Tableau 4: Mécanismes intrinsèques de résistance bactérienne aux biocides...	25
Tableau 5: Mécanismes possibles de résistance Plasmidique	29
Tableau 6: Type de souches, contrôles, séquences d'amorces et températures de recuit utilisé pour la réaction en chaîne par polymérase.....	37
Tableau 7: Comparaison des séquences nucléotidiques de deux <i>qac</i> UN B Amplicons trouve et séquences de référence Genbank	39

INTRODUCTION

Les infections nosocomiales sont responsables des maladies importantes et la mortalité en milieu hospitalier, il a été estimé que 20 à 40 % des infections associées aux soins est dû à la transmission croisée par les mains des soignants contaminés par contact direct avec les patients ou indirectement en touchant des surfaces environnementales contaminées ces dernières années, des efforts considérables ont été faites pour améliorer les pratiques de lutte contre ces infections, ce qui a conduit à une utilisation accrue des biocides (Boutarfi et al., 2019)

Les biocides (antiseptiques, désinfectants) sont des éléments essentiels des stratégies d'intervention utilisées en médecine clinique pour prévenir la dissémination des maladies nosocomiales des études in vitro suggèrent que l'exposition aux biocides entraîne une sensibilité réduite aux antibiotiques et aux biocides par des mécanismes de résistance intrinsèques ou acquis, de plus, les micro-organismes se sont adaptés à l'exposition aux biocides en acquérant des plasmides et des transposons qui confèrent une résistance à ce dernier (Sheldon, 2005)

Les bactéries à Gram positif sont les principaux agents responsables des infections associées aux soins que ce soit chez les adultes ou les enfants parmi eux le genre *Enterococcus* (Fernández-Fuentes et al., 2014 ; Sommer et al., 2019)

Depuis une vingtaine d'années, les entérocoques émergent comme étant des pathogènes nosocomiaux ou liés aux soins, deux espèces sont responsables de la très grande majorité des infections telle que *E. faecalis* à 80 % des infections et l'*E. faecium* de 10 à 20 % des infections, l'augmentation du pourcentage d'infection causée par *E. faecalis* due aux acquisitions rapide de multiples résistances aux biocides (Mantion, 2015 ; Isnard, 2017)

Dans cette étude nous nous intéressons à la caractérisation des gènes de résistance aux biocides, chez les entérocoques par la technique de PCR par l'analyse des travaux réalisés par (Braga et al., 2010), (Bischoff et al., 2012) et (Pidot et al., 2018) :

1. Détermination de la CMI
2. Détection des gènes de résistance par PCR

Synthèse bibliographique

Chapitre 1:

Généralité sur les

entérocoques

1. Classification :

Selon le système de Lancefield Serological Typing, et en 1930 les Entérocoques étaient classés dans le genre *Streptococcus* (groupe D) mais avec le développement de nouvelles techniques de la biologie moléculaire telles que la détermination du pourcentage G+C, le séquençage de l'ARNr 16S et l'hybridation DNA-DNA Schleifer et al en 1984 ont reclassé les bactéries *Streptococcus faecium* et *Streptococcus faecalis* comme Entérocoques (Aguilar-Galvez et al., 2012 ; Boussouar, 2017)

En suite 44 espèces ont été classées dans : (Aguilar-Galvez et al., 2012 ; Ladjouzi et al., 2013)

Règne : *Bacteria*

Division : *Firmicutes*

Classe : *Bacilli*

Ordre : *Lactobacillales*

Famille : *Enterococcaceae*

Genre : *Enterococcus*

Plus récemment, les résultats des analyses génétiques (études des ARNr 16S et de l'espace inter génique 16S-23S) confirment que le genre *Enterococcus* est hétérogène et il existe environ 5 à 6 grands groupes d'espèces au sein de ce genre représenté dans ce tableau : (Boussouar, 2017)

Tableau 1 : Groupes phylogénétiques des espèces du genre *Enterococcus* selon les analyses génétiques de l'ARNr 16S et de l'espace intergénique 16S-23S (Boussouar, 2017)

Groupes						Groupes phylogénétiquement distincts
1	2	3	4	5	6	
<i>E. faecalis</i>	<i>E. avium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. cecorum</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. italicus</i>	
<i>E. faecalis</i> <i>E. caccae</i> <i>E. haemoperoxidans</i> <i>E. moraviensis</i> <i>E. silvaticus</i> <i>E. termitis</i>	<i>E. avium</i> <i>E. devriesei</i> <i>E. gilvus</i> <i>E. malodorus</i> <i>E. pseudosporus</i> <i>E. raffinosus</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. canis</i> <i>E. durans</i> <i>E. hirae</i> <i>E. mundtii</i> <i>E. ratti</i> <i>E. villorum</i>	<i>E. cecorum</i> <i>E. columae</i>	<i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i>	<i>E. italicus</i> <i>E. camelliae</i>	<i>E. aquimarinus</i> <i>E. asini</i> <i>E. canintestini</i> <i>E. dispar</i> <i>E. hermanniensis</i> <i>E. pallens</i> <i>E. phoeniculicola</i> <i>E. saccharolyticus</i> <i>E. sulfureus</i>

2. Caractéristiques :

Les entérocoques sont des bactéries à Gram positif, qui se présentent sous forme de coques isolés ou arrangés en paires ou en chaînettes se sont des bactéries non sporulant, anaérobies facultatifs, catalase et oxydase négatifs, immobiles (sauf *E. casseliflavus* et *E. gallinarum* qui sont mobiles à 30°C), non capsulés (Isnard, 2017)

Les entérocoques se sont des mésophiles qui se développent à une température de 10 à 45°C avec un optimal de croissance de 30°C et 37°C, ces bactéries poussent dans des conditions hostiles de 6,5 % de NaCl avec un pH de 4.4 et 9.6 (Muruleedhara et al., 2012)

Ce sont des chimio-organotrophes, ayant un métabolisme homofermentaire en fabriquant principalement l'acide lactique (Pieniz et al., 2015 ; Boussouar, 2017)

Le milieu sélectif pour les entérocoques milieu dits bile-esculine dans le quelle les bactéries forment des colonies translucides enfermée par un halo noire qui sont capables à la fois de se multiplier en présence de bile et hydrolyse l'esculine (Facklam et Collins, 1989 ; Isnard, 2017)

Les entérocoques sont capables de métaboliser divers types de sucre telle que N acétyle glucosamine, le ribose, le glucose, l'arbutine, le cellobiose, le maltose, le β gentiobiose, le D manose, le β _D_methyle glucopyranose, la salicine et le tréhalose (Schleifer et Kilpper-Bälz, 1984 ; Gentry-Weeks et al., 1999)

3. Habitat :

Les entérocoques sont des bactéries ubiquitaires :

Chez l'homme présent dans le tractus intestinal les deux espèces les plus retrouvées sont *E. faecalis* et *E. faecium*, Ils sont présents aussi dans la bouche les voies biliaires et la cavité vaginale (Murray et al., 1990 ; Manton, 2015)

Dans l'environnement sont retrouvés dans les eaux usées, douce, et l'eau de mer et sur le sol et les végétaux (Manton, 2015)

4. Virulence et pathogénèse des entérocoques :

Les entérocoques sont les principaux agents d'infection nosocomiale elles peuvent provoquer des maladies graves, Les espèces les plus virulentes sont généralement des isolats cliniques (Boussouar, 2017)

Cette virulence est déterminée par plusieurs facteurs tels que l'aptitude à coloniser le tractus gastro-intestinal, la capacité d'adhérer à une variété de protéines de la matrice extracellulaire et d'adhérer l'épithélium du tractus urinaire, l'épithélium de la cavité orale et les cellules embryonnaires rénales humaines (Boussouar, 2017)

Les infections humaine causées par les entérocoques sont principalement dues à deux espèces, *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*, qui représentent 95% des isolats cliniques de ce genre bactérien, d'autres espèces peuvent causer des infections chez l'homme comme *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. hirae* ou *E. raffinosus* (Isnard, 2017)

Les infections à entérocoques peuvent toucher divers sites telle que intra-abdominaux (cholécystites, péritonites en association avec les entérobactéries et anaérobies), les voies urinaires, les plaies chirurgicales ou les valves cardiaques (endocardites) et sont aussi responsables d'infections sur matériel (cathéters vasculaires ou biliaires, sondes urinaires, prothèses ostéo-articulaires ou valvulaires) (Isnard, 2017)

Les facteurs de virulence les plus étudiés chez les entérocoques sont la production des substances d'agrégation cytolysine et les activités enzymatiques (Mantion, 2015) :

➤ **Hémolysine-Bactériocine (Hly-Bcn):**

Dite aussi cytolysine ou β -hémolysine est le facteur de virulence le plus étudié, il s'agit d'un complexe cytolytique protéique bifactoriel présent chez les souches d'*E. faecalis*, ce complexe protéique connu sous l'abréviation Hly-Bcn est codé par des gènes portés par des plasmides conjugatifs transmissibles de grande taille (58 à 65 kb) qui permet la lyse des cellules animales par formation des pores dans la membrane cellulaire (LE Bouguenec et al., 1988 ; Dunny, 1990 ; Gilmore et al., 1990 ; Mantion, 2015)

Il existe d'autres facteurs comme les enzymes hydrolytiques telles que la Hyaluronidase qui dégrade l'acide hyaluronique constituant majeur de la matrice extracellulaire des cellules animale et la gélatinase est un des facteurs de virulence les plus étudié chez *E. faecalis*, capable d'hydrolyser la " β insuline", la "gélatine", le collagène, la "caséine" et l'hémoglobine il donne aussi la capacité de forme des biofilms (Mantion, 2015)

➤ **Substances agrégatives :**

Ce sont des adhésines glycoprotéiques fixe dans la surface cellulaire et codées par des gènes portés sur des plasmides conjugatifs. Ils ont une relation avec les phéromones, émise par la cellule réceptrice vers la cellule donatrice permettant ainsi une conjugaison se signale permet la synthèse d'une adhésine de nature protéique (facteur de d'agrégation) qui facilite la formation des conjugués et le transfert des plasmides (Tanimoto et Clewell, 1993 ; Mantion, 2015)

Chapitre2 :
Polymérase Chain
Réaction (PCR)

1. Historique :

Cette technique a été inventée par un chimiste américain qui s'appelle Kary Mullis en 1985, la technique a été utilisée la première fois pour amplifier un fragment d'ADN de la β globine humaine pour le traitement de la drépanocytose (Pugniere, 2012 ; Tellaa, 2013)

En 1992, Russell HIGUCHI propose de détecter l'accumulation du produit de PCR par un intercalant fluorescent appelé bromure d'éthidium (EtBr), sans avoir à ouvrir le tube où se déroule la réaction biochimique, cette méthode permet d'amplifier et détecter les séquences cible, en 1993, Molecular Probes propose un autre intercalant capable de se lier de façon non spécifique à l'ADN SybrGreen I, en 1995, Yang Liu fait la première publication sur la taille-PCR En 1996, la mise au point des polymérase temporairement inactives et activables a été faite par Lacholem et Birch DE (Pugniere, 2012 ; Diarra, 2014)

Les thermocycleurs aussi sont développés par le temps alors en 1996, Idaho Technology commercialise le premier fluorimètre pour micro-échantillons présentant un contrôle rapide de température appelé l'Idaho Technology LC 24 et en 1997 Roche Molecular Biochemicals produisent les premiers LightCycler™ (Pugniere, 2012 ; Diarra, 2014)



Figure 1: Photos d'évolutions des machines de PCR (Pugniere, 2012)

2. Définition de la PCR :

C'est une technique qui permet d'amplifier les acides nucléiques c'est-à-dire produire un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN (Betelli, 2013; Tellaa, 2013)

L'avènement de la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) a radicalement transformé la science biologique. Dès sa découverte, Pour la première fois, la PCR a permis la détection et la production de grandes quantités d'ADN le diagnostic des maladies infectieuses, ensuite la technique a largement été utilisée par des cliniciens et des chercheurs pour diagnostiquer les maladies, cloner et séquencer les gènes et effectuer des analyses quantitatives et des études génomiques de manière rapide et très sensible. Parmi les applications médicales les plus importantes de la PCR classique la détection des agents pathogènes demeure un exemple édifiant. Par ailleurs, le test PCR est utilisé en médecine légale pour identifier les criminels (Garibyan et avashia, 2013)

Cette utilisation généralisée, justifie l'intérêt de la compréhension du principes du PCR et comment son utilisation peut être modifiée pour fournir une analyse sophistiquée des gènes et du génome (Garibyan et avashia, 2013)

3. Les constituants de la PCR :

3.1. Le fragment à amplifier(ADN) :

L'acide désoxyribonucléique est l'unité de base cellulaire constitué de deux brins formant une double hélice, Situé dans le noyau, il est constitué des nucléotides (une base + un sucre [le désoxyribose] + un phosphate) reliés par des liaisons phosphodiester (Tellaa, 2013)

Les quatre bases constituent : les bases puriques: adénine (A) et guanine (G) et les bases pyrimidiques : cytosine (C) et thymine (T) associée par des liaisons hydrogènes, la base G est associée à la base C par trois liaisons, la base A est associée à la base T par deux liaisons (Tellaa, 2013)

Chaque brin d'ADN possède une extrémité 5'-phosphate et une extrémité 3'-hydroxyle donc oriente sens (5' → 3') mais les Deux brins forment hélice sont orientés en sens opposé (antiparallèles) (Diarra, 2014)

3.2. Les amorces (sens et anti sens) :

Ce sont des oligonucléotides d'une taille comprise entre 17 pb et 30 pb, ils doivent être complémentaires au fragment à amplifier et posséder une composition globale de 50 % [G+C], ces derniers ne doivent pas s'hybrider sur elles-mêmes ou former une structure en épingle à cheveux (Tellaa, 2013)

Les températures de fusion (T_m) des amorces doivent être voisines et suffisamment élevés pour empêcher les hybridations non spécifiques.

La taille du segment a amplifié sera déterminée par la distance entre les amorces (Tellaa, 2013)

3.3. L'ADN polymérase et ses inhibiteurs :

C'est une enzyme thermostable obtenue à partir de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* appelée Taq-Polymérase, il peut fonctionner à une température de 70 et 75°C, cette enzyme possède des inhibiteurs tels que : l'hème, l'héparine, le SDS, le phénol et les polyamines (Pugniere, 2012 ; Tellaa, 2013)

3.4. Les nucléotides dNTPs :

Les quatre désoxyNucléotides-Triphosphates: dGTP, dATP, dTTP et dCTP, sont liés avec la Taq-polymérase et formeront le brin d'ADN complémentaire (Tellaa, 2013)

3.5. Le Magnésium (Mg ++):

C'est un cofacteur indispensable au bon fonctionnement de la polymérase et à l'incorporation des précurseurs (Tellaa, 2013)

Ces composants sont mélangés dans un tube à essai ou plaque de 96 puits, puis placés dans une machine dite un thermocycleur qui possède un bloc thermique avec des trous dans lesquels sont insérés les plaques contenant le mélange réactionnel PCR. La machine soulève et abaisse la température du bloc de manière discrète et précise, et des étapes préprogrammées (Garibyan et Avashia, 2013)

4. Les étapes de la réaction :

La réaction du PCR se fait par des séries répétitives de cycles comportant trois étapes après étapes de l'extraction de la matrice (Poitras et Houde, 2002)

4.1. Extraction :

L'extraction de l'ADN est une technique qui permet d'isoler l'ADN à partir d'une cellule en quantité et en qualité suffisante pour permettre son analyse (Tellaa, 2013)

L'extraction peut se faire manuelle ou automatisée, c'est une lyse préalable des cellules, elle est généralement faite par des produits chimiques ou par variation thermique, les produits utilisés en lyse chimique sont (le sulfate de guanidine et le chloroforme), le reste du principe d'extraction consiste à capter les acides nucléiques et éliminer les éléments non nécessaires par purification. Les acides nucléiques sont le plus souvent captés par la silice magnétique, le fer et les résines échangeuses d'ions (Tellaa, 2013 ; Elyse et Aain, 2002)

La lyse thermique, effectuée par choc thermique ou variation thermique consiste à passer instantanément de 20°C à 100°C excitant aussi une lyse de la paroi bactérienne et la libération de l'ADN (Elyse et Aain, 2002)

4.2. Amplification :

La réaction se déroule dans un thermocycleur, c'est un appareil programmé automatiquement, capable de changer des températures nécessaires aux cycles d'amplification, la PCR comprend une succession de cycles de trois étapes (Tella, 2013) :

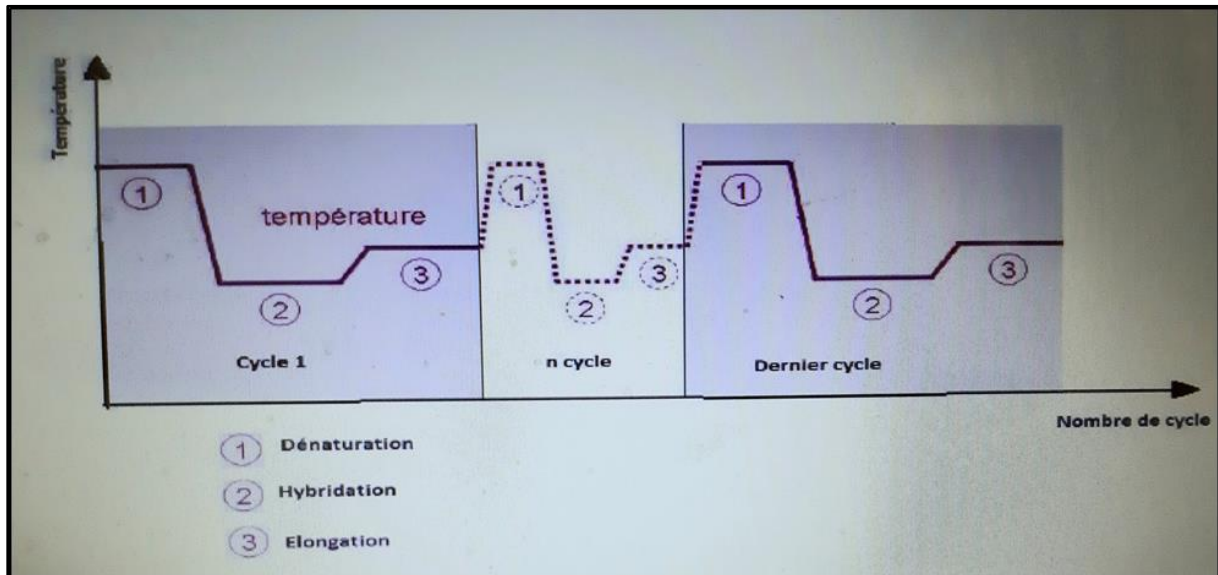


Figure 2: Cycle d'amplification PCR (Tella, 2013)

4.2.1. La dénaturation thermique:

Cette étape consiste à dénaturer les deux brins d'ADN complémentaires par rupture des liaisons à une température de 95°C pendant 0 à 1 minute et à activer la Taq-Polymérase (Betelli, 2013 ; Diarra, 2014)

4.2.2. Hybridation des amorces:

dans cette étape les amorces (sens et anti sens) sont fixées spécifiquement avec le brin d'ADN à une température favorable de 56 à 64 °C pendant 2 à 60 secondes, alors les amorces sens s'hybrident avec leur séquence complémentaire du brin antisens ; et les amorces antisens se lient aux brins sens sous l'action de deux polymérases qui peuvent interagir avec les deux complexes amorces-ADN matrice (Betelli, 2013 ; Diarra, 2014)

4.2.3. Elongation:

Après la fixation des amorces sur l'ADN l'élongation commence grâce à l'action de la Taq polymérase qui fait incorporer les dNTPs libres complémentaires du brin d'ADN matrice afin de synthétiser le brin nouvelle dite amplicon généralement se déroule de 4 à 120 secondes à 72 °C (Betelli, 2013)

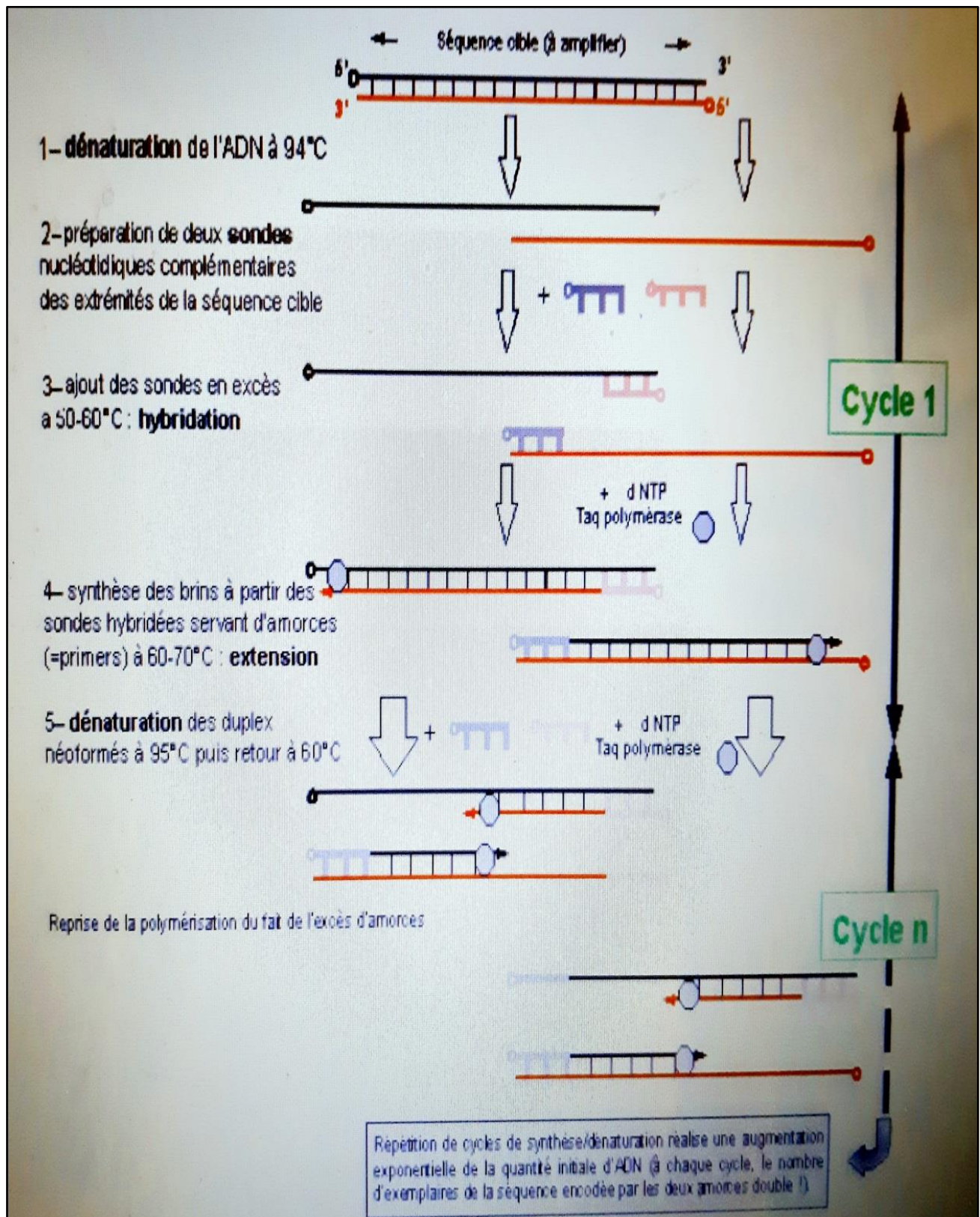


Figure 3: Schéma de principe de la technique de PCR (Tellaa, 2013)

5. Les types de PCR :

5.1. La PCR en point final :

Les amplicons sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose en fonction de leur masse, et visualisés par un agent d'intercalant fluorescent telle que le bromure d'éthidium sous les rayons ultraviolette (UV), La vitesse de migration est dépendante du nombre de bases de l'ADN testé (Payet, 2017)

5.2. La PCR en temps réel (real-time PCR) ou PCR quantitative (ou qPCR) :

Permet de mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle à l'aide d'un marqueur fluorescent telle que (Sybr Green ou EvaGreen), c'est agents sont libre dans le milieu réactionnel et non pas fluorescence, il sont fixes sur l'ADN double brin synthétisé à chaque cycle, et donne un signal fluorescent qui permet de suivre l'augmentation de la quantité d'ADN amplifié (Wong et *al.*, 2005 ; Payet, 2017)

5.3. PCR nichée ou nested PCR :

Elle se caractérise par l'emploi d'amorces se situant dans la séquence amplifiée par un premier PCR pour en réaliser un deuxième donc en utilise 2 couple amorces différant, alors un couple d'amorces externes permet d'obtenir un le premier fragment a amplifié ce fragment est matrice pour une seconde PCR et un couple d'amorces internes est situé à l'intérieur (ou nichée) du fragment nucléotidique obtenu avec le 1er couple d'amorces et donnera des fragments de taille inférieure à ceux obtenus avec la première amplification (Gagnon, 2003 ; Tellaa, 2013)

5.4. Le PCR multiplex :

Est une technique plus variée qui se caractérise par l'emploi de deux ou plusieurs paires d'amorces dans une même réaction les produits d'amplifications Doivent être de différente taille pour pouvoir les différencier (Gagnon, 2003 ; Tellaa, 2013)

5.5. PCR compétitive :

Leur particularité est de permettre la quantification de l'ADN Par une amplification simultanée de la séquence cible et d'une séquence ayant les mêmes sites d'amorçages, mais de taille différente, il est possible de différencier sur gel ou par digestion enzymatique les deux amplifications et même de les quantifier (Gagnon, 2003)

5.6. PCR asymétrique :

C'est l'amplification par PCR en présence d'une faible quantité des amorces. Elle permet le séquençage direct des fragments amplifiés. Pendant les 20 à 25 premiers cycles, l'ADN double brin est généré, jusqu'à épuisement de l'amorce limitant et de l'ADN simple brin est produit pendant les 5 à 10 derniers cycles (Gagnon, 2003)

5.7. La RT-PCR :

Elle permet une transcription inverse donc elle consiste à synthétiser le brin complémentaire(ADN) des ARN à partir d'une amorce oligonucléotidique, grâce à une enzyme à activité ADN polymérase ARN dépendante, la transcriptase inverse (reverse transcriptase) (Tellaa, 2013)

6. Avantages et inconvénients de la PCR :

6.1. Les avantages :

La PCR est une technique très sensible car capable de générer une très grande quantité d'acide nucléique à partir de quelques copies de la séquence recherchée Elle est beaucoup plus rapides que les autres techniques, elle est aussi Spécifique (Tellaa, 2013)

6.2. Les inconvénients :

Certaines contaminations au cours des prélèvements ou dans le milieu réactionnel lors de l'analyse au laboratoire et la dégradation des acides nucléiques peuvent être à l'origine de faux positifs (Tellaa, 2013)

Chapitre 3: lutte antimicrobienne

1. Les méthodes :

1.1. L'antisepsie :

C'est une opération au résultat momentané aux niveaux des cellules vivants qui permet d'éliminer ou tuer les microorganismes et/ ou d'inactiver dans la limite de leur tolérance et en fonction de leurs objectifs fixes (Rihn et *al.*, 2001)

1.2. La désinfection :

C'est opération, au résultat momentané, qui permet d'éliminer ou de tuer les microorganismes et/ou d'inactiver présent dans des milieux inertes contaminés, en fonction des objectifs fixés (Rihn et *al.*, 2001 ; Buxeraud et Faure, 2019)

2. Les produits :

2.1. Les biocides :

Ce sont des produits chimiques ou biologiques permettant de détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, ils sont présents dans de nombreux domaines : industrie agroalimentaire, la santé, le cosmétique, l'hygiène corporelle et domestique) (Mounier et *al.*, 2009 ; Lasek , 2018)

Ils sont utilisés dans de nombreuses applications que ce soit les objets inertes (les désinfectants) ou les tissu vivantes (les antiseptiques) (Mounier et *al.*, 2009)

Les biocides sont des molécules organiques, inorganiques ou synthétiques utilisé pour désinfecter ou stériliser des objets et des surfaces, et pour préserver les matériaux (Chapman, 2003)

Au niveau Européen, les biocides sont classés en quatre groupes et 22 types de produits mentionnés dans ce tableau (Lasek, 2018)

Tableau 2 : Liste des différents types de produits biocides d'après le règlement n°528/2012 du parlement et du conseil européen selon JOUE en 2012 (Lasek, 2018)

Groupe de produits biocides	Numéro du type de produit	Type de produit
Désinfectants	TP1	Hygiène humaine
	TP2	Désinfectants et produits algicides non destinés à l'application directe sur des êtres humains ou des animaux
	TP3	Hygiène vétérinaire
	TP4	Surfaces en contact avec les denrées alimentaires et les aliments pour animaux
	TP5	Eau potable
Produits de protection	TP6	Protection des produits pendant le stockage
	TP7	Produits de protection pour les pellicules
	TP8	Produits de protection pour le bois
	TP9	Produits de protection des fibres, du cuir, du caoutchouc et des matériaux polymérisés
	TP10	Produits de protection des matériaux de construction
	TP11	Produits de protection des liquides utilisés dans les systèmes de refroidissement et de fabrication
	TP12	Produits anti-biofilm
	TP13	Produits de protection des fluides de travail ou de coupe
Produits de lutte contre les nuisibles	TP14	Rodenticides
	TP15	Avicides
	TP16	Molluscicides, vermicides et produits utilisés pour lutter contre les autres invertébrés
	TP17	Piscicides
	TP18	Insecticides, acaricides et produits utilisé pour lutter contre les autres arthropodes
	TP19	Répulsifs et appâts
	TP20	Lutte contre d'autres vertébrés
Autres produits biocides	TP21	Produits antisalissure
	TP22	Fluides utilisés pour l'embaumement et la taxidermie

2.2. Les antiseptiques :

Ce sont des produits utilisés pour l'antiseptie dans des conditions définies, pour détruire les micro-organismes certains possèdent des activités bactéricides, virocides et fongicides d'autres possèdent des activités bactériostatiques, fongistatiques (Rihn *et al.*, 2001 ; Buxeraud et Faure, 2019)

2.3. Les désinfectants :

Ce sont des agents antimicrobiens utilisés pour éliminer ou de tuer les micro-organismes indésirables sur une surface inanimée (Massicotte, 2009)

3. Classification des biocides :

Le classement des biocides représenté dans ce tableau :

Tableau 3: Les majeurs antiseptiques et désinfectant (Mounier *et al.*, 2009)

Classe	Nom	Utilisation	Remarque
Biguanides	gluconate (Biseptine) La Chlorhexidine	antiseptie de la peau et des muqueuses Conservateurs alimentaires Désinfection des instruments	bactéricide à large spectre, très légèrement fongicide et inactif sur les spores, les mycobactéries et les virus
Alcools	Ethanol Propan-2-ol	désinfection de la peau, des mains, des sites d'injection et de prélèvement antiseptique des muqueuses	bactéricides et fongicides
Hexétidine	d'Hextril (bain de bouche, gel gingival, pâte dentifrice)	Antiseptiques	un large spectre antibactérien et antifongique
Le triclocarban (carbanilide)	Solubacter, Cutisan	Antiseptiques la détergence de la peau et de la muqueuse vaginale	possède une action bactériostatique.
L'hexamidine (dérivé Aminé)	Hexomédine, Désomédine, Cytéal	l'antiseptie de la peau et des muqueuses (notamment buccopharyngées)	action bactéricide mais aussi fongistatique vis-à-vis de <i>Candida albicans</i> . Actif surtout sur les coques à gram +

Synthèse bibliographique

ammoniums quaternaires	Le chlorure de benzalkonium (Sterlane, Biocidan) et le cétrimide (Sterilene, Cetavlon)	l'antisepsie des plaies superficielles, des brûlures et pour le nettoyage des lésions souillées par les graisses ou le goudron.	Bactériostatiques à spectre étroit, ils ne sont ni sporicides ni fongicides
Les acides	Acide borique. Acide lactique. Acide éthanoïque.	Antiseptiques. Antiseptie de la peau.	Non fongicides
Phénols	Phénol Thymol Bisphénol (Triclosan)	Désinfectant Conservateur Ancien antiseptique de la peau.	Très toxique
Oxydants			
Dérivés chlorés	Hypochlorites de sodium Dioxyde de chlore Hypobromite chloramine	Désinfection, antiseptie de muqueuse	
Dérivé iodés	Alcool iodé, teinture d'iode, Iodophore	antiseptie de muqueuse	Quelque risque allergique
Peroxyde	Eau oxygéné	Antisepsie des peaux lésées	
Ozone (trioxygène)	O ₃	Désinfection de l'eau	Très toxique
Permanganate de potassium	KMnO ₄	Antiseptie des muqueuses Désinfection de l'eau	Composant de la liqueur de Dakin avec l'eau de javel
Oxyde d'éthylene	C ₂ H ₄ O	Stérilisant	Gaz explosif utilisé pour la stérilisation industrielle du matériel plastique à usage unique (boîtes de petri ,pipette graduées, seringues).
B-Propiolactone		Stérilisant.	Liquide volatile utilisé pour la stérilisation des matériels, des locaux....

Synthèse bibliographique

Colorants	Bleu de méthylène, Eosine, vert et violet de méthyle	Antiseptie des muqueuse	Pour cocci à gram + et candida.
Ions methalique Ou Organo-Metilique	Nitrate d'argent, Cu^{2+} , Zn^{2+} , organo-mercuriels.	Antiseptie des muqueuse	Peu actifs. l'oxydes de zinc est utilisé dans les pansements dentaires, le nitrate d'argent en collyre
Savons et Surfactants		Antiseptie de la peau. Désinfection des sols, nettoyage dans les industries agroalimentaires	Peu actifs mais « lavent », donc éliminent les bactéries.
Salicylanilides et Carbanilides	Septivon, Solubacter.	Lavage des mains	Activité rémanente.
Aldéhydes	Méthanol(formol) Pentane, glutaraldehyde	Désinfectants puissants	Allergisant, toxique.

4. Mode d'action des biocides :

La diversité des produits chimiques et la structure de la bactérie c'est deux propriétés donnent une diversité de mode d'interaction des biocides, l'interaction avec paroi cellulaire, l'interaction avec la membrane cytoplasmique et l'interaction avec le cytoplasme (Denyer et Stewart, 1998)

Donc les dommages provoques se manifeste de la manière suivante (Denyer et Stewart, 1998)

- perturbation de la force motrice du proton transmembranaire qui conduit à un découplage de la phosphorylation oxydative
- L'inhibition du transport actif à travers la membrane.
- L'inhibition des réactions cataboliques ou anaboliques.
- perturbation de la réplication.
- perte de l'intégrité de la membrane entraînant une fuite de constituants intracellulaires essentiels tels que le potassium, cation, le phosphate inorganique, les pentoses, les nucléotides, les protéines.
- Lyse cellulaires
- la coagulation du matériel intracellulaire

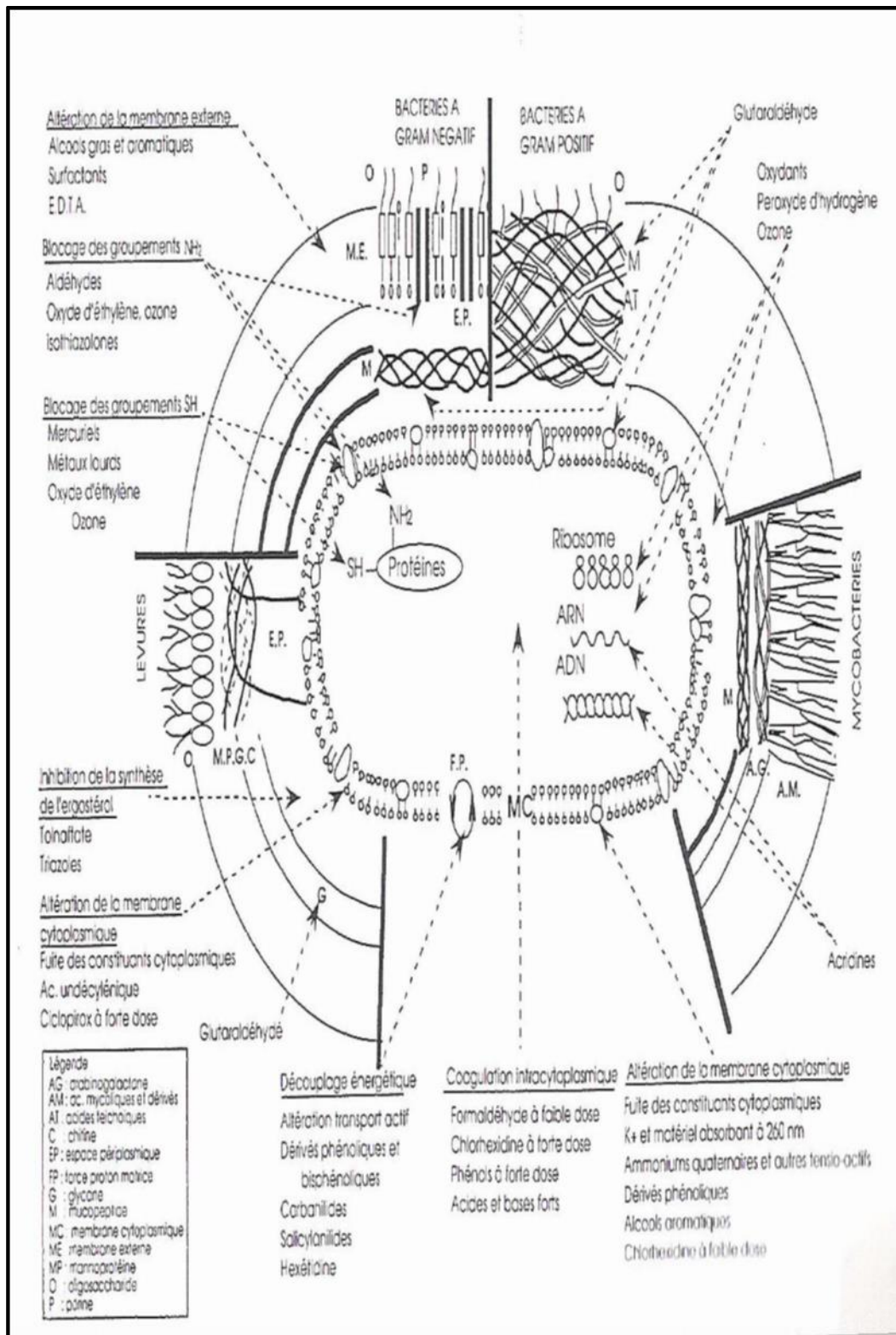


Figure 4 : Sites d'action des molécules antiseptiques et désinfectantes selon les micro-organismes (Allion, 2004)

Chapitre 4:la résistance aux biocides

1. Mécanismes de la résistance bactérienne aux biocides :

La réponse bactérienne aux biocides dépend généralement de sa composition chimique et de sa nature, leurs mécanismes de résistance sont divisés en deux grands types : intrinsèques et acquis, la résistance intrinsèque est due à une caractéristique inhérente des cellules, alors que l'acquise est obtenue après une exposition préalable de la bactérie sensible à l'agent antimicrobien (Russell, 1998 ; McDonnell et Russell, 1999)

1.1. Résistance intrinsèque :

Corresponds à un caractère inné de certaines espèces bactériennes à résister à certains biocides. En plus la résistance intrinsèque est définie comme une résistance chromosomique naturelle ou innée. C'est la propriété contrôlée d'une cellule bactérienne qui lui permet de contourner l'action d'un biocide. Elle est retrouvée plus fréquemment chez les bactéries Gram négatives. Mycobactéries et spores bactériennes (Russell, 1990 ; Russell, 1995)

Ce type de résistance est influencé par la paroi cellulaire, la composition chimique et les composants structurels de la surface cellulaire qui déterminent l'interaction entre les micro-organismes et les biocides tels que les lipopolysaccharides agissant comme une barrière de perméabilité, la présence de pompes à efflux qui diminue la concentration intracellulaire des biocides, et les transformations enzymatiques (Tumah, 2009)

Tableau 4: Mécanismes intrinsèques de résistance bactérienne aux biocides (Tumah, 2009)

Types de résistance	Exemples	Mécanismes de résistance
Imperméabilité		
Bactéries à Gram négatif	QACs Diamidines Parabens Triclosan Chlorhexidine	Barrières de perméabilité (membrane externe et glycocalyx) des pompes à efflux peuvent également être impliquées
Mycobactéries	Chlorhexidine QACs Glutaraldéhyde Organomercurials	Faible perméabilité de la paroi cellulaire cireuse et diffusion lente à travers les porines de très petite taille
Spores bactériennes	Chlorhexidine QACs Phénols Organomercurials	Barrière de perméabilité (couche de spores et / ou cortex)

Synthèse bibliographique

Bactéries à Gram positif	Chlorhexidine	Le glycocalyx / mucoexopolysaccharide peut être associé à une diffusion de biocide réduite
Inactivation		
(Médiation chromosomique)	Chlorhexidine Phénols Aldéhydes de triclosan	La panne de la molécule biocide peut être responsable pour la résistance.

Les bactéries à Gram positif telles que les entérocoques, les staphylocoques et Les streptocoques sont généralement plus sensibles aux biocides que les bactéries à Gram négative. Les entérocoques sont généralement moins sensibles aux biocides que les staphylocoques) (McDonnell et Russell, 1999), leur classement est représenté dans cette figure :

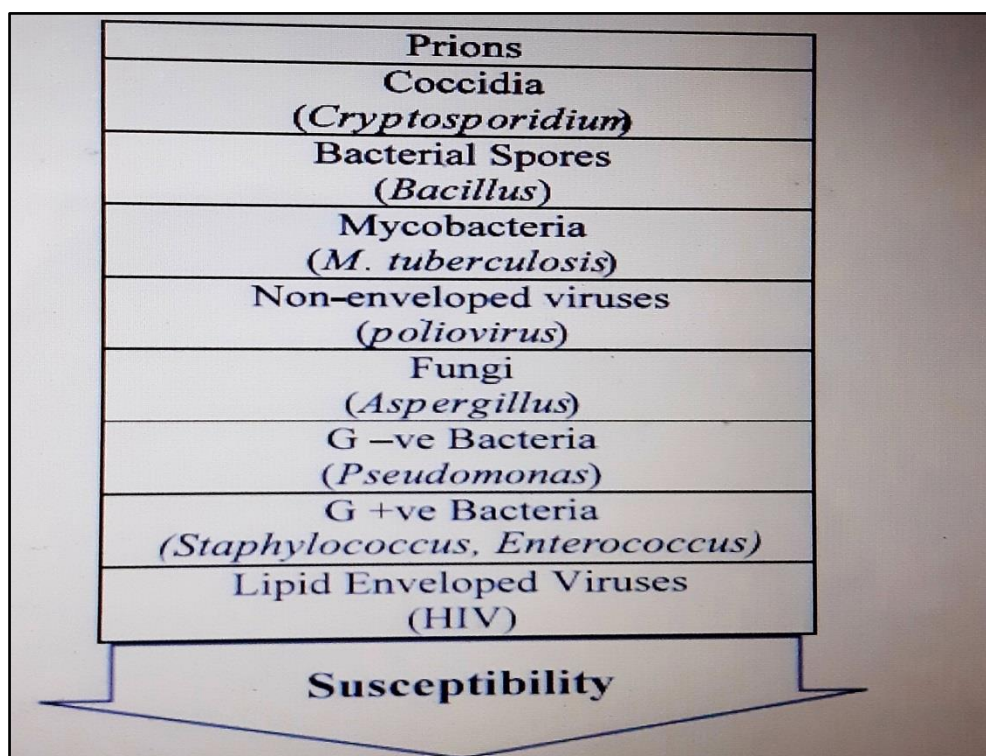


Figure 5: Classification des micro-organismes selon leur sensibilité aux biocides (Tumah, 2009)

1.2. La résistance acquise :

Est un caractère exprimé seulement par certaines souches d'une espèce bactérienne moins sensible à un biocide ou un antibiotique que d'autres souches de la même espèce (Russell, 1995)

Une résistance acquise, non codée par les plasmides, peut apparaître lorsque les bactéries sont exposées à l'augmentation de la concentration d'un biocide. Cette résistance est généralement instable et peuvent être perdues si les cellules sont cultivées dans un milieu sans biocide (Carenco, 2017)

1.2.1. Les mécanismes d'acquisition de la résistance :

Il existe deux mécanismes principaux pour acquérir une résistance, soit par une mutation dans le chromosome bactérien causée par un clonage ou une transmission verticale d'une bactérie mère aux bactéries filles, soit par des échanges génétiques qui se produisent par contact entre les bactéries de la même espèce ou des espèces différentes ce phénomène dite transfert latéral de gène (Vega et Gore, 2014 ; Carenco, 2017)

C'est le principal mécanisme de réarrangement et d'évolution des génomes des procaryotes, puisqu'il peut constituer jusqu'à 25% du génome de certaines espèces (Carenco, 2017)

1.2.1.1. La résistance acquise chromosomique :

C'est une mutation stable et héréditaire d'un gène chromosomique, code soit pour un élément cible de l'antimicrobien, soit pour un élément de fixation ou de pénétration du biocide, ainsi, le mécanisme biochimique de base de la résistance chromosomique bactérienne peut être lié à une modification de la membrane cellulaire empêchant ainsi la fixation et la pénétration du produit biocide (Allion, 2004)

Selon les travaux de Reverdy en 1995 et Jones et *al* en 1989 et thomas et *al* en 2000 et lundénet *al* en 2003 ont montré que la croissance d'une souche bactérienne sensible avec des concentrations sublétales d'un biocide permet l'acquisition d'une résistance à ces antimicrobienne, ce changement est dû à une évolution de l'enveloppe bactérienne et plus précisément de la composition lipidique membranaire des bactéries à Gram négatif et des bactéries à Gram positif (Allion, 2004)

Ces variations de composition de la paroi cellulaires des bactérie telle que la teneures en acides gras, lipides et protéines peuvent ainsi engendrer une évolution des propriétés physico-chimique de surface des microorganisme entraînant donc une modification des interaction entre cellules microbienne et agents antimicrobienne, cette résistance peut être réversible il s'agit d'un phénomène adaptatif gouverné par des gènes chromosomiques (Allion, 2004)

1.2.1.2. La résistance acquise Plasmidique (ou extra chromosomique) :

1.2.1.2.1. Les plasmides :

Les micro-organismes ayant acquis une résistance extra chromosomique hébergent des plasmides R (facteurs de résistance) véhiculant des gènes dont le produit confère la résistance à un ou plusieurs antimicrobiens. Ce phénomène, fréquent et varié, a été largement étudié dans le cas des antibiotiques. Des plasmides induisant une augmentation de résistance à certains agents désinfectants (ammonium quaternaire, chlorhexidine, bromure d'éthidium et acridines) ont également pu être mis en évidence chez des souches responsables d'infections nosocomiales (Russell, 1995)

Il existe des possibilités de résistance à médiation Plasmidique :

➤ Inactivation :

Le biocide inactivé à la suite d'une modification enzymatique. L'exemple le plus courant est l'inactivation des biocides concerne le mercure et d'autres composés organomercuriels. Bien que les mercuriels ne soient plus utilisés comme désinfectants, les sels phénylmercuriels et le thiomersal sont encore utilisés dans certains types de produits pharmaceutiques. Le mécanisme de résistance aux mercures implique la détoxification des enzymes réductase et hydrolase. Une résistance au formaldéhyde a également été signalée chez certaines bactéries associées au formaldéhyde déshydrogénase (provoquant la dégradation de l'aldéhyde) (Russell, 1995 ; Russell, 1998)

➤ Imperméabilité et altérations de la surface des cellules :

L'absorption et l'accumulation de biocides sont réduites en cas de l'imperméabilité et les altérations de la surface des cellules. Un exemple est la résistance aux sels d'argent à médiation Plasmidique (encore utilisée comme agents antimicrobien topique), bien qu'il ne soit pas totalement compris, cette réduction de l'absorption a également été étudiée pour la chlorhexidine (Russell, 1998 ; McDonnell et Russell, 1999)

Il y a quelques rapports de codage plasmidique concernant des changements dans les protéines de la membrane extérieure de certaines bactéries ce qui réduit la sensibilité au formaldéhyde et à d'autres substances biocides industrielles (Russell, 1998 ; McDonnell et Russell, 1999)

Tableau 5 : Mécanismes possibles de résistance Plasmidique (McDonnell et Russell, 1999 ; Allion, 2004)

Agents chimiques	Mécanismes de résistance
Sels de chlorhexidine	Efflux augmenté
Ammoniums quaternaires	Efflux augmenté
Formaldéhyde	Inactivation par le formaldéhyde déshydrogénase Modification de surface des cellules microbienne
Dérivé de l'argent	Diminution de la pénétration
Sels d'acridine	Efflux augmenté
Bromure d'éthidium	Efflux augmenté
Sels de mercure	Inactivation

➤ **Efflux:**

Efflux ou extrusion de médicaments cytotoxiques hors de la cellule via une membrane est l'une des stratégies de résistance les plus couramment employées dans les systèmes biologiques (Borges-Walmsley et *al.*, 2003)

1.2.1.2.2. Les intégrons de résistance :

Les intégrons de résistance (IR) sont classés en trois catégories en fonction de la nature du gène permettant leur intégration au sein d'une structure plus complexe. Les intégrons de classe 1, présents chez les bactéries multi résistantes, sont porteurs de la majorité des gènes de résistance. On note la présence du gène de résistance aux ammoniums quaternaires dans ces intégrons de classe 1 la proximité de ce gène avec l'intégrase renforçant l'intégration et la traduction du gène. Certaines variantes de ce gène *qac* confèrent également une résistance aux biguanides, classe de la chlorhexidine (antiseptique) (Carenco, 2017)

1.2.1.2.3. Les éléments transposables bactériens :

Il y a plus de 60 ans Barbara McClintock, qui a découvert les éléments transposables (ETs), a suggéré qu'ils avaient la capacité de remodeler les génomes. Plus récemment, de nombreux travaux effectués ont appuyé l'idée énoncée par Barbara McClintock et ceci en caractérisant les comme des générateurs potentiellement avantageux de la variation sur laquelle la sélection naturelle peut agir (Fedoroff, 1999)

Comme une séquence d'ADN Les transposons peuvent sauter à différents endroits du génome. Cependant, certains transposons sont toujours conservés au site d'insertion dans le génome. Les transposons sont divisés en deux groupes principaux: les rétrotransposons (classe I) et les Transposons l'ADN (classe II) Les rétrotransposons se retrouvent souvent chez les eucaryotes. Les transposons peuvent être trouvés dans les eucaryotes et les procaryotes. Les transposons peuvent transférer d'un plasmide à d'autres plasmides ou d'un chromosome d'ADN à un plasmide et vice versa ce qui provoquent la transmission de gènes de résistance aux biocides dans les bactéries (Babakhani et Oloomi, 2018)

2. Les gènes codant la résistance aux biocides :

Quelques gènes de résistance aux antiseptiques sont connus (Crémieux et Freney, 1995) :

- Gène *qac* code pour la résistance aux ammoniums quaternaires et à la chlorhexidine.
- Gène *psk* code pour la résistance à la chlorhexidine.
- Gène *mer*, code pour la résistance aux dérivés mercuriels. Il s'agit d'une résistance très fréquente.

3. La résistance chez les entérocoques :

3.1. Résistance aux ammoniums quaternaires :

3.1.1. Résistance au Chlorure de benzalkonium :

3.1.1.1. Objectif :

Braga et *al* en 2010 ont été étudié le rôle d'un petit transporteur de résistance multidrogue, annoté dans le génome de l'*E.faecalis* V583 sous le nom d'EFA0010 (ils appelleront ce gène *qacZ*) (Braga et *al.*, 2010) :

3.1.1.2. Matériels et méthodes :

- Une souche dérivée de V583, sensible à l'érythromycine (V583ErmS), a été complétée par pORI23 portant le gène *qacZ* (souche EF-SAVE1).
- La CMI du chlorure de benzalkonium, de la chlorhexidine et de bromure éthidium ont été déterminés pour la souche complétée et le type sauvage.
- Des tests de RT-PCR et de flux de bromure d'éthidium ont été réalisés afin de bien comprendre le rôle et la spécificité du gène *qacZ*.
- La présence du gène *qacZ* dans 73 souches d'entérocoques de différentes origines a été étudiée par la RT-PCR, et les CMI de chlorure de benzalkonium et la chlorhexidine ont été déterminés pour les mêmes souches.

Selon Sheldon en 2005 et Russell en 2002 les gènes *qacZ*, codant pour de petits transporteurs multi résistance aux médicaments, résistance aussi aux composés d'ammonium quaternaire (QACs) Le plasmide d'*E. faecalis* V583 pTEF1 porte un cadre de lecture, EFA0010, annoté comme un transporteur putatif (Braga et al., 2010)

Dans ce travail, Braga et al fournissons des preuves qui soutiennent cette activité d'EFA0010 et qui l'appellerons donc le gène *qacZ*.

3.1.1.2.1. Détermination du CMI :

La CMI, déterminés selon le CLSI (anciennement NCCLS) (National Committee for Clinical Laboratory Standards) des 3 produits : la chlorure de benzalkonium (un QACs), de la chlorhexidine (une Biguanidine) et du Bromure d'éthidium (un colorant), et ont été comparés pour deux souches: La souche V583ErmS (un dérivé de *E. faecalis* V583, sensible à l'érythromycine en raison de la suppression du gène *erm* (B) (EFA0007), aimablement fourni par (Axel Hartke, de Caen, France))

La souche EF-SAVE1 (un dérivé de V583ErmS portant le plasmide pSAVE1 à grand nombre de copies, construit dans la présente étude).

3.1.1.2.2. Construction de la souche EF-SAVE1 :

- Pour la construction de pSAVE1, le gène *qacZ* a été amplifié à partir de V583 en utilisant les amorces *qac-EF*.
(GAATCGGATCCATCACTTAATAAAGGAGC) et *qac-ER*
(GAATCCTGCAGATACACTAAACAAAGTGGGC) : *qac-EF* a un site de restriction pour BamHI et *qac-ER* ont un site de restriction pour la PstI, tous deux soulignés.
- Le produit de la PCR (480 pb) contenait à la fois la séquence codante et le site de liaison des ribosomes du *qacZ*, mais excluait les régions promotrices.
- L'amplicon et le plasmide pORI23 : QueY-A et *al* en 2001 qui ont été digérés et ligaturés pour construire pSAVE1.
- Le mélange de ligature a été introduit dans des cellules électro compétence.
- Les transformateurs ont été sélectionnés sur des cellules Luria-Gélose Bertani contenant 500 mg/L d'érythromycine, et la présence du gène *qacZ* sous pORI23, la régulation du promoteur a été confirmée par séquençage.

- La souche EF-SAVE1 a été construite en introduisant pSAVE1 dans des cellules électro compétentes V583ErmS et des transformant ont été sélectionnés sur des cellules cérébrales gélose pour perfusion cardiaque (BHI) contenant 500 mg/L d'érythromycine.

3.1.1.2.3. RT – PCR :

La RT-PCR a été réalisée afin de confirmer si un nombre de copies plus élevé d'EFA0010 dans V583ErmS conduit à une expression plus élevée de ce gène et par conséquent à une CMI plus élevée du chlorure de benzalkonium.

L'ARN total a été isolé de V583ErmS, EF-SAVE1 et EF-SAVE2 (V583ErmS contenant pORI23 sans l'amplicon) au moyen du RNeasy Mini Kit (Qiagen)

L'ARN a été transcrit en sens inverse en utilisant un kit de synthèse d'ADNc Transcriptor High Fidelity (Roche).

La RT – PCR a été réalisée en utilisant les amorces qac-IF et qac-IR.

3.1.1.3. Résultats et discussion :

Les déterminations de CMI pour V583ErmS et EF-SAVE1 ont été répétées cinq fois et ont donné des valeurs cohérentes et reproductibles:

- 4 mg / L de chlorhexidine pour les deux souches
- 16 mg / L de bromure d'éthidium pour les deux souches
- 4 mg / L de chlorure de benzalkonium pour V583ErmS et 8 mg / L de chlorure de benzalkonium pour EF-SAVE1.
- Bien que l'augmentation de la CMI du chlorure de benzalkonium été faible (de 4 à 8 mg / L).
- Ce résultat démontre l'implication de gène *qacZ* en diminution de la sensibilité au QAC, et non à la chlorhexidine ou au bromure d'éthidium
- Braga et *al* ont été confirmés, par RT – PCR, une expression plus élevée de *qacZ* dans la souche EF-SAVE1.
- Ils ont été également observés que l'expression du gène *qacZ* n'est pas induite par la présence de bromure d'éthidium.
- Braga et *al* ont montre clairement que l'EF-SAVE1 et le V583ErmS ont la même capacité d'efflux au bromure d'éthidium, ce qui correspond au fait que le gène *qacZ* est incapable de fournir une résistance au bromure d'éthidium.

- Paulsen et *al* en 1995 ont été montre que la cystéine 42, commune à toutes les protéines Qac, est remplacée par une sérine dans *qacZ*.
- Ils ont été démontrés que la substitution C42S conduit à une énorme diminution de la capacité du *qacC* à fournir une résistance à bromure d'éthidium.S42 dans *qacZ* peut donc nous fournir une raison de sa spécificité pour les QAC.
- Le gène *qacZ* a été détectée dans 63% et 70% des souches isolées dans des milieux cliniques et des produits laitiers, respectivement, et était absente des isolats vétérinaires. Il a été détecté dans cinq espèces d'entérocoques différentes.
- *E. faecalis* et *E. faecium* présentaient des pourcentages très similaires de gène *qacZ* transport, 52% et 47%, respectivement. Ces valeurs sont assez élevées et méritent d'être préoccupées, étant donné que ces espèces sont à la fois les plus pertinentes en milieu clinique et abondantes dans les produits alimentaires.
- La souche complémentée, EF-SAVE1, a présenté une CMI plus élevée de chlorure de benzalkonium (8 mg / L) que V583ErmS (4 mg / L); les CMI de la chlorhexidine et du bromure d'éthidium étaient les mêmes pour les deux souches, respectivement 4 mg / L et 16 mg / L. Expression de *qacZ* s'est avérée être plus élevée dans EF-SAVE1 et constitutive, la Surexpression de gène *qacZ* n'était pas responsable des changements dans l'efflux de bromure d'éthidium. Ce gène était présent dans 52% des isolats d'entérocoques étudiés et les CMI du chlorure de benzalkonium et de la chlorhexidine variaient entre 2 et 8 mg / L.
- aucun isolat vétérinaire n'a présenté le gène *qacZ*, Braga et al ne pouvons exclure l'hypothèse selon laquelle le gène *qacZ* est moins diffusé dans l'environnement clinique vétérinaire. Une recherche avec plus de contraintes est conseillée pour confirmer ce résultat.
- En résumé, Braga et *al* fournissons des preuves du rôle de gène *qacZ* dans la tolérance aux QAC chez les entérocoques. La prévalence généralisée et élevée de gène *qacZ* parmi le genre *Enterococcus*.

3.1.1.4. Conclusions:

Braga et *al* ont démontrés l'implication des gènes *qacZ* en tolérance au chlorure de benzalkonium composé d'ammonium quaternaire, mais pas au bromure d'éthidium. Ce travail constitue le premier rapport d'un mécanisme de résistance aux biocides en *E. faecalis*, et révèle sa diffusion parmi le genre *Enterococcus*.

3.1.2. Résistance au chlorure de didécyldiméthylammonium :

3.1.2.1. Objectif :

Bischoff et *al* en 2012 ont étudié la présence des gènes de résistance d'un composé d'ammoniums quaternaires (chlorure de didécyldiméthylammonium DDAC) chez *E. faecalis* (Bischoff et *al.*, 2012)

3.1.2.2. Matériels et méthodes :

3.1.2.2.1. Isolement et identification d'*E. faecalis* :

- Les souches d'*E. faecalis* du sang et selle humain ont été isolées au cours des tests de diagnostic clinique de routine dans les hôpitaux, ensuite ont été cultivées sur la gélose au Citrate azide tween carbonate (CATC).
- Les souches *E. faecalis* de la selle de bovin ont été envoyées par des vétérinaires et cultivées sur la gélose CATC.
- Les souches *E. faecalis* ont été prélevées du produit laitier (Camembert) et cultivée sur la gélose CATC après un enrichissement dans 1% d'eau peptonée.
- Tous les isolats ont été repiqués sur gélose nutritive Standard.
- Les souches ont été identifiées par un teste biochimique de la galerie (API Rapid ID 24 Strep) (Bischoff et *al.*, 2012)

3.1.2.2.2. Sensibilité au (DDAC) :

Ils ont étudiée La sensibilité des souches prélevées au chlorure de didécyldiméthylammonium (DDAC) par une méthode de microdilution (Bischoff et *al.*, 2012) :

Synthèse bibliographique

- Ils ont préparé le bouillon de soja triptyque (30g filtre pour 1L d'eau distillée) contenant 10^8 à 10^9 UFC/ ml de la souche d'essai.
- ils ont dilué le bouillon 1/10 fois par l'eau de dureté standard (WSH) résultant en des concentrations bactériennes 10^7 à 10^8 UFC/ml.
- Ensuite, 100 µl d'une solution de DDAC-WSH à double concentration ont été placés manuellement dans chaque puits d'une plaque de microtitration à 96 puits. Un total de 11 concentrations de DDAC à l'échelle log4 et un témoin de croissance a été placés 8 fois sur chaque plaque de microtitration.
- Ensuite, 13 ml de bouillon soja triptyque a été inoculé avec 226µl de suspension bactérienne, et 100µl de la suspension résultante ont été pipetés dans chaque puits (rempli DDAC-WSH) de la plaque de microtitration par un distributeur semi-automatique.
- Les plaques de microtitration ont été recouvertes de films plastiques transparents et incubées à 37 °c pendant 72 heures, la croissance microbienne a été étudiée après 24 heures et 72 heures.
- Les concentrations de DDAC étudiées variaient de 0% (contrôle de la croissance) à 0,5% (correspondant de 0 à 350 mg de DDAC / L). Ces concentrations incluaient la valeur de concentration minimale inhibitrice (CMI) des souches du type DSM et la concentration recommandée par le fabricant (0,5%).
- À partir des données de souches du type DSM et de 585 souches de terrain, la valeur seuil épidémiologique (ECOFF) a été fixée à 1,4 mg DDAC / L.
(L'ECOFF est définie comme la valeur qui sépare les microorganismes sans (type sauvage) et avec des mécanismes de résistance acquis (type non sauvage) à l'agent en question, les valeurs inférieures ou égales à ECOFF sont appelées valeurs CMI de type sauvage).
- Par la suite, des souches avec des valeurs $MIC > 1,4$ mg / L et des souches de type DSM ont en outre été testées par étapes de 0,35 mg / L pour des concentrations de 0,35 à 2,8 et par étapes de 0,7 mg / L pour des concentrations de 2,8 à 5,6 mg / L. Les résultats CMI de toutes les souches avec des valeurs $CMI > 1,4$ mg / L ont été confirmés deux fois avec des sous-cultures fraîchement décongelées.

3.1.2.2.3. Détection des gènes *qac* :

Pour la détection des gènes *qac*, ils sont réalisés la technique de la PCR en point final (Bischoff et *al.*, 2012) :

- Les produits de PCR ont été visualisés dans un gel d'agarose à 1% (45 min, 200 V) contenant 0,285 mg / ml de bromure d'éthidium, les gels ont été chargés avec les amplicons PCR cibles, les amplicons PCR des contrôles positifs et un contrôle négatif (composé de tous les ingrédients de PCR à l'exception de l'extrait d'ADN) et d'un marqueur de taille.
- Les fragments détectés ont été extraits du gel à l'aide du kit d'extraction de gel QIAquick, les fragments ont ensuite été purifiés avec le kit de purification PCR QIAquick (Quiagen) et séquencés.
- Les séquences ont été comparées aux séquences de référence GenBank à l'aide du programme BLAST.
- Tous les résultats positifs ont été répétés avec des cultures fraîchement extraites.

Synthèse bibliographique

Tableau 6 : Type de souches, contrôles, séquences d'amorces et températures de recuit utilisé pour la réaction en chaîne par polymérase (Bischoff et *al.*, 2012)

Cible	T°de recuit (temps)	Séquences d'amorce	Référence pour la séquence d'amorce	Types de souches et souches de référence (référence pour les souches de référence)
<i>Enterococcus</i> (spécifique au genre)	55° C (60s)	FW: 5'-TCAACCGGGGAG GGT-3 ' RV: 5'-ATTACTAGCGATTCCGG-3 '	6	<i>Enterococcus faecalis</i> DSM 2570, DSM 1634; <i>E. faecium</i> DSM 20477, DSM 2146; <i>Enterococcus avium</i> DSM 20679; <i>Enterococcus casseliflavus</i> DSM 20680; <i>Enterococcus durans</i> DSM 20633; <i>Enterococcus gallinarum</i> DSM 20628; <i>Enterococcus hirae</i> DSM 20160; <i>Enterococcus raffinosus</i> DSM 5633; contrôles négatifs pour garantir la spécificité : <i>Staphylococcus aureus</i> DSM 2569; <i>Str. agalactiae</i> (field strain), <i>Escherichia coli</i> DSM 1103
<i>E. faecalis</i>	55°C (60 s)	FW: 5'-ACTTATGTGACTAACTTAACC-3' RV: 5'-TAATGGTGAATCTTGGTTTGG-3'	14	<i>E. faecalis</i> DSM 2570
<i>E. faecium</i>	58°C (60 s)	FW: 5'-TTGAGGCAGACCAGATTGACG-3' RV: 5'-TATGACAGCGACTCCGATTCC-3'	4	<i>E. faecium</i> DSM 20477
<i>qacA/B</i>	52°C (30 s)	FW: 5'-GCAGAAAGTGCAGAGTTCG-3' RV: 5'-CCAGTCCAATCATGCCTG-3'	26	<i>qac A</i> : MRSA (26,32) <i>qac B</i> : MRSA (26)

Synthèse bibliographique

<i>qacC</i>	55°C (30 s)	FW: 5'-AAACAATGCAACACCTACCACT-3' RV: 5'-AACGAACTACGCCGACTATG-3'	23	<i>S. aureus</i> (MRSA; 32)
<i>smr (qacC+qacD)</i>	53°C (20 s)	FW: 5'-GCCATAAGTACTGAAGTTATTGGA-3' RV: 5'-GACTACGGTTGTTAAGACTAAACCT-3'	25	<i>S. aureus</i> (MRSA; 26)
<i>qacED1</i>	57°C (30 s)	FW: 5'-GGCTTTACTAAGCTTGCCCC-3' RV: 5'-AGCCCCATACCTACAAAGCC-3'	Geneart (cette étude)	Synthétisé par Geneart (Regensburg, Germany) pour la présente étude à partir de la séquence de référence Genbank et transformé <i>E. coli</i> pour le stockage
<i>qacG</i>	48°C (40 s)	FW: 5'-CAACAGAAATAATCGGAACT-3' RV: 5'-TACATTTAAGAGCACTACA-3'	2	<i>S. aureus</i> (2)
<i>qacH</i>	48°C (40 s)	FW: 5'-ATAGTCAGTGAAGTAATAG-3' RV: 5'-AGTGTGATGATCCGAATGT-3'	2	<i>S. aureus</i> (2)
<i>qacJ</i>	55°C (30 s)	FW: 5'-GGCCAACATTAGGCACACTTA-3' RV: 5'-TGACTTGATCCAAAAACGTTAAGA-3'	32	<i>S. aureus</i> (1,32)

3.1.2.3. Résultats et discussion :

Ont été détectés dans 4 souches les gènes de résistance aux biocides du *qac*-type :

Deux souches d'*E. faecalis* étaient positif pour *qac A / B*: une souche de bétail (Efa-AB-1) et une souche de sang humain (Efa-AB-2)

Deux souches d'*E. faecalis* étaient positives pour la *smr- (qac C +qac D)*: Efa-smr-1 des selles d'un patient stationnaire dans un hôpital régional et Efa-smr-2 d'un produit laitier (Camembert)

Les deux souches à un *smr-* positives et l'Efa-AB1 des bovins avaient une CMI pour le chlorure de didécyldiméthylammonium (DDAC) 1,05 mg / L tandis que les EfaAB-2 avait une valeur CMI élevée de 2,45 à 3,5 mg / L DDAC

Avec ces résultats et leur comparaison aux d'autres travaux ils sont confirmé qu'il n'y a que deux rapports uniques sur le gène *qac-* des entérocoques jusqu'à présent, alors Kazama et al de 1995 à 1996 sont détectés le gène *smr* chez deux *E. faecalis* avec valeur de CMI de 1.05 mg / L, même résultat ont été trouvé par Sasatsu et al en 1995

C'est auteurs ont décrit que La valeur de CMI plus élevée d'Efa-AB-2 par rapport à Efa-AB-1 pourrait donc résulter de la présence de gènes différents (*qac A* et *qac B*)

En fait, les séquences des amplicons différaient en deux paires de bases. Bien que la séquence de l'amplicon Efa-AB-2 identique aux produits protéiques des séquences de référence *qacA* déposées dans Genbank

la séquence de l'amplicon Efa-AB-1 diffère de *qacA* et *qacB* en trois paires de bases, résultant en un ou deux échanges d'acides aminés conservés, par rapport à *QacA* ou *QacB*, respectivement

Tableau 7: Comparaison des séquences nucléotidiques de deux *qac* UN B Amplicons trouve et séquences de référence Genbank (Bischoff *et al.*, 2012)

La désignation	Séquences nucléotidiques
<i>qacA/B1</i> , cette étude	300...384 T ...442 G ...455 T ...499 T ...670 (1) (85) (133) (146) (190) (361)
<i>qacA</i> , GI:300492196	300...384 C ...442 G ...455 T ...499 T ...670
<i>qacA</i> , GI:298103888	300...384 T ...442 G ...455 T ...499 T ...670
<i>qacB</i> , GI:3327946	300...384 C ...442 G ...455 C ...499 A ...670
<i>qacA/B2</i> , cette étude	300...384 T ...442 C ...455 C ...499 T ...670 (1) (85) (133) (146) (190) (361)

3.2. Résistance aux alcools :

Les désinfectants à base d'alcool et en particulier les désinfectants pour les mains sont un moyen clé de contrôler les infections hospitalières dans le monde entier. Ces désinfectants limitent la transmission d'agents pathogènes, tels que les agents multirésistants comme les *Enterococcus faecium*. Malgré ce succès, les infections des soins de santé causées par *E. faecium* augmentent (Pidot *et al.*, 2018)

3.2.1. Objectifs :

Pidot *et al* ont été testé la tolérance à l'alcool de 139 isolats hospitaliers d'*E. faecium* obtenus entre 1997 et 2015 (Pidot *et al.*, 2018)

Ils ont été ensuite recherchés des signatures génomiques bactériennes d'adaptation, tolérant à l'alcool chez *E. faecium* (Pidot *et al.*, 2018)

Les mutations sont accumulées dans les gènes impliqués dans l'absorption et le métabolisme des glucides. La mutagenèse a confirmé le rôle de ces gènes dans la tolérance d'*E. faecium* à l'isopropanol (Pidot *et al.*, 2018)

3.2.2. Résultats et discussion :

3.2.2.1. Pertinence clinique d'*E. faecium* tolérance à l'alcool :

Pour évaluer la pertinence clinique des différences de tolérance à l'alcool découvertes par les essais de pidot et *al*, de destruction de l'isopropanol à 23% Donc ils ont été établi un modèle de transmission de surface contaminée pour *E. faecium* chez la souris, et comparé l'impact d'une intervention, en utilisant des lingettes de surface imprégnées à 70% d'isopropanol sur une surface contaminée Ensuite, ils ont été sélectionnés un isolat à tolérance réduite en 1998 et un isolat tolérant à l'alcool en 2012

3.2.2.2. Identification des facteurs génétiques bactériens liés à la tolérance à l'alcool :

Une tolérance élevée à l'alcool a été observée chez des *E. faecium*, suggérant que de multiples événements génétiques conduisant à une tolérance à l'isopropanol se sont produits.

Dans ce cas Pidot et *al*, ont recherché la base génétique de la tolérance à l'alcool par analyse de convergence évolutive pour identifier les régions du *E. faecium* génome susceptible d'abriter des gènes ou des mutations liés à la tolérance à l'alcool

Ils ont identifié 400 positions nucléotidiques mutées en deux paires ou plus, ce qui a réduit à 75 positions nucléotidiques mutées en trois paires ou plus, et seulement trois de ces 75 sites avaient des mutations dans la même direction, l'un de ces lieux muté était le gène *rpoB*, codant la pour la sous-unité d'ARN polymérase. La substitution H486N / Y dans RpoB observée dans trois paires a été associée à une tolérance réduite à l'alcool.

Les Mutations dans cette région de *rpoB* sont connues pour provoquer une résistance à la rifampicine, et c'est l'exposition à ce médicament plutôt qu'une réponse évolutive à l'alcool qui sélectionne probablement ces mutations.

Néanmoins, le *rpoB* muté a servi de support supplémentaire pour l'approche et sa capacité à détecter les mutations homoplasiques associées à un phénotype de tolérance à l'alcool modifié.

3.2.2.3. Validation des facteurs génétiques bactériens liés à la tolérance à l'alcool :

- pidot et *al* ont utilisé l'échange allélique pour fabriquer des mutants ciblés dans l'isolat de référence tolérant à l'isopropanol.
- Okochi et *al* en 2007 étant donné le rôle signalé des protéines PTS dans la tolérance aux solvants.
- Pidot et *al* ont concentrés d'abord sur l'une des régions PTS associées au plasmide, en supprimant une région de 6,5 kb de PTS-2, un PTS putatif spécifique au glucoside.
- Pidot et *al* ont également fait un mutant de délétion du gène *locus_00501* codant pour un symporteur galactoside putatif présente dans la figure 6 où il y avait une substitution spécifique d'acides aminés V264A associée à la tolérance à l'isopropanol.
- Une *rpoB* mutant (H486Y) a également été créé par pidot et *al*, parce que ce locus a également été identifié dans l'analyse de convergence du génome et devrait donc présenter un phénotype de tolérance à l'alcool modifié, bien qu'ici, la mutation soit associée à une perte de tolérance à l'alcool.
- Pidot et *al* indiquée que La perte des gènes individuels, qui impliquée dans la tolérance à l'alcool cependant, n'a pas affectée la sensibilité à la destruction de l'isopropanol.
- Pidot et *al* suggère que la tolérance à l'isopropanol est un phénotype polygénique, avec de multiples changements génétiques à travers différents gène susceptibles de s'être produits dans des souches *E. faecium*.
- Islam et *al* en 2009 ont montré L'augmentation de la tolérance dans le temps affichée par *E. faecium*, les isolats de l'étude de pidot et *al* en 2018 sont compatibles avec l'accumulation de mutations et de gènes qui ont modifié le phénotype de la tolérance à l'alcool.
- Mukhopadhyay en 2015 et Ortega Morente en 2013 n'ont montré que les alcools à chaîne courte tels que l'éthanol et l'isopropanol sont supposés tuer les bactéries en général, en perturbant les fonctions des membranes.

Synthèse bibliographique

- Torres et *al* en 2011 ont montré que La pénétration de l'éthanol dans les composants hydrocarbonés des bicouches phospholipidiques bactériennes provoque la libération rapide de composants intracellulaires et la désorganisation des membranes.
- Mukhopadhyay en 2015 indiquée que L'ingénierie métabolique des bactéries tolérantes aux solvants a mis au jour des mécanismes de tolérance majeurs, montrant que les transporteurs membranaires sont d'une importance cruciale.
- Lam et *al* en 2014 indiquée que Pour les solvants tels que l'éthanol et l'isopropanol, les ions potassium et les gradients de membrane électrochimique à protons sont des mécanismes généraux qui améliorent la tolérance à l'alcool.
- Lam et *al* en 2014 et Pidot et *al* en 2018 ont supposé que des mutations telles que V264A au niveau du gène *locus_00501* codant pour un symporteur galactoside putatif pourraient aider à modifier le gradient de protons membranaires pour favoriser un état tolérant à l'alcool.

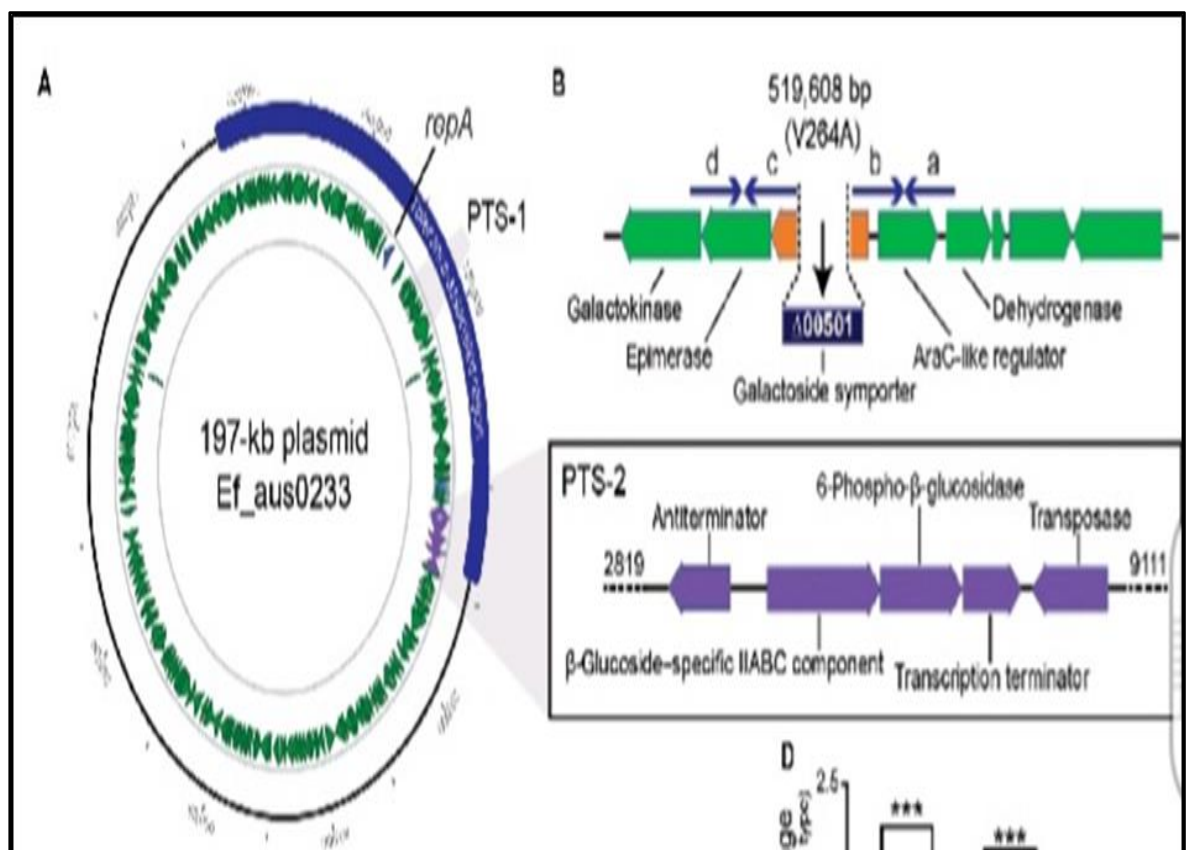


Figure 6 : Confirmation fonctionnelle des gènes associés à la tolérance à l'isopropanol chez *E. faecium* (Pidot et *al.*, 2018)

Synthèse bibliographique

(A): Carte du plasmide *E. faecium* de 197 kb montrant la région de 70 kb associé à la tolérance à l'isopropanol (bleu) et aux deux loci PTS des glucides, y compris le locus PTS-2 de 6,3 kb (violet) supprimé par échange allélique dans l'*E. faecium* souche de référence Ef_aus0233.

(B): Mutations au niveau V264A dans le gène *locus_00501* codant pour un symporteur galactoside putatif pourraient aider à modifier le gradient de protons membranaires pour favoriser un état tolérant à l'alcool.

Conclusion et perspectives

Le présent travail confirme l'évolution du phénomène de résistance génétique aux antimicrobiens traduisant des niveaux de tolérance aux produits biocides chez les souches d'*Enterococcus*.

Les trois études ont montré une faible résistance des entérocoques aux biocides mais les résultats obtenus ne doivent pas être ignorés en particulier :

- Les gènes *qacZ* en tolérance au chlorure de benzalkonium chez les souches *E.faecalis*.
- Le gène *qac A/B*, gène de résistance d'un composé ammonium quaternaire le chlorure de didécyltriméthylammonium qui ont montré une CMI élevée et surtout pour les souches *E.faecium* et *E.feacalis*.
- La présence du gène *rpoB* muté, ainsi un mutant de délétion du gène *locus_00501* codant pour un galactoside putatif, où il y avait une substitution spécifique d'acides aminés V264A associée à la tolérance à l'isopropanol qui est présente chez les souches *E.feacium*.

Ces résultats positifs pour ces deux souches pourraient être sélectionnés avec des pourcentages élevés à l'avenir par l'utilisation des biocides qui entraîne l'augmentation de la tolérance bactérienne à ces derniers et conduit aussi à l'expression des mécanismes permettant la survie des bactéries et bien sûr le développement des techniques de biologie moléculaire qui facilite la détection des nouveaux gènes de résistance aux biocides.

Au vu de l'ensemble des résultats obtenus par des études des chercheurs précédemment décrits au cours de notre étude, nous souhaitons donc de continuer vers une étude moléculaire des gènes responsables de la résistance aux molécules biocides et savoir la possibilité de poursuivre des travaux sur l'étude génétique des souches entérocoques, afin de contribuer à une meilleure compréhension des phénomènes de résistance bactérienne aux biocides, et de parvenir à en maîtriser plus efficacement les conséquences.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Aguilar Galvez, A., Dubois Dauphin, R., Destain, J., Campos, D., Thonart, P. Les entérocoques: avantages et inconvénients en biotechnologie (synthèse bibliographique). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 2012, Vol. 16(1), pp.67-76.
2. Allion, A. Environnement des bactéries et sensibilité aux biocides: mise au point d'une technique rapide pour déterminer in situ l'efficacité bactéricide d'agents antimicrobiens .Th.doct : Sciences Alimentaires : Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires, 2004.
3. Babakhani, S., Oloomi, M. Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *Journal of basic microbiology*, 2018, vol. 58(11), pp. 905-917.
4. Betelli, L. Développement et évaluation d'une méthode fondée sur la PCR temps réel pour la caractérisation des bioaérosols: application au groupe des actinomycètes. Th. doct : Sciences de la vie : Université de Bourgogne, 2013.
5. Bischoff, M., Bauer, J., Preikscht, P., Hölzel, C. First Detection of the Antiseptic Resistance Gene *qac A/B* in *Enterococcus faecalis*. *Microbial Drug Resistance*, 2012, vol. 18(1), pp. 7-12.
6. Borges-walmsley, M I., Mckeegan, K S., Walmsley, A R. Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochemical Journal*, 2003, vol. 376(2), pp. 313-338.
7. Boussouar, N. Caractérisation technologique sanitaire des Entérocoques isolés à partir de lait de chamelle du sud-ouest Algérien .Th.doct : Microbiologie : université Aboubeker Belkaid Tlencen, 2017.
8. Boutarfi, Z., Rebiahi, SA ., Morghad, T., Pulido, R P., Burgos, M JG., Mahdi, F., Galvez, A. Biocide tolerance and antibiotic resistance of *Enterobacter* spp. isolated from an Algerian hospital environment. *Journal of global antimicrobial resistance*, 2019, vol.18, pp. 291-297.
9. Braga,TM., Marujo,PE., Pomba,C., Lopes,M F S. Involvement, and dissemination, of the enterococcal small multidrug resistance transporter *QacZ* in resistance to quaternary ammonium compounds .*journal of chemotherapy*, 2010 , vol.66(2), pp. 283-286.

Références bibliographiques

10. Buxeraud, J., Faure, S. Les antiseptiques. Actualités Pharmaceutiques, 2019, vol.58(587), pp. 24-26.
11. Carencu, Philippe. Antibiorésistance et biocides. Bulletin CCLin-Arlin n, 2017.
12. Chapman, JS. Biocide resistance mechanisms. International Biodeterioration & Biodegradation, 2019, vol.51 (2), pp.133-138.
13. Cremieux, A., Freney, J. Bases fondamentales de l'action antimicrobienne des antiseptiques et désinfectants-les mécanismes d'action antimicrobienne IN. Antisepsie et Désinfection, 1995, pp. 23-37.
14. Denyer, S. P., Stewart, G S A B. Mechanisms of action of disinfectants. International biodeterioration & biodegradation, 1998, vol. 41(3-4), pp. 261-268.
15. Diarra, AS. Étude comparative de la PCR classique et de la PCR en temps réel dans le diagnostic des méningites dues à *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* de type b. Th.doct : Pharmacie : université de Bamako, 2014.
16. Dunny, GM. Genetic functions and cell–cell interactions in the pheromone-inducible plasmid transfer system of *Enterococcus faecalis*. Molecular microbiology, 1990, vol .4(5),pp. 689-696.
17. Elyse, P., Aain, H. La PCR en temps réel: principe et application. Review in Biology and Biotechnology (Canada), 2002, vol 2, pp. 2-11.
18. Facklam, RR., Collins, MD. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. Journal of clinical microbiology, 1989, vol .27(4), pp.731-734.
19. Fedoroff, NV. Transposable elements as a molecular evolutionary force. Annals-New York academy of Sciences, 1999, vol. 870, pp. 251-264.
20. Fernández-Fuentes, M A., Abriouel, H., Morente, E O., Pulido, R. P., Gálvez, A. Genetic determinants of antimicrobial resistance in Gram positive bacteria from organic foods. International journal of food microbiology, 2014, vol. 172, pp. 49-56.
21. Gagnon, D. Détection du virus de l'anémie aviaire par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) couplée à un test Elisa. Th. Maître sciences en microbiologie : Université de Montréal ,2004.
22. Garibyan, L., Avashia, N. Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). The Journal of investigative dermatology, 2013, vol. 133(3), pp.6.

Références bibliographiques

23. Gentry-Weeks, C R., Karkhoff-Schweizer, R., Pikis, A., Estay, M., Keith, J M. Survival of *Enterococcus faecalis* in mouse peritoneal macrophages. *Infection and immunity*, 1999, vol. 67(5), pp. 2160-2165.
24. Gilmore, M S., Segarra, R A., Booth, M C. An HlyB-type function is required for expression of the *Enterococcus faecalis* hemolysin/bacteriocin. *Infection and immunity*, 1990, vol.58 (12), pp. 3914-3923.
25. Isnard, C. *Enterococcus spp* : entre pathogènes opportunistes et probiotiques. Th. doct : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie : université Normandie, 2017.
26. Ladjouzi, R., Bizzini, A., Lebreton, F., Sauvageot, N., Rincé, A., Benachour, A., & Hartke, A. Analysis of the tolerance of pathogenic enterococci and *Staphylococcus aureus* to cell wall active antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2013, vol. 68(9), pp.2083-2091.
27. Lasek, F. Présence devenir et traitement des biocides dans les rejets d'un établissement hospitalier. Th. doct : Chimie et microbiologie de l'eau : Université de Poitiers ,2018.
28. Le Bouguéneq, C., Horaud, T., Geoffroy, C., Alouf, JE. Insertional inactivation by Tn3701 of pIP964 hemolysin expression in *Enterococcus faecalis*. *FEMS microbiology letters*, 1988, vol.49(3),pp. 455-458.
29. Mantion, B. Entérocoques résistants a la vancomycine :(ERV) de grandes épidémies vers une gestion en routine. Th.doct : Pharmacie : Université III ,2015.
30. Massicotte, R. Désinfectants et désinfection en hygiène et salubrité: principes fondamentaux. Direction des communications, Santé et services sociaux Québec, 2009.
31. McDonnell, G., & Russell, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical microbiology reviews*, 12(1), 147-179.
32. Mounier, M., Pestourie, N., Ploy, M C., Denis, F. Les détergents et les désinfectants: les risques liés à l'usage médical des biocides (2e partie). *Antibiotiques*, 2009, vol.11(4), pp. 234-242.
33. Murray, B. E., Singh, K. V., Heath, J. D., Sharma, B R., Weinstock, G M. Comparison of genomic DNAs of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. *Journal of Clinical Microbiology*, 1990, vol.28 (9), pp.2059-2063.

Références bibliographiques

34. Muruleedhara, N B., Meredith, B N., Asja, K., Zachery, R S., Valerie, J H. Enterococci in the environment. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2012, vol.76 (4), pp. 685-706.
35. Payet, S. Méthode d'identification bactérienne par PCR quantitative appliquée à un modèle de biofilm oral pluri-espèces dynamique. Th. doct : Chirurgie Dentaire : Université de Bordeaux, 2017.
36. Pidot, S J., Gao, W., Buultjens, A H., Monk, I R., Guerillot, R., Carter, G P., Mahony, A A . Increasing tolerance of hospital *Enterococcus faecium* to handwash alcohols. *Science translational medicine*, 2018, vol. 10(452), pp.6115.
37. Pieniz, S., de Moura, T. M., Cassenego, A P V., Andrezza, R., Frazzon, A P G., de Oliveira Camargo, F A., Brandelli, A. Evaluation of resistance genes and virulence factors in a food isolated *Enterococcus durans* with potential probiotic effect. *Food Control*, 2015, vol. 51, pp.49-54.
38. Poitras, E., Houde, A. La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in biology and biotechnology*, 2002, vol.2(2), pp.2-11.
39. Pugniere, P. Contribution à l'amélioration de la quantification des acides nucléiques par qPCR et RT-qPCR. Th. doct : Biotechnologie, Instrumentation, Signal et Imagerie pour la Biologie, la Médecine et l'Environnement (BIS) : Université de Grenoble, 2012.
40. Rihn, B H., HADOU, T., Le Faou, A. Virus, produits antiseptiques et désinfectants: La norme et ses limites. *Documents pour le médecin du travail*, 2001, vol.86, pp.143-149.
41. Russell, AD. Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. *Journal of Hospital Infection*, 1998, vol.43, pp. 57- 68.
42. Russell, AD. Bacterial spores and chemical sporicidal Agents. *Clinical Microbiology Review*, 1990, vol.3, pp.99-119.
43. Russell, AD. Mechanisms of bacterial resistance to biocides. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1995, vol. 36(3-4), pp. 247-265.
44. Schleifer, K H., Kilpper-Bälz, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. re vas *Enterococcus faecalis* comb. Nov. And *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1984, vol.34 (1), pp.31-34.
45. Sheldon Jr, A T. Antiseptic “resistance”: real or perceived threat?. *Clinical infectious diseases*, 2005, vol.40 (11), pp.1650-1656.

Références bibliographiques

46. Sommer, L M., Krauss, JL., Hulten, K. G., Dunn, J J., Kaplan, S L., McNeil, J C. The prevalence of antiseptic tolerance genes among staphylococci and enterococci in a pediatric population. *Infection control and hospital epidemiology*, 2019, vol.40 (3), pp.333-340.
47. Tanimoto, K., Clewell, DB. Regulation of the pAD1-encoded sex pheromone response in *Enterococcus faecalis*: expression of the positive regulator TraE1. *Journal of bacteriology*, 1993, vol.175 (4), pp.1008-1018.
48. Tella, R. Apport de la biologie moléculaire dans le diagnostic des infections fongiques invasives. Th.doct : Pharmacie : université Rabat, 2013.
49. Tumah, H N. Bacterial biocide resistance. *Journal of Chemotherapy*, 2009, vol. 21(1), pp. 5-15.
50. Vega, N M., GORE, J. Collective antibiotic resistance: mechanisms and implications. *Current opinion in microbiology*, 2014, vol. 21, pp. 28-34.
51. Wong, Marisa L., Medrano, J F. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 2005, vol. 39, (1), pp.75-85.

Résumés

ملخص:

المبيدات الحيوية (المطهرات و المنظفات) هي عناصر أساسية تستخدم في الطب السريري لمحاربة الميكروبات وتقليل انتشار العدوى في المستشفيات ، لكن الاستخدام المفرط لهذه الأخيرة يؤدي إلى المقاومة سواء كانت ذاتية أو مكتسبة و من بين الميكروبات التي تم اختبارها والتي تسبب التهابات خطيرة في المستشفيات وبنسب عالية من جنس *Enterococcus* ، وهذا ما دفعنا إلى تحليل الدراسات التي أجراها باحثون مختلفون على جينات مقاومة المكورات المعوية للمبيدات الحيوية

إذا ثلاث دراسات قامت بفحص المكورات المعوية البرازية و المكورات المعوية المستخلصة من مصادر مختلفة عن طريق تقنية تفاعل البوليمراز المتسلسل (PCR) مع الكشف عن قيم CMI :

اكتشف Braga واخرون الجين *qacZ* المقاوم chlorure de benzalkonium عند السلالة *E.faecalis*، واكتشف Bischoff واخرون الجين *qacA/B* المقاوم chlorure de didécyldiméthylammonium بقيم CMI مرتفعة عند سلالات *E.faecalis* و *E.faecium*، اما pidot واخرون اكتشفوا وجود جين *ropB* المتحور المقاوم للايزوبروبانول (الكحول) عند السلالة *E.faecium*

وأخيرًا ، على الرغم من النتائج الضعيفة التي تم الحصول عليها ولكنها مهمة ولا ينبغي تجاهلها ، يمكن اختيارها في المستقبل باستخدام المبيدات الحيوية وتطوير تقنيات البيولوجيا الجزيئية

الكلمات المفتاحية: المبيدات الحيوية ، المكورات المعوية ، المقاومة ، تفاعل البوليمراز المتسلسل PCR.

Résumé:

Les biocides (antiseptiques, désinfectants) sont des éléments essentiels utilisés en médecine clinique pour lutte contre les microbes et réduire la propagation des infections nosocomiale mais l'usage excessif de ce dernier entraîne une résistance que ce soit intrinsèque ou acquis, parmi les microbes testés qui provoquent des infections nosocomiales graves et avec des proportions élevées le genre *Enterococcus*, c'est ce qui nous a conduit à analyser des études des différents chercheurs sur les gènes de résistance des Entérocoques aux biocides.

Trois travaux qui ont dépisté des souches d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium* de différents isolèrent pour la présence des gènes de résistance des biocides via PCR avec la détection des valeurs de CMI :

Alors, Braga et *al* ont détecté le gène *qacZ* en tolérance au chlorure de benzalkonium chez les souches *E.faecalis*, Bischoff et *al* ont détecté les gènes *qac A /B* gène de résistance au chlorure de didécylidiméthylammonium avec des CMI élevé chez les souches *E.faecium* et *E.feacalis*, et pidot et *al* ont détecté la présence du gène *rpoB* mutée, gène de résistance d'isopropanol (alcool) chez les souches *E.faecium*.

Enfin, malgré les faibles résultats obtenus mais elle est importante et ne doivent pas être ignorés, pourraient être sélectionnés à l'avenir par l'utilisation des biocides, et le développement des techniques de biologie moléculaire.

Mots clés: Biocides, Entérocoques, Résistance, PCR.

Abstract:

Biocides (antiseptics, disinfectants) are essential elements used in clinical medicine to fight against microbes and reduce the spread of nosocomial infections, but excessive use of the latter leads to resistance, whether intrinsic or acquired, among the microbes tested which cause serious nosocomial infections and with high proportions the genus *Enterococcus*, this is what led us to analyze studies by different researchers on the genes of resistance of *Enterococci* to biocides.

Three studies which detected strains of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of differing isolate for the presence of biocide resistance genes via PCR with the detection of MIC values:

So, Braga and *al* detected the *qacZ* gene in tolerance to benzalkonium chloride in *E.faecalis* strains, Bischoff and *al* detected the *qac A / B* genes, gene for resistance to didécylidiméthylammonium chloride with high MICs in *E. faecium* and *E.feacalis*, and pidot and *al* have detected the presence of the mutated *rpoB* gene, isopropanol (alcohol) resistance gene in *E.faecium* strains.

Finally, despite the poor results obtained but it is important and should not be ignored, could be selected in the future by the use of biocides, and the development of molecular biology techniques.

Keywords: Biocides, *Enterococci*, Resistance, PCR.