

N° d'ordre: 12/2008 – D/ S.N

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA**  
**RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

Université des Sciences et de la Technologie HOUARI BOUMEDIENE

Faculté des Sciences Biologiques



THESE

Présentée pour l'obtention du diplôme de DOCTORAT  
EN: SCIENCES DE LA NATURE

Spécialité Microbiologie

Par

Mme BENMALEK Yamina

Sujet

Etude de la résistance aux agents antimicrobiens (métaux lourds et antibiotiques)  
Et évaluation du pouvoir dépolluant chez un nouveau taxon de la famille des  
***Flavobacteriaceae***

Soutenue le 20/12/2008, devant le jury composé de

M me LARABA -DJE BARI Fatima Professeur (FSB/USTHB Alger)	Présidente
Mr HACENE Hocine Professeur (FSB/USTHB Alger)	Directeur de thèse
M me TOUIL BOUKOFFA Chafia Professeur (FSB/USTHB Alger)	Examinatrice
Mr BAKOUR Rabah Professeur (FSB/USTHB Alger)	Examineur
Mr BENSOLTANE Ahmed Professeur (Univ. ORAN)	Examineur

## RESUME

Dans cette étude, nous avons isolé 17 souches bactériennes de différentes niches écologiques polluées principalement par des hydrocarbures. Elles sont à Gram positif, aérobies strictes, immobiles, non sporulées, pigmentées surtout en jaune avec une morphologie variable. Une d'entre elles, provenant du sol de la ville de MEFTAH en 2006 est à Gram négatif (1YB-R12T). Elle est psychrotolérante (4°C) avec une température optimale de croissance située entre 28°C et 30°C et Halotolérante (tolère une [Na Cl] allant de 1% - 6% avec un optimum à 4%). Son pH optimum de croissance est de 7.3, avec un intervalle allant de (3-11). Elle est caractérisée surtout par un cycle morphogénétique très variable en fonction de l'âge de la culture. Le séquençage de l'ARNr-16S de cette bactérie a montré que c'est une nouvelle espèce du genre *Chryseobacterium* appartenant à la famille des Flavobacteriaceae. Le taux de similitude de la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> avec les espèces phylo génétiquement proches est de 96.5% avec *Chryseobacterium haifense* souche H38 isolée en 2007 d'un échantillon de lait à HAIFA en Palestine. Le contenu de son DNA chromosomique en (G+C) est de 40.9 moles %. Les acides gras cellulaires prédominants chez la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> obtenus de la chimio - taxonomie sont: anteiso-C15:0 (41.4%) et iso-C15:0 (14.4%). Deux acides gras sous forme de traces sont mis en évidence; anteiso-C15:1 A et C18:0 2 DMA. Le numéro d'accèsion de Gen-Bank pour la séquence génomique de la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> est: EU 516352. Le nom latin attribué à ce nouveau taxon est *Chryseobacterium solincola* souche 1YB-R12T<sup>T</sup> (=DSM 1183<sup>T</sup> = CCUG 55604<sup>T</sup>).

-Cette nouvelle bactérie tolère des concentrations non négligeables de trois ions métalliques testés soit ; 500 ug/ml pour le Pb<sup>2+</sup>, 300 ug/ml pour le zn<sup>2+</sup> et 150 ug/ml pour le cd<sup>2+</sup>. Les concentrations résiduelles de chaque métal évalués par le dosage en utilisant la méthode spectroscopique sont faibles dans l'ensemble et varient en fonction du pH et du métal testé. La [Cd<sup>2+</sup>]<sub>r</sub> déterminée à pH acide et neutre (5, 5.5, 7.3) est respectivement de 13.26 mg/l, 9 mg/l et 15 mg/l. Les concentrations obtenues à pH basique sont faibles et fluctuent entre 0.198 mg/l et 1.800 mg/l. Pour le zinc à pH=5 et à pH=7.3, la [Zn<sup>2+</sup>]<sub>r</sub> est de l'ordre de 4.40 mg/l et 5 mg/l. Par contre à pH basique (8.5 et 9) elle est de 5.672 mg/l et 4.14 mg/l. La [Pb<sup>2+</sup>]<sub>r</sub> est de 7.1 mg/l à pH neutre, 5.7 mg/l et 5.4 mg/l à pH acide (5 et 5.5). Pour des pH élevés (basiques) elle fluctue entre 0.76 mg/l et 1.83 mg/l. Sur la base de ces résultats, on peut considérer cette bactérie psychrotolérante, isolée d'un environnement très pollué comme un germe à pouvoir dépolluant remarquable puisque le taux de captation des ions métalliques est supérieur à 80%.

-Sur 45 antibiotiques testés, la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> a montré une résistance totale pour l'imipénème, la cefuroxime, la tétracycline, l'acide nalidixique, l'acide pipémidique, la fosfomycine, les furanes et les nitrofurantoinés et une résistance intermédiaire pour la céfalotine, la dibécacine et l'acide fusidique.

-Le transfert génétique réalisé par conjugaison entre la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> et la souche receptrice d'E coli BM 21, montre que le caractère de résistance à l'imipénème, la céfalotine et la tétracycline n'a pas été transféré, ce qui indique que le support génétique n'est pas d'origine extra chromosomique (plasmides). Le profil plasmidique obtenu après extraction de l'ADN plasmidique et comparaison avec un témoin confirme l'absence des éléments génétiques autres que le chromosome. Donc, la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> est naturellement résistante aux différents agents antimicrobiens.

## Mots clés :

Résistance, métaux lourds, antibiotiques, Flavobacteriaceae

## Dédicaces

- Je dédie ce modeste travail:
- A la mémoire de mon chère papa que DIEU lui accorde sa Miséricorde
- A ma mère que je lui souhaite une longue et heureuse vie
- A mes frères et sœurs avec ma tendre affection
- A toute ma famille
- A la mémoire de toutes les personnes de la science et du savoir

## Remerciements

- Le présent travail a été réalisé dans le laboratoire de microbiologie de la Faculté des Sciences Biologiques (FSB/USTHB) sous la direction du défunt le Professeur *Ali CHIKHI* à qui je suis très reconnaissante aujourd'hui que DIEU lui accorde sa miséricorde.

- Tout d'abord je remercie DIEU le tout puissant de m'avoir guidé dans le bon chemin et de m'avoir aidé à finir ce travail.

- Je tiens à exprimer ma gratitude au Professeur *Hacene HOCINE*, responsable du laboratoire de microbiologie de la FSB/USTHB qui a accepté d'être notre directeur de thèse et pour ces motivations qui m'ont aidé à terminer ce travail.

- Madame *Fatima LARABA*, Professeur en Biochimie, Responsable du laboratoire de Biochimie et Doyenne de la FSB/USTHB, je vous remercie pour l'honneur que vous me faites en acceptant de présider ce jury et aussi pour votre soutien moral et votre témoignage que je n'oublierais jamais.

- Madame *Chafia TOUIL BOUKOFFA*, Professeur en Immunologie, Responsable de l'équipe de recherche sur les cytokines et Directrice du grand laboratoire de la Biologie Cellulaire et Moléculaire de la FSB/USTHB, je vous remercie beaucoup pour votre gentillesse et surtout pour votre soutien moral. Votre présence dans ce jury est un honneur pour moi.

- Je tiens à remercier également Monsieur *Rabah BAKOUR*, Professeur en génétique, Responsable du laboratoire de génétique de la FSB/USTHB et Directeur de l'ISMAL d'Alger d'avoir accepté de faire partie de ce jury et examiner ce travail malgré vos nombreuses tâches.

- Je remercie Monsieur *Ahmed BENSOLTANE*, Professeur en Microbiologie, Responsable du laboratoire de microbiologie de l'Université d'ORAN qui nous a honoré par sa présence en acceptant de faire partie de ce jury et d'examiner ce modeste travail.

- Je remercie tout les chercheurs du laboratoire de microbiologie de l'IRD de l'Université de la MEDITERRANEE en France en particulier le Docteur *Marie Laure FARDEAU* pour sa gentillesse et son aide, sans qui je n'aurais jamais pu terminer ce travail.

## Remerciements

- Je tiens aussi à remercier les membres du laboratoire d'écologie microbienne de la rhizosphère et des environnements extrêmes CNRS- CEA Cadarache de l'Université de la MEDITERRANEE/France surtout *Wafa ACHOUAK* grâce à elle j'ai pu faire un grand pas dans ma recherche scientifique.
- Je remercie également les membres du laboratoire de génétique de la FSB/USTHB pour leur aide et leur collaboration en particulier Mlle *Yamina MESSAI*. Merci beaucoup *Yamina*.
- Je voudrais aussi remercier Mlle *Djouher AIT- IDIR* d'avoir accepté de nous recevoir dans le laboratoire de la biologie moléculaire de l'Université de BOUMERDES pendant les grandes vacances.
- Je remercie aussi le Professeur *AMIROUCHE* de la FSB/USTHB qui nous a autorisé à prendre des photos dans son laboratoire.
- Mes remerciements s'adressent aussi aux membres du laboratoire de la police scientifique d'Alger et également ceux du laboratoire de chimie de l'ORGM de BOUMERDES.
- Mes remerciements les plus sincères s'adressent à mon amie *Ame1 BOUANANE*, qui a toujours été présente à mes côtés dans les moments les plus difficiles.
- Je tiens aussi à remercier vivement :
  - tous les membres du laboratoire de Microbiologie de la FSB/USTHB.
  - tous mes collègues de la FSB/USTHB.

Table des matières

Abréviations

Introduction ... ..	1
II- Etude bibliographique ... ..	3
1- Les métaux lourds ... ..	3
1.1- Définition ... ..	3
1.2- Source d'émission des métaux lourds ... ..	5
1.2.1- Source naturelle ... ..	6
1.2.2- Source anthropogénique ... ..	6
1.3- Propriétés et caractéristiques de quelques métaux lourds et leurs effets sur la santé ... ..	6
1.3.1- Le cadmium ... ..	6
1.3.2- Le plomb ... ..	6
1.3.3- Le zinc ... ..	8
1.4- La résistance bactérienne aux métaux lourds ... ..	8
1.4.1- Séquestration, bio sorption, immobilisation et bio minéralisation ... ..	10
1.4.2- Réduction enzymatique ... ..	11
1.4.2.1- La résistance au mercure ... ..	11
1.4.2.1.1- La résistance à spectre étroit... ..	11
1.4.2.1.2- La résistance à spectre large... ..	11
1.4.3- Les transporteurs membranaires ... ..	12
1.4.3.1- Les protéines de transport RND... ..	12
1.4.3.1.1- Définition et mode d'action ... ..	12
1.4.3.1.2- Distribution des protéines RND chez les procaryotes ... ..	14
1.4.3.1.3- Structure des composantes de la pompe efflux Czc CBA ... ..	17
1.4.3.2- Les protéines de transport CDF... ..	17
1.4.3.2.1- Définition et mode d'action ... ..	17
1.4.3.2.2- Répartition et classification des protéines CDF ... ..	19
1.4.3.2.3- Description de quelques protéines CDF ... ..	19
1.4.3.3- Les protéines de transport P-type ATPases ... ..	21
1.4.3.3.1- Définition et mode d'action ... ..	21
1.4.3.3.2- Classification des protéines P-type ATPases ... ..	23
2- Les antibiotiques ... ..	25
2.1- Définition ... ..	25
2.2- Mode d'action ... ..	25
2.2.1- Les antibiotiques inhibiteurs de la biosynthèse du peptidoglycane ... ..	25
2.2.1.1- Les •-Lactamines ... ..	27
2.2.1.2- La fosfomycine. ... ..	27

2.2.1.3-	La cyclosérine ... ..	27
2.2.1.4-	Les glycopeptides.. ... ..	29
2.2.1.5-	La bacitracine ... ..	29
2.2.2-	Les antibiotiques agissant sur les membranes ... ..	29
2.2.2.1-	Les polymyxines ... ..	29
2.2.3-	Les antibiotiques actifs sur l'ADN ... ..	29
2.2.3.1-	Inhibition de la réplication ... ..	29
2.2.3.1.1-	Les quinolones ... ..	29
2.2.3.1.2-	Les nitrofuranes.. ... ..	31
2.2.3.1.3-	La novobiocine ... ..	31
2.2.3.1.4-	Les antibiotiques imidazolés ... ..	31
2.2.3.2-	Inhibition de la transcription ... ..	31
2.2.3.2.1-	Les Rifampicines ... ..	31
2.2.4-	Les antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des protéines ... ..	31
2.2.4.1-	Les aminosides.. ... ..	32
2.2.4.2-	Les tétracyclines ... ..	34
2.2.4.3-	Les macrolides et apparentés ... ..	34
2.2.4.4-	Les antibiotiques phénicolés ... ..	34
2.2.4.5-	L'acide fusidique ... ..	34
2.2.5-	Les antibiotiques agissant par compétition ... ..	34
2.2.5.1-	Les sulfamides ... ..	34
2.2.5.2-	La triméthopri me ... ..	35
2.2.5.3-	L'acide para amino salicylique (PAS) ... ..	35
2.3-	Origine de la résistance bactérienne ... ..	35
2.3.1-	La résistance naturelle ... ..	35
2.3.2-	La résistance extra chromosomique ... ..	35
2.3.2.1-	Les plasmides ... ..	35
2.3.2.2-	Les transposons ... ..	36
2.3.2.3-	Les intégrons ... ..	36
2.4-	Les mécanismes biochimiques de la résistance ... ..	37
2.4.1-	Imperméabilité membranaire ... ..	37
2.4.2.1-	Diminution de la perméabilité de la membrane externe ... ..	37
2.4.2.2-	Systèmes efflux actifs ... ..	37
2.4.2-	Modification de la cible des antibiotiques ... ..	37
2.4.3-	Synthèse d'enzyme inactivant les antibiotiques ... ..	38
3-	Le transfert génétique ... ..	38
3.1-	La conjugaison ... ..	38
3.2-	La transduction ... ..	38

3.3- La transformation..	39
4- Les <i>Flavobacteriaceae</i>	40
4.1- Historique et position taxonomique...	40
4.2- Caractères bactériologiques..	40
4.3- Habitat et pouvoir pathogène ...	41
II- Etude expérimentale..	44
1- Isolement et identification des souches ...	44
1.1- Matériel et méthodes. ....	44
1.1.1- Matériel d'étude et prélèvements des échantillons ...	44
1.1.2- Méthodes d'étude ...	44
1.1.2.1- Préparation des échantillons et ensemencement. ....	44
1.1.2.2- Isolement, purification et sélection des souches ...	44
1.1.2.3- Caractérisation biochimique des souches ...	46
1.1.2.4- Optimisation des paramètres physicochimiques de la souche 1YB-R12T...46	
1.1.2.4.1- La température de croissance ...	46
1.1.2.4.2- Le pH de croissance ...	48
1.1.2.4.3- La tolérance au chlorure de sodium ...	48
1.1.2.5- Recherche de pigments spécifiques à la souche 1YB-R12T.....	48
1.1.2.6- Etude de la sensibilité de la souche 1YB-R12T au lysozyme.....	48
1.1.2.7- Identification moléculaire de la souche 1YB-R12T . ...	48
1.1.2.7.1- Amplification du gène codant pour l'ARNr-16S et séquençage ...	49
1.1.2.7.2- Détermination du contenu de l'ADN en (G+C) moles %.....	50
1.1.2.7.3- La chimio taxonomie ...	51
2- Etude de la résistance aux agents antimicrobiens ...	51
2.1- Etude de la résistance aux métaux lourds... ..	51
2.2.1- Préparation des solutions métalliques..	51
2.2.2- Détermination de la concentration seuil pour chaque métal ...	51
2.1.3- Evaluation du taux d'accumulation des ions métalliques ...	52
2.2- Etude de la résistance aux antibiotiques ...	53
3- Transfert génétique et détermination du support génétique ...	54
3.1- Transfert génétique par conjugaison ...	54
3.2- Détermination du support génétique ...	55
III- Résultats et discussion ...	57
1- Isolement et identification ...	57

1.1- Caractérisation des souches isolées ... ..	57
1.2- Caractérisation morphologique et biochimique de la souche 1YB-R12T ... ..	57
1.3- Identification moléculaire de la souche 1YB-R12T ... ..	63
2- Etude de la résistance aux agents antimicrobiens ... ..	71
2.1- Les métaux lourds ... ..	71
2.2- Etude de la résistance aux antibiotiques... ..	80
3- Transfert génétique et détermination du support génétique de la résistance ... ..	84
IV- Conclusion ... ..	86
Références bibliographiques ... ..	89
Annexes	

Les abréviations

A B C - Transporteur: transporteurs liant l'ATP  
A D N: acide désoxy-ribonucléique  
A L A: acide amino levulinique  
A L A D: amino levulinique déshydratase  
A R N: acide ribonucléique  
A T B: antibiotique  
B L A S T: basic local alignment search tool  
C C U G: culture collection, University of G Ô T E B O R G  
C D F: cation diffusion facilitator  
C H R: chromate transporteur  
c n r: gène de résistance au cobalt et au nickel  
c z c: déterminant génétique de la résistance aux cobalt, zinc et cadmium  
D O: densité optique  
D S M Z: Deutsh Sammlung Von Mikro organismen und Zellkulturen  
H A E - R N D: hydrophobic and amphiphilic compounds export resistance - nodulation -  
cellular - division  
H M E - R N D: heavy metal efflux resistance - nodulation - cellular - division  
H T M: hélice transmembranaire  
M F P: membrane fusion protein  
O M P: outer membrane factors  
N A C - G : N-acetyl glucosamine  
N A C - M U R : N-acetylmuramique  
P b : paire de bases  
P C R : polymerase chain reaction  
P L P : protéine liant la pénicilline  
P M F : protéine force motivation  
U D P - N A M P : uridine di phosphate-N -acetyl muramyl pentapeptide

Tableau I : Les principales familles des protéines de transport des métaux lourds ... ..9

Tableau II : Répartition et classification des protéines RND transporteurs des ions métalliques ... ..16

Tableau III : Les différents groupes des protéines CDF chez les micro-organismes .....20

Tableau IV : La nature, le lieu et la date des prélèvements ... .. 45

Tableau V : Les différents tests biochimiques effectués ... ..47

Tableau VI : Différentes étapes du programme... ..50

Tableau VII : Les différentes concentrations des ions métalliques testés en ug/ml ... ..52

Tableau VIII : La liste des différents antibiotiques testés avec leurs charges ... ..56

Tableau IX : Caractères différentiels entre la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> et les autres espèces proches ... ..64

Tableau X : Profil des acides gras cellulaires (%) de la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> et les autres espèces proches du genre *Chryseobacterium* ..... 67

Tableau XI : Profil des acides gras cellulaires (%) majoritaires chez les espèces du genre *Chryseobacterium* et la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> .....70

Figure 1 : Comportement du polluant dans l'environnement ... ..	4
Figure 2 : Gamme de concentration en métaux lourds et réponses biologiques associées ... ..	5
Figure 3 : Les deux modèles de résistance au mercure ... ..	11
Figure 4 : Modèle montrant la topologie et le mode de fonction du système CzcCBA chez les bactéries à Gram négatif ... ..	13
Figure 5 : Mode d'action du déterminant <i>czc</i> de la résistance aux ions métalliques .....	15
Figure 6 : Représentation schématique du plasmide pMOL30 qui code pour la résistance aux cobalt, zinc et cadmium chez <i>Alcaligenes eutrophus</i> ... ..	15
Figure 7 : Organisation génétique du système efflux <i>czc</i> CBA des espèces d' <i>Helicobacter pylori</i> et de <i>Ralstonia metallidurans</i> .....	18
Figure 8 : Représentation schématique du plasmide pIO 258 qui code pour la résistance aux ions métalliques du cadmium et du zinc chez <i>Staphylococcus aureus</i> ... ..	22
Figure 9 : Structure schématique des protéines ATPases P1 avec 8 hélices transmembranaires ... ..	24
Figure 10 : Représentation schématique des sites d'action des antibiotiques ... ..	26
Figure 11 : Représentation schématique des sites d'action de certains antibiotiques sur la biosynthèse du peptidoglycane ... ..	28
Figure 12 : Représentation schématique de la paroi des bactéries à Gram négatif (a) et à Gram positif (b) ... ..	30
Figure 13 : Représentation schématique des sites d'action des antibiotiques actifs sur la synthèse des protéines... ..	33
Figure 14 : Schéma représentant l'organisation générale de l'Opéron ribosomal des procaryotes ... ..	49
Figure 15 : Photos représentant l'aspect des colonies de la souche 1YB-R12T âgée de plus de 7 jours sur un milieu ordinaire (a) et un autre riche (b) ... ..	58
Figure 16 : Position phylogénétique de la souche 1YB-R12T <sup>T</sup> à l'intérieur du genre <i>Chryseobacterium</i> sur la base de la séquence du gène ARNr-16S ... ..	66
Figure 17 : Evaluation du taux de la résistance aux trois sels métalliques chez la souche 1YB-R12T <sup>T</sup> ... ..	72

Figure 18 : Courbes de croissance de la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> en absence et en présence des ions métalliques en fonction du pH ... ..77

Figure 19 : Histogramme représentant les concentrations résiduelles métalliques dosées dans le milieu de culture en fonction du pH ... ..79

Figure 20 : Profils plasmidiques obtenus après extraction de l'ADN plasmidique par la méthode de Kado et Liu et électrophorèse sur gel d'agarose 0.7 %.....85

Courbe 1 : Evolution de la croissance de la souche 1YB-R12T en fonction de la température ... ..61

Courbe 2 : Evolution de la croissance de la souche 1YB-R12T en fonction de temps ....61

Courbe 3 : Evolution de la croissance de la souche 1YB-R12T en fonction de pH ... ....62

Courbe 4 : : Evolution de la croissance de la souche 1YB-R12T en fonction de la concentration de Na Cl... ..62

# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

Le développement accru de la technologie ces deux derniers siècles, s'est accompagné par un développement de l'urbanisation, la concentration et la diversification des activités industrielles et agricoles de l'homme, ce qui a conduit à un accroissement général de la pollution de l'environnement.

Les hydrocarbures et les métaux lourds sont considérés comme étant les polluants les plus prépondérants. Le premier type d'effluent résulte de l'exploitation humaine des gisements de pétrole, l'extraction, le transport et l'utilisation de cette source d'énergie en entraînant des risques de pollution (accidentelle et chronique) pour l'environnement pouvant influencer sur l'équilibre écologique et conduire à la destruction totale des différents écosystèmes.

Les métaux lourds, et plus particulièrement le zinc, le cadmium et le plomb ont fait leur apparition ces dernières années à des concentrations anormalement élevées dans l'environnement, ce qui pose un vrai problème et un grand risque sanitaire pour l'homme. Le cadmium et le plomb sont en effet des composés chimiques hautement toxiques, possédant la capacité de se concentrer le long de la chaîne alimentaire et de s'accumuler dans certains organes du corps humain. En revanche, le zinc est considéré comme un élément essentiel à la vie biologique, mais au-delà d'une certaine concentration peut devenir toxique.

Les activités responsables de l'émission de ces métaux dangereux dans l'environnement sont nombreux, nous évoquons ceux qui sont liées surtout à l'utilisation abusive de substances non exemptes de ces composés chimiques en agriculture, aux activités industrielles et nucléaires qui engendrent une pollution à la fois directe (rejet de déchets ou d'effluents polluants) ou indirecte (transport de substances polluantes par voie aérienne, marine et terrestre). Il faut aussi citer les industries métallurgiques, les exploitations et les extractions minières sans oublier les activités urbaines liées au développement des villes et des réseaux routiers. Le trafic routier constitue en effet une source principale de pollution par le plomb (présent dans l'essence et les batteries), le cadmium et le zinc (présents dans les huiles, les pneumatiques et les freins). La pollution ainsi générée se retrouve dans les eaux de ruissellement de chaussées routières et dans l'atmosphère (poussières). Dans les deux cas, les polluants minéraux posent des risques de dégradation de la qualité des sols et aussi pour la ressource en eau superficielle et souterraine.

Face à cette situation alarmante à l'échelle mondiale, plusieurs travaux de recherche se font dans les différents laboratoires dans le but de développer des méthodes et des techniques de dépollution efficaces et moins coûteuses.

Certains micro-organismes sont capables de résister à ces agents antimicrobiens très toxiques et peuvent être utilisés dans le processus de bio-remédiation de l'environnement. Ils sont distingués surtout par leurs complexes enzymatiques particuliers ce qui leur confèrent la caractéristique de bio-dégrader les polluants de nature organique toxique en d'autres produits moins dangereux, ainsi que les systèmes de résistance qui leur permet de supporter les conditions hostiles de l'environnement.

Au cours de la réalisation de ce modeste travail, notre premier but était d'isoler et d'identifier des bactéries à Gram positif, aérobies strictes, immobiles, non sporulées, supposées appartenir aux genres *Rhodococcus* et *Micrococcus* connus par leur haute capacité de dégrader les hydrocarbures ainsi que leur forte résistance aux agents antimicrobiens. Cependant, la caractérisation d'une nouvelle espèce nous a obligé de réorienter notre travail de recherche et de concentrer notre étude à cette dernière.

Ainsi, nous avons isolé des bactéries à partir de différentes niches écologiques extrêmement polluées par les hydrocarbures et autres types de rejets. Après purification, nous avons procédé à leur caractérisation par l'étude des caractères morphologiques, physiologiques, physico-chimiques et biochimiques.

Pour la souche qui a fait l'objet principal de notre étude, en premier lieu nous avons effectué son identification par les outils de la biologie moléculaire (le séquençage de l'ARNr 16S, la détermination du contenu de son DNA chromosomique en (G+C) moles % et la détermination du profil des acides gras cellulaires). En second, nous avons fait une étude plus accentuée concernant sa morphologie, sa physiologie et son comportement vis-à-vis certains paramètres physico-chimiques indispensables pour la croissance tels que le pH, la température, la [Na Cl], sa résistance au lysozyme et éventuellement la détermination du milieu de culture le plus adéquat pour son développement ainsi que la recherche de pigments spécifiques.

Nous avons aussi étudié la capacité de ce nouveau taxon de tolérer et de résister à des concentrations croissantes de trois métaux lourds très toxiques (plomb, cadmium, zinc), puis évalué le taux d'accumulation de ces composés inorganiques par adsorption et/ou absorption en fonction du pH en milieu liquide stérile par le dosage à l'aide d'un spectrophotomètre à flamme et en même temps déterminé son taux de dépollution.

L'étude de la résistance vis-à-vis d'un grand nombre d'antibiotiques a été réalisée, suivie par des essais de transfert génétique par conjugaison. En vu de déterminer l'origine des supports génétiques de la résistance chez cette bactérie, nous avons étudié le profil plasmidique par extraction de l'ADN plasmidique.

**ETUDE**

**BIBLIOGRAPHIQUE**

## I/- Etude bibliographique

Chaque année des millions de tonnes de rejets industriels, nucléaires, urbains et hospitaliers sont déversés dans l'environnement, ce qui conduit à la libération de quantité considérable de composés organiques et inorganiques de nature chimiques très toxiques. Certains, sont volatiles (Hydrocarbures aromatiques) et contribuent à la pollution de l'air atmosphérique, d'autres sont très solubles dans l'eau et indestructibles tels que les métaux lourds.

Ces derniers, peuvent contaminer le sol et les eaux superficielles (mer, rivières, oueds, lacs ...), comme ils peuvent s'infiltrer dans le sol et contaminer les nappes phréatiques, ce qui pose un véritable problème pour la santé publique.

Les micro-organismes omniprésents dans les environnements extrêmement pollués peuvent jouer un rôle prépondérant dans la dégradation du premier type de polluants (Composés organiques toxiques) et la fixation et l'immobilisation des ions métalliques, et ainsi servir de barrière au passage de ces éléments aux êtres vivants. Ceci, peut être effectué par des réactions d'oxydo - réduction permettant de passer le polluant d'un état soluble, donc mobile et bio - disponible à un état solide moins ou non toxique.

Dans certains cas, la biomasse bactérienne a la capacité à la fois de catalyser les réactions d'oxydo - réduction et d'immobiliser le polluant après internalisation ou à sa surface. Ces phénomènes peuvent alors être mis à profit pour développer des procédés de bio-remédiation ou le polluant est concentré par la biomasse (Figure 1).

### 1/- Les métaux lourds

#### 1.1/- Définition

Les métaux lourds sont définis comme étant des éléments métalliques ayant une masse volumique supérieure à  $5 \text{ g/cm}^3$  (Nies, 1992). Parmi les 53 métaux concernés par cette définition, certains ne sont pas disponibles dans les écosystèmes habituels. Cette biodisponibilité dépend de la concentration du métal et de sa solubilité dans ces milieux. Pour pouvoir interagir avec les cellules vivantes, le métal doit donc être sous une forme soluble et présent à une concentration de l'ordre de nano molaire ou moins.

L'interaction des bactéries avec les métaux lourds se produit sur une gamme de concentrations en ions métalliques allant du nano molaire pour l'homéostasie (Métaux essentiels), au milli molaire pour la résistance (Toxicité pour les micro-organismes) et jusqu'au molaire pour certains micro-organismes chimio lithotrophes acidophiles (Monchy, 2007) (Figure 2).

Les métaux lourds sont classés en deux catégories :

La première englobe les métaux lourds dits de la série noire dont le mercure (Hg), le plomb (Pb) et le cadmium (Cd), caractérisés par leur forte toxicité même à très faibles concentrations.

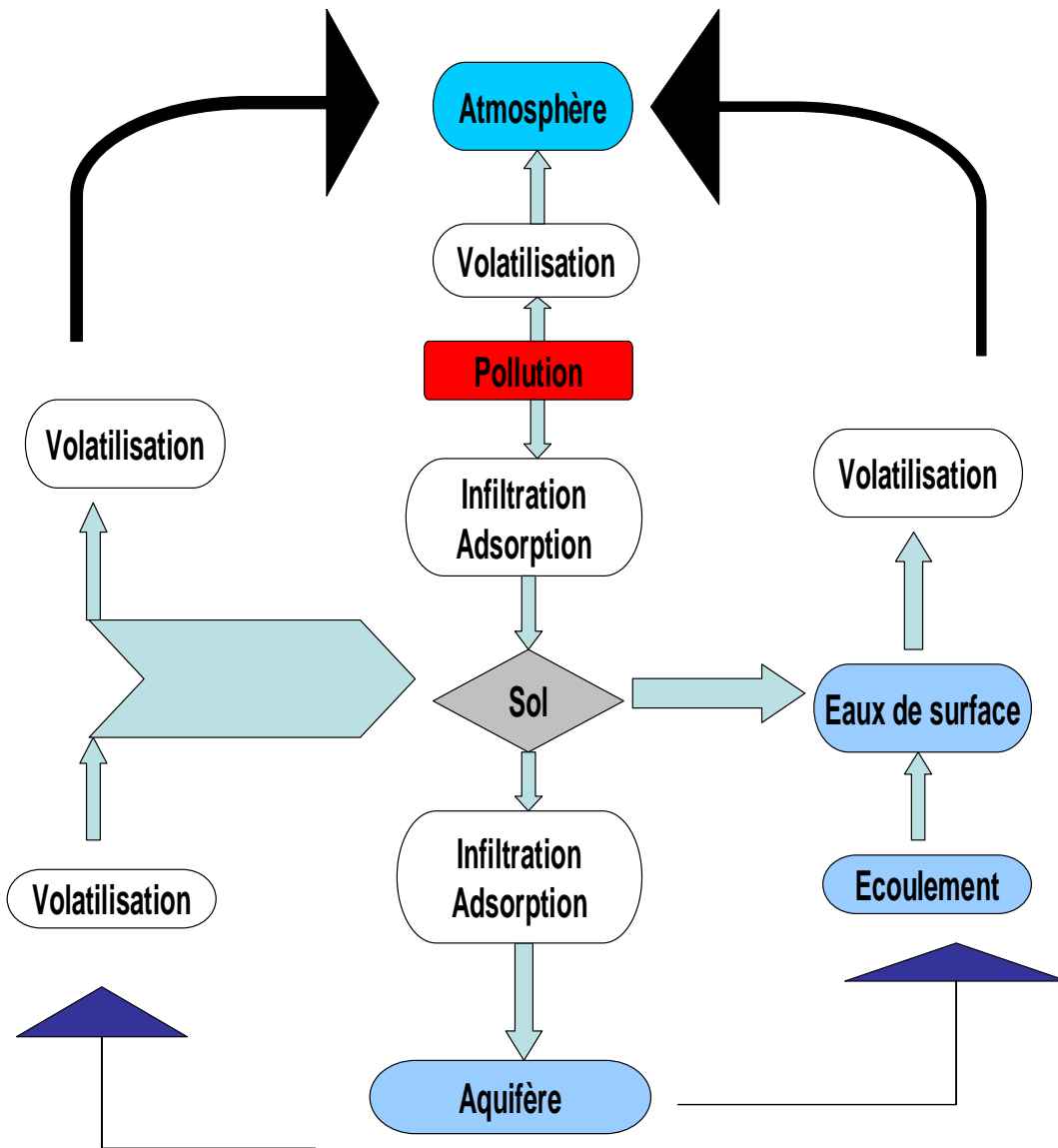


Figure 1: Comportement du polluant dans l'environnement. (Ballerini et al., 1998).

Cette appellation est due au fait que ces éléments minéraux sont indestructibles, et persistent dans l'environnement

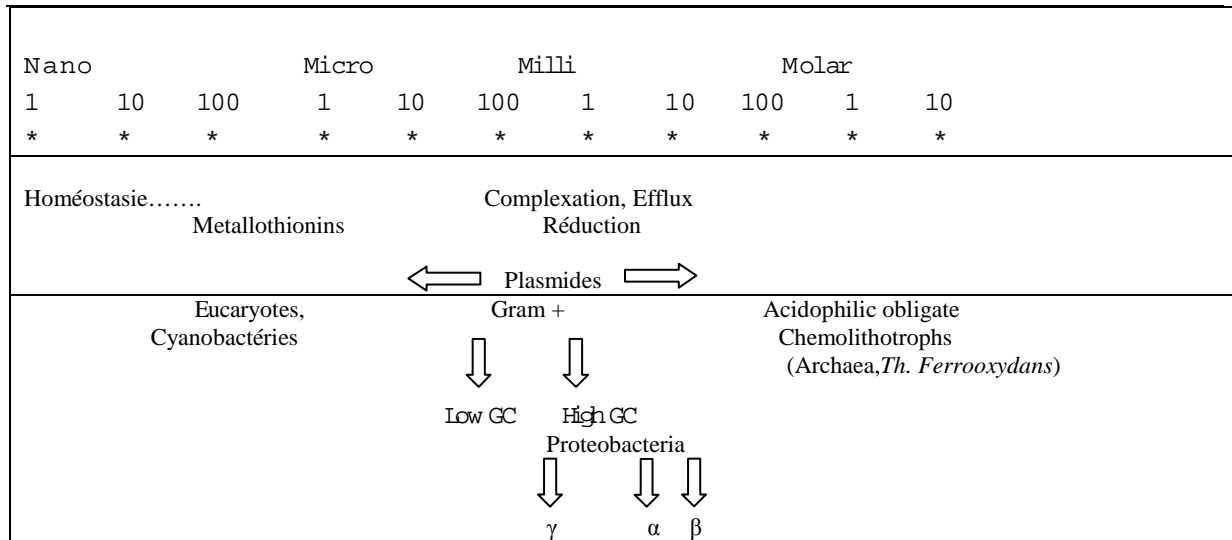


Figure 2: Gamme de concentration en métaux lourds et réponses biologiques Associées (Monchy, 2007).

La seconde, comprend les métaux lourds nécessaires pour le bon fonctionnement des différentes activités vitales pour la cellule, mais avec des doses bien déterminées. Ils sont appelés aussi des ions métalliques physiologiques, tels que le zinc (Zn), le cuivre (Cu), le fer (Fe), le cobalt (Co), le nickel (Ni) et autres (Levesque et al., 1993).

Ce sont des cofacteurs indispensables pour la stabilisation et la conformation de certaines protéines. Nous citons comme exemple le nickel qui est un cofacteur de l'uréase et des hydrogénases (Higuchi et al., 1997) et le cobalt qui est un cofacteur de certaines enzymes du métabolisme de la méthionine ou de la vitamine B12 (Wang et al., 2003).

La grande variété de métaux lourds et de leurs effets biologiques nécessite chez les bactéries une régulation 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 (en nanomolaire), ou l'entrée de métaux en quantité toxique (en micromolaire).

### 1.2/- Sources d'émission des métaux lourds

Il existe deux principales sources d'émission des métaux. L'une est naturelle, l'autre anthropogénique (Levesque et al., 1993).

#### 1.2.1 /- Source naturelle

En général, ils sont présents dans les roches en proportions variables (minerais) et les éruptions volcaniques. Il est à noter que la plupart sont hydrosolubles et peuvent diffuser dans le sol et contaminer les nappes phréatiques les plus profondes.

#### 1.2.2 /- Source anthropogénique

On entend par ce terme les émissions dues aux activités humaines (activités industrielles, nucléaires, agricoles et autres).

### 1.3/- Propriétés et caractéristiques de quelques métaux lourds et leurs effets sur la santé

#### 1.3.1/- Le cadmium :

C'est un métal blanc, mou et malléable. Il ternit au contact de l'air et résiste à la corrosion. Les propriétés physico-chimiques de ce métal sont très proches de celles du zinc. Il n'existe pas à l'état natif. Son minerai la green - Ochite (Cds) est très rare et inexploitée. Il est présent dans presque toutes les minerais de zinc avec un taux de 0.01 % à 0.05 % et aussi les minerais de plomb, de cuivre et de phosphate (Chiffolleau, 2001).

Il est très toxique sous toutes ses formes (métal, vapeur, sels, composés organiques), et il est absorbé d'abord par inhalation et moins par absorption gastro-intestinale. Il n'est pas absorbé par la peau.

L'homme est exposé aux risques de ce métal via la fumée et les poussières perdues de certaines industries comme la métallurgie, le recyclage des batteries, les activités nucléaires, les engrais phosphorés, les effluents et les boues d'épuration urbaines et/ou industrielles épandues sur les champs. Certains aliments peuvent aussi être considérés comme source de contamination de l'être humain tel que le foie, les reins, les champignons, le blé et des végétaux comme les épinards et autres.

Le cadmium est cancérigène, et affecte le système immunitaire, les poumons et l'appareil respiratoire en général (Elson & Haas, 1984).

#### 1.3.2/- Le plomb

Il est très malléable et résiste à la corrosion. Ceci, est due au fait qu'il se recouvre très rapidement sous l'attaque des agents d'un film protecteur, continu et insoluble formé d'un mélange de sulfures, sulfates, oxydes et carbonates de plomb, qui lui confère une teinte gris-bleuté caractéristique.

Il est très utilisé dans l'industrie, ce qui rend la possibilité de la pollution de l'environnement par le plomb extrêmement importante. Il est employé dans les carburants automobiles (Essence) comme antidétonant, en imprimerie et surtout en métallurgie. Il n'a aucun rôle physiologique connu chez l'homme, sa présence dans l'organisme témoigne donc toujours d'une contamination. Le Plomb pénètre dans l'organisme par voies cutanée, digestive et aérienne (inhalation des poussières atmosphériques contaminées). Cette dernière est la plus dangereuse car il atteint directement la circulation sanguine. La toxicité du Plomb dans l'organisme ne se manifeste qu'au-delà d'un certain seuil. Les cibles essentielles sont :

-Les enzymes : Le Plomb modifie les propriétés de nombreuses protéines cytosoliques et membranaires en se liant de façon réversible avec les groupements thiol. Il inhibe ainsi des enzymes et particulièrement celles de la voie de biosynthèse de l'hème comme l'acide aminolévulinique déshydratase (ALAD) et la ferrochélatase. L'inhibition de l'ALAD entraîne une augmentation de l'excrétion urinaire d'acide aminolévulinique (ALA), par contre celle de la ferrochélatase entraîne l'accumulation de protoporphyrine érythrocytaire libre. Il en résulte une carence en hème, carence qui affecte la synthèse de l'hémoglobine et aussi celle des processus cellulaires comme l'activité respiratoire mitochondriale ou le métabolisme oxydatif.

-Le calcium : Le Plomb libre ionisé perturbe l'homéostasie calcique. Il interagit avec le calcium à différents niveaux cellulaires et inhibe les systèmes de transport membranaires comme les pompes ioniques ( $\text{ATPase Na}^+ / \text{K}^+$ ) et certains canaux calciques. Il peut donc indirectement altérer les réactions intracellulaires dépendant des concentrations de calcium. Il peut aussi être responsable d'intoxications importantes à long terme.

Le saturnisme est l'une des intoxications aiguës ou chroniques, professionnelles ou domestiques par le Plomb, ses vapeurs ou ses sels qui pénètrent dans l'organisme par voie digestive ou respiratoire. La toxicité est essentiellement hématologique, neurologique et rénale.

On distingue le saturnisme aigu qui s'accompagne de violentes douleurs intestinales (coliques de Plomb) avec constipation et des troubles neuropsychiques et le saturnisme chronique caractérisé par :

-Le liseré saturnin ou liseré de Burton qui est un liseré gingival noirâtre s'accompagnant souvent de plaques pigmentées jugales ou plaques de Gubler qui témoignent de la formation d'un dépôt de sulfure de Plomb au contact du  $\text{SH}_2$ .

-Des lésions rétiniennes, des manifestations rénales observées surtout par une diminution de la filtration glomérulaire, goutte saturnine, néphropathies tubulo - interstitielles.

-Le syndrome urinaire comprend une protéinurie discrète, une hématurie et une leucocyturie microscopique, un abaissement des clairances de l'urée et de la créatinine.

En plus des symptômes précités, s'y ajoute des troubles de comportement, des pertes de mémoires, des encéphalopathies saturnines marquées par une amaurose, une surdité ou une aphasie de quelques jours et une hypertension artérielle. (Miquel, 2001).

### 1.3.3/- Le zinc

Il est présent de façon naturelle dans l'air, l'eau et le sol. Suite au processus d'érosion naturelle, le zinc est constamment en mouvement et transporté dans l'environnement. En raison de sa disponibilité pour les organismes vivants et de ses Caractéristiques, le zinc est utilisé par la cellule pour jouer un rôle spécifique dans diverses réactions biologiques. Il est par conséquent un élément essentiel pour toute forme de vie.

Chaque organisme vivant, possède une gamme de concentration (dans le domaine nanomolaire) relative à chacun des éléments essentiels et à l'intérieur de laquelle des exigences sont satisfaites. Il est utilisé pour le bon fonctionnement des enzymes, la stabilité de l'ADN et l'expression des gènes, ainsi que la transmission des signaux du système nerveux. Il intervient aussi dans le processus immunologique ( Hantke, 2005 ; Lazzerini, 2007).

### 1.4/- La résistance bactérienne aux métaux lourds

Les ions métalliques entrent dans la cellule selon deux voies principales:

La première, est empruntée par une large gamme de substrats. Elle est rapide, indépendante du métal, fait intervenir des protéines de type porines exprimées de manière constitutive et dépend uniquement d'un gradient chimio osmotique au travers de la membrane bactérienne. La seconde, demande une consommation d'énergie souvent sous la forme d'hydrolyse de l'ATP tel que le cas des transporteurs ABC, les protéines CDF (Cation diffusion facilitators) et les protéines chromates, les ATPases de type P et les facteurs de résistance - NreB et CnrT - like. Ces systèmes sont inductibles, synthétisés et mis en fonction en réponse à des besoins particuliers (Nies & Silver, 1995). Ils sont largement distribués chez les procaryotes et servent comme un moyen de défense vis-à-vis les ions métalliques. D'autres, sont plus spécialisés et présents uniquement chez quelques bactéries, ce qui leur confèrent une forte résistance aux métaux lourds (Nies, 2003) (Tableau I).

Une fois dans le cytoplasme, la toxicité des métaux lourds se manifeste comme suit :

- Inhibition des activités enzymatiques : les ions métalliques se fixent sur des résidus cystéine, 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. Quelques ions métalliques ont une structure proche du phosphate ou de l'ADP / ATP et dès lors peuvent inhiber des ATPases tel que le cas du vanadate (Nies, 1999). D'autres ions métalliques

**Tableau I :** Les principales familles de protéines de transport des métaux lourds (Nies, 2003).

Fa mille	Type de transport	Source d'énergie	Ions métalliques
ABC	Captage (uptake)	ATP	Mn <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> .
	Efflux	ATP	// // // //
P-type	Les deux	ATP	Mg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , K <sup>+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Ag <sup>+</sup> .
A-type	Efflux	ATP	Arsenite
RND	efflux	Gradient protonique	Co <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Ag <sup>+</sup> .
Hox N	Captage (uptake)	Chem i-osmotique	Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> .
CHR	antiport	// //	Chromate
MIT	Captage (uptake)	// //	La plupart des ions
CDF	efflux	// //	Zn <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> .

- peuvent occuper les sites de groupements phosphates et nitrates essentiels tels que le cas des oxy anions comme l'arsenate, le fluorate, le borate, le bromate, le sélénate, le tellurate et le tungstate (Pendias & Pendias, 1992).
- Altération de la structure des acides nucléiques: la fixation des ions métalliques sur les groupements phosphates des acides nucléiques peut entraîner des modifications de structure, empêchant ainsi la transcription ou la traduction des gènes (Hengstler et al. 2003).
- Interaction des ions métalliques avec des composés oxygénés issus des processus cellulaires respiratoires, ce qui entraîne la formation de radicaux libres, lesquels peuvent endommager l'ADN (création de mutations), les protéines (en créant des pontages entre molécules ou en leur sein), ou encore les acides gras insaturés de la membrane cellulaire.

Il est à préciser que la résistance aux métaux lourds dans des domaines de concentrations situés juste au dessus de la CMI est différente d'une résistance conduisant à l'adaptation à des milieux extrêmes. Cependant, les mécanismes de résistance aux ions métalliques comme la séquestration, la bio minéralisation, ou la conversion enzymatique diffèrent des véritables résistances liées à la présence de gènes portés par des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides ou les transposons. Ces derniers portent des déterminants de résistance qui assurent l'extrusion des métaux lourds (CDF, RND, ATPases de type P).

#### 1.4.1/- Séquestration, bio sorption, immobilisation et bio minéralisation

La séquestration du métal dans un compartiment de la cellule ou sur la face externe de la membrane cellulaire est un mécanisme efficace mis en place par les bactéries pour résister et échapper à l'effet toxique des ions métalliques. Elle permet l'immobilisation rapide des métaux lourds et par conséquent la survie de la bactérie. Elle peut agir en complément d'autres mécanismes de résistance (mécanismes d'efflux), empêchant ainsi la réentrée du métal expulsé, surtout dans les conditions extrêmes. Dans certains cas, les mécanismes de séquestration pourraient s'enclencher en présence de stimuli-toxiques et assurer seuls la résistance aux métaux lourds.

Chez les bactéries à Gram négatif, la séquestration dans un compartiment de la cellule ou la bio sorption à la surface de la membrane externe s'effectue souvent en combinaison avec d'autres systèmes et nécessite parfois des protéines à hautes affinités pour les ions métalliques comme la métallo- thionine Smt (Blindauer et al., 2002), les sidérophores dont certains ont une forte affinité vis-à-vis les métaux lourds, les agents compléxants tels que les acides organiques ou encore les poly phosphates.

La séquestration peut aussi se faire sous forme de cristaux (bio minéralisation) lié à une

alcalinisation du milieu résultant de l'activité cellulaire, et à la formation de carbonates à la surface cellulaire qui, lorsqu'il y a sursaturation, cristallisation avec les ions métalliques présents. Les cristaux formés peuvent s'adsorber de façon non spécifique sur la paroi extracellulaire (Diels et al., 1995 a ; Podda et al., 2000).

#### 1.4.2/- Réduction enzymatique

La réduction enzymatique consiste à la conversion d'un métal d'une forme toxique en une autre moins toxique ou une forme qui peut être plus facilement et plus rapidement évacué de la cellule. Le mécanisme de la conversion peut être une oxydation ou une réduction tel que le cas pour le mercure (Silver & Phung, 1996), ou encore après réaction avec un produit du métabolisme énergétique de la cellule comme la réduction du sélénium par les produits soufrés (thiosulfate ou les sulfites).

##### 1.4.2.1/- La résistance au mercure

Ce mode de résistance est très étudié chez les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif (Weiss et al., 1978 ; Clark et al., 1977). Les ions mercure sont tout d'abord captés par la protéine MerP puis transportés à l'intérieur de la cellule par la protéine MerT qui forme un canal dans la membrane interne. Dans le cytoplasme, le mercure ( $Hg^{2+}$ ) très toxique sera réduit en  $Hg^0$  non toxique qui se volatilise hors de la cellule (Misra, 1992 ; Summers et al., 1995). D'après Summers (1985), la résistance extra chromosomique aux composés mercuriels se fait selon deux mécanismes : la résistance à spectre étroit, et la résistance à spectre large.

##### 1.4.2.1.1/- La résistance à spectre étroit

Elle concerne le mercure inorganique  $Hg^{2+}$  et quelques organo mercuriels tels que le mercurochrome et l'acétate mercurique.

##### 1.4.2.1.2/- La résistance à spectre large

Elle concerne les composés précités et d'autres organo mercuriels plus complexes tels que l'éthyle mercure thiosalicylate.

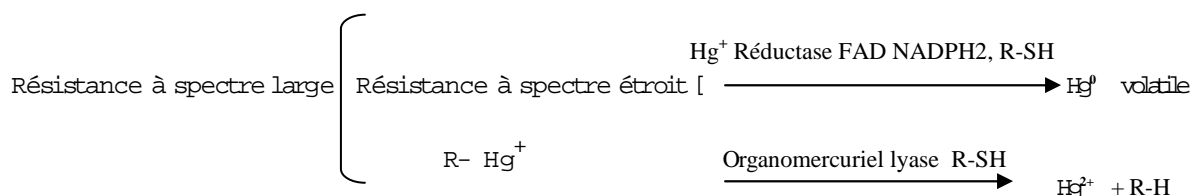
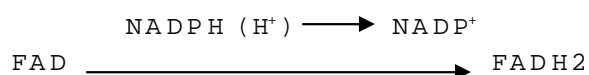


Figure 3 : Les deux modèles de résistance au mercure (Summers, 1985).

Selon le même auteur, le mécanisme à spectre étroit ( $\text{Hg}^{2+} \longrightarrow \text{Hg}^0$ ) est catalysé par une enzyme spécifique la mercure réductase flavoprotéine hydrosoluble intracellulaire, FAD dépendante active en présence de NADPH (cofacteur) et de groupements thiols. Les séquences réactionnelles de la résistance à spectre étroit ont été décrites ainsi :

- Réduction du FAD en FADH<sub>2</sub>



\* Le FADH<sub>2</sub> réduit la liaison disulfides entre deux cystéines adjacentes dans le site actif de l'enzyme.

\* Le  $\text{Hg}^{2+}$  est lié au groupement SH des deux cystéines et les ions  $\text{Hg}^{2+}$  sont réduits en  $\text{Hg}^0$ .

Dans le cas de la résistance à spectre large, en plus de la  $\text{Hg}^{2+}$  réductase s'ajoute une autre enzyme inductible l'organo mercuriel b-lyase.

#### 1.4.3/- Les transporteurs membranaires

Le plus souvent la résistance bactérienne aux ions métalliques fait intervenir un système d'efflux ou d'extrusion. Le transport actif à travers l'enveloppe cellulaire est assuré soit à l'aide d'un gradient électrochimique (protéines RND, MFS, CDF), soit par des transporteurs énergie dépendants (transporteurs ABC, ATPases).

##### 1.4.3.1/- Les protéines de transport RND ((Resistance-Nodulation-Cell Division)

###### 1.4.3.1.1/- Définition et mode d'action

Cette superfamille de protéines est la première être décrite comme un groupe de protéines impliquées dans le transport des ions métalliques chez les bactéries (*Ralstonia metallidurans*), la nodulation (*Mesorhizobium meliloti*) et la division cellulaire (*Escherichia coli*). (Saier et al., 1994).

Ces protéines sont très nombreuses et assurent le transport d'un grand nombre de composés organiques et inorganiques (Tseng et al., 1999). Elles interagissent dans la plupart des cas avec les protéines de fusion membranaires (MFP) et les facteurs membranaires externes (OMF), pour former des pores et des canaux trans-enveloppe, permettant la sortie d'un flux du cytoplasme vers le périplasma, la membrane externe puis directement vers l'extérieur. (Paulsen et al., 1997 ; Johnson & Church, 1999) (Figure 4 et 5).

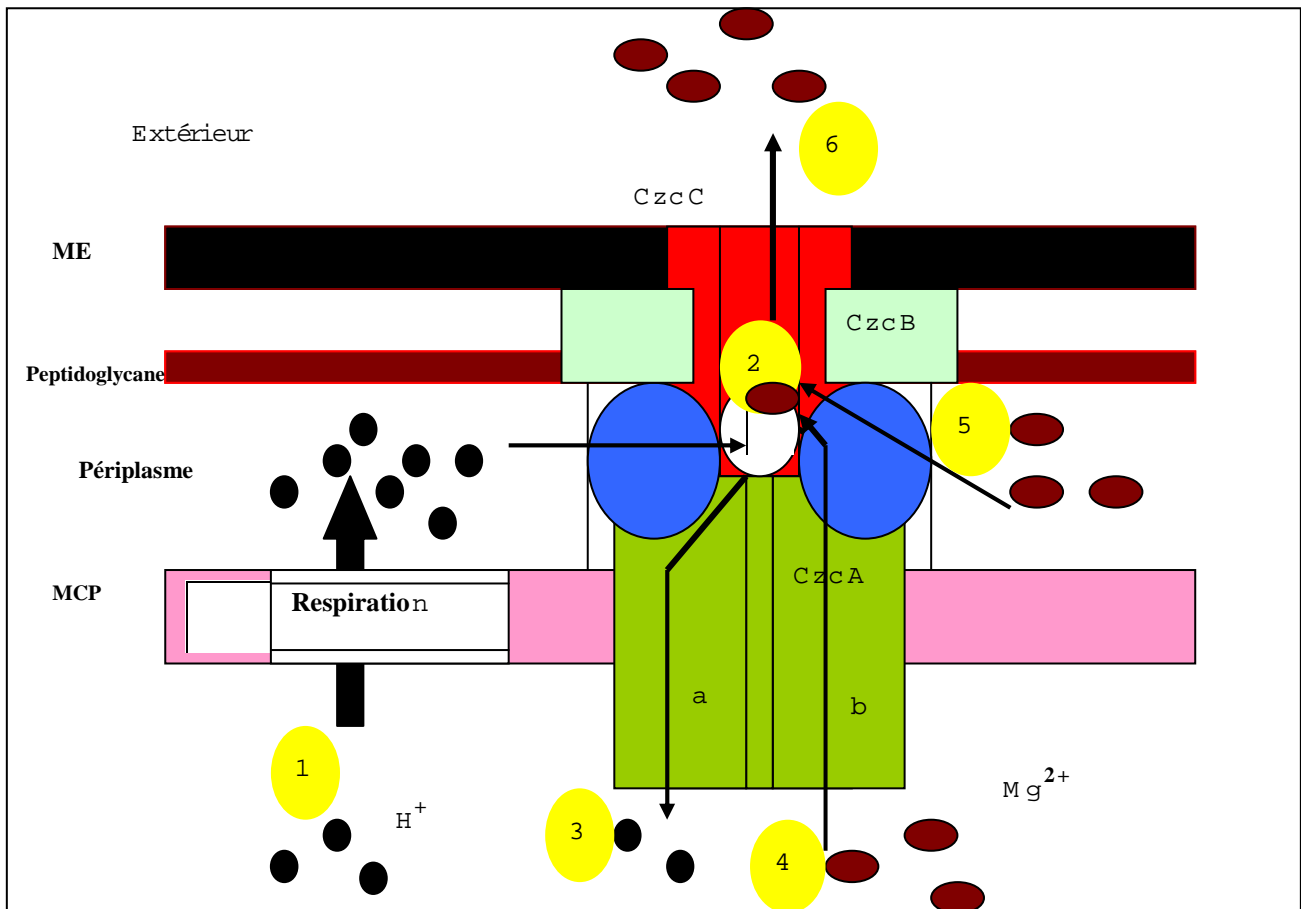


Figure 4 : Modèle montrant la topologie et le mode de fonction du système Czc CBA Chez les bactéries à Gram négatif (Nies, 2003).

MCP : Membrane Cytoplasmique, ME : membrane externe

La protéine CzcA est composée de : canal à protons (a), canal à cations (b). Le gradient de protons entre le cytoplasme et le périplasma est en partie dû aux transporteurs de la chaîne respiratoire (1). L'affinité des protons pour le site (2) situé dans une des boucles de CzcA induit une translocation des protons dans le cytoplasme créant ainsi un déficit de charge à ce niveau. (4) Ce déficit de charge crée une attraction électrostatique des cations métalliques qui peuvent alors diffuser dans CzcC et sortir de la cellule (6). (5). Actuellement on pense que les cations métalliques situés dans le périplasma peuvent également accéder au site (2).

Le premier membre identifié des protéines RND est CzcA, suivi par CnrA chez *Alcaligenes eutrophus* (Saier et al., 1994). La pompe efflux Czc CBA détoxifie le cobalt, le zinc et le cadmium (Rensing et al., 1999). C'est un système inductible, codé par un méga plasmide, pMOL30 (Nies, 1992 ; GroBe et al., 1999) (Figure 6).

Au sein des systèmes RND on trouve les protéines HAE - RND (Hydrophobic and Amphiphilic compounds Export) et HME-RND (Heavy Metal Efflux) (Nies, 2003) (Tableau II).

Chez *Pseudomonas aeruginosa*, il existe 13 protéines de transport RND, dont une est HME-RND, qui exportent les métaux lourds (Hassan et al., 1999). *Escherichia coli*, contient environ 6 protéines HAE-RND, dont certaines détoxifient beaucoup de composés toxiques surtout en cas d'une croissance lente (Rand et al., 2002).

Les bactéries à Gram positif contiennent peu de protéines RND. Ceci, est en relation avec la principale fonction de ces dernières, des pompes efflux trans-enveloppe. Autrement dit, le complexe efflux CBA ne pourra pas fonctionner au niveau de la paroi des bactéries Gram+. Cependant, la protéine CzcA seule intervient dans quelques résistances (Rensing et al., 1997). Ainsi, chez les bactéries à Gram positif, les protéines RND fonctionnent en tant que système efflux avec une seule sous unité.

La plupart des protéines RND chez les Proteobacteria appartiennent à la famille HAE, et dans la plupart des cas ces protéines HAE-RND sont de la grappe HAE1, fortement liées à CzcA qui confère aux bactéries la résistance aux  $Zn^{2+}/Co^{2+}/Cd^{2+}$  (Nies et al., 1989 ; Hassan et al., 1999).

Toutes les protéines RND des bactéries à Gram positif sont regroupées dans la grappe (Cluster) HAE2, identique avec la famille des protéines HAE2' présente chez les bactéries à Gram positif et *Borrelia burgdorferi*. Ceci indique, que le mécanisme d'action des protéines RND chez les bactéries à Gram positif est différent de celui des bactéries à Gram négatif (Tseng et al., 1999).

Les bactéries qui possèdent la protéine Cnr liée à la grappe HME2 sont résistantes aux  $Ni^{2+}/Co^{2+}/Cd^{2+}$  (Schmidt & Schlegel, 1994). La grappe HME3 contient toutes les protéines non associées avec HME1, HME2 ou HME4. Le groupe de protéines HME3 est divisé en deux sous groupes : HME3 a et HME3 b. Le premier transporte les ions métalliques divalents et le deuxième les ions métalliques monovalents (Schmidt & Schlegel, 1994 ; Nies, 2003).

#### 1.4.3.1.2/- Distribution des protéines RND chez les procaryotes

Une étude comparative entre 64 génomes issus de différentes espèces bactériennes et d'archaebactéries et celui de la bactérie *Ralstonia metallidurans* souche CH 34, a aidé les

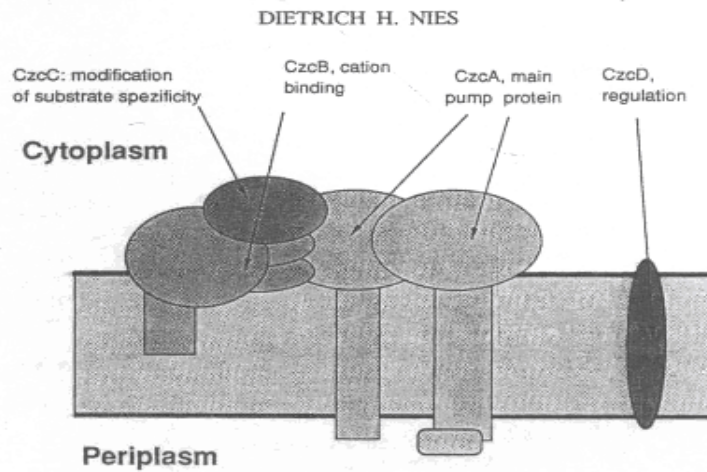


FIG. 3. Model of action of the *czc* cation resistance determinant. The hypothetical functions the gene products of the *czcCBAD* determinant are illustrated. For details, see text.

Figure 5: Mode d'action du déterminant *czc* de la résistance aux ions métalliques (Nies, 1992)

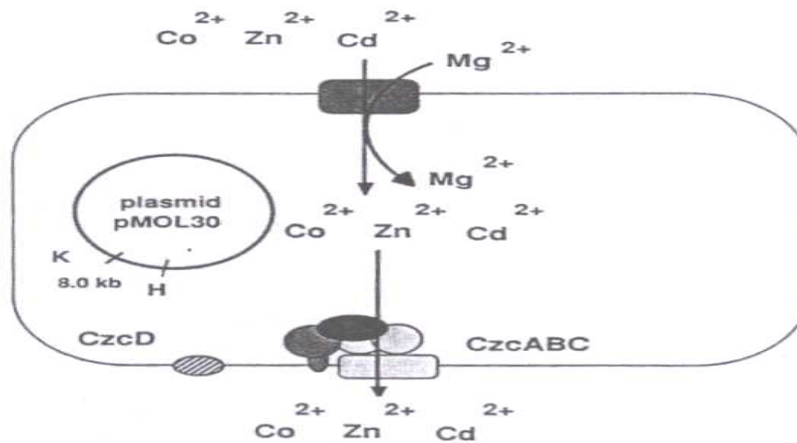


Figure 6 : Représentation schématique du plasmide p M O L 3 0 qui code pour la résistance aux  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  et  $Cd^{2+}$  chez *Alcaligenes eutrophus* (Nies, 1992).

- Le déterminant génétique (*czc*) est localisé Sur le fragment KpnI-Ba m HI de 8.0-kb),
  - La protéine CzcD est impliquée dans la régulation de *czc*.
- K= site KpnI ; H= site Hind III.

Tableau II : Répartition et classification des protéines RND transporteurs des ions métalliques (Nies, 2003).

No m des protéines	Séquences protéïniques	Substrats	exemples
Protéïnes HME :			
-HME1- (M1)	DFG-DGA-Ven	Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup>	CzcA, CztA, HelA
-HME2- (M2)	DFG-DGA-Ven	Ni <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>	CnrA, NccA
-HME3a- (M3a)	GFD-D(G,S,A)(S,A)-(V,M)EN	Ions divalents	RSA 1040
-HME3b- (M3b)	(A,g)(L,L)G-D(G-A,s)-VEN	Ions monovalents	HPO 969
-HME4- (M4)	A(I,V)G-DA(A,s)-V,I(E,d)N	Cu <sup>+</sup> , Ag <sup>+</sup>	SilA, CusA
-HME5- (M5)	AIG-DDX-(M,V)EN	Ni <sup>2+</sup>	AII 7631
Protéïnes HAE:			
-HAE1- (A1)	X(V,L)G-D(N,G)A-X(D,E)N	Inconnu	AlrI 1656
-HAE2- (A2)	XXG-D(D,X)(S,a)-X(D,E)(N,S)	Inconnu	YerP
-HAE3- (A3)	XXG-DDA-XEN	Inconnu	NolG
-HAE4- (A4)	XXG-D(D,S,N)(S,A)-XE(N,1)	Inconnu	A15294
-HAE5- (A5)	AIG-DDA-XEN	Composés organiques	AcrB

G, D, E, N: Ce sont des résidus d'acides aminés de la protéïne CzcA correspondant à G404, D408, E415 et N416.

La ( ) indique alternation des acides aminés pour la même position

X : Indique n'importe quel acide aminé

Origine des protéïnes représentatives : CzcA, CnrA (*Ralstonia metallidurans* souche CH 34 et 31A), RSA 1040 (*Ralstonia solanacearum*), CztA (*P. fluorescens*), HelA (*Legionella pneumophila*), HPO960 (*H. pylori*), SilA (*S. enterica* pv typhimurium), CusA, AcaB (*E. coli*), AII7631, AlrS 294 (*Nostoc sp.*), YerP (*B. subtilis* et NolG (*S. meliloti*).

Chercheurs à sélectionner toutes les séquences protéiques présentant une homologie avec la protéine CzcA et de procéder à leur classification (Nies, 2003) (Tableau II).

#### 1.4.3.1.3/- Structure des composantes de la pompe efflux CzcCBA- (CzcA, CzcB, CzcC)

-La protéine CzcA : Elle est l'archétype des protéines RND, composée de 1064 acides aminés et se localise dans la membrane cytoplasmique. Elle est constituée de deux canons (Un à proton et l'autre à cations). Certains auteurs, suggèrent qu'elle possède 12 hélices trans membranaires (HTM I à HTM XII) (Dong & Mergeay, 1994 ; Saier et al., 1994), et deux grandes boucles périplasmiques situées entre les hélices HTM-I et HTM-II et les hélices HTM-VII et HTM-VIII. Elle est pauvre en cystéine et en histidine. L'ultra structure de cette protéine montre qu'elle est constituée de 4 domaines dont deux sont hydrophobes et deux autres hydrophiles.

- La protéine CzcB : Elle est composée de 521 acides aminés, et contient environ 8 résidus d'histidine. C'est une protéine périplasmique dont une partie est dans le cytoplasme et l'autre extra-membranaire. Elle possède au niveau de son extrémité N-terminale un petit segment hydrophobe qui pourrait permettre son ancrage à la membrane externe. Elle est sous forme de dimère.

-La protéine CzcC : Elle est composée de 346 acides aminés, ne contient pas de résidus d'histidine et son fonctionnement dépend de la protéine CzcB. Elle est probablement en contact avec une protéine intégrante dans la membrane externe. Son extrémité C-terminale est dans le périplasme, mais elle est localisée dans la membrane externe.

L'organisation génétique de ces trois protéines chez les espèces *Helicobacter pylori* souche 1328, 1329, 0971, 0970, 0969 et *Ralstonia metallidurans* souche CH 34 est représentée sur la figure 7.

#### 1.4.3.2/- Les protéines de transport CDF (Cation Diffusion Facilitators)

##### 1.4.3.2.1/- Définition et mode d'action

Ce sont des protéines impliquées dans le transport des ions métalliques de manière passive, par simple diffusion (Saier, 2000). Le premier substrat des protéines CDF est le zinc avec d'autres tels que le cobalt, le nickel, le cadmium et le fer.

Le transport est assuré par un Gradient chimio osmotique (gradient de potentiel ou de pH) ou un gradient de potassium (Wong et al., 2000 ; Bloss et al., 2002 ; Lee et al., 2002).

Le premier membre des protéines CDF, a été décrit chez l'espèce *Alcaligenes eutrophus*

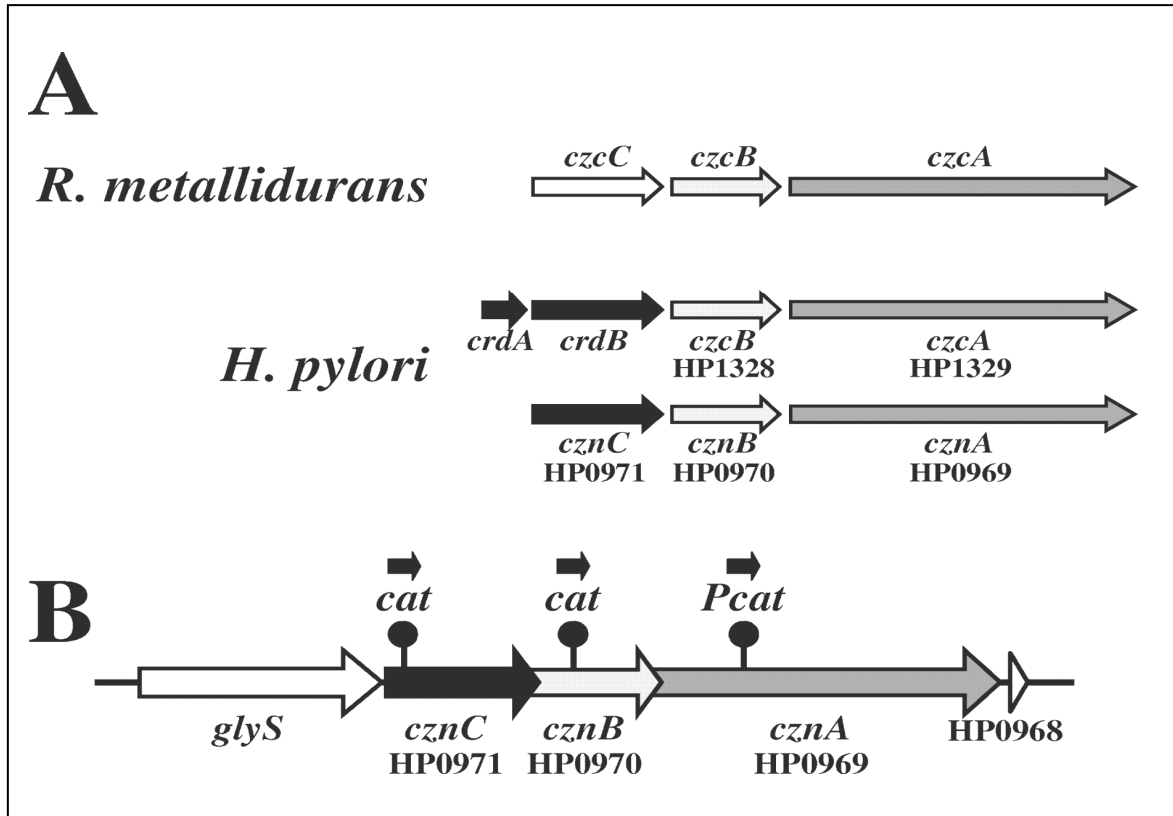


Figure 7: Organisation génétique du système efflux *czcCBA* des espèces *Helicobacter pylori* et de *Ralstonia metallidurans* (Stahler et al., 2006).

Souche H34, CzcD. Cette protéine régule l'expression du système CzcCBA, responsable d'une haute résistance aux ions métalliques  $Zn^{2+}/Co^{2+}/Cd^{2+}$  chez les bactéries (Nies, 1992). En absence du système à haute résistance CzcCBA, la protéine CzcD peut intervenir dans la résistance vis-à-vis de  $Zn^{2+}/Co^{2+}/Cd^{2+}$ . Elle diminue la concentration cytoplasmique des ions métalliques précités (Anton et al., 1999) (Figure 6).

Deux autres familles de transporteurs chimio osmotiques plus spécifiques existent. Un transporteur est impliqué dans l'extrusion du Chromate (ChrA) (Juhnke et al., 2002 ; Silver & Phung, 2005), l'autre dans l'extrusion de l'Arsenic  $As^{3+}$  (ArsB) et de l'antimonite  $Sb^{3+}$  (Silver & Phung, 2005). Ces systèmes sont uniques dans le sens et peuvent fonctionner aussi bien seuls comme un système d'extrusion chimio osmotique ou en combinaison avec une autre sous unité nécessitant de l'énergie sous la forme d'ATP tel que le cas de ArsA.

Chez *Bacillus subtilis*, la protéine CzcD agit comme un antiport  $Zn^{2+}/K^+$  ou  $Zn^{2+}/H^+$  (Guffani et al., 2002). L'échange serait électriquement neutre ( $Zn^{2+}/2K^+$ ,  $Zn^{2+}/2H^+$  ou  $Zn^{2+}/K^+ + H^+$ ) et l'énergie nécessaire provient des gradients transmembranaires orientés de façon opposée. Le gène *czcD* est situé au niveau du même opéron avec le gène *trkA* déhydrogénase TrkA (Wang et al., 2000).

Chez *Staphylococcus aureus*, la protéine CzcD est impliquée dans la résistance aux  $Zn^{2+}/Co^{2+}$ . Par contre chez *Thermus thermophilus*, elle est responsable de la résistance aux  $Zn^{2+}/Cd^{2+}$ , mais pas pour le  $Co^{2+}$  (Spada et al., 2002).

Trois protéines CDF ont été aussi déterminées chez *Escherichia coli* dont deux sont caractérisées comme ZitB et ZupT, responsables de la résistance au zinc (Grass et al., 2005). La troisième protéine impliquée dans la résistance aux ions métalliques est la YiiP. (Grass et al., 2001). Une autre protéine CDF a été déterminée chez les bactéries magnétotactiques, la MamB, localisée dans la membrane magnétosome (Grunberg et al., 2001).

#### 1.4.3.2.2/- Répartition et classification des protéines CDF chez les procaryotes

Les protéines CDF spécialisées dans le transport des ions métalliques identifiées chez les procaryotes ont été classées dans trois groupes différents (Tableau III).

#### 1.4.3.2.3/- Description de quelques protéines CDF

- La protéine CzcD : Elle a été identifiée pour la première fois chez les bactéries à Gram négatif (*R. metallidurans* souche CH 34) (Goris et al., 2001). Elle fait partie du système Czc impliqué dans la résistance au  $Zn^{2+}, Co^{2+}, Cd^{2+}$ . C'est une protéine à 6 domaines transmembranaires avec plusieurs résidus d'histidine. Un domaine hydrophobe est constituée d'environ 200 résidus d'acides aminés avec probablement 6 • hélices transmembranaires et un autre domaine hydrophile composé de 115 résidus d'acide aminé localisé dans le cytoplasme (Anton et al., 2004). Elle contient environ 8 résidus de cystéine localisés dans (H5,

Tableau III : Les différents groupes de protéines CDF chez les micro-organismes (Nies, 2003).

Les différents sous groupes de protéines CDF	Substrats	Exemples et origines des protéines
Protéines CDF du groupe 1 : - (Proteobacteria • , • , • )	Zn <sup>2+</sup>	PA 1297- ( P. aeruginosa ).
Protéines CDF du groupe 2 : - 2b (Bactéries à Gram positif) - 2c (Bactéries) - 2e (Proteobacteria et cyanobactéries) - 2f (Bactéries à Gram positif) - 2g (Bactéries)  - 2h (Bactéries)	Zn <sup>2+</sup> Zn <sup>2+</sup> Zn <sup>2+</sup> Zn <sup>2+</sup> Zn <sup>2+</sup>  Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup>	Spr 1672- (S. pneumoniae ). PH 0896 AII 7610- (Nostoc). SA 0155 -(S. aureus). ZitB, CzcD, Bacsu- (E.coli, R. metalliduran et B. subtilis). CzcD, Ralme- (R. metalliduran et B. subtilis).
Protéines CDF du groupe 3 : - 3a (Bactéries) - 3b (Proteobacteria • , • ) - 3c (Bactéries) - 3d [Bactéries à Gram + , à faible (G+C)] - 3e [Bactéries à Gram + , à faible (G+C) et les Thermotaga] - 3f (Procaryotes)	Inconnu // // // // // // // //  Fe <sup>2+</sup>	.Aq_2073- (Alcaligenes aeolicus). YiiP- (E.coli). DR 1236-(Deinococcus radiodurans) . EF0859-(Enterococcus faecalis ). YeaB, YbdO- (B. subtilis).  MamB- (Magnetococcus gryphiswaldensis) .

H7, H9) de l'extrémité N du domaine hydrophobe ou dans (H234, H237, H251, H280, H298) de l'extrémité carboxyle du domaine hydrophile.

- La protéine ZitB : Elle est très proche de la protéine CzcD. Elle a été identifiée pour la première fois chez *E. coli* et contient au niveau de l'extrémité N de son domaine transmembranaire (TMs) les résidus d'acides aminés H53, H159, D163, D186. Cette protéine est conduite par la motivation de la force des protons (PMF). Elle assure l'homéostasie du Zinc (Anton et al., 2004).

En général, le transport des protons (Import) et des ions métalliques (Export) est réalisé par les résidus d'acides aminés chargés et polarisés au niveau de l'extrémité amino- acyl des deux protéines précitées et autres protéines CDF du groupe 2 (Nies, 2003). Il est à souligner que les résidus d'histidine sont très importants et essentiels pour le bon fonctionnement des protéines CzcD et ZitB (Lee et al., 2002).

#### 1.4.3.3/- Les protéines de transport P-type ATPases

##### 1.4.3.3.1/- Définition et mode d'action des protéines P-type ATPases

Elles constituent une superfamille de protéines conduites par l'hydrolyse de l'ATP (Fagan & Saier, 1994). Elles doivent leur étiquette (P) au motif DKTG impliqué dans la phosphorylation de l'Aspartate. Ces protéines se trouvent chez tous les organismes vivants et transportent les composés inorganiques surtout les ions tels que  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^+$ ,  $Ag^+$ ,  $Zn^{2+}$  et  $Cd^{2+}$ . Une protéine P-type ATPase peut effectuer le transport des ions dans les deux sens et joue un rôle important dans l'homéostasie ionique intra cellulaire par le processus de détoxification. Les protéines P-type ATPases métallo - transporteurs, portent un résidu proline et/ou suivi par un autre de cystéine et ont une spécificité pour les ions métalliques  $Cu^+$  /  $Ag^+$  / ou  $Zn^{2+}$  /  $Cd^{2+}$  /  $Pb^{2+}$  (Fan & Rosen, 2002 ; Tong et al., 2002).

Les protéines de la sous famille Zn - CPx-type ATPases transportent le  $Zn^{2+}$  /  $Cd^{2+}$  /  $Pb^{2+}$  /  $Co^{2+}$ , du cytoplasme vers le périplasme, puis à l'extérieur de la cellule grâce à un gradient d'ions au travers de la membrane interne (Degen & Eitinger, 2002). Il a été démontré que la protéine PbrA se trouve sur le plasmide qui confère à *Ralstonia metallidurans* la résistance au plomb (Borremans et al., 2001). Les protéines ZntA d'*Escherichia coli* et CadA de *Staphylococcus aureus* sont impliquées dans la résistance aux  $Zn^{2+}$  /  $Cd^{2+}$  (Legatzki et al., 2003). Le premier membre décrit de cette famille est CadA, responsable de la résistance au cadmium chez *S. aureus* (Udo et al., 2000) (Figure 8).

Ces protéines exposent deux faces, et leur principal rôle est d'exporter les groupements thiols liés aux ions métalliques du cytoplasme vers le périplasme et/ou vers l'extérieur. (Sharma et al., 2000 ; Nies, 2003).

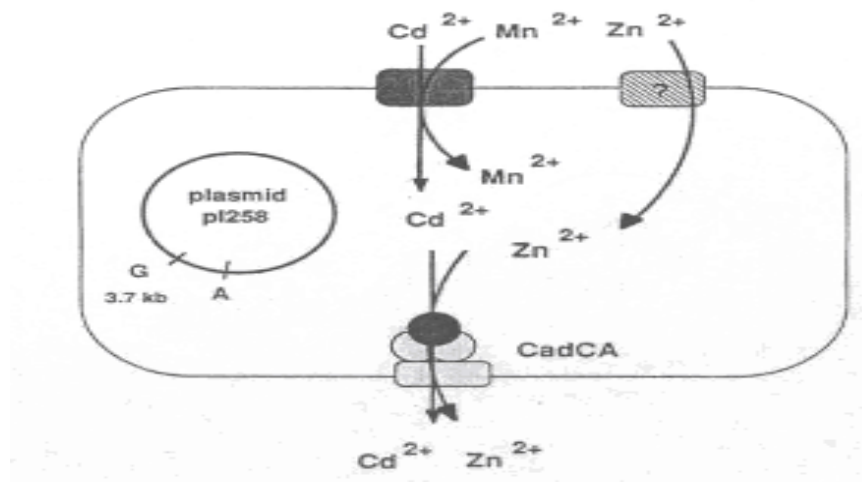


Figure 8 : Représentation schématique du plasmide pI 258 qui code pour la résistance aux ions métalliques Cd<sup>2+</sup> et Zn<sup>2+</sup> chez *Staphylococcus aureus* (Nies, 1993 ).

- cadA est le déterminant génétique porté par le plasmide pI 258, localisé sur le fragment Bg/II-XbaI de 3.5- Kb.
- CadCA est un complexe protéinique inductible dont le rôle est de transporter les ions métalliques Cd<sup>2+</sup> et Zn<sup>2+</sup> à l'extérieur de la cellule.
- G = site de Bg/II et A = site de XbaI

#### 1.4.3.3.2 /- Classification des protéines P-type A TPases

Ces protéines sont classées en deux sous familles; les ATPases P1-A et les P1-B. Les membres de la première sous famille (P1-A) sont généralement impliquées dans le transport du potassium ( $K^+$ ) surtout, mais certaines peuvent transporter les ions métalliques (oxyanions principalement) tels que le cas de ArsA et ArsB d'Escherichia coli (Saier, 1994). Ces ATPases sont rares, et se distinguent par la présence d'un motif distinct pour le site de fixation du nucléotide par rapport aux autres membres de cette superfamille (Chen et al., 1996).

Les ATPases de type P1-B contrôlent la concentration cytoplasmique d'une grande variété de métaux lourds et elles se divisent en deux principalux groupes. Le premier regroupe les protéines de type CadA de S aureus (Nucifora et al., 1989) impliquées dans l'extrusion du cadmium et du zinc (Silver & Phung, 1996), tandis que le second comporte les transporteurs du cuivre et de l'argent. La protéine ZntA d'E coli est impliquée dans l'efflux des ions  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ , et  $Cd^{2+}$ , (Rensing et al., 1998).

Les ATPases de type P1 sont distinguées par quatre particularités (Palmgren, 1998 ; Rensing et al., 1999) (Figure 9) :

- Au moins un site de fixation au métal du côté N - terminal, qui peut être un domaine à Cystéine de type « CXXC » et/ou un domaine riche en histidine.

- Une séquence conservée « CPX », (X pouvant être un résidu histidine, sérine ou Cystéine) qui joue un rôle au niveau du canal permettant le passage de l'ion.

- Une séquence dipeptidique conservée « HP » dans le second domaine cytoplasmique dont le rôle n'est pas encore définit.

- Une topologie membranaire unique (Solioz & Vulpe, 1996) :

- a/- du côté N - terminal, il y'a quatre hélices membranaires qui précèdent la première boucle cytoplasmique au lieu de deux chez les autres ATPases.

- b/- du côté C - terminal, après la seconde boucle cytoplasmique, il y'a que deux hélices trans - membranaires au lieu de quatre chez les autres.

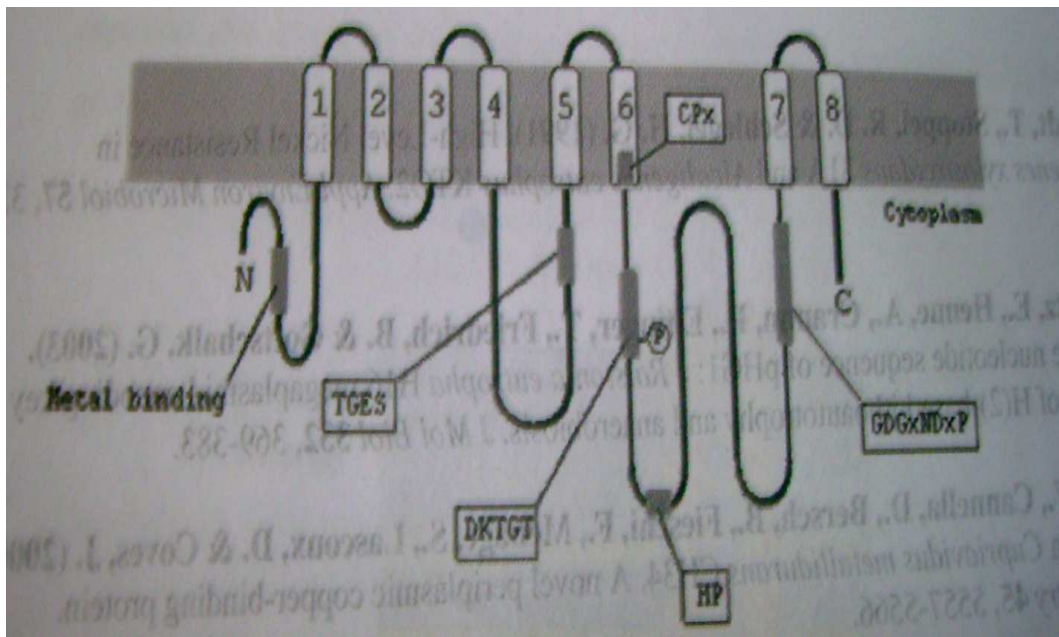


Figure 9 : Structure schématique des protéines ATPase P1 avec 8 hélices trans membranaires ( Monchy , 2007).

- Sites communs à toutes les ATPases type P1 sont : site phosphatase (TGES), site de phosphorylation (DKTGT), site de fixation de l'ATP (GDGxNDxP).
- Sites spécifiques intervenant dans le transport des métaux lourds sont : sites CPX, HP et les sites de fixation au métal (poly-His, CXXC).

## 2/- Les antibiotiques

### 2.1/- Définition d'un antibiotique

Le terme antibiotique a été proposé pour la première fois par Selmane Waksman en 1942, et désigne toute substance chimique ou biologique ayant la capacité d'inhiber la croissance ou de détruire les micro-organismes.

Actuellement, un antibiotique est défini comme étant une substance d'origine biologique (Produite par des bactéries ou des mycètes), synthétique ou semi synthétique agissant spécifiquement sur une étape essentielle du métabolisme des micro-organismes (Berche et al., 1991).

### 2.2/- Mode d'action des antibiotiques

Selon le spectre d'activité des antibiotiques, certains sont bactéricides du fait qu'ils inhibent la biosynthèse de molécules vitales pour la cellule, et d'autres sont bactériostatiques. Cette activité anti-microbienne peut être large ou étroite. Cependant, deux grands lieux d'action ; la paroi et le cytoplasme avec cinq différents mécanismes sont distingués : action sur la synthèse du peptidoglycane, action sur la membrane cytoplasmique, action sur la réplication de l'ADN, action sur la synthèse des protéines et action par inhibition compétitive (Lavigne, 2007). Figure 10).

#### 2.2.1/- Les antibiotiques inhibiteurs de la biosynthèse du Peptidoglycane

Le Peptidoglycane est un polymère majeur spécifique de la paroi des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Il est composé de chaînes linéaires de N- acétyl D glucosamine et d'acide N- acétyl muramique dont le nombre de molécules va de 20 à 100. Ces chaînes polysidiques sont reliées entre elles par de courtes chaînes de tétra- peptides (L - Ala - D - Glu - L - Lys - D - Ala) à l'aide des ponts peptidiques (Vandenesch & Etienne, 1997 ; Cavallo et al., 2004) (Figure 11). La biosynthèse du Peptidoglycane est effectuée en 3 principales étapes :

##### -La première étape

Elle est effectuée dans le cytoplasme et correspond à la formation du précurseur du Peptidoglycane (UDP - N A M P).

##### -La deuxième étape

C'est une étape membranaire. Elle correspond au transport de l'UDP - N A M P au travers de la membrane cytoplasmique et en même temps addition d'un autre sucre le N - acétyl glucosamine et d'une autre chaîne peptidique secondaire dont la séquence varie en fonction des espèces bactériennes. Cependant, on aura un disaccharide pentapeptide (N - acétyl

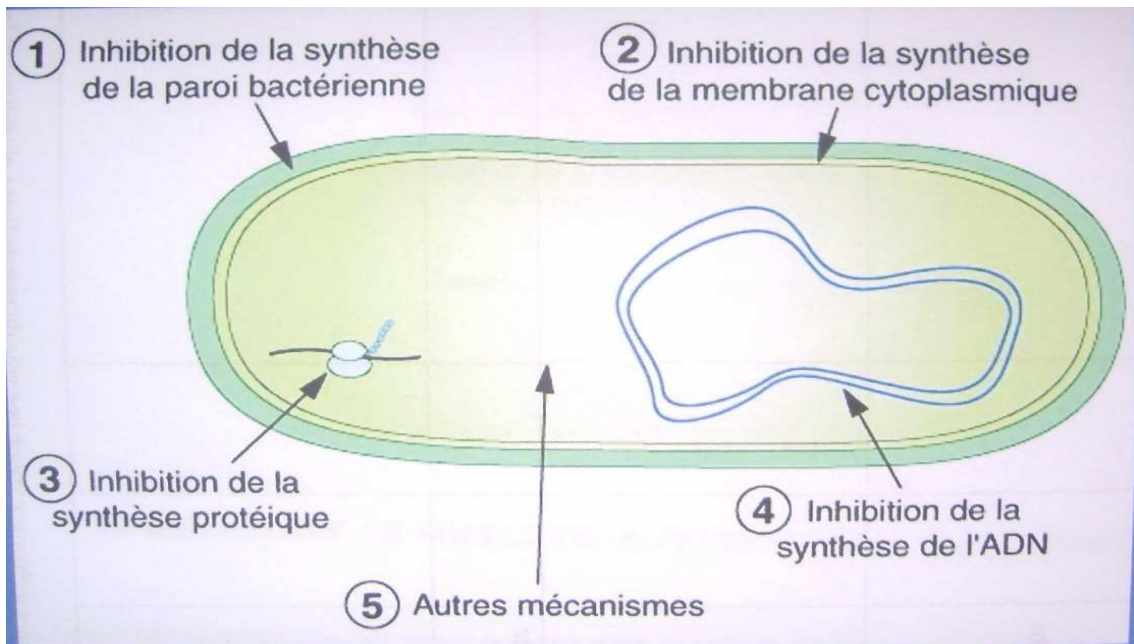


Figure10: Représentation schématique des sites d'action des antibiotiques (Fournier & Roy, 1997).

glucosamine/N - acétyl muramique pentapeptide). Ces éléments constituent les unités de base du Peptidoglycane.

-La troisième étape

Elle consiste à la polymérisation des disaccharides penta peptides au niveau de la face externe de la membrane cytoplasmique selon deux réactions différentes:

-La première réaction est réalisée en présence des trans- glycosidases dont le rôle principal est de lier les unités élémentaires du Peptidoglycane entre elles pour donner naissance à de longues chaînes poly saccharidiques linéaires.

-La deuxième réaction consiste à l'incorporation des chaînes poly saccharidiques néo synthétisées au Peptidoglycane pré existant par le biais des transpeptidases (Cavallo et al., 2004).

#### 2.2.1.1/- Les $\beta$ -lactamines

Ce sont des antibiotiques bactéricides, inhibent la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane par analogie structurale avec le dipeptide D - alanyl - D - alanine. Elles se lient spécifiquement au site actif de leurs protéines cibles présentes sur la face externe de la membrane cytoplasmiques ; les PLP (Protéine liant la pénicilline) ou PBP (Penicillin binding protein). Le nombre et la nature des PLP varient en fonction des espèces bactériennes. Pour atteindre les PLP, les  $\beta$ -lactamines doivent traverser la paroi bactérienne. Chez les bactéries à Gram positif, ces molécules atteignent facilement leurs cibles car Leur diffusion au travers de la paroi se fait passivement. Par contre, chez les bactéries à Gram négatif la membrane externe empêche la diffusion de nombreuses molécules. Cependant, ces agents antimicrobiens emprunte la voie des porines et leur passage est fonction de leur taille, de leur charge et aussi d'autres facteurs tel que la nature du LPS ce qui explique la résistance de *P aeruginosa* à de nombreuses  $\beta$ -lactamines (Vandenesch & Etienne,1997) (Figure 12).

#### 2.2.1.2/- La fosfomycine (Phospho mycine)

C'est un antibiotique bactéricide, inhibe la conversion de l'UDP - N - acetyl glucosamine en acide UDP - N - acetyl muramique en se liant par une liaison covalente à un résidu cystéine de la pyruvyl transférase. Pour atteindre sa cible dans le cytoplasme, la fosfomycine doit franchir la membrane cytoplasmique en empruntant deux systèmes de transport : le système L-  $\beta$ - glycérophosphates et celui des hexoses phosphates (Lavigne, 2007).

#### 2.2.1.3/- La cyclosérine

Elle présente une analogie de structure avec la D-alanine, inhibe la racémase transformant la

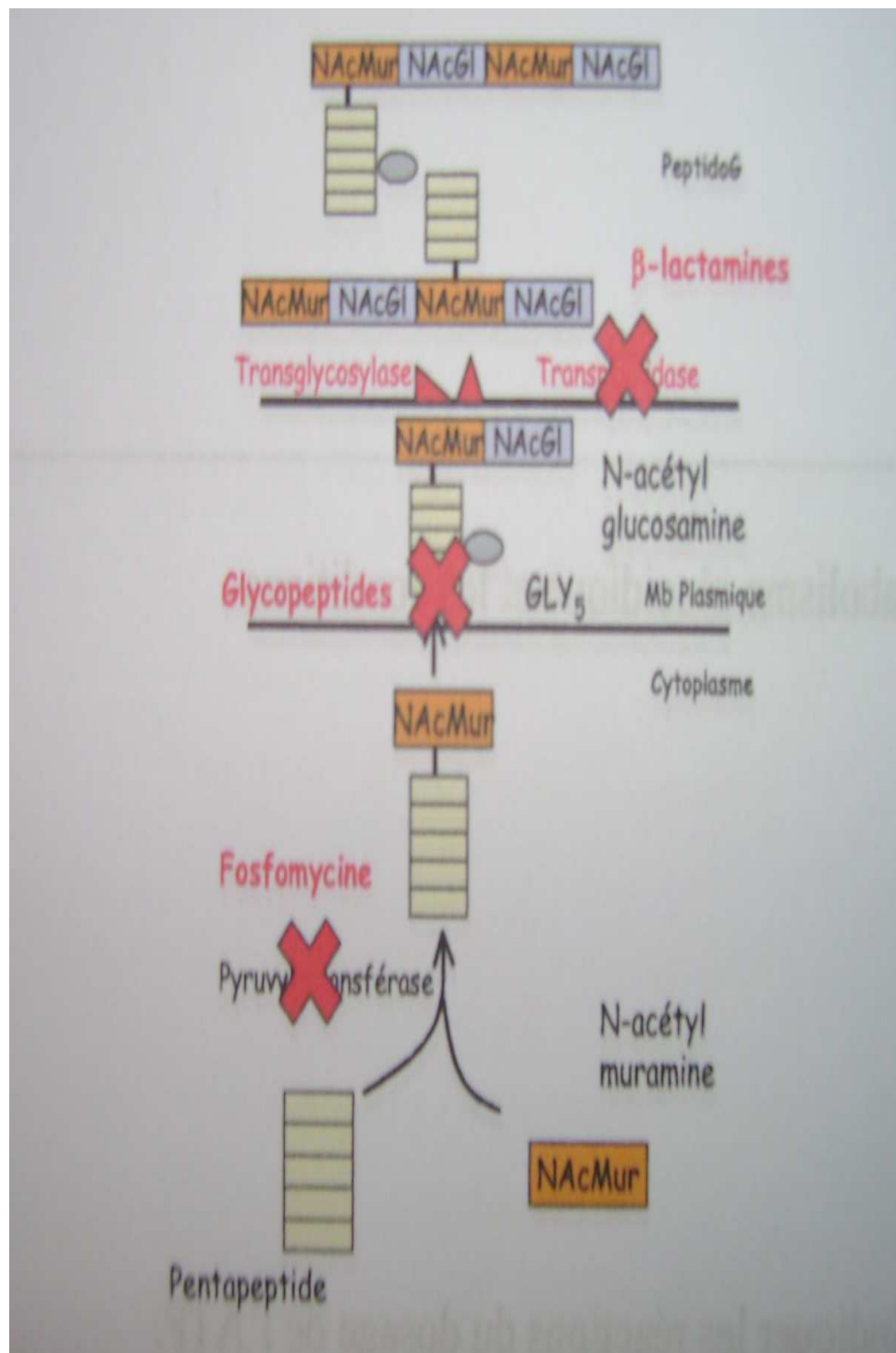


Figure 11 : Représentation schématique des sites d'action de certains antibiotiques sur la biosynthèse du peptidoglycane (Lavigne, 2007).

L - alanine en D - alanine et la D - alanyl - D - alanine synthétase. Sous l'effet de cet agent antimicrobien très toxique, il se produit une accumulation d'UDP-N-acetyl mura myl tripeptide (Berche et al., 1991).

#### 2.2.1.4/- Les glycopeptides

Ces antibiotiques sont bactéricides, avec une grande affinité vis-à-vis les précurseurs du peptidoglycane comportant le dipeptide D - alanyl - D - alanine. Leurs cibles sont donc situées soit dans le cytoplasme, soit au niveau de la paroi en formation. Chez les bactéries à Gram négatif, aucune cible n'est atteinte à cause de l'imperméabilité de leur membrane pour ces molécules, contrairement aux bactéries à Gram positif. En revanche, ces antibiotiques ne peuvent franchir la membrane cytoplasmique de ces derniers et leur action s'exerce sur la paroi en formation. Les glycopeptides forment un complexe avec les dipeptides D-alanyl-D-alanine présents dans la paroi en formation, ce qui conduit à l'inhibition des transglycosylases et des transpeptidases. Par ailleurs, l'élongation de la paroi et la croissance bactérienne est inhibée (Lavigne, 2007).

#### 2.2.1.5/- La bacitracine

Cette molécule est inactive sur les bactéries à Gram négatif grâce au mécanisme d'imperméabilité membranaire. Chez les bactéries à Gram positif, forme un complexe irréversible avec l'undécaprényl - pyrophosphate et inhibe sa déphosphorylation (Berche et al., 1991).

### 2.2.2/- Les antibiotiques agissants sur les membranes

#### 2.2.2.1/- Les polymyxines

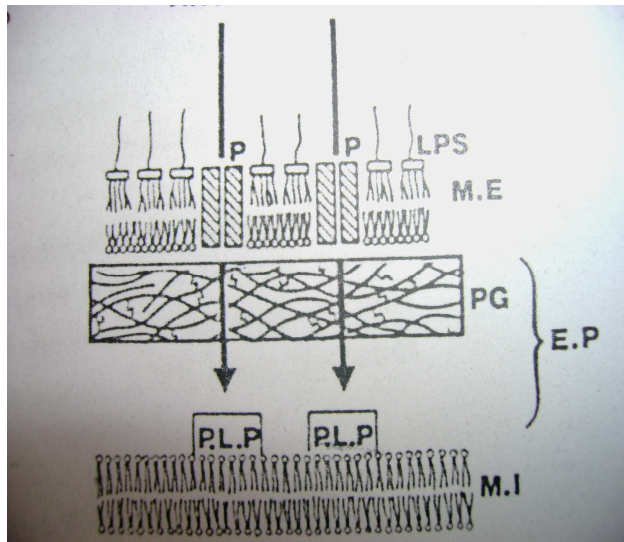
Ces agents antimicrobiens sont constitués d'un polypeptide cyclique et d'un acide gras. Ils pénètrent à l'intérieur de la membrane et s'incorporent à la couche lipidique grâce à leur extrémité hydrophobe, ce qui induit une désorganisation de la structure membranaire et entraîne la mort de la cellule. Ces molécules sont très actives sur les bactéries à Gram négatif (Berche et al., 1991).

### 2.2.3/- Les antibiotiques actifs sur l'ADN

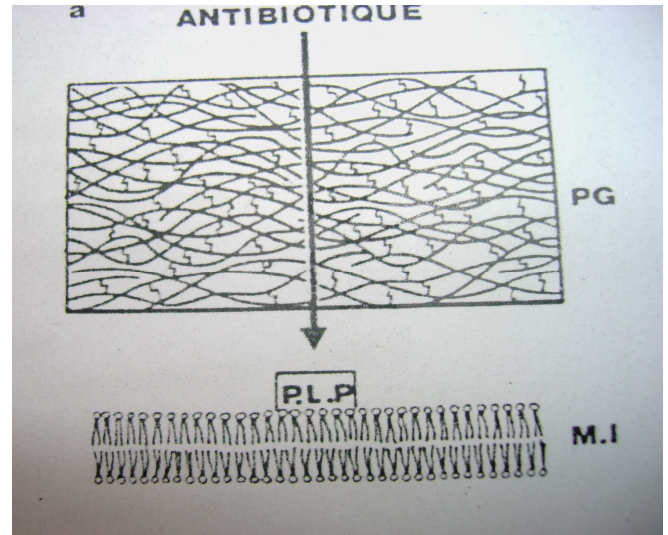
#### 2.2.3.1/- Inhibition de la réplication

##### 2.2.3.1.1/- Les quinolones

Ces molécules inhibent la synthèse de l'ADN par action sur les topo - isomérases bactériennes. Ils franchissent la paroi des bactéries à Gram négatif grâce aux porines et pénètrent à l'intérieur de la cellule par diffusion passive. Leurs cibles sont l'ADN- gyrase (topo - isomérase II) et la topo - isomérase IV. L'ADN gyrase est composée de deux sous



(a)



(b)

Figure 12 : Représentation schématique de la paroi des bactéries à Gram négatif (a) et à Gram positif (b) d'après Gutmann & Williamson, 1987 in Berche et al., 1991.

- P = protéines de type porine
- L.P.S = lipo polysaccharides
- M.E = membrane externe
- P.G = peptidoglycane
- E.P = espace périplasmique
- P.L.P = protéine liant la pénicilline
- M.I = membrane interne

unités A (codées par le gène *gyrA*) et de deux sous unités B (codées par le gène *gyrB*). Le site catalytique de l'ADN gyrase est centré sur la tyrosine en position 122 de la sous unité A. La sous unité B comprend un site d'hydrolyse de l'ATP fournissant l'énergie nécessaire à l'activité enzymatique. L'ADN gyrase intervient au moment de la réplication de la double hélice, en produisant des coupures et des ligations au niveau des brins d'ADN ce qui permet la progression de la fourche de réplication. Au moment de la coupure, l'ADN et l'enzyme (gyrase) sont transitoirement liés de manière covalente (sous forme de complexe). Les quinolones agissent sur ce dernier en formant un autre complexe irréversible (enzyme - antibiotique). Ainsi, les brèches au niveau des brins d'ADN ne peuvent être soudées et l'ADN bactérien reste sous forme de fragments. Ces antibiotiques agissent aussi sur la topo - isomérase IV qui intervient lors de la séparation des copies d'ADN circulaires présentes après réplication. Ils inhibent aussi la transcription (Berche et al., 1991).

#### 2.2.3.1.2/- Les nitrofuranes

Ces agents antibactériens ne peuvent fonctionner correctement qu'après une réduction de leur groupement NO<sub>2</sub>. Ils induisent des coupures et des mutations dans l'ADN.

#### 2.2.3.1.3/- La novobiocine

Cet antibiotique est actif surtout sur les bactéries à Gram positif. Elle inhibe la réplication de l'ADN en empêchant la fixation d'ATP sur la sous unité B de l'ADN-gyrase.

#### 2.2.3.1.4/- Les antibiotiques imidazolés

Comme pour les nitrofuranes, le bon fonctionnement de ces agents nécessite une réduction partielle de leur groupement NO<sub>2</sub>. Ils se fixent sur l'ADN au niveau des régions riches en adénine et thymine, tout en provoquant une oxydation suivie d'une coupure des brins et d'un déroulement de l'ADN ce qui entraîne la mort de la cellule (Berche et al., 1991).

#### 2.2.3.2/- Inhibition de la transcription

##### 2.2.3.2.1/- Les rifampicines

Ces molécules sont bactéricides. Cet effet serait lié à l'oxydation in vivo du site quinone de la molécule ce qui formerait des ions super oxydes et des radicaux libres toxiques pour l'ADN bactérien. Elles se fixent sur la sous unité  $\beta$  de l'ARN polymérase et empêchent l'initiation de la synthèse des ARNm (Lavigne, 2007).

#### 2.2.4/- Les antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des protéines

La traduction des ARNm en protéines se fait au niveau des ribosomes et peut se décomposer en trois étapes : initiation, élongation, terminaison (Lavigne, 2007).

#### Première étape (initiation)

Au cours de l'initiation, la sous unité ribosomale 30S et le complexe formyl - méthionine - ARNt se fixent au site d'initiation AUG de la molécule d'ARNm. Trois protéines et des facteurs d'initiation sont nécessaires pour cette étape. Par la suite, la sous unité ribosomale 50S se lie à ce complexe d'initiation pour former le ribosome 70S.

#### Deuxième étape (élongation)

Durant l'élongation, on aura incorporation séquentielle des acides aminés spécifiques. Cette étape peut être divisée en trois phases différentes à savoir: reconnaissance, transfert peptidique et translocation.

- La reconnaissance : Pendant cette phase, une molécule d'acide aminé ARNt se fixe sur le site A (aminoacyl) du ribosome.
- Le transfert peptidique : Transfert du peptide en formation du site P (peptidyl) au site A et formation d'une liaison peptidique avec l'acide aminé du site A ce qui conduit à l'élongation de la chaîne peptidique.
- La translocation : Cette phase fait intervenir trois protéines connues sous le nom de facteurs d'élongation. Son but est de transporter le peptide au site P.

#### Troisième étape (incorporation des acides aminés)

L'incorporation des acides aminés se répète jusqu'à ce qu'un codon de terminaison soit reconnu sur l'ARNm. A l'aide de trois protéines accessoires spécifiques, on aura libération du peptide, séparation du ribosome et de l'ARNm et la dissociation du ribosome en ses deux sous unités.

L'effet inhibiteur des antibiotiques sur la synthèse des protéines est exercé surtout sur la sous unité ribosomale 30S ou 50S, parfois les deux à la fois (Figure 13).

#### 2.2.4.1/- Les aminosides

Ce sont des antibiotiques bactéricides. Pour atteindre leurs cibles dans le cytoplasme, ils franchissent l'enveloppe externe à l'aide des porines, puis la membrane cytoplasmique par le biais d'un système de transport d'électron et d'oxygène comme accepteur final. Une fois à l'intérieur de la cellule, ces agents se fixent sur la sous unité 30S et provoquent des erreurs de reconnaissance codons - anti codons et l'incorporation d'acides aminés erronés dans la chaîne peptidique en formation. D'autre part, ils empêchent la fixation du facteur F3 qui en fin de synthèse provoque la dissociation du ribosome en ses deux sous unités. De ce fait, les ribosomes sont incapables de s'unir à de nouveaux ARNm. Certains aminosides se fixent à la fois sur la sous unité 30S et 50S du ribosome (Berche et al., 1991).

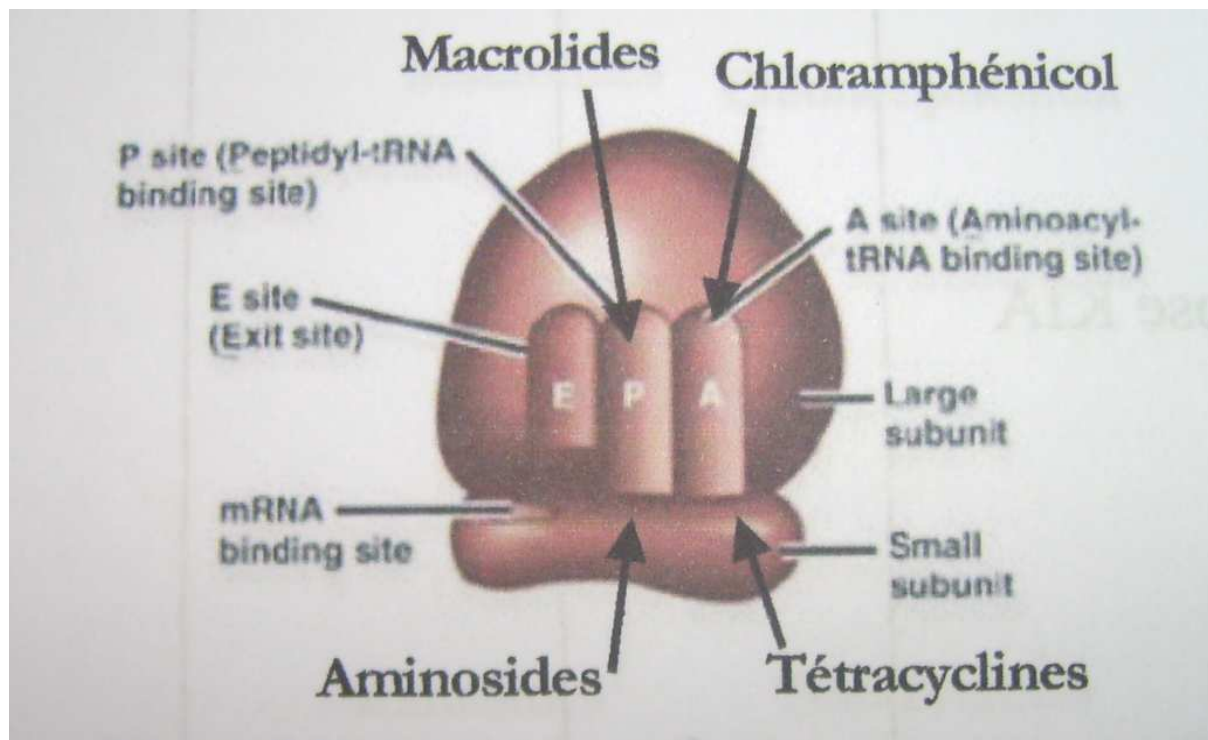


Figure 13 : Représentation schématique des sites d'action des antibiotiques actifs sur la synthèse des protéines (Lavigne, 2007).

#### 2.2.4.2/- Les tetracyclines

Ce sont des antibiotiques bactériostatiques à large spectre. Pour exercer leur effet inhibiteur, traverse la membrane externe grâce aux porines, puis la membrane cytoplasmique soit par diffusion passive, soit par des systèmes de transport actif. Ces molécules se fixent sur les ribosomes au niveau du site A par liaison avec les protéines de la sous unité 30S. De ce fait, l'aminocyl - ARNt sera inhibé et la phase de reconnaissance au cours de l'étape d'élongation de la chaîne peptidique sera bloquée (Berche et al., 1991) .

#### 2.2.4.3/- Les macrolides et apparentés

Les LMS sont des antibiotiques lipophiles, constitués par un noyau central lactonique composé de 12 à 16 atomes sur lesquels sont fixés des sucres. Ces molécules et d'autres sont actifs surtout sur les bactéries à Gram positif et quelques bactéries à Gram négatif. Ils inhibent

la synthèse des protéines en se fixant de façon réversible sur la sous unités 50S, notamment au niveau de l'ARN ribosomal 23S, au voisinage du site P. Ceci, inhibe l'élongation du peptide en cours de synthèse par blocage des étapes de transfert peptidique ou de translocation. Certains agents antibactériens de ce groupe inhibent la synthèse des protéines par inhibition de la formation des liaisons peptidiques (Berche et al., 1991).

#### 2.2.4.4/- Les phénicolés

Ces antibiotiques s'attachent à la sous unité ribosomale 50S préférentiellement sur le site A, en empêchant l'attachement des amino - acyl ARNt et inhibent la formation des liaisons peptidiques (peptidyl transférase) et enfin l'élongation de la chaîne. Ils sont bactériostatiques et actifs sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Lavigne, 2007 ; Berche et al., 1991).

#### 2.2.4.5/- L'acide fusidique

C'est un antibiotique de nature stéroïdique. Il est hydrophobe et actif uniquement sur les bactéries à Gram positif. Il intervient au cours de la translocation et inhibe l'élongation du peptide en immobilisant le complexe ribosome- facteur d'élongation qui doit normalement se dissocier juste après la translocation du peptide.

#### 2.2.5/- Les antibiotiques agissant par compétition

##### 2.2.5.1/- Les sulfamides

Ce sont des agents antimicrobiens à effet bactériostatiques. Ils inhibent l'enzyme dihydrofolate synthétase par analogie structurale avec l'acide para amino - benzoïque (PAB) ce qui conduit à l'inhibition de la synthèse de l'acide tétrahydrofolique impliqué dans la voie de biosynthèse des purines et des pyrimidines (Lavigne, 2007).

#### 2.2.5.2/- La triméthoprimine

C'est un antibiotique à effet bactériostatique, et inhibe l'activité de l'enzyme dihydrofolate réductase.

#### 2.2.5.3/- L'acide para aminosalicylique (PAS)

Il se caractérise surtout par une structure analogue au PAB. Il est très actif sur les mycobactéries et son mécanisme d'action est similaire à celui des sulfamides.

### 2.3/- Origine de la résistance bactérienne

La résistance des bactéries aux différents agents antimicrobiens peut être naturelle (intrinsèque) ou acquise.

#### 2.3.1/- La résistance naturelle

Dans le cas d'une résistance naturelle, le support génétique est le chromosome bactérien. Cette résistance est considérée comme une propriété de l'ensemble des souches d'une même espèce. Elle est fixe, constante (transmission verticale), et constitue un critère d'identification. Elle est due à un grand nombre de mécanismes biochimiques tel que le cas de l'imperméabilité membranaire à certains antibiotiques hydrophobes ou de masse moléculaire élevée (pénicilline G et M, macrolides, rifampicine, acide fusidique, vancomycine, novobiocine) chez les entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*. La résistance chromosomique peut être le fait d'une mutation (acquisition). Cette dernière est rare et ne se produit en moyenne que toutes les  $10^5$  à  $10^{10}$  divisions cellulaires. La mutation affecte un caractère, et souvent la résistance ne touche qu'un antibiotique ou une famille d'antibiotiques ayant le même mode d'action. Il existe toutefois quelques exceptions en cas d'une mutation qui affecte les porines. Cependant, une seule mutation conduit à une résistance simultanée à plusieurs antibiotiques tel que le cas de la résistance aux • lactamines et aux aminosides chez *Serratia marcescens* et *Pseudomonas aeruginosa*.

#### 2.3.2/- La résistance extra chromosomique

Ce type de résistance est lié à des éléments génétiques extra chromosomiques ; plasmides, transposons et intégrons.

##### 2.3.2.1/- Les plasmides

Les plasmides ont été décrits dans les années 1950. Ils codent pour la résistance à un ou plusieurs agents antimicrobiens à la fois. Cette insensibilité est liée à la synthèse de nouvelles protéines et non à une modification des constituants normaux des bactéries. Ils confèrent aussi aux bactéries la résistance à certaines conditions hostiles de l'environnement (acidité,

salinité...), comme ils peuvent porter également des facteurs de virulence, de la biodégradation de certains composés organiques toxiques (hydrocarbures), de la production de toxines et autres (Le Minor & Veron, 1990 ; Clewell, 1993). Ils sont dotés d'un système de répllication autonome qui est à l'origine du phénomène d'incompatibilité et du contrôle du nombre de copies de plasmides dans la cellule. Les plasmides conjugatifs, autotransférables (transfert horizontal) portent les gènes de transfert nécessaires pour la synthèse des pili responsables de la conjugaison et la régulation de la fréquence du transfert (Hayes, 1968).

Il existe aussi des plasmides non conjugatifs, pouvant ou non être mobilisables. Les plasmides non autotransférables mobilisables sont dotés d'une région de transfert mais pas des fonctions de transfert et ils sont transférés par l'intermédiaire d'un plasmide conjugatif. Dans certains cas, les plasmides non conjugatifs et non mobilisables peuvent former un co-intégrat avec un plasmide conjugatif ce qui leur permet d'être transférés en bloc lors d'un croisement (Davison, 1999).

#### 2.3.2.2/- Les transposons

Ce sont des séquences d'ADN capables de promouvoir leur translocation d'un réplicon à un autre (transposition intermoléculaire) ou en un autre site du même réplicon (transposition intramoléculaire) (Le Minor & Veron, 1990). Les éléments transposables les plus simples sont les séquences d'insertion (IS= Insertion sequence). Cette dernière ne contient que les gènes utiles à sa mobilité et elle est flanquée aux deux extrémités par des séquences nucléotidiques inversées, répétées, de 20 à 40 pb impliquées dans la fixation de la transposase et dans les phases de coupure, d'excision et de transposition de l'ADN (IR). Les éléments transposables peuvent également contenir d'autres gènes de résistance ou de toxines et dans ce cas il s'agit de transposons composites. La transposition peut se faire par excision/intégration, par transposition conservative ou répllicative (Craig, 1996).

#### 2.3.2.3/ Les intégrons

Ils ont été découverts au cours des années 1980. Ce sont des structures génétiques linéaires d'ADN qui servent à la capture de gènes et de vecteurs d'expression. Les cassettes sont considérées comme des éléments mobiles qui peuvent être facilement intégrés dans un intégron par un mécanisme de recombinaison spécifique de site. Ils existent chez les bactéries à Gram positif et négatif (Roy, 1997 ; Ploy et al., 2005). Ces unités mobiles sont incapables de s'auto répliquer et portés par un réplicon (plasmide ou chromosome). En général, l'intégron est composé de trois régions, deux sont conservées situées de part et d'autre de la troisième région qui est connue d'être variable. L'enzyme responsable de la catalyse de l'insertion d'un ou de plusieurs gènes cassettes au niveau du site d'attachement att I est codée par le gène *int I* localisé au niveau de la région 5 conservée (5 CR). Les gènes cassettes de résistance aux différents antibiotiques peuvent être insérés dans un seul intégron et confère ainsi à une bactérie la multirésistance (Rowe - Magnus & Mazel, 2001 ; Towner, 2002).

## 2.4/- Les mécanismes biochimiques de la résistance

Les bactéries se défendent contre l'action des antibiotiques par imperméabilité membranaire, inactivation enzymatique ou modification de la structure de leurs cibles (Courvalin et al., 1985 ; Lavigne, 2007).

### 2.4.1/- Imperméabilité membranaire

#### 2.4.1.1/- Diminution de perméabilité de la membrane externe

Elle empêche la pénétration de l'antibiotique ou limite sa concentration dans l'espace périplasmique, et résulte souvent d'une mutation affectant la structure des porines ou diminuant leur synthèse. Il a été démontré que l'acquisition d'une multi-résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif est due à un dysfonctionnement ou à la perte de l'une des majeures porines (Omp ou Opr), qui constituent des canaux aqueux ou hydrophiles composés de trois protéines laissant diffuser diverses molécules de faibles poids moléculaires (Lavigne, 2007). Chez *Pseudomonas aeruginosa*, elle résulte de la perte de la porine OprD qui affecte principalement l'imipénème, par contre chez *Escherichia coli* est liée à la perte des porines OmpC et OmpF (Nikaido & Vaara, 1985 ; Dalhoff et al., 2006 ; Mesaros et al., 2007).

#### 2.4.1.2/- Systèmes efflux actifs

Les bactéries peuvent résister aux antibiotiques par exportation active à l'aide des transporteurs membranaires appelés pompes d'efflux. Ces dernières sont énergie dépendante et interfèrent avec les mécanismes de transport de type imperméabilité (Lavigne, 2007).

Ces deux mécanismes associés constituent les principaux mécanismes de la résistance intrinsèque élevée des bactéries à Gram négatif vis-à-vis de nombreux agents antimicrobiens. Les systèmes d'efflux se distinguent surtout par une structure tripartite composée d'une pompe transmembranaire, une protéine de fusion périplasmique et une porine de la membrane externe. Parmi les systèmes d'efflux actifs décrits chez les bactéries à Gram négatif, le transporteur Amr AB - OprA responsable de la résistance aux aminoglycosides et aux macrolides chez *Burkholderia pseudomallei*, Mex XY qui assure l'extrusion des lactamines, des aminoglycosides, de la tétracycline et de l'érythromycine chez *Pseudomonas aeruginosa* et Acr AB/Tol C d'*Escherichia coli* (Magnet et al., 2001 ; Cattoir, 2004 ; Mesaros et al., 2007).

#### 2.4.2/- Modification de la cible des antibiotiques

Ce mécanisme de résistance confère aux bactéries la résistance à un grand nombre d'antibiotique de familles différentes. La modification des PLP (protéines liant les pénicillines), fréquemment rencontrée chez les bactéries à Gram positif est due à une mutation

spontanée qui survienne dans les gènes chromosomiques codant les PLP normales, ce qui conduit à la modification de la structure de ces protéines (affinité diminuée) tel que le cas de la PLP2a de *Staphylococcus aureus* résistante à toutes les  $\beta$ -lactamines), et la PLP2 x de *Streptococcus pneumoniae* (diminution de la sensibilité aux pénicillines) (Lavigne, 2007). Elle peut aussi être due à l'acquisition de gènes codant pour des variants de PLP qui présente une faible affinité pour les  $\beta$ -lactamines par un transfert horizontal (transformation) (Brisou et al., 2004).

#### 2.4.3/- Synthèse d'enzymes inactivant les antibiotiques

L'inactivation enzymatique des antibiotiques ( $\beta$ -lactamines, aminosides, phenicoles, ... ..), est le mécanisme de résistance le plus souvent observé chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Ces enzymes ont une localisation intracellulaire ou extracellulaire, de nature constitutive ou inductible, codés par des gènes chromosomiques ou extra chromosomique (plasmides, transposons et intégrons). L'exemple le mieux connu est celui des  $\beta$ -lactamases responsables de l'hydrolyse du noyau  $\beta$ -lactame des antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines, ce qui confèrent la résistance bactérienne vis-à-vis ces agents antimicrobiens. Selon des études récentes, plus de 350  $\beta$ -lactamases ont été identifiées (Babic et al., 2006 ; Lavigne, 2007).

### 3/- Le transfert génétique

Le transfert horizontal des gènes de résistance d'une bactérie à une autre peut être réalisé par trois principaux mécanismes : la conjugaison, la transformation et la transduction.

#### 3.1/- La conjugaison

C'est un mécanisme de transfert du matériel génétique entre les bactéries le plus fréquent. Elle est unidirectionnelle à déterminisme plasmidique qui nécessite un contact direct entre les bactéries dites sexuellement différenciées par formation d'un pont cytoplasmique. Elle est très fréquente chez les bactéries à Gram négatif, et le transfert des gènes peut être interspécifique, intra - génique ou hétéri - génique. Les gènes de résistance sont transportés vers la bactérie réceptrice sensible à tous les agents antimicrobiens (antibiotiques, métaux lourds ....) excepté le marqueur grâce au transfert des plasmides conjugatifs, ce qui lui confère la résistance partielle ou en bloc (Franke & Clewell, 1980). Les bactéries donatrices de gènes possèdent un facteur de fertilité ou facteur « F » et elles sont qualifiées de F+, contrairement aux bactéries réceptrices qualifiées de F-, car elles sont primitivement dépourvues de facteur « F ».

#### 3.2/- La transduction

Ce processus de transfert de gènes entre les bactéries se fait par l'intermédiaire de virus (phage). Les gènes provenant de la bactérie donatrice sont incorporés dans une capsid de phage suite à des erreurs faites durant le cycle de vie de ce dernier. Il transporte ces gènes et les injecte alors dans la bactérie réceptrice, complétant ainsi le transfert.

Il existe deux types de transduction : la transduction généralisée et la transduction spécialisée. Dans le premier cas, un phage virulent ou tempéré peut transporter et transférer des fragments d'ADN générés au cours de la lyse bactérienne, par contre dans le second, les phages tempérés ne transportent que certains gènes spécifiques du génome de leur hôtes, situés près de leur sites d'attachement (att) tel que le cas du phage lambda d'Escherichia coli, donc c'est une transduction restreinte (Davison, 1999).

### 3.3/- La transformation

L'échange d'ADN entre les bactéries correspond à l'acquisition de gènes par une bactérie réceptrice mise dans un milieu en présence de l'ADN nu d'une autre donatrice. Ce processus est aléatoire, et toute partie du génome peut être transférée vers la réceptrice. La transformation dépend de la concentration de l'ADN dans le milieu et de la compétence de la bactérie réceptrice. C'est phénomène réalisé surtout in vitro, du fait que l'ADN libre dans l'environnement est rapidement dégradé, de même les bactéries naturellement compétentes sont rares (Dowson, 1994).

## 4/- Les Flavobactéries

### 4.1/- Historique et position taxonomique

La famille des Flavobacteriaceae est l'une des principales familles du groupe Cytophaga - Flavobacterium - Bacteroides (Hirsh et al., 1998). Elle a été proposée par Jooste (1985), puis incluse dans le Bergey's Manual de systématique et de bactériologie (Reichenbach, 1989). La validation du nom de cette famille a eu lieu en 1992 par Reichenbach. En 1996, Bernardet et al., ont publié une étude très détaillée, intéressant plus de 100 souches bactériennes, dont 81 appartiennent au genre Flavobacterium, Cytophaga ou Flexibacter, et les résultats ont conduit à une véritable description de cette famille et de son genre type Flavobacterium. En 2002, Bernardet et al., agissant au nom du sous comité de taxonomie des Flavobacterium, Cytophaga - like bacteria, ont modifié la description de cette famille. Selon Garrity et al., 2004, elle est classée comme suit :

- Phylum : Bacteroidetes
- Classe : Flavobacteria
- Ordre : Flavobacteriales

Ces dernières années, cette famille a fait sujet de recherche de plusieurs laboratoires dans le monde, ce qui a permis l'isolement et l'identification d'un grand nombre de nouveaux taxons à titre d'exemple les genres Formosa (Ivanova, 2004), Pibocella et Bizionia (Nedashkovskaya et al., 2005 a et b), Nonlabens (Lau et al., 2005), Sejongia (Yi et al., 2005), Wautersiella (Kampfer et al., 2006) et Tamlana (Lee, 2007).

### 4.2/- Caractères bactériologiques:

Les membres de la famille des Flavobacteraceae sont des bacilles à Gram négatif, non sporulés, le diamètre des cellules est situé entre 0.2-0.6 µm et leur longueur entre 1-10 µm. Certaines espèces peuvent former des cellules filamenteuses qui se fragmentent pour donner naissance à des bacilles puis des cocci dans les vieilles cultures. Certaines souches du genre Polaribacter possèdent des vésicules gazeuses. D'autres genres se distinguent par la présence des appendices longs et fins qui semblent servir à unir les cellules entre elles (Muricauda ruestringensis) (Reichenbach, 1989, 1992 a ; Bernardet et al., 2002).

Toutes les souches sont dépourvues de flagelles sauf l'espèce Polaribacter irgensii. La mobilité par glissement a été observée chez les espèces de plusieurs genres tels que Algibacter, Formosa et Gelidibacter. Cette mobilité est étroitement liée à la composition du milieu de culture qui doit être pauvre en nutriments (Reichenbach & Dworkin, 1981 ; Reichenbach, 1992 a) et aux conditions physico-chimiques de la croissance comme la température d'incubation (Mc Grath et al., 1990). Il a été démontré que la mobilité par glissement est en

relation directe avec le mécanisme d'adhésion. La concomitance adhésion - mobilité permettrait aux espèces pathogènes surtout pour les poissons de coloniser et d'envahir les tissus de l'hôte. Ces micro-organismes sont aérobies. Toutes fois, certains préfèrent voire exigent des conditions micro aérophiles pour se développer ou sont des aéro - anaérobies facultatifs (Segers et al., 1993 a ; Vandamme et al., 1994 b, 1996 b, 1999 ; Vancanneyt et al., 1999). La température optimale de croissance est comprise entre 23-35°C, mais beaucoup de genres sont psychrophiles ou psychrotolérants. Le caractère d'halophilie ou d'halotolérance a été noté chez certains genres tels que Gillisia, Chryseobacterium, Psychroflexus, Flavobacterium (Bowman et al., 1997 et 1998 ; Gosink et al., 1998 ; Barbeyron et al., 2001). Ces bactéries sont caractérisées surtout par la présence de pigments (jaune pâle, jaune foncé ou orange, beige) et le pigment n'est pas diffusible. Parfois la pigmentation est absente (genre Riemerella) (Reichenbach, 1989 ; Bernardet et al., 1996).

Les réponses aux tests catalase, oxydase et nitrate réductase sont variables (Koski et al., 1993 ; Vandamme et al., 1999). Le métabolisme est chimio - organotrophes, la principale quinone respiratoire est une ménaquinone à 6 unités isoprénoides, la cellulose sous forme cristalline (papier filtre) n'est jamais hydrolysée, les sphingolipides sont absents et le contenu de leur DNA en G+C est compris entre 27-44 mol % (Bernardet et al., 2002).

#### 4.3/- Habitat et pouvoir pathogène

Les représentants de la famille des Flavobacteriaceae sont largement distribués dans la nature (sol, eau douce, sédiments des lacs et des rivières, eau de mer et environnement marin, boues activées, bio films, plantes, aliments (notamment produits laitiers), cavité buccale de l'homme et des animaux. Dans l'environnement, ces micro-organismes joueraient un rôle important dans la dégradation de multiples composés de nature organiques et de structure simple ou complexe (Bernardet et al., 2002). Certaines espèces ont été isolées du milieu extérieur mais se comportent comme des bactéries pathogènes opportunistes tels que le cas des genres Chryseobacterium, Elizabethkingia, Flavobacterium et autres (Bernardet et al., 2002 et 2003).

## - Le genre *Chryseobacterium*

### a/- Etude taxonomique

Il est considéré comme l'un des premiers membres de la famille des Flavobacteriaceae (Holmes, 1992). Il a été créé suite au transfert de 6 espèces du genre Flavobacterium [F balustinum (Harrison et al., 1929), F indoltheticum (Campbell & Williams, 1951), F indologenes (Yabuuchi et al., 1983), F meningosepticum (Vandamme et al., 1994), F gleum (Holmes et al., 1984) et F scophthalmum (Mudarris et al., 1994)], dont le séquençage de leurs ARNr 16S avait montré qu'elles étaient phylogénétiquement proches (Vandamme et al., 1994). Plus tard, il s'est élargie grâce à l'extension des études génétiques et phylogénétiques sur la famille des Flavobacteriaceae (Vandamme et al., 1994 ; Bernardet et al., 1996).

Le nombre d'espèces est resté constant jusqu'à 2003 quand *Chryseobacterium defluvi* (Kampfer et al., 2003), *Chryseobacterium joostei* (Hugo et al., 2003) et *Chryseobacterium miricola* (Li et al., 2003) ont été décrites. Ultérieurement, *C meningosepticum* et *C miricola* ont été transférées dans un nouveau genre *Elizabethkingia* mais les résultats de ce travail ne sont pas encore validés (Kim et al., 2005 b). Depuis, le nombre d'espèces ne cesse d'augmenter pour atteindre environ 36 espèces en 2008. L'espèce type est *C gleum* (Vandamme et al., 1994).

#### b/- Caractères bactériologiques

Les membres de ce genre sont des bacilles à Gram négatif, non sporulés, immobiles, dépourvus de granules de poly- $\beta$ -hydroxy-butyrates, aérobies, chimio-organotrophes, oxydase et catalase positives, halotolérantes, psychrotolérantes et pigmentées surtout en jaune (Bernardet et al., 2002 et 2006). La température optimale de croissance est à 30°C, mais certaines poussent à des températures allant de 5°C à 37°C et même à 42°C en donnant des colonies translucides (parfois opaques), circulaires, convexes, lisses, brillantes typiquement pigmentées en jaune. Une réponse variable selon les espèces est notée pour la croissance sur la gélose de Mc Conkey et la gélose à la cétrimide (Barrow & Feltham, 1993). Les cellules peuvent avoir une morphologie filamenteuse dans les cultures jeunes, bacillaire dans les cultures plus ou moins âgées et coccoïde dans les cultures âgées (plus de 15 jours). Certaines espèces sont protéolytiques comme *Chryseobacterium haifense* ; *Chryseobacterium bovis* et *Chryseobacterium proteolyticum* (Yamaguchi & Yokoe, 2000 ; Hantsis - Zakarov & Halpern, 2007 ; Hantsis - Zakarov et al., 2008). Les acides gras cellulaires majoritaires sont: iso-C<sub>15:0</sub>, iso-C<sub>17:1</sub> w<sub>9c</sub> et iso-C<sub>17:0</sub> 3-OH (Weon, 2008).

Un autre caractère frappant de ce genre est la fréquence élevée de multirésistance aux antibiotiques (Hsuch et al., 1997 ; Hoque et al., 2001).

#### c/- Habitat et pouvoir pathogène

Les espèces du genre *Chryseobacterium* ont pour habitat le milieu extérieur (sol, eau douce, eau de mer, eaux usées, plantes), mais elles ont été également isolées de divers prélèvements et de denrées alimentaires (lait, produits laitiers, poissons, carcasses de volailles, de porcs, de bœufs et d'agneau) (Bellais et al., 2000 ; Gonzalez et al., 2000 ; Hugo et al., 2003 ; Bernardet et al., 2005 et 2006 ; Chen et al., 2006 ; Weon et al., 2006 ; Gallego et al., 2006 ; de Beer et al., 2006 ; Zhou et al., 2007 ; Behrendt et al., 2007 ; Quan et al., 2007 ; Weon et al., 2008 ; Kim et al., 2008 ; Park et al., 2008 ; Cambell et al., 2008 ; Herzog et al., 2008).

- L'espèce *Chryseobacterium hominis* a été isolée de divers prélèvements effectués en milieu hospitalier (sang, liquide de dialyse, pus) (Vanechoutte et al., 2007).

- Les espèces isolées du lait comme *C haifense* et *C bovis* pourraient être à l'origine d'altération des produits laitiers et notamment du beurre (modification de la couleur et de l'odeur) (Hantsis-Zacharov & Halpern, 2007 et Hantsis-Zacharov et al., 2008).

*Chryseobacterium shigense* est considérée comme un germe de la flore normale d'un lait fermenté Japonais (Shimomura et al., 2005).

- *Chryseobacterium vrystaatense* a été isolée de volailles, de carcasse de volailles et de l'environnement des abattoirs. Elle semble être responsable d'altération des viandes (de Beer et al., 2005).

Certaines espèces présentent un intérêt dans le domaine médical et vétérinaire telles que *C. balustinum* impliquée dans les maladies des branchies, *C. scophthalmum* responsable d'infections branchiales et de septicémies chez le turbot, *C. indologenes* isolée chez des grenouilles élevées dans le laboratoire et atteintes de la maladie des jambes rouges est impliquée aussi dans des infections nosocomiales et la pneumonie surtout chez les personnes immunodéprimées ainsi que *Chryseobacterium gleum* (Vandamme et al., 1994). Ces deux dernières espèces sont souvent considérées comme des germes pathogènes opportunistes (Sader et al., 1995 ; Bloch et al., 1997 ; Hsuch et al., 1997 ; Chiu et al., 2000).

**ETUDE**

**EXPERIMENTALE**

## II/- Etude expérimentale

### 1/- Isolement et identification des souches

#### 1.1/- Matériel et méthodes

##### 1.1.1/- Matériel d'étude et prélèvements des échantillons

Les échantillons de sol pollué par des hydrocarbures, des rejets de pneus de véhicules et des rejets domestiques ont été prélevés des villes de MEFTA H, située à l'ouest d'Alger à côté de la ville de Blida, de BAB EZZOUAR « SORECAL » qui se trouve à quelques kilomètres de la ville d'EL HARRACH, côté est d'Alger et de la ville de Hadjout faisant partie de la wilaya de Tipaza à l'ouest d'Alger. Pour le sable pollué par des huiles et des hydrocarbures, les prélèvements ont été effectués à partir d'un parking de véhicules près de la plage au niveau de la ville d'AIN TAYA à l'est d'Alger. Les eaux usées ont été prélevées de l'Oued El Harrach, recevant des effluents d'origine urbaine et industrielle, par contre celles de l'eau de mer polluée par des huiles et des hydrocarbures provenant du Port d'Alger (Tableau IV).

Pour le sol et le sable, les prélèvements ont été réalisés en surface. Après avoir écarté la couche superficielle du sol à l'aide d'une spatule, un flacon stérile de 250 ml a été rempli à moitié. On a procédé de la même manière pour le sable provenant de la ville d'AIN TAYA.

Les échantillons des eaux usées ont été prélevés à quelques mètres de la rive (au niveau du pont de l'Oued El Harrach) avec un seau attaché à une corde, par contre l'eau de mer juste au niveau du bord du port d'Alger par le biais d'une perche. Le volume prélevé est de 250 ml environ dans des flacons stériles de 250 ml. Le transport des échantillons (sol, sable, eaux usées et eau de mer) a été fait à température ambiante (Tableau IV).

#### 1.1.2/- Méthodes d'étude

##### 1.1.2.1/- Préparation des échantillons et ensemencement

10g et 10ml de chaque échantillon prélevé ont été introduits stérilement dans un Erlen Meyer de 250 ml contenant 90 ml de bouillon nutritif. Après 24 h à 72 h d'incubation à 30°C sous agitation (130 rpm), 0.1 ml a été prélevé et ensemencé par étalement à la surface d'une boîte de Petri contenant environ 20 ml de la gélose nutritive à pH = 7.3.

##### 1.1.2.2/- Isolement, purification et Sélection des souches

L'isolement des souches a été basé sur certains critères morphologiques à savoir ; l'aspect, la pigmentation et la taille des colonies. Les souches ainsi récupérées, ont été purifiées par des repiquages successifs sur un milieu gélosé non sélectif (Gélose nutritive).

La sélection des souches a été réalisée sur la base des paramètres suivants :

Tableau IV : La nature, le lieu et la date des prélèvements

Lieu et nature des prélèvements	Type de pollution	Date de prélèvement
BAB EZZOUAR « SORECAL » (sol)	Rejets domestiques	08 / 04 / 2002
Oued EL HARRACH « pont » (eaux usées)	Rejets urbains et industriels	11 / 04 / 2002 et 23 / 02 / 2006
AIN TAYA (sable)	Hydrocarbures et des huiles	21 / 02 / 2006
HADJOUT (sol).	Hydrocarbures	08 / 03 / 2005
MEFTA H (sol).	Hydrocarbures et rejets de pneus de véhicules	22 / 03 / 2006
Port d'ALGER (eau de mer).	Nappe des hydrocarbures et des huiles	08 / 03 / 2006

- Etude morphologique à l'état frais par observation au microscopique photonique G x 40.
- Etude morphologique après fixation et coloration double (coloration de Gram) puis observation au microscopique photonique G x 100.
- Détermination du type respiratoire en milieu gélosé viande foie (VF).

Toutes les souches à Gram positif, aérobies strictes, immobiles, non sporulées avec une morphologie variable ont été sélectionnées.

Une seule souche à Gram négatif, provenant du sol de la ville de MEFTAH a attiré notre attention et a été sélectionnée et identifiée avec les autres souches bactériennes par les tests biochimiques conventionnels.

#### 1.1.2.3/- Caractérisation biochimique des souches

Cette étude consiste à rechercher les différentes enzymes de la chaîne respiratoire d'une part, et de mettre en évidence certaines enzymes et métabolites issus des différentes activités biologiques d'autre part selon les recommandations de Marchal et al., 1987. Les tests biochimiques réalisés sont regroupés dans le tableau V.

Sur l'ensemble des souches caractérisées, une seule a fait objet de notre travail, provenant du sol pollué de la ville de MEFTAH. Elle a été choisie à cause de sa morphologie particulière et aussi son identification moléculaire qui a révélé que c'est un nouveau taxon. Une autre souche isolée des eaux usées de l'oued EL HARRACH a aussi été identifiée par la biologie moléculaire (séquençage), mais nécessite l'application de l'hybridation DNA/DNA pour savoir si c'est une nouvelle espèce. Les autres souches sont conservées à +4°C.

Nous tenons à signaler que cette souche a fait aussi objet d'une identification par deux types de galeries : Api 20 E et 20 NE selon les indications de Bernardet et al., 2002).

#### 1.1.2.4/- Optimisation des paramètres physico-chimiques de la souche sélectionnée

En vue d'optimiser certains paramètres physico-chimiques tels que le pH, la température et la pression osmotique, la souche bactérienne en question a été tout d'abord cultivée sur cinq milieux gélosés à titre comparatif (Gélose nutritive, gélose TSA, gélose TGEA, gélose Columbia et gélose de Mac Conkey). Après incubation à 30°C pendant 3 jours, le milieu sur lequel une bonne croissance a été obtenue, sera choisi pour le reste de notre étude.

##### 1.1.2.4.1/- La température de croissance

La détermination de la température optimale de croissance de cette bactérie, a été réalisée en bouillon nutritif et sur gélose TSA. En premier lieu, la souche bactérienne a été ensemencée en stries sur la gélose TSA. L'incubation a été faite à différentes températures (+4°C, +20°C, +25°C, +28°C, +30°C, +37°C, +40°C) pendant 72h. La température à laquelle une bonne

Tableau V : Les différents tests biochimiques effectués.

- Recherche de la catalase, de l'oxydase et de la nitrate réductase
- // // de la production d'indole
- // // de la B galactosidase
- // // de la DNASE
- // // de la LECITHINASE
- // // de la Tryptophane désaminase
- // // des Décarboxylase et de l'UREASE en milieu urée- indole
- // // de la production d' H<sub>2</sub>S sur milieu KIA
- Etude de l'hydrolyse de l' Amidon, de l'Esculine et de la Caséine
- // de l'hydrolyse du TWEEN 80 et 20
- // du métabolisme des acides organiques sur milieu de SIMMONS
- // de la dégradation des sucres en milieu HUGH et LEIFSON (HUGH et LEIFSON, 1953) : Adonitol, Amidon, Amygdaline, Arabinose, Cellobiose, Dextrine, Dulcitol, Esculine, Galactose, Glucose, Glycérol, Glysiline, Inositol, Levulose, Lactose, Maltose, Mannitol, Mélibiose, Raffinose, Rhamnose, Saccharose, Salicine, Sorbitol, Sorbose, Tréhalose, Xylose, Fructose, Mannose.

croissance a été obtenue sera considérée comme le seuil optimum. En second, un inoculum dense de la même souche a étéensemencé en bouillon nutritif. l'incubation a été effectuée sous agitation (130 rpm), à des températures allant de +20°C à +40°C et la croissance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à UV (Référence - 6405 UV/Vis JENWAY), à une longueur d'onde de 600nm.

#### 1.1.2.4.2/- Le pH de croissance

La souche a étéensemencée en stries sur la gélose TSA à différents pH (3, 4, 5, 6, 7.3, 8, 9, 10, 11, 12), puis incubée à la température optimale déterminée pendant 3 jours. Pour le bouillon nutritif, après avoir ajusté les pH précités à l'aide d'une base (KOH 20%) et un acide (HCl 6N), on a procédé à un ensemencement, puis une incubation pendant 3 jours à la température optimale déterminée sous agitation (130 rpm). Le pH optimal de croissance correspond à celui auquel une bonne croissance a été obtenue sur milieu gélosé et de même une densité optique (DO) importante mesurée à une longueur d'onde (•) égale à 600 nm.

#### 1.1.2.4.2/- La tolérance au chlorure de sodium (Na Cl)

Dans le but de déterminer la concentration optimale de Na Cl tolérée par cette bactérie, on a fait un ensemencement en bouillon nutritif et sur milieu gélosé TSA en présence de concentrations croissantes de Na Cl allant de 1% à 14%. Les boîtes de Petri ainsi que les Erlens ont été incubées pendant 72 h à la température optimale déterminée sauf que ces derniers étaient soumis à une agitation (130 rpm).

#### 1.1.2.5/- Recherche de pigments spécifiques à la souche étudiée

Cette étude consiste à rechercher les pigments Flévirubines caractéristiques des bactéries de la famille des Flavobacteriaceae. La technique utilisée est celle recommandée par Bernardet et al., 2002. Il s'agit de traiter une colonie bien distincte de la souche à étudier sur boîte ou sur lame avec quelques gouttes d'une solution de KOH à 20%. Le résultat est considéré comme positif s'il y a apparition de la couleur rouge. Dans le cas contraire, le résultat est négatif.

#### 1.1.2.6/- Etude de la sensibilité de la souche étudiée au lysozyme.

La technique appliquée est similaire à celle utilisée pour l'étude de la résistance aux différents agents antimicrobiens. On aensemencé en stries la bactérie sur milieu TSA contenant une concentration finale de lysozyme de 2.5 mg/ml de milieu. Après 72h d'incubation à la température optimale, la lecture a été faite. L'absence de toute croissance indique que la bactérie est sensible à cette [lysozyme].

#### 1.1.2.7/-Identification moléculaire

En vu de compléter et en même temps confirmer avec certitude l'identité de cette souche bactérienne, le séquençage de l'ARNr 16S a été réalisé dans Le laboratoire de microbiologie à.

L'IRD de l'université de la MEDITERRANEE à Marseille en France. La séquence d'ADNr 16S obtenue, a été comparée à celles d'une banque de données (BLAST), à partir desquelles l'arbre phylogénétique spécifique a été construit.

Les différentes étapes de travail effectuées pour le séquençage sont :

#### 1.1.2.5.1/- Amplification par PCR du gène codant pour l'ARNr 16S et séquençage

Principe :

L'objectif principal de l'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S est d'obtenir un grand nombre de copies de fragments d'ADN grâce à l'utilisation de la Taq polymérase et en présence d'amorces dans le milieu réactionnel. La visualisation et la vérification de l'amplification se fait par électrophorèse, qui fait apparaître une seule bande, correspondant à la taille de l'ADN amplifié.

Elle a été réalisée directement sur des extraits d'ADN par PCR (Polymérase - Chain - Reaction), en utilisant 4 amorces universelles spécifiques pour le gène fd1 et rD1, qui correspondent aux positions respectives 8-27 et 1524-1540 pb du gène d'Escherichia coli, et permettent d'amplifier des fragments du gène rrs • 1500 pb ( Mirandella -Tello et al., 2004) .

Les produits purs de la PCR ont été par la suite séquencés en utilisant un ADN - séquenceur de type ABI PRISM 3100, avec un terminateur Big - Bye.

Les amorces utilisées sont :

8f-(5'- GGATCCAGACTTTGATAATGGCTCAG- 3'),  
 534r- (5'- ATTACCGCGGCTGCTGG-3'),  
 968f- ((5'- AACGCGAAGAACCTTAC-3'),  
 1512f- (5'- GTGAAGCTTACGGCTAGCTTGTTACGACTT-3').

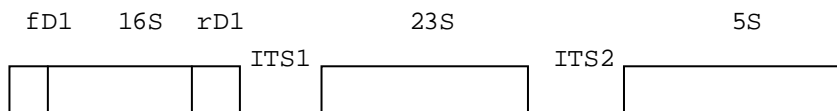


Figure 14: Schéma représentant l'organisation générale de l'Opéron Ribosomal des procaryotes.

Après extraction de l'ADN (technique complète en annexe), la solution de cet dernier a été conservée à -20°C, puis on a procédé à la préparation du milieu réactionnel dans des tubes EPPENDORF comme suit :

Technique :

- DNTP (10 mM) ... .. 00.5 ul,
- Tampon (X10) ... .. .05 ul,
- Mg Cl<sub>2</sub> (25 mM) ... .. .05 ul
- Amorces (50 p.mol/ul) ... .. 00.5 ul
- Taq polymérase (5 u/ul) ... .. .00.3 ul
- Eau ultra pure ... .. .37.7 ul

Une fois le mélange a été préparé, 0.5ul d'échantillon d'ADN ont été ajoutés puis une centrifugation avec un tombe goutte (mini centrifugeuse) a été réalisée. Pour le témoin, 0.5ul d'eau pure ont été ajoutés à la place de l'ADN. Par la suite, les préparations ont été placées dans l'appareil PCR et le programme indiqué dans le tableau VI a été appliqué.

Tableau VI : Différentes étapes du programme

Dénaturation initiale	1 mn à 95°C
Cycles : X 30	20 s à 95°C (dénaturation)
	30 s à 55°C (hybridation)
	1.5 mn à 72°C (élongation)
	5 mn à 72°C (élongation finale)
Fin	+4°C

Les produits PCR ainsi obtenus, ont été récupérés et la vérification de l'amplification a été réalisée sur gel d'agarose à 1%, permettant de mettre en évidence l'apparition d'une seule bande de minimum de 200 ng / 50ul (• 1500 pb).

#### 1.1.2.5.2/- Détermination du contenu de l'ADN chromosomique en (G+C) moles %

Le taux de (G+C) moles % de l'ADN chromosomique de cette bactérie a été effectué en Allemagne au DSMZ (Deutsch Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) par la méthode chromatographique (chromatographie à phase liquide à haute performance « HPLC ») (Mesbah et al., 1989 ; Tamaoka & Komagata, 1984).

Principe :

Après extraction, l'ADN chromosomique a été purifié sur hydroxyapatite conformément à la procédure de Cashion et al., 1977, et l'hydrolyse a été réalisée à l'aide de la phosphatase

alkaline d'origine bovine (Mesbah et al., 1989). Le produit ainsi obtenu a été analysé par HPLC de marque (SHIMADZU CORPORATION, JAPAN). L'analyse chromatographique a été effectuée sur 10 µl d'échantillon en présence d'un solvant 0.3 M de (NH<sub>4</sub>) H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/ acéto - nitrile [40:1(v/v)] à un pH = 4.4 et une température de 45°C. (Tamaoka & Komagata, 1984). Le calcul du GC% a été effectué selon la méthode de Mesbah et al., 1989, tout en se référant à des valeurs de (G+C) mol % de souches de référence de DSMZ.

#### 1.1.2.5.3/- La Chimio taxonomie (analyse biochimique de la paroi cellulaire)

Cette étude consiste à analyser la paroi des cellules bactériennes, dans le but de déterminer les différents acides gras présents et leur taux chez la bactérie étudiée, puis faire une étude Comparative avec les autres bactéries proches afin de pouvoir compléter l'identification de nouveaux genres et espèces bactériennes. Pour cela, la souche bactérienne a été cultivée sur le milieu gélosé TSA pendant 72h à 30°C, puis les acides gras ont été isolés et méthylés (Ben Zeev et al., 2005). L'analyse des acides gras méthyle- ester a été faite à l'aide d'une chromatographie à phase gazeuse (CPG). Cette partie de travail a été réalisée dans le laboratoire CCUG à GOETTBURG en Suède.

## 2/- Etude de la résistance aux agents antimicrobiens

### 2.1/- Etude de la résistance aux métaux lourds

Le but de cette partie de travail est de déterminer d'une part le seuil de résistance de la bactérie retenue pour cette étude vis-à-vis 3 sels métalliques et d'autre part, évaluer le taux d'accumulation de chaque métal dans la cellule par les mécanismes d'absorption et/ou d'adsorption. Les trois sels étudiés sont : Nitrate de cadmium, sulfate de zinc et acétate de plomb

#### 2.1.1/- Préparation des solutions métalliques

Les trois sels métalliques testés sont très solubles dans l'eau. Deux solutions mères de 10<sup>4</sup> µg/ml pour le zinc et le plomb et une autre de 500 µg/ml pour le cadmium ont été préparées.

#### 2.1.2/- Détermination de la concentration seuil pour chaque sel métallique

Une série de boîtes de Petri a été préparée avec des concentrations croissantes de chaque métal incorporé dans la gélose Mueller Hinton (tableau VII). La souche bactérienne a été ensemencée en stries sur les boîtes de sélection ainsi préparées. Après 3 à 7 jours d'incubation à la température optimale obtenue, la concentration seuil de la résistance a été déterminée. Cette dernière correspond à la concentration la plus élevée à laquelle une croissance bactérienne a été obtenue, c'est à dire la dernière concentration avant la CMI (concentration minimale inhibitrice).

Tableau VII : Les différentes concentrations des ions métalliques testés en ug/ml.

Nitrate de cadmium	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	125	150	175	200		
Sulfates de zinc	25	50	75	100	125	150	200	225	250	300	350	400	450	500	550	600
Acétate de plomb	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	600	700	800	900	1000	1200

### 2.1.3/- Evaluation du taux d'accumulation des ions métalliques

L'objectif principal de cette étude expérimentale est de déterminer l'effet du pH sur les métaux lourds testés. Le dosage du taux des ions métalliques résiduel dans un milieu liquide stérile à différents pH a été réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption atomique à flamme type UNICAM de marque PHILIPS série PU - 9200 X et SAA avec FLAME SOLAMAR 929.

Le principe du spectrophotomètre d'absorption atomique à flamme est basé sur la détection de très faibles niveaux de concentration de nombreux éléments par digestion acide, grâce à l'utilisation de différentes sources de rayonnement pour chaque élément à mesurer et ce, en comparaison avec des solutions de références dont les concentrations sont connues de l'élément à doser.

#### Technique :

Les échantillons contenant les ions métalliques ont été dissous dans une solution acide. Par la suite, cette dernière a été transférée dans un flacon volumétrique et diluée à la concentration voulue. Une gamme de solutions étalons de métaux recherchés, permet de tracer une courbe à étalon (Figures en annexe), et la concentration des métaux lourds recherchés dans les échantillons peut alors être calculée.

Cette analyse a été réalisée dans le laboratoire de chimie de l'ORGM de Boumerdes et le laboratoire central de la police d'Alger.

#### 2.1.3.1/- Préparation du milieu et ensemencement de la souche

Dans le but d'avoir un milieu de culture de composition simple, on a opté pour la formule de base suivante :

Composition en g/l :

Extrait de levure ... .. 3 g  
 MgSO<sub>4</sub> - 7H<sub>2</sub>O ... .. 1 g  
 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 3H<sub>2</sub>O ... .. 1 g

Les expériences d'accumulation des métaux lourds par adsorption et/ou absorption ont été réalisées en milieu liquide stérile agité (130rpm), dont le pH a été ajusté avec un acide (HCl à 6N) et une base (KOH à 20 %). Les pH testés sont : (pH= 5, 5.5, 6, 6.5, 7.3, 8, 8.5, 9).

Dans une série d'Erlen -Meyer de 250 ml, on a introduit 100 ml de milieu précité à différents pH auquel les ions métalliques ont été ajoutés à raison d'une concentration finale de 100 mg/l de milieu. En parallèle, on a préparé des témoins avec 100 ml de milieu seulement à différents pH (sans ions métalliques). Par la suite, dans chaque série d'Erlen Meyer un inoculum de 10 % des cultures préparées dans le même milieu et à différents pH (Carlberg et al., 1980), et dont la densité optique préalablement mesurée à  $\lambda = 600$  nm a étéensemencé. Après 5 jours d'incubation sous agitation (130 rpm) à température optimale, la densité optique (DO) de chaque préparation ainsi que les témoins a été mesurée à la même longueur d'onde à l'aide d'un spectrophotomètre à UV (6405 UV/Vis JEN W A).

50 ml de chaque culture ont été prélevés et filtrés au travers d'une membrane filtrante de nature cellulosique de 0.45 $\mu$ m de porosité. Les filtrats ont été récupérés stérilement et les métaux libres dans le milieu ont été dosés par un spectrophotomètre à absorption atomique à flamme à des longueurs d'ondes spécifiques (Di- Benedetto et al., 1997)).

- Cadmium :  $\lambda = 228.8$  nm
- Zinc :  $\lambda = 214$  nm
- Plomb :  $\lambda = 217$  nm

## 2.2/- Etude de la résistance aux antibiotiques

En vu de mieux connaître le profil de résistance de cette bactérie vis à vis des différents agents antimicrobiens, 45 antibiotiques ont été testés par la méthode de diffusion en milieu gélosé (Méthode des disques) selon la technique de Courvalin et al., 1985 (Tableau VIII).

### Technique

Tout d'abord, une culture bactérienne dense a été préparée dans du bouillon cœur cerveau (BHIB), et après 3 jours d'incubation à 30°C, on a réalisé une dilution de façon à obtenir après une bonne homogénéisation une DO = 0.08 ou 0.1 à 625 nm, équivalent à 0.5 Mc Farland. L'ensemencement des boîtes de Petri a été effectué par inondation, et l'application des disques a été faite à l'aide d'une pince stérile à raison de 6 à 7 disques par boîte. La lecture a été faite après 3 jours d'incubation à la température précitée. Elle consiste à

mesurer le diamètre de la zone d'inhibition apparue autour du disque, et l'interprétation ( $R_t$ ,  $R_i$ ,  $S$ ) a été établie selon les diamètres critiques proposés par le NCCLS - 2004.

### 3/- Transfert génétique et détermination du support génétique

#### 3.1/- Transfert génétique par conjugaison

Le croisement par contact direct entre les bactéries permet le transfert horizontal des gènes de résistance suspectés d'être portés sur des éléments génétiques extra chromosomiques (plasmides) d'une bactérie dite donatrice (résistante) vers une autre réceptrice (sensible) par le biais d'un pont qui se forme entre les deux souches.

La souche réceptrice E coli BM 21 utilisée au cours de notre étude nous a été fournie par le laboratoire de génétique de la FSB/USTHB. Elle est dépourvue de plasmides et marquée à l'acide nalidixique (marqueur chromosomique). La technique appliquée est celle décrite par Chabbert, 1973.

#### Technique

On a réalisé trois cultures de la souche réceptrice dans des flacons de 250 ml contenant chacun 20 ml de BHI B stérile, et trois autres de la donatrice dans des tubes à essai de 5 ml du même bouillon. L'ensemble a été incubé sous agitation (130 rpm) à température optimale pendant 8 h. Par la suite, la réceptrice a subi un chauffage à 50°C pendant 10 mn afin d'empêcher le phénomène de restriction, puis on a procédé au mélange de façon à obtenir un rapport de  $\frac{1}{4}$  (donatrice/ réceptrice).

#### Préparation des boîtes de sélection des trans-conjugants et ensemencement

Vue que notre souche est résistante au marqueur chromosomique de la souche réceptrice (acide nalidixique) donc, on a utilisé la gélose de Mac Conkey sur laquelle la souche donatrice ne pousse pas comme agent sélectif. Les antibiotiques dont la résistance est suspectée d'être portée sur des éléments génétiques extra - chromosomiques chez la souche donatrice (imipénème, céfalotine et tétracycline) sont ajoutés dans le milieu à 45°C. On a ensemencé les boîtes ainsi préparées par stries à partir des mélanges, de la souche donatrice et de la réceptrice (âgés de 72h). Un résultat n'est considéré comme positif que si les trois cultures (mélanges) donne le même résultat et les souches parentales ne poussent pas.

#### 3.2/- Détermination du support génétique

L'extraction d'ADN plasmidique a été réalisé par lyse alcaline selon la méthode de Kado & Liu (1981) dans le laboratoire de génétique de la FSB/USTHB. Après une centrifugation d'un volume de 3 ml environ des cultures bactériennes à 12000 rpm pendant 2 mn, le culot

obtenu a été resuspendu dans 100ul de Tampon TE (Tris 50 mM, EDTA 10 mM). Ce dernier, permet de fragiliser la paroi cellulaire et empêcher la dégradation de l'ADN par les nucléases grâce au chélateur d'ions. Par la suite, la lyse des cellules a été réalisée par un traitement au SDS (3% de SDS dans du Tris 50 mM à pH=12.6) alcalin combiné à la chaleur. Juste après, 200ul de la solution de lyse ont été introduits dans les micro tubes EPPENDORF et on a mélangé par inversion de ces derniers. Cette étape a été suivie par un chauffage à 60 °C pendant 2mn. Dans ces conditions, l'ADN linéaire (pas circulaire) est dénaturé. Dans le but d'éliminer les contaminants majeurs de l'ADN plasmidique (protéines, ADN chromosomique et ARN de poids moléculaire élevé), 2 volumes de phénol / chloroforme (600ul) ont été ajoutés et le mélange a été réalisé par inversion des micro tubes. Après une dernière centrifugation à 12000rpm pendant 12mn, la phase supérieure très limpide contenant l'ADN plasmidique a été prélevée et introduite dans un nouveau micro tube stérile.

Pour analyser cet ADN extra chromosomique, on a utilisé une méthode standard dont le but principal est de séparer et d'identifier les fragments d'ADN chargé négativement (ELECTROPHORESE sur gel d'agarose). La visualisation de ces derniers sur gel a été effectuée par un révélateur (bromure d'éthidium) fluorescent aux UV selon les recommandations de Sambrook et al., 1989. La migration de l'ADN plasmidique a été faite sur gel d'agarose 0.7% dans du tampon TBE 1X. La tension de fonctionnement a été réglée à 50 volts pendant 1 heure 30 mn. Par la suite, le gel a été immergé dans une solution de bromure d'éthidium (0.5 ug/ml) pendant 1 heure à température ambiante, puis on a visualisé l'ADN sous UV à 254 nm dans le laboratoire de biologie moléculaire de BOUMERDES.

En vu de comparer nos résultats à des témoins, une souche de référence (Salmonella ordenez souche BM2000) contenant un plasmide de taille connue pIP173 « • 127.5 kb » en plus de son chromosome a été utilisée (Allard et al., 1993).

Tableau VIII: La liste des différents antibiotiques testés avec leurs charges

familles	antibiotiques	abréviation	Charge
<b>B lactamines</b>	Ampicilline	AM	10 ug
	Amoxicilline	AMX	25 ug
	Carbénicilline	CB	100 ug
	Cefolexime	CN	30 ug
	Céfalotine	CF	30 ug
	Céfamandole	MA	30 ug
	Céfotaxime	CTX	30 ug
	Céfuroxime	CXM	30 ug
	Céfazoline	CZ	30 ug
	Céfoxitine	FOX	30 ug
	Ceftazidime	CAZ	30 ug
	Imipénème	IPM	10 ug
	Oxacilline	OX	05 ug
	Pénicilline G	P	10 UI
	Pipéracilline	PIP	100 ug
<b>Aminosides et Aminocyclitols</b>	Amikacine	AN	30 ug
	Dibékacine	DKB	10 ug
	Gentamycine	GM	10 ug
	Kanamycine	KN	30 ug
	Néomycine	N	30 UI
	Nétilmycine	Net	30 ug
	Streptomycine	S	10 ug
	Tobramycine	NN	10 ug
<b>Tétracyclines</b>	Tétracycline	TE	30 UI
	Doxycycline	D	30 ug
<b>Macrolides</b>	Erythromycine	E	15 ug
	Spiramycine	SP	100 ug
<b>Quinolones</b>	Ofloxacine	OFX	05 ug
	Acide nalidixique	NA	30 ug
	Acid pipémidique	Pi	20 ug
<b>Phénicoles</b>	Chloramphénicol	C	30 ug
<b>Nitrofuranes et Furanes</b>	Nitrofurantoïne	F/M	300 ug
	Furanes	FT	300 ug
<b>Sulfamides et associés</b>	Sulfamides	G	20 ug
	Triméthoprime + Sulfatoxazole	SXT	1.25 ug + 23.75 ug
<b>Polypeptides et Gramicidines</b>	Colistine	CL	50 ug
	Bacitracine	B	10 UI
<b>Rifampicines</b>	Rifampicine	RA	30 ug
<b>Lincomycines</b>	Lincomycine	L	15 ug
<b>Fusidamines</b>	Acide Fusidique	FA	10 ug
<b>Glycopeptides</b>	Vancomycine	V	10 ug
<b>Fosfomycines</b>	Fosfomycine	FOS	50 ug
<b>Fluoroquinolones</b>	Fluméquine	UB	30 ug
<b>Oxiquinolones</b>	Nitroxoline	Ni	20 ug
<b>Streptogramines</b>	Pristinamycine	PR	15 ug

### III/ - Résultats et discussion

#### 1/- Isolement et identification

##### 1.1/- Caractérisation des souches isolées

Le nombre de souches sélectionnées et identifiées sur la base des critères morphologiques, physiologiques et biochimiques est de 17. Six souches sont isolées des eaux usées de l'oued EL HARRACH et du sol de BAB EZZOUAR « SORECAL » en 2002, six autres provenant du sol et de sable pollué des villes de HADJOUT et d'AIN TAYA en 2005 et les cinq dernières sont récupérées des eaux usées de l'oued EL HARRACH, des eaux de mer au niveau du port d'Alger et du sol de la ville de MEFTAH en 2006.

Toutes les souches sont de taille petite ou moyenne (1 à 3 mm de diamètre) après 24h à 72h d'incubation à 30°C sur gélose nutritive, rondes avec un contour régulier, une surface lisse, bombées ou légèrement bombées, parfois plates avec un centre élevé, pigmentées en crème, en jaune ou en jaune qui vire à l'orange avec le temps (1 à 2 semaines). Elles sont à Gram positif excepté la souche 1YB-R12T isolée du sol pollué par des hydrocarbures et des rejets de pneus de véhicules de la ville de MEFTAH qui est à Gram négatif.

Les souches sont aérobies strictes, immobiles, ne forment pas de spores, oxydase positive et négative et catalase positive. Sous microscope optique (Zeiss - G x100), apparaissent sous forme de bacilles isolés, de coccobacilles et de cocci isolés ou regroupés en diplocoques, en courtes chaînettes, en tétrades et parfois en amas. On a aussi observé des filaments branchés qui se fragmentent. (Tableau II a, II b, IIc en annexe).

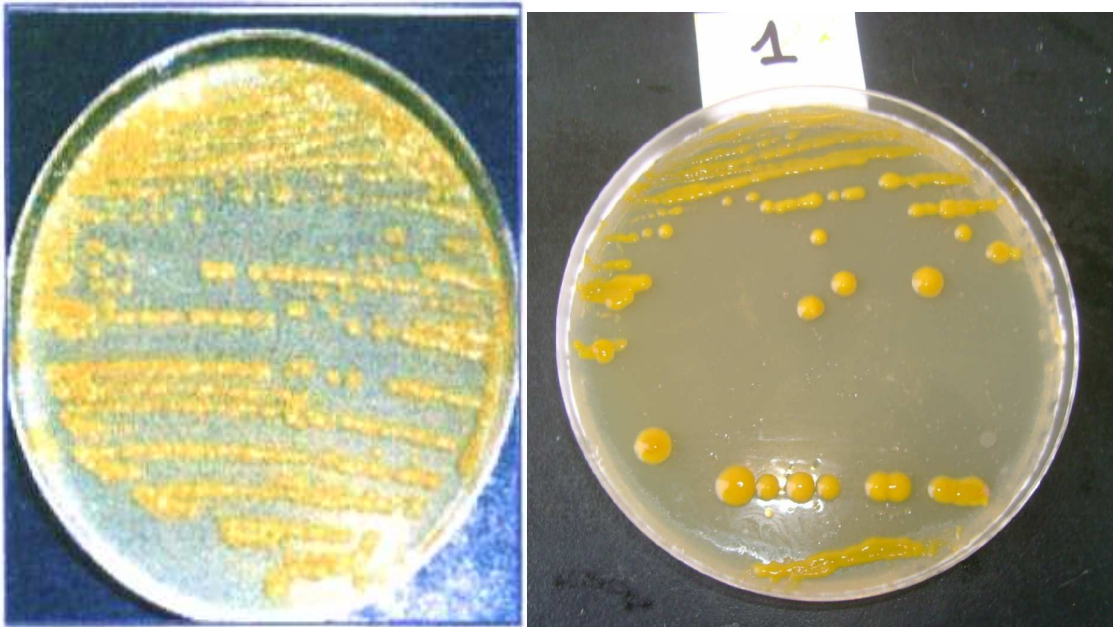
La souche retenue pour le reste de notre étude est 1YB-R12T.

##### 1.2/- Caractérisation morphologique et biochimique de la souche 1YB-R12T

###### 1.2.1/- Etude morphologique

###### 1.2.1.1/- Sur gélose nutritive et gélose Mueller Hinton

Après 72h d'incubation à 30°C, les colonies sont de taille moyenne (1 à 1.3 mm de diamètre), avec un bord régulier, bombées, opaques avec une surface lisse et brillante, visqueuses et pigmentées en jaune ocre qui vire avec le temps à l'orange. Le pigment n'est pas diffusible dans le milieu et au-delà d'une à deux semaines d'incubation à +4°C elle produit beaucoup de mucus. Sur gélose Mueller Hinton, les colonies sont relativement volumineuses, bombées, très brillantes et très visqueuses et la pigmentation est plus foncée que sur le premier milieu (Figure 15).



**a/-** Culture âgée de plus d'une semaine  
Sur gélose nutritive conservée à +4°C

**b/-** Culture âgée de plus d'une semaine sur  
gélose Mueller Hinton conservée à +4°C

Figure 15 : Photos représentant l'aspect des colonies de la souche 1 Y B- R12 T  
âgée de plus de 7 jours sur un milieu ordinaire (a) et un autre riche (b).

#### 1.2.1.2/- Après observation microscopique

La souche 1YB-R12T est caractérisée surtout par un cycle morphogénétique très variable. Après 3 à 7 jours d'incubation à 30°C, elle apparaît au microscope photonique (Zeiss G X 1000) sous forme de branches ramifiées qui se fragmentent pour donner naissance à beaucoup de longs filaments (12-80 x 0.5-1µm), de bacilles (2-4 x 0.5-1µm) et quelques cocci. Après 15 à 20 jours et plus, la culture est composée uniquement de cocci (0.5-7µm x 0.9-1.5µm) (Planche 1).

#### 1.2.2/- Etude des caractères biochimiques et physico - chimiques

##### 1.2.2.1/- Optimisation de quelques facteurs de croissance

Cette bactérie pousse bien sur la gélose nutritive, la gélose TSA, la gélose TGEA et la Gélose Columbia. L'optimum de croissance est obtenu sur la gélose TSA. Aucun développement n'est observé sur la gélose de Mac Conkey.

La température optimale de croissance déterminée par la mesure de la densité optique à  $\lambda = 600 \text{ nm}$  se situe entre 28°C et 30°C avec des chiffres respectifs de l'ordre de 1.969 et 2.033 (courbe 1). Au-delà de 30°C, la croissance a nettement diminué pour atteindre une DO de 0.815 à 37°C et 0.285 à 40°C. A des températures en dessous de 28°C (20°C, 25°C et 27°C), la croissance est importante. Nous tenons à préciser que sur milieu gélosé une croissance dense est aussi obtenue après incubation à ces deux températures. Au cours de la conservation de cette souche à +4°C elle se prolifère lentement.

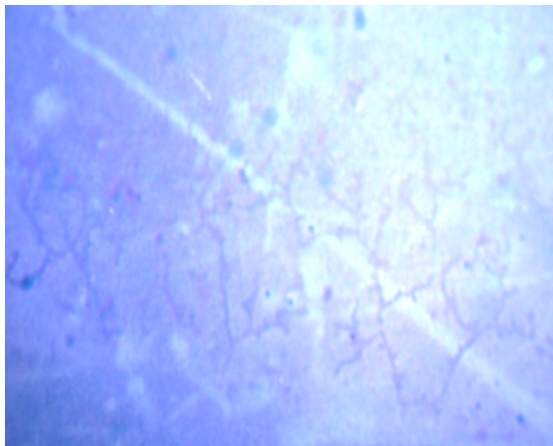
La densité cellulaire obtenue à la même longueur d'onde au cours du suivi de la cinétique de croissance en bouillon nutritif à 30°C et en fonction de temps, montre bien que cette bactérie est psychro-tolérante. La phase exponentielle de son développement s'étale sur 10 jours environ (courbe 2).

Le pH optimal de croissance déterminé après la mesure de la densité cellulaire se situe entre 7.3 et 8 avec des DO respectives de 1.974 et 1.848 (courbe 3). Il y'a lieu de noter que cette bactérie peut croître à des pH allant de 3 à 11.

La souche 1YB-R12T tolère des taux importants de Na Cl. Selon les résultats obtenus (courbe 4), la concentration seuil de tolérance déterminée par la mesure de la densité cellulaire (DO = 1.725) correspond à un taux de 4 % en Na Cl. La tolérance de cette bactérie en sel, va jusqu'à 6 % (DO = 1.253). A des concentrations élevées en Na Cl (8 % à 14 %), la croissance est trop faible et stable. Les mêmes résultats sont obtenus sur milieu gélosé.

##### 1.2.2.2/- Caractérisation biochimique

Aucune précipitation n'est observée après traitement d'une colonie de la souche 1YB-R12T avec quelques gouttes d'une solution de KOH à 20%. Ceci montre que les pigments flévirubines sont absents.

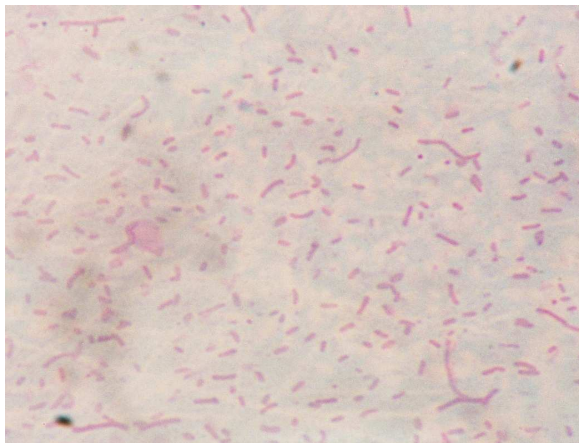


a

(cultures âgées de trois jours)

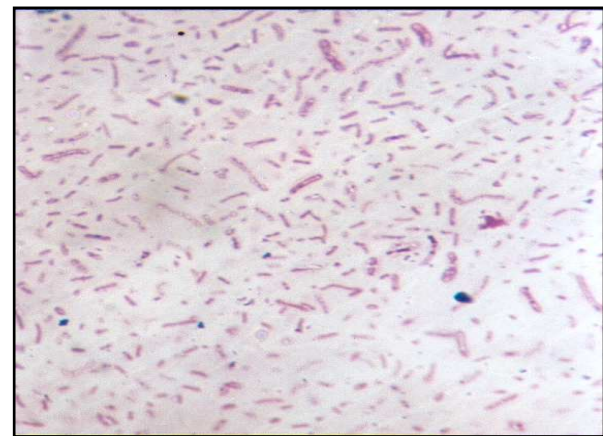


b

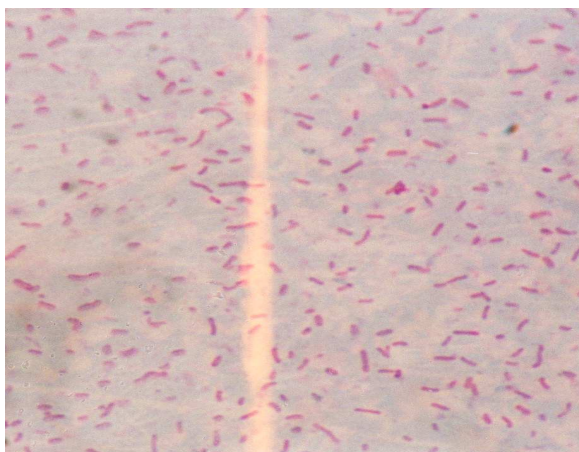


c

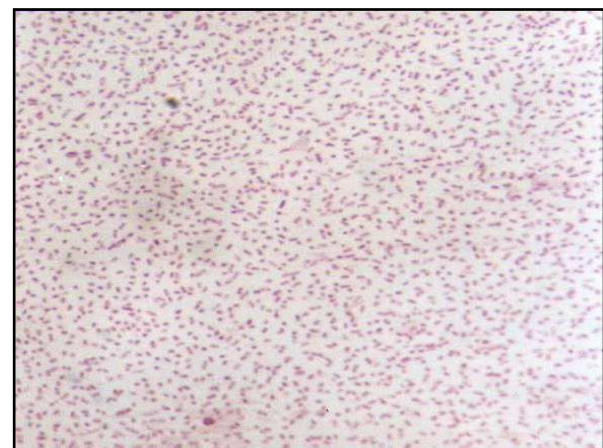
(cultures âgées de trois jours)



d

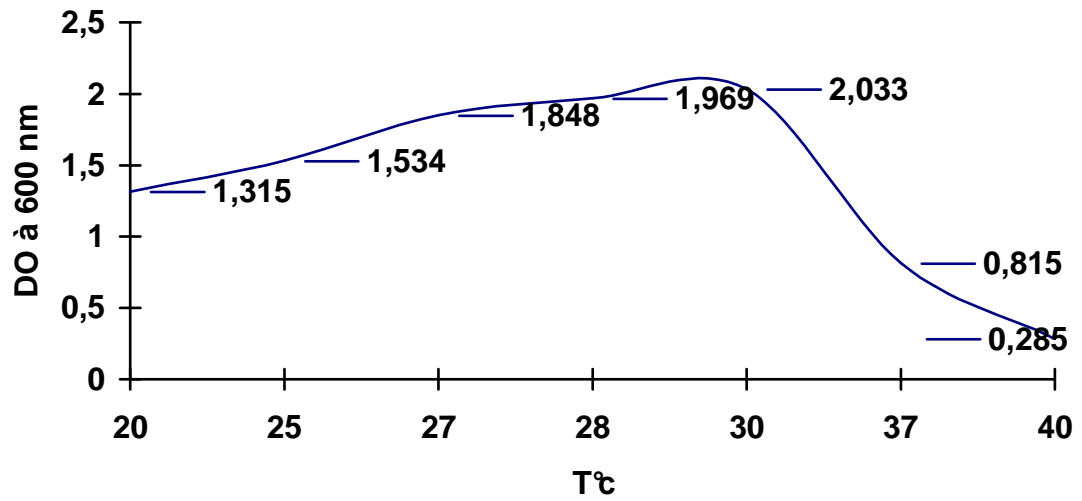


e (culture âgée de 7 jours)

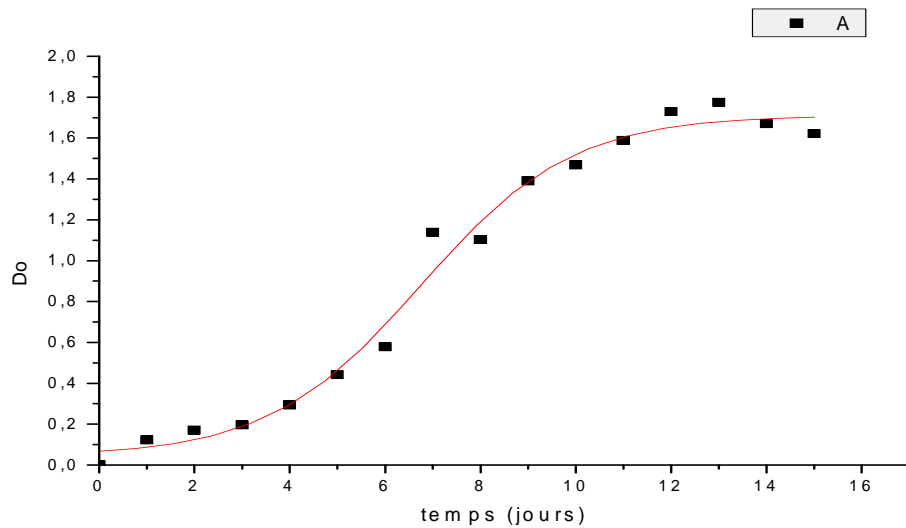


f (culture âgée de plus de 20 jours)

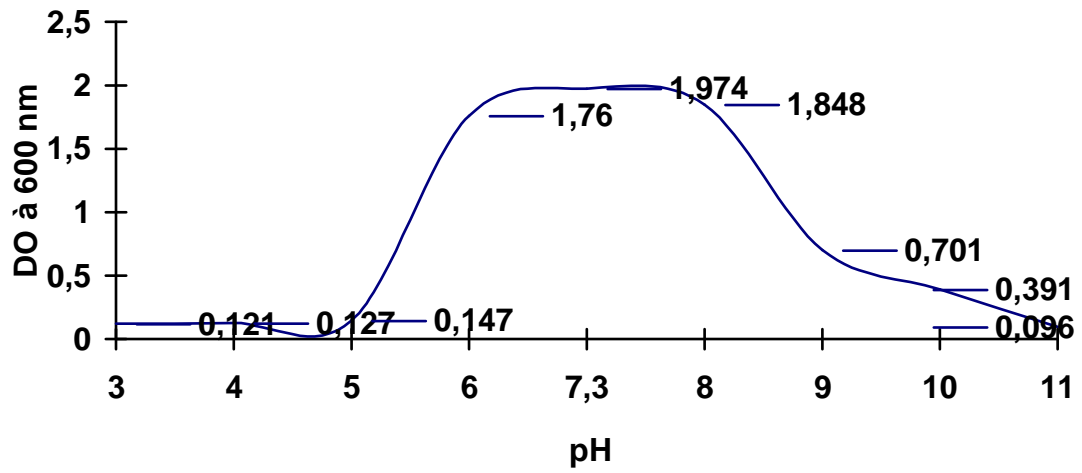
**Planche 1:** Figures représentant la morphologie cellulaire de la souche **1YB-R12T** après coloration de **Gram** (coloration double). Observation au microscope photonique (ZEISS- HB 050/AC) **G x 1000**



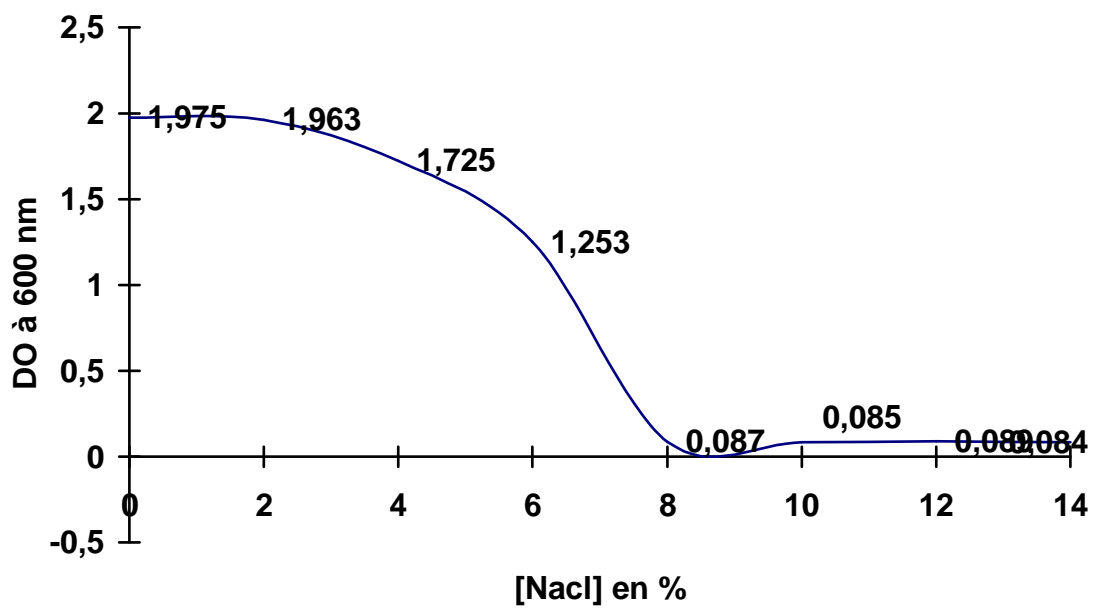
Courbe 1: Evolution de la croissance de la souche 1YB-R12T en fonction de la température



Courbe 2: Evolution de la croissance de la souche 1YB-R12T en fonction de temps



Courbe 3: Evolution de la croissance de la souche 1YB-R12T en fonction de pH



Courbe 4: Evolution de la croissance de la souche 1YB-R12T en fonction de la [Na Cl]

Aucun développement n'est obtenu sur milieu gélosé contenant une concentration de 2.5 mg/ml de lysozyme, ce qui indique que cette bactérie est sensible.

La souche 1YB-R12T ne pousse pas sur la gélose KIA (Kligler, Iron, Agar) et par conséquent ne produit pas de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S). Elle est dépourvue de la tryptophane désaminase (TDA -), de la tryptophanase (indole -), de l'ornithine décarboxylase (ODC -) et de la lysine décarboxylase (LDC -). Les citrates ne sont pas utilisés comme seule source de carbone sur le milieu citrate de SIMMONS (citrate perméase -). La B galactosidase est absente, ainsi que la lécithinase. Elle n'hydrolyse pas le Tween 20, le Tween 80, l'amidon, l'esculine, l'ADN, la caséine et le sang de cheval, contrairement à l'urée et l'arginine (uréase + et ADH +). Les nitrates sont réduits en nitrites (nitrate réductase +). Pour les sucres testés, aucun n'a été dégradé excepté le D glucose qui a donné un léger virage au jaune après plus d'une semaine (Tableau IX).

Les mêmes résultats sont obtenus avec les galeries api 20 E et 20 NE. Pour la galerie 20 E l'amygdaline n'a pas été dégradé et le virage de la couleur dans la cupule du glucose a été très faible (jaune pale) après 72h d'incubation à 30°C.

### 1.3/- Identification moléculaire de la souche 1YB-R12T

Cette identification est basée surtout sur des caractères génotypiques comme la séquence du gène codant pour l'ARNr 16s (gène *rrs*), qui est considéré actuellement comme un outil d'identification très fiable et rapide et aussi la détermination du contenu de l'ADN en bases (G+C) moles % permettant de confirmer l'identification d'un nouveau genre dans le cas où le taux de similitude entre la séquence du gène de l'ARNr 16S de ce dernier et celle des taxons proches est inférieur à 97%. Si ce taux est < 97% une hybridation est nécessaire pour déterminer l'espèce.

La détermination du profil des acides gras pariétal est aussi d'une importance considérable. Elle permet la mise en évidence des acides gras communs entre les membres du même genre, la détection de nouveaux acides gras caractéristiques pour un taxon donné, ainsi que leur taux et leur structure.

#### 1.3.1/- Le séquençage

La séquence complète du gène codant pour l'ARNr 16S obtenue est alignée manuellement avec celles des taxons les plus proches obtenus de Gen - Bank. (Benson et al., 1999) en utilisant le Ribosomal Database Projet II (Maidak et al., 2001) et la séquence alignment editor Bio Edit (Hall, 1999). La position de la séquence et les régions contenant des <indels>, régions avec des insertions ou des délétions créant des trous <<gaps>>, sont supprimées de l'analyse. Les distances génétiques entre paires de séquences sont corrigées pour les substitutions multiples de bases par la méthode de Jukes & Cantor (1969).

Tableau IX: Caractères différentiels entre la souche 1YB-R12<sup>T</sup> et les espèces proches.

1: 1BY-R12<sup>T</sup>, 2: C haifense souche LMG 24029<sup>T</sup> (Hantsis-Zakarov & Halpern, 2007)  
 3 : C bovis souche LMG 24227<sup>T</sup> (Hantsis-Zakarov et al., 2008), 4 : C hispanicum souche JCM 13554<sup>T</sup> (Gallego et al., 2006), 5 : C arothri souche DSM 19326<sup>T</sup> (Campbell et al., 2008), 6 : C hominis souche CCUG 52711<sup>T</sup> (Vaneechoutte et al., 2007), 7: C caeni souche DSM 17710<sup>T</sup> (Quan et al., 2007), 8: C Pallidum souche DSM 18015<sup>T</sup> et 9: C molle souche DSM 18016<sup>T</sup> (Herzog et al., 2008).

Caractéristiques	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Pigmentation:	Y	C	C	Y	Y	Y	Y	C	C
Flexirubines :	-	+	+	-	-	-	+	-	-
Type respiratoire:	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Croissance sur:									
TSA agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mac Conkey agar	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl (%):	0-4	0-2.5	0-2.5	0-3	0-2.5	0-3	0-2	0-2	0-2
Croissance à:									
4°C	+	+	+	+	-	ND	+	-	-
20°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37°C	F	+	+	-	+	+	+	+	+
40°C	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Activités enzymatiques:									
Uréase	+	-	-	-	-	-	+	+	+
ADH	+	-	-	-	-	-	+	+	+
LDC	-	-	-	-	-	-	-	+	+
ODC	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Tween 80	-	ND	ND	-	+	-	-	+	+
Réduction des nitrates	+	-	+	+	-	+	-	+	+
B galactosidase	-	+	+	-	-	-	+	-	-
Production de:									
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	+	-	-	+	+
Indole	-	+	-	w	-	+	-	+	+
production d'acide à partir de:									
D glucose	+	+	+	+	+	+	-	+	+
L arabinose	-	-	-	-	-	-	-	+	+
D fructose	-	+	-	+	+	-	-	-	-
Lactose	-	+	+	-	-	-	-	+	+
Maltose	-	+	+	+	+	+	-	+	+
D mannitol	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Trehalose	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
D xylose	-	-	-	+	-	-	-	ND	ND
Aesculine	-	+	+	+	-	+	-	+	+
(G+C)moles %:	40.9	37.8	38.6	34.3	36.5	36.5	38.2	38.1	39.2
Habitat	Sol	Lait	Lait	Eau poisson	Sang	Bioréacteur	Plantes	Plantes	
Pays	Algérie	Palestine		Espagne	USA	Belgique	Koréa	Allemagne	

Y= pigment jaune ; C= pigment crème; A=aérobie ; F= Très faible; w = après une semaine ; ND= non déterminé ; + = positif ; - = négatif

L'arbre phylogénétique de la souche 1YB-R12T est construit selon la méthode de rapprochement des voisins (Neighbour joining) (Saitou & Nei, 1987) et le maximum de ressemblance (Felsenstein, 1993). Une analyse par sous échantillonnage de type (bouts traps) est réalisée sur 1000 répétitions dans le but de déterminer le niveau de confiance dans les topologies obtenues (Felsenstein, 1985). La représentation graphique de l'arbre phylogénétique est obtenue à l'aide d'un logiciel spécifique.

L'arbre phylogénétique (figure 16), établi à partir de la séquence complète composée de 1473 pb montre que la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> est un nouveau membre de la famille des Flavobacteriaceae. Cette dernière, est l'une des principales familles du groupe Cytophaga, Flavobacterium, Bacteroides (Bernadet et al., 2002), dont le nombre de genres et d'espèces nouvelles ne cesse d'augmenter chaque année.

### 1.3.2/- Détermination du taux de (G+C) moles %

Le contenu de l'ADN chromosomique en bases (G+C) de cette bactérie, déterminé par la méthode chromatographique (HPLC) est de 40.9 moles %.

### 1.3.3/- La chimio - taxonomie (analyse des acides gras de la paroi)

Le profil des acides gras cellulaires obtenus pour la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> est différent de celui des autres espèces proches comme le montre le tableau X. Le taux et la structure de chaque acide gras est comme suit :

Anteiso-C15:0 (41.4%), iso-C15:0 (14.4%), iso-C17:1 w9c (9.0%), iso-C16:0 (7.2%), C17:0 2-OH (5.7%), iso-C17:0 3-OH (5.2%), iso-C16:0 3-OH (4.2%), iso-C16:1 H (2.8%), anteiso-C15:1 A (2.4%), iso-C14:0 (2.0%), anteiso-C17:1 w9c (1.8%), C15:0 2-OH (1.4%), C16:1 w3c (1.3%), C16:1 w7c (1.0%), iso-C15:0 2-OH (1.0%), C16:1 w6c (1.0%), C18:0 2 DMA.

Sur la base de ces critères morphologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires, la souche 1YB-R12T appartient au genre *Chryseobacterium* dont la plupart des espèces sont isolées de l'environnement (Sol, eaux usées et salées), et forme une branche monophylétique avec l'espèce *Chryseobacterium haifense* souche H 38<sup>T</sup> (=LMG 24029<sup>T</sup>=DSM 19056<sup>T</sup>).

Elle est aussi étroitement liée à d'autres branches composées des espèces *Chryseobacterium bovis* souche H 9<sup>T</sup> (=LMG 24227<sup>T</sup>=DSM 19482<sup>T</sup>), *Chryseobacterium hispanicum* souche VP48<sup>T</sup> (=JCM13554<sup>T</sup>=CCM5973<sup>T</sup>=CECT7129<sup>T</sup>), *Chryseobacterium aquaticum* souche 10-46<sup>T</sup> (=KCTC12483<sup>T</sup>=CECT7302<sup>T</sup>), *Chryseobacterium hominis* souche NF802<sup>T</sup> (=CCUG 52711<sup>T</sup>=CIP109415<sup>T</sup>), *Chryseobacterium caeni* souche N4<sup>T</sup> (=DSM 17710<sup>T</sup>=KCTC 12506<sup>T</sup>=CCBAU 10201<sup>T</sup>), *Chryseobacterium pallidum* souche 26-3St2b<sup>T</sup> (=DSM 18015<sup>T</sup>=CCUG 52548<sup>T</sup>) et *Chryseobacterium molle* souche DW3<sup>T</sup> (=DSM 18016<sup>T</sup>=CCUG 52547).

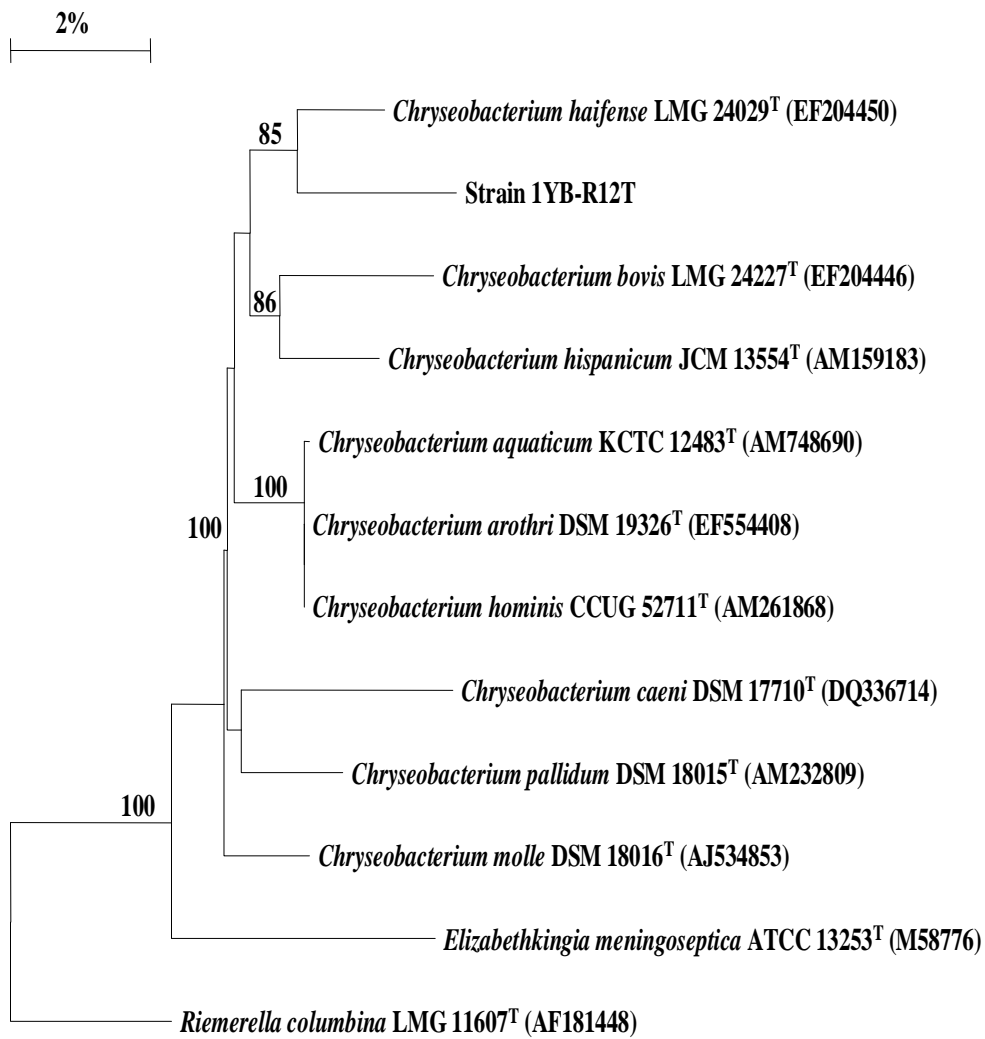


Figure 16: Position Phylogénétique de la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> à l'intérieur du genre *Chryseobacterium*, sur la base de la séquence du gène 16S rRNA.

Tableau X: Profil des acides gras cellulaires (%) de la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> et les espèces Proches du genre *Chryseobacterium*.

1: 1YB-R12T<sup>T</sup>, 2: *C. haifense* souche LMG 24029<sup>T</sup> (Hantsis - Zakarov & Halpern, 2007), 3: *C. bovis* souche LMG 24227<sup>T</sup> (Hantsis - Zakarov et al., 2008), 4: *C. hispanicum* souche JCM 13554<sup>T</sup> (Gallego et al., 2006), 5: *C. arothri* souche DSM 19326<sup>T</sup> (Campbell et al., 2008), 6: *C. hominis* souche CCUG 52711<sup>T</sup> (Vaneechoutte et al., 2007), 7: *C. caeni* souche DSM 17710<sup>T</sup> (Quan et al., 2007), 8: *C. pallidum* souche DSM 18015<sup>T</sup> et 9: *C. molle* souche DSM 18016<sup>T</sup> (Herzog et al., 2008).

Fatty acid	1	2	3	4	5	6	7	8	9
anteiso-C15:0	41.4	16.6	15.6	03.0	05.45	08.8	04.3	05.2	10.3
Iso-C15:0	14.4	41.6	38.9	22.6	35.3	31.5	26.4	41.8	32.3
iso-C17:1w9c	09.0	02.7	14.8	01.5	-	15.6	-	-	-
iso-C16:0	07.2	-	-	-	-	-	-	-	-
C17:0 2-OH	05.7	01.0	01.3	-	00.8	-	-	-	-
iso-C17:0 3-OH	05.2	10.3	12.7	17.5	14.9	18.1	09.8	11.4	10.1
iso-C16:03-OH	04.2	01.1	01.6	-	Tr	-	-	-	-
iso-C16:1H	02.8	-	-	-	-	-	-	-	-
Anteiso-C15:1 A	02.4	-	-	-	-	-	-	-	-
Iso-C14:0	02.0	Tr	Tr	-	-	-	-	-	-
anteiso-C17:1w9c	01.8	-	-	-	-	-	-	-	-
C15:02-OH	01.4	Tr	Tr	-	Tr	-	-	-	-
C16:1 w3c	01.3	-	-	-	-	-	-	-	-
C16:1 w7c	01.0	-	-	-	-	-	-	-	-
iso-C15:0 2-OH	01.0	-	-	-	-	-	-	-	-
C16:1w6c	01.0	-	-	-	-	-	-	-	-
C18:0 2 DMA	Tr	-	-	-	-	-	-	-	-

- = non déterminé, Tr = sous forme de trace

Par comparaison avec les espèces les plus proches, le taux de similitude le plus élevé relevé est de 96.8 % avec l'espèce *C. haifense* souche LMG 24029<sup>T</sup> (EF 204450) dont la séquence complète est composée de 1483 paires de bases, et un taux inférieur à 96 % avec l'espèce *C. bovis* souche LMG 24227<sup>T</sup> (EF 204446) avec une séquence de 1485pb. Les deux espèces précitées ont été isolées du lait cru de vache à Haifa (Palestine) au cours d'une étude réalisée sur la biodiversité de la microflore du lait (Hantsis-Zakarov & Halpern, 2007 ; Hantsis-Zakarov et al., 2008).

Notre souche diffère de ces deux taxons par quelques caractères phénotypiques (Tableau IX). *Chryseobacterium haifense* et *Chryseobacterium bovis* sont colorées en crème et la pigmentation en jaune doré n'apparaît que si les cultures sont incubées sous conditions de haut éclairage. *Chryseobacterium haifense* possède une α-galactosidase, une escultine ce qui lui confère la capacité d'hydrolyser l'esculine. Elle produit aussi de l'indole et les pigments flexirubines, par contre la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> est dépourvue de ces enzymes.

Les deux espèces précitées tolèrent une [Na Cl] égale à 3 % par contre la concentration tolérée par la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> est de 1 % à 6 % avec une concentration optimale de 4 % de Na Cl.

Les autres espèces rattachées phylo-génétiquement à notre souche (Figure 16), ont certains caractères phénotypiques communs avec elle comme la présence d'une nitrate réductase, l'absence des pigments flexirubines et des décarboxylases ainsi que l'incapacité de dégrader les sucres tels que le mannitol, le tréhalose, le D xylose et les autres (Tableau IX).

Le contenu de l'ADN chromosomique en bases (G+C) de la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> est très important (40.9 moles %) alors qu'il est de 37.8 moles % pour *C. haifense* et de 38.6 moles % pour *C. bovis*.

La chimio-taxonomie a montré que les acides gras majoritaires chez la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> sont : anteiso-C<sub>15:0</sub> (41.4%), iso-C<sub>15:0</sub> (14.4%), iso-C<sub>17:1</sub> w9c (9.0%) et iso-C<sub>16:0</sub> (7.2%) avec la présence de deux autres sous forme de traces, anteiso-C<sub>15:1</sub> A et C<sub>18:0</sub> 2 DMA. Ces derniers sont considérés comme inconnus, car ils n'ont pas été mis en évidence chez les autres espèces identifiées du genre *Chryseobacterium* (Tableau X).

Les acides gras prédominants chez *C. haifense* et *C. bovis* sont les mêmes, mais avec des taux différents ; anteiso-C<sub>15:0</sub> (16.6% et 15.6%), iso-C<sub>15:0</sub> (41.6% et 38.9%), iso-C<sub>17:1</sub> w9c (2.7% et 14.8%).

Deux acides gras minoritaires identifiés chez la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> C<sub>17:0</sub> 2-OH et C<sub>15:0</sub> 2-OH sont aussi présents chez *C. haifense*, *C. bovis* et *C. arothri*. Pour l'acide gras iso-C<sub>14:0</sub> est présent sous forme de traces chez les deux premières espèces seulement.

Il y'a lieu de remarquer que les acides gras suivants : iso-C<sub>15:0</sub>, anteiso-C<sub>15:0</sub> et iso-C<sub>17:0</sub> 3-OH sont présents chez toutes les espèces rattachées phylo génétiquement à la souche 1YB-R12T<sup>T</sup>.

Nous tenons à signaler que les acides gras suivants : iso-C<sub>15:0</sub>, iso-C<sub>17:0</sub> 3-O H, iso- C<sub>17:1</sub> w9c, anteiso-C<sub>17:1</sub> w9c sont souvent majoritaires chez les membres du genre Chryseobacterium, par contre anteiso-C<sub>15:0</sub> est minoritaire. Chez la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> ce dernier est prédominant (tableau XI).

Sur la base des résultats phénotypiques, génotypiques et de la chimiotaxonomie, la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> est considérée comme une nouvelle espèce du genre Chryseobacterium, et on lui a attribuée le nom de « Chryseobacterium solincola », qui est un nom latin en relation directe avec son habitat le sol.

La souche type est 1YB-R12T<sup>T</sup> (=DSM -1183<sup>T</sup> = CCUG - 55604<sup>T</sup>).

Le numéro d'accèsion de la séquence génomique obtenu du séquençage de l'ARNr 16S de la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> est : EU 516352.

D'après le Bergey's Manual de systématique et de bactériologie (2001), la classification de cette espèce est comme suit :

Domaine des Bacteria

Phylum B X X	: Bacteroidetes
Classe II	: Flavobacteria
Famille	: Flavobacteriaceae
Genre	: Chryseobacterium
Espèce	: Chryseobacterium solincola

Tableau XI: Profil des acides gras cellulaires (%) majoritaire chez les souches du genre *Chryseobacterium* et la souche 1YB-R12<sup>T</sup>.

1: 1YB-R12<sup>T</sup>, 2: *C. ureilyticum* souche F - fue - 04IIIaaaa<sup>T</sup> (Herzog et al., 2008), 3: *C. gambrini* souche 5 -lsTIIa<sup>T</sup> (Herzog et al., 2008), 4: *C. formosense* souche CC-H3-2<sup>T</sup> (Young et al., 2005), 5: *C. daecheongense* souche DSM 15235<sup>T</sup> (Kim et al., 2005 a), 6: *C. defluvii* souche B2<sup>T</sup> (Kampfer et al., 2003), 7: *C. soli* souche JS6-6<sup>T</sup> (Weon et al., 2008), 8: *C. jejuense* souche JS17-8<sup>T</sup> (Weon et al., 2008), 9: *C. Wanjuense* souche DSM 17724<sup>T</sup> (Weon et al., 2006), 10: *C. taiwanense* souche LMJ23355<sup>T</sup> (Tai et al., 2008), 11: *C. aquifrigidense* souche KCTC12894<sup>T</sup> (Park et al., 2008), 12: *C. piscium* souche CCUG 51923<sup>T</sup> (De Beer et al., 2006), 13: *C. shigense* souche DSM 17126<sup>T</sup> (Shimumora et al., 2005), 14: *C. balustinum* souche LMG 8329<sup>T</sup> (Hugo et al., 2003), 15: *C. indologenes* souche NCTC 10796<sup>T</sup> (Hugo et al., 2003), 16: *C. indoltheticum* souche ATCC27950<sup>T</sup> (Hugo et al., 2003), 17: *C. scophthalmum* souche LMG 13028<sup>T</sup> (Hugo et al., 2003), 18: *C. joostei* souche KCTC 12128<sup>T</sup> (Hugo et al., 2003), 19: *C. gleum* souche NCTC 11432<sup>T</sup> (Hugo et al., 2003), 20: *C. taeaanense* souche NBRC 100863<sup>T</sup> (Park et al., 2006), 21: *C. soldanellicola* souche KCTC 12382<sup>T</sup> (Park et al., 2006), 22: *C. taichungense* souche CCUG 50001<sup>T</sup> (Chen et al., 2005), 23: *C. vrystaatense* souche LMG 22846<sup>T</sup> (De Beer et al., 2005), 24: *C. luteum* souche P456/04<sup>T</sup> (Behrendt et al., 2007).

Acides gras	Iso-C15:0	iso-C17:0 3 OH	iso-C17:1w9c	anteiso-C15:0
1	14.0	05.2	09.0	41.4
2	40.2	14.7	tr	00.4
3	57.4	16.2	tr	00.6
4	51.7	10.6	04.3	02.4
5	56.1	17.4	tr	01.0
6	61.8	13.3	tr	01.4
7	15.7	15.0	15.5	01.6
8	26.8	21.2	12.1	01.6
9	40.0	21.9	11.7	tr
10	43.0	16.6	17.5	tr
11	45.5	13.0	14.4	tr
12	22.0	14.0	12.9	03.8
13	24.7	19.1	13.3	02.8
14	32.3	16.8	27.1	tr
15	38.2	21.0	27.3	02.0
16	29.5	14.0	24.6	04.9
17	35.4	16.4	21.7	tr
18	22.6	17.5	15.5	01.9
19	38.3	22.1	24.1	tr
20	36.1	18.8	15.8	01.1
21	24.0	18.3	11.2	05.5
22	35.4	22.4	08.9	00.7
23	41.8	-	22.0	17.0
24	40.51	16.15	-	03.7

tr: sous forme de traces, - : non déterminé

## 2/- Etude de la résistance aux agents antimicrobiens

### 2.1/- Les métaux lourds

#### 2.1.1/- Détermination des concentrations seuils de la résistance

Les résultats obtenus de cette étude montrent bien que ce nouveau taxon de la famille des Flavobacteriaceae tolère des concentrations non négligeables des trois ions métalliques testés (plomb, zinc, cadmiu). Les concentrations tolérées sont de l'ordre de 500ug/ml pour le  $Pb^{2+}$ , 300ug/ml pour le  $zn^{2+}$  et 150ug/ml pour le  $cd^{2+}$  (Figure 17).

Pour pouvoir interpréter ces résultats, il est très important de préciser que l'origine de cette souche bactérienne est un sol pollué surtout par des hydrocarbures et des rejets de pneus de véhicules de la ville de MEFTAH. Il est connu que les hydrocarbures contiennent une concentration importante de plomb comme antidétonant, en plus de son abondance fréquente dans l'environnement due aux divers rejets déchargés un peu partout dans la nature.

Cependant, cette tolérance de haut niveau au plomb (500ug/ml) chez la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> peut être due à une adaptation physiologique naturelle. Par conséquent, cette bactérie a développé certains systèmes et mécanismes de résistance comme moyen de défense et de lutte contre les conditions hostiles de cet écosystème. Il y'a lieu de noter que les ions du plomb sont très toxiques pour les différents systèmes biologiques cellulaires, et n'ont pas de rôle dans le métabolisme. Toutefois, la présence du plomb dans le milieu peut induire certaines voies métaboliques telles que celle du pyruvate et une partie de celle de la cobalamine, composé essentielle pour la biosynthèse de la méthionine nécessaire au renouvellement du pool thiol consommé par la bactérie pour détoxifier le  $Pb^{2+}$  et même la voie de réduction périplasmique dissimilative des nitrates surtout quand il est ajouté sous forme de  $[Pb(NO_3)_2]$  (Steenhoudt et al., 2001).

Il est aussi intéressant d'évoquer l'effet du pH du sol sur le degré de toxicité de cet agent minéral toxique. Selon la littérature, de haut niveaux de résistance au  $Pb^{2+}$  sont décrit chez de nombreuses bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Ces dernières années une étude détaillée sur la résistance à 13 métaux lourds chez une bactérie à Gram négatif (*Cupriavidus metallidurans* CH 34), isolée en Belgique (Houba, 1976), a mieux élucidé le mécanisme génétique de résistance vis-à-vis ce métal qui était mal connu (Mergey et al., 2003).

Concernant la résistance aux ions de zinc et de cadmium, il faut tout d'abord préciser que le premier métal ( $Zn^{2+}$ ) à de très faibles concentrations est considéré comme un cofacteur essentiel à l'activité et à la stabilité conformationnelle de certaines protéines de la cellule, mais au-delà d'un certain seuil, il devient toxique. Le second ( $Cd^{2+}$ ), est connu d'être très toxique pour la plupart des bactéries même en concentrations minimales comme le mercure. Il agit

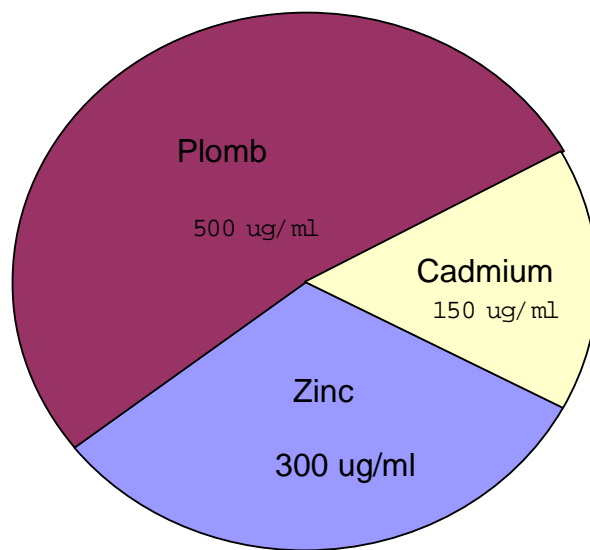


Figure 17: Evaluation du taux de la résistance aux trois sels métalliques  
Chez la souche 1 Y B- R12 T<sup>T</sup>.

comme inhibiteur compétitif vis-à-vis des cations essentiels tel que le zinc. La présence de ces deux métaux lourds dans l'environnement est due surtout aux rejets provenant des différentes activités industrielles. Le cadmium peut aussi être considéré comme l'un des déchets majeurs des activités nucléaires.

Cette forte résistance à ces deux agents toxiques (300ug/ml et 150ug/ml respectivement) observée chez la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> peut être liée à une adaptation à ces conditions extrêmes tel que le cas pour le plomb, ce qui a induit le développement ou la production de certaines molécules (protéines) et systèmes de résistance constitutives. Ces résultats nous donne aussi une idée sur le degré de pollution du milieu d'origine de cette souche, et la nature des effluents contaminant ce sol, provenant d'une pollution directe (rejets) ou indirecte liée à la cimenterie de la ville de MEFTAH. Le mécanisme de séquestration qui est généralement enclenché en présence de stimuli - toxiques et assure la résistance peut aussi être envisagé.

Les microorganismes des environnements pollués doivent donc développer des mécanismes de résistance leur permettant de contre-balancer l'effet des fortes concentrations en métaux lourds, tout en assurant le maintien du rôle biologique des ions essentiels. Il convient de faire la différence entre la résistance aux ions métalliques dans des domaines de concentrations situés juste au dessus de la CMI et les véritables résistances conduisant à l'adaptation à des milieux extrêmes. Il faut aussi faire une corrélation entre les hautes résistances aux métaux lourds et le degré de la pollution de l'environnement (Diaz-Ravinâ & Baath, 2001 ; Mertens et al., 2006).

Les métaux lourds sont connus pour leurs effets très toxiques pour les bactéries et de porter atteintes à leurs différentes molécules très importantes même vitales (enzymes et acides nucléiques) et par conséquent leurs activités biologiques (Nies, 1999 ; Hengstler et al., 2003). Néanmoins, certains sont impliqués dans l'induction de quelques voies métaboliques tels que le cas du cuivre et du plomb, ce qui explique en partie les taux élevés de résistance vis-à-vis de ces deux métaux lourds chez les bactéries à Gram négatif en général et de la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> en particulier (pour le plomb). L'activation de ces voies métaboliques induites pourrait être le résultat de l'induction de certains facteurs sigma qui activeraient à leur tour tout un réseau de régulation. Ce facteur est connu pour son implication dans la réponse aux carences et aux stress des bactéries des environnements pollués (Lonetto et al., 1992 ; Gross et al., 2007).

Le métabolisme du glutathion semble être aussi activé en présence des deux ions métalliques précités (cuivre et plomb). Ce composé (glutathion « GSH ») peut fixer les ions lourds afin de permettre leur immobilisation dans le cytoplasme. Il est composé d'un tripeptide très important, produit en cas de stress bactérien surtout en cas d'une forte acidité, une forte salinité ou une forte concentration des ions métalliques (Murata et al., 1985 ; Chesmey et al., 1996 ; Ferguson & Booth, 1998 ; Riccillo et al., 2000).

Les modifications qu'entraîne ce tripeptide laissent supposer qu'il s'agit d'un agent de détoxification du premier ordre (Xiang et al., 2001 ; Figueira et al., 2005).

La croissance de cette bactérie en présence de fortes concentrations de plomb ( $Pb^{2+}$ ), de zinc ( $Zn^{2+}$ ) et de cadmium ( $Cd^{2+}$ ), laisse suggérer que ses protéines intrinsèques ne sont pas ou sont peu infectées et aussi supposer qu'elle est dotée d'un ou de plusieurs éléments génétiques qui codent pour des systèmes et des mécanismes variés de résistance (Tibazarwa et al., 2000 ; Grass et al., 2001). Ces éléments génétiques peuvent être de nature constitutive ou inductible, le cas le plus fréquent (Nies et al., 1998 ; Franke et al., 2001 ; Saltikov et al., 2002), portés par des molécules d'ADN extra chromosomique (Beveridge et al., 1997 ; Almas et al., 2004). Chez de nombreuses bactéries à Gram négatif, la résistance au cadmium ( $Cd^{2+}$ ) et au zinc ( $Zn^{2+}$ ) est toujours liée à celle du cobalt ( $Co^{2+}$ ) et parfois à celle du plomb ( $Pb^{2+}$ ). Elle peut être réalisée par des protéines de transport ATP dépendantes, par des protéines gouvernées par le système *czc* ou par des protéines *CDF*.

Il a été démontré que la présence du cadmium dans le milieu induit l'augmentation de la synthèse de certaines protéines spécifiques chez quelques bactéries à Gram négatif (*Rhizobium leguminosarum*) ce qui leur confèrent le pouvoir de tolérer et de résister à des concentrations considérables (2m Mol/l) de ce métal (Figueira et al., 2005). Ce mécanisme peut être incriminé pour expliquer cette insensibilité remarquée chez la souche 1YB-R12T<sup>T</sup>.

Le premier mécanisme d'insensibilité au cadmium déterminé, via un transporteur ATPase-type P est celui de *Staphylococcus aureus* codé par l'opéron *cad* et porté par le plasmide *pI-258* (Nucifora et al., 1989 ; Yoon & Silver, 1991 ; Endo & Silver, 1995 et 1996). Ces dernières années, d'autres opérons similaires ont été détectés et décrits chez des bactéries à Gram (+) et à Gram (-). L'opéron *zntA* d'*Escherichia coli*, code pour une protéine ATPase - type P de structure très proche de la protéine *CadA*. La protéine *ZntA* confère la résistance au zinc, au cadmium et au plomb. Son expression est régulée par la protéine *ZntR* de la famille *MerR*. En général, la résistance au  $Cd^{2+}$  est due à une extrusion active des ions de ce métal vers l'extérieur de la cellule grâce à *CadA* qui peut aussi expulser d'autres ions métalliques comme le  $Zn^{2+}$  et le  $Pb^{2+}$  quand ils sont présents en fortes concentrations (Rensing et al., 1998). Il a été démontré que les gènes codant pour les protéines ATPase-type P, principaux agents de l'extrusion des ions lourds sont nombreuses et leur répartition chez les bactéries est très variable. L'analyse phylogénétique de ces protéines, a permis leur regroupement dans trois classes distinctes ; la classe I comporte 4 ATPases qui seraient impliquées dans l'efflux du  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  et le  $Pb^{2+}$  ; la classe II avec deux protéines intervenant dans la résistance aux  $Cu^{2+}$  et  $Ag^{2+}$  et la classe III avec deux protéines similaires aux ATPases - type *FixI* de *Bradyrhizobium* dont les substrats transportés sont inconnus (Nies, 2003).

La résistance aux  $\text{Cd}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  via l'extrusion chimio osmotique par le système *czc* identifié chez un grand nombre de bactéries à Gram négatif est effectué lorsque les gènes *czc* sont exprimés via les ARNm correspondants. La détoxification des ions métalliques se fait par la diminution de leur taux d'accumulation intracellulaire due à leur expulsion du cytoplasme vers le périplasma puis la membrane externe pour se retrouver enfin à l'extérieur. Le déterminant génétique *czc* gouverne un polypeptide composé de trois séquences protéiques, CzcA de la famille RND qui assure l'antiport cations-protons, CzcB de la famille MFP (protéines de fusion membranaires) qui assure le lien entre CzcA dans la membrane interne et la protéine canal CzcC appartenant aux OMF (facteurs externes membranaires), insérée dans la membrane externe (Nies, 1995). Ce sont des protéines de transport constituant la pompe à éfflux Czc CBA chez les bactéries à Gram négatif (Nies, 2003). L'expression de cette pompe à éfflux est régulée par un système à deux composantes CzcR et CzcS ainsi que deux autres protéines CzcI et CzcN qui seraient impliquées dans la régulation de l'opéron *czc* (Zgurskaya & Nikaido, 2000 a et b).

Ce complexe protéinique CzcCBA fait partie des pompes à éfflux de type HME -RND et il est codé par au moins 13 gènes distribués sur les différents opérons des quatre classes de protéines HME - RND (Liesegang et al., 1993 ; Diels et al., 1995 a et b).

La résistance au cadmium et au zinc par le système CDF, est réalisée grâce à la protéine de transport CzcD dont la synthèse est sous le contrôle de l'opéron *czc*. Cette protéine est le premier transporteur chimio osmotique qui permet le passage des ions métalliques au travers de la membrane interne (Anton et al., 1999 ; Chao & Fut, 2004 ; Naz et al., 2005 ; Stahler et al., 2006).

Une haute résistance de la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> aux plomb (500ug/ml), zinc (300ug/ml) et cadmium (150ug/ml) peut être aussi liée à la présence de certains systèmes éfflux de support génétique chromosomique.

Des études récentes effectuées sur l'espèce *Cupriavidus metallidurans* CH 34 ont mis en évidence la présence de l'opéron *pbr* TRABCD (Borremans et al., 2001). Nous tenons à préciser qu'il est le seul à avoir été caractérisé chez les bactéries à Gram - négatif. Le mécanisme biochimique de la résistance demande tout d'abord le passage du plomb du périplasma vers le cytoplasme de la cellule par la protéine PbrT. Une fois à l'intérieur, les ions du plomb dérèglent le promoteur *ppbrA*, ce qui conduit à l'expression des gènes de structure *pbr* ABCD. L'étape suivante consiste à expulser le plomb du cytoplasme par l'intermédiaire de la protéine PbrA qui est une ATPase - type P similaire à CadA. L'énergie nécessaire lui est fournie de l'hydrolyse de l'ATP. La translocation du plomb de la membrane interne vers l'extérieur de la cellule est réalisée par la lipoprotéine PbrB. La deuxième lipoprotéine PbrC serait requise pour cliver la séquence signal de PbrB afin de lui permettre de pénétrer dans la membrane externe. La transcription des gènes de structure de l'opéron *pbr* est inhibée lorsque le répresseur est lié aux promoteurs *ppbrA* / *ppbrR*. Le répresseur PbrR possède un domaine de liaison à l'ADN et un autre de liaison au plomb. Les gènes *pbrR* et *pbrT* sont transcrits de manière divergente par rapport aux gènes de structure

(Borremans et al., 2001). Cette insensibilité remarquable vis - à - vis les ions métalliques de plomb, de zinc et de cadmium chez cette bactérie psychro -tolérante et halotolérante peut être aussi en relation avec la quantité importante d'exo- poly saccharides produite. Il a été rapporté que ces derniers peuvent jouer le rôle d'une barrière aux ions métalliques chez les souches du genre *Rhizobium* (Santamaria et al., 2003).

#### 2.1.2/ - Evaluation du taux d'accumulation des ions métalliques en fonction du pH

La densité cellulaire évaluée des cultures témoins de la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> en milieu de culture contenant de l'extrait de levure comme seule source de carbone et d'énergie à différents pH est relativement faible par rapport à celle des cultures mères. A pH = 7.3 La DO obtenue à  $\lambda = 600\text{nm}$  est de 1.033 pour la culture mère contre 0.888 pour celle du témoin. Cette baisse au niveau de la densité cellulaire, semble être en relation directe avec le taux de germes ensemencés dans le premier type de cultures (inoculum de 10 %) contre une colonie de taille importante dans le deuxième (Tableau II d en annexe).

En présence des différents métaux lourds (cadmium, zinc, plomb) avec une concentration de 100 mg/l de milieu pour chacun, la densité cellulaire déterminée est légèrement faible pour les deux premiers métaux (cadmium et zinc) par rapport à celle des témoins. Celle du plomb est relativement importante (Figure 18). A pH = 7.3 Les densités optiques (DO) déterminées sont: 0.444, 0.547 et 0.689 respectivement pour le cadmium, le zinc et le plomb contre 0.888 pour le témoin. Cette baisse au niveau de la densité peut être due au choc (stress) causé par les ions métalliques sur les cellules bactériennes mises en contact directement avec ces polluants toxiques d'une part, et à l'effet du pH du milieu d'une autre.

Pour interpréter ce résultat, il est intéressant d'évoquer la charge des différentes molécules cellulaires et leur stabilité à pH neutre ou voisin de la neutralité. Il se pourrait que cela a conduit à la dissociation des ions métalliques des différents groupements et des protéines. Les concentrations résiduelles des trois métaux lourds quantifiées par le dosage en utilisant la méthode spectroscopique sont faibles dans l'ensemble. Elles varient en fonction du pH et du métal testé (Figure 18) et (Tableau II e en annexe).

Pour le Cadmium, la concentration déterminée  $[\text{Cd}^{2+}]_r$  à pH égal à (5, 5.5 et 7.3) est légèrement supérieure par rapport aux autres pH, avec des résultats respectifs de 13.26 mg/l, 9 mg/l et 15 mg/l. Les concentrations obtenues à pH basique sont faibles et fluctuent entre

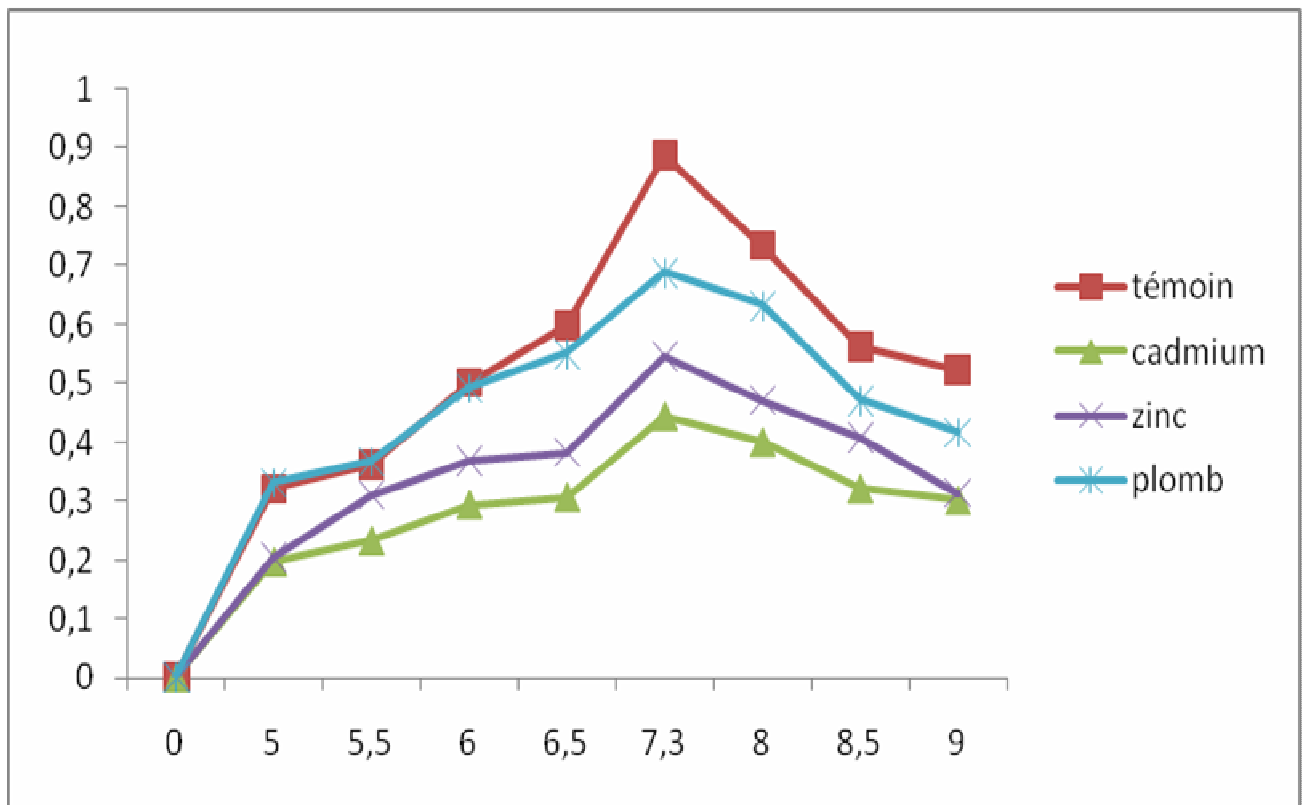


Figure 18: Courbes de croissance de la souche étudiée en absence et en présence des ions métalliques en fonction du pH

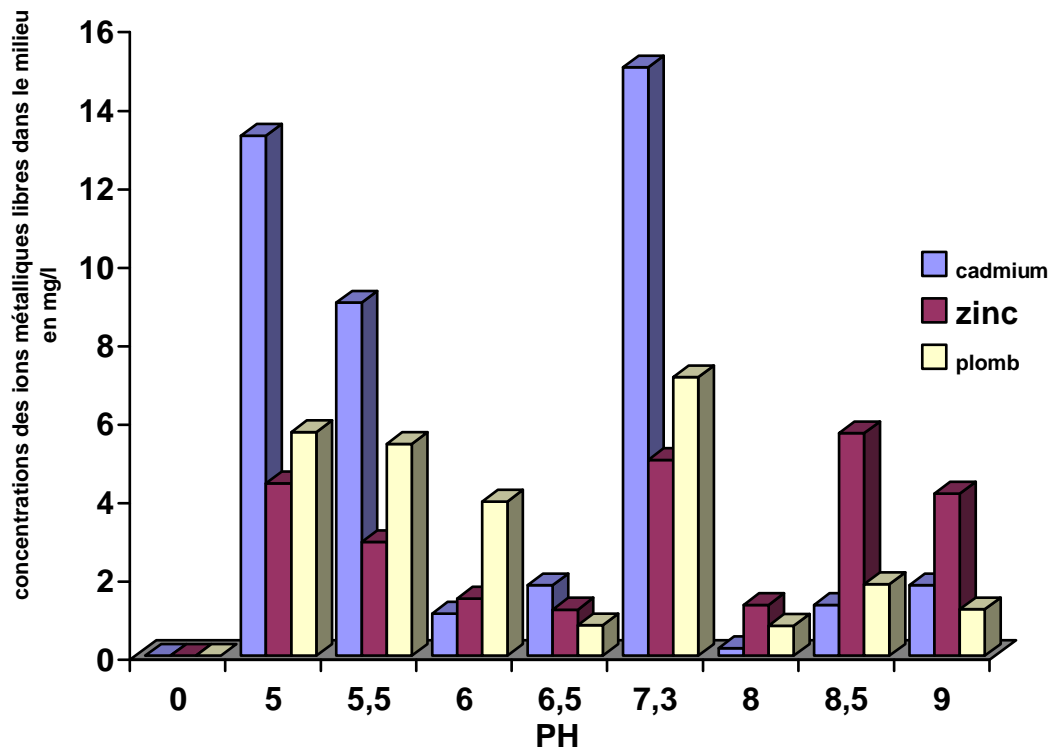
0.198 mg/l et 1.800 mg/l. Les résultats obtenus pour le zinc  $[Zn^{2+}]_r$  à pH très acide (pH = 5) et à pH neutre (pH = 7.3) sont de l'ordre de 4.40 mg/l et 5 mg/l. Ces concentrations sont de 5.672 mg/l et 4.14 mg/l environ aux pH (8.5 et 9).

Pour les ions du plomb, la  $[Pb^{2+}]_r$  est de 7.1 mg/l à pH égal à 7.3. Cette concentration est plus ou moins importante à pH acide (5 et 5.5) avec des résultats de 5.7 mg/l et 5.4 mg/l respectivement. Pour des pH élevés, elle fluctue entre 0.76 mg/l et 1.83 mg/l.

Sur la figure 19, on constate que la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> a capturé presque la totalité des ions métalliques présents dans le milieu, raison pour laquelle la concentration des métaux libres déterminée est faible. A pH acide (pH = 5 et 5,5), l'effet toxique du  $Cd^{2+}$  est relativement considérable par rapport au zinc et au plomb avec environ 86,74 mg/l et 91 mg/l des ions sont adsorbés ou absorbés contre 95,6 mg/l et 97,1 mg/l pour  $Zn^{2+}$  et 94,3 mg/l et 94,6 mg/l pour  $Pb^{2+}$ . La densité cellulaire mesurée est aussi en accord avec ces résultats soit une DO = 0,197 et 0,233. Il est à noter que la toxicité du cadmium diminue avec l'augmentation du pH. Cependant, la concentration des ions capturés à pH neutre (pH = 7,3) est de 85 mg/l seulement. La concentration résiduelle plus ou moins importante à pH neutre peut être due au relarguage ou le relâchage des ions après la mort et la lyse de certaines cellules et de même la libération des ions par compétition avec d'autres cations. La même remarque peut être faite pour les deux autres ions métalliques ( $Zn^{2+}$  et  $Pb^{2+}$ ) à pH neutre.

Pour des pH basiques, on constate que l'effet toxique des trois métaux lourds testés est faible, ceci semble être en relation avec leur degré de solubilité. Il est à préciser que la complexation des métaux lourds et les constantes de stabilité conditionnelle augmentent avec l'augmentation du pH, due à la diminution de la compétition du métal avec les protons pour les sites complexants. Par contre due au caractère poly-électrolyte et polyfonctionnel des exsudats tels que les exo poly-saccharides, une augmentation du rapport métal - exsudat ou de la force ionique a montré une diminution dans les constantes de stabilité conditionnelle. Les exo- polysaccharides bactériens, au regard de leurs caractéristiques physico-chimiques (teneurs en oses acides et en oses amines, substituants sulfates et pyruvates), constituent d'excellents bio- accumulateurs de métaux solubles (Lamelas, 2007).

Sur la base de ces résultats, on constate qu'une forte concentration des ions métalliques testés a été capturée par les cellules bactériennes de la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> selon des mécanismes d'adsorption ou d'absorption. Ceci, semble être étroitement lié aux seuils de résistance déterminés pour chaque métal (150ug/ml pour  $Cd^{2+}$ , 300ug/ml pour  $Zn^{2+}$  et 500ug/ml pour  $Pb^{2+}$ ). Cette forte accumulation de métaux est due donc soit à une complexation entre les ions métalliques et les ligands se situant à la surface des bactéries soit à une internalisation ou à une diffusion (Daisuke et al., 2006). Dans le cas d'une accumulation par absorption, on peut supposer que les ions métalliques sont stockés dans les différents compartiments des bactéries tels que les vacuoles, mais ceci ne pourra être confirmé qu'après une observation au microscope électronique.



**Figure 19:** Histogramme représentant Les concentrations résiduelles métalliques dosées dans le milieu de culture en fonction du PH

Les fluctuations observées au niveau des résultats obtenus à différents pH (acides, neutre, basiques), peuvent être expliquées en partie par l'effet de ce paramètre physico chimique sur le phénomène d'ionisation des métaux lourds d'une part et sur la structure de l'enveloppe et de la membrane cellulaire d'autre part. Il a été démontré que le stress causé par certains ions métalliques, la salinité et l'acidité sur les micro-organismes est souvent accompagné par un changement dans l'ultra-structure de l'enveloppe cellulaire (Leppard & Rao, 1988).

En effet, beaucoup d'auteurs considèrent le pH comme l'un des principaux facteurs affectant la toxicité des métaux lourds (Babiche & Stotzky, 1978 ; Cooney & Pettibone, 1986 ; Dean Ross & Mills, 1989 ; Dean-Ross, 1991 ; Benyehuda et al., 2003). Il a été rapporté que les ions métalliques ont une faible solubilité à pH alcalin (Hahne & Kroontje, 1973).

A la lumière de ces résultats, on peut dire que cette nouvelle espèce bactérienne du genre *Chryseobacterium*, appartenant à la famille des Flavobacteriaceae, isolée du sol est très intéressante et peut être utilisées dans le processus de bioremédiation de l'environnement en particulier dans la dépollution des sols contaminés surtout par les métaux lourds précités ainsi que dans le traitement des fluides pollués.

## 2.2/- Etude de la résistance aux antibiotiques

Les résultats obtenus de l'étude de la sensibilité de la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> vis-à-vis des 45 antibiotiques appartenant à 16 familles différentes par la méthode de diffusion en milieu gélosé, montrent que cette dernière est insensible à 11 d'entre eux, soit un taux de 25 % environ (Tableau II f en annexe).

Une résistance de haut niveau (résistance totale « Rt ») est observée pour 8 antibiotiques testés (imipénème, cefuroxime, tétracycline, acide nalidixique, acide pipémidique, fosfomycine, furanes, nitrofurantoines). Des résistances à bas niveau ou intermédiaires (Ri) sont relevées pour la céfalotine, la Dibékacine et l'acide fusidique.

Sur 15 antibiotiques testés de la famille des • lactamines, une résistance est observée vis-à-vis de la Céfuroxime (Rt), la Céfalotine (Ri) et l'Imipénème (Rt). Pour les autres • lactamines (Pénicillines, Ampicilline et dérivés), cette bactérie est très sensible.

Parmi 8 agents testés de la famille des aminosides et aminocyclitol, une seule résistance à bas niveau est observée vis-à-vis de la Dibékacine (Ri).

La tétracycline les furanes et les nitrofuranes n'ont exercé aucune activité inhibitrice sur la croissance de cette bactérie. La même remarque peut être faite pour l'acide nalidixique et l'acide Pipémidique contrairement à l'ofloxacin (Quinolones).

Une forte sensibilité est constatée pour les glycopeptides (Vancomycine), le Chloramphénicol, la Lincomycine, les polypeptides (Bacitracine, Colistine), les macrolides (Erythromycine, Spiramycine), la Rifampicine, les Sulfamides et associés, la Fluméquine, la Nitroxoline et la Pristinamycine.

Ces résultats sont en partie en accord avec ceux obtenus par Bellais et al., 2000 a,b au cours d'une étude réalisée sur des souches du genre *Chryseobacterium* isolées des milieux aquatiques.

Pour interpréter cette poly-résistance chez ce nouveau taxon du genre *Chryseobacterium*, il est très important de rappeler que trois principaux mécanismes de résistance sont décrits chez les bactéries à Gram négatif: Imperméabilité ou diminution de la perméabilité de la membrane cellulaire, modification ou altération de la cible et inactivation des molécules d'antibiotique par production d'enzymes.

La résistance observée vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines, peut être liée surtout à la production d'enzymes ( $\beta$ -lactamases) appartenant à une ou plusieurs classes de la famille des Métallo- $\beta$ -lactamases (M- $\beta$ ls), qui peuvent combiner chez cette bactérie. Il a été rapporté que les espèces du genre *Chryseobacterium* produisent beaucoup d'enzymes de ce type (Rasmussen et al., 1990 ; Sanschaguin et al., 1998 ; Bellais et al., 2000 a, b ; Guiadkowski, 2001). Ces dernières, peuvent être des Céphalosporinases de nature constitutive (chromosomique) à bas niveau et à sécrétion inductible, ce qui a conduit à l'hydrolyse des céphalosporines de la première génération (Céfalotine) et de la deuxième (Céfuroxime). Il est à signaler que la production de cette catégorie d'enzymes a été mis en évidence chez de nombreuses espèces de la famille des Flavobacteriaceae telles que *Chryseobacterium meningosepticum* (Bush & Jacoby, 1995 ; Bellais et al., 2000 a,b et 2002), *Chryseobacterium indologenes* (Bellais et al., 1999), *Chryseobacterium gleum* et *Flavobacterium johnsoniae* (Bernardet et al., 1996 ; Naas et al., 2003) et de même chez plusieurs bactéries à Gram négatif phylo - génétiquement éloignées de ce genre comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* et *Acinetobacter* (Le Minor & Veron, 1990 ; Hood & Amyes, 1991 ; Vila et al., 1993 et 1995)

L'insensibilité de haut niveau à l'Imipénème est peut être le résultat de l'activité d'une  $\beta$ -lactamase (M- $\beta$ ls) à spectre étroit ou à spectre élargi de nature constitutive. La résistance aux Carbapénèmes et autres  $\beta$ -lactamines a été déjà démontré et caractérisée chez le genre *Chryseobacterium* en particulier chez les espèces *C meningosepticum* (BlaB-1 et GOB-1), *C indologenes* (IND-1) et *C gleum* (CGB-1 et CGA-1) (Osamo et al., 1994 ; Rasmussen et al., 1997 ; Bloch et al., 1997 ; Visalli et al., 1997 ; Rossolini et al., 1998 ; Di Pentima et al., 1998 ; Bush et al., 1998 ; Lauretti et al., 1999 ; Woodford et al., 2000 ; Kirby et al., 2004).

Des souches de *Chryseobacterium meningosepticum* très résistantes à l'Imipépène ont aussi été isolées en Chine (Chen et al., 2006). Ces dernières années, il a été démontré que la résistance aux carbapénèmes (Imipénème) chez ce genre bactérien peut être portée sur des éléments génétiques mobiles (intégrons) (Bellais et al., 2000 a, b et 2002).

Nous tenons à évoquer la détection des enzymes de type  $\beta$ -lactamases spécifiques (IMP-1, GIM-1, VIM-1, SPM-1, SIM-1, SFB-1 ...) acquises chez beaucoup de bactéries à Gram négatif isolées dans plusieurs pays (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Serratia fonticola* et d'autres entérobactéries). Elles confèrent la résistance de haut niveau aux carbapénèmes et parfois à d'autres  $\beta$ -lactamines, et leurs gènes sont portés sur des intégrons et des plasmides (Arakawa et al., 1995 ; Senda et al., 1996 ; Livermore, 1997 ; Bradford et al., 1997 ; Walsh et al., 1997 ; Marchese et al., 1998 ; Comaglia et al., 1999 ; Koh et al., 1999 ; Lauretti et al., 1999 ; Philippon & Arlet, 2005 ; Jacoby, 2006).

Il a été rapporté que chez certaines bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*), la résistance intrinsèque aux carbapénèmes (imipénème) est en relation directe avec le système d'efflux Czc CBA qui assure le transport des métaux lourds (zinc, cadmium, cobalt). Certains auteurs ont suggéré l'existence d'une co-régulation entre les composantes du système d'efflux des ions métalliques et le système d'import de l'imipénème. Donc, la présence de ces métaux lourds en particulier le zinc (métaallo- $\beta$ -lactamases sont zinc dépendantes) dans des environnements contaminés, pourrait donc induire des bactéries mutantes résistante à l'imipénème même en absence de tout contact avec cet antibiotique (Perron et al., 2004). Cette hypothèse peut expliquer la résistance de notre souche à l'imipénème.

La résistance de haut niveau à la Tétracycline chez la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> peut être le résultat d'activation de l'expression de système d'efflux transmembranaire spécifique, ne permet que l'extrusion de molécules apparentées contrairement aux systèmes d'efflux poly-résistance. Ce mécanisme biochimique confère aux bactéries l'insensibilité à toutes les molécules de Tétracyclines. Cette résistance observée peut être aussi liée à une mutation dans la région régulatrice des systèmes d'efflux multirésistance. Ceci, a conduit à une surexpression des systèmes d'efflux constitutives associés à la modification quantitative et qualitative des porines. Il a provoqué une diminution dans la perméabilité membranaire et a conduit à l'acquisition d'une résistance aux  $\beta$ -lactamines, aux quinolones et à la Tétracycline. Il est à signaler que des systèmes d'efflux constitutifs ont été identifiés chez de nombreuses bactéries à Gram négatif en particulier chez *P. aeruginosa* et *E. coli* dont le rôle principal est de diminuer la concentration intra cellulaire des antibiotiques, mais ils confèrent généralement des résistances à bas niveau (Nikaido, 2000).

Selon la littérature, plusieurs espèces nouvelles du genre *Chryseobacterium* isolées de différentes niches écologiques ainsi que d'autres appartenant aux différents genres de la famille des Flavobacteriaceae sont résistantes à cet antibiotique (Nedashkovskaya et al., 2004 ; Vaneechoutte et al., 2007 ; Herzog et al., 2008).

La résistance de haut niveau aux quinolones (acide nalidixique et acide pipémidique), peut être le résultat d'une modification dans le gène *gyr A*, ce qui a conduit à un changement dans la sous unité A de l'ADN gyrase (cible des quinolones) et par conséquent diminution de l'affinité de ces molécules vis-à-vis leurs cibles. Ce mécanisme très fréquent chez les bactéries à Gram négatif provoque souvent une résistance croisée à des degrés divers pour l'ensemble des quinolones et une résistance de haut niveau surtout pour l'acide nalidixique (Carbon et al., 1995).

Il existe un mécanisme de résistance lié aux systèmes d'efflux multi - drogues constitutives qui confèrent aux bactéries la résistance à bas niveau aux quinolones, aux tétracyclines et d'autres antibiotiques dont la cible est intracellulaire, mais ne peut pas expliquer l'insensibilité de notre souche (Michel et al., 2005).

Une résistance intermédiaire à un seul aminoside (Dibekacine) peut être d'origine chromosomique et dont les gènes sont soit peu exprimés et dans ce cas la bactérie est faiblement résistante, ce qui est le cas de la souche 1YB-R12T<sup>T</sup>, ou non exprimés du tout et la bactérie est parfaitement sensible. Une imperméabilité relative à la production d'exo polysaccharides ou de modification des LPS qui conduit à des niveaux de résistance très faibles et isolés, peut expliquer en partie le résultat obtenu pour notre souche. La résistance par altération de la cible ne peut être envisagée parcequ'elle provoque souvent une résistance de haut niveau. Par contre, une insensibilité liée à une activité enzymatique ou à un système efflux actif constitutive peut être incriminée (Moore et al., 1999 ; Mine et al., 1999 ; Westbrook et al., 1999 ; Rosenberg et al., 2000). La résistance aux aminoglycosides a été démontrée chez beaucoup de souches du genre *Chryseobacterium* (Aber et al., 1978 ; Bloch et al., 1997 ; Hsuch et al., 1996 a,b et 1997 ; Sibellas et al., 2007).

La résistance aux furanes et aux nitrofuranes, peut être naturelle (chromosomique), liée surtout à une réduction enzymatique (nitrofurane réductase). Pour la Fosfomycine, cette insensibilité de haut niveau peut être acquise ce qui a conduit soit à une inactivation enzymatique de cet antibiotique ou bien à une modification dans le système de transport de ces molécules. En plus de ce dernier mécanisme, la résistance à bas niveau à l'acide Fusidique peut être aussi due à une altération de la cible intracellulaire.

Pour la pénicilline, les macrolides, la novobiocine et la vancomycine, la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> est très sensible. Ce résultat mérite d'être souligné, vue que les bactéries à Gram négatif sont le plus souvent naturellement résistantes aux antibiotiques hydrophobes et/ou de poids moléculaire élevé ce qui rend leur pénétration au travers de la membrane externe de la paroi impossible. Pour expliquer ce phénomène, on peut supposer que cette bactérie a subi une ou plusieurs mutations ce qui a conduit à une modification qualitative et quantitative au niveau de ces protéines membranaires (porines) et a fait diminuer ou inhiber la synthèse de certaines enzymes (penicillinase). Ceci, a permis à ces agents d'atteindre leurs cibles et agir activement sur ce micro-organisme.

### 3/- Transfert génétique et détermination du support génétique de la résistance

Le transfert génétique (conjugaison) réalisé entre la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> et la souche d'E coli (receptrice), a montré que le caractère de résistance à l'imipénème, la céfalotine et la tétracycline n'a pas été transféré. Ceci, laisse supposer que les déterminants génétiques responsables de la résistance à ces antibiotiques sont portés sur le chromosome. Il est à préciser que le transfert de la résistance plasmidique ou d'autres éléments génétiques extra chromosomiques est inconnu chez le genre *Chryseobacterium* (Michel et al., 2005).

Il a été démontré que la résistance à l'imipénème chez beaucoup de bactéries à Gram négatif est portée sur des intégrons chromosomiques (Zong et al., 2003). De ce fait, les intégrons représentent une sérieuse menace de diffusion rapide des facteurs de résistance chez une espèce bactérienne (Bellais et al., 2000 a, b; Michel et al., 2005). Pour la céfalotine et la tétracycline, les gènes de résistance peuvent aussi être organisés sur le chromosome.

Selon les profils d'ADN obtenus sur gel d'agarose (figure 20), on observe un seul type de bande identique au niveau des 4 premiers échantillons de la souche 1YB-R12T<sup>T</sup>. La même constatation peut être faite pour l'échantillon n° 5 (souche receptrice E coli BM 21 Na<sup>R</sup>) avec une différence dans le niveau de position et la taille. Pour le dernier échantillon témoin (souche de référence contenant le plasmide pIP173 « • 127 kb avec le chromosome »), on constate la présence de deux bandes de taille et de position différentes. Par comparaison entre les résultats, on peut dire que notre souche ne contient que de l'ADN chromosomique ainsi que la souche receptrice. Ceci veut dire que cette bactérie est dépourvue d'éléments génétiques extra chromosomiques (plasmides), ce qui peut expliquer l'absence de transfert des caractères de résistance pour les antibiotiques chez la souche receptrice. De même, la position de la bande de la souche receptrice est au même niveau que celle du chromosome du témoin, ce qui indique qu'elle est effectivement dépourvue de plasmides. Cependant, la tolérance aux métaux lourds et la résistance aux différents antibiotiques déterminée chez ce nouveau taxon paraît être d'origine chromosomique (naturelle).

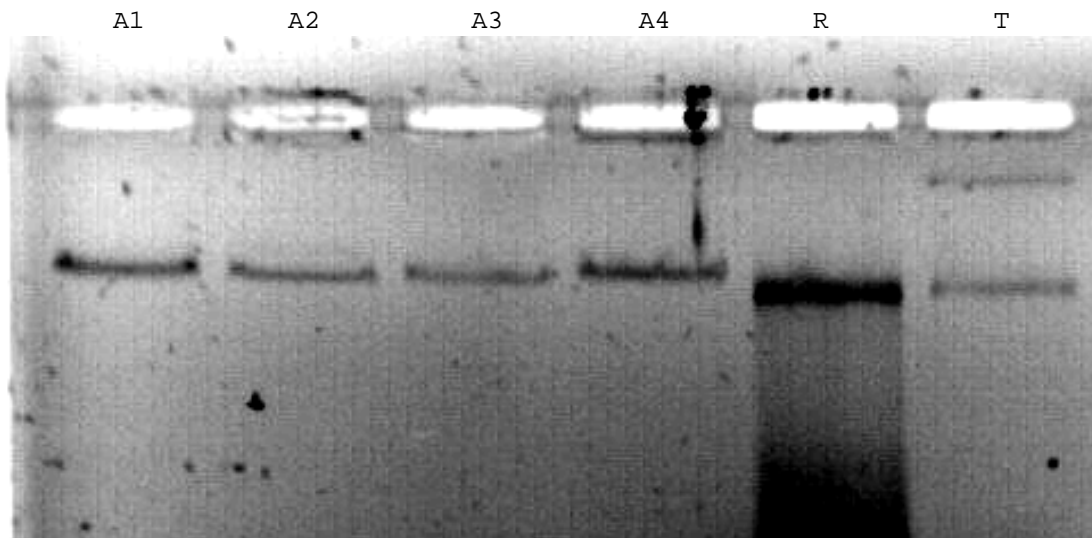


Figure 20: Profils plasmidiques obtenus après extraction de l'ADN plasmidique par la méthode de Kado et Liu (1981) et électrophorèse sur gel d'agarose 0.7%.

A1 + A2 + A3 + A4 : Profils de la souche 1YB-R12T<sup>T</sup>

R : Profil de la souche réceptrice E coli BM 21 Na<sup>R</sup>

T : Profil du témoin portant deux bandes (1<sup>ère</sup> bande en bas correspond à l'ADN chromosomique, 2<sup>ème</sup> bande en haut correspond à l'ADN du gros plasmide pIP173 • 127 kb).

## IV/- CONCLUSION

La protection de l'environnement est essentielle au bien être des différents êtres vivants et l'homme en particulier. Le développement durable au moyen de la prévention de la pollution est le but principal de tout le monde. Ceci, suscite le développement et l'utilisation de procédés pratiques qui empêchent en réduisant au minimum la production de polluants ou de déchets et par conséquent réduire les risques d'atteintes à l'environnement et à la santé humaine. Les méthodes physico-chimiques utilisées éliminent le ou/les contaminants mais la pollution y reste. Les méthodes biologiques sont simples, non dispendieuses et considérées comme les plus performantes vu leur large utilisation dans le traitement d'une grande variété de composés organiques et inorganiques. Elles utilisent des micro-organismes capables de dégrader principalement de façon aérobie les composés organiques et limiter la concentration de ceux qui sont inorganiques. Pour cette raison, il fallait tout d'abord déterminer quels micro-organismes étaient en mesure d'effectuer ce travail.

Dans cette optique, nous avons isolé de différentes niches écologiques extrêmement polluées par des hydrocarbures et d'autres types d'effluents d'origine urbaine et industrielle, puis identifiée 17 souches bactériennes sur la base des critères morphologiques, physiologiques et biochimiques. Elles sont à Gram positif, aérobies strictes, immobiles, non sporulées, pigmentées et avec une morphologie variable.

Une d'entre elles, provenant du sol de la ville de MEFTAH en 2006 est à Gram négatif (1YB-R12T). Elle est psychrotolérante (+4°C) avec une température optimale de croissance située entre 28°C et 30°C et Halotolérante (tolère une [Na Cl] allant de 1 % à 6 % avec un optimum à 4 %). Son pH optimum de croissance est de 7.3, avec un intervalle allant de (3 à 11). Elle est caractérisée surtout par un cycle morphogénétique très variable en fonction de l'âge de la culture.

Le séquençage de l'ARNr-16S de cette bactérie a montré qu'il s'agit d'un nouveau taxon du genre *Chryseobacterium* appartenant à la famille des Flavobacteriaceae. Le taux de similitude de la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> avec les espèces phylo-génétiquement proches est de 96.5 % avec *Chryseobacterium haifense* souche H38 isolée en 2007 d'un échantillon de lait à HAIFA en Palestine.

Le contenu de son DNA chromosomique en (G+C) est de 40.9 moles %.

Les acides gras cellulaires prédominants chez la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> obtenus de la chimio-taxonomie sont: anteiso-C<sub>15:0</sub> (41.4 %) et iso-C<sub>15:0</sub> (14.4 %).

Deux acides gras sous forme de traces sont mis en évidence pour la première fois chez une espèce de ce genre ; anteiso-C<sub>15:1</sub> A et C<sub>18:0</sub> 2DMA.

Le numéro d'accèsion de Gen Bank pour la séquence génomique obtenu du séquençage de l'ARNr 16S de la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> est : EU 516352.

Le nom latin attribué à ce nouveau taxon est *Chryseobacterium solincola* souche 1YB-R12T<sup>T</sup> (= DSM 1183<sup>T</sup> = CCUG 55604<sup>T</sup>).

- L'étude de la résistance aux métaux lourds montre que cette nouvelle bactérie tolère des concentrations non négligeables des trois ions métalliques testés soit ; 500 ug/ml pour le Pb<sup>2+</sup>, 300 ug/ml pour le zn<sup>2+</sup> et 150 ug/ml pour le cd<sup>2+</sup>.

Les concentrations résiduelles des trois métaux lourds évalués par le dosage en utilisant la méthode spectroscopique sont faibles dans l'ensemble et varient en fonction du pH et du métal testé.

Pour le Cadmium, la [Cd<sup>2+</sup>]<sub>R</sub> déterminée à pH acide et neutre (5, 5.5, 7.3) est respectivement de 13.26 mg/l, 9 mg/l et 15 mg/l. Les concentrations obtenues à pH basique sont faibles et fluctuent entre 0.198 mg/l et 1.800 mg/l.

Pour le zinc à pH=5 et à pH=7.3, la [Zn<sup>2+</sup>]<sub>R</sub> est de l'ordre de 4.40 mg/l et 5 mg/l. Par contre à pH basique (8.5 et 9) elle est de 5.672 mg/l et 4.14 mg/l.

La [Pb<sup>2+</sup>]<sub>R</sub> est de 7.1 mg/l à pH neutre avec 5.7 mg/l et 5.4 mg/l à pH acide (5 et 5.5). Pour des pH élevés (basiques) elle fluctue entre 0.76 mg/l et 1.83 mg/l.

Sur la base de ces résultats, on peut conclure que cette bactérie issue d'un environnement très pollué à un pouvoir dépolluant remarquable puisque le taux de captation des ions métalliques est supérieur à 80 %.

-Pour l'étude de la sensibilité de la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> vis-à-vis 45 antibiotiques par la méthode de diffusion en milieu gélosé on distingue :

✚ Une résistance totale pour: imipénème, cefuroxime, tétracycline, acide nalidixique, acide pipémidique, fosfomycine, furanes et nitrofurantoinés.

✚ Une résistance intermédiaire pour: la céfalotine, la dibécacine et l'acide fusidique.

-Le transfert génétique réalisé par un croisement (conjugaison) entre la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> et la souche receptrice d'E coli BM 21, montre que le caractère de résistance à l'imipénème, la céfalotine et la tétracycline n'a pas été transféré, ce qui indique que le support génétique n'est pas d'origine plasmidique.

Le profil plasmidique obtenu après extraction de l'ADN plasmidique et comparaison avec un témoin confirme l'absence des éléments génétiques autres que le chromosome. Donc, la souche 1YB-R12T<sup>T</sup> est naturellement résistante aux différents agents antimicrobiens.

#### Les perspectives

- Etudier la résistance et la tolérance de ce nouveau taxon vis-à-vis d'autres métaux lourds.
- Etudier le pouvoir dépolluant de cette bactérie en milieu ouvert (non stérile) et en même temps déterminer son pouvoir compétitif avec les autres micro-organismes.
- Etudier les mécanismes biochimiques impliqués dans la résistance aux agents antimicrobiens.
- Identifier par la PCR et le Séquençage les groupes et les sous groupes aux quels appartiennent les  $\beta$ -lactamases naturelles de cette bactérie, puis rechercher le degré de similitude entre ces dernières et celles des autres bactéries à Gram négatif provenant du milieu clinique et de l'environnement.
- Etudier la co-régulation entre le système d'efflux des métaux lourds et le système d'import de l'imipénème en cas d'existence.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

## Références bibliographiques :

- Aber, R.C., Wennersten, C. & Moellering, R.C.-Jr. (1978). Antimicrobiol susceptibility of Flavobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 14: 483-487.
- Allard, J.D., Gibbson, M.L., Vul, H., Nguyen, T.T. & Bertrand, K.P. (1993). Nucleotide sequence of class D tetracycline resistance genes from *Salmonella* Ordenez. *MGG Molecular & general genetics* Vol. 237, N. 1-2, 301-305
- Almas, A.R., Bakken, L.R. & Mulder, J. (2004). Changes in tolerance of soil microbial communities in zinc and cadmium contaminated soils. *Soil and Biochemistry* 36, 805-813.
- Anton, A., Weltrowski, A., Haney, C.J., Franke, S., Grass, G., Rensing, C. & Nies, D.H. (2004). Characteristics of zinc transport by two bacterial cation diffusion facilitators from *Ralstonia metallidurans* CH 34 and *E. coli*. *Journal of Bacteriology* Vol. 186, N°. 22, 7499-7507.
- Anton, A., GroBe, C., Reibman, J., Pribyl, T. & Nies, D.H. (1999). CzcD is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia metallidurans* strain CH 34. *Journal of Bacteriology* 181, 6876-6881.
- Arakawa, Y., Marakami, M., Suzuki, K., Ito, H., Wacharotayankun, R. & Ohsuka, S. (1995). A novel integron-like element carrying metallo  $\beta$ -lactamases gene bla<sub>IMP</sub>. *Antimicrobiol Agents Chemother* 39: 1612-1615.
- Babic, M.A., Hujer, A. & Bonomo, R.A. (2006). What's new in antibiotic resistance? Focus on  $\beta$ -lactamases. *Drug Resist. Uptat* 9, 142-156.
- Babiche, H. & Stotzky, G. (1978). Toxicity of zinc to fungi, bacteria and coliphages: influence of chloride ions. *Applied Environment Microbiol* 36, 906-914.
- Ballerini, D., Gatelier, C. & Vogel, T. (1998). Techniques de traitement par voies biologiques des sols pollués. *ABEME* 246P.
- Barbeyroun, T., L'Haridon, S., Corre, E., Kloareg, B. & Potin, P. (2001). *Zobellia galactanovorans* gen. Nov., sp. Nov., a marine species of Flavobacteriaceae isolated from a red alga, and reclassification of [Cytophaga] uliginosa (Zobelland Upham 1944) Reichenbach 1989 as *Zobellia uliginosa* gen. Nov., comb. Nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 985-997.
- Barrow, G.I. & Feltham, R.K.A. (1993). *Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria*. 3<sup>rd</sup> edn. Cambridge: Cambridge University Press.
- Behrendt, V., Ulrich, A., Spöer, C. & Schumann, P. (2007). *Chryseobacterium luteum* sp. Nov., associated with the phyllosphere of grasses. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 1881-1885.

- Bellais, S., Leotard, S., Poiret, L., Naas, T. & Nordmann, P. (1999). Molecular characterization of a carbapenem. Hydrolysing  $\beta$ -Lactamase from *Chryseobacterium* (Flavobacterium) indologenes. FEMS Microbiol Letter 171, 127-132.
- Bellais, S., Aubert, D., Naas, T. & Nordmann, P. (2000 a). Molecular and biochemical heterogeneity of class  $\beta$ -Lactamases in *Chryseobacterium meningosepticum*. Antimicrobiol Agents Chemothera 44, 1878-1886.
- Bellais, S., Poiret, L., Leotard, S., Naas, T. & Nordmann, P. (2000 b). Genetic diversity of Carbapenem - hydrolysing metallo -  $\beta$  - lactamases from *Chryseobacterium* (Flavobacterium) indologenes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 44, N°. 11, 3028-3034.
- Bellais, S., Naas, T. & Nordmann, P. (2002). Molecular and biochemical characterization of Ambler class A extended spectrum  $\beta$ -lactamases CGA-1 from *Chryseobacterium gleum*. Antimicrobiol Agents Chemothera 46, 966-970.
- Benson, D.A., Boguski, M.S., Lipman, D.J., Ostell, J., Ouellette, B.F., Rapp, B.A. & Wheeler, D.L. (1999). GenBank. Nucleic Acids Research 27, 12-17.
- Benyehuda, G., Coombs, J., Ward, P.L., Balkwill, D. & Barkey, T. (2003). Metal resistance among aerobic chemoheterotrophic bacteria from the deep terrestrial subsurface. Can J Microbio 49, 151-156.
- Ben-Zeev, I.S., Levy, E., Eilam, T. & Amikster, Y. (2005). Whole cell - fatty acid profiles a tool for species and subspecies classification in the *Luccinia recondite* complex. Journal Plant Pathol 87, 187-197.
- Berche, P., Gaillard, J.L. & Simonet, M. (1991). Bacteriologie. Les bactéries des infections humaines. Médecine-Sciences. Ed- Flammarion 660P.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (2001). Taxonomic outline of the Prokaryotic genera. Second edition, 39P.
- Bernardet, J.-F., Segers, P., Vancnneyt, M., Berthe, F., Kersters, K. & Vandamme, P. (1996). Cutting a Gordian knot: emended classification and description of the family Flavobacteriaceae, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. Nov. (basonym, *Cytophaga aquatilis*. Stohl and Tait, 1978). Int J Syst Evol Microbiol 46, 128-148.
- Bernardet, J.-F., Nagakawa, Y. & Holmes, B. (2002). Proposed minimal standards For describing new taxa of the family Flavobacteriaceae and emended description of the family. Int Journal Syst Evol Microbiol 52, 1049 -1070.

- Bernardet, J.-F. & Nagakawa, Y. (2003). An introduction to the family Flavobacteriaceae. In: M. Dworki, et al., eds., *The Prokaryotes: An evolving Electronic Ressource for the Microbiological Community*, 3<sup>rd</sup> edition, release 3.15, Springer-Verlag, Heidelberg.
- Bernardet, J.-F., Vancanneyt, M., Matte-Taille, O., Grisez, L., Taille, P., Bizet, C., Nowakowski, M., Kerouault, B. & Swings, J. (2005). Polyphasic study of *Chryseobacterium* strains isolated from diseased aquatic animals. *Syst Appl Microbiol* 28, 640-660.
- Bernardet, J.-F., Hugo, C. & Bruun, B. (2006). The genera *Chryseobacterium* and *Elizabethkingia*. In *The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria*, 3<sup>rd</sup> edn.vol.7, 638-676. Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer and E. Stackebrandt. New York: Springer
- Beveridge, T.J., Hughes, M.N., Lee, H., Leung, K.T., Poole, R.K., Savvaidis, I., Silver, S. & Trevors, J.T. (1997). Metal microbe interactions: contemporary approaches. *Advances in Microbiol Physiology* 38, 177-243.
- Blindauer, C.A., Harrison, M.D., Robinson, A.K., Parkinson, J.A., Bowness, P.W., Sadler, P.J. & Robinson, N.J. (2002). Multiple bacteria encode metallothioneins and Smt A-like zinc fingers. *Mol Microbiol* 45, 1421-1432.
- Bloch, K.C., Nadarajah, R. & Jacobs, R. (1997). *Chryseobacterium meningosepticum*: an emerging pathogene among immunocompromised adults. *Medicine* 76, 30-41.
- Bloss, T., Clemens, S. & Nies, D.H. (2002). Characterization of the ZAT1p zinc transporter from *Arabidopsis thaliana* in microbial model organisms and reconstituted proteoliposomes. *Planta* 214, 783-791.
- Bradford, P.A., Urban, C., Mariano, N., Projan, S.J., Rahal, J.J. & Bush, K. (1997). Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid mediated Amp<sup>C</sup>  $\beta$ -lactamase, and loss of an outer membrane protein. *Antimicrob. Agents Chemother* 41: 563- 569.
- Brissou, P., Chamouilli, J.M., Gaillard, T. & Muzellec, Y. (2004). Infections à pneumocoques. *Encyclopédie Médico-chirurgicale* 4- 260- 10, 1-13.
- Borremans, B., Hobman, J.L., Provoos, A., Brown, N.L. & Van der Lelie, D. (2001). Cloning and functional analysis of the pbr lead resistance determinant of *Ralstonia metallidurans* CH 34. *J Bacteriol* 183, 5651-5658.
- Bowman, J.P., McCammon, S.a., Brown, J.L., Nichols, P.D. & McMeekin, T.A. (1997). *Psychroserpens burionensis* gen. nov., sp. nov., and *Gelidibacter algens* gen. nov., sp. Nov., psychrophilic bacteria isolated from Antarctic lacustrine and sea ice habitats. *Int J Syst Bacteriol* 47, 670-677.

- Bowman, J.P., McCammon, S.A., Lewis, T., Skerratt, J.H., Brown, J.L., Nichols, D.S. & McMeekin, T.A. (1998). *Psychroflexus torques* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic species from Antarctic sea ice, and reclassification of *Flavobacterium gondwanense* (Dobson et al., 1993) as *Psychroflexus gondwanense* gen. nov., comb. Nov. Microbiology 144, 1601-1609.
- Bush, K. & Jacoby, G.A. (1995). A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 39, 1211-1233.
- Campbell, L.L. & Willims, O.B. (1951). A study of chitin decomposing micro organisms of marine origin. J Gen Microbiol 5, 894-905.
- Campbell, S., Harada, R. M. & Li, Q. X. (2008). *Chryseobacterium arothri* sp. nov., isolated from the kidneys of a pufferfish. Int J Syst Evol Microbiol 58, 290-293.
- Carbon, C., Regnier, B., Saimot, G., Vilde, J.L. & Yeni, R. (1995). Médicament anti infectieux. Antibiotiques. Edition Flammarion, 11-146.
- Cashion, P., Holder-Franklin, M.A., McCully, J. & Franklin, M. (1977). A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA. Anal Biochem 81, 461-466.
- Cattoir, V. (2004). Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. Pathologie Biologie. Vol. 52, 607-616.
- Cavallo, J.D., Fabre, R., Jehl, F., Rapp, C & Garrabe, E. (2004).  $\beta$ -lactamines. EMC-maladies infectieuses 1, 129 - 202.
- Chabbert, Y.A. (1973). Données actuelles sur la résistance des bactéries aux antibiotiques. Extraits des actualités pharmacologiques-26<sup>ème</sup> serie. Edition Masson & Cie. Paris
- Chao, Y. & Fu, D. (2004). Kinetic study of the antiport mechanism of an *Escherichia coli*. Journal of Biol Chem 279, 12043-12050.
- Chen, Y., Dey, S. & Rosen, B.P. (1996). Soft metal thiol chemistry is not involved in the transport of arsenite by the Ars pump. Journal of Bacteriology 178, 911-913.
- Chen, G.X., Zhang, R. & Zhou, H. W. (2006). Heterogeneity of metallo- $\beta$ -lactamase in clinical isolates of *Chryseobacterium meningosepticum* from Hangzhou, China. Journal of Antimicrobiol Chemotherapy 57, (4), 750-752.
- Chesney, J.A., Eaton, J. W. & Mahoney, J.R. (1996). Bacterial glutathione: a sacrificial defence against chlorine compounds. Journal of Bacteriol 178, 2131-2135.
- Chiffolleau, J. C. (2001). La contamination métallique. IFEMER, région haute Normandie, programme scientifique seine Aval 8, 39P.

- Chiu, C.H., Waddington, M., Hsich, W.S., Greenberg, D., Schreckenberger, P.C. & Carnahan, A. M. (2000). Atypical *Chryseobacterium meningosepticum* and meningitis and sepsis in newborns and the immunocompromised, Taiwan. *Emer Infect Dis* 6, 481-486.
- CLARK, d.l., Weiss, A.A. & Siver, S. (1977). Mercury and organomercurial resistance determined by plasmids in *Pseudomonas*. *Journal of Bacteriology* 132, 186 - 196.
- Clewell, D.B. (1993). *Bacterial conjugation*. Plenum Press, New York.
- Comaglia, G., Riccio, M. L., Mazzariol, A., Lauretti, L., Fontana, R. & Rossolini, G. M. (1999). Appearance of IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase in Europe. *Lancet* 353: 899-900.
- Cooney, J.L. & Pettibone, G. W. (1986). Metal and microbes in artificial streams. *Can Journal Microbiol* 36, 561-566.
- Courvalin, P.F., Goldstein, A.P. & Sirot, J. (1985). *L'antibiogramme*. Ed. MPC - Vigot, Paris-Bruxelle.
- Craig, N.L. (1996). Transposition, in: Neidhart FC, ed, *Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology*, 2<sup>nd</sup> ed, Washington DC: American Society for Microbiology, 2339-2362.
- Daisuke, S., Ken, M. & Tatsuo, O. (2006). Cloning a heavy metal-binding protein derived from activated sludge microorganisms. *Applied and Environmental Microbiol.* Vol.72, N°. 9, 6371-6380.
- Davison, J. (1999). Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* 42 (2), 73-91.
- Dean-Ross, D. & Mills, A.L. (1989). Bacterial community structure and function along a heavy metal gradient. *Applied and Environmental Microbiol.* Vol 55, N°.8, 2002-2009.
- Dean-Ross, D. (1990). Response of attached bacteria to zinc in artificial streams. *Can Journal of Microbiol* 36, 561-566.
- Dean-Ross, D. (1991). Effect of combined treatments of zinc and pH on attached bacterial abundance and activity. *Can Journal of Microbiol* 37, 491-496.
- De Beer, H., Hugo, C.J., Jooste, P.J., Vancanneyt, M., Coenye, T. & Vandamme, P. (2006). *Chryseobacterium piscium* sp. nov., isolated from fish of the south Atlantic ocean of south Africa. *Int Journal Syst Evol Microbiol* 56, 1317-1322.
- .-Deffus, J. A. (2002). Heavy metals. A meaningless term. IUPAC technical report. *Applied chemistry* vol 74, n 5; 793-807.

- Degen, O. & Eitinger, T. (2002). Substrate specificity of nickel/cobalt permease: insights from mutants altered in transmembrane domains I and II. *Journal of Bacteriology* 184, 3565-3577.
- Diaz-Ravinâ, M. & Bââth, E. (2001). Response of soil bacteria communities pre-exposed to different metals and reinoculated in an unpolluted soil. *Soil Biology & Biochemistry* 33, 241-248.
- Di - Benedetto, M., Anfossi, S., Billiard, E., Bonnel, M., Henriot, F., Kreemer, F., Lechenne, L., Le Herissier, M. & Lorin, S. (1997). Methodes spectrometriques d'analyse et de caractérisation des métaux lourds. Axe "Genie des procédés", centre Spin, Ecole nationale supérieure des mines de Saint Etienne.
- Diels, L., Dong, Q., Van der Lillie, D., Baeyens, W. & Mergeay, M. (1995a). The *czc* operon of *Alcaligenes eutrophus* CH 34. From resistance mechanism to the removal of heavy metals. *Journal of Industrial Microbiology* 14, 142-153.
- Diels, L., Van-Roy, S., Somers, K., Willems, L., Doyen, W., Mergeay, M., Springael, D. & Leysen, R. (1995 b). The use of bacteria immobilized in tubular membrane reactors for heavy metal recovery and degradation of chlorinated aromatics. *Journal of Membrane Science* 100, 249-258.
- Di Pentima, M.C., Mason, E.OJr. & Kaplan, S.L. (1999). In vitro antibiotic synergy against *Flavobacterium meningosepticum*: implication for therapeutic options. *Clin Infect Dis* 26: 1169-1176.
- Dong, Q. & Mergeay, M. (1994). *Czc/cnr* efflux: a three component chemiosmotic antiport pathway with a 12 transmembrane helix protein. *Molecular Microbiology*, 14, 185-187.
- Dosanjh, N.S., Hammerbacher, N.A. & Michel, S.L. (2007). Characterization of the *Helicobacter pylori* NikR-P(ure A), DANN-interaction: metal ion requirements and sequence specificity. *Biochemistry* 46: 2520-2529.
- Dowson, C.G., Coffey, T.J. & Spratt, B.G. (1994). Origin and molecular epidemiology of penicillin-binding protein mediated resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Trends Microbiol* 2, 361-366.
- Eide, D.J. (2006). Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763, 711-722.
- Elson, M. & Haas, M.D (1984). Excerpted from staying healthy with nutrition: the complete guide to diet and nutritional medicine. ISBN; 1-3.
- Endo, G. & Siver, S. (1995). Cad A, the transcriptional regulatory protein of the cadmium resistance system of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *Journal of Bacteriol* 177, 4437-4441.

- Fan, B. & Rosen, B.P. (2002). Biochemical characterization of copA, the E coli Cu (I) translocating P-type ATPase. *Journal Biol Chem* 277, 46987- 46992.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Felsenstein, J. (1993). PHYLIP ( phylogeny inference package), version 3.5c. Department of genetics, University of Washington, Seattle, USA.
- Ferguson, G.P. & Booth, I.R. (1998). Importance of glutathione for growth and survival of *Escherichia coli* cells: detoxification of methyl glyoxal and maintenance of intracellular K<sup>+</sup>. *Journal of Bacteriol* 180, 4313-4318.
- Figueira, E. M. A., Lima, A.I.G & Preiro, S.I.A. (2005). Cadmium tolerance plasticity in *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*: glutathione as a detoxifying agent. *Can Journal Microbiol* 51, 7-14.
- Fournier, B. & Roy, P.H. (1997). Variability of chromosomally encoded  $\beta$ - lactamases from *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob. Agents Chemother* 41: 1641-1648.
- Franke, A. & Clewell, D.B. (1980). Evidence for conjugal transfer of *Streptococcus faecalis* transposon (Tn 916) from a chromosomal site in the absence of plasmid DNA. *Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol* 45, 77-80.
- Franke, S., Grass, G. & Nies, D.H. (2001). The product of the ybde gene of *E coli* chromosome is involved in detoxification of silver ions. *Microbiology* 147, 965-972.
- Gallego, V., Garcia, M.T. & Ventose, A. (2006). *Chryseobacterium hispanicum* sp. Nov., isolated from the drinking water distribution system of Sevilla, Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 1589-1592.
- Garrity, G. M., Bell, J.A. & Lilburn, T.G. (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second edition. Release 5.0., Springer-Verlag, New York, 401P. DOI: 10.1007/bergey's outline 200405.
- Gonzalez, C.J., Santos, J.A., Garcia-Lopez, M.L. & Otero, A. (2000). Psychrobacters and related bacteria in freshwater fish. *J Food Prot* 63, 315-321.

- Goris, J., Devos, P., Coenye, T., Hoste, B., Janssens, D., Brim, H., Diels, L., Mergeay, M., Kersters, K. & Vandamme, P. (2001). Classification of metal resistance bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp. nov., *Ralstonia metallidurans* sp. nov and *Ralstonia basilensis*, Steinle et al., 1998 emend. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 1773-1782.
- Gosink, J.J., Woese, C.R. & Staley, J.T. (1998). *Polaribacter* gen. nov., with three new species, *Polaribacter irgensii* sp. nov., *Polaribacter franzmannii* sp. nov., and *Polaribacter filamentus* sp. nov., gas vacuolate polar marine bacteria of the Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides group and reclassification of *Flectobacillus glomeratus* as *Polaribacter glomeratus* comb. Nov. *Int J Syst Bacteriol* 48, 223-235.
- Grass, G., Fan, B., Rosen, B.P., Lemke, K., Schlegel, H.G. & Rensing, C. (2001). NreB from *Achromobacter xylosoxidans* 31 A is a nickel - induced transporter conferring nickel resistance. *J Bacteriol.* Vol. 183, 2803-2807.
- Grass, G., Franke, S., Tandte, N., Nies, H.D., Kucharski, L.M., Maguire, M.E. & Rensing, C. (2005). The metal permease ZupT from *E. coli*, is a transporter with a broad substrate spectrum. *Journal of Bacteriology.* Vol. 187, N° 5, 1604-1611.
- GroBe, C., Grass, G., Anton, A., Franke, S., Navarrete, S.A., Lowkey, B., Brown, N.L. & Nies, D.H. (1999). Transcriptional organization of the *czc* heavy metal homeostasis determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Bacteriology* 181, 2385-2393.
- Gross, C., Friedrich, S. & Nies, D.H. (2007). Contribution of extracytoplasmic function sigma factors to transcription metal homeostasis in *Cupriavidus metallidurans* strain CH 34. *Journal Mol Microbiol Biotechnol* 12, 155-161.
- Grover, A. & Sharma, R. (2006). Identification and characterization of a major zn (II) resistance determinant in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology.* Vol. 188, N° 19, 7026-7032.
- Grunberg, K., Wawer, C., Tebo, B.M. & Schuler, D. (2001). A large gene cluster encoding several magnetosome proteins is conserved in different species of magnetotactic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 67, 4573-4582.
- Guffanti, A.A., Wei, Y., Rood, S.V. & Krulwich, T.A. (2002). An antiport mechanism for a member of the cation diffusion facilitator family: divalent cations efflux in exchange for K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup>. *Mol Microbiol* 45, 145-153.
- Guiadkowski, M. (2001). Evolution and epidemiology of extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) and ESBL-producing micro organisms. *Clin Microbiol Infect* 7, 597-608.

- Gutmann, L. & Williamson, R. (1987). Paroi bactérienne et  $\beta$ -lactamines. *Med Sci* 3,75-81.
- Hahne, H.C.H. & Krontje, W. (1973). Significance of pH and chloride concentration on behavior of heavy metal pollutants: mercury (II), cadmium (II), zinc (II) and lead (II). *Journal Environ Qual* 2, 444-450.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*, 41, 95-98.
- Hantke, K. (2005). Bacterial zinc uptake and regulators. *Current opinion in Microbiology* 8, 196-202.
- Harrison, F.C. (1929). The discolouration of halibut. *Can J Res* 1, 214-239.
- Hassan, M.E.T., Van der Lelie, D., Springael, D., Römmling, U., Ahmed, N. & Mergeay, M. (1999). Identification of a gene cluster *czr*, involved in cadmium and zinc resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 238, 417-425.
- Hantsis - Zacharov, E. & Halpern, M. (2007). *Chryseobacterium haifense* sp.nov., a psychrotolerant bacterium isolated from raw milk. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 2344-2348.
- Hantsis - Zacharov, Z.E., Senderovich, Y. & Halpern, M. (2008). *Chryseobacterium bovis* sp.nov., isolated from raw cow's milk. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 1024-1028.
- Hayes, W. (1968). *The genetics of bacteria and their viruses*, 2nd ed.
- Hengstler, J.G., Bolm - Audorff, V., Faldum, A., Janssen, K., Reifenrath, M., Gotte, W., Jung, D., Mayer-Popken, O., Fuchs, J., Cebhard, S., Bienfait, H.C., Schlink, K., Dietrich, C., Faust, D., Epe, B. & Oech, F. (2003). Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. *Carcinogenesis* 24, 63-73.
- Herrero, T.C. & Martin, L. (1993). Evaluation of cadmium levels in fertilized soils. *Bull. Environ. Contam. Toxicol* 50, 61-68.
- Herzog, P., Winkler, I., Wolking, D., Kampfer, P. & Lipski, A. (2008). *Chryseobacterium ureilyticum* sp. nv., *Chryseobacterium gambrini* sp.nov., *Chryseobacterium pallidum* sp. nov and *Chryseobacterium molle* sp. nov., isolated from beer-bottling plants. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 26-33.

- Higuchi, Y., Yagi, T. & 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, pp: 1671-1680.
- Hirsh, P., Ludwig, W., Hethke, C., Sittig, M., Hoffmann, B. & Gallikowski, C.A. (1998). *Hymenobacter roseosalivarius* gen. Nov., sp. Nov., isolated from continental Antarctic soils Sandstone: bacteria of the Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides line of phylogenetic descent. *Syst Appl Microbiol* 21, 374-383.
- Hood, J. & Amyes, S.G.B. (1991). The chromosomal  $\beta$ -lactamases of the genus *Acinetobacter*: enzymes which challenge our imagination, p. 117-132. In Towner, K.J. & Fewson, C.A (ed). *The biology of Acinetobacter*. Plenum Publishing Corp., New York, N.Y.
- Holmes, B. (1992). The genera *Flavobacterium*, *Sphingobacterium* and *Weeksellia*. In the prokaryotes, 2nd edn. Vol. 4, pp. 3620 - 3630. Edited by A. Balows, II.G. Trüper, M. Dworkin., W. Harder & K.-H. Schleifer. Berlin: Springer.
- Holmes, B., Owen, R.J., Steigerwalt, A.G. & Brenner, D.J. (1984). *Flavobacterium gleum*, a new species found in human clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol* 34, 21-25.
- Hoque, S.N., Graham, N.J., Kaufman, M.E. & Tabaqchali, S. (2001). *Chryseobacterium* (*Flavobacterium*) *meningosepticum* outbreak associated with colonization of water taps in a neonatal intensive care unit. *J Host Infect* 47: 188-192.
- Hsueh, P.R., Hsiue, T.R., Wu, J.J., Teng, L.J., Ho, S.W., Hsieh, W.C. & Luh, K.T. (1996 a). *Flavobacterium indologenes* bacteremia: clinical and microbiological characteristics. *Clin Infect Dis* 23: 550-555.
- Hsueh, P.R., Teng, L.J., Ho, S.W., Hsieh, W.C. & Luh, K.T. (1996 b). Clinical and microbiological characteristics of *Flavobacterium indologenes* infections associated with indwelling devices. *J Clin Microbiol* 34: 1908-1913.
- Hsueh, P.R., Teng, L.J., Yang, P.C., Ho, S.W., Hsieh, W.C. & Luh, K.T. (1997). Increasing incidence of nosocomial *Chryseobacterium indologenes* infections in Taiwan. *Eur. J Clin Microbiol Infect Dis* 16: 568-574.
- Hugh, R. & Leifson, E. (1953). The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology* 66,

24-26.

-Hugo, C.J., Segers, P., Hoste, B., Vancanneyt, M. & Kersters, K. (2003). *Chryseobacterium jooste* sp. nov., isolated from the dairy environment. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 771-777.

-Ivanova, E.P., Alexeeva, Y.V., Flavier, S., Wright, J.P., Zhukova, N.V., Gorshkova, N.M., Mikhailov, V.V., Nicolau, D.V. & Christen, R. (2004). *Formosa* algae gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Flavobacteriaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 705-711.

-Jacoby, G.A. (2006). Beta-lactamase nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 1123-1129.

-Johnson, J.M. & Church, G.M. (1999). Alignment and structure prediction of divergent protein families: periplasmic and outer membrane protein of bacterial efflux pumps. *Journal Mol Biol* 287, 695-713.

-Jooste, P.J. (1985). The taxonomy and significance of *Flavobacterium/Cytophaga* strains from dairy source. PhD thesis. University of the Orange Free State, Bloemfontein, South Africa.

-Juhnke, S., Peitzsch, N., Hubener, N., GroBe, C & Nies, D.H. (2002). New genes involved in chromate resistance in *Ralstonia metallidurans* CH 34. *Arch Microbiol* 179, 15-25.

-Jukes, T.H. & Cantor, C.R. (1969). Evolution of protein molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*, vol. 3, 21-132. Edited by H.N. Munro. New York. Academic Press.

-Kado, C.I. & Liu, S.T. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *Journal of Bacterio* 45, 1365-1373.

-Kampfer, P., Dreyer, U., Neef, A., Dott, W. & Busse, H-J. (2003). *Chryseobacterium defluvii* sp. nov., isolated from wastewater. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 93-97.

-Kampfer, P., Dreyer, V., Janssens, M., Charlier, J., De Baere, T. & Vanechoutte, M. (2006). Description of *Watersiella falsenii* Gen. nov., sp. Nov., to accommodate clinical isolate phenotypically resembling members of *Empedobacter*. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 2323-2329.

- Kelly, J.J., Håggblom, M. & Tate, R.L., (1999). Changes in soil microbial communities over time resulting from on time application of zinc: a laboratory microcosm study. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 1455-1465.
- Kim, K.K., Bae, H.S., Schumann, P. & Lee, S.T. (2005 a). *Chryseobacterium daecheongense* sp. nov., isolated from freshwater lake sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 133-138.
- Kim, K.K., Lee, K.C., Oh, H.-M. & Lee, J.-S. (2008). *Chryseobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from a water reservoir. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 533-537.
- Kim, K.K., Kim, K., Lim, J.H., Park, H.Y. & Lee, S.-T. (2005 b). Transfert of *Chryseobacterium meningosepticum* and *Chryseobacterium miricola* to *Elizabethkingia* gen. Nov. as *Elizabethkingia meningosepticum* comb. Nov. and *Elizabethkingia miricola* comb. Nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 1287-1293.
- Kirby, J.T., Sader, H.S., Walsh, T.R & Jones, R.N. (2004). Antimicrobial susceptibility and epidemiology of a worldwide collection of *Chryseobacterium* spp.: Report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2001). *Journal of Clinical Microbiology*. vol. 42, N°. 1, 445-448.
- Koh, T.H., Babini, G.S., Woodford, N., Sng, L.-H., Hall, L.M.C. & Livermore, D.M. (1999). Carbapenem - hydrolysing IMP - 1 • - lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Singapore. *Lancet* 353: 2162.
- Koski, P.n Hirvela-Koski, V. & Bernardet, J.-F. (1993). *Flexibacter columnaris* infection in Arctic char (*Salvelinus alpinus* L); first isolation in Finland. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 13, 66-69.
- Lamelas, C. (2007). Linking Chemical Speciation to metal Bioavailability: Role of Dissolved organic matter on cadmium and lead bioavailability by green microalgae. Thèse de Doctorat Es Science en sciences d'ingénierie de l'environnement, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne.
- Lau, S. C.K., Tsoi, M.M. Y., Li, X., Plakhotnikova, L., Dobretsov, S., Wong, P. K., Pawlik, J.R & Qian, P.Y. (2005). *Nonlabens tegetincola* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Flavobacteriaceae isolated from a microbial mat in a subtropical estuary. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 000-000.
- Laurettil, L., Riccio, M.L., Mazzariol, A., Comaglia, G., Amicossante, R.F. & Rassolini, G. M. (1999). Cloning and characterization of bla - VI M, a new integron-borne metallo • - lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother* 43, 1584-1590.
- Lavigne, J.P. (2007). Effets des antibiotiques et mécanismes de résistance. MB7 Bacteriologie, 1-3.

- Lazzerini, M. (2007). Effect of zinc supplementation on child mortality. *Lancet* 370; 1194-1195.
- Lee, S. M., Grass, G., Haney, C.J., Fan, B., Rosen, B.P., Anton, A., Nies, D.H. & Rensing, C. (2002). Functional analysis of E coli zinc transporter Zit B. *FEMS Microbiol Letters* 215, 273-278.
- Lee, S.D. (2007). *Tamlana crocina* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium of the family Flavobacteriaceae isolated from beach - sediment in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 764-769.
- Legatzki, A., Grass, G., Anton, A., Rensing, C. & Nies, D.H. (2003). Interplay of the Czc system and two P-type ATPases in conferring metal resistance to *Ralstonia metallidurans*. *J Bacteriology* 185, 4354-4361.
- Le Minor, L. & Veron, M. (1990). *Bactériologie médicale*. Ed. Medecine Science, Flammarion. 1107P.
- Leppard, G.G. & Rao, S.S. (1988). Acid stress and lake bacteria: ultrastructural and physiological correlates of some acid and copper stresses. *Hydrobiologia* 160: 2241-2247.
- Levesque, B., Brousseau, P., Simard, P., Dewailly, E., Meisets, M., Ramsey, D. & Joly, J. (1993). Impact of the ring billed Gull (*Larus delawarensis*) on the microbiological quality of recreational water. *Applied and Environmental Microbiology* 54, (4); 1228-1230.
- Li, X.Z., Zhang, L. & Poole, K. (1998). Role of the multidrug efflux systems of *Pseudomonas aeruginosa* in organic solvent tolerance. *J Bacteriology* 180: 2987-2991.
- Li, Y., Kawamura, K., Fujiwara, N., Naka, T., Huang, X., Kobayashi, K. & Ezaki, T. (2003). *Chryseobacterium miricola* sp. nov., a novel species isolated from condensation water of space station Mir. *Syst Appl Microbiol* 26, 523-528.
- Liesegang, H., Lemke, K., Siddiqui, R.A. & Schlegel, H.G. (1993). Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMol28 of *Alcaligenes eutrophus* CH 34. *J Bacteriol* 175 :767-778.
- Livermore, D. M. (1997). Acquired carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 39: 673-676.
- Lonetto, M., Gribskov, M. & Gross, C.A. (1992). The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J Bacteriol* 174: 3843-3849.
- Magnet, S., Courvalain, P. & Lambert, T. (2001). Resistance-nodulation cell division type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM 4454. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol.45, N°.12: 3375-3380.

- Maidak, B.L., Cole, J.R., Lilburn, T.G., Parker, C.T., Saxman, P.R., Farris, R.J., Garrity, G. M., Olsen, G.J., Schmidt, T. M. & Tiedje, J.M. (2001). The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Research* 29, 173-174.
- Marchal, N., Bourdon, J.L. & Richard, C. (1987). *Les milieux de culture*. Ed Doin, Paris - 481P.
- Marchese, A., Ariet, G., Schito, G.C., Lagrange, P.H. & Philippon, A. (1998). Characterization of FOX-3, an Amp<sup>C</sup>-type plasmid mediated  $\beta$ -lactamase from an Italian isolate of *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob. Agents Chemother* 42: 464-467.
- McGrath, C.F., Moss, C.W. & Burchard, R.P. (1990). Effect of temperature shifts on gliding motility, adhesion, and fatty acid composition of *Cytophaga* sp. Strain U 67. *J Bacteriol* 172, 1978-1982.
- Mergeay, M., Monchy, S., Vallaeys, T., Auquier, V., Benotmane, A., Bertin, P., Taghavi, S., Dunn, J., Van der Lelie, D. & Wattiez, R. (2003). *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: Towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiology Reviews* 27, 385-410.
- Mertens, J., Springael, D., De royer, I., Cheyns, K., Wattiau, P. & Smolders, E. (2006). Long exposure to elevated zinc concentrations induced structural changes and zinc tolerance of the nitrifying community in soil. *Environmental Microbiology* 8 (12), 2170-2178.
- Mesaros, N., Nordmann, P., Plesiat, P., Roussel-Delvallez, M., Van Eldere, J., Gluczynski, Y., Jacobs, F., Malfroot, A., Tulkens, P.M. & Van Bambeke, F. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the new millennium. *Clin Microbiol Infect.* In press 126, 8, 305-316.
- Mesbah, M., Premachandran, U. & Whitman, W.B. (1989). Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high - performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol* 39, 159-167.
- Michel, C., Matte-Tailliez, O., Kerouault, B. & Bernardet, J.-F. (2005). Resistance pattern and assessment of phenicol agents minimum inhibitory concentration in multiple drug resistant *Chryseobacterium* isolates from fish and aquatic habitats. *Journal of Applied Microbiology* 99, 323-332.
- Mine, T., Merita, Y., Kataoka, A., Mirushima, T. & Tsuchiya, T. (1999). Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother* 43: 415-417.
- Miquel, G. (2001). *Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé*. Rapport de l'OPECST, n° 261, 260P.

- Miranda-Tello, E., Fardeau, M-L, Thomas P, Ramirez F, Casalot L, Cayol J-L, Garcia J-7L. & Ollivier B (2004). *Petrotoga mexicana* sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic and xylanolytic bacterium isolated from an oil-producing well in the gulf of Mexico, *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 169-174.
- Misra, T. K. (1992). Bacterial resistances to inorganic mercury salts and organomercurials. *Plasmid* 27, 4-6.
- Monchy, S. (2007). Organisation et expression des genes de résistance aux métaux lourds chez *Cupriavidus metallidurans* CH 34. Thèse de Doctorat en Sciences biologiques. Université libre de Bruxelles, 99P.
- Moore, R. A., Deshazer, D., Reckseidler, A., Welssman, A. & Woods, D.E. (1999). Efflux-mediated aminoglycoside and macrolide resistance in *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrob. Agents Chemother* 43: 465-470.
- Mudarris, M. & Austin, B. (1989). Systemic disease in turbot *Scophthalmus maximus* caused by a previously unrecognised Cytophaga-like bacterium. *Dis Aquat Organ* 6, 161-166.
- Mudarris, M., Austin, B., Segers, P., Vancanneyt, M., Hoste, B. & Bernardet, J.-F. (1994). *Flavobacterium scophthalmum* sp. Nov., a pathogen of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Int J Syst Bacteriol* 44, 447-453.
- Munkelt, D., Grass, G. & Dietrich, H.N. (2004). The chromosomally encoded cation diffusion facilitator and fief from *Wautersia metallidurans* CH 34 are trans-metal specificity. *J Bacteriology* 186 (23), 8036-8043.
- Murata, K., Fukuda, Y., Shimosaka, M., Wantanabe, K., Saikusa, T. & Kimura, A. (1985). Phenotypic character of the methylglyoxal resistance gene in *Saccharomyces cerevisiae*: expression in *Escherichia coli* and application to breeding wild-type yeast strains. *Appl Environ Microbiol* 50, 1200-1207
- Naas, T., Bellais, S. & Nordmann, P. (2003). Molecular and biochemical characterization of a carbapenem hydrolysing  $\beta$ -lactamase from *Flavobacterium johnsoniae*. *Journal of Antimicrobiol Chemotherapy* 51, 267-273.
- Naz, N., Young, H. K.Y., Ahmed, N. & Gadd, G. M. (2005). Cadmium accumulation and DNA homology with metal resistance genes in sulphate-reducing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 71, N°. 8, 4610-4618.
- Nedashkovskaya, O.I., Kim, S.B., Han, S.K., Lysenko, A. M., Mikhailov, V.V. & Bae, K. S. (2004). *Arenibacter certesii* sp. Nov., a novel marine bacterium isolated from the green alga *Ulva fenestrata*. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 1173-1176.

- Nedashkovskaya, O.I., Kim, S.B., Lee, K.H., Bae, K.S., Frolova, G.M., Mikhailov, V.V. & Kim, I.S. (2005 a). *Pibocella ponti* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium of the family Flavobacteriaceae isolated from the green *Acrosiphonia* Sardeni. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 177-181.
- Nedashkovskaya, O.I., Kim, S.B., Lysenko, A.M., Frolova, G.M., Mikhailov, V.V. & Bae, K.S. (2005 b). *Bizionia paragorgiae* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Flavobacteriaceae isolated from the soft coral *Paragorgia arborea*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 375-378.
- Nies, D.H., Nies, A., Chu, L. & Silver, S. (1989). Expression and nucleotide sequence of a plasmid mediated divalent cation efflux system from *Alcaligenes eutrophus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 7351-7355.
- Nies, D.H. & Silver, S. (1989). Plasmid determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriology* 171, 896-900.
- Nies, D.H. (1992). *CzcR* and *CzcD*, gene products affecting regulation of resistance to cobalt, zinc and cadmium (*czc* system) in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriology* 174, 8102-8110.
- Nies, D.H. (1995). The cobalt, zinc and cadmium efflux system *Czc ABC* from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *E. coli*. *J Bacteriol* 177, 2707-2712.
- Nies, D.H., Koch, S., Wachi, S., Peitzsch, N. & Saier, M.H.J. (1998). *CHR*, a novel family of prokaryotic proton motive force-driven transporters probably containing chromate/sulphate transporters. *J Bacteriol* 180 (21): I, press.
- Nies, D.H. (1999). Microbial heavy metal resistance. *Applied Microbiol Biotechnol* 51, 730-750.
- Nies, D.H. (2003). Efflux mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 27, 313-339.
- Nikaido, H. & Vaara, M. (1985). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* 49, 1-32.
- Nikaido, H. (2000). How do exported proteins and antibiotics bypass the periplasm in Gram negative bacteria cells? *Trends Microbiol* 8: 481-483.
- Nucifora, G., Chu, L., Misra, T.K. & Silver, S. (1989). Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 *cad A* gene results from a cadmium efflux ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 3544-3448.
- Osano, E., Arakawa, E.Y., Wacharotayankun, R., Ohta, M., Horii, T., Ito, H.,

- Yushimura, F. & Fetkato, N. (1994). Molecular characterization of an enterobacterial metallo- $\beta$ -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob. Agents Chemothe* 38: 71-78.
- Palmgren, M. G. & Axelsen, K.B. (1998). Evolution of P - type ATPases. *Bioch Biophys Acta* 1365, 37-45.
- Park, M.S., Jung, S.R., Lee, M.S., Do, J.O., Kim, S.B. & Bae, K.S. (2006). *Chryseobacterium soldanellicola* sp. nov., and *Chryseobacterium taenense* sp. nov., isolated from roots of sand-dune plants. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 433-438.
- Park, S.C., Kim, M.S., Baik, K.S., Kim, E.M., Rhee, M.S. & Seong, C.N. (2008). *Chryseobacterium aquifrigidense* sp. Nov., isolated from a water cooling system. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 607-611.
- Paulsen, I.T., Park, J.H., Choi, P.S. & Saier, M.H.J. (1997). A family of Gram negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from Gram negative bacteria. *FEMS Microbiol Letters* 156, 1-8.
- Perron, K., Caille, O., Rossier, C., Van Delden, C., Dumas, J.L. & Köhler, T (2004). CzcR, CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 279: 8761-8768.
- Philippon, A. & Arlet, G. (2005). Les  $\beta$ -lactamases chez les bacilles à Gram négatif : que de nouveautés en 15 ans ! *Antibiotiques* 7 : 247-259.
- Ploy, M.C., Gassama, A., Chainier, D. & Denis, F. (2005). Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques. *Immuno-analyse et Biologie spécialisée*. Vol. 20, N° 6, 343-352.
- Podda, F., Zuddas, P., Minacci, A., Pepi, M. & Baldi, F. (2000). Heavy metal coprecipitation with hydrozincite [Zn (5) (CO) (3) (2) (OH) (6)] from mine waters caused by photosynthetic micro organisms. *Appl Environ Microbiol* 66, 5099-5098.
- Quan, Z.X., Kim, K.K., Kim, M.K., Jin, L and Lee, S.T. (2007). *Chryseobacterium caeni* sp. nov., isolated from bioreactor sludge. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 141-145.
- Rajapaksha, R. M. C.P., Tobor - Kapton, M.A. & Bââth, E. (2004). Metal toxicity affects fungal and bacterial activities. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 70, N° 5, 2966-2973.
- Rand, J.D., Danby, S.G., Greenway, D.L.A. & England, R.R. (2002). Increased expression of the multidrug efflux genes *acrAB* occurs during slow growth of *E. coli*. *FEMS Microbiol Letters* 207, 91-95.

- Rasmussen, B.A., Gluzman, Y. & Tally, F.P. (1990). Cloning and sequencing of the class B  $\beta$ -lactamase gene (*ccrA*) from *Bacteroides fragilis* Tal 3636. *Antimicrob Agents Chemother* 34: 1590-1592.
- Rasmussen, B.A. & Bush, K. (1997). Carbapenem hydrolysing  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 223-232.
- Reichenbach, H. & Dworkin, M. (1981). Introduction to the gliding bacteria. In the *Prokaryotes*, vol. 1, pp. 315-327. Edited by M.P. Starr., H. Stolp., H.G. Trüper., A. Balows & H.G. Schlegel. Berlin: Springer.
- Reichenbach, H. (1989). The order Cytophagales L Cadbetter 1974, 99AL. In *Bergey's Manual of systematic and bacteriology* vol 3, pp. 2011-2073. Edited by J.T. Staley., M.P. Bryan., N. Pfennig & J.G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Reichenbach, H. (1992 a). The order Cytophagales. In *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, 2<sup>nd</sup> edn, vol. 4, pp. 3631-3675. Edited by A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder & K.-H. Schleifer. Berlin: Springer.
- Rensing, C., Pribyl, T. & Nies, D.H. (1997). New functions for the three subunits of the CzcCBA cation proton - antiporter. *J Bacteriology* 179, 6871-6879.
- Rensing, C., Sun, Y., Mitra, B. & Rosen, B.P. (1998). Pb (II) - translocating P-type ATPases. *J. Bacteriol. Chem* 273, 32614-32617.
- Rensing, C., Ghosh, M & Rosen, B.P. (1999). Families of salt metal ion - transporting ATPases. *J Bacteriology* 181, 5891-5897.
- Ricciolo, P. M., Muglin, C.I., De Bbruiji, F.J., Booth, I.R. & Aguilar, O. M. (2000). Glutathione is involved in environmental stress reponses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. *J Bacteriol* 182, 1748-1753.
- Rosenberg, E.Y., Ma, D. & Nikaido, H. (2000). AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump. *J Bacteriol* 182, 1754-1756.
- Rossolini, G. M., Franschini, N., Riccio, M.L., Mercuri, P.S., Perilli, M., Galleni, M., Frère, J. M. & Amicosante, G. (1998). Characterization and sequence of the *Chryseobacterium* (*Flavobacterium*) *meningosepticum* carbapenemase: a new molecular class B  $\beta$ -lactamases showing a broad substrate profile. *Biochem Journal* 332, 145-152.
- Roy, R.H. (1997). Dissemination de la résistance aux antibiotiques: le génie génétique à l'oeuvre chez les bactéries. *Médecine/Sciences* 13, 927-933.

- Rowe - Magnus, D.A. & Mazel, D. (2001). Integrons : natural tools for bacterial genome evolution. *Gm Opin Microbiol* 4, 565-769.
- Sader, H.S., Jones, R.N & Pfaller, M. A. (1995). Relapse of catheter-related *Flavobacterium meningosepticum* bacteremia demonstrated by DNA macrorestriction analysis. *Clin Infect Dis* 21: 997-1000.
- Saezt, I. G., Hopkins, J., Papamichael, C., Franceschini, N., Amicosante, G., Rossolini, G. M., Galleni, M., Frère, J & Dideberg, O. (2003). The 1.5 Å structure of *Chryseobacterium meningosepticum* Zinc • -lactamase in complex with the inhibitor, D- Captopril. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 26, 23868-23873.
- Saier, M. H.J., Reizer, A., Tam, R. & Reizer, J. (1994). Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation cell division and transport. *Mol Microbiol* 11, 841-847.
- Saier, M. H.J. (1994). Computer aided analyses of transport protein sequences: gleaned evidence concerning function, structure biogenesis and evolution. *Microbiol. Rev* 58, 71-93.
- Saier, M. H. J. (2000). A functional phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 354-411.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor - joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406-425.
- Saltikov, C. W. & Olson, B II. (2002). Homology of *E coli* R 773 *arsA*, *arsB* and *arsC* genes in arsenic-resistant bacteria isolated from raw sewage and arsenic enriched creek waters. *Appl Environ Microbiol* 68, 280-288.
- Sambrook, J.E., Fritsh, F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. N.Y.
- Sanschagrín, F., Dufresne, J. & Levesque, R. C. (1998). Molecular heterogeneity of the L-1 metallo-•-lactamase family from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobiol. Agents Chemother* 42: 1245-1248.
- Santamaria, M., Diaz-Romero, A.R., Hernandez, J., Gutierrez-Navarro, A. M. & Corzo, I. (2003). Effect of thorium on the growth and capsule morphology of *Bradyrhizobium*. *Environ Microbiol* 5, 916-925.
- Schmidt, T. & Schlegel, H. G. (1994). Combined nickel. Cobalt. Cadmium resistance encoded by the *ncc* locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31 A. *J Bacteriology* 176, 7045-7054.
- Segers, P., Mannheim, W., Vancanneyt, M., De Brandt, K., Hinz, K.-H., Kersters, K. & Vandamme, P. (1993 a). *Riemerella anatipstifer* gen. Nov., the causative agent of septicemia

anseram exsudativa, and its phylogenetic affiliation within the Flavobacterium - Cytophaga rRNA homology group. *Int J Syst Bacterio* 43, 768-776.

-Senda, K., Arakawa, Y., Ichiyama, S., Nakashima, K., Ito, H., Ohsuka, S., Shimikata, K., Kato, N. & Ohta, M. (1996). PCR detection of metallo- $\beta$ -lactamase gene (*bla<sub>IMP</sub>*) in Gram-negative rods resistant to broad-spectrum  $\beta$ -lactamas. *J Clin Microbiol* 34: 2909-2913.

-Sharma, R., Rensing, C., Rosen, B.P. & Mitra, B. (2000). The ATP hydrolytic activity of purified ZntA, a Pb (II)/Cd (II)/Zn (II)-translocating ATPase from *E. coli*. *J. Biol. Chem* 275: 3873-3878.

-Shen, F.T., Kämpfer, P., Young, C.C., Lai, W.A. & Arun, A.B. (2005). *Chryseobacterium taichungense* sp. nov., isolated from contaminated soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 1301-1304.

-Shimomura, K., Kaji, S. & Hiraishi, A. (2005). *Chryseobacterium shigense* sp. Nov., a yellow-pigmented, aerobic bacterium isolated from a lactic acid beverage. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 1903-1906.

-Sibellas, F.I., Mohammedi, J., Illinger, G.L. & Robert, D. (2007). Bactériémie à *Chryseobacterium indologenes* chez un patient traité par corticothérapie au long cours. *Annales Françaises d'anesthésie et de réanimation*. ISSUE 10, 887-889.

-Silver, S. (1991). Resistance systems and detoxification of toxic heavy metals. In "Proceeding of the Eighth international Biodeterioration and Biodegradation-Symposium" (H. Rossmoore, Ed). Elsevier, London, 308-339.

-Silver, S. & Phung, L.T. (1996). Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Ann Rev Microbiol* 50, 753-789.

-Silver, S. (1996). Bacterial resistance to toxic metal ions. A review. *Gene* 179, 9-19.

-Silver, S. & Phung, L.T. (2005). A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *Journal Ind Microbiol Biotechnol* 32, 587-605.

-Solioz, M. & Vulpe, C. (1996). Cpx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals. *Trends Biochem Sci* 21, 237-241.

-Spada, S., Pembroke, J.T & Wall, J.G. (2002). Isolation of a novel *Thermus thermophilus* metal efflux protein that improves *E. coli* growth under stress conditions. *Extremophiles* 6, 301-308.

-Stähler, F.N., Odenbreigt, S., Haas, R., Wilrich, J., Van Vliet, A.H.M., Kusters, J.G., Kist, M. & Bereswill, S. (2006). The novel *Helicobacter pylori* CznABC metal efflux pump is required for cadmium, zinc and nickel resistance, urease nodulation and gastric colonization.

Infection Immunity. Vol. 74, N°. 7, 3845-3852.

-Steenhoudt, O., Zhu, P. & Vande, B.A. (2001). A spontaneous chlorate resistant mutant of *Azospirillum brasiliense* sp 245 displays defects in nitrate reduction and plant root colonization. *Bio Fert Soils* 33, 317-322.

-Summers, A.O. (1985). Bacterial resistance to toxic elements. *Trends in biotechnology*. Vol. 3, N°. 5, 121-125.

-Summers, A.O., Caslake, L., Liebert, C. & Wireman, J. (1995). The response of the bacterial plamid mercury resistance operon to inorganic Hg exposure: Transcriptional and environmental studies. *Journal of inorganic Biochemistry* 59, 246-248.

-Tamaoka, J. & Komagata, K. (1984). Determination of DNA base composition by reversed - phase high - performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol Letters* 25, 125-128.

-Tibazarwa, C., Wuertz, S., Mergeay, M., Wyns, L. & Van der Lelie, U. (2000). Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant of *Ralstonia eutrophus* (*Alcaligenes eutrophus*) CH 34. *J Bacteriol* 182, 1399-1409.

Tong, L., Nakashima, S., Shibasaka, M., Katsuhara, M. & Kasamo, K. (2002). A novel histidine rich CPx-ATPase from the filamentous Cyanobacterium *Oscillatoria brevis* related to multiple heavy metal cotolerance. *J Bactriology* 184, 5027-5035.

-Towner, K.J. (2002). Integrons: their role spread of antibiotic resistance and therapeutic impact. *Antibiotiques*. Vol. 4, N°. 1, 45-49.

Tsai, K.J., Lin, Y.F., Wong, M.D., Yang, H.H.C., Fu, H.L. & Rosen, B.P. (2002). Membrane topology of the pl 258 *CadA* Cd(II)/Pb (II)/Zn (II) - translocating P-type ATPase. *J Bioeneg Biomembr* 34, 147-156.

-Tseng, T. T., Gratwich, K. S., Kollman, J., Park, D., Nies, D.H., Goffeau, A & Saier, M. H. J. (1999). The RND superfamily : an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J Mol Microbiol Biotechnol* (1), 107-125.

-Udo, E.E., Jacob, L.E. & Tathew, B. (2000). A cadmium resistance plasmid, PXU5, in *Staphylococcus aureus* strain ATCC 25923. *FEMS Microbiol Letters* 189, 79-80.

-Vancanneyt, P., Vandamme, P., Segers, P., Torck, U., Coopman, R., Kersters, K. & Hinz, K.-H. (1999). *Riemerella columbina* sp. nov., a bacterium associated with respiratory disease in pigeons. *Int J Syst Bacteriol* 49, 289-295.

-Vandamme, P., Bernardet, J.-F., Segers, P., Kerstars, K. & Holmes, B. (1994 a). New perspectives in the classification of the flavobacteria: description of *Chryseobacterium* gen.

nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* nom. rev. *Int J Syst Bacteriol* 44, 827-831.

-Vandamme, P., segers, P., Vancanneyt, M. & Holmes, B. (1994 b). *Ornithobacterium rhinotracheale* gen. Nov., sp. Nov., isolated from the avian respiratory tract. *Int J Syst Bacteriol* 44, 24-37.

- Vandamme, P., Vancanneyt, M., Van Belkum, A., Segers, P., Quint, W. G. V., Kersters, K., Paster, B.J. & Dewhirst, F.E. (1996 b). Polyphasic analysis of strains of the genus *Capnocytophaga* and Centers for disease control group DF.3. *Int J Syst Bacteriol* 46, 782-791.

- Vandamme, P., Vancanneyt, M., Segers, P., Ryll, M., Kohler, B., Ludwig, W. & Hinz, K.-H. (1999). *Coenonia anatine* gen. nov., sp. Nov., a novel bacterium associated with respiratory disease in ducks and geese. *Int J Syst Bacteriol* 49, 867-874.

-Vandenesh, F., Etienne, J. (1997). Proteines liant la penicilline: cibles des  $\beta$ -lactamines. *Medecine Therapeutique* 3 : 61-65.

-Van der Lelie, D., Schwuchow, T., Schwidetzky, U., Wuertz, S., Bacyens, W., Mergeay, M. & Nies, D.H. (1997). Two component regulatory system involved in transcriptional control of heavy metal homeostasis in *Alcaligenes eutrophus*. *Mol Microbiol* 23: 493-503.

-Vanechoutte, M., Kampfer, P., De Baere, V. Avesani, Janssens, M. & Wanters, G. (2007). *Chryseobacterium hominis* sp. nov., to accommodate clinical isolates biochemically similar to CDC groups II-h and II-c. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 2623-2628.

-Vila, J., Marces, A., Marco, F., Abdalla, S., Vergara, Y., Reig, R., Gomez-Lus, R. & Jimenez de Anta, T. (1993). In vitro antimicrobial production of  $\beta$ -lactamase, aminoglycoside-modifying enzymes, and chloramphenicol acetyl-transferase by and susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobiol Agents Chemother* 37: 138-141.

-Vila, J., Ruiz, J., Goni, P., Marcos, A. & Jimenez de Anta, T. (1995). Mutation in the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobiol Agents Chemother* 39: 1201-1203.

-Visalli, M.A., Bajaksouzian, S., Jacobs, M.R. & Appelbaum, P.C. (1997). Comparative activity of trovafloxacin, alone and in combination with other agents, against Gram negative nonfermentative rods. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 1475-1481.

-Visuvarathen, S., Moss, M.T., Standord, J.L., hermon-Taylor, J. & Mc Fadden, J.J. (1989). Simple enzymatic method for isolation of DNA from diverse bacteria. *J Microbiol* 10,

59-64.

-Walsh, T.R., MacGowan, A.P & Bennett, P.M. (1997). Sequence analysis and enzyme kinetics of the L2 serine  $\beta$ -lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 1460-1464.

-Wang, J., Sheppard, G.S., Lou, P., Kawai, M., Park, C., Egan, D.A., Schneider, A., Bouska, J., Lesniewski, R. & Henkin, J. (2003). Physiologically relevant metal cofactor for methionine aminopeptidase 2 is manganese. *Biochemistry* 42, 5035-5042.

-Weiss, A.A., Silver, S. & Kincherf, T.G. (1978). Cation transport alteration associated with plasmid determined resistance to cadmium in *S aureus*. *Ant Agents Chemother* 14, 856-865.

-Weon, H.Y., Kim, B.Y., Yoo, S-H., Kwon, S-W., Cho, Y.H., Go, S.J. & Stackbrandt, E. (2006). *Chryseobacterium wanjuense* sp. Nov., isolated from a water cooling system. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 607-611.

-Weon, H.-Y., Kim, B.-Y., Yoo, S.-H., Kwon, S.-W., Stackebrandt, E. & Go, S. J. (2008). *Chryseobacterium soli* sp. nov. and *Chryseobacterium jejuense* sp. nov., isolated from soil samples from Jeju, Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 470-473.

-Westbrock-Wadman, S., Sherman, D.R., Hickey, M.J., Coulter, S.N., hu, Y.Q., Warrener, P., Nguyen, L.Y., Shawar, R.M., Folger, K.R. & Stover, C.K. (1999). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2975-2983.

-Woodford, N., Palepou, M.F., Babini, G.S., Homes, B. & Livermore, D.M. (2000). Carbapenemases of *Chryseobacterium* (Flavobacterium) *meningosepticum* : Distribution of blaB and characterization of a novel Metallo- $\beta$ -lactamase Gene, blaB3, in the type strain, NCTC 10016. *Antimicrob Agents Chemother* 44 (6), 1448-1452.

Wong, K.K.Y. & Hancock, R.E.W. (2000). Insertion. Mutagenesis and membrane topology model of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprM. *JBacteriology* 182, 2402-2410.

-Xiang, C., Binnie, I.W., Christensen, E.M. & Oliver, D.J. (2001). The biological function of glutathione revisited in *Arabidopsis* transgenic plants with altered glutathione levels. *Plant Physiol* 126, 564-574.

-Yamaguchi, S. & Yokoe, M. (2000). A novel protease-deamidating enzyme from *Chryseobacterium proteolyticum* sp. nov., a newly isolated bacterium from soil. *Appl Environ Microbiol* 66, 1501-1504.

- Yabuuchi, E., Kanedo, T., Yano, L., Moss, C.W. & Miyoshi, N. (1983). *Sphingobacterium* gen. nov., *Sphingobacterium spirinivorum* comb. nov., *Sphingobacterium multivorum* comb. nov., *Sphingobacterium mizutae* sp. nov., and *Flavobacterium indologenes* sp. nov.: glucose-nonfermenting Gram-negative rods in CDC groups IIk-2 and IIb. *Int J Syst Bacteriol* 33, 580-598.
- Yi, .H, Yoon, H.I. & Chun, J. (2005). *Sejongia antarctica* gen. nov., sp. nov and *Sejongia jeonii* sp. nov., isolated from the Antarctic. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 409-416.
- Yoon, J.-H., Kang, S.-J & Oh, T.-K. (2007). *Chryseobacterium daeguense* sp. nov., isolated from wastewater of a textile dye works. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 1355-1359.
- Young, C.C., Kämpfer, P., Shen, F.-T., Lai, W.-A & Arun, A.B. (2005). *Chryseobacterium formosense* sp. nov., isolated from the rhizosphere of *Lactuca sativa* L. (garden lettuce). *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 423-426.
- Zarifi, Z.I., Lianes, C., Kohler, T., Pechere, J.C. & Plesiol, P. (1999). In vivo emergence of multidrug resistance mutant of *Pseudomonas aeruginosa* over expressing the active efflux system MexA, MexB - OprM. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 287-291.
- Zhou, Y., Dong, J., Wang, X., Huang, X., Zhang, K. Y., Zhang, Y. Q., Guo, Y. F., Lai, R. & Li, W.-J. (2007). *Chryseobacterium flavum* sp. Nov., isolated from polluted soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 1765-1769.
- Zgurskaya, H.I. & Nikaido, H. (2000, a). Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Mol Microbiol* 37, 219-225.
- Zgurskaya, H.I. & Nikaido, H. (2000, b). Cross - Linked complex between oligomeric periplasmic AcrA and the inner - membrane associated multidrug efflux pump AcrB from *E coli*. *J Bacteriol* 182. 4264-4267.
- Zong, Z. Y., Lu, X.J. & Gao, Y. Y. (2003). Metallo - beta-lactamases of non - fermenting Gram-negative bacteria. *Rev Med ol Microbiol* 14, 79-93.

## Annexe I

### Technique d'extraction d'ADN

Elle a été réalisée par utilisation du Wizard® Genomic DNA Purification Kit de Promega

#### 1/- Préparation de l'échantillon:

Prélever 5 à 10 ml de culture,

Centrifuger à 8000 g pendant 10 mn

Jeter le surnageant et rajouter 480 µl d'EDTA (50 mM), mélanger soigneusement puis transférer le mélange dans eppendorf (1,5 ml) et ajouter :

- 140 µl de TE (10 mM de Tris et 1 mM EDTA)
- 40 µl de lysozyme (20 mg/ul) puis conserver à -20°C

Incuber à 37°C pendant 30 mn

Centrifuger 2 mn à 13000 g (=14,5 rpm), jeter le surnageant

#### 2/- Lyse des cellules :

Ajouter 600 µl de Nucleis Lysis solution, puis mélanger doucement

Incuber 5 mn à 80°C puis remettre à température ambiante

Ajouter 3 µl de la solution de Rnase, mélanger et incuber à 37°C pendant 15 mn

#### 3/- Précipitation des protéines :

Ajouter 200 µl de Protein Precipitation solution et vortexer

Incuber pendant 5 mn dans la glace, puis centrifuger à 13000 g durant 3 mn.

#### 4/- Précipitation de l'ADN :

Transférer le surnageant dans un tube propre contenant 600 µl d'isopropanol à température ambiante, agiter et centrifuger à 13000 g pendant 2 mn

Jeter le surnageant et ajouter 600 µl d'éthanol à 70% (froid) et mélanger

Centrifuger à 13000 g durant 2 mn, aspirer tout l'éthanol et laisser sécher à l'air libre pendant 15 mn

Réhydrater l'ADN avec 30 ou 50 µl de Tris 10 mM et incuber à +4°C pendant 18 h ou 1 h à 65°C puis conserver à -20°C.

## Annexe I

## Spectrophotomètre d'absorption atomique UNICAM 929

Date : 25/03/08

Temps : 11 :03 :56

Fichier : LMDPB. RES

## Detail echantillon

Unité conc. Corrigée :

Masse nominale : 1.0000

* Identité échantillon.	Masse échantillon.	Facteur dilution.
1 pH = 5.0	1.0000	1.0000
2 pH = 5.5	1.0000	1.0000
3 pH = 6.0	1.0000	1.0000
4 pH = 6.5	1.0000	1.0000
5 pH = 7.3	1.0000	1.0000
6 pH = 8.0	1.0000	1.0000
7 pH = 8.5	1.0000	1.0000
8 pH = 9.0	1.0000	1.0000

Mode instrument : flamme

Elément :

Plomb (Pb)

Mode spectromètre : Densité op.

Mode instrument	: flamme	Mode spectro	: Densité optique
Longueur d'onde	: 217.0 nm	Fente	: 0.5
Courant lampe	: 100 %	Correction de fond	: En fonction
Haute résolution	: En fonction		

Type signal : Continu

Nombre de mesures : 1

Temps de mesure : 4.0sec

Mode de rejet : Non

Type flamme : Air-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>

Débit combustible : 1.1 l/mn

Oxydant oxiliaire : Arrêt

Stabilisation flamme : 4.0 sec

Mode d'étalonnage : Normal

Calcul : Courbe segmentée

Limites d'excès de courbure : -10 % à +4 %

Unité de concentration : mg/l

Etalon 1 : 1.000

Etalon 2 : 5.000

Etalon 3 : 10.000

Passeur : Arrêt

## Annexe I

Identité échant. * Mesures	Signal abs	Conc mg/l	Corrigée	DSR %
Blanc	1/1	-0.000	0.000	
Etalon 1	1/1	0.004	1.000	
Etalon 2	1/1	0.018	5.000	
Etalon 3	1/1	0.037	10.00	

Axe - X : concentration (mg/l)  
X interception : 9.099E-002 mg/l  
Axe-Y : hauteur signal (Abs)  
Y interception : -3.757E-004 Abs  
Courbure minimale : 0 %  
Courbure maximale : 7 %

## Annexe I

Spectrophotomètre d'absorption atomique UNICAM 929

Date : 25/03/08

Temps : 11 :03 :56

Fichier : LM DP B. RES

## Detail echantillon

Unité conc. Corrigée :

Masse nominale : 1.0000

* Identité échantillon.	Masse échantillon.	Facteur dilution.
1 pH = 5.0	1.0000	1.0000
2 pH = 5.5	1.0000	1.0000
3 pH = 6.0	1.0000	1.0000
4 pH = 6.5	1.0000	1.0000
5 pH = 7.3	1.0000	1.0000
6 pH = 8.0	1.0000	1.0000
7 pH = 8.5	1.0000	1.0000
8 pH = 9.0	1.0000	1.0000

Mode instrument : flamme

Elément :

Zinc (Zn)

Mode spectromètre : Densité op.

Mode instrument	: flamme	Mode spectro	: Densité optique
Longueur d'onde	: 213.9 nm	Fente	: 0.5
Courant lampe	: 75 %	Correction de fond	: En fonction
Haute résolution	: En fonction		

Type signal : Continu

Nombre de mesures : 1

Temps de mesure : 4.0sec

Mode de rejet : Non

Type flamme : Air-C2H2

Débit combustible : 1.2 l/mn

Oxydant oxiliaire : Arrêt

Stabilisation flamme : 4.0 sec

Mode d'étalonnage : Normal

Calcul : Courbe segmentée

Limites d'excès de courbure : -10 % à +4 %

Unité de concentration : mg/l

Etalon 1 : 1.000

Etalon 2 : 5.000

Etalon 3 : 10.000

Passeur : Arrêt

## Annexe I

Identité échant. * Mesures	Signal abs	Conc mg/l	Corrigée	DSR %
Blanc	1/1	-0.002	0.000	
Etalon 1	1/1	0.052	1.000	
Etalon 2	1/1	0.230	5.000	
Etalon 3	1/1	0.402	10.00	

Axe - X : concentration (mg/l)  
X interception : 9.099E-002 mg/l  
Axe-Y : hauteur signal (Abs)  
Y interception : 1.577E-003 Abs  
Courbure minimale : 0 %  
Courbure maximale : 18 %

## Annexe I

## Spectrophotomètre d'absorption atomique UNICAM 929

Date : 25/03/08

Temps : 11 :03 :56

Fichier : LMDPB. RES

## Detail echantillon

Unité conc. Corrigée :

Masse nominale : 1.0000

* Identité échantillon.	Masse échantillon.	Facteur dilution.
1 pH = 5.0	1.0000	1.0000
2 pH = 5.5	1.0000	1.0000
3 pH = 6.0	1.0000	1.0000
4 pH = 6.5	1.0000	1.0000
5 pH = 7.3	1.0000	1.0000
6 pH = 8.0	1.0000	1.0000
7 pH = 8.5	1.0000	1.0000
8 pH = 9.0	1.0000	1.0000

Mode instrument : flamme

Elément :

Cadmium (Cd)

Mode spectromètre : Densité op.

Mode instrument	: flamme	Mode spectro	:	Densité optique
Longueur d'onde	: 228.8 nm	Fente	:	0.5
Courant lampe	: 90 %	Correction de fond	:	En fonction
Haute résolution	: En fonction			

Type signal : Continu

Nombre de mesures : 1

Temps de mesure : 4.0sec

Mode de rejet : Non

Type flamme : Air-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>

Débit combustible : 1.2 l/mn

Oxydant oxiliaire : Arrêt

Stabilisation flamme : 4.0 sec

Mode d'étalonnage : Normal

Calcul : Courbe segmentée

Limites d'excès de courbure : -10 % à +4 %

Unité de concentration : mg/l

Etalon 1 : 0.500

Etalon 2 : 1.000

Etalon 3 : 10.000

Passeur : Arrêt

## Annexe I

Identité échant. * Mesures	Signal abs	Conc mg/l	Corrigée	DSR %
Blanc	1/1	-0.000	0.000	
Etalon 1	1/1	0.011	0.500	
Etalon 2	1/1	0.021	1.000	
Etalon 3	1/1	0.194	10.00	

Axe - X : concentration (mg/l)  
X interception : 6.128E-003 mg/l  
Axe-Y : hauteur signal (Abs)  
Y interception : -1.316E-004 Abs  
Courbure minimale : 0 %  
Courbure maximale : 4 %

## Annexe II

**Tableau II a:** les caractères morphologiques des souches isolées sur gélose nutritive après 24 à 72h d'incubation à 30°C.

Souches	Etude macroscopique	Etude microscopique
<b>R1- O.H</b> (2002)	Colonies de 3 mm de diamètre, bombées, opaques, avec contour régulier, blanches, laiteuses, muqueuses, lisses et brillantes	24 h après : cocci, coccobacilles, isolés, en diplo avec qqes bacilles courts. 48 h après : cocci isolés et en diplo avec des coccobacilles Gram positif et immobiles.
<b>R2- B.E</b> (2002)	Colonies de 1 mm de diamètre, bombées avec un centre opaque et un contour régulier, pigmentées en orange, muqueuses, lisses et brillantes.	24 h après : cocci isolés, en diplo avec des coccobacilles 48 h après : cocci isolés, en diplo avec des coccobacilles Gram positif et immobiles.
<b>R3- B.E</b> (2002)	Colonies de 3 mm de diamètre, bombées, avec contour régulier et un centre opaque de couleur crème	24 h après : cocci isolés, en diplo avec de courtes chaînettes et des coccobacilles. 48 h après : cocci isolés, en diplo et des coccobacilles Gram positif et immobiles
<b>R4-B.E</b> (2002)	Colonies petites, de 1 mm de diamètre, opaques avec un contour régulier et un centre bombé, muqueuses, lisses et brillantes de couleur rose.	24 h après : cocci isolés, en chaînettes et des coccobacilles. 48 h après : cocci isolés en diplo et en chaînettes Gram positif et immobiles.
<b>R5-O.H</b> (2002)	Colonies petites, de 1 mm de diamètre, opaques, bombées, avec un contour régulier, pigmentées en jaune, muqueuses, lisses et brillantes.	24 h après : cocci en diplo 48 h après : cocci isolés, en diplo et en courtes chaînettes. Gram positif et immobiles.
<b>R6-B.E</b> (2002)	Colonies punctiformes, translucides avec un contour régulier, colorées en rose, muqueuses, lisses et brillantes.	24 h après : cocci isolés, en diplo, en courtes chaînettes avec qqes coccobacilles. 48 h après : cocci isolés, en diplo, en courtes chaînettes avec qqes coccobacilles. Gram positif et immobiles
<b>R1- HAD</b> (2005)	Colonies de 3 mm de diamètre, ± bombées, opaques, rondes avec un contour régulier et complet, de couleur crème, lisses, brillantes et non visqueuses.	24 h après : cocci isolés, en diplo avec des coccobacilles et des bacilles. 48 h après : cocci et des coccobacilles. Gram positif et immobiles.
<b>R2-ELM</b> (2005)	Colonies de 2 mm de diamètre, ± bombées, opaques, rondes avec un contour complet, lisses, brillantes de couleur crème.	24 h après: Cocci en diplo avec des coccobacilles et des filaments. 48 h après: cocci et coccobacilles. Gram positif et immobiles.
<b>R3-ELM</b> (2005)	Colonies de 2 mm de diamètre, ± bombées, opaques, circulaires avec contour régulier, lisses, brillantes de couleur crème et opaques.	24 h après: Cocci, coccobacilles, batonnets et des filaments. 48 h après: batonnets et des filaments Gram positif et immobiles.
<b>R4-HDJ</b> (2005)	Colonies de 3 mm de diamètre, bombées avec un centre concave, opaques de couleur crème avec un centre complet, visqueuses, lisses et brillantes.	24 h après: cocci, coccobacilles, batonnets et des filaments. 48 h après: cocci, coccobacilles et des batonnets. Gram positif et immobiles.

## Annexe II

Suite du tableau II a

<b>R5-HDJ</b> (2005)	Colonies de 2 mm de diamètre, ± bombées, rondes avec un contour complet, opaques de couleur crème, lisses et brillantes.	24 h après: cocci, coccobacilles, batonnets. 48 h après: cocci. Gram positif et immobiles.
<b>R6-HDJ</b> (2005)	Colonies de 3 mm de diamètre, rondes avec un contour complet, de couleur crème, opaques, ± bombées avec un centre concave, visqueuses, lisses et brillantes.	24 h après: cocci, coccobacilles, batonnets et de longs filaments. Gram positif et immobiles.
<b>1YB-R12T</b> (2006)	Colonies de taille moyenne après 72 h, rondes, bombées, opaques de couleur jaune ocre qui vire à l'orange avec un contour complet, muqueuses, lisses et brillantes.	72 h après : filaments branchés ou non, des filaments longs avec qqes cocci et des bacilles. Gram négatif et immobile.
<b>2YB- R25.OH</b> (2006)	Colonies petites de 2 mm de diamètre, bombées, circulaires, de couleur jaune, opaques, lisses et brillantes.	24 h après : cocci isolés, en chaînettes, en amas, en diplo, et batonnets courts. 48 h après : cocci en diplo. Gram positif et immobiles.
<b>3YB-R18.P</b> (2006)	Colonies de taille moyenne après 72 h , bombées, rondes de couleur jaune, opaques à contour complet, lisses et brillantes.	24 h après: Cocci, isolés, en amas et en tétrades. 48 h après: Cocci en diplo. Gram positif et immobile.
<b>4YB-R25JP.OH</b> (2006)	Colonies de taille moyenne après 72 h, ± bombées, rondes de couleur crème, opaques, lisses et brillantes.	24 h après: cocci isolés, en diplo, en amas, en courtes chaînettes avec des filaments et des batonnets. 48 h après: cocci et batonnets. Gram positif et immobiles.
<b>5YB-R25JF.OH</b> (2006)	Colonies de taille moyenne après 72 h, ± bombées, rondes, de couleur beige, opaques à contour complet, lisses et brillantes.	24 h après: cocci, coccobacilles, batonnets et des filaments. 48 h après: cocci et batonnets. Gram positif et immobiles

## Annexe II

Tableau II b : Résultats de l'activité physiologique et biochimiques des souches isolées et Identifiées.

N° de souche	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
R1-OH (2002)	A.S	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
R2-BE (2002)	//	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
R3-BE (2002)	//	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R4-BE (2002)	//	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
R5-OH (2002)	//	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
R6-BE (2002)	//	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
R1-HAD (2005)	//	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	•
R2-ELM (2005)	//	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	•
R3-ELM (2005)	//	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
R4-HDJ (2005)	//	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	•
R5-HDJ (2005)	//	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R6-HDJ (2005)	//	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	•
1YB-R12T 2006	//	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
2YB-R25.OH 2006	//	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
3YB-R18.P 2006	//	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
4YB-R25JP.OH 2006	//	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5YB-R25JF.OH 2006	//	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1: Type respiratoire , 2: catalase , 3: oxydase , 4: nitrate réductase , 5: uréase , 6: B galactosidase , 7: production d'indole , 8: production d'H<sub>2</sub>S , 9: hydrolyse de l'amidon , 10: hydrolyse de l'esculine, 11: hydrolyse de tween 80 , 12: hydrolyse de tween 20 , 13: hydrolyse de la caséine , 14: lecithinase , 15: hydrolyse de l'ADN , 16: TDA (tryptophane désaminase)= , 17: ADH (arginine dihydrolase) , 18: ODC (ornithine décarboxylase) , 19: LDC (lysine décarboxylase) , 20: citrate perméase , 21: hémolyse de sang.

## Annexe II

Tableau II c : Comportement des souches isolées vis à vis des différents sucres.

	S1 2002	S2 2002	S3 2002	S4 2002	S5 2002	S6 2002	S1 2005	S2 2005	S3 2005	S4 2005	S5 2005	S6 2005	S1 2006	S2 2006	S3 2006	S4 2006	S5 2006
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+
2	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
6	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
8	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
11	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
13	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
14	+	-					+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
15	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
17	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+				
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
20	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1: glucose , 2: lactose , 3: saccharose , 4: mannitol , 5: arabinose , 6: fructose , 7: galactose , 8: inositol , 9: maltose , 10: melibiose , 11: rhamnose , 12: raffinose , 13: sorbitol , 14: glycerol , 15: tréhalose , 16: mannose , 17: adonitol , 18: amygdaline , 19: cellobiose , 20: dextrine , 21: dulcitol , 22: glysiline , 23: levulose , 24: salicine , 25: sorbose , 26: xylose , 27: amidon , 28: esculine.

## Annexe II:

Tableau II d : Résultats obtenus de la mesure de la densité cellulaire à  $\lambda = 600\text{nm}$  en présence et en absence des métaux lourds et en fonction du pH.

pH	5	5.5	6	6.5	7.3	8	8.5	9
Cultures mères	0.501	0.642	0.771	0.820	1.033	0.991	0.907	0.754
Cultures témoins	0.321	0.362	0.501	0.598	0.888	0.734	0.563	0.522
Cultures avec ML :								
Le cadmium :	0.197	0.233	0.294	0.307	0.444	0.400	0.321	0.301
Le zinc :	0.204	0.311	0.369	0.383	0.547	0.472	0.408	0.314
Le plomb :	0.331	0.367	0.492	0.550	0.689	0.633	0.471	0.417

Tableau II e : Résultats obtenus du dosage des métaux lourds en mg/l de milieu de culture

pH	5	5.5	6	6.5	7.3	8	8.5	9
$[\text{Cd}^{2+}]_r$ , ions libres	13.26	9	1.079	1.80	15	0.198	1.29	1.80
$[\text{Cd}^{2+}]$ capturée	86.75	91	98.9	98.2	85	99.80	98.7	98.2
$[\text{Zn}^{2+}]_r$ , ions libres	4.40	2.90	1.46	1.18	5	1.30	5.672	4.14
$[\text{Zn}^{2+}]$ capturée	95.6	97.1	98.54	98.82	95	98.7	94.33	95.81
$[\text{Pb}^{2+}]_r$ , ions libres	5.7	5.4	3.93	0.78	7.1	0.76	1.83	1.19
$[\text{Pb}^{2+}]$ capturée	94.3	94.6	96.07	99.22	92.9	99.24	98.2	98.81

## Annexe II

Tableau II f: Résultats de l'antibiorésistance de la souche étudiée

Antibiotiques	Diamètres critiques mesurés en mm		Résultats (diamètre en mm)		
	Sensible	résistant	R	I	S
Cefalotine	≥ 18	< 12		14 mm	
Cefazoline	ND	ND			18 mm
Cefamandole	≥ 22	< 15			16 mm
Cefuroxime	≥ 22	< 15	10 mm		
Cefotaxime	≥ 21	< 15			18 mm
Cefoxitine	≥ 22	< 15			17 mm
Ceftazidime	≥ 21	< 15			22 mm
Cefalexine	≥ 18	< 12			14 mm
carbenicilline	≥ 22	< 17			22 mm
Ampicilline	≥ 19	< 14			16 mm
Amoxicilline	≥ 21	< 14			15 mm
Imipenème	≥ 22	< 17	12 mm		
Oxacilline	≥ 20	< 20			22 mm
Piperacilline	≥ 18	< 12			14 mm
Penicilline	≥ 29	< 8			14 mm
Tobramycine	≥ 16	< 14			22 mm
Neomycine	ND	ND			
Dibekacine	≥ 16	< 14		13 mm	
Amikacine	≥ 17	< 15			23 mm
Kanamycine	≥ 17	< 15			24 mm
Gentamycine	≥ 16	< 14			19 mm
Netilmycine	≥ 19	< 17			30 mm
Streptomycine	≥ 15	< 13			14 mm
Tetracycline	≥ 19	< 17	R		
Doxycycline	≥ 19	< 17			22 mm
Acide nalidixique	≥ 22	< 16	R		
Ofloxacine	≥ 22	< 16			22 mm
Acide pipemidique	≥ 19	< 14	11 mm		
Bacitracine	≥ 15	< 15			19 mm
Colistine	≥ 15	< 15			21 mm
Furanes	≥ 17	< 14	R		
Nitrofurantoïne	≥ 17	< 14	R		
Trimethoprime + sulfométhoxazole	≥ 16	< 10			15 mm
Sulfamides	≥ 17	< 12			14 mm
Pristinamycine	≥ 22	< 19			25 mm
Erythromycine	≥ 22	< 17			20 mm
Spiramycine	≥ 24	< 19			20 mm
Chloramphenicol	≥ 23	< 19			24 mm
Vancomycine	≥ 17	ND			22 mm
Acide fusidique	≥ 16	< 15		14 mm	
Fosfomycine	≥ 14	< 14	11 mm		
Nitoxoline	≥ 30	< 12			33 mm
Flumequine	≥ 25	< 21			24 mm
Lincomycine	≥ 21	< 15			21 mm
Rifampicine	≥ 19	< 14			24 mm

R= résistant, I= résistance intermédiaire, S= sensible, ND= non donné

Les diamètres critiques et les profils de sensibilité et de résistance sont déterminés selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société Française de microbiologie (2004).

Annexe II

- iso- C<sub>15:0</sub> : acide 13- méthyl téradécanoïque
- iso- C<sub>17:0</sub> 3-OH : acide 3- hydroxy -5- méthylhéxadécanoïque
- iso- C<sub>17:1</sub> w9c : acide oméga-9-cis-15- méthylhéxadécanoïque.

## SUMMARY

In this study, we have isolated from different polluted habitats and characterized 17 bacterial strains. One of them is identified as a Gram - negative, yellow - pigmented, strictly aerobic designated 1YB-R12T, was isolated from a soil sample hydrocarbon contaminated in Mefteh city. The temperature and pH optima for growth were 28-30°C and pH = 7.3-8 respectively. The bacterium tolerated up to 0-6 % of Na Cl with an optima at 4%. Cells were non-motile, non-spore-forming, with a variable morphological cycle. From results of 16S-rRNA gene sequences, the strain occupied a distinct lineage within the genus *Chryseobacterium* and showed moderate relationships to the species *C. haifense* strain H 38 (96.5%). The DNA G+C content was 40.9 mol %. The predominant cellular fatty acids were: anteiso-C<sub>15:0</sub> (41.4 %) and iso-C<sub>15:0</sub> (14.4 %). On the basis of phenotypic characteristics, chemotaxonomic, genotypic and phylogenetic distance, strain 1YB-R12T<sup>T</sup> is proposed as a novel species in the family Flavobacteriaceae and has been assigned to *Chryseobacterium solincola*.

Results obtained from heavy metal resistance study indicated that the novel isolate tolerated up to 500ug/ml of lead, 300ug/ml of zinc and 150ug/ml of cadmium. The residual concentration of metals ions evaluated by spectroscopy - method, determined that the depolluted power of this bacterium is higher than 80 %.

The strain 1YB-R12T<sup>T</sup> is resistant to 11 antibiotics from 45 tested and none results is obtained from the genetic transfer. The extraction of plasmidic DNA indicated that the resistance is coding by the chromosome.

## ملخص

خلال هذه الدراسة قمنا بعزل و تنقية 17 جرثومة بكتيرية من اماكن عدة ملوثة من الوسط البيئي الخارجي. من بينها واحدة متميزة بصبغة جرام - سلبي عزلت من عينة من التربة الملوثة بالنفط جيء بها من مدينة مفتاح سنة 2006. تتميز بانها غير متحركة هوائية - اجبارية غير- مكونة للابواغ. درجة حرارة نموها منحصرة بين 28-30°م مع درجة حموضة تتراوح بين 7.3-8. تتحمل درجة ملوحة مقدارها 0 - 6 بالمائة مع نم متميز عند 4 بالمائة. تنمو ببطئ عند درجة حرارة +4°م. الدراسة الجزئية للحامض النووي الريبوزي الريبوزومي 16س اطهر انها نوع جديد ينتمي الى الجنس "كريزيوبكتيريوم" من عائلة "فلافوبكتيريوم". عدد جزيئات القوانين + السيتوزين الموجودة بالحامض النووي المنقوص الاكسجين يساوي 40.9 جزيء بالمائة. من اهم الاحماض الدهنية الموجودة بالجدار الخلوي نذكر اثنين ونسبتهما (41.4 بالمائة) و (14.4 بالمائة). على هذا الاساس سميت هذه الجرثومة الجديدة "كريزيوبكتيريوم سولنكولا" نسبة الى الوسط الذي انت منه.

اثناء دراستنا لفعل المضادات البكتيرية ضد هذه الجرثومة تبين انها من جهة تتحمل كميات كبيرة من املاح بعض المعادن 500 مكروغرام/مل بالنسبة للرصاص 300 مكروغرام/مل بالنسبة للزنك و 150 مكروغرام/مل بالنسبة للكادميوم. معاينة كمية املاح هذه المعادن السامة في وسط غذاء ساءل مع مختلف درجات الحموضة اوضحت ان هذه الجرثومة قد امسكت بكميات كبيرة منها وبدا فان درجة التنقية الوسطية عندها تقدر باكثر من 80 بالمائة.

من جهة اخرى اتضح انها غير حساسة ل 11 مضاد حيوي من بين 45 تمت دراستهم. هذا يدل على امكانيتها للمقاومة. خلال اجراء تصالب بين هذه البكتيريا و/اشريشيا قولبي لمعرفة ان كان هناك انتقال افقي للمقاومة اتضح ان هذه البكتيريا لا تحتوي على جزيئات وراثية قابلة للانتقال بين الخلايا غير الصبغي ومن ثمة تبين ان ما تملكه من مقاومة يعود الى الكروموزوم مما مكننا من استنتاج ان كل هذه الفعليات مسيرة بواسطة جينات مرتبة على الصبغي وعليه فانها تعتبر حالة ناقلم هذه البكتيريا مع المحيط الذي تعيش فيه.