



10^e Congrès National de la Société Française de Microbiologie

31 mars et 1^{er} avril 2014, Institut Pasteur, Paris

LIVRE DES RESUMES



www.congres-sfm.com

COMMUNICATIONS ORALES SELECTIONNEES

CO1. Réservoirs naturels de bactéries productrices de carbapénémases et transmission à l'homme

Laurens C.¹, Jean-Pierre H.¹, Vittecoq M.², Renaud F.², Martinez O.³, Godreuil S.^{1,4}, Jumas-Bilak E.⁵

¹ Laboratoire de Bactériologie, CHU ADV Montpellier

² M.I.V.E.G.E.C. - UMR (CNRS/IRD/UM) 5290, Montpellier

³ Réanimation Polytraumatisés, pôle Urgences Lapeyronie, Montpellier

⁴ INSERM U1058 ; Laboratoire de Bactériologie, CHU ADV

⁵ Equipe Pathogènes et Environnements UMR 5119 ECOSYM Unité de Bactériologie, UFR Pharmacie Montpellier

L'isolement de bactéries productrices de carbapénémases (BPC) est de plus en plus fréquent en médecine humaine. La diffusion mondiale de ces BPC est une préoccupation majeure en santé publique alors que leurs réservoirs naturels restent peu explorés. Nous avons recherché et étudié les BPC dans différents réservoirs naturels potentiels du pourtour méditerranéen (deux colonies de goélands et un fleuve côtier, l'Orb) et évalué le risque de transmission à l'homme.

Les écouvillonnages du cloaque de poussins goélands leucophées (n=93) et railleurs (n=65) ont étéensemencés sur gélose sélective. Les marqueurs de résistance des souches ont été étudiés grâce à une puce à ADN (Check Point). D'autre part, nous avons réalisé une investigation environnementale autour d'un cas de bactériémie à *Enterobacter asburiae* produisant une carbapénémase (gène *bla_{IMI-2}*) après un accident de noyade : comparaison des communautés aquatiques et humaines par PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis, typage moléculaire en électrophorèse en champ pulsé et rep-PCR, caractérisation du marqueur génétique de la résistance et de son support.

Les microbiotes respiratoires et digestifs de la patiente ont été remplacés par la communauté bactérienne résidante du fleuve, et en particulier par des bactéries résistantes aux carbapénèmes (*E. asburiae*, *Pseudomonas* du groupe *fluorescens* et *Aeromonas veronii*). Le génotypage des souches d'*E. asburiae bla_{IMI-2}* démontre que l'implantation digestive de la souche environnementale est le point de départ de la bactériémie. Les bactéries impliquées portaient un gène *bla_{IMI-2}* plasmidique. De plus, nous avons démontré la présence et la forte prévalence (19 % des oiseaux) de la carbapénémase VIM dans la population de goélands leucophées. Nous avons mis en évidence 25 isolats exprimant *bla_{VIM}*, correspondant aux espèces *Escherichia coli* (n=23) et *Klebsiella pneumoniae* (n=1). Les goélands railleurs n'étaient pas porteurs de BPC.

Cette étude montre l'importance des réservoirs environnementaux de BPC et décrit un cas de transmission à l'homme. L'implantation digestive chez la patiente et le support plasmidique du gène de résistance suggère un risque de transfert de cette résistance vers le microbiote humain. La carbapénémase VIM, retrouvée dans une des colonies de goélands, suggère une pression de sélection particulière selon l'anthropisation de l'écosystème ou le mode de vie de l'oiseau. Le risque infectieux lié aux BPC impose une meilleure connaissance des réservoirs environnementaux pour comprendre les mécanismes d'émergence et de diffusion.

CO2. *Listeria monocytogenes* dans les lagunes de stockage d'effluents d'élevages porcins*Boscher E.*¹, *Pourcher A.-M.*², *Ziebal C.*², *Perrot M.*¹, *Denis M.*¹¹Anses²Irstea

Listeria monocytogenes est un pathogène ubiquiste largement représenté dans l'environnement. Sa présence dans les effluents de lagune, liquide surnageant des lisiers de porc décantés, suggère que ces bassins de stockage, utilisés pour l'irrigation ou l'arrosage des cultures, sont favorables à sa survie.

Cette étude a pour but d'améliorer les connaissances sur ce germe dans les stations de traitement du lisier de porc. Lors d'une enquête terrain sur un an réalisé par l'Irstea, 252 isolats de *L. monocytogenes* ont été isolés de prélèvements de lisier, d'effluents de lagune et de sol de deux stations de traitement du lisier (S1 et S2). Les souches de *L. monocytogenes* ont été sérotypées par PCR et génotypées par RFLP-PFGE. Les isolats se répartissent dans trois sérogroupes : IIa, IIb et IVb. Dans la station S1, 35% des isolats appartiennent au séro groupe IIa, 35% au IIb et 30% au IVb. Dans la station S2, le séro groupe dominant est le IVb (62% des isolats) suivi des sérogroupes IIa (35%), et IIb (22%). Le séro groupe IIa prédomine dans les lisiers et le séro groupe IIb dans les effluents de lagune. Les 252 isolats se répartissent en 44 pulsotypes *Apal-Ascl* ; la diversité génétique est élevée ($D=0,95$). Le nombre de sérotypes mis en évidence dans les deux stations s'élève à 28 (S1) et à 24 (S2). Neuf pulsotypes (A5-C7, A37-C39, A4-C8, A4-C3, A19-C13, A26-C33, A40-C13, A15-C12, A3-C12) sont retrouvés dans les lisiers et les effluents de lagune suggérant une origine porcine de ces souches. Dix-sept (A1-C41, A33-C1, A34-C42, A39-C2, A24-C16, A27-C35, A35-C11, A21-C17, A34-C4, A36-C5, A4-C40, A7-C2, A11-C22, A28-C29, A35-C11, A28-C34, A12-C40) sont retrouvés uniquement dans les effluents de lagune suggérant une autre origine de contamination.

Cependant, neuf de ces pulsotypes partagent 90% de similarité génétique avec des pulsotypes d'origine porcine issus de la collection de l'Anses.

La présence de trois pulsotypes (A28-C34, A33-C1, A4-C8) à différents temps dans les lagunes semble confirmer la capacité de survie de ces souches dans ces effluents qui peuvent donc contribuer à leur dissémination dans l'environnement.

CO3. Genomic epidemiology of high-risk clonal groups of *Klebsiella pneumoniae* and automated extraction of their resistance and virulence genes

Brisse S.

Institut Pasteur

Multidrug resistant or highly virulent *Klebsiella pneumoniae* isolates are currently emerging, but the clonal groups (CG) corresponding to these high-risk strains remain imprecisely defined based on the current standard seven-gene MLST. We aimed to define *K. pneumoniae* clonal groups based on genome-wide sequence variation and to provide a simple bioinformatics tool to extract virulence and resistance genes from genomic data. A 694-gene core-genome multilocus sequence typing (cgMLST) system was developed. It allowed precise definition of hypervirulent (CG23, CG86, CG375 and CG380) and multidrug resistant (CG258, CG14, CG15) clonal groups. Detection of virulence and antimicrobial resistance-associated genes demonstrated that resistant and virulent *K. pneumoniae* populations are largely non-overlapping. A database (BIGSdb-Kp) was created to allow rapid extraction of medically and epidemiologically relevant information from genomic sequences of *K. pneumoniae*.

CO4. Transmission, évolution de l'entérovirus 71 en Europe et en Asie

Hassel C.¹, Mirand A.¹, Archimbaud C.¹, Terletskaia-Ladwig E.², Lukashev A.³, Farkas A.⁴, Diedrich S.⁵, Huemer H.⁶, Reigue-Lafeuille H.¹, Hengueil C.¹

¹Laboratoire Epidémiologie, Pathogenèse des Infections à Entérovirus, Université d'Auvergne, CHU Clermont-Ferrand, France

²Prof. Gisela Enders & Kollegen MVZ GbR and Institute of Virology, Stuttgart, Germany

³Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Moscow, Russia

⁴Division of Virology, National Center for Epidemiology, Budapest, Hungary

⁵National Reference Center for Poliomyelitis and Enterovirus, Robert Koch Institute, Berlin, Germany

⁶Austrian Agency for Health and Food Safety, Vienna, Austria

La maladie pied-main-bouche chez les enfants est causée par les entérovirus dont le type 71 (EV-A71), responsable de grandes épidémies dans la région Asie Pacifique. Ce virus est surveillé car il est responsable d'atteintes neurologiques et cardio-pulmonaires sévères.

Objectifs

Les entérovirus sont diffusés par les déplacements humains mais plusieurs interrogations subsistent concernant leur transmission à une échelle géographique globale et les conséquences de la transmission inter humaine sur l'évolution virale ne sont pas connues.

Matériels et méthodes

Nous avons réalisé des analyses phylogénétiques en utilisant de grands échantillons de séquences représentant deux régions géographiques pour estimer la transmission de l'EV-A71. Des jeux de séquences codant les protéines de capside VP1-VP4, incluant 116 séquences européennes nouvellement acquises, ont été utilisés. Nous avons estimé les dynamiques de transmission des génogroupes B4, B5, C1, C2 et C4 en Europe et en Asie pendant les 30 dernières années et examiné les conséquences évolutives.

Résultats

Les généalogies montrent que, lors des 15 dernières années, les infections à EV-A71 en Europe étaient principalement causées par des virus C1 et C2 et de fréquents événements de transport de souches avec l'Asie. Les virus B4-B5 et C4 présentent un profil différent : les phylogénies indiquent que des souches C4 ont été régulièrement disséminées depuis la Chine vers l'Europe et la Russie. La diversité génétique des virus C2 et C4 présente des fortes hausses saisonnières de l'incidence virale, les virus B4/B5 et C1 présentent des variations marquées. Une importante épidémie a été causée par le virus C2 en Europe en 2007. Les lignées virales se succèdent rapidement et peu d'entre elles persistent entre les épidémies. Les épidémies locales dans un pays surviennent à la suite d'importations virales. La diversité génétique de l'EV-A71 est clairement limitée par les extinctions de populations virales. L'émergence des virus variants repose sur un processus lent de substitutions d'acides aminés parmi un jeu limité de sites des quatre protéines de capside, ce qui en retour détermine deux profils évolutifs distincts entre les génogroupes B et C.

Conclusions

A une échelle géographique globale, la transmission de l'EV-A71 n'est pas uniforme entre l'Europe et l'Asie. Les dynamiques spatiotemporelles des variants suggèrent que le renouvellement local des épidémies est la conséquence de facteurs non sélectifs (régression du nombre d'individus sensibles, transmission intercontinentale) et de l'immunité croisée.

CO5. Emergence, compétition et colonisation bactériennes dans l'eau de fauteuils dentaires

*Abdouchakour F.*¹, *Dupont C.*¹, *Grau D.*^{1,2}, *Aujoulat F.*¹, *Marchandin H.*^{1,3}, *Parer S.*^{1,2}, *Valcarcel J.*⁴, *Jumas-Bilak E.*^{1,2}

¹Équipe Pathogènes et Environnements, UMR 5119 Ecosym, UFR Pharmacie, Université Montpellier 1

²Département d'Hygiène Hospitalière, CHRU de Montpellier.

³Laboratoire de Bactériologie, CHRU de Montpellier

⁴Service d'Odontologie, CHRU de Montpellier

Pseudomonas aeruginosa est la 3^e cause d'infections associées aux soins. C'est une bactérie présentant une polyvalence métabolique qui lui permet de se développer et de persister dans diverses niches écologiques, en particulier dans les réseaux d'eau qu'elle colonise en formant du biofilm. D'autres bacilles à Gram négatif non fermentants comme *Achromobacter* spp. sont retrouvés dans les réseaux d'eau et sont des pathogènes humains émergents.

Nous décrivons ici la dynamique de colonisation de *P. aeruginosa* et *Achromobacter* sp. de l'eau de 66 fauteuils d'un centre de soins dentaires (CSD) organisés en série sur un réseau d'eau commun.

Soixante huit souches de *P. aeruginosa* et 17 souches d'*Achromobacter* sp. isolées de l'eau des fauteuils dentaires et du réseau ont été étudiées par PCR sur séquences répétées, RFLP en électrophorèse en champ pulsé (ECP) et par analyse génétique/phylogénie multilocus.

Les deux espèces ont été retrouvées durant 2 ans dans l'ensemble du réseau du CSD. Un clone majoritaire de *P. aeruginosa* (ST309) et 2 clones d'*Achromobacter* sp. présentent un potentiel invasif particulier puisqu'ils représentent 87% des isolats de *P. aeruginosa* et 100% des isolats d'*Achromobacter* spp. Des phases successives d'invasion des 2 espèces et des génotypes en relation avec les mesures correctives de décontamination ont été observées, suggérant des phénomènes de sélection et d'inhibition compétitive entre les 2 espèces et entre les 2 populations d'*Achromobacter* spp. En 2013, *P. aeruginosa* ST309 s'est implanté massivement dans tous les fauteuils dentaires et les mesures de décontamination furent inefficaces. Sa présence préalable dans le réseau en amont suggère une contamination à partir de l'eau d'alimentation. Une modification génomique intraclonale observée en ECP entre une souche isolée avant le système de traitement d'eau et les souches colonisant les fauteuils dentaires évoque un phénomène d'évolution adaptative pouvant expliquer le succès invasif. Une restructuration complète du réseau avec isolement et décontamination de chaque fauteuil a été nécessaire afin de rétablir l'activité du CSD.

Certains clones bactériens semblent avoir une capacité d'implantation et/ou de persistance accrue dans des niches technologiques et leur éradication pourrait nécessiter des méthodes particulièrement agressives. Les caractéristiques leur conférant un tel avantage sélectif restent à élucider.

CO6. Antibiotiques en milieu aquatique : le fonctionnement des rivières perturbé ?*Roose-Amsaleg C., Anniel L.**UMR METIS (7619) Sorbonne Universités, CNRS, Université Pierre et Marie Curie*

Conscients de l'omniprésence des antibiotiques en milieu naturel, nous explorons leur impact sur la dénitrification en rivière. Ce processus majeur du cycle de l'azote consiste en la transformation anaérobie, du nitrate en diazote. Nous explorons les perturbations du processus et des communautés microbiennes impliquées.

Nous recherchons les effets de concentrations environnementales ($\text{ng-}\mu\text{g L}^{-1}$), en deçà des concentrations inhibitrices (mg L^{-1}). Des sédiments d'un affluent suburbain de la Seine ont été soumis à des systèmes en flux continu. Ils permettent de reproduire au laboratoire des conditions favorables à la dénitrification ainsi qu'une exposition continue en antibiotique. Plusieurs étapes de la dénitrification ont été étudiées (réduction des nitrates, production de nitrites, production d'oxyde nitreux). Aucun des 4 antibiotiques testés (sulfaméthoxazole, SMX ; fluméquine, FLU ; vancomycine, VA et tétracycline, TC) n'inhibe la dénitrification aux concentrations environnementales. Des inhibitions partielles de la réduction des nitrates ($\gg 40\%$) ont uniquement lieu à concentration élevée ($> 50 \text{ mg L}^{-1}$) de FLU et SMX. A l'exception de la TC, tous les antibiotiques stimulent significativement la production de nitrites à concentration élevée ; il en est de même pour la VA à concentration environnementale ($\mu\text{g L}^{-1}$). En revanche, les taux de production d'oxyde nitreux, uniquement observés dans le cas de la TC demeurent inchangés quelle que soit le niveau d'exposition.

Par ailleurs, concernant les communautés bactériennes sédimentaires exposées à la VA ou la TC, des changements s'opèrent dans leurs composition dès les plus faibles concentrations et s'amplifient avec la concentration ; le nombre de taxons restant constant. De plus, si aucune activité dénitrifiante n'est développée par les communautés cultivables enrichies en dénitrifiantes, au 1^{er} jour d'exposition, après 2 à 7 jours, la dénitrification a lieu en présence de 2 mg L^{-1} TC et plus de 256 mg L^{-1} VA. Une adaptation des communautés s'effectue donc en faveur d'espèces tolérantes voire résistantes à l'antibiotique au détriment d'espèces sensibles. En outre, des bactéries dénitrifiantes isolées de rivière parviennent à dénitrifier à des concentrations élevées de VA ($> 256 \text{ mg L}^{-1}$) y compris des bactéries à Gram positif (naturellement affectées par la VA). Cette insensibilité de bactéries dénitrifiantes autochtones vis à vis de 2 antibiotiques est troublante. Il convient désormais d'identifier l'origine génétique de cette insensibilité aux antibiotiques de bactéries de rivière.

CO7. *Escherichia coli* antibiorésistantes et porteuses d'intégrons isolées d'effluents d'abattoirs bovins

*Um M. M.*¹, *Bibbal D.*¹, *Kérourédan M.*¹, *Stalder T.*^{2,3}, *Barraud O.*³, *Casellas M.*², *Gaschet M.*, *Oswald E.*⁴, *Dagot C.*², *Ploy M.-C.*³, *Brugère H.*¹

¹INSERM UMR1043, INRA USC1360, INP-ENVT, Université de Toulouse, Toulouse, France

²Université de Limoges, EA4330 GRESE, Limoges, France

³INSERM UMR 1092, Université de Limoges, CHU Limoges, Limoges, France

⁴INSERM UMR1043, INRA USC1360, CHU de Toulouse, Hôpital Purpan, Toulouse, France

Objectifs :

Peu d'informations sont disponibles sur la présence de souches d'*Escherichia coli* antibiorésistantes dans les effluents d'abattoirs de bovins. L'objectif de cette étude était d'évaluer leur prévalence aux différents stades du processus épuratoire des effluents, afin d'en apprécier l'impact. La présence d'intégrons a également été recherchée, afin de préciser leur lien avec la résistance aux antibiotiques.

Matériel et méthodes :

Les effluents de station d'épuration d'un abattoir de bovins adultes et d'un abattoir de veaux ont été prélevés à quatre étapes : eaux usées, eaux traitées, boues circulantes et boues destinées à être épandues. Le dénombrement des souches d'*E. coli* a été réalisé. La résistance à 16 antibiotiques a été recherchée par la méthode de diffusion en milieu gélosé pour 40 souches d'*E. coli* par point de prélèvement. La présence d'intégrons de classe 1, 2 et 3 a été recherchée par PCR en temps réel, sur ces mêmes souches.

Résultats :

Dans chacun des 2 abattoirs, le traitement épuratoire a permis de réduire de 3 Log la charge en *E. coli* pour les effluents liquides avec un rejet dans la rivière supérieur à 102 UFC/mL; 105 UFC/mL étaient présentes dans les boues destinées à être épandues. Le pourcentage d'*E. coli* résistantes à au moins un des antibiotiques testés était significativement plus élevé dans les prélèvements d'abattoir de veaux (90,6%) que dans les prélèvements d'abattoir de bovins adultes (10,0%) ($p < 0,05$). Le niveau de résistance le plus élevé a été observé pour la tétracycline. Dans les prélèvements de l'abattoir de veaux, 45,0% des souches étaient résistantes à plus de 5 antibiotiques. Ces résultats sont en adéquation avec ceux concernant les intégrons : 57,5% des *E. coli* de l'abattoir de veaux hébergeaient un intégron de classe 1, versus 0,0% pour ceux issus de l'abattoir de bovins adultes. Par ailleurs, un intégron de classe 2 a été identifié dans 15 souches isolées de l'abattoir de veaux; et aucun intégron de classe 3 n'a été détecté. Les pourcentages d'*E. coli* antibiorésistantes et porteuses d'intégrons de classe 1 n'étaient pas significativement différents en fonction des points de prélèvement.

Conclusions :

Cette étude a montré que les effluents et boues de station d'épuration d'abattoirs de bovins étaient contaminés par des *E. coli* antibiorésistantes et porteuses d'intégrons, rejetées dans l'environnement. Ces pourcentages étaient plus élevés dans les effluents de l'abattoir de veaux. Le traitement épuratoire n'a pas eu d'impact sur ces pourcentages.

CO8. Comparaison de souillures alimentaires sur l'adhésion de *Listeria monocytogenes* sur une surface en acier inoxydable et recherche de milieux de culture modèles.

Firmesse O., Overney A., Chassaing D., Carpentier B.

ANSES

Résumé :

La persistance de *Listeria monocytogenes* dans les ateliers agro-alimentaires, c'est-à-dire sa présence pendant de longues durées malgré des applications correctes et fréquentes d'opérations d'hygiène [1] est un problème majeur. De fait, de telles persistances peuvent être responsables d'épidémies de listériose aux conséquences désastreuses [2]. Partant du principe que la persistance bactérienne résulte d'une croissance, il est important d'expérimenter en présence de souillures alimentaires, qui sont les nutriments présents sur le terrain, ou d'un milieu de culture modèle. Cependant, l'utilisation de souillures présente des inconvénients : leur qualité n'est pas homogène d'un lot à un autre, elles ne sont pas autoclavables, ne se conservent pas longtemps et génèrent un bruit de fond important lors des observations par microscopie ou par cytométrie en flux qui perturbe l'analyse.

Les travaux proposés ont consisté tout d'abord à comparer des souillures alimentaires (l'exsudat de viande et le jus de saumon fumé) sur la base de plusieurs critères : (i) la croissance bactérienne en milieu liquide à 25°C évaluée par mesure d'absorbance ou par dénombrement d'UFC ; puis sur une surface en acier inoxydable après 24 heures de culture à 25°C : (ii) la topographie des populations bactériennes adhérentes observées par microscopie à épifluorescence, (iii) les forces d'adhésion relatives de ces cellules estimées par la réalisation de droites de décrochement suite à des écouvillonnages successifs et (iv) l'état physiologique des cellules adhérentes avec quantification des cellules totales par PCRq, des cellules viables par PMA-PCRq et des cellules cultivables par dénombrement d'UFC. Ensuite, sur la base de ces mêmes critères, des milieux de culture modèles se rapprochant le plus possible des souillures alimentaires ont été recherchés afin de s'affranchir des inconvénients liés à leur utilisation.

D'après nos résultats, le comportement de *L. monocytogenes* sur une surface en acier inoxydable est fortement dépendant de la souillure alimentaire utilisée. De plus, sur la base des critères fixés et après validation avec quatre souches de *L. monocytogenes*, seul le jus de saumon fumé paraît être remplaçable par un milieu de culture de laboratoire modifié.

[1] Carpentier, B., Cerf, O. (2011). Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, **145**, 1-8.

[2] Todd, E.C.D., Notermans, S. (2011). Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, **22**, 1484-1490

CO9. Rôle de la couche muqueuse des spores de *B. subtilis*

Christine Faille¹, Etienne Dewailly², Christian Slomianny², Emmanuel Maes^{3,4}, Frédéric Krzewinski^{3,4}, Yann Guerardel^{3,4}

¹INRA, UR638 Interface Processes and Hygiene of Materials, F-59651 Villeneuve d'Ascq, France

²INSERM-LPC, U1003, Univ. Lille1, Cité Scientifique, Bât. SN3, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France

³Univ. Lille1, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France

⁴CNRS UMR 8576, F-59655, Villeneuve d'Ascq, France

Objectifs : Nous avons observé précédemment que les spores de la souche *B. subtilis* 98/7 était entourées d'une épaisse couche muqueuse (Faille et al., 2010), dont la structure est très éloignée de celle de la « brosse » superficielle de l'exosporium des spores de *B. cereus*. L'objet de cette étude est de caractériser cette couche muqueuse et de rechercher son rôle sur les propriétés de surface et d'adhésion des spores.

Méthodes : Des sections de spores de sept souches de *B. subtilis* ont été observées par microscopie électronique à transmission pour rechercher la présence de cette couche et caractériser sa morphologie. Ces spores ont aussi été analysées pour leur caractère hydrophile (méthode MATH d'affinité pour l'hexadécane, solvant apolaire), la charge de surface (zétamétrie) et la nature des fractions glucidiques. Afin d'identifier le rôle de la couche externe, celle-ci a été retirée mécaniquement (sonication et presse de French) des spores de *B. subtilis* 98/7 et les spores obtenues ont été à nouveau analysées pour leurs propriétés de surface et leur aptitude à adhérer à des surfaces d'acier inoxydable.

Résultats : La présence d'une couche muqueuse n'est pas observée systématiquement dans l'espèce *B. subtilis* et il est difficile de relier la présence de cette couche aux propriétés des spores. La souche *B. subtilis* 98/7 dont les spores sont entourées d'une épaisse couche muqueuse, a été conservée pour des analyses plus poussées. Cette couche muqueuse est essentiellement composée notamment de deux polysaccharides. Le premier est formé de dérivés du rhamnose et de près de 50% de quinovose et glucosamine. Plus original, le second polysaccharide est riche en acides muramiques, famille de monosaccharides associés au cortex, couche profonde de la spore. Ces spores sont très hydrophiles (constante à l'équilibre = 1.75) et très électronégatives (potentiel zéta proche de -35 mV). Lorsque la couche externe est retirée mécaniquement, les spores deviennent significativement moins hydrophiles (constante à l'équilibre = 5.95), mais la charge de surface n'est pas modifiée significativement. En parallèle, les spores dépourvues de la couche muqueuse adhèrent plus à l'acier inoxydable (10 fois plus de spores adhérentes), et leur résistance à une procédure de nettoyage est peu affectée.

En conclusion, la couche muqueuse entourant les spores de *B. subtilis* 98/7 est largement responsable des propriétés particulières de cette souche, notamment sa faible capacité à contaminer les surfaces, pour peu sur son intégrité ne soit pas affectée par les conditions environnementales.

CO10. Détection rapide de micro-organismes par fluorescence dans les produits agroalimentaires

Sophie Barrier, Renaud Chollet et Holger Schönenbrücher.

Merck Millipore, Lab Solutions, BioMonitoring, R&D, Molsheim, France.

Détecter rapidement un contaminant dans un produit alimentaire représente un atout majeur pour la sécurité alimentaire et les industriels. L'utilisation de la fluorescence représente une alternative par rapport aux procédures de microbiologie traditionnelle. Une méthode de détection rapide par fluorescence a été développée dans le but de réduire simplement et de façon significative le temps de détection des micro-organismes. L'objectif de cette étude est de décrire le protocole de détection par fluorescence et de démontrer sur différentes matrices alimentaires les performances de la méthode.

La méthode développée consiste à ajouter une étape intermédiaire aux procédures classiques de microbiologie traditionnelle basée sur la filtration. Le protocole permet de réaliser un marquage par fluorescence des micro-organismes présents sur la membrane et de les détecter après une période d'incubation réduite. Le principe est basé sur l'utilisation d'une solution de marquage universelle contenant un substrat non fluorescent dérivé de la fluorescéine, devenant fluorescent lorsqu'il est clivé par les micro-organismes viables. L'accumulation du marqueur fluorescent dans les cellules rend la micro-colonie visible par un lecteur.

Trois matrices alimentaires variées (eau minérale, poudre de noix de coco et boisson énergétique) ont été sélectionnées. Aucune des matrices testées n'a montré la présence d'une fluorescence naturelle empêchant l'application du protocole de détection. Les contaminants totaux naturels de l'eau minérale ont été détectés par fluorescence après 24 heures d'incubation sur milieu Yeast Extract Agar à $22 \pm 2^\circ\text{C}$ contre 68 ± 4 heures pour la méthode traditionnelle selon la norme ISO 6222. *Aspergillus brasiliensis* et *Candida albicans* ont été détectés dans la poudre de noix de coco après 24 heures d'incubation sur milieu spécifique à 25°C contre 5 jours avec la méthode traditionnelle. La présence d'*Alicyclobacillus acidoterrestris* artificiellement inoculé dans la boisson énergétique a pu être mise en évidence après 20 heures d'incubation sur milieu Potatoes Dextrose Agar pH 5,6 à 46°C contre 3 jours avec la méthode traditionnelle. L'équivalence entre la méthode traditionnelle et la méthode de détection rapide a été démontrée avec trois niveaux de contamination différents.

La méthode de détection par fluorescence développée montre des résultats équivalents aux méthodes de référence tout en réduisant significativement le temps de détection.

CO11. Détection et enrichissement spécifique des bactéries à Gram négatif vivantes

Emilie Fugier, Audrey Dumont, Annie Malleron^c, Enora Poquet^a, Aurélie Baron^a, Boris Vauzeilles^{a,c}, Sam Dukan^b

^a Centre de Recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles du CNRS, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France. Fax: +33 1 69 07 72 47; Tel: +33 1 69 82 31 17

^b Aix Marseille Université, Laboratoire de Chimie Bactérienne (UMR 7283), Institut de Microbiologie de la Méditerranée (IMM), CNRS, 31 Chemin Joseph Aiguier - 13402 Marseille, France. Fax : +33 4 91 71 89 14; Tel: +33 4 91 16 46 01

^c CNRS and Université Paris-Sud, Laboratoire de Synthèse de Biomolécules, Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay, UMR 8182, 91405 Orsay, France

L'industrie alimentaire est soumise à de drastiques contrôles sanitaires qui imposent la recherche entre autre de bactéries à Gram négatif pathogènes (*Escherichia coli* O157, *Salmonella* spp., *Enterobacter sakasaki*) avant libération des lots. Cette analyse passe par une première étape d'enrichissement, mise en culture liquide de 25 g de matrice alimentaire (de 16 à 24h) suivie d'une étape d'identification (ELISA, PCR, gélose...). La réduction du temps nécessaire à cet enrichissement est un sujet de recherche très actif puisque il conditionne la libération des lots plus rapidement.

Pour répondre à cette demande nous avons mis au point une technologie innovante permettant de concentrer toutes les bactéries Gram-négatives vivantes présentes en solution. Pour ce faire, les bactéries sont mises en contact avec une sonde, mime d'un sucre dont seule les bactéries Gram négative se servent pour synthétiser un polysaccharide spécifique de leur membrane cellulaire. Mais ce sucre a été au préalable modifié par l'introduction d'une fonction azoture (constituée de trois atomes d'azote). Leurrées, les bactéries Gram négative vivantes intègrent le sucre artificiel à leur membrane (Dumont *et al.*, 2012). Grâce à des billes magnétiques s'attachant exclusivement au groupe azoture présent en surface des bactéries, il devient alors possible de collecter les bactéries Gram négative par simple application d'un champ magnétique.

Nous apportons ici la preuve de concept de notre technologie, en concentrant *E. coli* comme exemple de bactérie modèle Gram négative. Nous démontrons ainsi une bonne sensibilité et spécificité de notre technique et ce même en présence de bactéries *E. coli* mortes ou de bactéries à Gram positif comme *B. subtilis*. Ce travail met en lumière l'efficacité de notre technologie qui permet de concentrer après 6-8h de culture, plus de 1000 fois les bactéries à Gram négatif vivantes présentes dans le bouillon d'enrichissement.

CO12. Premiers enseignements de l'Évaluation externe de la qualité en microbiologie moléculaire en Belgique*China B., Vernelen K.**Institut Scientifique de Santé Publique*

Depuis 2008, l'institut scientifique de santé publique organise le contrôle externe de la qualité pour certains les paramètres de la microbiologie moléculaire qui font partie du remboursement de la sécurité sociale. Le remboursement est conditionné à la participation à l'EEQ mais aussi à l'obtention d'une accréditation ISO15189 pour chacun de ses paramètres. Il s'agit : de la détection de *Chlamydia trachomatis*, de la détection de *Neisseria gonorrhoeae*, de la détection de *Mycobacterium tuberculosis* et de *Mycobacterium avium* pour ce qui est de la bactériologie. La détection des enterovirus, du varicella zoster virus, des virus HSV1 et HSV2, la détection et la quantification du virus de l'hépatite B et du virus de l'hépatite C ainsi que du génotypage de l'HCV et la détection des souches à haut risque du papillomavirus, pour la virologie. Enfin, pour la parasitologie, on trouve aussi la détection de *Toxoplasma gondii*.

Les échantillons sont fournis par QCMD (Glasgow, Ecosse), les laboratoires belges ont ainsi la possibilité de comparer leurs performances avec celles des participants des autres pays. Ceci est particulièrement important pour les paramètres où le nombre de participants belges est faible. De plus, l'ISP reçoit un rapport spécifique pour les participants belges ainsi qu'en fin de cycle les données brutes qui permettent de générer un rapport annuel et de comparer les tendances d'une année à l'autre. Les laboratoires sont aussi évalués individuellement et sont invités à justifier tout écart significatif et à entreprendre les actions correctives et préventives adéquates.

D'un point de vue global, on constate que les performances ont tendance à s'améliorer au cours du temps. Ainsi le nombre de fautes cliniquement graves, c'est-à-dire soit un résultat faussement positif ou un résultat faussement négatif pour un échantillon fortement contaminé, est en baisse passant de 3,1% en 2008 à 0,65% en 2012. D'autre part, les principaux problèmes qui semblent perdurer sont l'incapacité de certaines méthodes de détecter le variant suédois de *C. trachomatis* donnant lieu à un grand nombre de faux négatifs ainsi que le manque de spécificité en ce qui concerne la détection de *N. gonorrhoeae*. En effet, un nombre significatif de résultats faussement positifs sont enregistrés pour des souches de *Neisseria lactamica* ou *cinerea*. En ce qui concerne, les autres paramètres évalués, les performances sont surtout fonction de la composition des panels, les échantillons peu contaminés étant en général moins bien détectés que les échantillons moyennement ou fortement contaminés.

CO13. Effet souche de *Coxiella burnetii* sur les embryons caprins.

Ashraf Alsaleh, Francis Fieni, Jean-François Bruyas, Gérard Chatagnon, Cécile Roux, Myriam Larrat et Jean-Louis Pellerin.
Unité de Recherche sur la Sécurité Sanitaire des Biotechnologies de la Reproduction,
Oniris, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, BP 40706, 44307 NANTES Cedex 03, France

Coxiella burnetii a montré une forte adhérence à la zone pellucide (ZP) des embryons caprins produits *in vivo* et *in vitro* et des embryons bovins produits *in vitro*, après une infection *in vitro*. Les souches *C. burnetii*, CbC1 et CbB1 utilisées lors de ces infections d'embryons *in vitro*, étaient issues d'œufs embryonnés. La purification par centrifugation différentielle de cette souche n'a pas pu éliminer totalement les protéines d'œuf qui pourraient influencer sur l'interaction *Coxiella*-ZP.

L'objectif de cette étude est de rechercher, chez l'embryon caprin et par utilisation de *C. burnetii* d'origines de production différentes, l'effet éventuel des protéines d'œufs résiduelles sur l'interaction de la bactérie sur la ZP.

248 embryons caprins, de 8 à 16 cellules avec une ZP intacte, produits *in vitro* sont répartis en 4 lots différents. Chaque lot est infecté respectivement avec la souche CbC1 produite selon des conditions différentes: soit par ovoculture pour le lot 1 (n=30) (témoin positif), par ovoculture purifiée pour le lot 2 (n=58), par culture cellulaire pour le lot 3 (n=80), et par souche sauvage (prélevée à partir d'un avortement) pour le lot 4 (n=80). Après 18 h d'incubation dans des bains contenant chacun 1 mL de MEM complet avec une concentration de 10⁹ bactéries/mL, à 37°C dans une atmosphère de 5% de CO₂, les embryons sont lavés par groupes de 8 à 10 embryons selon le protocole de 10 lavages recommandés par l'IETS.

Les 10 bains de lavages pour chaque groupe d'embryons des 4 lots sont récupérés séparément et centrifugés pendant 1 h à 13 000 g. Les groupes d'embryons lavés et les culots des 10 bains de lavages sont testés par PCR classique.

La détection de l'ADN bactérien dans tous les groupes d'embryons infectés avec la CbC1 ovoculture (lot 1), culture cellulaire (lot 3) et sauvage (lot 4), et pour 2 des 6 groupes d'embryons du lot 2 infectés avec CbC1 ovoculture purifiée, après les 10 lavages successifs, montre clairement que la source de la souche n'a pas d'effet sur l'adhérence de *C. burnetii* sur la ZP d'embryons caprins et que notamment les résidus des protéines d'œufs présents dans la souche produite par ovoculture ne jouent pas un rôle essentiel dans cette interaction.

Cette persistance bactérienne présente un risque de transmission de la bactérie, lors de transfert embryonnaire de chèvres donneuses infectées à des chèvres receveuses indemnes et/ou à leurs produits. D'autres études sont nécessaires pour déterminer si un traitement enzymatique permettrait d'éliminer *C. burnetii* de la zone pellucide.

Mots clés : *Coxiella burnetii* ; transfert d'embryons ; zone pellucide ; embryon caprin; PCR.

CO14. Caractérisation, prévalence et analyse phylogénétique de trois nouveaux variants de la famille des fimbriae F17 produits par *Escherichia coli* chez le bovin.Bihannic M.^{1,2}, Madec J.-P.¹, Oswald E.²¹. ANSES². INRA

La bactérie *Escherichia coli* constitue une espèce bactérienne prédominante de la microflore aéro-anaérobie intestinale des ruminants. En raison d'une grande plasticité génétique, elle peut parfois devenir pathogène, et être responsable d'un large éventail d'infections. Certains *E. coli* pathogènes, impliqués dans des diarrhées et des septicémies du veau et de l'agneau, se caractérisent par la production de fimbriae de la famille F17. En dépit d'une association évidente avec la virulence, le rôle exact des fimbriae F17 dans la pathogénicité d'*E. coli* reste encore aujourd'hui inconnu. Plusieurs variants des sous-unités F17-A et F17-G des fimbriae F17 ont été identifiés, qui sont retrouvés associés à différents facteurs de virulence caractéristiques de souches pathogènes bovines d'*E. coli*. L'analyse des flux génétiques et des associations de ces variants révèle la présence de souches productrices de fimbriae F17 non typables, suggérant l'existence de variants non encore identifiés.

Au cours d'une étude des facteurs de virulence d'une collection de 58 isolats d'*E. coli* issus de veaux diarrhéiques en Iran, un nouveau variant F17e-A a été identifié. Prévalent au sein des isolats iraniens producteurs de fimbriae F17 (71.4%), ce variant a été faiblement retrouvé au sein d'une population bovine saine en France, suggérant une forte association à la virulence ou une dissémination très localisée. Une analyse *in silico* de la séquence du gène f17Ae a révélé le portage de F17e-A et d'un autre nouveau variant F17-G3 sur un îlot de pathogénicité au sein de la souche bovine d'*E. coli* MHI813. Un troisième nouveau variant, F17f-A, a en outre été découvert sur le plasmide pVir68 de la souche pathogène bovine 6.0900 et correspond à une combinaison des 2 variants déjà décrits F17c-A et F17d-A. Une analyse phylogénétique a finalement mis en évidence la parenté de F17e-A avec F17b-A et la grande divergence entre F17-G3 et les deux variants F17-G1 et F17-G2.

CO15. Nouvelle approche de la gestion des risques microbiologiques dans les aliments*Augustin J.-C., Cerf Olivier*

ENVA

La législation alimentaire vise à atteindre un certain niveau de protection sanitaire de la population. Les pratiques d'hygiène et les mesures de maîtrise des dangers microbiologiques réglementaires appliquées par les exploitants du secteur alimentaire doivent permettre d'atteindre un certain niveau de risque de morbidité et de mortalité « acceptable ». L'approche permettant de justifier ces mesures de gestion préconisée par le Codex alimentarius consiste à traduire le niveau de risque acceptable en charge maximale en micro-organismes indésirables dans les aliments au moment de leur consommation (« objectif de sécurité des aliments » - Food Safety Objective - FSO). Ces objectifs concernent les aliments au moment de leur consommation, donc à un moment où ils ne sont plus sous la responsabilité des exploitants. Il faut tenir compte des conditions raisonnablement prévisibles dans lesquelles les aliments peuvent se trouver entre le moment de leur remise au consommateur et celui de leur consommation. Les exploitants doivent donc disposer d'un autre objectif qui tienne compte de ces conditions raisonnablement prévisibles. Cet objectif est la charge maximale en micro-organismes indésirables au moment où les aliments sont remis au consommateur (« objectif de performance » - Performance Objective - PO). De la même façon, d'autres objectifs de performance peuvent être établis pour des stades antérieurs de la chaîne alimentaire, par exemple, pour l'expédition par le transformateur, pour les matières premières, etc. Ces relations entre risque acceptable et objectifs de sécurité des aliments ou objectifs de performance s'établissent grâce à la mise en œuvre de démarches d'appréciation quantitative des risques qui permettent d'évaluer les risques microbiologiques et de modéliser l'influence des facteurs les modulant tout au long de la chaîne alimentaire. Une fois les objectifs définis, les exploitants et les gestionnaires peuvent alors identifier les mesures de maîtrise dont les critères de performance permettent de respecter ces objectifs et définir des critères microbiologiques qui permettent de vérifier leur respect. Cette approche, théorisée depuis une dizaine d'années, se heurte encore en pratique à des difficultés dans sa mise en œuvre car elle requiert une prise de position de l'autorité compétente sur le risque acceptable ainsi que la mise en œuvre de démarches de modélisation du risque parfois complexes.

CO16. Quantification et caractérisation des *Campylobacters* infectant le porc en élevage

Mily Leblanc Maridor (1), Catherine Belloc (1), Berengere Chidaine (2), Martine Denis (2)

(1) Oniris, INRA, LUNAM Université, UMR 1300 Biologie, Epidémiologie et Analyse de Risque en santé animale, Nantes, France

(2) ANSES, Unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcine, Ploufragan, France

Les *Campylobacter* sont considérés comme la première cause de toxi-infections alimentaires chez l'homme dans les pays développés. Le portage intestinal de *Campylobacter* est fréquent chez le porc, notamment en *Campylobacter coli*. Toutefois, la dynamique d'infection des animaux au cours de leur vie est mal connue. La truie semble jouer un rôle important dans l'infection des porcelets dès les premiers jours de vie mais les autres sources potentielles d'infection (congénères après le sevrage, environnement d'élevage) n'ont fait l'objet que de peu d'investigations. Notre étude a pour objectif de déterminer l'importance relative de ces diverses sources d'infection. Dans ce but, cinq truies et trente porcelets issus de ces truies ont fait l'objet de prélèvements de matières fécales au cours d'un cycle de production dans deux élevages naisseurs-engraisseurs. Les *Campylobacters* ont également été recherchés dans l'environnement des animaux (bâtiments d'élevage, aliment, eau de boisson). Des PCRs quantitatives en temps réel préalablement mises au point ont permis l'identification et la quantification des espèces *C jejuni* et *C coli*. Nous avons mis en évidence une prévalence élevée du portage de *C coli* dès les premiers jours de vie des porcelets. Les quantités excrétées se sont révélées très variables entre animaux au même stade physiologique et au cours de la vie d'un même animal. En parallèle, des souches isolées sur chaque animal à différents moments de la vie ont été génotypées par les méthodes de PFGE et PCR-RFLP. La comparaison des souches confirme le rôle prépondérant des truies dans l'infection précoce des porcelets et suggère, ultérieurement, une diversité des sources de contamination.

CO17. Etude de la survie en air ambiant de bactéries anaérobies d'intérêt médical

Bihl P.-A., De Martinot S., Jaulhac B.

Laboratoire de Bactériologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

Objectifs :

En bactériologie médicale, lors de la démarche diagnostique d'une infection à bactéries anaérobies strictes, l'exposition temporaire à l'air ambiant est difficilement évitable tant lors de la culture que de l'identification ou de l'antibiogramme. Nous avons analysé l'impact du passage en air ambiant sur la survie de ces bactéries anaérobies.

Matériels et méthodes :

• Souches

Nous avons étudié 4 espèces bactériennes anaérobies sur la base de leur sensibilité connue à l'oxygène et de leur fréquence d'isolement clinique : *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella melaninogenica* et *Clostridium perfringens*. Pour chaque espèce, une souche a été testée. Nous l'avons mise en suspension dans un milieu liquide et généré une gamme de dilution en cascade jusqu'à 10⁻⁵.

• Milieux et ensemencement

100 µl de chaque dilution sont ensemencés sur des géloses SCS (bioMérieux) pré-incubées en anaérobiose depuis ≥ 48 h) selon le protocole de chaque type de manipulation :

-« survie avant ensemencement » : exposition des géloses préduites à l'air ambiant pendant 0, 1, 2, 3 ou 4 heures puis ensemencement en atmosphère anaérobie.

-« témoin » : identique à « survie avant ensemencement » à l'exception du fait que les géloses ne sont pas exposées à l'air ambiant

-« survie après ensemencement » : sortie des géloses préduites en air ambiant, ensemencement immédiat puis exposition pendant 0, 1, 2, 3 ou 4 heures avant incubation en anaérobiose.

• Lecture des résultats

Après 2-4 jours d'incubation, dénombrement des colonies présentes sur chaque gélose.

• Analyse statistique

Nous avons défini comme seuil de « perte acceptable » 1 log UFC/ml. Nous avons testé la décroissance bactérienne par rapport à ce seuil.

Résultats

• Analyse a priori :

- Absence d'inhibition de croissance par rapport aux témoins après 4 heures d'exposition à l'air ambiant et pour les 4 souches étudiées.

- Existence d'une inhibition de croissance due au milieu liquide de mise en suspension pour les souches de *Fusobacterium* et *Prevotella* testées.

• Analyse statistique

Absence de différence significative entre « survie avant ensemencement » et « témoin » pour les 4 souches testées.

Le seuil n'a été atteint pour aucune des manipulations réalisées

Conclusion

- Absence de perte significative de survie après 4 h d'exposition de géloses pré-réduites à l'air ambiant, que celui-ci ait lieu avant ou après ensemencement.

- Ces résultats permettent d'introduire une certaine souplesse dans les différentes étapes de la démarche diagnostique et d'envisager l'automatisation de l'ensemencement des bactéries anaérobies strictes.

CO18. Leptospirose humaine : étude clinique et biologique

Afiri M.¹, Amara-Khorba A.², Ait-Kaid D.³

¹CHU Nedir Mohammed

²Institut Pasteur - Alger

³EHS El Kettar - Alger

Objectifs : Décrire les aspects cliniques et biologiques de 173 cas de leptospirose humaine.

Matériels et méthodes : Etude prospective, portant sur les aspects cliniques et biologiques chez 173 patients hospitalisés au sein du CHU de Tizi-Ouzou du 01/01/2005 au 31/12/2008 pour leptospirose confirmée sérologiquement.

Résultats : Le sex-ratio était de 113 hommes pour 60 femmes, l'âge moyen de 35.92 ans. La transmission était le plus souvent indirecte chez les éleveurs, les agriculteurs et les ouvriers des sablières. Les atteintes viscérales étaient dominées par l'ictère de type cholestatique (45.08 %), l'insuffisance rénale aiguë (39.30%), l'atteinte pulmonaire (36.41%), les signes hémorragiques (35.83%), l'atteinte cardiaque (16.18%) et neurologique (12.71%). Le diagnostic était toujours confirmé sérologiquement par la réaction de Martin et Pettit ou microagglutination test (MAT). Le séro groupe icterohaemorrhagiae prédominait (52.60%). Il n'y avait pas de relation absolue entre la symptomatologie clinique, les perturbations biologiques et le séro groupe de leptospires. Le taux de létalité était de 6,93 %.

Conclusion : La fréquence et la gravité de la leptospirose ictéro-hémorragique dans la wilaya de Tizi-Ouzou, devraient inciter à instaurer une prophylaxie vaccinale chez les sujets les plus exposés (éleveurs et agriculteurs notamment) car le vaccin, qui ne protège que contre *Leptospira icterohaemorrhagiae* a prouvé son efficacité.

CO19. Identification bactérienne, résistance et virulence par spectrométrie de masse electrospray

Dauwalder O.¹, Charrier J.-P.², Vandenesch F.¹, Theretz A.², Chatellier S.³, Gervasi G.², Lemoine J.⁴, Durand G.³, Dechaume D.², Girard V.³, Salvador A.², Tristan A.¹, Fortin T.², Bes M.¹, Lacoux X.⁵, Zambardi G.³, Cecchini T.², Freydiere A.-M.⁶, Franceschi C.³, Degout-Charmette E.², Charretier Y.⁴

¹ CNR des Staphylocoques, CBPE, Hospices Civils de Lyon, Bron, France; Laboratoire de Bactériologie, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon, Bron, France; INSERM U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

² Technology Research Department, Marcy l'Etoile, bioMérieux SA, France

³ R&D Microbiology, La Balme Les Grottes, bioMérieux SA, France

⁴ ANABIO, UMR 5180, CNRS / Université de Lyon, Lyon-1 (UCBL-1), France

⁵ R&D ImmunoAssays, Marcy l'Etoile, bioMérieux SA, France

⁶ Laboratoire de Bactériologie, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon, Bron, France

Objectifs : Etablir la preuve de concept de l'identification bactérienne et de la détection de facteurs de virulence et de marqueurs de résistance par chromatographie liquide [LC] couplée à un spectromètre de masse à triple quadripole [SM-ESI-QqQ] à partir d'isolats cliniques et de flacons d'hémocultures.

Matériels et méthode : Quatre-vingt-seize souches cliniques de *Staphylococcus aureus*, 20 *S. non aureus* et 14 hémocultures positives à *S. aureus* (bioMérieux) ont été lysées puis digérées par la trypsine. La solution peptidique obtenue a été analysée par chromatographie liquide [LC] conventionnelle (XBridge BEH, C18) couplée avec un SM-ESI-QqQ (QTRAP 5500 MS, AB Sciex). Les spectres obtenus ont été acquis en mode « Selected/Multiple Reaction Monitoring » [SRM/MRM]. Les méthodes SRM/MRM ont été créées à l'aide de peptides synthétiques et/ou de protéines purifiées. Les acquisitions ont été analysées par le logiciel MultiQuantTM. La présence d'un peptide est affirmée par la détection de 3 transitions peptidiques associées à la conservation du ratio des aires des pics entre les transitions. Les souches incluses ont été caractérisées par méthodes phénotypiques et/ou moléculaires vis-à-vis de leur résistance à la méthicilline [OXA-R] et de leur virulence (détection de la leucocidine de Panton et Valentine [PVL]).

Résultats principaux : Appliquée à une collection de 38 *S. aureus* et 7 *Staphylococcus non aureus*, la méthode SRM/MRM a permis la sélection de 42 peptides protéolytiques dont la pertinence a été évaluée sur une seconde collection de 38 *S. aureus* et 9 *S. non aureus*. Les résultats d'identification, des détections d'OXA-R et de PVL ont montré une concordance parfaite avec les méthodes phénotypiques et/ou moléculaires. La reproductibilité, évaluée sur 12 *S. aureus* testés dans 3 expériences indépendantes, a montré une détection qualitative sans erreur. Pour éviter tous biais de clonalité, 20 souches représentatives des principaux clones de *S. aureus* ont été analysées, et ont montré une parfaite corrélation avec les techniques de référence. Enfin, 14 hémocultures aérobies provenant de patients atteints de sepsis à *S. aureus* ont été analysées permettant l'identification et les détections de résistance et de présence de PVL en moins d'une heure.

Conclusions : La LC SM-ESI-QqQ apparait comme un outil prometteur : elle permet la caractérisation des souches et des hémocultures en moins d'heure vis-à-vis de leur résistance et de leur virulence, réduisant le délai avant diagnostic et favorisant l'optimisation de l'antibiothérapie, notamment vis-à-vis de la virulence.

CO20. Détection automatisée de gènes de résistance dans les génomes de *Klebsiella pneumoniae*

*Bialek Davenet S.*¹, *Criscuolo A.*¹, *Nicolas-Chanoine M.-H.*², *Decré D.*³, *Brisse S.*¹

¹Institut Pasteur

²Hôpital Beaujon, AP-HP

³Hôpital Saint-Antoine, AP-HP

Chez *Klebsiella pneumoniae*, la multirésistance aux antibiotiques est véhiculée majoritairement par certains clones à diffusion mondiale, tels que le ST258. Le but de ce travail était de développer un outil bioinformatique permettant d'analyser facilement le contenu en gènes de résistance d'un génome de *K. pneumoniae* et de relier ces informations aux autres données de typage.

48 souches de *K. pneumoniae* ont été séquencées par technologie Illumina et comparées avec 119 génomes publics à l'aide de l'interface d'épidémiologie génomique BIGSdb. Les séquences de tous les gènes connus codant la résistance aux β -lactamines, aux aminosides et aux quinolones ont été recherchées automatiquement dans les 167 génomes. La sensibilité à ces familles d'antibiotiques a été testée sur un échantillon de souches par la méthode de diffusion en gélose.

La détection des gènes de résistance par BIGSdb a fourni des résultats concordants avec les données de la littérature et les antibiogrammes. Bien que les clones multirésistants et virulents de *K. pneumoniae* soient pour l'instant bien distincts, des souches hybrides combinant des caractères de virulence et de résistance aux antibiotiques ont été détectées.

La base de données BIGSdb-Kp, accessible via internet, est un outil pratique permettant d'extraire les données de typage, de virulence et de résistance à partir de génomes de *K. pneumoniae*.

CO21. MilliDrop, un nouveau système de mesure très précise des CMI

Boitard L.¹, Baudry J.¹, Zambardi G.², Franceschi G.², Tournoud M.², Mahé P.², Bourne-Branchu P.², Chaire A.-C.², Broyer P.², Jiang L.¹, Bibette J.¹

¹ESPCI ParisTech

²BioMérieux

La mesure de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est nécessaire pour optimiser l'antibiothérapie dans certaines situations cliniques. Les méthodes actuellement disponibles manquent de précision notamment du fait de la gamme de dilution utilisée qui suit une progression géométrique de raison 2. Ceci est particulièrement pénalisant lorsque la CMI est proche de la concentration critique. Pour pallier à ce problème, un nouveau système de détermination de la CMI, reposant sur un principe de millifluidique en goutte appelé MilliDrop, a été développé. Ce système a été testé avec la souche *E. coli* ATCC 25922 et 3 antibiotiques pour évaluer sa reproductibilité et son exactitude.

Le MilliDrop consiste à fractionner un milieu de culture liquide contenant des bactéries en des centaines de gouttes millimétriques, chacune contenant une concentration connue en antibiotique. La miniaturisation des échantillons permet de réaliser une gamme de dilution de l'antibiotique sur plus de 500 points.

La croissance bactérienne est suivie au cours du temps par deux méthodes optiques : l'une basée sur la turbidité et l'autre sur une fluorescence associée au métabolisme cellulaire. Après incubation, la CMI est déterminée à partir des courbes de croissance mesurées dans les différentes gouttes et à l'aide d'une procédure d'analyse de données.

La reproductibilité a été évaluée en testant 5 fois la souche *E. coli* ATCC 25922 avec chacun des 3 antibiotiques : gentamicine, acide nalidixique et chloramphenicol. Les résultats obtenus par le MilliDrop ont aussi été comparés avec la méthode de référence de détermination de CMI (micro-dilution).

Le suivi cinétique de chacune des gouttes permet d'avoir des temps de rendu de CMI très courts, de l'ordre de 240 minutes.

Les valeurs extrêmes des CMI et les coefficients de variation (CV) obtenus sont respectivement de 0,26-0,67 mg/L (CV=33,7%), 0,8-2,4 mg/L (CV=34,8%) et 1,09-1,83 mg/L (CV=18,2) pour la gentamicine, le chloramphenicol et l'acide nalidixique. La concordance des CMI avec la méthode de référence est parfaite (CMI identique) pour 12 tests sur 15 et acceptable (une dilution d'écart) pour 2 des 15 tests.

Le MilliDrop représente une approche innovante et prometteuse de mesure de la CMI. Ce système permet d'augmenter considérablement le nombre de points de gamme et d'avoir une lecture automatisée objective du résultat. Aussi, la mesure des courbes de croissance complètes donne accès à de nouveaux paramètres tel que le temps de latence et le temps de division qui pourraient permettre de mieux caractériser la réponse aux antibiotiques.

CO22. Caractérisation phénotypique et génotypique de la résistance aux macrolides et aminosides chez des souches cliniques de *Mycobacterium abscessus*Mougari F.¹, Cambau E.¹, Amarsy R.², Raskine L.³, Bernard C.⁴, Brossier F.⁴¹ CNR des Mycobactéries et de la Résistance des Mycobactéries aux Antituberculeux (CNR-MyRMA) ; Hôpital Lariboisière, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène ; Université Paris 7, IAME, UMR 1137 INSERM, Paris, France² Hôpital Lariboisière, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène³ CNR des Mycobactéries et de la Résistance des Mycobactéries aux Antituberculeux (CNR-MyRMA) ; Hôpital Lariboisière, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène⁴ CNR des Mycobactéries et de la Résistance des Mycobactéries aux Antituberculeux (CNR-MyRMA) ; Hôpital Pitié-Salpêtrière, Laboratoire de Bactériologie, Paris, France**Objectifs :**Etudier la résistance aux macrolides et aminosides chez des souches cliniques de *M. abscessus*.**Méthodes :**

Nous avons étudié 50 souches cliniques de *M. abscessus* et déterminé les CMI à l'amikacine et clarithromycine par microdilution (plaques Sensititre RAPMYCO; Trek Diagnosis Systems). Pour différencier les souches avec une résistance inductible des souches sensibles à la clarithromycine, nous avons lu les CMI à J5, J7 et J14 d'incubation des plaques à 30°C (Bastian et al. 2011) et séquencé les gènes *rrl* (23s ribosomal RNA), *rrs* (16s ribosomal RNA) et *erm41* (methyl transferase). Les souches ont été identifiées par séquençage du gène *hsp65*.

Résultats :

Pour les 44 souches sans mutation du gène *rrs*, la CMI à l'amikacine était ≤ 16 mg/l pour 30 souches (60%), 32 mg/l pour 9 souches et ≥ 64 mg/l pour 5 souches. *rrs* n'a pas été déterminé pour 2 souches (une avec CMI à l'amikacine ≤ 16 mg/l, l'autre avec CMI ≥ 64 mg/l). Pour les 4 souches portant une mutation A1408G du gène *rrs*, connue pour conférer une résistance à l'amikacine, les CMI étaient ≥ 64 mg/l. Pour la clarithromycine, il y avait une corrélation entre la séquence de *erm41* et la résistance ou sensibilité naturelle : 29 *M. abscessus abscessus erm41 sequevar T28* and 5 *M. bolletii* avaient une résistance inductible; 5 *M. abscessus erm41 sequevar C28* et 3 *M. massiliense* étaient sensibles à la clarithromycine avec une CMI < 1 mg/l. *erm41* n'a pas été caractérisé pour 3 souches (une sensible et 2 résistantes inductibles). De plus, un haut niveau de résistance constitutive à la clarithromycine a été observé pour 5 souches avec des CMI > 16 mg/L dont 4 souches avaient une mutation A2058G du gène *rrl*.

Conclusions :

Alors que la résistance inductible naturelle et sensibilité à la clarithromycine sont corrélées aux séquences de *erm41* chez *M. abscessus*, un haut niveau de résistance à la clarithromycine (retrouvé chez 10% des souches cliniques de *M. abscessus*) était associé à une mutation du gène *rrl* chez 3 souches sur 4. Le profil génotypique incluant *rrl* et *erm41* est corrélé à la sensibilité ou résistance à la clarithromycine (Bastian et al. 2011). Pour l'amikacine, la valeur de CMI est moins corrélée à la détection de mutation du gène *rrs*, probablement en raison d'une gamme étroite des concentrations disponibles pour les plaques de microdilution commercialisées. Un haut niveau de résistance à l'amikacine sans mutation du gène *rrs* pourrait être dû à d'autres mécanismes en cours d'investigation (mutations de protéines ribosomales (*rps*) ou aminoglycoside 2-N-acetyltransferase).

CO23. Résistances primaires de *Helicobacter pylori* aux antibiotiques : pas (non plus) d'inversion de la courbe

Francart A.¹, Deforges L.^{1,3}, Fihman V.¹, Delchier J.-C.^{2,3}, Decousser J.-W.^{1,3}

¹Laboratoire de Bactériologie

²Hépatologie Gastroentérologie, CHU Henri Mondor Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Créteil(94)

³Université Paris Est Créteil (UPEC)

Objectif

Evaluer la prévalence des résistances primaires aux antibiotiques chez les souches d'*Helicobacter pylori* (Hp) isolées chez l'adulte au CHU Henri Mondor (Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Créteil, France).

Matériels et méthode

De juin à octobre 2013, nous avons réalisé prospectivement un antibiogramme sur toutes les souches d'Hp isolées de biopsies gastriques. Les patients en échec d'un premier traitement d'éradication ont été exclus de l'analyse. La méthode réalisée était la détermination des CMI par Etest® sur MH+ 10% de sang de cheval+ NAD selon les recommandations du CA-SFM. Si une double population était observée, la CMI de la souche de la population la plus résistante était prise en compte. Les facteurs de risque d'infection par une souche résistante aux différents antibiotiques ont été recherchés: motif de l'endoscopie, antécédents d'infection bactérienne, d'hospitalisation ou d'antibiothérapie, profession, lieux de naissance et de résidence, score de Charlson (test du Chi² +/- correction de Yates).

Résultats principaux

Parmi les 98 souches d'Hp inclus, nous rapportons les taux de résistance primaire suivants : métronidazole 75,5%, rifampicine 26,0%, lévofloxacine 23,5%, clarithromycine 20,4%, amoxicilline 9,2% et tétracycline 0%. Concernant l'amoxicilline, une augmentation « rampante » des CMI a été constatée avec 5 souches possédant une CMI à 0.125 mg/l, 3 à 0.25 mg/L et 2 à 0.38 mg/L. Des doubles zones ont été mises en évidence pour plus d'un tiers des antibiogrammes, concernant principalement le métronidazole, la lévofloxacine et la clarithromycine. La résistance associée au métronidazole et à la clarithromycine est de 16,3%. Les femmes et les patients atteints de maladie ulcéreuse sont infectés significativement plus souvent par des souches résistantes à la clarithromycine (p=0,01) et à la rifampicine (p=0.05), respectivement.

Discussion/Conclusion

L'interprétation de ces résultats nécessite une prise en compte des différences de concentrations critiques utilisées dans la littérature (amoxicilline, rifampicine), des molécules testées (notamment pour les rifamycines) et de la population étudiée (dans le cas présent une population d'adultes née à plus de 50% en dehors d'Europe). Nous constatons une augmentation inquiétante des résistances au métronidazole, à la rifampicine et à la lévofloxacine ainsi qu'une élévation des CMI à l'amoxicilline. Les tendances rapportées nécessiteraient d'être vérifiées à plus grande échelle. Leur impact sur les succès cliniques des stratégies thérapeutiques actuellement recommandées devrait être évalué.

CO24. *Campylobacter* chez les porcs biologiques et conventionnels : prévalence et antibiorésistanceKérouanton A.^{1,3}, Chidaine B.^{1,3}, Rose V.^{1,3}, Kempf I.^{2,3}, Denis M.^{1,3}¹ Anses Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins, BP 53, 22440 Ploufragan, France.² Anses Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Mycoplasmodologie-Bactériologie, BP 53, 22440 Ploufragan, France.³ Université Européenne de Bretagne, France

Cette étude a pour objectif d'obtenir et comparer des données de prévalence et de résistance aux antibiotiques de *Campylobacter* isolés de porcs issus de la production biologique porcine et de la production conventionnelle.

Des prélèvements de contenus de colon et des chiffonnettes de carcasses ont été réalisés en 2012, dans un abattoir, sur 31 lots de porcs biologiques et 31 lots de porcs conventionnels (1 ou 2 porcs par lot). La détection de *Campylobacter* a été réalisée par isolement direct sur gélose Karmali. Le genre *Campylobacter* et l'espèce des isolats collectés ont été confirmés par PCR. La résistance aux antibiotiques des isolats a été recherchée pour 5 familles d'antibiotiques (Gentamicine et streptomycine, Ciprofloxacine et Acide Nalidixique, Tétracycline (TET), Erythromycine (ERY) et chloramphénicol) par détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et interprétation selon les cut-offs épidémiologiques EUCAST.

114 contenus fécaux (56 biologiques et 58 conventionnels) et 120 chiffonnettes de carcasses (60 biologiques et 60 conventionnels) ont été analysés. Les *Campylobacter* isolés sont de l'espèce *C. coli*. La prévalence dans les contenus de colon n'est pas significativement différente entre les porcs biologiques (76,8%) et conventionnels (74,0%). *C. coli* n'a été détecté que sur 1 carcasse de porc conventionnel.

Parmi les 264 isolats de *C. coli* isolés de contenus du colon (140 de porcs biologiques et 124 de porcs conventionnels), seuls 10 isolats sont sensibles aux 5 familles d'antibiotiques. 147 isolats sont résistants à 1 ou 2 familles d'antibiotiques et 107 sont multirésistants (\geq à 3 familles d'antibiotiques). Le profil de résistance majoritaire est la résistance couplée STR-TET, observée pour respectivement 21,8% et 32,9% des isolats issus de porcs conventionnels et biologiques. Entre les deux productions, une différence est observée pour TET et ERY. Les isolats provenant de porcs conventionnels sont significativement ($p < 0,01$) plus souvent résistants à ces 2 antibiotiques, souvent en association avec d'autres résistances: 54,8% des isolats de porcs conventionnels sont multirésistants contre 27,9% des isolats de porcs biologiques ($p < 0,01$).

Cette étude montre que le portage de *Campylobacter* par les porcs est identique quel que soit le type de production. Le niveau plus faible de taux de résistance aux antibiotiques pour les *Campylobacters* issus de porcs biologiques pourrait être lié à l'usage restreint d'antibiotiques en production biologique et/ou à la colonisation des porcs biologiques par des souches sauvages sensibles.

CO25. Le complexe *M. abscessus* et les infections pulmonaires au Vietnam: approche génétique

*Bouzinbi N.*¹, *Arnaud Hery G.*², *Lassere C.*, *Nguyen Hong D.*⁴, *Nguyen Thi Ngoc L.*⁵, *Nguyen Huy D.*⁵, *Mai Nguyen Thu H.*⁵, *Fangous M. S.*², *Van de Perre P.*¹, *Bañuls A. L.*³ and *Godreuil S.*¹

¹Department of bacteriology & virology, CHU Arnaud de Villeneuve 34295 Montpellier France

²Department of Microbiology, CHU Brest 29238 France

³MIVEGEC UMR IRD 224-CNRS 5290- University of Montpellier 1 & 2, Centre IRD, Montpellier France

⁴France3Pulmonary Department, Pham Ngoc Thach Hospital Ho Chi Minh City, Vietnam

⁵Microbiology Laboratory, Pham Ngoc Thach Hospital, Ho Chi Minh City, Vietnam

Objectif:

Les mycobactéries du complexe *abscessus* sont, parmi les mycobactéries à croissance rapide, des espèces particulièrement pathogènes et résistantes aux antibiotiques. Depuis une dizaine d'années, elles sont considérées comme des pathogènes émergents à travers le monde. Cependant, à ce jour aucune donnée n'a été publiée sur l'impact de ce complexe dans les infections pulmonaires au Vietnam. L'objectif de ce travail est donc d'étudier moléculairement des isolats de patients présentant une infection pulmonaire non tuberculeuse et d'étudier l'implication des espèces du complexe *Mycobacterium abscessus* (CMA) au Vietnam et leur diversité génétique.

Matériel et méthodes :

Cette étude a été réalisée sur 53 isolats de CMA isolés chez des patients avec un diagnostic d'infection pulmonaire non tuberculeuse au Centre Nationale de Référence de la TB au Vietnam. Ces isolats ont été génétiquement identifiés et caractérisés par le Kit GenoType *Mycobacterium* AS/CM® (Hain Lifescience), les techniques VNTR (Variable Number Tandem Repeat) et MLST (Multi-locus sequence typing). Les données ont été analysées par des études génétiques et phylogénétiques.

Résultats :

Parmi les 53 isolats de CMA, 28, 24 et 1 correspondaient respectivement aux espèces *M. massiliense*, *M. abscessus* sensu stricto et *M. bolletii*. L'analyse des MLST a mis en évidence 39 «sequence types» (ST), dont 30 nouveaux et 9 déjà décrits. Les VNTR ont montré un pouvoir discriminant supérieur avec 51 patterns. L'analyse combinée VNTR+MLST a révélé 52 patterns et permet de séparer les isolats en 2 lignées monophylétiques (*M. abscessus* sensu stricto vs *M. massiliense*). La souche de *M. bolletii* est toutefois intégrée dans le groupe de *M. massiliense*.

Conclusion :

Cette étude préliminaire montre que les espèces du CMA sont impliquées dans les infections pulmonaires non tuberculeuses au Vietnam en proportions similaires pour *M. abscessus* versus *M. massiliense*. Dans cette étude, contrairement à de nombreuses publications, les deux espèces, *M. abscessus* sensu stricto et *M. massiliense*, sont clairement différenciées, démontrant l'utilité des techniques VNTR et MLST combinées. La grande diversité génétique observée au sein de chaque espèce suggère que les sources de contamination sont diverses et variées, compliquant fortement la possibilité d'identifier les origines d'infection.

CO26. La protéine chaperon Hsp90Ec est nécessaire à la synthèse de facteurs de virulence chez *Escherichia coli*

Garcie C.¹, Pénary M.¹, Garénaux A.², Magistro G.³, Shubert S.³, Dozois C.², Genevaux P.⁴, Oswald E.¹, Martin P.¹

¹CPTP, INSERM U1043, Toulouse ; Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, CHU de Toulouse

²Institut Armand-Frappier, INRS, Canada

³Max von Pettenkofer-Institut, LMU, Munich

⁴LMGM, CNRS UMR5100, Toulouse

Les protéines chaperons sont des molécules participant au repliement conformationnel, à la stabilisation et au remodelage d'autres molécules chez les organismes eucaryotes et procaryotes. Nous rapportons ici le rôle de la protéine chaperon Hsp90Ec dans la virulence des souches de *E. coli* par son implication dans la synthèse de colibactine, une génotoxine, mais aussi de sidérophores, des systèmes de captation du fer. Hsp90Ec (HtpG) est l'analogue procaryote de la protéine chaperon Heat shock protein 90.

Certaines souches de *E. coli* possèdent un îlot génomique, l'îlot pks. Il code une machinerie enzymatique complexe permettant la synthèse d'un composé non protéique, la colibactine, une génotoxine capable d'induire sur des cellules eucaryotes des cassures double-brin de l'ADN. Ces souches produisent également des sidérophores, molécules appartenant à la même famille chimique que la colibactine, qui sont impliqués dans la captation du fer par les bactéries, élément indispensable à leur survie.

L'étude d'un mutant inactivé pour le gène *htpG*, codant Hsp90Ec, a révélé que l'analogue procaryote de Hsp90 est nécessaire à la production de colibactine. Parce que les protéines chaperons agissent de concert avec des protéases pour réguler l'homéostasie protéique intracellulaire, nous avons recherché la protéase qui pourrait intervenir dans la production de la colibactine. Nous avons pour cela inactivé les gènes *lon*, *clpP* ou *clpQ*, codant différentes protéases, dans la souche préalablement mutée pour *htpG*. L'analyse de ces double-mutants a montré que ClpQ intervient dans la production de colibactine, en relation avec Hsp90Ec. Nous avons également mis en évidence que la production de sidérophores est atténuée dans une souche mutée pour Hsp90Ec. Ces résultats sont en faveur d'une interconnexion supplémentaire entre la synthèse de colibactine et de sidérophores, comme nous l'avons récemment décrit en montrant qu'une des enzymes de l'îlot pks participe à la synthèse de sidérophores.

Ce travail a permis d'identifier la protéine Hsp90Ec comme un régulateur clé dans la production de divers facteurs de virulence ou de fitness. Cette protéine chaperon pourrait être une cible thérapeutique intéressante. En effet, inhiber son action, et donc indirectement la virulence des souches pathogènes de *E. coli*, serait une stratégie thérapeutique anti-infectieuse innovante.

CO27. Le gène *opgC* code la O-succinyl-transférase des glucanes périplasmiques osmorégulés chez la bactérie phytopathogène *Dickeya dadantii**Bontemps Gallo S.*¹, *Lacroix J.-M.*¹, *Madec E.*¹, *Robbe-Masselot C.*¹, *Souche E.*²¹Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UMR 8576 CNRS/Lille 1)²Center for Human Genetics, University of Leuven

Les glucanes périplasmiques osmorégulés (OPG) sont des oligosaccharides périplasmiques retrouvés chez la plupart des Protéobactéries. Ces glucanes sont des facteurs de virulence de nombreuses bactéries zoo- et phyto- pathogènes telles que *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Dickeya dadantii*. Chez les entérobactéries, la synthèse du squelette est catalysée par les produits des deux gènes de l'opéron *opgGH*. Ce dernier consiste en une chaîne linéaire liée en b,1-2 et ramifiée en b,1-6. Ce squelette glucosidique peut être substitué par différentes molécules en fonction de l'espèce bactérienne comme des résidus acétyles, du phosphoglycérol ou des résidus succinyles. Ces résidus succinyles sont le type de substituants des OPG le plus largement retrouvé chez les Proteobactéries.

Par mutagenèse aléatoire, notre laboratoire a caractérisé le gène codant la succinyl-transférase, *OpgC*, chez *Escherichia coli* ainsi que chez *Rhodobacter sphaeroides*. *OpgC* est une protéine intrinsèque de membrane. Les protéines de ces deux espèces bactériennes sont homologues.

Dans notre modèle d'étude, *Dickeya dadantii*, une entérobactérie phytopathogène à large spectre d'hôte, les OPG sont substitués par des résidus acétyles et succinyles. Aucun gène orthologue à *opgC* d'*E. coli* ou de *R. sphaeroides* n'a pu être trouvé chez *D. dadantii*. nous avons alors recherché un gène codant une protéine présentant les deux caractéristiques principales retrouvées chez les succinyl-transférases d'*E. coli* et de *R. sphaeroides* à savoir : 10 segments transmembranaires et un domaine acyl-transférase. Trois gènes candidats ont pu être identifiés et inactivés. Les OPG de chaque souche ont été extraits et la présence de succinyles a été analysée soit directement par spectrométrie de masse soit par quantification directe de la quantité de succinyle. Un des mutants testés présente une absence totale de résidu succinyle et le gène a donc été renommé *opgC*. Malgré la faible homologie de séquence la complémentarité fonctionnelle est possible.

L'inactivation du système phosphorelais RcsCDB, un système impliqué dans l'adaptation aux variations de l'environnement et régulant plus d'une centaine de gènes impliqués notamment dans la virulence et la survie de la bactérie, conduit à la perte des résidus succinyles sur les OPG. Ainsi, le gène *opgC* appartient au régulon RcsCDB bien que ce dernier ne semble régulé directement par ce système. Aucun rôle dans la virulence n'a pu être mis en évidence ni par une surexpression ni par une absence de ces substituants sur le squelette glucosidique.

CO28. Système de sécrétion de type VI et virulence chez d'*Escherichia coli*

Massier S., Miquel S., Dreux N., Agus A., Denizot J., Darfeuille-Michaud A., Barnich N.

Unité MziSH

Objectifs :

Etudier le(s) rôle(s) des systèmes de sécrétion de type VI dans la virulence des souches *Escherichia coli* adhérentes et invasives isolées chez des patients atteints de maladie de Crohn.

Sujets / matériels et méthode :

Les bactéries AIEC (Adherent-Invasive *Escherichia coli*) ont été isolées de muqueuse iléale de patients atteints de Maladie de Crohn (MC), maladie inflammatoire chronique du tube digestif, et adhérent aux entérocytes de l'iléon grâce à l'adhésine FimH localisée à l'extrémité des pili de type 1. Cette adhésine présente des mutations pathoadaptatives, améliorant la capacité d'adhésion des AIEC aux cellules épithéliales intestinales. La souche AIEC de référence LF82 héberge également des éléments génétiques qui pourraient être impliqués dans la virulence, en particulier des îlots de pathogénicité. Deux de ces îlots codent pour la mise en place de systèmes de sécrétion de type VI fonctionnels. Afin d'étudier le(s) rôle(s) de ces derniers dans la virulence bactérienne, la prévalence de ces îlots a été déterminée dans une collection de 46 souches AIEC, et ces îlots ont été totalement délétés du génome. Le phénotype des mutants a été caractérisé en cellules épithéliales intestinales, macrophages et en modèle animal.

Résultats principaux :

La prévalence des 2 systèmes de sécrétion de type VI est significativement augmentée chez les souches AIEC présentant les mutations pathoadaptatives dans l'adhésine FimH (10/14) comparativement aux souches AIEC présentant une adhésine FimH de type *E. coli* MG1655 (4/32), suggérant une co-évolution simultanée entre la sélection des mutations pathoadaptatives dans *fimH* et l'acquisition des systèmes de sécrétion de type VI. Les mutants délétés dans les systèmes de sécrétion de type VI (?T6SS-1, ?T6SS-2 et ?T6SS-1+2) présentent une diminution dans leur capacité à adhérer et à envahir les cellules épithéliales intestinales T84 comparativement à la souche sauvage. De manière intéressante, le double mutant (?T6SS-1+2) montre une meilleure survie en macrophage humain THP1.

Conclusions :

Les résultats indiquent que les systèmes de sécrétion de type VI jouent un rôle dans la virulence de la souche AIEC LF82, en améliorant les capacités d'adhésion et d'invasion, et en limitant la survie en macrophages. Une étude préliminaire du comportement de ces mutants *in vivo* sur modèle murin confirme ces résultats, et une approche protéomique devrait permettre d'identifier les protéines sécrétées par ce système afin de proposer de nouvelles cibles pour contrôler la virulence des souches AIEC.

CO29. Ultra Deep PyroSequencing et *Pneumocystis jirovecii*: mise en évidence d'une grande diversité fongique intra- et inter- individuelle.

Alanio A.¹, Menotti J.², Mercier-Delarue S.³, Bretagne S.³

¹. Institut Pasteur Paris

². Laboratoire de mycologie Hôpital Saint Louis

³. Laboratoire de microbiologie Hôpital Saint Louis

Objectifs : *Pneumocystis jirovecii* est un champignon opportuniste non cultivable responsable de pneumopathies sévères du patient immunodéprimé HIV ou non-HIV. La primo-infection a lieu dans l'enfance et le réservoir est l'hôte immunocompétent qui peut être la source de transmission aux hôtes immunodéprimés. Les techniques de typage actuelles basées sur des méthodes classiques (Sanger) de séquençage ont montré la possibilité de mélange de génotypes chez certains patients. Étant donné les limites de sensibilité de la méthode Sanger, nous avons utilisé l'Ultra-deep Pyrosequencing (GsJunior System, 454 Life Sciences, Roche) pour détecter des génotypes minoritaires et ainsi mieux analyser la diversité de *P. jirovecii* dans les prélèvements respiratoires.

Méthodes : Nous avons mis au point une PCR de 314 pb pour cribler la présence de 3 single nucleotide polymorphisms (SNPs) connus dans le gène codant pour la grande sous-unité de l'ARN ribosomique mitochondrial. Nous avons séquencé le produit de PCR obtenu pour 36 prélèvements respiratoires provenant de 29 patients atteints de pneumocystose. Il a été généré en moyenne 3998 séquences (+/- 2084) par échantillon après multiplexage par 20. La reproductibilité de la technique a été estimée à 2%.

Résultats : Nous avons identifié différents haplotypes de séquence basés sur la combinaison des différents SNPs aux trois loci (AAC, ACC, ACT, ATT, ATC, AAT, et GNN). Nous avons détecté la présence de 4 haplotypes en moyenne (2 à 7) par échantillon avec des différences de proportions de chaque haplotype en fonction des patients. Chez 6 patients avec prélèvement itératifs, nous avons pu montrer que la présence des haplotypes était conservée mais que la proportion de chacun pouvait varier au cours du temps.

Conclusion : L'Ultra-Deep Pyrosequencing est un outil extrêmement intéressant pour analyser la diversité fongique dans les prélèvements cliniques. Il révèle une diversité non soupçonnée auparavant et pose des questions quant à la physiopathologie de l'infection.

CO30. Détermination de l'efficacité antibactérienne du TiO₂ par cytométrieCARRE G.¹, PELUSO J.², MULLER C. D.², GIES J.-P.¹, KELLER V.³, KELLER N.³, ANDRE P.¹¹. Faculté de Pharmacie Laboratoire de Biophotonique et de Pharmacologie UMR 7213 Strasbourg². Faculté de Pharmacie Laboratoire d'Innovation Thérapeutique UMR 7200 Strasbourg³. ECPM, Institut de Chimie et Procédés pour l'Energie, l'Environnement et la Santé UMR 7515 Strasbourg

La photocatalyse est un procédé d'oxydation avancée qui utilise un semi-conducteur, généralement le dioxyde de titane, TiO₂. Cette technique est utilisée dans de nombreuses applications telles que la décontamination de l'eau, de l'air et des surfaces. Brièvement, TiO₂ sous rayonnement UV-A va générer des espèces réactives de l'oxygène, les ROS (O₂^{•-}, OH[•]...). Ces ROS vont induire des dommages sur les composants cellulaires (lipides, protéines...) et vont conduire in fine à la mort cellulaire. Déterminée par cytométrie capillaire à l'aide du kit live/dead, l'analyse de l'intégrité membranaire a été réalisée sur quatre espèces bactériennes, deux à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) et deux à Gram positif (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*). L'efficacité des différents traitements lors de la variation des deux paramètres : durées de rayonnement UV-A et concentrations en TiO₂ a été déterminée en calculant le ratio du nombre d'évènements de fluorescence correspondant à des bactéries dont la membrane est intacte par rapport à celui obtenu pour le contrôle (sans rayonnement et sans TiO₂).

Ces résultats relatifs au nombre d'évènements de fluorescence correspondant à des bactéries dont la membrane est intacte ont ensuite été comparés aux résultats obtenus par la technique du dénombrement sur milieux gélosés.

Pour les deux techniques, les mêmes tendances ont été observées à savoir que pour les bactéries à Gram négatif, l'efficacité des traitements photocatalytiques était corrélée à l'effet cumulatif des deux paramètres (durées de rayonnements UV-A et concentrations en TiO₂) et que pour les bactéries à Gram positif, dès la condition photocatalytique la moins drastique appliquée, le maximum de réduction logarithmique était obtenu. Des différences de réduction ont toutefois été observées entre les deux techniques pouvant refléter : des différences de temps d'analyse, la formation d'agrégats bactéries-TiO₂ ou bien la présence de bactéries viables non cultivables... De ce fait, par extrapolation, nous pourrions considérer que par cytométrie capillaire une réduction de l'ordre de 2log du nombre d'évènements de fluorescence correspondant à des bactéries vivantes correspond à une réduction d'au moins 4log sur milieux gélosés.

La cytométrie capillaire nous a permis d'évaluer rapidement l'efficacité antibactérienne du TiO₂. De par les nombreux avantages qu'offre cette technique (automatisation, sensibilité..), il ne serait pas surprenant qu'à l'avenir, elle soit utilisée pour réaliser des screenings de l'efficacité antimicrobienne de divers composés.

CO31. Résistance au linézolide médiée par *cfr* chez les staphylocoques français

Desroches M.¹, Doucet-Populaire F.², Decousser J.-W.³, Patry I.⁴, Biendo M.⁵, Loiez-Durocher C.⁶, Archambaud M.⁷, Jean-Pierre H.⁸, Jehl F.⁹, Bourgeois-Nicolaos N.²

¹AP-HP, Hôpital Antoine Béclère Service de Bactériologie-Hygiène, HUPS, Clamart

²AP-HP, Hôpital Antoine Béclère, Service de Bactériologie-Hygiène, HUPS, Clamart ; EA 4043, USC INRA, Université Paris Sud, Chatenay-Malabry.

³AP-HP, Hôpital Antoine Béclère, Service de Bactériologie-Hygiène, HUPS, Clamart ; AP-HP, Hôpital Henri Mondor, Département de Microbiologie, Créteil

⁴Centre Hospitalier Régional Universitaire Hôpital Jean Minjot (Besançon)

⁵Laboratoire de Bactériologie, CHU SUD d'Amiens

⁶Centre hospitalier universitaire de Lille

⁷Centre hospitalier de Toulouse

⁸Hôpital Lapeyronie Montpellier

⁹Institut de Bactériologie, Faculté de Médecine, Université Louis Pasteur Strasbourg

Objectifs

La résistance aux antibiotiques des staphylocoques constitue l'un des défis les plus importants dans le domaine de la chimiothérapie antimicrobienne, en particulier concernant les infections invasives telles que les bactériémies ou les infections osseuses et articulaires. Au cours d'une étude prospective et multicentrique à l'échelle nationale pour détecter des caractères de résistance parmi les staphylocoques responsables d'infections invasives, nous avons identifié 10 staphylocoques à coagulase négative (SCoN) résistants au linézolide (LZ) et à la méticilline, dont nous avons caractérisé le mécanisme de résistance.

Matériel et Méthodes

Parmi les 704 souches cliniques de SCoN recueillies entre Octobre 2011 et Février 2012, de 37 hôpitaux, 10 SCoN résistants au LZ ont été identifiés dans 7 hôpitaux (19%). Ces souches ont été isolées d'hémocultures (n=7), de biopsies osseuses (n=1) et de liquide péritonéal (n=2). La CMI du LZ a été déterminée pour chaque souche (E-test, microdilution en milieu liquide et macrodilution sur gélose de Mueller-Hinton). La présence de mutations ponctuelles dans l'ADNr23S et les gènes codant les protéines ribosomales L3 et L4 a été étudiée par séquençage et pyroséquençage. La présence du gène *cfr* a été recherchée par PCR

Résultats

Parmi les SCoN isolés, 1,4% (10/704) étaient résistants au LZ (selon les concentrations critiques de l'EUCAST). Les CMI du LZ variaient de 8 à >256 mg/L. Ces 10 souches (*S. epidermidis* (n=8), *S. hominis* (n=1) et *S. capitis* (n=1)) étaient résistantes à la méticilline et sensibles à la vancomycine et la daptomycine. La mutation G2576T (Domaine V de l'ADNr23S) a été retrouvée chez 9 souches (90%) et la mutation T2504A chez une souche. Les mutations : G152D (n=1), M156T (n=3) D159E (n=1) et A160P (n=1) ont été identifiées dans la protéine L3 et la mutation G71D (n=1) dans la protéine L4. Le gène *cfr* a été détecté chez 5 souches (50%), toutes de l'espèce *S. epidermidis* provenant de 2 hôpitaux. Ces SCoN résistants au LZ et positifs pour le gène de *cfr* étaient également résistants au chloramphénicol, aux lincosamides, aux streptogramines et aux pleuromutilines sauf une souche.

Conclusion :

Il s'agit de la première description de l'émergence et de la propagation nationale de SCoN résistants au LZ portant le gène transférable *cfr*. Il faut noter que chez ces 5 souches cliniques, cette résistance transmissible était associée à une résistance chromosomique: la mutation G2576T et des mutations dans la protéine ribosomale L3.

CO32. Etude de l'association amibes – mycobactéries dans l'eau potableDelafont V.^{1,2}, Mougari F.³, Cambau E.³, Joyeux M.², Bouchon D.¹, Héchard Y.¹, Moulin L.²¹UMR CNRS 7267 Ecologie et Biologie des Interactions. Université de Poitiers, France²Eau de Paris, Direction de la Recherche et du Développement pour la Qualité de l'Eau, R&D Biologie. 33, avenue Jean Jaurès, 94200 Ivry sur Seine, France³Centre National de Référence des Mycobactéries et de la Résistance aux Antituberculeux, Groupe Hospitalier Saint-Louis, Lariboisière, Fernand-Widal, APHP, F-75475 Paris, France

Les amibes libres sont des phagocytes professionnels ubiquitaires des milieux hydriques se nourrissant de bactéries. Certaines bactéries ont cependant acquis au cours de l'évolution des mécanismes de résistance à cette prédation, leur permettant de persister et de se multiplier au sein d'un hôte amibien. Les amibes peuvent alors être considérées comme un véritable vecteur de ces bactéries, potentiellement pathogènes. Alors que plusieurs études ont démontré la capacité de nombreuses souches de mycobactéries à persister au sein des amibes *in vitro*, aucune n'a pu mettre en évidence de telles associations en conditions environnementales.

Une large campagne de prélèvements sur un réseau d'eau potable a évalué la présence d'amibes et leur association avec des mycobactéries, en utilisant des techniques d'enrichissement amibien en culture, suivies par des techniques de PCR quantitative ciblant un gène spécifique du genre *Mycobacterium*. L'état d'association entre les amibes et les mycobactéries a été étudié microscopie optique après coloration de Zhiel-Neelsen. L'identification des protagonistes amibiens et mycobactériens a été effectuée par séquençage dérivé de Sanger ainsi que par pyroséquençage.

Sur une période d'un an, l'analyse de 398 prélèvements d'eau potable a mis en évidence la présence d'amibes dans 69,3% des échantillons. A partir des échantillons présentant des amibes, 87,6% ont été positifs pour la présence de mycobactéries par PCRq. L'observation en microscopie a révélé une forte co-localisation de ces deux types de microorganismes, à des niveaux intra-amibiens ou en contact direct. Les amibes identifiées comme porteuses de mycobactéries par séquençage appartenaient aux genres *Vermamoeba*, *Protacanthamoeba*, *Acanthamoeba* et *Echinamoeba* ; ces amibes étant principalement associées à des souches de *M. phocacium*, *M. mucogenicum*, et *M. llutzerense*. L'analyse des bactéries associées aux amibes par pyroséquençage a permis d'identifier 15 taxons mycobactériens repartis sur l'ensemble des échantillons positifs.

Nos travaux constituent la première description des interactions amibes - mycobactéries non tuberculeuses en conditions environnementales. Les résultats obtenus permettent de suggérer que ces microorganismes sont fréquemment associés dans l'eau potable, corroborant les précédents travaux menés *in vitro*, et appuyant le rôle crucial que pourrait représenter les amibes libres dans le cycle de vie des mycobactéries au sein d'un réseau d'eau potable.

CO33. Un algorithme d'identification des 3 espèces du complexe *Mycobacterium abscessus* par spectrométrie de masse (SM) MALDI-TOF

Marie-Sarah Fangous¹, Markus Timke², Stéphanie Gouriou³, Elodie Calvez⁴, Emmanuelle Cambau⁵, Christopher Payan¹, Geneviève Héry-Arnaud¹

¹. Unité de Bactériologie, Hôpital La Cavale Blanche, CHRU de Brest ; EA 3882-LUBEM, IFR 148 ScInBioS, Université de Brest, Brest

². Bruker Daltonics, Bremen, Allemagne

³. EA 3882-LUBEM, IFR 148 ScInBioS, Université de Brest, Brest

⁴. Unité de Bactériologie, Hôpital La Cavale Blanche, CHRU de Brest

⁵. CNR des Mycobactéries et de la Résistance des Mycobactéries aux Antituberculeux (CNR MyRMA), Laboratoire Associé, GH Saint-Louis-Lariboisière, AP-HP, Paris; Université Paris Diderot Paris VII, Paris

Rationnel : Les mycobactéries du complexe *M. abscessus* (MabC) sont en émergence, notamment chez les patients atteints de mucoviscidose, dont elles dégradent de manière significative la fonction respiratoire. Le complexe regroupe 3 espèces (*M. abscessus sensu stricto*, *M. massiliense*, et *M. bolletii*), non différenciables par les techniques phénotypiques habituelles, et par ailleurs extrêmement proches génétiquement. Etant donné les différences substantielles dans leur profil clinique et leur profil de sensibilité aux antibiotiques qui justifient le typage jusqu'à l'espèce, le développement d'un outil diagnostique de routine capable de différencier les 3 espèces est un réel challenge que pourrait relever la SM MALDI-TOF.

Objectif : Évaluer les performances de la SM MALDI-TOF dans l'identification des 3 espèces du complexe *M. abscessus*.

Méthodes : 92 isolats de MabC (44 *M. abscessus*, 27 *M. massiliense* et 21 *M. bolletii*) ont été analysés par SM MALDI-TOF sur l'automate MicroFlex LT (Bruker Daltonics) après préparation des échantillons selon le protocole de Bruker qui combine la lyse mécanique de la paroi par des microbilles de silicium et l'extraction des protéines par l'acétonitrile et l'acide formique. Dans un premier temps, les spectres de masse de 40 isolats cliniques et 3 souches de référence, préalablement identifiés par l'analyse multilocus du polymorphisme allélique (Macheras et al. 2013), ont été analysés manuellement (ClinProTools) pour mettre en évidence des pics discriminants. Secondairement, 49 souches de MabC dûment identifiées jusqu'à l'espèce (collection du CNR MyRMA) ont analysées à l'aveugle afin de tester l'algorithme d'identification préalablement établi.

Résultats : Cinq pics discriminants caractérisés ont permis l'élaboration d'un algorithme d'identification à l'espèce. Sur les 49 souches testées à l'aveugle, 94% (n=46) ont été correctement identifiées. Deux isolats de *M. massiliense* ont été confondus avec *M. abscessus* et un isolat n'a pas pu être identifié. Toutes les souches de *M. bolletii* ont été identifiées.

Conclusion : Cette étude démontre la capacité de la SM MALDI-TOF à différencier les 3 espèces du MabC. Avec l'implantation croissante dans les laboratoires de cet outil, la proposition de cet algorithme d'identification pourrait permettre l'amélioration des connaissances sur l'épidémiologie des espèces du MabC. La portabilité de cet algorithme reste à évaluer avec des souches provenant d'autres régions du monde.

CO34. La sécurité au laboratoire de mycologie clinique

KAUFFMANN LACROIX Catherine¹, BOUSSEAU Anne², CASTEL Olivier²

¹ CHU de POITIERS laboratoire de Parasitologie - Mycologie

² CHU de Poitiers Laboratoire de Bactériologie et Hygiène hospitalière

Certaines connaissances sont nécessaires pour organiser le laboratoire de mycologie et former un personnel technique même si de nombreux points concernant la sécurité biologique sont développés dans la bibliographie des laboratoires. L'épidémiologie des mycoses et le recrutement des patients conditionneront les mesures à prendre après évaluation des risques. Néanmoins l'exposition des manipulateurs est différente selon les différentes étapes du processus analytique jusqu'au stockage des souches en souchothèque. Les moyens de prévention seront adaptés, notamment pour ce qui concerne le confinement.

La réglementation définit les agents biologiques et leur classement en quatre groupes selon la gravité des risques d'infection. Les champignons présentant un risque appartiennent aux groupes 2 et 3. Ils doivent être manipulés dans un laboratoire disposant d'un niveau de confinement correspondant au niveau des normes de sécurité biologiques NSB 2 et 3 respectivement. La liste des agents pathogènes publiée à l'arrêté du 17 Avril 1997 et la directive européenne JO du 17 Octobre 2000 ne sont pas exhaustive pour les espèces peu fréquentes. Les laboratoires spécialisés peuvent se référer aux informations présentes sur la page « fungi » du site de l'American Biological Safety Association .

Outre le risque infectieux, en cas d'inhalations répétées de spores d'*Aspergillus* sp allergisantes, la manipulation des souches peut provoquer des broncho-pneumopathies. Les cultures de prélèvements d'un patient vivant en zone tropicale des germes des groupes 2 et 3 doivent être manipulées en fonction du risque potentiel de leur isolement.

Le transport vers un autre laboratoire est règlementé par une réglementation internationale.

Enfin, les règles d'hygiène doivent être respectées, certains points sont à souligner en mycologie comme le nettoyage et la désinfection des surfaces avec des produits spécifiques fongicides.

Les contaminations des personnels de laboratoires dues à des champignons sont très rares, leur formation doit leur assurer un niveau de sécurité suffisant.

COMMUNICATIONS AFFICHEES SELECTIONNEES

P1. Épidémiologie moléculaire de CTX-M produit par *Klebsiella pneumoniae* isolées à l'hôpital universitaire d'Oran, en AlgérieZemmour A.¹, Humaun Kabir M.², Gisk G.², Rahmani B.³, Benhamouche N.⁴, Dali Yahia R.⁵¹ PhD student, Département de génétique moléculaire appliquée, Université des sciences et de la technologie d'Oran, Algérie² Masters, microbiologie clinique, hopital universitaire karolinska, Solna, Stockholm, Suède³ Professeur, Université des sciences et de la technologie d'Oran, Algérie⁴ Maître assistant, Département de génétique moléculaire appliquée, Université des sciences et de la technologie d'Oran, Algérie⁵ Docteur, Etablissement Hospitalier Universitaire d'Oran-Algerie**Introduction :**

Klebsiella pneumoniae est une bactérie à bacille gram négatif et un pathogène opportuniste qui est une cause importante d'infections nosocomiales. La prévalence des entérobactéries productrices de bêta-lactame à spectre étendu (BLSE) a rapidement augmenté au cours de la dernière décennie, *Klebsiella pneumoniae* en fait partie.

Objectif : Le but de l'étude était de faire l'épidémiologie moléculaire et la caractérisation de souches clinique de *K. pneumoniae* productrices de BLSE, isolées à Etablissement Hospitalier Universitaire d'Oran, en Algérie.

Matériels et méthodes :

En 2012, 180 souches cliniques de *K. pneumoniae* ont été isolées des différents services de l'hôpital, dont 120 souches (67%) étaient productrices de BLSE. 88 souches étaient prises au hasard, ont fait l'objet de la présente étude. Ces souches ont été isolées à partir de différents types de prélèvements, 24 échantillons d'urine, 23 les sécrétions de la plaie (pus), 13 échantillons de sang, 11 échantillons de prélèvement distal protégé, 7 échantillons de liquide céphalo-rachidien, 6 cathéters centraux, un prélèvement vaginal, un prélèvement intra-péritonéale et une sécrétion trachéale. L'identification des espèces a été réalisée par l'API 20 E (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France), la production de BLSE a été confirmée par test de synergie selon le Clinical Laboratory Standards Institute 2013 (CLSI 2013) et VITEK 2 Compact (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France).

SYBR Green PCR a été réalisée pour la détection des génotypes suivants CTX-M-groupe 1, CTX-M-groupe 2 et CTX-M-groupe 9. Pour couvrir les autres génotypes potentiels CTX-M, un couple d'amorces de CTX-M universelles a également été utilisé.

Résultats et discussions :

Les analyses moléculaires ont montré que 82/88 souches (93%) étaient positives avec des amorces du CTX-M-groupe 1, 3/88 souches ont été positives pour CTX-M avec des amorces universelles, mais pas pour les deux CTX-M- groupe 1, CTX-M- groupe 2 et CTX-M- groupe 9, 3/88 souches ont été négatives avec CTX-M amorces universelles. On pourrait en conclure que les souches productrices de BLSE de *K. pneumoniae* ont été de plus en plus reconnues dans le milieu hospitalier à Oran, en Algérie et sont associées à un phénotype multi résistante.

Mots-clés: *Klebsiella pneumoniae*, nosocomiales, bêta-lactamases à spectre étendu, épidémiologie, SYBR Geen PCR, Algérie.

P2. Antibiotiques et microorganisme de l'hôpital, sources de pollutions des eauxOry J.¹, Togola A.², Portelli C.¹, Bohatier J.¹, Forestier C.¹, Traoré O.¹, Bricheux G.¹¹UMR CNRS 6023 - Université d'Auvergne²BRGM Orléans

Les effluents hospitaliers sont des milieux récepteurs à la fois de molécules pharmaceutiques tels que les antibiotiques et de bactéries pathogènes, parfois multirésistantes aux antibiotiques. La combinaison de ces deux entités conduit potentiellement à un risque accru de sélection des résistances vis-à-vis de ces antibiotiques dans le milieu environnemental, voire à leur diffusion. En milieu aquatique, la plupart des bactéries s'organisent sous forme de communautés agrégées dénommées biofilms, connues pour résister à l'action de molécules bactéricides. La détermination des quantités de fluoroquinolones présentes au niveau de l'effluent de l'hôpital Gabriel Montpied (CHU Clermont-Ferrand) a été entreprise via la mise en place, in situ, d'échantillonneurs intégratifs de type POCIS (*acronyme de polar organic chemical integrative sampler*) sur des durées d'exposition de 15 jours. En parallèle, des biofilms ont été formés sur des supports abiotiques (lames de verre) immergés dans le même flux. La recherche de bactéries résistantes aux fluoroquinolones au sein des biofilms constitués a été effectuée par étalement des suspensions bactériennes obtenues après recueil et sonication des biofilms sur des géloses nutritives sélectives (ciprofloxacine, 1 µg/ml). L'identification des isolats a montré une grande diversité d'espèces au sein des échantillons testés. L'étape ultérieure consiste à comparer ces isolats de l'environnement aux souches isolées à l'hôpital au cours de la même période, afin d'établir leur capacité de diffusion. De même, nous chercherons s'il existe une corrélation entre les antibiotiques consommés à l'hôpital et l'incidence des isolats dans les effluents hospitaliers. L'absence de prise en charge spécifique des déchets hospitaliers au niveau des eaux usées pourrait ainsi contribuer largement au maintien et à la diffusion des souches et des mécanismes de résistance dans l'environnement.

P3. MLVA-16 chez *Brucella*: quelles limites pour les enquêtes épidémiologiques ?

Corde Y., Cherfa M.-A., Drapeau A., Le Carrou G., Jay M., Garin-Bastuji B., Mick V.

*Université Paris-Est-ANSES, Laboratoire de Santé Animale, Unité Zoonoses Bactériennes, Centre National de référence des *Brucella*, Laboratoire de Référence National et UE/OIE/FAO pour la Brucellose Animale, 23 avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort Cedex (France)*

Objectif:

La brucellose, zoonose mondiale, due à *Brucella*, impacte la santé publique humaine et animale.

L'identification des variations génétiques est essentielle pour les programmes de surveillance des pathogènes. Actuellement, la stratégie optimale pour le génotypage des souches de *Brucella* est la MLVA-16, basée sur 16 marqueurs génétiques, organisés en 2 panels: panel 1 (8 minisatellites), plus stable que le panel 2 (8 microsattellites: 3 pour le panel 2A et 5 pour le panel 2B).

Chez d'autres pathogènes, des événements génétiques aléatoires peuvent générer des petites variations sur les profils VNTR de souches étroitement liées. De ce fait, l'analyse des données peut en être impactée, rendant discutable leur interprétation épidémiologique. Mais, qu'en est-il pour *Brucella* ?

Méthodes:

Cette étude avait pour objectif d'évaluer la stabilité génétique des marqueurs MLVA-16, ainsi que son implication dans l'interprétation des données MLVA pour *Brucella*. Le *Hunter Gaston Diversity Index* (HGDI) de chaque marqueur a été déterminé à partir des données MLVA des espèces/biovars majeurs (>500 isolats de *B. melitensis* bv3 [Bmel3]; données personnelles et publiques). Parallèlement, la stabilité des loci a été étudiée en comparant 76 isolats de Bmel3, groupés en 25 groupes épidémiologiquement liés (2 à 9 membres, 1 à 4 hôtes; même source de contamination, contamination directe patient/technicien, même patient).

Résultats:

Les HGDI de chaque marqueur génétique MLVA-16 ont confirmé un degré de polymorphisme espèce-dépendant, mais aussi biovar-dépendant. En outre, 32% des groupes ont montré au moins une variation unique sur un locus (Single-Locus Variation: SLV), 8% une double variation et 12% de multiples variations (4 loci). Ces variations génétiques ne semblent pas corrélées à l'hôte.

Les différences entre les souches très proches ont été attribuées aux variations du panel2B hypervariable (28%). 20% des groupes, patient/technicien inclus, ont montré des variations dans le panel2A (1 à 2U), mais seulement un groupe (6.7%) a montré une SLV (1U) dans le panel1 (Bruce42), conformément aux HGDI. De plus, deux allèles distincts pour un même locus (Bruce16) ont été reportés pour le même patient, suggérant une adaptation à l'hôte.

Conclusion:

Bien que la MLVA-16 soit appropriée pour les enquêtes micro/macro-épidémiologiques, certaines variations de motifs existent entre les souches très proches de *Brucella* qui peuvent impacter l'interprétation des données MLVA chez *Brucella*. Nos résultats mettent en évidence le besoin d'un guide spécifique en la matière.

P5. Caractérisation de populations bactériennes dans l'air intérieur par pyroséquençage*Gerard A.¹, Le Cann P.¹, Gangneux J.-P.², Gabet S.¹*¹UMR Inserm 1085 IRSET, EHESP²UMR Inserm 1085 IRSET, Laboratoire de Parasitologie, Université de médecine de Rennes

Depuis de nombreuses années, une augmentation des maladies respiratoires est constatée dans la population, parmi lesquelles l'asthme et les broncho-pneumopathies chroniques obstructives (BPCO). La pollution et l'augmentation de la susceptibilité individuelle à l'allergie sont clairement impliquées. Récemment, des études ont également montré le rôle de l'environnement intérieur, et notamment la présence de certains composés chimiques et agents microbiens. De plus, l'amélioration des performances énergétiques dans l'habitat a aussi contribué à augmenter le confinement et ainsi l'exposition aux contaminants de l'air intérieur. Cette exposition est la plus importante puisque nous passons 90% de notre temps à l'intérieur (maison, bureau, transport...). Le rôle des moisissures a été clairement établi dans l'occurrence des problèmes respiratoires et en particulier l'asthme. Mais depuis quelques années, la communauté internationale scientifique s'intéresse aux bactéries de l'environnement. L'influence de l'exposition aux bactéries est encore mal connue. Afin d'explorer les populations de l'air intérieur, nous avons réalisé des prélèvements d'air par une technique d'impaction cyclonique en milieu liquide. Le collecteur cyclonique Coriolis® (Bertin technologies, France) a été utilisé à une vitesse d'aspiration de 300 L/min pour collecter 3 m³ d'air dans des salons. Quinze logements ont été sélectionnés pour leurs caractéristiques (maison ou appartement, rural ou urbain, vieux ou neuf, présence d'enfants ou pas, présence d'animaux familiers ou pas). Au cours de la visite, des prélèvements d'air intérieur ont été réalisés, des paramètres environnementaux ont été mesurés (température, humidité) et un questionnaire a été complété par les habitants. L'ADN des échantillons a été extrait et le gène 16S a été pyroséquencé sur un système Roche 454. Les résultats de pyroséquençage montrent une fréquence élevée du genre *Burkholderia* (environ 50% sur 7 logements), et dans une proportion plus faible *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* et *Ralstonia* (qui est proche de *Burkholderia*). Ces genres sont fréquemment retrouvés par culture dans l'environnement intérieur de l'habitat. *Stenotrophomonas* et *Acinetobacter baumannii* ont été détectés dans 10 et 3 logements respectivement. Ces bactéries environnementales ont été décrites comme responsables d'infections nosocomiales à l'hôpital. Cette étude caractérise la flore bactérienne dans des échantillons d'air intérieur de logements de l'Ouest de la France. Les résultats ont mis en évidence la proportion importante de certains genres de bactéries dans les échantillons d'air, ainsi que la présence de bactéries pathogènes dans l'air intérieur qui pourrait constituer un risque pour les patients immunodéprimés rentrant chez eux après hospitalisation.

P6. Rôle de systèmes « Toxine-Antitoxine » de *Sinorhizobium meliloti* dans l'interaction symbiotique avec *Medicago sp.*

Lipuma J., Kiers A., Garcia I., Dupont L.

Institut Sophia Agrobiotech

La symbiose fixatrice d'azote entre la légumineuse *Medicago* et la bactérie *Sinorhizobium meliloti* induit le développement d'un nouvel organe racinaire, la nodosité. Dans cet organe, la bactérie se différencie en bactéroïde fixateur d'azote fournissant à la plante une source d'azote. En retour, la plante fournit à la bactérie des substrats carbonés. Les travaux présentés concernent l'étude du rôle de systèmes toxine-antitoxine (TA) de la bactérie dans l'interaction symbiotique. Chez les bactéries pathogènes animales, certains systèmes TA sont décrits comme intervenant dans la survie des bactéries dans la cellule hôte ainsi que dans l'adaptation à différents stress. C'est le cas de la famille TA VapBC (*Virulence-Associated Protein*), famille très représentée chez la bactérie pathogène humaine *Mycobacterium*. Un système TA est composé d'une antitoxine labile et d'une toxine stable qui, lors d'un stress, agit comme régulateur de la traduction, via son activité RNase.

Parmi les opérons TA putatifs présents sur le chromosome de *S. meliloti*, nous avons étudié le rôle de deux systèmes appartenant à la famille VapBC. Pour cela, le phénotype symbiotique de mutants invalidés dans le gène de la toxine a été étudié. Ainsi, le mutant bactérien affecté dans la toxine VapC5 (système VapBC5) présente, en interaction, une activité fixatrice d'azote 30% supérieure à celle d'une souche sauvage, et un rendement végétal supérieur. Inversement, un mutant de la toxine VapC7 (système VapBC7) présente lui une quasi-incapacité à fixer l'azote, entraînant une sénescence précoce de la nodosité. Ce phénotype est associé à une perte de viabilité de la bactérie différenciée en bactéroïde *in planta*. Le bactéroïde symbiotique déficient pourrait alors être perçu comme un « pathogène » au sein de la cellule hôte. En conclusion, le rôle de ces toxines VapC, qui agiraient en tant que RNases site-spécifique, sera discuté.

P7. Microbiome respiratoire des patients CF dans la primocolonisation à *Pseudomonas aeruginosa*

*Hery-Arnaud G.*¹, *Keravec M.*¹, *Mounier J.*¹, *Burgaud G.*¹, *Prestat E.*², *Jansson J.*², *Vallet S.*¹, *Barbier G.*¹

¹Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne (LUBEM) EA3882-SFR148, Université de Brest

²Earth Sciences Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, California, USA

Objet de l'étude

La microbiologie des patients atteints de mucoviscidose (CF, cystic fibrosis) est en train d'être revue à la lumière des données métagénomiques. Si *P. aeruginosa* (*Pa*) est toujours reconnu comme l'un des principaux pathogènes, le microbiote respiratoire est désormais vu comme une entité pathogénique dans laquelle toutes les espèces en présence pourraient potentiellement jouer un rôle. L'objectif de cette étude est d'identifier les espèces bactériennes et virales capables de jouer un rôle comme synergènes ou antagonistes de *Pa*.

Matériel et méthodes

Vingt expectorations provenant de 5 patients CF (moyenne d'âge = 9,8 ans), tous exempts de *Pa* en culture depuis au moins un an, ont été recueillies au cours d'un suivi longitudinal (médiane=23,4 mois) jusqu'à l'apparition de *Pa*. La diversité bactérienne a été explorée par pyroséquençage 454 de l'ADNr 16S. 18 virus respiratoires ont été recherchés par qPCR multiplexe (RespiFinder Smart22). Les données du microbiome ont été corrélées i) entre elles (matrice des corrélations) ii) aux données cliniques (Analyses Factorielles Multiples réalisées avec 27 variables de biodiversité et 11 variables cliniques).

Résultats

Pour chaque expectoration, 13762 reads en moyenne ont été obtenus. Entre 33 et 94 OTUs (Operational Taxonomic Units) ont été retrouvés. Malgré des différences observées entre les individus, un « core » microbiome composé de 12 genres bactériens a été identifié. Les AFM ont mis en évidence une ségrégation des prélèvements *Pa*+. Quelques OTUs sont associées positivement ou négativement à la présence ou l'absence de *Pa* de manière hautement significative. L'antibiothérapie n'est pas significativement associée à une modification de la diversité bactérienne.

Conclusion

Cette étude démontre (1) la grande diversité bactérienne du microbiote respiratoire CF mais la présence d'un noyau commun (2) la résilience post-antibiothérapie de ce microbiote (3) le lien existant entre la composition du microbiote pulmonaire et la primocolonisation à *Pa*.

P118. Comparaison génomique des souches de *Campylobacter jejuni* : résultats préliminaires de l'analyse d'une souche atypique aérotolérante*Bronnec V., Cruveiller S., Tresse O., Haddad N.*

UMR – INRA SECALIM1014

Campylobacter jejuni est la première cause d'entérite bactérienne dans le monde et pourtant cet agent zoonotique reste encore mal décrit et non maîtrisé au sein notamment de la filière avicole. En effet, contrairement aux autres pathogènes alimentaires, ses caractéristiques biologiques, sa pathogénicité et son mécanisme de virulence sont peu élucidés. L'espèce *C. jejuni* regroupe des souches hétérogènes qui sont présentes dans des environnements variés et isolés à partir d'hôtes différents. Les techniques modernes d'analyse des génomes (notamment le séquençage et la comparaison génomique) permettent de mettre en évidence les différences existantes entre les génomes des différentes souches ainsi que les régions conservées pouvant expliquer la persistance et l'adaptation du pathogène au sein de la chaîne alimentaire ou lui permettant d'exprimer son pouvoir pathogène. L'objectif de ce travail est de réaliser une comparaison génomique des différentes souches de *C. jejuni* afin de mettre en évidence le core génome de l'espèce *C. jejuni* (i.e. les gènes communs aux différentes souches), mais surtout d'identifier les particularités génomiques pouvant être associées à la virulence des souches et à leur capacité à résister face aux stress environnementaux. Le nombre de génomes de *C. jejuni* entièrement séquencés à ce jour s'élève à 16, ce qui a permis la mise en évidence d'une certaine homogénéité en termes de taille, de nombre de gènes et de protéines parmi ces souches aux origines et physiologies différentes. Seules 5 souches de *C. jejuni* parmi celles recensées semblent posséder un plasmide. La souche *C. jejuni* 81-176 responsable de diarrhées inflammatoires chez l'homme, a la particularité d'en posséder deux, codant pour des facteurs de virulence et pouvant être impliqués dans son caractère particulièrement virulent. D'autres souches identifiées pour leur mode de transmission inhabituel ont été étudiées afin de mettre en évidence des particularités génomiques. C'est le cas par exemple de la souche M1 issue d'une contamination directe de la volaille à l'homme, ou encore *C. jejuni* 1336 et 414, isolés de l'environnement et incapables de coloniser les volailles ou d'infecter l'homme. L'identification de nouvelles insertions génomiques, de divergences ou encore de délétions entre les différentes souches par génomique comparative permettrait d'identifier des régions importantes pouvant jouer un rôle dans la colonisation des hôtes et dans la virulence. Ces spécificités peuvent être mises en lien avec le réservoir et également le potentiel pathogène de chaque souche.

P8. Etude du rendement des prélèvements de surface par gélose contact

Diebolt-Ougier M., Marie V., Leroyer C., Boulestrau H., Rogues A.-M.

CHU Bordeaux

Objectifs :

Etudier l'efficacité de la technique de prélèvement par gélose contact vis-à-vis de différentes souches bactériennes et différents supports.

Méthode :

Etude expérimentale avec quatre surfaces testées : stratifié compact, Corian®, acier inoxydable et faïence après contamination artificielle par sept souches bactériennes : *S. aureus*, SARM, *E. coli*, *E. coli* BLSE, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. pneumoniae* productrice d'une carbapénémase (type OXA-48). Les surfaces ont été contaminées en déposant une suspension bactérienne calibrée. Les prélèvements ont été standardisés en utilisant un applicateur. Huit prélèvements successifs (gélose count-tact® Biomérieux) ont été réalisés afin d'établir une courbe de cinétique de décrochage des bactéries. Le rendement moyen d'extraction des bactéries a été calculé à partir de cette courbe spécifique au couple bactérie/surface testée.

Résultats :

Les rendements moyens d'extraction étaient toujours supérieurs à 70% pour la faïence. Les prélèvements sur Corian® montraient un rendement moyen de 40% alors que ceux sur l'acier inoxydable et le stratifié compact étaient de 30%. Il n'a pas été mis en évidence de différence de rendement d'extraction entre souches sensibles et multi-résistantes aux antibiotiques.

Conclusion :

Ces observations confirment que le rendement d'un prélèvement par gélose contact peut être fortement impacté par le matériau de la surface prélevée avec une sous-estimation globale de la contamination bactérienne des surfaces. Le rendement variait aussi selon la souche bactérienne déposée sur le support soulignant la prudence à avoir pour l'interprétation des résultats. En l'absence de méthodologie unanimement validée, le guide concernant la surveillance microbiologique de l'environnement dans les établissements de santé (CTIN 2002) souligne l'intérêt d'une étude de rendement dans le cadre de la démarche qualité du laboratoire.

P9. Lyse automatisée de microorganismes par sonication : développement et applications agroalimentaires*Marisa Hohnadel, Luc Felden, Renaud Chollet et Holger Schönenbrücher**Merck Millipore, Molsheim, France*

De plus en plus, des méthodes de détection rapide de microorganismes pathogènes sont demandées par les industries afin de répondre aux exigences de santé publique. Ainsi, les laboratoires de contrôle remplacent de plus en plus souvent les méthodes traditionnelles de microbiologie par des essais plus rapides, comme la PCR en temps réel, basés sur l'amplification et la détection des acides nucléiques. Cependant, la sensibilité et la spécificité de ces techniques nécessitent une méthode optimale de préparation de l'échantillon.

En combinant le développement d'un système automatisé de sonotrode externe avec l'utilisation de systèmes de qPCR, un protocole a été mis au point permettant une extraction robuste et répétable de l'ADN de microorganismes. Dans un premier temps, la puissance et la fréquence de la sonotrode ainsi que le temps de sonication ont été déterminés afin de permettre une lyse efficace d'un grand nombre de microorganismes. Puis la sonotrode a été évaluée en condition réelle pour la détection de pathogènes dans des aliments. Pour cela, 25g de bœuf haché ou 25g de volaille hachée ont été artificiellement contaminés par de faibles quantités de *S.enteritidis* ou *L.monocytogenes*.

Avec une puissance de 750W, une fréquence de 20 kHz et un temps de sonication de 4 minutes, les résultats ont montré une extraction efficace de l'ADN des 16 microorganismes testés, incluant aussi bien des bactéries à Gram positif ou négatif que des levures et des spores de bactéries ou moisissures. Basés sur les valeurs de Ct obtenues par qPCR, la linéarité de la lyse a également été démontrée sur *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *S.enterica*, *C.albicans* et des spores de *A.brasiliensis* avec des coefficients de corrélation compris entre 0.90 et 0.98. L'utilisation de la sonotrode a également permis la détection de pathogènes dans le bœuf ou la volaille, avec des valeurs de Ct de 27.16 et 33.2 pour *S.enteritidis* et de 21.99 et 24.01 pour *L.monocytogenes*. Une comparaison avec un kit commercial d'extraction d'ADN basé sur du bead-beating a montré des résultats de qPCR au moins équivalents entre les deux méthodes de lyse.

Cette étude démontre qu'un protocole de préparation d'échantillon incluant une étape de 4 minutes de sonication sur ce nouvel instrument automatisé et à haut débit permet une lyse efficace d'un grand nombre de microorganismes et la détection de leur ADN dans des échantillons complexes.

P10. Altération et biopréservation de la viande de veau

*La Carbona S.*¹, *Denis C.*¹, *Hanin A.*¹, *Chaillou S.*², *Zagorec M.*³, *Champomier-Vergès M.-C.*²

¹ ACTALIA Sécurité des Aliments, Villers Bocage, France

² INRA, UMR1319-Micalis Jouy-en-Josas, France

³ Oniris, INRA UMR1014-Secalim, Nantes, France

Objectifs : le projet “ANR Ecobiopro” étudie l'écosystème microbien de produits carnés et de produits de la mer en vue d'accroître les connaissances sur les flores d'altération et d'évaluer l'impact des flores bioprotectrices sur ces flores.

Méthode : des analyses microbiologiques conventionnelles et des identifications par pyroséquençage ont été réalisées sur des steaks hachés de veau en fin de fabrication et après conservation et altération au froid. Le pouvoir altérant des espèces identifiées et l'impact de ferments de biopréservation ont été évalués par des challenges tests sur des steaks ionisés ou naturellement contaminés durant la durée de vie du produit de 12 jours à 8°C sous atmosphère modifiée. Des évaluations sensorielles ont permis d'évaluer l'altération des steaks (couleur, exsudat, odeur).

Résultats : les identifications par pyroséquençage ont mis en évidence cinq espèces majoritaires, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc gasicomitatum*, *B. thermosphacta*, *Lc. piscium* et *Lb. sakei*. Les challenge-tests sur steaks hachés ionisés ont montré que les croissances de *B. thermosphacta*, *Ln. citreum* et *Ln. gasicomitatum* étaient importantes durant les cinq premiers jours de conservation tandis que *Lc. piscium* et *Lb. sakei* présentaient une croissance plus lente. L'altération des steaks a été observée pour les cinq espèces avec une décoloration des steaks. L'impact de quatre ferments de bioprotection a été évalué sur de la viande de veau ionisée inoculée par les trois espèces les plus altérantes, *Ln. gasicomitatum*, *Ln. citreum* et *Lc. piscium*. Deux ferments ont été retenus et testés sur du steak haché naturellement contaminé. L'efficacité des ferments s'est avérée meilleure sur la viande naturellement contaminée et l'un d'entre eux a permis de limiter l'altération en cours de conservation, notamment les défauts liés à l'évolution de la couleur.

Conclusion : cette étude a permis d'identifier la flore d'altération de la viande de veau qui n'était auparavant pas décrite dans la littérature. L'utilisation de ferments de bioprotection peut permettre de limiter l'altération des produits durant la conservation sous atmosphère modifiée à 8°C.

P11. Polymorphisme et localisation des gènes *stx* des STEC O26:H11

Bonanno Ludivine¹, Auvray Frédéric², Loukiadis Estelle³, Michel Valérie⁴

¹ Université Paris Est ; Anses - Laboratoire de Sécurité des Aliments, Maisons Alfort ; Actalia - Laboratoire de Microbiologie d'Intérêt Laitier, La Roche sur Foron

² Université Paris Est ; ANSES, Laboratoire de Sécurité des Aliments, Maisons-Alfort

³ Université de Lyon, VetAgro Sup, LMAP, Marcy l'Etoile

⁴ ACTALIA, Laboratoire de Microbiologie d'Intérêt Laitier, La Roche sur Foron

Les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) sont responsables d'infections humaines, allant de diarrhées aqueuses bénignes à des colites hémorragiques (CH) pouvant se compliquer d'un syndrome hémolytique et urémique (SHU), parfois mortel. Seul un nombre restreint de sérotypes, dont O26:H11, sont impliqués dans les cas graves. Principal facteur de virulence des STEC, les Shiga toxines (Stx) sont codées par des bactériophages. L'objectif de cette étude est de caractériser les phages Stx présents dans les STEC de sérotype O26:H11, afin d'évaluer la pathogénicité de ces souches selon leur origine, les variants du gène *stx*, et le site d'insertion du phage Stx.

Cette étude a porté sur une collection de 74 souches de STEC O26:H11 d'origine humaine, alimentaire (principalement des produits laitiers) et animale (bovins). Les variants des gènes *stx* et les sites d'insertion des phages Stx ont été déterminés par PCR conventionnelle et PCR en temps réel, respectivement.

Les résultats obtenus montrent que les variants du gène *stx*, majoritairement retrouvés dans les souches O26:H11, sont les variants *stx1a* (53 souches) et *stx2a* (17 souches). A noter que 3 souches possèdent simultanément les deux variants (*stx1a* et *stx2a*). La majorité des souches issues de produits alimentaires et de fèces bovines possèdent le variant *stx1a*, alors que les souches humaines possèdent soit *stx1a* soit *stx2a* (dont une majorité est liée à des cas SHU). Quatre sites d'insertion sont occupés par un phage Stx chez les STEC O26:H11 étudiées, correspondant aux gènes *wrbA* (37 souches), *yehV* (29 souches), *yecE* (10 souches), et *sbcB* (2 souches). Les souches issues des produits alimentaires et de fèces bovines possèdent un phage Stx inséré dans les gènes *wrbA* ou *yehV*, tandis que les souches humaines possèdent, en plus, une insertion dans un 3^{ème} gène (*yecE*). A noter qu'un tiers des souches humaines à l'origine de SHU possèdent un phage Stx inséré dans ce gène *yecE*.

En conclusion, les types de variants *stx* mais aussi les sites d'insertion des phages Stx présents parmi les souches STEC O26:H11 diffèrent en fonction de l'origine des souches. Ces différences pourraient refléter l'existence de clones distincts, aux potentiels de virulence différents, circulant dans les aliments, chez les bovins et chez les patients

P12. Résistance des biofilms de *Bacillus* au nettoyage dans les IAA

Moris Jonathan, Clarisse Martine, Ronse Annette, Faillle Christine

INRA, UR638 Processus aux Interfaces et Hygiène des Matériaux, F-59651 Villeneuve d'Ascq, France

Objectifs : Des souches de différentes espèces de *Bacillus* sont souvent isolées des aliments tels que les produits laitiers. La surface des équipements des chaînes de transformation est un des éléments incriminés dans la contamination des produits alimentaires. L'objectif de cette étude est de démontrer que *Bacillus* est capable de former des biofilms sur des surfaces d'acier et de résister au moins partiellement à une procédure de nettoyage en place (NEP).

Méthodes : Quatre souches de *Bacillus*, ont été testées : trois souches de *B. cereus* (Bc 98/4, Bc 5832 et Bc D22) et une souche de *B. subtilis* (Bs 98/7). Des biofilms de 24 h ont été produits sur des surfaces d'acier inoxydable 304 2B par immersion dans un milieu nutritif. Après rinçage, ces biofilms sont caractérisés pour leur composition et leur structure 3D par dénombrements et par microscopie à épifluorescence et électronique à balayage. L'aptitude des biofilms à résister à une procédure de nettoyage en place (NEP, soude 0.5%, 60°C, 10 min) a été évaluée sur une boucle d'essai à l'échelle pilote.

Résultats : L'aptitude à former des biofilms résistants à une procédure douce de rinçage était très différente selon les souches de *Bacillus*. Des taux de contamination compris entre $6.4 \cdot 10^3$ (Bc D22) et $8.8 \cdot 10^6$ (Bs 98/7) cellules par coupon ont été trouvés. Malgré la durée relativement courte de formation du biofilm, des taux de 10 à 30 % de spores ont été quantifiés au sein de ces biofilms. La structure des biofilms était aussi très différente selon les souches, avec des biofilms épais et riches en exopolymères (Bs 98/7) ou des biofilms formés de cellules isolées et de petits amas ou filaments avec peu ou pas d'exopolymères (Bc 98/4, Bc D22). La faible adhésion de Bc 5832 a été confirmée par NEP puisque seulement 1% des bactéries du biofilm ont résisté à cette procédure. Pour les autres souches, Bs 98/7 a présenté une résistance proche de Bc 5832, alors que des résistances de l'ordre de 30% étaient observées pour les deux dernières souches. Plus remarquable, le pourcentage de spores dans le biofilm résiduel s'élevait à 60-100% sauf pour Bc 5832 dont le pourcentage de spores reste bac que ce soit avant (10%) ou après (20%) la procédure de NEP.

En conclusion, des souches de *B. cereus* et *B. subtilis* sont aptes à former des biofilms comportant beaucoup de spores, souvent très résistantes aux procédures de NEP. Ces spores seront capables de contaminer les produits alimentaires en contact, voire de germer et de former de nouveaux biofilms si les conditions extérieures le permettent.

P13. *Yersinia enterocolitica* : prévalence sur viande fraîche et virulence des souches.

ESNAULT Emilie, LABBE Annie, HOUDAYER Catherine, MORIN Stéphane, DENIS Martine
ANSES SITE DE PLOUFRAGAN

Yersinia enterocolitica est la 4^{ème} cause d'entérite humaine en Europe et le porc est considéré comme le réservoir des souches pathogènes pour l'Homme. En France, 74,3% des lots de porcs sont positif en *Y. enterocolitica*. Cette bactérie a également été retrouvée sur de la viande de volaille et de bœuf. Cette étude a pour objet d'estimer l'exposition des consommateurs à *Y. enterocolitica* à travers la consommation de viande de porc, de volaille et de bœuf et de mesurer la virulence des souches.

En 2012, 649 échantillons de viande crue ont été collectés à la distribution en France. La détection de *Y. enterocolitica* a été réalisée selon la méthode ITC-CIN-YeCM. Trois gènes de virulence ont été recherchés par PCR chez les souches isolées : le gène *ystB* codant pour une entérotoxine thermostable, le gène *inv* codant pour l'invasine et le gène *myfA*, impliqué dans l'assemblage de l'antigène Myf. Le pouvoir colonisateur de ces souches a également été mesuré à l'aide de tests d'adhésion-invasion sur lignée cellulaire eucaryote humaine.

Sur les 649 échantillons, 4.8% étaient positifs en *Y. enterocolitica*. La prévalence est du même ordre (test du chi², P=0,9) pour les trois productions: 4,6%, 4,5% et 5,2% pour le porc, la volaille et le bœuf, respectivement. Bien que la méthode utilisée favorise la détection de *Y. enterocolitica* de biotypes pathogènes, seul le biotype 1A (BT1A) a été isolé. Ce biotype est considéré comme non pathogène pour l'Homme mais des gènes de virulence sont détectés dans des souches isolées de cas cliniques. Cinq souches sur les 39 isolées n'ont pas les gènes *inv*, *myfA*, et *ystB*. Ces gènes ont été respectivement détectés pour 64%, 15% et 77% des souches. Les résultats issus des tests d'adhésion-invasion sur lignée cellulaire eucaryote humaines sont en cours d'analyse.

En conclusion, cette étude indique que la consommation de viande de porc, de volaille et de bœuf présente à priori un faible risque pour le consommateur. En effet la prévalence est faible et les souches isolées sont de BT1A. Bien que considérée comme non-pathogène, certaines de ces souches possèdent des gènes retrouvés dans des souches isolées de cas cliniques humains. Le risque lié à la présence de ces souches sur les viandes ne doit donc pas être ignoré et les résultats issus des tests *in vitro* pourront permettre de mieux évaluer le potentiel colonisateur des souches isolées dans cette étude.

P14. Caractérisation de l'écosystème microbien de viande de volaille

ZAGOREC M., PREVOST H., REMENANT B., ROUGER A.

INRA ONIRIS

Les aliments hébergent une communauté microbienne diverse et très variable entre lots, qui comprend des microorganismes pathogènes ou altérants et qu'il est nécessaire de contrôler pour assurer la qualité des produits. Pour comprendre les interactions microbiennes des aliments, des modèles simples sont généralement utilisés (souche unique, matrice stérile, milieu de culture), peu représentatifs de la réalité. Le but de cette étude est de constituer un modèle pour décrire et comprendre les interactions microbiennes lors de la transformation des viandes de volailles. Différents protocoles ont été testés pour constituer un écosystème microbien représentatif de la diversité et la variabilité des lots en collectant les bactéries présentes sur des produits du commerce et pour en extraire l'ADN en s'affranchissant des méthodes culturales. La viabilité des bactéries après congélation a été évaluée. Sa composition, obtenue par méthodes culturales et non culturales a été comparée.

La flore totale présente sur des découpes de volaille conservées sous atmosphère protectrice varie de 10³ à 10⁷ UFC/g suivant les lots. Le rinçage montre un meilleur compromis que l'écouvillonnage ou le broyage pour extraire les bactéries de la matrice, quelle que soit la charge microbienne. Après récupération des communautés bactériennes, des aliquotes peuvent être conservés à -80°C sans perte significative de viabilité. Après étalement sur milieux spécifiques la flore majoritaire identifiée est constituée de bactéries lactiques, *Brochothrix thermosphacta* et *Pseudomonas*. Cependant, cette flore ne représente parfois que le 1/10^e de la flore totale dénombrée sur milieu PCA, montrant qu'une flore non identifiée par ces méthodes est aussi présente. Le pyroséquençage des régions V1-V3 de l'ADNr 16S des communautés s'étant développées sur PCA conforte la présence de *B. thermosphacta* (37% des lectures), *Serratia liquefaciens* (18%), *Carnobacterium divergens* (10%) et *Carnobacterium maltaromaticum* (8%).

Des différentes méthodes d'extraction d'ADN, directement à partir du stock microbien congelé, le kit PowerFood™ (Mobio) montre les rendements les plus satisfaisants et reproductibles, permettant l'amplification des régions V1-V3 de l'ADNr 16S. Une charge bactérienne d'au moins 10⁵-10⁶ UFC/g est nécessaire pour obtenir un rendement de PCR optimal.

Des échantillons viables représentant la communauté microbienne de découpes de volaille sont donc disponibles. Leur composition sera déterminée et ils permettront de manière reproductible d'étudier les interactions après inoculation de matrices alimentaires.

P15. Potentiel proteolytic des souches isolées à partir du lait cru

Gonçalves Machado Solimar¹, Mara Soares Bazzoli Denise¹, Lopes da Silva Fernanda¹, Van Coillie Els², De Block Jan², Heyndrickx Marc², Dantas Vanetti Maria Cristina¹

¹ Universidade Federal de Viçosa

² Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek

La qualité des produits laitiers peut être affectée par la croissance des bactéries psychrotrophes qui peuvent produire enzymes protéolytiques thermorésistantes ayant pour conséquence l'apparition de goûts très désagréables et la gélification du lait UHT. L'objectif de cette étude est d'évaluer le potentiel proteolytic des souches isolées à partir de lait cru refroidi au cours du temps de stockage. Les échantillons de lait ont été prélevés dans trois fermes situées dans la région de Minas Gerais au Brésil. Au laboratoire, chaque échantillon a été incubé sous conditions optimales (45 h à 4 °C suivi par 3 h à 7 °C) et sous-optimales (45 h à 7 °C suivi par 3 h à 10 °C) sur la base de la loi brésilienne pour simuler le stockage dans les fermes et le transport du lait. Pendant cette période de simulation, les échantillons ont été évalués pour la concentration microbienne en ce qui concerne aux bactéries totales, psychrotrophes, psychrotrophes protéolytiques et bactéries du genre *Pseudomonas*. Les bactéries psychrotrophes protéolytiques ayant différentes morphologies de colonies ont été isolées et le potentiel proteolytic de chaque souche a été évalué. Ensuite, la capacité de production de protéases thermorésistantes des souches potentiellement protéolytiques a été déterminée en utilisant la méthode colorimétrique de l'acide 2,4,6-trinitrobenzènesulfonique après traitement thermique à 95 °C pendant 8 min et 45 s. La concentration de chaque groupe microbien a augmentée avec le temps et les plus grandes valeurs logarithmiques ont été observées lorsque le lait a été conservé en condition sous-optimale. Cent cinquante souches protéolytiques ont été isolées. Soixante-seize pourcent de ces souches ont présenté un potentiel proteolytic plus grand que la moyenne et, pourtant, ont été classifiées comme très protéolytiques. Les bactéries isolées à la fin de la simulation sous la condition sous-optimale de stockage ont donné un potentiel protéolytique plus élevée. Soixante pourcent des souches isolées présentaient une activité protéolytique thermorésistante. La sélection des isolats à grand potentiel de détérioration pendant le stockage à froid du lait cru a été aussi remarquée lorsque les souches sont évaluées pour leur capacité à produire des protéases thermorésistantes. Enfin, le lait cru conservé sous la condition sous-optimale présente une microflore avec un potentiel proteolytic supérieur qui augmente avec le temps de stockage. Pourtant, la maîtrise des conditions de stockage du lait cru est très importante pour garantir la qualité des produits laitiers.

P16. Méta-analyse des valeurs de D de *Clostridium botulinum* protéolytique et de sa souche de substitution *Clostridium sporogenes* PA3679Diao M.M.^{1,2}, André S.³, Membré J.-M.^{1,2}¹ INRA, UMR1014 Secalim, 44322 Nantes Cedex 3, France,² LUNAM Université, Oniris, Nantes, France,³ CTCPA, Unité de microbiologie, ZA de l'aéroport, 84911 Avignon**OBJECTIFS**

Le botulisme est une maladie très dangereuse résultant de l'ingestion de la toxine botulique produite par *Clostridium botulinum* protéolytique. Les spores protéolytiques de *C. botulinum* sont réputées détenir la plus grande résistance thermique parmi les organismes pathogènes retrouvés dans les produits alimentaires faiblement acides et stables à température ambiante.

Le premier objectif de cette étude était de quantifier la thermorésistance de *C. botulinum* et le second objectif était de comparer la thermorésistance de *C. botulinum* avec celle de *C. sporogenes* PA3679.

MATERIELS ET METHODES

Les valeurs de D de *C. botulinum* et de *C. sporogenes* PA3679 sont issues de différents articles publiés entre 1922 et 2013. Les informations extraites de ces articles sont : log des valeurs de D, température de traitement thermique, milieu dans lequel le traitement a été effectué (9 catégories), espèce et souche (11 pour *C. botulinum*) et enfin, pH du milieu lors du traitement (5 catégories). Les données sont collectées à des températures comprises entre 100°C et 140°C pour *C. botulinum* et entre 110°C et 143°C pour *C. sporogenes* PA3679. Au final 911 valeurs de D collectées à partir de 38 études ont été utilisées pour la méta-analyse.

Les log des valeurs de D (log D_k) ont été analysés par une approche bayésienne dans un modèle à effet mixte suivant l'équation :

$$\log D_k = \log D_{ave} - \frac{T_k - T_{ave}}{z_i} + \varepsilon_k (T_k - T_{ave})/z_i + e_k, \text{ avec } D_{ave} \text{ dépendant du milieu, de l'espèce bactérienne,}$$

de la souche bactérienne (*C. botulinum*), du pH et de l'étude.

RESULTATS

L'erreur résiduelle a été estimée à 0.22. Les valeurs de z des deux espèces ont été estimées avec précision : 11.3°C [0.3] pour *C. botulinum* et 11.1°C [0.2] pour *C. sporogenes* PA3679. Les valeurs de D à 121.1°C en milieu liquide, à pH neutre, ont été estimées à 0.19 min et 1.28 min respectivement pour *C. botulinum* et *C. sporogenes* PA3679.

CONCLUSIONS

En se basant sur une méta-analyse incluant 911 valeurs de D, les thermorésistances de *C. botulinum* et *C. sporogenes* PA3679 ont été quantifiées. La souche *C. sporogenes* PA3679 présente une thermorésistance supérieure à celle de *C. botulinum*.

P17. Impact des mélanoidines du pain sur le microbiote intestinal

Cynthia Helou, Sylvain Denis, David Marier, Véronique Rame, Monique Alric, Frédéric J. Tessier et Pascale Gadonna-Widehem
EGEAL UP2012-10.101 - Institut Polytechnique LaSalle Beauvais, Beauvais

La réaction de Maillard est une réaction chimique qui lie un sucre réducteur à une protéine ou un acide aminé lors du traitement thermique des aliments. Elle aboutit à des polymères bruns de hauts poids moléculaires appelés mélanoidines. Alors que les produits des stades précoces et avancés de la réaction de Maillard ont été largement étudiés, peu de travaux ont été menés sur les mélanoidines, particulièrement les mélanoidines du pain, en raison de leurs structures complexes et peu connues. Le but de cette étude était d'évaluer l'impact des enzymes digestives sur les mélanoidines du pain et les conséquences sur le microbiote intestinal.

De la croûte de pain riche en mélanoidines, de la mie ne contenant pas de mélanoidines et des mélanoidines modèles (gluten/amidon chauffés) ont été digérés *in-vitro* à l'aide d'un système gastro-intestinal de type TIM 1. La fraction soluble des mélanoidines a été mesurée par chromatographie d'exclusion stérique couplée à une mesure de fluorescence. Afin d'évaluer l'impact des digestats de croûte, de mie, de mélanoidines modèles et d'inuline (contrôle prébiotique), des fermentations en batch ont été réalisées sous enceinte anaérobie avec des matières fécales d'adultes sains. Différentes flores ont été suivies par culture et par qPCR pendant les 8 jours de fermentation.

Au cours de la digestion gastrique et amylasique de la croûte et des mélanoidines modèles, une hausse de la fraction soluble des mélanoidines a été observée. Ces résultats indiquent qu'une partie des mélanoidines insolubles est libérée au cours du processus digestif (acidité gastrique, activités enzymatiques). Néanmoins, le poids moléculaire encore élevé de ces composés (>3kDa) suggère qu'ils ne peuvent traverser les membranes intestinales et restent donc confinés dans la lumière digestive en contact avec la flore intestinale. Lors des fermentations en batch, la présence de mélanoidines, ainsi que d'inuline, a entraîné une augmentation de la flore lactique et des bifidobactéries. Ces résultats semblent indiquer que les mélanoidines du pain auraient un effet prébiotique et interviendraient dans la modulation de la flore intestinale. Cette observation est en cours de validation sur un modèle *in-vivo*.

P18. Antimycotoxigenic and antifungal activities of *Citrullus colocynthis* seeds against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus* contaminating wheat stored

*Gacem M.A.*¹, *Gacem H.*², *Bouregag M.*³, *Ould El Hadj Khelil A.*⁴

¹ Université de Ouargla, ² Université de Sidi Bel Abbès, ³ Université de Saida, ⁴ Université de Ouargla

Plant extracts and their constituents have a long history as antifungal agents, but their use in biotechnology as preservatives, due to the increasing resistance of fungi to fungicides, has been rarely reported. The aim of this study was to assess *in vitro* antifungal and antimycotoxigenic power of methanolic and aqueous extracts of *Citrullus colocynthis* seeds, an aromatic and medicinal plant, of Algerian flora, against two toxigenic species of the genera *Aspergillus* responsible of contamination of wheat stored. The antifungal and antimycotoxigenic activity of methanolic and aqueous extracts were screened against *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus flavus*. Dilution method was used to investigate the antimicrobial and antimycotoxigenic activity. These bioassays are preceded by a phytochemical screening. The phytochemical analysis of seeds extracts revealed the presence of some chemical groups (polyphenols, steroids and alkaloids) which can express the desired activities. The results suggest that the extracts showed a very good antifungal activity against *A. ochraceus*, but for *A. flavus* any antifungal activity was recorded. The extracts have good antiochratoxigenic power in liquid medium. This evaluation confirms that the extracts of *C. colocynthis* seeds used at low concentration may have significant potential for biological control of fungi and their toxins.

Key words: *Citrullus colocynthis*, methanolic extract, aqueous extract, phytochemical screening, antifungal activity, antimycotoxigenic activity, antiochratoxigenic activity.

P19. Adhésion et viabilité de *Listeria monocytogenes* sur films de TiO₂

*Barthomeuf M.*¹, *Pissavin C.*¹, *Castel X.*², *Le Gendre L.*²

¹ IUT Saint-Brieuc, Université Rennes 1, Département Génie Biologique

² Institut d'Electronique et de Télécommunications de Rennes (IETR, UMR-CNRS 6164), Equipe Matériaux Fonctionnels, IUT Saint-Brieuc, Université de Rennes 1,

Objectifs : La présence des biofilms dans les industries agro-alimentaires est un problème économique et sanitaire récurrent. Le développement de matériaux innovants capables de lutter en amont contre la formation de ces biofilms permettrait de limiter leur présence et ainsi faciliterait les opérations de nettoyage et désinfection. L'objectif est de fonctionnaliser la surface de matériaux standards (verre, inox...) par le dépôt de films minces de dioxyde de titane (TiO₂) dotés d'une activité photocatalytique et d'en étudier l'impact sur l'adhésion et la viabilité d'une souche de *Listeria monocytogenes*.

Matériel et Méthodes : Afin de produire une gamme de surfaces actives de compositions et de textures différentes, des coupons de verre ont été recouverts d'une couche mince de TiO₂, par la technique de pulvérisation cathodique dans différentes conditions de température et de teneurs en oxygène. La surface de ces couches minces a été observée par microscopie électronique à balayage et leur structure analysée par diffraction de rayons X. L'activité photocatalytique a initialement été évaluée par un test de décoloration du bleu de méthylène afin de ne retenir pour la suite de l'étude que les supports potentiellement efficaces. Sur ces supports photoactifs, après 3h de contact et illumination aux UV-C (254 nm), les bactéries adhérentes d'une souche de *Listeria monocytogenes* ont été dénombrées et des marquages *in situ* ont été réalisés.

Résultats : La maîtrise des conditions de dépôt nous a permis de synthétiser des films amorphes ou cristallisés (phase anatase). Au regard de l'activité bactéricide, seuls ceux présentant une surface de type anatase présentent une activité photocatalytique sous UV. Une diminution d'un logarithme de la population bactérienne adhérente de la souche de *Listeria monocytogenes* a été observée. Les marquages *in situ* ont permis d'observer des bactéries adhérentes dont les parois sont altérées, suite au choc oxydatif. Ainsi, après exposition aux UV, le film de type TiO₂-anatase est anti-adhésif et bactéricide.

Conclusions : Le revêtement sélectionné présente une surface de type TiO₂-anatase, ce qui lui confère une activité photocatalytique. L'adhésion et la viabilité de la souche de *Listeria monocytogenes* sont affectées par un stress oxydatif créé à la surface du matériau. En perspective, ce matériau pourra être optimisé par modification de la composition anionique (réduction du band-gap) lors des dépôts afin d'être activable sous lumière blanche et ainsi jouer un rôle dans la lutte contre la présence des biofilms.

P20. Déshydratation de levures alimentaires par séchage sur zéolithe : la zéodratation

Pascale Gadonna-Widehem, Cynthia Helou, Myriam Sol, Katia Hessas, Laure Boursaud, Dominique Boutaud, Gadonna Jean-Pierre

Institut Polytechnique Lasalle Beauvais, 19 rue P. Wagué, BP 30313, 60026 Beauvais Cedex Zéodryplus, 42 rue Alfred Cornu, 45000 Orléans

La zéodratation est une méthode de séchage très douce développée pour sécher des produits alimentaires ou destinés à des fins cosmétiques ou médicales. Durant le procédé de zéodratation, le produit est séché sous vide contrôlé, à des températures proches de l'ambiance. Au cours du séchage, l'eau évaporée du produit est adsorbée par la zéolithe qui sera ensuite régénérée par chauffage. Afin de valider ce procédé pour la conservation des microorganismes, l'impact de la zéodratation sur la survie de levures, *Saccharomyces cerevisiae*, a été évalué.

Des levures alimentaires commerciales ont été mises en culture en bouillon Sabouraud, lavées ou non puis séchées par zéodratation (Zeodry+plus) ou par lyophilisation (utilisée ici comme méthode de référence). La population de levures survivantes après séchage a été déterminée après étalement sur milieu Sabouraud. La couleur des levures a été évaluée par colorimétrie (LAB).

Après zéodratation, une perte de moins d'un logCFU/g a été observée après séchage des levures contre une réduction de près de deux logCFU/g après lyophilisation. Les lavages des levures avant séchage ont un impact significatif sur la survie des levures et réduisent notamment le brunissement lié à la réaction de Maillard. D'autre part, le lavage améliore la couleur et permet d'obtenir des levures d'un blanc crémeux, caractéristique macroscopique des levures.

La consommation énergétique de cette méthode étant beaucoup moins élevée et le séchage étant beaucoup plus rapide que la lyophilisation, il est envisageable de produire des microorganismes déshydratés par cette méthode.

P21. Evaluation de l'effet combiné «hautes pressions» et «lactate de potassium» sur le niveau de contamination de produits de volaille en fin de DLC par *Salmonella* et *Listeria monocytogenes*Lerasle M.¹, Fédérighi M.¹, Chéret R.², Antoine V.¹, Simonin H.³, Guillou S.¹, Membré J.-M.¹¹ Lunam Université, Oniris, Nantes; INRA, UMR1014 SECALIM² CTCPA, Nantes³ UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, équipe PBM, Agrosup Dijon; Université de Bourgogne, Dijon

Les produits à base de viande de volaille crue sont des produits périssables qui peuvent être contaminés naturellement ou recontaminés lors de la fabrication. L'objectif de l'étude était de développer un modèle probabiliste pour déterminer le niveau et la prévalence de *L. monocytogenes* et de *Salmonella* dans la viande hachée de volaille crue après un traitement hautes pressions (HP). Le modèle inclut trois étapes : i) fabrication et conditionnement de la viande hachée, ii) traitement HP et iii) stockage dans des conditions réfrigérées jusqu'à la fin de la durée de vie. La contamination initiale des deux pathogènes (étape 1) a été déterminée à partir de données collectées dans différentes usines de fabrication. L'effet du traitement HP et de la concentration en lactate de potassium sur la réduction microbienne (étape 2) a été évalué à partir d'un plan expérimental complet : trois niveaux de pression (200 – 350 – 500 MPa), trois durées de traitements (2, 8 et 14 min) et deux concentrations en lactate de potassium (0 et 1,8%). Les courbes d'inactivation ajustées avec le modèle de Weibull montrent que le taux de réduction dépend du niveau de pression mais pas de la concentration en lactate de potassium. En ce qui concerne le suivi de croissance lors du stockage (3^{ème} étape), d'après la littérature, *Salmonella* ne se développe pas en présence de lactate, sous une atmosphère modifiée et dans des conditions réfrigérées. La croissance de *L. monocytogenes* est déterminée en utilisant un modèle existant et validé dans la volaille (Seefood Spoilage and Safety Predictor software).

Implémenté dans Excel (@risk), le modèle est exécuté en utilisant la simulation de Monte Carlo. La distribution de probabilité des niveaux de contamination est déterminée pour différents scénarios. Pour un scénario moyen : 200 g de viande (1,8% lactate, pH 6,1, aw 0,96), conditionnés sous atmosphère modifiée, traités à 350 MPa pendant 8 min, la prévalence à la fin d'une durée de vie de 20 jours à 6°C est estimée à 4,1% et 7,1% pour *Salmonella* et *L. monocytogenes*, respectivement. Le niveau de contamination à la fin de la durée de vie est faible : le 99^{ème} percentile de la distribution est égal à -2,3 log ufc/g pour *Salmonella* et 0,5 log ufc/g pour *L. monocytogenes*.

Le modèle développé permet de recommander des combinaisons de traitement HP et de concentration en lactate de potassium afin de garantir une concentration microbienne acceptable à la fin de la durée de vie des produits avant cuisson.

P22. Propriétés de surface de lactocoques de laits crus de chèvre*Jard G.¹, Couderc C.¹, Rayme M.¹, Castelain M.², Schmitz P.², Tormo H.¹*¹ El Purpan² LISBP - INSA

Les biofilms dans les installations laitières peuvent être à l'origine de défauts de qualité sanitaire et technologique. Cependant, la microflore d'intérêt du lait cru et plus particulièrement les lactocoques permettant l'acidification du lait en cours de coagulation est aussi capable de s'installer en biofilm (Teixeira et al., 2005; Teh et al., 2012; Mariani et al., 2011). L'installation de lactocoques, dans la machine à traire (MAT) en compétition avec les flores d'altération est une piste à étudier pour combler la perte des capacités acidifiantes des laits crus et pour lutter contre certains pathogènes (Simoes et al., 2010). Une grande diversité de caractéristiques de surface est observée parmi les lactocoques (Giaouris et al., 2009; Ly et al., 2006) suggérant des capacités d'adhésion différentes.

L'objectif de cette étude a été de caractériser les propriétés physico-chimiques de surface de certaines souches de *L. lactis* isolées de laits crus de chèvre (Tormo, 2010). Connaissant ces propriétés, une seconde étape consistera à déterminer le potentiel d'adhésion sur des surfaces abiotiques – proches des matériaux utilisés en traite et d'en sélectionner certaines comme candidates pour former des biofilms positifs dans la MAT.

Trente-sept souches de la collection du laboratoire de l'Ecole d'Ingénieurs de Purpan ont été cultivées sur milieu M17-glucose à 30°C, jusqu'à atteindre la phase stationnaire de croissance. Leur hydrophobicité de surface a été caractérisée par mesure de leur affinité à un solvant polaire (chloroforme) et apolaire (hexadécane) qui ont les mêmes caractéristiques de Lifshitz-van der Waals (méthode MATS, Bellon-Fontaine et al., 1996). Leur charge de surface a été identifiée par mesure de la mobilité électrophorétique (Pelletier et al., 1997) à pH 3, 5 et 7.

Parmi les 37 souches étudiées, une grande diversité d'hydrophobicité de surface est observée. La plupart des souches présente un caractère hydrophile (24 souches) avec moins de 40% d'adhésion à l'hexadécane. La plupart des souches ont des surfaces chargées négativement quel que soit le pH (30 souches). 8 souches étudiées ont des mobilités électrophorétiques proches de zéro indiquant une très faible charge de surface. Le détachement des souches préalablement adhérees sur un support (inox, verre, caoutchouc) en conditions hydrodynamiques contrôlées (chambre à écoulement cisailé, Mercier-Bonin et al., 2011) sera ensuite quantifié.

P23. Evaluation des propriétés prébiotiques de Fructooligosaccharides de fruits : métabolisation par des probiotiques, inhibition d'entéropathogènes et réduction de la prolifération de cellules cancéreuses.

Grimoud J., Gignac-Brassard S., Roques C.

Laboratoire de Génie Chimique, Toulouse, France.

Les fructooligosaccharides (FOS) ont été largement étudiés pour leurs propriétés prébiotiques. Nous présentons ici les résultats de nos travaux concernant l'évaluation des caractéristiques de FOS synthétisés à partir de fructose de fruits déclassés et selon un procédé original. Il en résulte l'obtention de polymères de composition intermédiaire entre les FOS classiquement issus soit de l'hydrolyse de l'inuline ou soit de synthèse enzymatique, ainsi que la présence de sorbitol, marqueur de l'origine fruit.

Des bactéries lactiques probiotiques ont été utilisées pour évaluer la capacité des FOS de fruits à être métabolisés par des bactéries intestinales bénéfiques. Des FOS du commerce, le Raftilose®L95 et l'Actilight®950P (issus d'hydrolyse de l'inuline et de biosynthèse respectivement) ont été utilisés comme produits de référence. Les croissances bactériennes ont été suivies dans un milieu ne contenant que les glucides étudiés comme source de carbone. Les paramètres cinétiques ont montré que les FOS de fruits ont été métabolisés par tous les probiotiques, à des taux équivalents à ceux observés pour l'Actilight®950P tandis que 3 souches seulement ont poussé en présence de Raftilose®L95. Le sorbitol a été utilisé par 80 % des souches. Des analyses HPLC ont été menées pour mesurer la consommation de chaque degré de polymérisation (DP). Globalement, les DP courts (DP2 et DP3) ont été préférentiellement utilisés, bien que les bifidobactéries testées aient été en mesure de métaboliser les DP4.

Les croissances de plusieurs germes pathogènes en présence des différents polymères, ont été évaluées en co-cultures avec des probiotiques. Les microorganismes ont été inoculés aux mêmes concentrations dans un milieu basal sans source de carbone autre que les glucides testés, avant dénombrements sur géloses sélectives. Parmi les pathogènes testés, *Candida albicans* et *Clostridium difficile* ont été significativement inhibés par plusieurs lactobacilles et bifidobactéries, en présence de FOS de fruits et/ou de sorbitol. *Listeria monocytogenes* a été inhibé dans les mêmes conditions, mais dans une moindre mesure. Ces inhibitions ont été significativement plus importantes que celles obtenues lors de l'ajout de Raftilose®L95.

Nous avons enfin mesuré les effets anti-prolifératifs de nos composés sur des cellules épithéliales cancéreuses de la lignée HT-29, à l'aide d'un test XTT. Aucun des glucides utilisés seuls n'ont eu d'effet, ainsi que les probiotiques. A l'opposé, deux probiotiques (*Bifidobacterium breve* et *Lactococcus lactis*) en association avec des FOS de fruits permettent de réduire de façon importante la prolifération des cellules cancéreuses *in vitro*. L'ajout de sorbitol aux FOS a conduit à une légère amélioration de ces effets, avec une valeur d'inhibition approchant les 80 %.

Nous avons donc montré *in vitro* que les FOS de fruits peuvent être métabolisés plus facilement par une flore entérique bénéfique, et pouvaient conduire à l'inhibition plus efficace de *C. albicans* et *C. difficile*, des pathogènes liés fréquemment à des diarrhées associées aux antibiotiques, en comparaison avec les autres types de FOS déjà commercialisés. Par ailleurs, seuls les FOS de fruits, avec ou sans sorbitol, ont permis de réduire très significativement la prolifération des cellules cancéreuses HT-29, en association avec des probiotiques. Nous pouvons donc conclure que les FOS de fruits sont de bons candidats prébiotiques pour améliorer le microbiote intestinal et devraient être soumis ultérieurement à des modèles animaux pour évaluer leurs effets bénéfiques *in vivo*, en particulier pour la prévention du cancer colorectal.

P24. Extraction et identification de microflore d'intérêt en surface de planches d'affinage en bois d'épicéa.Rached ISMAÏL^{ab}, Valérie MICHEL^c, Perrine GAY-PERRET^c, Florence AVIAT^{ab}, Michel FEDERIGHI^{ab}^a LUNAM Université, Oniris, Secalim, route de Gachet, CS 40706, 44307 Nantes cedex 03^b INRA, UMR1014 SECALIM, Nantes, F-44307, France^c ACTALIA, 419 route des champs laitiers, CS50030, 74801 La Roche sur Foron**Objectifs**

L'épicéa est un bois traditionnellement utilisé pour l'affinage des fromages sous forme de planche, et autorisé au contact alimentaire direct [1, 2]. En situation d'affinage, les écosystèmes microbiens présents sur les planches d'épicéa peuvent avoir un effet inhibiteur vis-à-vis de *L. monocytogenes*. [3]. Le but de cette étude était d'extraire une microflore à partir de la surface des planches d'affinage et de la quantifier afin d'évaluer leur niveau de contamination à différentes étapes de leur procédé de fabrication et d'utilisation.

Matériel et méthodes

Deux fabricants-scieurs et trois fromagers-affineurs ont été sollicités pour cette étude. Les analyses ont été effectuées sur des planches d'affinage en bois d'épicéa en sortie de fabrication, en stockage avant utilisation et également dans les conditions de première-utilisation Six planches par stade et par entreprise et trois échantillons par planche ont été analysés. La méthode d'extraction des microorganismes par rabotage a été utilisée pour cette étude. Plusieurs microorganismes pathogènes ou potentiellement pathogènes, présentant un risque en santé humaine, ont été recherchés.

Résultats principaux

Les résultats obtenus ont permis de dénombrer une flore totale peu abondante comprise entre 0,6 UFC/cm² et 1,1×10² UFC/cm² avec une moyenne de 1,4×10¹ UFC/cm² ± 0.5log (UFC/cm²). L'absence de *L. monocytogenes*, d'*E. coli*, de *S. aureus* potentiellement producteurs d'entéro-toxines et de salmonelles a été confirmée pour les 36 planches testées. Seul un échantillon sur 108 a permis de révéler la présence présomptive de *B. cereus*.

Conclusions

L'absence des principaux microorganismes pouvant constituer un danger dans certains produits laitiers, ainsi que la faible concentration en flore totale semble confirmer que l'utilisation des planches d'affinage en bois ne conduit pas à un danger de contamination des fromages par des bactéries pathogènes ou potentiellement pathogènes. L'innocuité microbiologique du bois vis-à-vis des aliments en contact direct pourrait être confirmée sur un panel plus large de planches et par l'analyse d'autres emballages ou surfaces en bois telles que, par exemple, les caquettes de fruits et les légumes en peuplier.

Mots-clés : bois, planches d'affinage, microflore, méthode d'extraction

1. Aviat, F., *et al.*, Le bois comme matériau au contact des denrées alimentaires : point réglementaire. LA REVUE DE L'OBSERVATOIRE DES IAA DE BRETAGNE 2013(103): p. 12-15.
2. Anonymes, Arrêté du 7 novembre 2012 relatif aux règles sanitaires applicables aux produits laitiers présentant des caractéristiques traditionnelles. Journal officiel du 10 novembre 2012.
3. Mariani, C., *et al.*, Inhibition of *Listeria monocytogenes* by resident biofilms present on wooden shelves used for cheese ripening. Food Control, 2011. 22(8): p. 1357-1362.

P25. Discrimination de lactocoques et d'entérocoques d'intérêt fromager par spectroscopie infrarouge

Cécile Levasseur

Ecole d'Ingénieurs de Purpan

Objectifs : Cette étude a deux objectifs : 1) mise au point d'un protocole de collecte spectrale rapide sur boîte de culture, 2) discrimination de souches de lactocoques pure et d'entérocoques grâce à leurs spectres d'absorption.

Sujets / Matériel et méthodes :

Dans le lait de chèvre, le groupe dominant de micro-organismes est constitué de bactéries lactiques avec principalement des lactocoques et des entérocoques.

Afin d'identifier et classer les bactéries, il existe de nombreuses méthodes traditionnelles reposant sur la mise en culture et sur des techniques phénotypiques et génotypiques qui sont, certes, discriminantes, mais laborieuses. Un outil de discrimination rapide et sélectif pourrait être la spectroscopie infrarouge. En effet, elle est régulièrement utilisée dans l'industrie agro-alimentaire du fait de son faible coût et de sa rapidité. La spectroscopie infrarouge repose sur la mesure de l'absorbance d'énergie d'un produit éclairé par de la lumière aux longueurs d'ondes comprises entre 800 et 25000 nm. L'énergie est absorbée par les liaisons organiques qui passent d'un état fondamental à un état excité. Chaque type de liaison absorbe l'énergie à certaines longueurs d'ondes spécifiques et donne une signature spectrale particulière.

Les études menées avec la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier sont prometteuses, mais demandent une préparation importante de l'échantillon avant de collecter le spectre. Le travail a eu comme premier objectif de réussir à mettre au point un protocole de collecte spectrale simplifié, puis de différencier grâce aux spectres d'absorptions les souches de lactocoques pures et les souches d'entérocoques pures.

Pour cela, un spectromètre proche infrarouge Getspec a été utilisé. Une sonde déportée positionnée à 0,5 cm au-dessus de la boîte de mise en culture sur MRS a permis de collecter des spectres entre 908 et 1684 nm avec un pas de 1 nm. 105 souches de bactéries lactiques ont été mises en culture, parmi lesquelles 48 entérocoques et 57 lactocoques.

Résultats principaux : La répétabilité spectrale est validée. Après traitement mathématique, une analyse linéaire discriminante a permis de bien séparer les entérocoques des lactocoques avec un taux de réussite de 93%.

Conclusions : La discrimination rapide des bactéries lactiques entérocoques et lactocoques par spectroscopie proche infrarouge sur boîtes de culture présente d'excellentes performances. L'étude doit se poursuivre pour enrichir la base de données.

P26. Caractérisation du pathogène alimentaire *Campylobacter jejuni* Bf face à l'oxygène

RODRIGUES RAMILA C., HADDAD NABILA, TRESSE ODILE, CAPPELIER JEAN-MICHEL

UMR – INRA SECALIM 1014

Campylobacter jejuni est une bactérie microaérophile capable de survivre dans des environnements aérobies, suggérant que cette souche utilise une variété de mécanismes de protection pour résister au stress oxydant. *C. jejuni* est aujourd'hui reconnue comme une cause majeure d'entérite, la campylobactériose représentant la première zoonose alimentaire dans le monde. Malgré ce statut, les mécanismes pathogéniques utilisés par *C. jejuni* ne sont pas pleinement compris, principalement en raison de la diversité phénotypique des isolats bactériens. La souche *C. jejuni* Bf a été isolée en France chez un patient atteint d'une campylobactériose sévère en 1994. Cette souche se caractérise par une résistance accrue à l'oxygène. L'objectif de ce travail, consiste en l'étude du comportement de *C. jejuni* Bf face au stress oxydant ainsi qu'en la détermination des mécanismes moléculaires mis en place pour se multiplier dans des conditions enrichies en oxygène. Des méthodes de culture bactériologiques ont été utilisées pour étudier sa croissance dans des conditions aérobies et microaérobies. La survie dans des conditions de stress oxydant a été évaluée en utilisant différentes concentrations en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et paraquat. Le protéome de cette souche a été comparé en aérobiose et en microaérobiose par électrophorèse bidimensionnelle afin d'identifier les acteurs de cette résistance au stress oxydant. Les résultats obtenus montrent que contrairement à la souche de référence *C. jejuni* NCTC 11168, *C. jejuni* Bf est capable de résister et de se multiplier en présence d'oxygène atmosphérique. Après une préculture en aérobiose, la souche Bf exposée à de l' H_2O_2 (1mM) présente un taux de survie bien supérieur à la souche de référence (taux de survie de 91.2% pour la souche Bf contre 39.1% pour la souche de référence). De plus, des concentrations en paraquat supérieures à 1 mM sont létales pour la souche de référence mais pas pour *C. jejuni* Bf. L'étude du profil des protéines cytosolubles chez cette souche montre des variations en fonction des conditions de croissance (aérobiose Vs microaérobiose). Ces premiers résultats montrent que *C. jejuni* Bf semble plus adaptée à la survie dans des conditions environnementales hostiles. Cette étude a permis la caractérisation de la première souche de *Campylobacter* spp. résistante à l'oxygène, fournissant des informations permettant d'approfondir les connaissances sur le processus de détoxication de l'oxygène chez *Campylobacter* spp. et sur sa diversité phénotypique.

P27. Dynamique et diversité des bactéries lactiques et des levures dans les levains de panification biologiques français

Emilie Lhomme¹, Charlotte Urien², Xavier Dousset^{1, 4}, Delphine Sicard^{3, 5} et Bernard Onno¹

¹ Oniris, Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle, rue de la Géraudière, Nantes Cedex 3, France.

² INRA, UMR 0320 / UMR 8120 Génétique Végétale, F-91190 Gif-sur-Yvette, France

³ Univ Paris-Sud, UMR0320/UMR 8120 Génétique Végétale, F-91190 Gif-sur-Yvette, France

⁴ UMR INRA 1014 Secalim, rue de la Géraudière, BP 88225 Nantes Cédex 3, France.

⁵ INRA, UMR 1083 Sciences pour l'œnologie, 34060 Montpellier cedex 02, France

La fermentation au levain est une biotechnologie alimentaire ancienne qui conserve une image attractive pour la filière BVP (Boulangerie, Viennoiserie, Panification). L'image de naturalité associée au levain, ses fonctionnalités impactant la flaveur, la texture, ou encore la conservation, accroissent l'intérêt du secteur envers ce processus fermentaire. La co-culture levures – bactéries lactiques (BL) constitue une des clés de l'activité du levain et représente un véritable réservoir d'étude de la biodiversité inter et intra-spécifique. De même, les pratiques boulangères influencent la qualité ou les caractéristiques du levain, mais restent peu étudiées.

L'objectif de cette recherche a été d'étudier la diversité microbienne de 14 levains biologiques échantillonnés dans différentes régions françaises auprès d'artisans-boulangers et de PME. Après numération des BL et des levures, la microflore de chaque échantillon a été identifiée par séquençage de l'ADNr 16S et 18S, respectivement.

Le ratio BL : levures est compris entre 10 et 10 000. L'identification des BL du levain tout point chez les 14 boulangers montre la prédominance de *L. sanfranciscensis*. On retrouve également *L. curvatus*, *L. plantarum* et *L. hammesii* caractéristiques du levain ainsi que *L. sakei*, *L. pentosus*, et *L. kimchii* moins fréquemment isolées dans cet écosystème. Concernant les levures, aucune n'est prédominante chez tous les boulangers. En effet, 6 espèces différentes de levures sont retrouvées comme étant majoritaire dans les différents levains étudiés. Cependant *Candida humilis* est la levure la plus fréquemment isolée et est identifiée chez 5 boulangers. De plus, *Kazachstania bulderi* a été isolée pour la première fois dans l'écosystème levain.

L'étude de la biodiversité microbienne des levains de panification français sera approfondie par une analyse en pyroséquençage 454 afin d'obtenir une image plus complète et précise des BL et des levures présentes dans cet écosystème.

P28. Détection multiplexe de *Salmonella* et *Cronobacter* dans la poudre de lait en imagerie par résonance des plasmons de surface (SPRi)

Alexandra Morlay^a, Felix Piat^a, ThibautMercey^a, Thierry Livache^b, YoannRoupioz^b,

Les méthodes actuelles de détection des bactéries dans l'agroalimentaire sont longues et nécessitent de nombreuses opérations. L'imagerie par résonance des plasmons de surface permet de réduire le nombre d'opération et d'identifier en une seule analyse la présence de plusieurs pathogènes. Cette étude développe un procédé de détection multiplexe de *Salmonella* et *Cronobacter* dans la poudre de lait, en utilisant un kit à SPRi jetable fabriqué par la société Prestodiag. Des échantillons de 30g de poudre de lait ont été artificiellement contaminés avec des souches de *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Enteritidis* et *Cronobacter sakazakii*, puis dilués dans 270mL d'eau peptonée tamponnée. Après un enrichissement de 16h à 37°C un aliquot à été prélevé et injecté dans un kit SPRi Prestodiag contenant des anticorps anti-*Salmonella* et anti-*Cronobacter*. La croissance des différents pathogènes est ensuite suivie en temps-réel par résonance des plasmons de surface pendant 8 heures.

Le procédé développé permet la détection des principaux sérogroupes de *Salmonella* et de *Cronobacter* dans un échantillon de 30g de poudre de lait en moins de 24h. Ce procédé permet en outre un protocole simple et économique, avec un minimum de manipulations et un seul test utilisé pour réaliser les deux analyses simultanément. Des essais associant l'enrichissement à la lecture sont en cours afin d'obtenir un résultat en moins de 12h.

P29. Highly sensitive label-free detection of bacterial pathogens in food and blood samples

V. Templier¹, D. Pulido¹, F. Piat², T. Mercey², S. Slimani¹, Y. Roupioz¹ and T. Livache¹

¹Groupe Chimie de la Reconnaissance et Etude d'Assemblages Biologiques. SPrAM, UMR CEA / CNRS / Grenoble 1, INAC, 38054, Grenoble, France

²Prestodiag, Villejuif Bio Park, 1 mail du Professeur Georges Mathé, 94800 Villejuif France

Standard microbiological analysis of blood samples lasts 24 to 72 hours. Due to this long analysis time, classical preventive antibiotic treatments are administered to limit bacterial development in the organism. Eventually, and on a larger scale, these non-specific treatments favour the emergence of multi drug-resistant bacterial strains. One way to limit this side effect would be to shorten the analysis time required for bacterial identification, thereby enabling appropriate treatment. Such advantages should also benefit Food safety assays by significantly decreasing the storage times before commercialization.

Recently, we proposed an SPR-based analysis of antibody micro-arrays for the fast and label-free characterization of bacterial pathogens in various conditions (Bouguelia *et al.*, *Lab on Chip*, **2013**, *13*, 4024-4032). This original approach enabled the significant decrease in processing time for bacterial pathogen detection to only a few hours.

Today, we wish to report on the development of antibody microarrays dedicated to several bacterial strains, present either in food or blood sample. Our approach has been found suitable for the detection of a few bacteria (*Salmonella enteritidis*) per milliliter of blood. To that end, blood samples are diluted according to standard protocols and loaded onto the microarray before incubation. Surface Plasmon Resonance imaging of the biochip is then led to monitor the bacteria capture on the microarrayed features and their multiplication on the biochip. This approach has also been successfully validated for the identification and distinction of both Methicillin-sensitive and Methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. A later challenge to be addressed is the simultaneous characterization of bacterial strains and their secreted toxins using this label-free optical readout of biochips.

P30. Les mycoplasmes génitaux : épidémiologie et sensibilité aux antibiotiques dans la région de Nouakchott.

Ould Salem ML, Ould Maouloud MM, Ghaber SM

Service des laboratoires

Chn de Nouakchott, Mauritanie

OBJECTIF

Cette étude a pour objectif d'étudier la fréquence de mycoplasmes génitaux « *M. genitalium* excepté » ainsi que leurs sensibilités aux antibiotiques dans les prélèvements vaginaux (PV) chez des femmes non enceintes, dans les prélèvements urétraux (PU) et dans les spermocultures.

MATERIEL ET METHODES

Notre étude a été réalisée aux laboratoires d'analyses médicales MAURILAB et MEDILAB sur 246 PV, 124 PU et 111 spermocultures colligés durant l'année 2011.

La recherche de mycoplasmes et la détection de leurs sensibilités aux antibiotiques ont été réalisées par le kit A.F GENITAL SYSTEM «LIOFILCHEM® S.r.l.» pour les PV et par le MYCOFAST® Evolution 2 (ELITech MICROBIO) pour les PU et les spermocultures. Ces kits permettent ainsi la numération, l'identification et la détection de la résistance aux antibiotiques des mycoplasmes. L'interprétation de positivité a été faite selon les recommandations des fabricants.

RESULTATS

Le taux de positivité des PV était de 11,38% de (*M. hominis*). Le taux de positivité des PU (*U. urealyticum*) était de 11,29% et celui des spermoculture (*U. urealyticum*) était de l'ordre de 24,32%.

Le pourcentage de résistance dans les PV est importante atteignant ainsi 82% pour la josamycine, 50 % pour tétracycline 42% pour pefloxacin et clindamycine, 71% pour clarithromycine. la résistance dans les PU et les spermocultures sont moins importantes, les taux de résistance sont respectivement, pour l'ofloxacine : 14,28% et 3,70%, pour roxithromycine 7,14% et 11,11%, pour doxycycline : 7,14% et 7,40%, pour l'érythromycine : 00% et 7,4%.

DISCUSSION

La prévalence des mycoplasmes dans les prélèvements génitaux est importante dans notre série particulièrement dans les spermocultures atteignant ainsi 24,32%.

Le taux de résistance aux antibiotiques le plus important concerne les souches de *M. hominis* isolées des prélèvements vaginaux. Ce taux dépasse largement celui décrit dans certaines publications et touche les trois familles d'antibiotiques actives sur ces germes.

CONCLUSION

La fréquence des mycoplasmes dans les prélèvements génitaux, ainsi que leur résistance importante aux antibiotiques, constituent un motif de recherche aussi bien dans les infections génitales que dans le cadre du bilan d'infertilité dans notre pays.

P31. *Arcobacter butzleri* : une bactérie pathogène méconnue des cliniciens

Bovet J., Ramanantsoa C., Beaudron A., Penn P.

Laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier du Mans

Arcobacter Butzleri fait partie de la famille des Campylobacteriaceae et représente la seule espèce du genre isolée chez l'homme. Retrouvée dans les selles d'animaux avec entérites, sa transmission est très certainement alimentaire. Très peu identifiée dans les coprocultures, son identification du genre ou de l'espèce est difficile. L'apparition dans nos laboratoires de bactériologie de routine de la spectrométrie de masse, nous permet actuellement de la retrouver beaucoup plus facilement.

Nous présentons le cas d'une patiente de 66 ans, présentant des diarrhées aiguës et importantes (15 selles /jour) avec un syndrome rectal très invalidant à type de ténésmes et faux besoins. La patiente est apyrétique et n'a pas de prise d'antibiotiques récente. Après un traitement symptomatique pendant 3 jours sans amélioration, elle est hospitalisée et bénéficie d'un lavement dans l'hypothèse de fausses diarrhées sur constipation. Un traitement par Amoxicilline et Acide Clavulanique est débuté sans preuve bactériologique. Il n'est pas mis en évidence de colite pseudo-membraneuse à la rectosigmoidoscopie courte. La coproculture de la patiente est alors positive à *Arcobacter butzleri* pour lequel un traitement par ciprofloxacine est instauré pendant 10 jours. L'évolution favorable permet à la patiente de sortir de l'hôpital. La souche isolée est résistante à l'amoxicilline et aux macrolides, sensible à la ciprofloxacine.

Arcobacter est retrouvé majoritairement dans les selles et rarement dans les hémocultures et le liquide péritonéal. Il s'agit de bacilles Gram négatif incurvés en virgules mobiles. Ce germe aéro-tolérant se développe en microaérobie à 37°, 15° et 25°C sur milieux enrichis et sélectifs comme les milieux Butzler® et Campysel®. Les colonies sont fines, circulaires et transparentes. L'oxydase et la catalase sont positives. Son identification est réalisée avec la galerie API Campy® et plus facilement par la spectrométrie de masse permettant une identification précise du genre et parfois de l'espèce. Le principal diagnostic différentiel est *Campylobacter coli* mais présente une résistance plus importante aux antibiotiques. Il est donc essentiel de l'identifier et de réaliser un antibiogramme.

Compte tenu de son pouvoir pathogène entérique, l'identification de *Arcobacter Butzleri* est essentiel pour les cliniciens, d'autant plus que son traitement est simple et efficace.

P32.Épidémiologie moléculaire de CTX-M produit par *Klebsiella pneumoniae* isolées à l'Hôpital Universitaire d'Oran, en Algérie.

Zemmour A.¹, Rahmani B.¹, Humaun K.², Dali Y.³, Benhamouche N.¹, Gisk C.²

¹Université des Sciences et de la technologie d'Oran-Algérie

²Service de microbiologie, Hôpital Universitaire de Karolinska, Solna, Stockholm, Suède

³Etablissement Hospitalier Universitaire d'Oran- Algérie

Introduction : *Klebsiella pneumoniae* est une bactérie à bacille gram négatif et un pathogène opportuniste qui est une cause importante d'infections nosocomiales. La prévalence des entérobactéries productrices de bêta-lactame à spectre étendu (BLSE) a rapidement augmenté au cours de la dernière décennie, *Klebsiella pneumoniae* en fait partie.

Objectif : Le but de l'étude était de faire l'épidémiologie moléculaire et la caractérisation de souches clinique de *K. pneumoniae* productrices de BLSE, isolées à l'Etablissement Hospitalier Universitaire d'Oran, en Algérie.

Matériels et méthodes : En 2012, 180 souches cliniques de *K. pneumoniae* ont été isolées des différents services de l'hôpital, dont 120 souches (67%) étaient productrices de BLSE. 88 souches étaient prises au hasard, ont fait l'objet de la présente étude. Ces souches ont été isolées à partir de différents types de prélèvements, 24 échantillons d'urine, 23 les sécrétions de la plaie (pus), 13 échantillons de sang, 11 échantillons de prélèvement distal protégé, 7 échantillons de liquide céphalo-rachidien, 6 cathéters centraux, un prélèvement vaginal, un prélèvement intra-péritonéale et une sécrétion trachéale. L'identification des espèces a été réalisée par l'API 20 E (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France), la production de BLSE a été confirmée par test de synergie selon le Clinical Laboratory Standards Institute 2013 (CLSI 2013) et VITEK 2 Compact (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France).

SYBR Green PCR a été réalisée pour la détection des génotypes suivants CTX-M-groupe 1, CTX-M-groupe 2 et CTX-M-groupe 9. Pour couvrir les autres génotypes potentiels CTX-M, un couple d'amorces de CTX-M universelles a également été utilisé.

Résultats et discussions : Les analyses moléculaires ont montré que 82/88 souches (93%) étaient positives avec des amorces du CTX-M-groupe 1, 3/88 souches ont été positives pour CTX-M avec des amorces universelles, mais pas pour les deux CTX-M- groupe 1, CTX-M- groupe 2 et CTX-M- groupe 9, 3/88 souches ont été négatives avec CTX-M amorces universelles. On pourrait en conclure que les souches productrices de BLSE de *K. pneumoniae* ont été de plus en plus reconnues dans le milieu hospitalier à Oran, en Algérie et sont associées à un phénotype multi-résistant.

Mots-clés : *Klebsiella pneumoniae*, nosocomiales, bêta-lactamases à spectre étendu, épidémiologie, SYBR Geen PCR, Algérie.

P33. Etiologie des infections bactériennes chez les patients immunodéprimés

Zarif A.¹, Adebous A.², Idalene M.¹, Chinbo M.², Tassi N.¹, Sora N.²

¹Service des maladies infectieuses; CHU Mohammed VI Marrakech Maroc

²Unité de bactériologie; hôpital mère et enfant; CHU Mohammed VI Marrakech

Introduction :

L'immunodépression constitue le lit pour différents types d'infections quelles soient bactériennes, virales, ou fongiques. Le but de ce travail est de faire un état des lieux sur le profil bactériologique et la sensibilité aux antibiotiques des germes incriminés dans les infections sur terrain d'immunodépression.

Matériel et méthodes :

Il s'agit d'une étude descriptive réalisée depuis Janvier 2010 à Octobre 2013 à partir des registres de l'unité de bactériologie de l'hôpital Mère Enfant. Incluant tous les prélèvements bactériologiques, tous sites confondus effectués chez les patients immunodéprimés suivis au service des maladies infectieuses du CHU Mohammed VI Marrakech.

Résultats :

Un total de 80 germes à été isolé des prélèvements reçus représentant un taux de positivité de 14%. Les bactériémies ont représenté 41 % des infections retrouvées suivies par les infections urinaires dans 39% des cas. Les Cocci à gram positif ont dominé le profil épidémiologique dans 53% des cas. Les espèces bactériennes les plus fréquentes étaient respectivement le *Staphylococcus à coagulase négative* (20%) suivie par *Escherichia coli* (14%) et les BGN non fermentaires (14%). Les bactéries multi résistantes ont représenté 0,05% de l'ensemble des isolats.

Conclusion :

Dans ce travail, le profil étiologique des infections bactériennes chez les immunodéprimés hospitalisés au service des maladies infectieuses est dominé par les cocci à Gram positif et *Escherichia coli* suivie par les bacilles à Gram négatif non fermentaires de l'environnement avec une prévalence très faible des bactéries multi résistantes .

P34. Évaluation de la contamination microbiologique des endoscopes digestif. CHU de Tlemcen.

Hassaine H., Mostéfa Kara A., Bellifa S., M'Hammedi I., Kara Terki I., Lachachi M., Didi W.

University of Tlemcen

Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire au Biomédical et à l'Environnement .Tlemcen – Algérie

Résumé :

Les endoscopes sont des dispositifs médicaux qui ne peuvent faire l'objet de mesures de stérilisation en raison de leurs caractères complexes et notamment de la sensibilité à la chaleur de certains de leurs constituants. La complexité de leur structure rend possible une accumulation de souillures organiques ou minérales qui peuvent elles-mêmes renfermer des agents infectieux. Une fréquence ou une qualité insuffisante de la procédure de désinfection peut aboutir à la formation d'un biofilm.

L'objectif de notre travail est de faire une évaluation de la contamination microbiologique des endoscopes après désinfection dans une unité d'endoscopie du service d'hépatocastro-entérologie du CHU de Tlemcen, Algérie.

Les prélèvements ont concerné les 2 seuls endoscopes fonctionnels du service. Ils ont été réalisés en deux phases : l'injection d'une solution de décrochage dans les canaux de l'endoscope, et l'écouvillonnage de l'embout distal.

Une quantité de 100 mL d'eau utilisée pour le rinçage des endoscopes a été filtrée sur une membrane de nitrocellulose de 0.22µ, et déposée sur gélose PCA. De la même manière, la solution de désinfection au glutaraldehyde a été analysée.

L'incubation a été réalisée à 37° C pendant 24 h jusqu'à 72 h. Les résultats sont exprimés en UFC/100mL. Nous avons étalé les écouvillons prélevés sur des milieux de culture sélectifs, Les boîtes ont été incubées à 37° C pendant 24 h jusqu'à 72 h.

Les différentes colonies ont été isolées, purifiées et identifiées par les tests biochimiques classiques et confirmées par le système API

Les résultats obtenus ont montré une contamination résiduelle de la flore mésophile aérobie totale (FMAT) dépassant le plus souvent l'ordre de 3,6.10⁴ UFC/endoscope. Nous avons identifié plus de 46 micro-organismes dits à risque nosocomiale. Les *Staphylococcus* sp., les *Escherichia* sp. et *Serratia marcescens* sont les bactéries les plus fréquemment rencontrées dans nos prélèvements, suivies des *Pseudomonas* et des klebsielles.

Toutes ces bactéries avaient une très grande capacité à former un biofilm. Egalement nos résultats révèlent l'inefficacité du désinfectant utilisé (glutaraldehyde) vis-à-vis de l'élimination des biofilms.

Le respect des principes de bases de l'hygiène hospitalière et l'application de procédures de nettoyage et de désinfection rigoureuses sont des éléments majeurs dans la prévention et la lutte contre les infections nosocomiales.

Mots clés : Contamination – Désinfection – Endoscopes digestifs

P35. Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées des dispositifs médicaux au niveau de CHU Tlemcen (Algérie)

*Bellifa S.*¹, *Hassaine H.*¹, *Balestrino D.*², *Charbonnel N.*², *Mhamedi I.*¹, *Kara Terki I.*¹, *Lachachi M.*¹, *Didi W.*¹, *Forestier C.*²

¹ Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire au biomédical et à l'environnement (LAMAABE), Université de Tlemcen, Algérie.

² Clermont Université, UMR CNRS 6023 Laboratoire Microorganismes : Génome Environnement (LMGE) Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France

Résumé :

Klebsiella pneumoniae est l'une des causes majeures des infections communautaires et nosocomiales. Ce germe est responsable des infections aiguës et chroniques dont la plupart sont dues à sa capacité à adhérer sur les implants médicaux et à former un biofilm. Le développement de biofilm est un processus dynamique à plusieurs étapes, de l'adhésion initiale des bactéries au support à la maturation des agrégats.

L'objectif de ce travail est d'étudier l'interaction entre des souches cliniques de *K. pneumoniae* et des surfaces abiotiques (dispositifs médicaux) et quelques facteurs influençant la formation du biofilm.

Dans cette étude sur une période de deux ans, 115 souches de *K. pneumoniae* ont été isolées des dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. La plupart des souches isolées présentent un haut niveau de résistance vis-à-vis les céphalosporines de 1^{re}, 2^e et 3^e génération. La capacité de ces souches à former un biofilm a été évalué par 3 techniques : TCP, TP, RCA. Sur l'ensemble des souches les *Klebsiella pneumoniae* isolées des sondes urinaires sont des très bonnes formatrices du biofilm. Dans une seconde partie 24 souches ont été sélectionnées sur lesquelles on a étudié l'hydrophobicité, l'effet des trois agents antimicrobiens sur la forme planctonique et la forme biofilm. Une nette différence de sensibilité aux antibiotiques entre les populations planctoniques et populations de biofilm de *K. pneumoniae*. Toutes les souches avaient un caractère hydrophile. La formation des biofilms a ainsi été reconstituée dans deux systèmes expérimentaux. Le premier est un système en microplaques de polyvinyl-chlorure (PVC) ; le second, un système de microfermenteur en flux continu. L'adhésion des souches aux substrats hydrophobes PVC est 2 à 10 fois plus importante que le verre.

L'amplification par PCR a révélé la présence du gène MrkD dans 22 souches. Les souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées des dispositifs médicaux sont des très bonnes formatrices de biofilm ce qui augmente sa pathogénicité.

Mots clés : Biofilm, *Klebsiella pneumoniae*, dispositifs médicaux.

P36. Antifungal effect of *salsola vermiculata* and *Asphodelus tenuifolius* on mycotoxigenic fungi

Moghtet S.^{1,2,3}, Moussaoui A.¹, Boumediene M.⁴, Nahal boudierba N.¹, Kadi H.¹.

¹ Laboratoire de ressources végétales et sécurité alimentaire des zones semi-arides du Sud- Ouest of Algérie – Bechar univ - Bechar (08000).

² Laboratoire d'analyse des grands moulins du Dahra – Mostaganem (27000).

³ Département des sciences de la terre et l'univers- C. Univ. Tindouf (37000).

⁴ Département

Abstract:

Toxigenic fungi are natural contaminaters for cereals; they produce mycotoxins which are dangerous for human and animal health.

A phytochemical and biological study of *Salsola vermiculata* and *Asphodelus tenuifolius* has been undertaken within the framework of research on medicinal plants. The study entailed evaluating the antifungal and antimycotoxigenical activities of many chemical constituents extracted from leaves of soft wheat following solvent (petrol ether, chloroform, ethyl acetate and methanol) extraction. The extracts were tested on several mycotoxigenic fungi (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *P. expansum*, *F. oxysporum* and *Alternaria* sp.).

Isolated from the soft wheat used in this study was marketed in the North and the southern Ouest of Algeria. Inhibitory activity of the extracted biochemicals was evaluated on mycotoxigenic fungi according to two methods, using in agar medium and Y.E.S medium. Results of antimycotoxigenical assay indicated that all the tested fungi were negatively affected both using the agar medium and the Y.E.S medium. However, antifungal activity of extracts varied according to particular fungal species tested. Results also showed that the crude extract had an effect on fungal development and subsequent mycotoxin production in wheat grains. The extent of inhibition of fungal growth and mycotoxin production was dependent on concentration of extract of plant used.

Efficacy of these extracted mycotoxins in relation to other varieties of wheat and other cereals.

Keywords: Mycotoxin, Fungi, *Asphodelus tenuifolius*, *salsola vermiculata*, medicinal, antifungal effect.

P37. Emergence d'infections nosocomiales à *Enterococcus faecium* résistant aux glycopeptides à L'ouest Algérien.

*Yamouni F.*¹, *Rahal K.*², *Naim M.*¹, *Loazizi A.*³, *Loail M. A.*³, *Taalimaamar H.*², *Benmahdi L.*³

¹Laboratoire de microbiologie, hôpital central de l'armée, Alger, Algérie

²Laboratoire de bactériologie médicale et d'antibiothérapie, institut Pasteur d'Alger, Algérie

³Laboratoire de biologie clinique, hôpital militaire universitaire d'Oran, Alger, Algérie

Objectifs :

Les entérocoques sont des hôtes naturels du tube digestif de l'homme et des animaux, ces bactéries sont responsables de nombreuses infections nosocomiales posant de réels problèmes de santé publiques aggravés ces dernières années par l'émergence de souches d'entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG)

L'ERG est endémique aux USA et dans quelques pays européens. Nous rappelons qu'en Algérie le premier *Enterococcus faecalis* résistant à la vancomycine a été décrit en 2007 et le premier *Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine a été décrit en 2011.

Notre objectif est de décrire deux cas d'infections nosocomiales à *Enterococcus faecium* résistant aux glycopeptides apparues à l'ouest algérien.

Observations :

La première souche d'*Enterococcus faecium* résistante à haut niveau aux glycopeptides (EFRG) est isolée dans le pus d'une péritonite post opératoire d'un patient âgé de 43ans hospitalisé au niveau du service de chirurgie générale d'un CHU à l'ouest Algérien.

La deuxième souche d'EFRG est isolée dans le pus d'une plaie opératoire d'une patiente âgée de 55 ans hospitalisée au niveau du service d'orthopédie du même CHU.

Quelques jours plus tard, un écouvillonnage rectal et un deuxième prélèvement de pus ont été réalisés chez les deux patients. La même souche d'ERG a été retrouvée dans les prélèvements de pus mais pas dans les écouvillonnages rectaux.

La culture des deux souches d'ERG a été obtenue en 24 heures, l'identification biochimique a été faite par des galeries biochimiques commercialisées (Api strepto Biomérieux®).

L'antibiogramme a été réalisé par la méthode de diffusion selon les recommandations du CLSI et du CA-SFM sur Muller Hinton, il montre que les deux souches d'EFRG sont aussi résistantes à l'ampicilline 10 µg, gentamicine 120 µg, kanamycine 1000µg, streptomycine 300µg, érythromycine 15µg, levofloxacine 5µg, tétracycline 30µg, pristinaamycine 15µg, rifampicine 30µg, et furanes 300µg.

Les valeurs des CMI par E-test pour les deux souches étaient élevées pour la vancomycine (256 µg/ml) et intermédiaires pour la teicoplanine (32 µg/ml).

La recherche des gènes de résistance aux glycopeptides a été effectuée par PCR à l'aide d'amorces spécifiques, elle a permis de mettre en évidence le gène van A chez les deux souches.

Conclusion :

Devant l'émergence en Algérie d'infections nosocomiales à *E faecium* résistantes aux glycopeptides, les laboratoires devraient bien les rechercher et les comités de lutte contre les infections nosocomiales devraient les inclure dans leur protocole de surveillance des bactéries multirésistantes.

P38. Identification phénotypique et moléculaire des bactéries du genre *Enterococcus*, d'origine hospitalière, responsable d'infection urinaire

Belguidoum B., Khenchouche A.

Laboratoire de valorisation des ressources biologiques naturelles, Département de Microbiologie, Fac SNV, Université FARHAT ABASS Sétif, Algérie.

Au niveau des centres hospitaliers, plusieurs germes sont à l'origine de l'infection urinaire. Parmi ces germes, on trouve certaines souches du genre *Enterococcus* qui représentent la deuxième cause des infections nosocomiales (10-12%). En effet, ce genre est caractérisé par sa multi résistance aux antibiotiques.

Dans ce travail nous sommes proposés de déterminer la prévalence d'*Enterococcus*, sa multi résistance aux divers antibiotiques utilisés selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie, et sa diversité spécifique au niveau de l'infection urinaire.

L'échantillonnage réalisé à l'hôpital d'Ain Azel willaya de Sétif nous a permis de recueillir des prélèvements d'urine provenant de 643 sujets. Parmi les isolats obtenus, 21 cas se sont révélés positifs en *Enterococcus*, qui seraient responsables d'infection urinaire.

L'identification phénotypique, a montré que l'espèce *Enterococcus faecalis* représente 80 à 90% des souches d'*Enterococcus* isolées en clinique, tandis qu'*Enterococcus faecium* n'en représente que 5 à 10%. Les autres espèces d'*Enterococcus* ne sont qu'occasionnellement rencontrées.

L'antibiogramme réalisé sur ces isolats d'*Enterococcus*, a consisté en l'utilisation de 10 antibiotiques déférents. Ce test a montré que parmi ces 21 isolats d'*Enterococcus*, 19 se sont révélés résistants à au moins deux antibiotiques mis à l'épreuve.

Etant donné le faible pouvoir de discrimination du système API, une identification plus précise utilisant les méthodes de génétique moléculaire en l'occurrence la (GTG)5-PCR s'impose.

Mots clés : *Enterococcus*, Infection urinaire, API 20 Strep, Antibiotypage, (GTG)5-PCR.

P39. Identification et caractérisation des bactéries lactiques isolées à partir du lait de chamelle au Maroc

Kadri Z.^{1,3}, Ouadghiri M.¹, Elfahime M.², Mellou M.², Swings J.⁴, El Farricha O.³, and Amar M.¹

¹Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire, Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique. LMBM / CNRST – Angle av. Allal El Fassi, av. des FAR, Quartier Hay Ryad, BP. 8027 Nations Unies, 10102 Rabat, Morocco.

²Laboratoire de génomique fonctionnelle, Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique. LMBM / CNRST – Angle av. Allal El Fassi, av. des FAR, Quartier Hay Ryad, BP. 8027 Nations Unies, 10102 Rabat, Morocco.

³Laboratoire de Biotechnologie Microbienne, Faculté des Sciences et Techniques de Fès-Saïs, B.P. 2202, Route d'Imouzzer, Fez, Morocco.

⁴Laboratory of Microbiology, Department of Biochemistry and Microbiology, Gent University, K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent, Belgium.

Résumé :

Le lait de chamelle constitue une ressource alimentaire pour les peuplades nomades le consommant cru ou fermenté pour une période annuelle prolongée, dans les zones pastorales sahariennes marocaines. L'objectif du présent travail est d'énumérer, d'identifier et de caractériser les bactéries lactiques isolées du lait de chamelle produit au Maroc en utilisant aussi bien les méthodes moléculaires que génétiques. Un total de 128 isolats Gram-positifs, oxydase et catalase-négatifs ont été obtenus à partir de différentes régions marocaines. Ces isolats ont été par la suite groupés and identifiés en utilisant la (GTG)₅-PCR et le séquençage de l'ARNr 16S. L'identification a révélé la présence des espèces suivantes : *Leuconostoc mesenteroides*. subsp *mesenteroides* (40.63%), *Lactococcus lactis*. subsp *lactis* (32.03%), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (7.03%), *Lactococcus lactis*. subsp *cremoris* (6.25%), *Leuconostoc citreum* (5.47%), *Leuconostoc mesenteroides*. subsp *dextranicum* (2.34%), *Enterococcus faecium* (1.56%), *Enterococcus durans* (0.78%) et *Lactococcus raffinolactis* (0.78%). 3.13% des isolats ont été identifiés comme étant de nouvelles espèces du genre *Streptococcus* en utilisant l'hybridation ADN/ADN, le séquençage des gènes de ménage (*pheS*), (*rpoA*) et (*atpA*), le MALDI-TOF MS, le calcul du GC% et les techniques phénotypiques telles que l'API 20STREP et l'API 50CHL

P40. L'érysipèle : 190 cas

Afiri M., Benali A., Achour N., Bouchaib H., Touat M.

CHU Nedir Mohamed

Introduction – Objectifs : Dermo-hypodermite aiguë non nécrosante, l'érysipèle est essentiellement dû à *Streptococcus pyogenes*, et survient autour d'une infection cutanée mal ou non traitée. Le tableau clinique le plus fréquent est celui d'une grosse jambe rouge douloureuse fébrile unilatérale dont l'évolution sous traitement est souvent favorable, mais la récurrence constitue la complication la plus redoutée. Les objectifs de l'étude ont été de décrire les aspects épidémiologiques, cliniques, thérapeutiques et évolutifs de 190 cas d'érysipèle.

Matériel et méthodes : Nous avons analysé 190 dossiers de patients admis au sein du service des maladies infectieuses du CHU de Tizi-Ouzou, du 01/01/2007 au 31/12/2012, pour érysipèle. Le diagnostic a été retenu sur des arguments épidémiologiques, cliniques et évolutifs.

Résultats : L'étude a concerné 102 hommes et 88 femmes (sex-ratio H/F : 1.15), d'âge moyen de 49.90 ans (16-90). Nous avons colligé 165 (86.84%) érysipèles du membre inférieur, 16 (8.42%) de la face et 9 (4.73%) du membre supérieur. Des facteurs de risque ont été également relevés dans notre étude : locorégionaux (n=57) et généraux (n=42). Une porte d'entrée cutanée a été observée dans 56.84% (n=108) des cas (intertrigo inter orteils, n=75, dermatose excoriée, n=33). Des complications locorégionales ont été notées chez 1% des patients (abcès, n=1, nécrose superficielle n=1) et des récurrences chez 38.42% d'entre eux (n=73). Une antibiothérapie (β -lactamines, n=172, synergistines, n=18) et des soins locaux ont été institués dans tous les cas, une héparine de bas poids moléculaire dans 67.89% des cas (n=129). Pour la prévention des récurrences nous avons fait appel à la benzathine-pénicillineG dans 38.42% des cas.

Conclusion : L'érysipèle se voit plus volontiers chez les personnes âgées de plus de 40 ans qui présentent certains facteurs de risque apparaissant ou s'aggravant au fil des années. Sa prévention repose sur le traitement de ces facteurs et l'antibiothérapie chez les sujets à haut risque.

P41. La leptospirose féminine : 60 cas

Afiri M.¹, Amara-Khorba A.², Ait-Kaid D.³

¹CHU Nedir Mohammed

²Institut Pasteur - Alger

³EHS El Kettar - Alger

Introduction – objectifs : La leptospirose est une anthroponose de répartition mondiale. Elle est due à des spirochètes du genre *Leptospira* et d'espèce interrogans. La leptospirose féminine est généralement contractée dans l'environnement domestique et provient d'une contamination locale ou d'un contact avec des animaux domestiques. Les objectifs de l'étude étaient de décrire les caractéristiques épidémiologiques, cliniques et évolutives des cas de leptospirose féminine.

Matériel et méthodes : Etude prospective concernant 60 patientes prises en charge en maladies infectieuses du 01/01/2005 au 31/12/2008 pour leptospirose confirmée sérologiquement par le MAT (microagglutination test).

Résultats : L'âge moyen était de 38 ans (16-84). Les circonstances de contamination étaient liées à des activités de jardinage (n=23), des travaux domestiques (n=22), la récolte des olives (n=4), une morsure de rat (n=1) et/ou à la présence d'animaux domestiques (n=10). Le début était brutal marqué par une fièvre (n=60), des arthro-myalgies (n=60), une atteinte pulmonaire (n=21), un ictère de type cholestatique (n=16), une insuffisance rénale aiguë (n=15), un syndrome hémorragique (n=11), une myocardite (n=8), une suffusion conjonctivale (n=7), un exanthème maculopapuleux (n=6), une encéphalite (n=5) et une méningite lymphocytaire (n=3). Le sérotype icterohaemorrhagiae était identifié dans 51.66% des cas. Le taux de létalité était de 3.33% (n=2).

Conclusion : La leptospirose féminine contractée dans l'environnement domestique doit être évoquée devant tout syndrome algique fébrile associé à une atteinte multiviscérale.

P42. Les infections à *Pseudomonas aeruginosa* dans le service de soins intensifs au CHU de Sétif en Algérie

Etude sur quatre ans -2009 au 2012-

Bendjama A., Mezaghcha W., Radji N., Sahli F.

CHU et FAC de Médecine

Introduction :

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram négatif aérobie stricte, ubiquitaire qui peut devenir un pathogène opportuniste, responsable dans des conditions favorables, d'infections graves. Les patients hospitalisés dans les services de soins intensifs cumulent les facteurs de risque. Ils sont souvent immunodéprimés, intubés, ventilés, sondés et porteurs de cathéters périphériques et centraux. Ces facteurs de risque associés à la forte pression antibiotique expliquent l'émergence importante de souches de *P. aeruginosa* dans ces services et la fréquence élevée des résistantes acquises aux antibiotiques anti-*Pseudomonas*

Objectifs :

- Connaître la place et la fréquence des infections à *pseudomonas aeruginosa* en soins intensifs.
- Connaître son profils de résistance aux différents antibiotiques.

Matériel et méthodes :

C'est une étude rétrospective : qui a portée sur 4 ans (01 /01/2009-31/12/2012) Nous avons colligé 174 souches de *P. aeruginosa* au laboratoire de microbiologie, provenant des patients hospitalisés au niveau de services de soins intensifs au CHU de Sétif.

On a utilisé les méthodes classiques de bactériologie qui passent par plusieurs étapes : examen direct, mise en culture, identification, antibiogramme.

Résultats :

L'infection à *P. aeruginosa* occupe la première place dans les infections bactériennes en soins intensifs avec un pourcentage de 15 % , et elle touche beaucoup plus le sexe féminin (54 %). 50% des souches sont isolées à partir des trachéaux, suivi par les infections purulentes (20%) puis les sondes urinaires avec un taux de 17% .

cette étude rétrospective, nous révèle que 41,7 % des *P.aeruginosa* isolés sont résistants à l'imipénème, 31,1 % et 55,8 % à la Ciprofloxacine et l'ofloxacine respectivement, 13,1 % à la Ceftazidime ,13,3 et 21,6 % à la Piperacilline et la Ticarcilline respectivement, 73 % des souches sont résistantes à la fosfomycine, enfin pour les aminosides 6,2 % pour l' Amikacine et 6,7 pour la gentamicine. Il est à noter que 46% des souches ont été classées comme des BMR .

Conclusion :

P.aeruginosa est en premier rang des infections dans les service de soins intensifs avec un taux de résistance très élevé à l' imipénème qui reste parmi les derniers armes contre cette bactérie chez nous .

Liées aux pratiques hospitalières, les infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa* nécessitent des mesures d'hygiène strictes et une conduite soigneuse de l'enquête en cas d'épidémie. Mais, le meilleur moyen de prévention reste l'utilisation rationnelle de l'antibiothérapie à large spectre, dont l'emploi non raisonné est source de sélection et de contamination des voies aériennes et urinaire de l'ensemble des patients.

P43. Les salmonelloses non typhiques au CHU de Sétif

Sahli F.¹, Makhoukh N.², Mezaghcha W.¹, Bendjama A.¹, Radji N.¹, Saadoune W.²

¹Laboratoire de microbiologie, CHU Sétif; Faculté de médecine de Sétif, Université Sétif1, Algérie

²Laboratoire de microbiologie, CHU Sétif

Introduction

Les salmonelloses non typhiques représentent un problème de santé publique mondiale. Les sérotypes en cause sont variables ainsi que leurs résistances aux antibiotiques posant parfois des problèmes thérapeutiques surtout dans les infections invasives.

Objectifs :

L'objectif de notre étude est de déterminer la part des différents sérotypes dans les salmonelloses non typhiques diagnostiquées au laboratoire de microbiologie du CHU de Sétif de 2002 à 2010, ainsi que l'étude de la résistance des souches isolées aux antibiotiques.

Matériels et méthodes

L'examen bactériologique des prélèvements est effectué par méthode classique. L'identification bactérienne est faite par méthode conventionnelle. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques est réalisée par méthode de diffusion des disques selon les recommandations du Clinical Laboratory institute (CLSI).

L'analyse des résultats est effectuée à l'aide du logiciel Whonet 5.6 de saisie et d'analyse des antibiogrammes.

Résultats

92 cas de salmonelloses sont recensés durant la période d'étude. Le sexe ratio H/F est de 1,3. 57,6 % des souches sont isolées chez l'adulte de 15-65ans, 22,8 % chez le nourrisson et l'enfant de 2 mois-14 ans, 9,7 % chez le nouveau né et 9,7 % chez le sujet âgé de plus de 65 ans. 35,8 % des souches sont isolées de coproculture, 30,4 % d'hémoculture, 15,2 % de suppurations divers, 8,6 % d'urine, 5,4 % de liquide pleural et 4,3% de liquide céphalorachidien.

Salmonella typhimurium est le sérotype le plus fréquent caractérisant 33 % des souches, 18 % des souches sont de sérotype *S. enteritidis*, 8 % *S. seftenberg*, 5 % *S. agona*, 3 % *S. manhattan*, 2 % *S. choleraesuis*.

Les résistances aux antibiotiques sont de 60 % à l'ampicilline, 40.7 % à l'association amoxicilline plus acide clavulanique, 26 % aux céphalosporines de 3^e génération par production de bêtalactamase à spectre étendu. Aucune souche n'est résistante à la ciprofloxacine.

Conclusion

Nos souches de salmonelles non typhiques sont isolées en majorité chez l'adulte, surtout de diarrhée mais également en proportion non négligeable d'infection invasive (bactériémie, pleurésie et méningite). *S. typhimurium* et *S. enteritidis* sont les sérotypes les plus fréquents. La résistance à l'ampicilline est élevée et celle aux céphalosporines de 3^e génération n'est pas négligeable. La ciprofloxacine reste efficace. La détermination de la source des différents sérotypes ainsi que l'étude de la consommation des antibiotiques chez les animaux d'élevage permettrait d'instaurer des mesures préventives adéquates.

P44. Diagnostic des gastroentérites aiguës : comparaison de trois tests multiplexes

Dauwalder O.¹, Freydiere A.-M.¹, Carricajo A.², Vandenesch F.¹, Lina B.¹, Mekki Y.¹, Benito Y.¹, Epercieux A.², Roque J.-M.¹, Marion S.¹, Casalegno J.-S.¹, Durous L.¹, Verhoeven P. O.², Maccio G.¹, Vernet N.¹, Beucher A.¹

¹Laboratoire de Bactériologie, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon, Bron, France

²Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Hôpital Nord, CHU de Saint Etienne, Saint Etienne, France

Objectives : Comparaison des tests moléculaires multiplexés [TMM] CLART-EnteroBact® (Genomica) [GEN], XTAG-GP® (Luminex) [LUM], Enteric Bacterial Panel® (BD) [EBP] et Enteric Virus Panel® (Diagenode) [EVP] de diagnostic des gastroentérites aiguës [GEA] sur 194 selles pédiatriques.

Méthodes : Collectées prospectivement dans les services pédiatriques des Hospices Civils de Lyon, 194 selles ont été analysées selon les méthodologies conventionnelles [MCONV] : culture pour la bactériologie ; tests immunologiques et moléculaires pour la virologie, puis congelées à -80°C. Après une seule décongélation, une extraction (EasyMAG®) et les TMM GEN et LUM ont été réalisés avec les instruments CAR® et MagPix® respectivement, fournissant des résultats en moins de 5 heures. Les tests automatisés EBP et EVP ont été réalisés sur BD MAX™ (BD) en moins de 3 heures. En cas d'inhibition ou de discordance avec le référentiel, les TMM ont été répétés une fois après dilution de l'extrait au 1/10.

Résultats principaux : Comparés à un référentiel bactérien incluant la positivité des MCONV et/ou de 2 des 3 TMM évalués (18 *Campylobacter* spp, 13 *Salmonella* spp., 6 *Shigella* spp), les TMM ont montré les sensibilités [Se] et spécificités [Sp] suivantes : *Campylobacter* : 100% & 98,6% (GEN), 100% & 96,6% (LUM), 88,9% & 99,4% (EBP) ; *Salmonella* : 83,3% & 99,3% (GEN), 61,5% & 73,9% (LUM), 84,6 & 100% (EBP) ; *Shigella* : 100% & 100% pour les 3 TMM. Après avoir retesté 20% (GEN) et 40% (LUM) des selles, à cause d'inhibiteurs et/ou de résultats discordants, les Se et Sp respectives des deux tests : *Campylobacter* : 94,4% & 98,3% (GEN), 100% & 100% (LUM) ; *Salmonella* : 84,6% & 100% (GEN), 92,3% & 98,3% (LUM), suggèrent une moindre robustesse de LUM. Comparés à un référentiel virologique incluant la positivité de tests immunologiques et/ou moléculaires (21 Norovirus, 30 Rotavirus), les TMM ont montré des Se et Sp suivantes : Norovirus : 71,4% & 100% (LUM), 81% & 97,7% (EVP) ; Rotavirus : 66,7% & 99,4% (LUM), 55,2 & 97,0% (EVP).

Conclusions : Cette approche syndromique de diagnostic des GEA réduit le délai de rendu des résultats et permet, si besoin, l'administration d'une antibiothérapie adaptée durant les 3 à 5 premiers jours en accord avec les recommandations européennes. Utilisés en première intention, ces TMM pourraient dépister les selles requérant une mise en culture. Mais, un accroissement des performances de détection des virus et des salmonelles et une amélioration des étapes d'extraction et/ou du protocole expérimental sont nécessaires avant la mise en place d'un tel algorithme.

P45. Analyse in-silico et caractérisation de protéines de surface Chaperone-Usher impliquées dans l'adhésion de *Klebsiella pneumoniae*

Khater F.¹, Forestier C.¹, Brisse S.², Charbonnel N.¹, Balestrino D.¹

¹LMGE UMR CNRS 6023 Université d'Auvergne Laboratoire de Bactériologie Faculté de Pharmacie 28 place Henri Dunant 63001 Clermont-Ferrand

²Platform Genotyping of Pathogens and Public Health Institut Pasteur 25-28 rue du docteur Roux, 75015 Paris

La voie Chaperone-Usher (CU) est une machinerie macromoléculaire permettant l'assemblage à la surface des bactéries de fimbriae impliqués dans l'adhésion aux cellules eucaryotes et dans la formation de biofilm. Les opérons codant ces structures sont majoritairement trouvés dans les génomes des bactéries à Gram négatif. Une analyse in-silico du génome de *Klebsiella pneumoniae* LM21 à l'aide d'outils heuristiques et locaux a permis d'identifier dix opérons Chaperone/Usher potentiels.

Les dix mutants isogéniques correspondants ont été créés en délétant spécifiquement les gènes codant les protéines usher. L'analyse de leurs phénotypes d'adhésion a été déterminée avec des modèles de formation de biofilm statique (microplaque), et dynamique (micro-fermenteur) ainsi qu'avec des cellules en culture (Int 407). Trois des mutants ont montré des phénotypes atténués dans l'un ou l'autre des modèles, et des expériences de trans-complémentation ont confirmé l'implication de ces opérons dans l'expression des phénotypes d'adhésion.

Klebsiella pneumoniae est fréquemment présente lors d'infections nosocomiales. La richesse de son génome en opérons Usher codant potentiellement des adhésines variées lui confèrent vraisemblablement une grande capacité à coloniser différentes surfaces, abiotiques ou cellulaires.

P46. Formation de biofilm mixte à *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* sur sonde à demeure*Marquès C., Hennequin C., Lescher K., Balestrino D., Forestier C.*

Université d'Auvergne ; bioMérieux

Les infections nosocomiales représentent un problème majeur de santé publique, au premier rang desquelles apparaissent les infections urinaires, surtout chez des patients porteurs de sondes à demeure. En effet, ces dispositifs sont rapidement colonisés par les bactéries des flores environnantes (essentiellement digestives) sous forme de biofilms mixtes. L'actuelle stratégie préventive anti-biofilm consiste à recouvrir les sondes d'agents anti-microbiens, mais les bactéries à Gram négatif principalement incriminées, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*, peuvent être résistantes à ces agents anti-microbiens, voire former des biofilms plus importants en leur présence. Nous avons analysé le comportement de souches d'*E. coli* et *K. pneumoniae* en biofilms mixtes constitués sur des échantillons de sonde urinaire (silicone) dans différents modèles de formation de biofilm (microplaques, microfermenteurs) et dans un milieu de culture proche de l'urine, en faisant varier les inoculum respectifs des deux bactéries. Les biomasses (UFC) respectives de chacune des entérobactéries au sein des biofilms mixtes ont été déterminées après 24 h d'incubation. Lorsque l'inoculation des deux souches est réalisée simultanément, à un inoculum constant pour *E. coli* (10⁴ ou 10⁶ UFC/mL), le nombre d'UFC d'*E. coli* détecté varie inversement par rapport à la concentration initiale de *K. pneumoniae*. L'analyse de l'expression de gènes spécifiquement impliqués dans les processus d'adhésion de *K. pneumoniae* (gènes codant des exopolysaccharides, des pili ...) a également été réalisée au sein des biofilms mixtes par des techniques de qRT-PCR. Ces gènes sont réprimés dans un biofilm mixte par rapport à un biofilm monospécies, avec un coefficient de variation compris entre 2,5 et 9,1, ce qui serait en faveur de l'établissement d'un « dialogue » modulant les capacités de colonisation de *K. pneumoniae*. Mieux connaître les interactions de ces bactéries dans un biofilm mixte permettra à terme de développer des stratégies pour prévenir ou retarder leur implantation sur les sondes à demeure.

P47. Infection sur prothèse de genou à *Staphylococcus lugdunensis* Small Colony Variant

*Chabaud A.*¹, *Argemi X.*¹, *Gaudias J.*², *Boeri C.*², *Jenny J.-Y.*², *Jaulhac B.*¹, *Riegel P.*¹

¹Laboratoire de bactériologie ; hôpitaux universitaires de Strasbourg

²Centre de chirurgie orthopédique et de la main ; hôpitaux universitaires de Strasbourg

Objectif :

Le diagnostic bactériologique d'une infection ostéo-articulaire sur matériel pose souvent des problèmes notamment dans le cas de bactéries de croissance déficiente appelées Small Colony Variant (SCV). Ceux-ci concernent essentiellement *S. aureus* et très peu d'autres bactéries. La littérature ne rapporte pas de cas de *S. lugdunensis* SCV responsable d'une infection de prothèses orthopédiques.

Sujet :

En octobre 2013, une patiente de 67 ans porteuse d'une prothèse totale de genou (PTG) cimentée à la gentamicine consulte pour une tubérosité tibiale antérieure associée à une fistulisation avec difficulté à la marche. Dans ses antécédents, on note en mars 2010 une infection à *S. epidermidis* sur PTG posée en novembre 2009, ayant entraîné un changement de la prothèse et un traitement de six semaines par daptomycine et cotrimoxazole. Une douleur chronique a nécessité en juin 2012 un lavage complet de la prothèse, le liquide articulaire prélevé contenait un *S. lugdunensis* de bonne croissance et multi-sensible. La patiente a reçu de l'ofloxacine et de la rifampicine pendant trois mois. Un changement de la PTG est réalisé en décembre 2013. Les prélèvements péri-prothétiques ainsi que la sonication de la prothèse sont alors à nouveau positifs à *S. lugdunensis*.

Résultats :

La souche de *S. lugdunensis* isolée des broyats de fragment tissulaire en décembre 2013 n'a poussé que dans les flacons d'hémocultures pédiatriques, tandis que les boîtes d'origine sont restées stériles. Seul l'examen direct issu de la sonication de la prothèse était positif, à nombreux cocci Gram positif. Les colonies issues du repiquage des flacons sont de petites tailles et ne poussent qu'au bout de trois jours uniquement sur géloses chocolat. La sensibilité de cette souche est différente de celles isolées en juin 2012, avec une sensibilité diminuée aux fluoroquinolones et aux aminosides. Il s'agit donc d'un cas typique de *Staphylococcus* SCV.

Conclusions :

Il s'agit à notre connaissance du premier cas décrit de *S. lugdunensis* Small Colony Variant isolé d'une infection sur prothèse orthopédique. L'apparition d'une déficience de croissance et d'une résistance aux antibiotiques pour ce *S. lugdunensis* SCV peut être liée au fait que la patiente ait reçu précédemment de l'ofloxacine, et que le ciment de la prothèse contenait de la gentamicine. Il est à noter l'importance de l'ensemencement des broyats dans un flacon d'hémoculture ainsi que l'analyse de la prothèse après sonication, à l'origine de l'isolement de cette souche déficiente.

P48. Aspects bactériologiques des méningites communautaires en Algérie

Houria A.¹, Rahal K.²

¹Laboratoire Central de Biologie- CHU Béni-Messous

²Service de Bactériologie Médicale- Institut Pasteur d'Algérie

Introduction

Les méningites bactériennes communautaires sont heureusement rares mais toujours associées à une forte morbidité. Le choix de l'antibiothérapie dépend des données épidémiologiques (germes en cause et sensibilité) et des performances pharmacocinétiques des antibiotiques. Dans ce travail, nous rapportons les résultats du Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques (AARN) concernant les trois principales bactéries incriminées dans les méningites communautaires et leurs sensibilités aux antibiotiques.

Matériel et méthodes

Il s'agit d'une étude rétrospective réalisée à partir des données cumulées des différents laboratoires de microbiologie membres du réseau AARN, portant sur *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* et *Streptococcus pneumoniae* isolés des liquides céphalo-rachidiens, du 1^{er} Septembre 2005 au 31 Décembre 2011. L'analyse des données a été réalisée avec le logiciel WHONET 5.6.

Résultats

Streptococcus pneumoniae représente près de la moitié des cas (48,3 %), suivi par *Haemophilus influenzae* (34,7 %) puis *Neisseria meningitidis* (17 %).

Toutes les souches de *N. meningitidis* sont sensibles au céfotaxime et à la ceftriaxone, 15,5% sont de sensibilité diminuée à la pénicilline G (CMI $\geq 0.25\mu\text{g/ml}$). Concernant le pneumocoque, en 2005, 19% des souches étaient résistantes à la pénicilline G (CMI $\geq 0.125\mu\text{g/ml}$) alors qu'en 2011 elles représentaient 30% des cas. Les taux de sensibilité diminuée au céfotaxime (CMI $\geq 1\mu\text{g/ml}$) sont fluctuants selon les années variant entre 28% (en 2006) et 5% (en 2008). La surveillance des méningites à *Haemophilus influenzae* de 2005 à 2011 montre une augmentation régulière du nombre de souches isolées à partir de LCR avec un pic en 2008 suivi d'une chute brusque du nombre de souches à partir de 2009, année qui a suivi l'introduction de la vaccination anti-*Haemophilus* type b en Algérie.

Conclusion

La connaissance de l'épidémiologie des bactéries et de leur sensibilité aux antibiotiques permet le choix du traitement optimal des méningites. Les changements épidémiologiques de ces dernières années sont en partie liés à l'impact des vaccins conjugués et à la pression de sélection exercée par les antibiotiques.

P49. Exposition des professionnels à *Chlamydia psittaci* en filière canard mulard

Hulin V.¹, Bernard P.², Vorimore F.¹, Aaziz R.¹, Cleva D.³, Laroucau K.¹

¹ Université Paris-Est, ANSES, Unité des zoonoses bactériennes, 94706 Maisons-Alfort, France.

² Ecole nationale vétérinaire, ONIRIS, 44300, Nantes, France.

³ Cabinet vétérinaire, 85140, L'Oie, France

Chlamydia psittaci est une petite bactérie intracellulaire obligatoire de la famille des *Chlamydiaceae* responsable d'une zoonose : la chlamydie aviaire. Cette infection peut toucher plus de 450 espèces d'oiseaux répartis en plus de 30 ordres et est, le plus souvent, asymptomatique.

La psittacose, nom de la maladie humaine, peut causer de graves cas de pneumopathies atypiques. Elle touche principalement les personnes au contact d'oiseaux, particulièrement dans un cadre professionnel.

Le canard mulard, espèce utilisée pour la production du foie gras, a fréquemment été associé aux graves cas humains recensés ces dernières années.

Une première étude réalisée en 2010 avait mis en évidence un portage asymptomatique fréquent de *C. psittaci* par le canard mulard en élevage, soulevant ainsi la question du risque représenté par les aérosols pour les professionnels lors de la manipulation des volailles.

Afin de tenter d'appréhender ce risque, sept lots de canards mulards répartis dans cinq élevages différents ont régulièrement été suivis de l'éclosion à l'abattage. Des écouvillonnages cloacaux ont été effectués sur les animaux et des prélèvements d'air ont été réalisés à chacune des interventions impliquant la présence de l'homme.

L'analyse des prélèvements a mis en évidence une excrétion asymptomatique de *C. psittaci* pour l'ensemble des lots suivis. Trois schémas d'excrétion différents ont été mis en évidence : 1/ un schéma identique aux précédentes observations, à savoir un pic d'excrétion détecté chez les canards lors de la sortie sur parcours vers l'âge de 8 semaines, 2/ une excrétion « précoce » détectée chez les canetons dès l'âge de 4 semaines et enfin 3/ une excrétion plus « tardive », détectée lors du gavage et de l'abattage. Les prélèvements d'air se sont révélés positifs à chaque fois que les animaux étaient fortement excréteurs.

Ces résultats mettent en évidence une exposition réelle des professionnels de la filière à *C. psittaci* et d'autant plus dangereuse du fait du portage souvent asymptomatique des animaux. En l'absence de vaccins commercialisés pour l'élevage, le port d'équipements de protection individuels reste le seul moyen de se prémunir d'une infection qui peut avoir de graves conséquences pour l'homme.

P50. Détection automatisée de gènes de résistance dans les génomes de *Klebsiella pneumoniae*

Bialek Davenet S.1, Criscuolo A.2, Nicolas-Chanoine M.-H.2, Decré D.3, Brisse S.2

1 Hôpital Beaujon, AP-HP

2 Institut Pasteur, Paris

3 Hôpital aint-Antoine, AP-HP

Chez *Klebsiella pneumoniae*, la multirésistance aux antibiotiques est véhiculée majoritairement par certains clones à diffusion mondiale, tels que le ST258. Le but de ce travail était de développer un outil bioinformatique permettant d'analyser facilement le contenu en gènes de résistance d'un génome de *K. pneumoniae* et de relier ces informations aux autres données de typage.

48 souches de *K. pneumoniae* ont été séquencées par technologie Illumina et comparées avec 119 génomes publics à l'aide de l'interface d'épidémiologie génomique BIGSdb. Les séquences de tous les gènes connus codant la résistance aux β -lactamines, aux aminosides et aux quinolones ont été recherchées automatiquement dans les 167 génomes. La sensibilité à ces familles d'antibiotiques a été testée sur un échantillon de souches par la méthode de diffusion en gélose.

La détection des gènes de résistance par BIGSdb a fourni des résultats concordants avec les données de la littérature et les antibiogrammes. Bien que les clones multirésistants et virulents de *K. pneumoniae* soient pour l'instant bien distincts, des souches hybrides combinant des caractères de virulence et de résistance aux antibiotiques ont été détectées.

La base de données BIGSdb-Kp, accessible via internet, est un outil pratique permettant d'extraire les données de typage, de virulence et de résistance à partir de génomes de *K. pneumoniae*.

P51. Activités anti-biofilm de bactéries probiotiques vis-à-vis de pathogènes

Lagrafeuille R.¹, Vareille M.¹, Balestrino D.¹, Rios L.², Bernardi T.³, Nivoliez A.⁴, Dubois J.-Y.¹, Forestier C.¹

¹ Université d'Auvergne

² Greentech

³ Biofilm Control

⁴ Probionov

Les probiotiques sont définis comme des microorganismes vivants non pathogènes qui lorsqu'ils sont administrés en quantité suffisante, ont des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte. Leur mécanisme d'action reste méconnu car complexe, mais les interactions de ces bactéries avec les microorganismes de l'hôte constituent un élément clé.

Dans la nature, les microorganismes sont organisés en communautés agrégées dénommées biofilms, qui constituent le mode de croissance le plus adapté à la survie dans un milieu hostile générant parfois des effets délétères. Dans cette optique, l'utilisation de probiotiques pour lutter contre la formation de biofilms indésirables paraît judicieuse.

La recherche d'une activité anti-biofilm de souches probiotiques de lactobacilles (*Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus reuteri*) vis-à-vis des bactéries pathogènes *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus epidermidis* a été réalisée. L'étape initiale a consisté à déterminer l'impact de ces probiotiques sur la croissance en planctonique des pathogènes afin de s'affranchir d'un éventuel effet bactéricide. Dans une deuxième étape, des biofilms mixtes ont été constitués dans différents modèles expérimentaux (multiplaques 24 puits et Ringtest®) avec des concentrations initiales de chacune des bactéries variables (10e2 à 10e6). Après 24 heures de co-incubation, le nombre d'Unités Formant Colonie (UFC) de *K. pneumoniae* détectées au sein des biofilms mixtes constitués avec *L. rhamnosus* est inférieur aux concentrations observées dans des biofilms monospécies de *K. pneumoniae*. En ce qui concerne le pathogène *S. epidermidis*, une diminution du nombre d'UFC est également observée en biofilms mixtes, quelle que soit la souche de *Lactobacillus* testée.

En conclusion, les souches de probiotiques testées exercent un effet anti-biofilm, avec un spectre d'activité plus ou moins large. L'étape suivante consiste à caractériser au niveau moléculaire les interactions entre des bactéries probiotiques et pathogènes en situation de biofilms mixtes, afin d'identifier le mécanisme anti-biofilm et la réponse du pathogène au contact du probiotique.

P52. Evaluation du β LACTA test sur hémocultures positives

Defourny L., El Batik F., Verroken A.

Laboratoire de microbiologie, Cliniques universitaires Saint-Luc, avenue Hippocrate, 10, 1200 Bruxelles, Belgique

Objectif : Un défi majeur pour optimiser la prise en charge du patient septique est l'identification accélérée de la bactérie en cause et le rendu rapide de son profil de sensibilité aux antibiotiques. Les entérobactéries (EB) et le *Pseudomonas aeruginosa* (PA) sont fréquemment à l'origine de sepsis et la résistance aux céphalosporines de troisième génération est une préoccupation croissante dans notre épidémiologie actuelle. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité du β LACTA test (β LT) (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) permettant de détecter en moins de 15 minutes une résistance des EB et du PA aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) directement à partir du sang des hémocultures positives.

Matériel et méthode: Le β LT a été réalisé sur 60 hémocultures (doublons exclus) détectées positives par BACTEC FX (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) et présentant des bacilles à gram négatif (BGN) à l'examen direct. Un tube à gel séparateur de 8,5 mL a été prélevé à partir de chaque hémoculture puis centrifugé 10 minutes à 3000 rpm. Le β LT a été effectué à partir du culot obtenu. Chaque subculture a par ailleurs bénéficié d'une identification par MALDI-TOF MS et d'un antibiogramme manuel (PA) ou automatisé (EB) interprétés selon les recommandations EUCAST 2013. Les suspicions phénotypiques de β -lactamase à spectre étendu (BLSE) ont été confirmées par biologie moléculaire.

Résultats : 55/63 (87.3%) hémocultures positives ont présenté un β LT négatif et 8/63 (12.7%) un β LT positif. Une discordance unique des résultats a été observée pour une hémoculture positive à *Citrobacter freundii* présentant un β LT négatif versus une résistance aux C3G détectée au niveau de l'antibiogramme automatisé suggérant la présence d'une céphalosporinase chromosomique dérégulée (*AmpC*). Parmi les 8/63 β LT positifs, 6 *Escherichia coli* et 1 *Klebsiella pneumoniae* tous porteurs d'une BLSE ont été mis en évidence. Dans la 8^{ème} hémoculture β LT positif, une *Klebsiella pneumoniae* BLSE et un *Enterobacter cloacae* *AmpC* ont été identifiés. Les β LT négatifs sur les 5 hémocultures à PA ont été confirmés par un antibiogramme montrant une sensibilité aux C3G.

Conclusion: La sensibilité du β LT réalisé directement à partir du sang d'hémocultures positives à BGN est de 88.9% et la spécificité de 100%. La valeur prédictive positive est de 100% et la valeur prédictive négative de 98.2% soulignant la difficulté de détection des souches productrices d'*AmpC* par β LT. Des études complémentaires à plus large échelle doivent être menées afin de soutenir ces observations.

P53. Bilan de l'acquisition d'un système automatisé de biologie moléculaire au sein d'un laboratoire hospitalier après 9 mois d'utilisation.

Dubois A., Salaun-Beretta G., Cattoir V., Legros A.

Laboratoire de Biologie médicale - Centre Hospitalier Robert Bisson Lisieux

Les techniques de biologie moléculaire sont aujourd'hui devenues indispensables pour une prise en charge optimale de certaines pathologies. Les structures hospitalières de taille moyenne ont tendance à s'équiper de systèmes automatisés moins contraignants. Cependant la situation financière fragile des établissements publics rend difficile l'acquisition de nouveaux équipements. L'autofinancement est alors une solution privilégiée par les services économiques.

Dans le but d'équiper notre laboratoire d'un système automatisé de PCR en temps réel GeneXpert (Cepheid), un dossier médico-économique basé sur les tests Xpert® *C. difficile* et Xpert® Enterovirus a été élaboré. L'estimation du gain financier annuel pour l'hôpital s'élevait à 5580 € en englobant les coûts réactifs et les changements de cotation de séjour liés à l'isolement d'un *C. difficile* toxigène au cours d'un épisode de diarrhées, avec une rentabilisation de l'automate estimée en 3 ans et demi. Pour les infections à *C. difficile*, cette estimation avait été calculée en considérant une baisse de 20 % des tests effectués par meilleur ciblage des demandes avec une sensibilité moyenne de la technique à 13 % (sensibilité de 5,54 % au sein de notre laboratoire en 2012). Pour les méningites à Entérovirus, cette estimation s'est surtout basée sur la diminution du coût de la technique par rapport à une sous-traitance.

L'acquisition du GeneXpert nous a permis de travailler sur notre stratégie de dépistage des infections à *C. difficile* et de réduire le nombre de demandes de 35,7 %. La sensibilité de la technique au sein du laboratoire atteint désormais 18 %. Après synthèse des surcoûts liés aux réactifs et des gains de cotation de séjour liés aux diarrhées à *C. difficile*, le gain financier a été évalué à 11600 € pour les 9 premiers mois d'utilisation.

L'obtention de cet automate à coût constant nous a permis d'améliorer la prise en charge des patients, notamment en proposant une recherche d'entérovirus 24h/24h et en sensibilisant notre détection des *C. difficile* toxigènes. La présence de cet automate dans notre laboratoire nous a également permis de réaliser au laboratoire des examens auparavant sous-traités comme la recherche de *Chlamydia trachomatis* par PCR ou de proposer de nouveaux tests à nos cliniciens (tests Xpert® MTB/Rif et Xpert® MRSA/SA BC).

P54. Nouvelle méthode rapide de détection des *legionella pneumophila* vivantes.*Dumont A.*¹, *Dukan S.*¹, *Baron A.*², *Fugier E.*¹, *Sautejeau G.*², *Mas-Pons J.*², *Vauzeilles B.*²¹ CNRS² ICSN

Legionella pneumophila est une bactérie pathogène à l'origine de la légionellose, une des 30 « maladies à déclaration obligatoire », nécessitant donc dès son diagnostic une signalisation auprès des autorités sanitaires compétentes. Ainsi, des textes réglementaires et des normes de détection encadrent la prévention et la surveillance de la légionnelle tout particulièrement dans les eaux chaudes (tours aéroréfrigérantes et établissements accueillant du public). La méthode de détection réglementaire prend du temps : elle nécessite le passage par culture en milieu gélosé (10 jours) suivi par une confirmation immunologique. L'obtention de méthodes alternatives plus rapides est un enjeu de santé publique tout particulièrement en cas d'épidémie.

La méthode qui vient d'être mise au point permet de détecter et dénombrer spécifiquement et rapidement la bactérie pathogène *L. pneumophila* vivante. Pour ce faire, les bactéries sont mises en contact avec une sonde, mime d'un sucre que seules les *L. pneumophila* utilisent pour synthétiser un polysaccharide spécifique de leur membrane cellulaire. Mais ce sucre a été au préalable modifié par l'introduction d'une fonction chimique de type « azoture » (constituée de trois atomes d'azote). Leurrées, les *L. pneumophila* vivantes intègrent le sucre artificiel à leur membrane. Ensuite, grâce par exemple à une molécule fluorescente s'attachant exclusivement au groupe azoture, il devient alors possible de reconnaître et compter les *L. pneumophila* vivantes, les seules à avoir assimilé la sonde. Jusqu'à présent, il n'existait aucune méthode rapide permettant simultanément de détecter et dénombrer des *L. pneumophila* vivantes.

P55. Septicémie à *Vibrio parahaemolyticus* chez un patient en aplasie

*Limelette A.*¹, *Vernet-Garnier V.*¹, *De Champs C.*¹, *Himberlin C.*², *Guillard T.*¹, *Brasme L.*³, *Genty C.*¹

¹Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, CHU de REIMS; Université Reims Champagne-Ardenne, SFR CAP Santé EA 4687, UFR Médecine, F-51092 Reims

²Service d'Hématologie clinique, CHU REIMS

³Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, CHU de REIMS

Introduction :

Vibrio parahaemolyticus est une bactérie halophile responsable de gastroentérites aiguës, parfois d'infections des tissus mous, mais exceptionnellement de bactériémies.

Cas clinique :

Nous rapportons ici le cas d'un patient de 39 ans, hospitalisé en secteur protégé d'hématologie, pour une chimiothérapie de rattrapage dans le cadre du traitement d'une leucémie aigue lymphoblastique T, diagnostiquée 4 mois plus tôt, en avril 2013.

Dix jours après la fin de la chimiothérapie, le patient, en aplasie, présente une fièvre à 38,7°C, sans point d'appel clinique. Un traitement probabiliste par tazocilline (4g x 3/j) est débuté après réalisation des prélèvements microbiologiques (hémocultures, ECBU...). Après 72h d'incubation, les hémocultures se positivent à bacilles à gram négatif, incurvés et mobiles. L'identification des subcultures par spectrométrie de masse (IVD MALDI Biotyper, Bruker Biospin SAS) met en évidence un *Vibrio parahaemolyticus*. La souche est sensible à la tazocilline, qui est poursuivie pendant 15 jours avec succès. L'interrogatoire du patient, révèle un épisode de diarrhée, 24 heures après le pic fébrile. L'origine de la contamination n'a pas été retrouvée.

Discussion :

Vibrio parahaemolyticus est un bacille gram négatif anaérobie facultatif, oxydase positif, principalement responsable de gastro-entérites et d'infections des tissus mous. La contamination se fait essentiellement par consommation de poissons peu ou pas cuits ou de fruits de mer contaminés, ainsi que par l'exposition de plaies dans l'eau de mer.

Les cas de bactériémies à *V. parahaemolyticus* rapportés dans la littérature sont par contre rares et surviennent chez des patients cirrhotiques, diabétiques ou immunodéprimés (notamment leucémiques).

Dans notre cas, la porte d'entrée est fort probablement digestive, le patient ayant décrit un épisode de diarrhée. Malheureusement, aucun prélèvement de selles n'a été réalisé, afin d'authentifier la présence de *V. parahaemolyticus*. Au niveau de la sensibilité aux antibiotiques, *V. parahaemolyticus* est généralement sensible aux aminosides, à l'érythromycine, aux céphalosporines, au chloramphénicol et aux quinolones. L'amoxicilline est généralement inactive, ce qui est le cas de la souche isolée ici. Celle-ci est aussi résistante à l'érythromycine.

Conclusion :

Afin de prévenir ces infections à *Vibrio spp*, il serait sûrement souhaitable de conseiller aux patients immunodéprimés à risque, de manger des aliments bien cuits et d'éviter les fruits de mer crus.

P56. Apport du MALDI-TOF dans le management clinique des hémocultures positives

Chabaud A., Riegel P., Jaulhac B.

Laboratoire de bactériologie, hôpitaux universitaires de Strasbourg

Objectifs

Evaluation des performances du MALDI-TOF MS (Matrix Assisted-Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) pour l'identification des bactéries directement à partir des flacons d'hémocultures positifs et impact sur la prise en charge des patients.

Matériels et méthode

De mi-novembre 2013 à mi-janvier 2014, 168 flacons d'hémocultures de 161 patients détectés positifs par les automates Bactec FX (Becton Dickinson, Meylan, France) ont été analysés directement par spectrométrie de masse MALDI-TOF après extraction des protéines bactériennes (kit Sepsityper, Bruker Daltonics). Un microlitre du surnageant final a été déposé en double sur la plaque du spectromètre et recouvert par 1 µl de matrice CHCA (Bruker Daltonics). Les spectres ont été acquis sur un Microflex LT (Bruker Daltonics) et analysés par le logiciel BioTyper, version 2.3 (Bruker Daltonics). L'identification à l'espèce (score supérieur à 2) ou au genre (score compris entre 1,7 et 2) est ensuite transmise au clinicien. Des informations sur l'état infectieux, les antibiotiques administrés ainsi que la perception clinique de cette identification rapide sont alors recueillies selon un questionnaire. Le lendemain, la concordance au genre ou à l'espèce du résultat obtenu est faite avec l'identification de la souche isolée, par MALDI-TOF.

Résultats

Sur les 168 flacons analysés, seuls les 150 flacons monomicrobiens ont été retenus (144 patients). L'analyse a montré que 85,3% des germes ont été identifiés au genre et 73,3% à l'espèce. Aucune discordance majeure (genres différents) n'a été relevée. De très bons résultats ont été obtenus pour *S. aureus* (100% d'identifications concordantes) et non *aureus* (89,7%), les entérobactéries (89,5%), les *Streptococcaceae* (92,1%), les bacilles à Gram négatif non fermentants (100%, mais 3 flacons). Dans 71,4% des cas où l'identification a pu être transmise, 80% des cliniciens ont trouvé cette information utile mais un changement de l'antibiothérapie n'a été observé que dans 9,5% des cas.

Conclusions

Les performances de l'identification dépendent du type de germe mais également de la matrice initiale : les résultats sont moins bons avec les germes anaérobies, bacilles à Gram positif, *Haemophilus*, ... et un sang d'une grande viscosité, qui peuvent influencer la formation du culot bactérien (prélude à l'extraction). L'identification précoce rassure souvent le clinicien dans le choix de l'antibiothérapie instaurée en probabiliste, et dans certains cas permet une adaptation plus ciblée (*P. aeruginosa* et apparentés) ou une désescalade thérapeutique.

P57. Apport du MALDI-TOF MS dans l'investigation d'une épidémie à MRSA

Steensels D.¹, Deplano A.², Denis O.², Verroken A.¹

¹Cliniques Universitaires Saint-Luc

²ULB-Erasme

Objectifs :

L'identification d'une épidémie à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) au sein d'un hôpital nécessite la détermination rapide de la clonalité des souches. Le typage moléculaire par macrorestriction génomique et spa typing est le plus fréquemment utilisé. Ces méthodes sont très performantes mais longues et onéreuses. L'objectif de cette étude est d'évaluer les performances de la spectrométrie de masse de type matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF MS) pour le typage des souches de *S. aureus* impliquées dans une épidémie.

Matériels et méthode :

Entre 2011 et 2013, dans le service de néonatalogie intensive, 15 SARM ont été détectés dont respectivement 14 souches patients et 1 souche soignant. L'identification a été réalisée par MALDI-TOF MS (microflex LT, Bruker Daltonik, Allemagne) et confirmée par PCR (gènes *ARN 16S* et *nuc*). La sensibilité aux antibiotiques a été déterminée par antibiogramme automatisé et la résistance à l'oxacilline a été confirmée par détection moléculaire du gène *mecA*. Le typage moléculaire a été réalisé par spa typing (« gold standard ») et MALDI-TOF MS, intégrant 5 souches SARM de référence. L'analyse des profils MALDI-TOF MS a été réalisée avec le logiciel BioNumerics (Applied Maths) à partir des « mean spectrum profile » (MSP). La concordance entre le spa typing et le MALDI-TOF a été calculée selon les critères décrits par Robinson et al. (*J. Mol. Evol.* 1998. 47 : 222-229).

Résultats et discussion :

L'analyse par spa typing a révélé un même spa type t148, associé à un même profil de résistance aux antibiotiques, pour 11 souches de SARM (10 patients et 1 soignant) définissant l'épidémie. Les 4 autres souches patients appartenaient à 3 spa types différents avec 2 SARM isolés chez des jumeaux ayant un même spa type t12438. L'analyse des 20 MSP réalisés par MALDI-TOF MS utilisant un cut-off de 95% de similitude montre un regroupement de 10 des 11 souches liées à l'épidémie et différencie les souches non liées. Néanmoins, le MALDI-TOF MS différencie également les 2 SARM isolés chez les jumeaux. La concordance entre le spa typing et l'analyse par MALDI-TOF MS pour cette collection de SARM est de 93%.

Conclusions :

L'analyse des MSP des souches SARM par MALDI-TOF MS a montré une bonne concordance avec le spa typing. Des études complémentaires évaluant la reproductibilité et incluant un plus grand nombre de souches épidémiologiquement liées et non liées doivent néanmoins être réalisées pour confirmer le potentiel du MALDI-TOF MS comme outil d'investigation dans une épidémie.

P58. Typage moléculaire par NG-MAST de *Neisseria gonorrhoeae* isolées d'infections génitales récidivantes.M. Gits-Muselli^{1,5}, B. Berçot^{1,2,4,5}, F Lassau³, M. Janier³, E. Cambau^{1,2,4,5}¹ Service de Bactériologie-Virologie, APHP, Hôpital Lariboisière-St Louis-Fernand Widal, ² Laboratoire associé au Centre National de Référence de *Neisseria gonorrhoeae*; ³ Centre de MST, APHP, Hôpital St Louis-Lariboisière-Fernand Widal; ⁴ IAME, UMR 1137, INSERM, F-75018 Paris, France; ⁵ Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75018 Paris, France**Objectifs :**

L'incidence des infections sexuellement transmissibles à *Neisseria gonorrhoeae* (NG) est en augmentation avec une estimation mondiale par l'OMS à 106 millions de cas en 2012. Parallèlement, la diminution de sensibilité de NG aux céphalosporines de troisième génération est un problème émergent. L'objectif de notre étude était de réaliser un génotypage des souches de NG isolées chez des patients présentant une infection génitale récidivante afin d'identifier les souches circulantes dans ces populations à risque et différencier entre récurrence et réinfection.

Méthodes :

Notre étude a porté sur 200 souches de NG (179 prélèvements urétraux, 7 prélèvements cervicaux, 14 prélèvements rectaux) isolés chez 84 patients (80 hommes) ayant consulté au moins à deux reprises pour une infection génitales à NG entre 2004 et 2012 à l'Hôpital St Louis, Paris. Les récurrences ont été définies par des infections génitales avec des isolats de NG de même séquence type (ST) survenant dans un intervalle de moins de 6 mois. Les réinfections sont caractérisées par des infections récidivantes avec des NG de ST différents. Le typage moléculaire a été réalisé par la technique de référence NG-MAST.

Résultats :

L'âge moyen dans notre population était de 30 ans, avec 60% d'hommes homosexuels (HSH) et 40% hétérosexuels. Les co-infections avec le VIH ou *Chlamydiae trachomatis* ont été observées dans 22.6% et 29% des cas, respectivement. Cent deux ST différents ont été caractérisés dont 37 étaient indéterminés. Les ST les plus fréquemment représentés étaient : ST2992 (12%), ST2 (8.5%), ST225 (6%), ST1407 (5%), ST766 (2,5%) et ST40 (2,5%). Les ST2992, ST225 et ST1407 étaient surreprésentés dans la population HSH, le ST2 n'a été retrouvé que dans la population hétérosexuelle. Les réinfections avec un isolat de ST différent étaient les plus fréquentes (78,6%). Lors de récurrences (21,4%), 2 ST étaient majoritaires : les ST2992 et ST2 associés respectivement aux patients HSH et aux hétérosexuels. Les récurrences sont apparues comme plus fréquentes dans la population hétérosexuelle suggérant un probable défaut d'utilisation de protection entre partenaires sexuels ainsi qu'un probable sous diagnostic du partenaire contact.

Conclusion :

Notre étude souligne l'intérêt du génotypage de NG par la méthode NG-MAST pour distinguer entre récurrence et réinfection. Bien qu'elle ne permette pas de distinguer entre rechutes réelles et récurrences, cette méthode pourrait nous indiquer quelles mesures de prévention sont adéquates dans la population consultant pour un deuxième épisode d'infection NG.

P59. Evaluation du kit FluoroType® NG et CT pour le diagnostic d'Infections Sexuellement Transmissibles

*Bercot B.*¹, *Mougari F.*², *Amarsy R.*², *Meunier F.*³, *Cambau E.*¹

¹ Service de Bactériologie-Virologie, APHP, Hôpital Lariboisière-St Louis-Fernand Widal, Laboratoire associé au CNR du gonocoque; IAME, UMR 1137, INSERM, F-75018 Paris, France; Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75018 Paris, France

² Service de Bactériologie-Virologie, APHP, Hôpital Lariboisière-St Louis-Fernand Widal; IAME, UMR 1137, INSERM, F-75018 Paris, France; Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75018 Paris, France

³ Service de Bactériologie-Virologie, APHP, Hôpital Lariboisière-St Louis-Fernand Widal, Laboratoire associé au CNR du gonocoque

Objectifs :

Evaluer les performances de détection par PCR en temps réel de l'ADN de *Neisseria gonorrhoeae* (NG) et de *Chlamydiae trachomatis* (CT) par les trousse FluoroType®NG et FluoroType®CT (Hain, Lifesciences) par rapport au système automatisé m2000 Abbott.

Méthodes :

Entre novembre 2012 et juillet 2013, 64 premiers jets d'urines et 15 prélèvements vaginaux en milieu Eswab ont été testés prospectivement pour la détection de NG et CT. Afin de tester un nombre plus important d'échantillons positifs, 36 prélèvements positifs ont aussi été étudiés rétrospectivement. Après ajout du contrôle interne du kit, l'ADN de ces 115 prélèvements a été extrait par le kit Fluorolyse à partir d'un culot de 500ml de prélèvement selon les recommandations du fabricant. L'amplification a été réalisée sur le même ADN par la technologie associée aux sondes d'hybridation HyBeacon à l'aide des kits FluoroType NG et FluoroType CT (Hain) et de l'amplificateur Fluorocycler (Hain). Les résultats obtenus ont été comparés à ceux du m2000 (Abbott). Les discordances ont été départagées par un troisième test, le test Anyplex STI-7 (Eurobio)

Résultats :

Sur les 115 prélèvements, le test Fluorotype a détecté 27 (23,4%) échantillons positifs pour NG et 21 (18,2%) échantillons positifs pour CT. Trois résultats étaient invalides avec le test Fluorotype NG et se sont révélés négatifs après dilution de l'ADN au 1/10. Le pourcentage de concordance entre FluoroType et m2000 était respectivement de 98,3% pour CT et 93,9% pour NG. A l'aide du troisième test pour départager les discordances, le FluoroType®NG obtient une sensibilité (Ss) à 100%, une spécificité (Sp) à 94,4%, une valeur prédictive positive (VPP) à 81,5% et une valeur prédictive négative (VPN) à 100% pour la détection de *N. gonorrhoeae*. Pour le FluoroType® CT, les valeurs sont : Ss 95,2%, Sp 98,9%, VPP 95,2% et VPN 98,9% pour le dépistage de *C. trachomatis*.

Conclusion :

Les nouvelles trousse FluoroType donnent des résultats similaires à la trousse connue m2000 pour la détection du gonocoque et de *C. trachomatis*. Toutefois, quelques discordances entre les deux trousse ont été observées

P60. Les bactériémies à *Pseudomonas aeruginosa*

Sahli E., Bendjama A., Mezaghcha W., Radji N.

Laboratoire de microbiologie, CHU Sétif ; faculté de médecine, Université Sétif1, Algérie

Les bactériémies à *Pseudomonas aeruginosa* sont essentiellement nosocomiales, survenant chez des sujets porteurs de dispositifs médicaux ou immunodéprimés. Une antibiothérapie inadéquate est un des facteurs majorant le risque de mortalité lié à ces bactériémies.

Objectifs

L'objectif de notre étude est d'évaluer la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* isolé de bactériémies au laboratoire de microbiologie du CHU de Sétif, afin d'orienter une antibiothérapie empirique rapide.

Matériels et méthodes

Notre étude est rétrospective de janvier 2008 à décembre 2012, portant sur les souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées de bactériémie. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques est effectuée par antibiogramme standard et CMI selon les recommandations du Clinical Laboratory Standard Institute.

Résultats

66 souches bactériémiques de *Pseudomonas aeruginosa* sont recensées durant la période d'étude. Elles sont isolées dans 77 % chez les adultes, 15 % chez les enfants et 7.5 % chez le sujet âgé. La moitié des souches sont isolées chez des patients immunodéprimés. Les pourcentages de résistance aux antibiotiques sont de : 24.6 à la pipéracilline, 14.3 à la ceftazidime, 10.9 à l'imipénème, 3.9 à l'amikacine et 6.2 à la ciprofloxacine. 3 % des souches ont une CMI à la colistine supérieure à 4 mg/l.

Conclusion

La ciprofloxacine, l'imipénème et l'amikacine restent les plus actifs. L'association de 2 voire 3 de ces antibiotiques est recommandée en cas de suspicion de bactériémie à *Pseudomonas aeruginosa* essentiellement chez les immunodéprimés.

P61. Place du dosage de la GDH par le kit Liaison *C. difficile* GDH dans l'algorithme de prise en charge des patients suspects d'infection à *Clostridium difficile*

Herwegh S., Le Guern R., Wallet F., Courcol R.

Institut de Microbiologie- Centre de Biologie Pathologie- CHRU de Lille

Objectifs :

Clostridium difficile (CD) est l'agent principal des diarrhées post-antibiotiques nosocomiales. La détection rapide de cette étiologie est un gage de moindre dissémination de la bactérie au sein des unités de soins et une meilleure prise en charge des patients par les équipes d'hygiène. La culture conventionnelle reste trop longue pour rendre une réponse rapide au clinicien. Aussi des tests rapides sont nécessaires pour éliminer cette cause dans le cas de suspicion d'infection à CD et lever rapidement l'isolement des patients en attente de diagnostic.

Matériels et méthode :

169 selles liquides (Classification de Bristol 5-7) ont été évaluées par dosage de la GDH (kit Liaison *C. difficile* GDH-Diasorin) afin d'obtenir rapidement une réponse négative, en comparaison à la technique usuelle du laboratoire Xpert *C. difficile* (Cepheid) donnant une réponse en 45 min (Clin Infect Dis 2013 57:494-500). La praticabilité du nouveau kit a également été expertisée en termes de temps technique et délai de réponse final.

Résultats :

Le taux de positivité (critère toxigène) était de 19,5% dans notre série. Le test GDH dépistait 10% de souches non toxigènes en supplément ne permettant pas d'exclure l'absence rapide d'infection à CD toxigène. Quatre cas (2,3%) correspondant à 2 Tox+/GDH- et 2 cas équivoques étaient retrouvés dans l'étude. La praticabilité du dosage de la GDH nécessitait 35 min de préparation incluant 2 phases de centrifugation. Les échantillons étaient donc groupés par séries. Le test lui-même prenait 35 min obtenant un résultat définitif en 70 min versus 50 min pour Cepheid avec 3 min de manipulation technique.

Conclusion :

Notre étude portait sur l'utilisation d'un algorithme en deux temps pour la prise en charge des patients suspects d'infection à CD. Le kit Liaison *C. difficile* GDH a permis l'obtention d'un résultat négatif dans 68% des cas testés. Pour les 50 selles positives, la confirmation de la toxigénicité était nécessaire à l'obtention d'un résultat définitif, repoussant le délai d'au moins 50 minutes. Le kit de dosage de la GDH s'intègre correctement dans un algorithme en deux temps mais retarde dans 30% des cas testés le résultat d'un minimum de 50 minutes. De plus, en comparaison à la technique usuelle, il nécessite la mobilisation de temps technique supplémentaire.

P62. UF1000i et tubes boraté : peut-on différer le sédiment urinaire?*Cocquerelle V., Rieder-Monsch C., Rousée J.-M., Gueudet T.**Laboratoire Schuh Bio 67***Objectifs**

Les tubes contenant de l'acide borique permettent de différer la mise en culture des urines en préservant la numération bactérienne. Cependant, l'organisation des laboratoires nécessite souvent le transport des prélèvements sur un plateau technique où sont réalisés les sédiments urinaires. Cette étude a pour but d'évaluer l'impact du délai d'acheminement sur les GB, les GR, le comptage bactérien et la présence d'alertes de l'UF1000i, mais surtout sur la prise en charge clinique et l'interprétation de l'ECBU.

Matériel et Méthode

60 urines sélectionnées pour cette étude et transférées rapidement en tube boraté ont été analysées à +2h, +8h, +24h et +48h après l'heure de prélèvement sur l'UF1000i. Le mode automatique a été privilégié afin d'assurer l'homogénéisation du prélèvement. Ces derniers ont été conservés à température ambiante, et couverts de parafilm pour éviter toute concentration. Une gélose au sang estensemencée pour les urines considérées comme négatives (GB <25/μl et bactéries <100/μl), une gélose chromogène CPS3 (bioMérieux) pour les autres.

Résultats

Le comptage à T8/T24/T48, en % de la valeur initiale à T2, est en moyenne de 92/86/91% pour les GR, 96/81/70% pour les GB et de 91/97/95% pour les bactéries (valeurs aberrantes en % des données < 20/μl non prises en compte).

Sur les 60 urines, 8 auraient été considérées comme négatives à T8/T24/T48, alors que seules 7 l'étaient à T2. Pour cette 8^{ème} urine, les GB étaient à 7/6/5/5/μl, le chiffre des bactéries était à 130 à T2 et < 100 ensuite ; la culture était stérile.

Sur 10 urines avec une valeur faible de GB (27-60 GB/μl à T2), 4 sont en dessous du seuil de 25 GB/μl à T8, et 5 à T48. Parmi ces échantillons, une seule culture était positive (10^4 E.coli) ; les GB étaient à 55/42/39 et 36/μl à T2/T8/T24 et T48.

Le nombre d'alerte du Sysmex augmente entre T2 et T48 (respectivement 4 à 10 sur 60 échantillons).

Conclusions

Lors de la réalisation du sédiment urinaire, l'heure de prélèvement, le transfert en tube boraté et le délai d'acheminement sont des points critiques. La diminution des GB, de l'ordre de 20 % à 24h, et de 30% à 48h, est un aspect qu'il est indispensable de prendre en compte dans l'interprétation. Bien que sur-estimés par rapport à la numération en culture, la stabilité du nombre de bactéries détectées par le Sysmex est un critère important à inclure dans l'interprétation de l'ECBU. Cette lyse des GB dans le temps est toutefois à relativiser, car dans notre étude, aucun échantillon n'aurait été interprété différemment à T2, T8, T24 ou T48.

P63. Sérotypes et sensibilité aux antibiotiques de *Streptococcus pneumoniae* en Tunisie

Marzouk M., Ferjani A., Ben Salem Y., Ben Harb H., Haj Ali M., Hannachi N., Boukadida J.

Laboratoire de Microbiologie et d'Immunologie UR12SP34, CHU Farhat Hached

Objectifs

Déterminer la sensibilité aux antibiotiques et la distribution des sérotypes ainsi que la couverture des sérotypes inclus dans les vaccins anti-pneumococciques conjugués à 7, 10 et 13 valences vis-à-vis des infections pneumococciques dans notre région.

Patients et méthodes

Cette étude a porté sur toutes les souches non redondantes de *S. pneumoniae* isolées dans notre laboratoire (2008-2013). L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée selon les recommandations du CA-SFM. La détermination des CMI de la pénicilline G, l'amoxicilline et le céfotaxime a été réalisée par méthode E-test (ABBIODISK). Le sérotypage des souches a été réalisé par méthode d'agglutination en utilisant le kit Pneumo-Test-Latex® (Statens Serum Institute).

Résultats

Un total de 203 souches de *S. pneumoniae* ont été inclus. Cent huit souches invasives et 95 non invasives provenaient de patients âgés entre 1 mois et 85 ans. Le taux de pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP) était de 31,3%. Le taux de PSDP était plus élevé parmi les souches non invasives (38,9%) que les invasives (23,1%). Aucune souche résistance n'était résistante pour les glycopeptides et la rifampicine. Les sérotypes prédominants dans notre région étaient les sérotypes 14 (26,9%) et 1 (21,8%). La couverture des sérotypes inclus dans les vaccins anti-pneumococciques conjugués à 7, 10 et 13 valences était respectivement de 40,3%, 62,1% et 68,1%.

Conclusion

Afin d'optimiser la prise en charge des infections pneumococciques, l'antibiothérapie et la vaccination anti-pneumococcique doivent tenir compte des données actuelles et locales spécifiques à chaque région.

P64. Emergence d'infections nosocomiales à *Enterococcus faecium* résistant aux glycopeptides à L'ouest Algérien.

*Ferroudja Y.*¹, *Rahal K.*², *Naim M.*¹, *Louil A.*³, *Tali Maamar H.*², *Laazizi A.*³, *Benmahdi L.*³

¹ Service de microbiologie, Hôpital central de l'armée :Dr Mohamed Seghir Nekkache

² Service de bactériologie médicale et d'antibiophtérapie, Institut Pasteur d'Alger,Alger,Algérie

³ Laboratoire central de biologie,Hôpital militaire universitaire d'Oran,Dr Mohamed Benaissa,Oran,Algérie

Objectifs :

Les entérocoques sont des hôtes naturels du tube digestif de l'homme et sont responsables d'infections nosocomiales, posant des problèmes de santé publiques aggravées par l'émergence de souches d'entérocoques résistantes aux glycopeptides (ERG).

L'ERG est endémique aux USA et dans quelques pays européens. En Algérie le premier *Enterococcus faecalis* résistant à la vancomycine a été isolé en 2007, et le premier *Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine en 2011.

Notre objectif est de décrire deux cas d'infections nosocomiales à *Enterococcus faecium* résistant à haut niveau aux glycopeptides (EFRG) apparues à l'ouest algérien.

Sujets :

Deux souches d'EFRG ont été isolées dans un CHU à l'ouest Algérien ; la première d'un pus de péritonite post opératoire chez un patient âgé de 43ans, hospitalisé au service de chirurgie générale et la deuxième d'un pus de plaie opératoire d'une patiente âgée de 55 ans, hospitalisée au service de réanimation , un écouvillonnage rectal et un second prélèvement de pus ont été réalisés par la suite chez les deux patients. Les pus ont été ensemencés sur milieux usuels et enrichis et l'écouvillonnage rectal sur milieu contenant la vancomycine à 6mg /L. L'identification biochimique a été faite par des tests biochimiques (Api Strepto Biomérieux ®). L'antibiogramme a été réalisé par la méthode de diffusion selon les recommandations du CLSI et du CA-SFM sur Muller Hinton et les CMI vancomycine et teicoplanine par E-test. La recherche des gènes de résistance aux glycopeptides a été effectuée par PCR multiplexe (GenoType ® *Enterococcus*, BioCentric).

Résultats :

L'*E. faecium* résistant aux glycopeptides a été isolé à partir des deux prélèvements de pus chez les deux patients mais pas dans les écouvillonnages rectaux. Ces deux souches présentaient le même phénotype de résistance et manifestaient des résistances associées à d'autres antibiotiques : ampicilline 10 µg, gentamicine 120 µg, kanamycine 1000µg, streptomycine 300µg, érythromycine 15µg, levofloxacine 5µg, tétracycline 30µg, pristnamycine 15µg, rifampicine 30µg, et furanes 300µg.les valeurs des CMI vancomycine et teicoplanine étaient élevées pour les deux souches (256 µg/ml).ces deux souches possédaient le gène van A.

Conclusion :

Devant l'émergence d'infections nosocomiales à *E faecium* résistant aux glycopeptides en Algérie, il est nécessaire que les laboratoires améliorent leurs recherches et que les comités de lutte contre les infections nosocomiales les incluent dans le protocole de surveillance des bactéries multirésistantes.

P65. Staphylocoques résistants à la méticilline : intérêt clinique et comparaison de méthodes de la détermination des CMI des glycopeptides

Zucchini L.¹, Guillard T.², Limelette A.², Lebreil A.-L.³, Brasme L.², De Champs C.², Vernet-Garnier V.²

¹Bactériologie CHU Robert Debré Reims

²Bactériologie CHU Robert Debré Reims; EA4687 SFR Cap-Santé Reims

³EA4687 SFR CAP-Santé Reims

Objectifs :

(1) Evaluation de l'intérêt du contrôle de la CMI de la vancomycine (V) ou de la teicoplanine (T) des souches de *Staphylococcus aureus* et des staphylocoques à coagulase négative résistantes à la méticilline (SAMR et SCNMR) afin d'optimiser l'antibiothérapie, (2) Comparaison des méthodes de détermination de ces CMI.

Matériels et méthodes :

35 souches cliniques de SAMR et 65 SCNMR (53 *S. epidermidis*, 5 *S. warneri*, 4 *S. haemolyticus*, 1 *S. hominis*, 1 *S. cohnii*, et 1 *S. capitis*) isolées chez 96 patients de juin à novembre 2012, (34 cathéters, 12 hémocultures, 22 prélèvements d'infections ostéo-articulaires complexes, 24 plaies, 8 autres). Les CMI de V et T rendues par le Vitek2® (cartes AST-P581, -P631) (bioMérieux®), ont été déterminées en parallèle en duplicate par bandelettes E-test et dilution en milieu gélosé (DMG). La souche de *S. aureus* ATCC 25923 a été utilisée comme contrôle.

Résultats :

Les CMI (min-max) de V sont les suivantes : ≤ 0,5-4 mg/L avec le Vitek2, 0,5-8 mg/L avec les E-test et 0,5-4 mg/L par DMG avec une concordance de 96% entre Vitek2 et E-test, 95% entre Vitek2 et DMG et 97% entre E-test et DMG. Les CMI de V sont ≤ à 2mg/L (S) pour toutes les souches de SAMR avec les 3 méthodes. Pour les SCNMR, les CMI de V sont > à 2mg/L (R) dans 4/65 cas (6,2%) avec le Vitek2, 3/65 (4,6%) avec E-test et 1/65 (1,5%) par DMG. Les CMI de T sont réparties selon les bornes suivantes : <0,5-8 mg/L avec le Vitek, 2-24 mg/L avec les E-test et 0,5-8 mg/L par DMG avec une concordance de 75% entre Vitek et E-test, 69 % entre Vitek et DMG et 78% entre E-test et DMG. Pour les SAMR, les CMI de T sont > à 2 mg/L (R) dans 1/35 cas (2,9%) avec le Vitek2, 2/35 (5,7%) avec E-test et 2/35 (5,7%) par DMG. Pour les SCNMR, les CMI de T sont > à 4 mg/L (R) dans 27/65 cas (41,5%) avec le Vitek2, 17/65 (26,2%) avec E-test et 10/65 (15,4%) par DMG. Au sein des SCNMR catégorisés « S » à la V, entre la technique E-test et la DMG, les CMI diminuent de 2 à 1 mg/L (n=6), de 2 à 0,5 mg/L (n=2) soit 13% des cas et pour la T de 4 à 2 mg/L (n=7), de 3 à 2 (n=2), de 2 à 1 (n=2) et de 2 à 0,5 mg/L (n=1) soit 23 % des cas.

Conclusions :

Les méthodes utilisant le Vitek2® et les E-test® sur-évaluent le nombre de souches « R » aux glycopeptides. De plus, pour les souches catégorisées « S » par ces techniques, il est utile de vérifier la valeur précise des CMI par la méthode de référence afin d'optimiser le traitement des infections graves à SCNMR et de préserver si possible l'utilisation de la daptomycine.

P66. Caractérisation de souches de portage nasal de *Staphylococcus aureus* en milieu communautaire à Bouaké, Côte d'IvoireAkoua Koffi G.C.¹, Monemo P.¹, Tia H.¹, Cissé A.¹, Herrmann M.², Becker S.²¹Laboratoire de Bactériologie-Virologie, CHU de Bouaké/UFR Sciences Médicales, Université Alassane Ouattara, 01 BP 1174 Bouaké – Côte d'Ivoire²Institut de Microbiologie Médicale et de l'Hygiène, Hôpital Universitaire de Saarland, Homburg - Allemagne**Introduction**

Le niveau de résistance aux antibiotiques et la distribution clonale de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) sont peu documentés dans les régions subsahariennes. Les souches de *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) communautaires productrices de leucocidine de Panton-Valentine peuvent induire des infections staphylococciques nécosantes. La caractérisation bactériologique et épidémiologique des souches de *S. aureus* aussi bien communautaires qu'hospitalières s'avère nécessaire pour une meilleure compréhension de sa pathogénie dans différentes régions géographiques. L'objectif était de déterminer le profil de résistance des souches *S. aureus* communautaires isolées à Bouaké, Côte d'Ivoire, dans le cadre d'un projet multicentrique «African-German network on Staphylococci».

Matériel et méthodes

Il s'agit d'une étude transversale menée d'avril à juillet 2013 dans la ville de Bouaké. A l'aide de dispositif de collecte comprenant un écouvillon stérile et une tube de milieu de conservation (Copan Liquid Amies Elution Swab; Brescia, Italie), un écouvillonnage nasal a été effectué chez des sujets volontaires. Les méthodes bactériologiques conventionnelles pour l'isolement (screening sur gélose au sang frais, recherche de catalase et de coagulase) ont été complétées par la spectrométrie de masse (MALDI-TOF) pour la confirmation, l'antibiogramme en milieu gélosé et l'analyse moléculaire de gène *mecA* et de leucocidine de Panton-Valentine (PVL).

Résultats

A partir de 363 écouvillons collectés chez des sujets dont l'âge varie de 2 ans à 75 ans, 100 souches de *S. aureus* (27,5%) ont été isolées parmi lesquelles 97 confirmées en spectrométrie de masse. Vis-à-vis des antibiotiques testés, 89% présentaient une résistance à la pénicilline, 56% à la tétracycline, 29% au cotrimoxazole, 14% à la ciprofloxacine, 3% à la rifampicine, et une souche (1,03%) a été prouvée résistante à la méticilline ainsi qu'à l'imipénème, à la tétracycline, à la gentamicine, à la ciprofloxacine, à la moxifloxacine, et positive pour le gène *mecA* et du gène codant la PVL. Plusieurs résistances combinées ont été observées (58,3%) dont 19,6% concernaient l'association pénicilline - ciprofloxacine parmi lesquelles 36,4% présentaient également une résistance à la moxifloxacine, tétracycline et cotrimoxazole. Cependant toutes les souches étaient sensibles à la vancomycine, à la fosfomycine, à l'acide fusidique, à la daptomycine et à la tigecycline.

Conclusion

La prévalence observée de la colonisation nasale par *S. aureus* est similaire aux conclusions d'études dans d'autres régions géographiques. Fait intéressant, la prévalence du portage nasal de SARM était faible. Toutefois, certaines souches méticillino-sensibles se sont révélées multirésistantes à des molécules d'utilisation peu courante en milieu communautaire.

Mots-clé : portage nasal, *Staphylococcus aureus*, multirésistance, Bouaké

P67. Caractérisation de souches d'actinomycètes isolée de milieu extrême (sebkha de Kenadsa)*Messaoudi O., Bendahou M., Benamar I.**Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'agroalimentaire biomédicale et à l'environnement (LAMMABE) Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.*

Dix échantillons du sol ont été prélevés à partir de différents endroits de sebkha de Kenadsa (Béchar, Algérie) par la technique de **Pochon** et **Tardieux** (1962). Pour l'isolement des actinomycètes nous avons utilisé quatre milieux de cultures : caséine amidon agar, ISP2, Bennette et le milieu amidon extrait de levure peptone. Dans chaque milieu de culture un antifongique (amphotéricine B à 50µg/l) et un antibactérien (polymyxine 20µg/l) ainsi que 12% de NaCl ont été ajoutés. L'activité antimicrobienne est mise en évidence par la technique de cylindre agar contre huit bactéries teste. Le meilleur isolat est sélectionné. L'extraction des molécules bioactives à partir du milieu ISP2 liquide est réalisée en utilisant trois solvants de polarités croissantes (chloroforme, butanol, acétate d'éthyle), l'activité antimicrobienne est effectuée par la technique de disque de papier contre des bactéries testes. La caractérisation des molécules antimicrobiennes est réalisée par chromatographie, dans le système de solvant éthanol-ammoniaque-eau (8/1/1), en utilisant différent révélateurs: ninhydrine, chlorure de ferre ferrique, H₂SO₄-formaldehyde et le réactif de Molish. L'étude spectrale des substances antimicrobienne est réalisé par UV-visible et infrarouge. L'identification de l'isolat sélectionné est réalisée selon des critères morphologiques, chimio-taxonomiques, physiologiques, biochimiques et cultureux.

18 actinomycètes ont été isolés à partir de différents échantillons. Tous les isolats ont montré une activité antimicrobienne contre au moins un microorganisme teste utilisé. Un isolat (LAM143CG3) a été sélectionné pour son pouvoir antimicrobien intéressant. La caractérisation des substances antimicrobiennes indique la présence d'une seule tache active (Rf= 0.73). La révélation de cette tache indique la présence des groupements amines et phénols. L'analyse spectrale par UV-VISIBLE indique l'absence des pics polyéniques, tandis que le spectre infrarouge à confirmer la présence des groupements amines. L'isolat, LAM143CG3, a été rapproché au genre *Spirillospora*. Cependant, l'existence de plusieurs différences physiologiques et biochimiques entre notre isolat et les espèces du genre *Spirillospora* (*S. rubra* et *S. albida*) nous laisse à supposer qu'il s'agit d'un nouveau membre dans ce genre.

P68. Evaluation du β -LACTA test pour la détection de la résistance aux céphalosporines de troisième génération chez les bacilles Gram-négatifs directement dans les hémocultures.

Vandervinne S., Huang T.-D., Laurent T., Glupczynski Y.

Cliniques Universitaires Saint-Luc

Introduction :

La résistance par l'intermédiaire de la production de β -lactamases hydrolisant les céphalosporines de troisième génération (C3G) est un mécanisme de résistance fréquent et préoccupant chez les bacilles Gram-négatifs aérobie. Le β -LACTA test® (BLT ; Bio-Rad) est un test rapide basé sur l'hydrolyse d'une céphalosporine chromogénique, HMRZ-86, pour détecter une résistance aux C3G. Il fournit une réponse rapide permettant une adaptation rapide de l'antibiothérapie empirique.

Méthode :

Pour chaque flacon d'hémoculture (BacT/Alert, bioMérieux) positif dont l'examen direct montre des bacilles Gram-négatifs (les anaérobies ont été exclus de l'analyse), nous avons réalisé un β -lacta test directement sur bouillon d'hémoculture après concentration dans un tube avec gel séparateur avec une lecture en trois temps (15, 30, 45 minutes). Nous avons comparé les résultats obtenus avec les résultats de sensibilité aux disques de ceftazidime et cefotaxime réalisés en méthode de diffusion sur les souches d'entérobactéries subcultivées correspondantes.

Résultats :

Sur 100 BLT réalisés, 10 étaient positifs, 89 négatifs et 1 non interprétable (une souche d'*Escherichia coli*).

Parmi les positifs : 4 souches de *Klebsiella pneumoniae* et 6 souches d'*Escherichia coli*.

Parmi les négatifs : 2 souches de *Morganella morganii* , 2 souches d'*Enterobacter asburiae*, 7 souches de *Klebsiella oxytoca*, 2 souches de *Serratia marcescens* , 1 souche d'*Enterobacter aerogenes*, 1 souche de *Proteus mirabilis* , 68 souches d'*Escherichia coli* et 6 souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

Les 10 souches positives au BLT se sont révélées résistantes à la ceftazidime et au cefotaxime, quant aux 89 souches négatives au BLT, elles étaient sensibles à ces deux antibiotiques.

Nous avons donc obtenu pour ce test une sensibilité et une spécificité de 99%.

Conclusion :

D'après notre étude, le β -lacta test réalisé directement à partir du sang, permet une évaluation rapide, sensible et spécifique de la résistance aux C3G des bacilles Gram-négatifs aérobie isolés dans les hémocultures. Le résultat permet une adaptation plus rapide du traitement avant l'obtention de l'antibiogramme.

P69. *Actinobaculum schaalii* pathogène urinaire émergent : étude rétrospective, CHU de Nice

Lotte R., Lotte L., Touati C., Degand N., Gaudart A., Landraud L., Ruimy R.

Laboratoire de Bactériologie CHU de Nice

Objectifs :

Actinobaculum schaalii est un bacille Gram positif anaérobie facultatif, commensal de la flore périnéale. Son implication en pathologie infectieuse est sous estimée à cause de sa croissance lente sur milieux usuels en aérobiose, et des difficultés d'identification par les méthodes phénotypiques standard.

L'objectif de cette étude était d'évaluer la pathogénicité d'*A. schaalii* retrouvé dans les prélèvements des patients au CHU de Nice sur une période de 2 ans.

Méthodes :

La recherche d'*A. schaalii* dans les urines a été réalisée par l'ensemencement d'une gélose au sang incubée en anaérobiose minimum 48 h, lorsque l'examen direct retrouvait des bacilles Gram positif. L'identification à partir des colonies a été obtenue par spectrométrie de masse MALDI-TOF ou séquençage de l'ADNr 16S. Un antibiogramme était ensuite effectué pour tous les isolats positifs.

L'extraction des données à l'aide du système informatique du laboratoire a permis de comptabiliser toutes les cultures positives à *A. schaalii* de janvier 2012 à janvier 2014. Pour ces prélèvements, une analyse rétrospective de données épidémiologiques, cliniques et microbiologiques a été effectuée.

Résultats :

Au total 42 isolats positifs correspondant à 32 patients ont été retrouvés. L'âge médian est de 73 ans avec un sex ratio homme/femme de 60%. *A. schaalii* est isolé dans des prélèvements d'urines (60%), mais aussi de pus (20%), d'hémocultures (9%), de spermocultures (9%) et d'os (<2%).

Parmi les 20 patients chez lesquels *A. schaalii* a été identifié dans les urines, une leucocyturie significative était constamment associée et chez 17 d'entre eux, une pathologie urologique sous-jacente était connue. Dans 30% des cas, la présence d'*A. schaalii* était responsable d'une infection urinaire. Enfin, 100% des souches d'*A. schaalii* isolées étaient sensibles aux β -lactamines testées.

Conclusions :

A. schaalii est isolé majoritairement chez les hommes âgés. Il est retrouvé le plus souvent dans les urines comme colonisant mais est parfois responsable d'infections urinaires ou invasives opportunistes chez des patients présentant un terrain urologique sous-jacent. Pour ces patients, une recherche de ce germe par ensemencement d'une gélose au sang incubée 48 à 72h en anaérobiose est recommandée lorsque l'examen direct retrouve des bacilles Gram positif associés à une leucocyturie.

L'utilisation récente en routine de techniques d'identification utilisant la biologie moléculaire ou la spectrométrie de masse devrait permettre une meilleure connaissance de l'épidémiologie des infections à *A. schaalii*.

P70. Effets antibactérien et antiviral du Laiton AB+

Khorsi-Cauet H.¹, Biendo M.², Bach V.³, Léké A.², Obry C.², Ségard C.², Sion M.⁴,

¹UFR Médecine UPJVLaboratoire PERITOX-INERIS UMR-Io1 Ineris

²CHU Amiens

³Laboratoire PériTox-INERIS, UFR de Médecine d'Amiens

⁴Laboratoire PériTox-INERIS, UFR de Médecine d'Amiens; Institut d'Ingénierie de la Santé, Université de Picardie Jules Verne

Objets :

Les infections nosocomiales, réel problème de santé publique, touchent chaque année plusieurs milliers de patients en France. Elles peuvent se transmettre de manière directe, manu portées, ou indirecte, via des surfaces contaminées, comme les poignées de portes. De nombreuses études ont démontré que l'utilisation d'équipements hospitaliers en alliage cuivreux diminuait la charge microbienne sur ces équipements. Le cuivre et certains alliages cuivreux sont reconnus depuis 2006 officiellement par l'EPA (agence Américaine de protection de l'environnement) pour leurs propriétés antimicrobiennes.

Matériels et méthode :

Afin de valider les aptitudes antibactériennes de l'alliage AB+ développé par la société FAVI, sur le long terme, une étude *in situ* a été réalisée dans deux services de pédiatrie du CHU d'Amiens en comparant le potentiel antimicrobien de 14 poignées en laiton AB+ avec celui de 14 poignées témoins en inox. Durant 3 mois, des prélèvements (bimensuels) ont été réalisés sur les poignées pour la recherche de bactéries par la méthode d'écouvillonnage selon la norme NF ISO 18593 : 2004. Les bactéries ont été prélevées, dénombrées et identifiées sur les poignées tests et témoins. Une étude *in vitro* a été réalisée en virologie afin de tester l'effet de l'alliage sur l'Entérovirus. Cette étude a été réalisée en laboratoire, CBH CHU Amiens, en comparant des poignées témoins en inox et des poignées en Laiton AB+. Pour cette étude *in vitro* de virologie, la culture cellulaire et la RT-PCR ont été utilisées.

Résultats principaux :

Les résultats de bactériologie sur le long terme révèlent une diminution significative du nombre de bactéries sur les poignées tests en laiton par rapport aux poignées témoins en inox (Entérobactéries $p=0.0364$, Streptocoques/Entérocoques $p=0.0287$). Pour l'étude *in vitro* de virologie, une perte de viabilité des virus étudiés est observée sur le laiton AB+ en comparaison à l'inox (Effet du laiton AB+ sur l'Entérovirus $p<0.0001$). Pour l'Entérovirus, l'étude a révélé qu'au bout de 3 à 6h de contact entre le virus et le laiton AB+, le virus n'était plus viable.

Conclusions :

Les diminutions du nombre de bactéries témoignent des propriétés bactéricides du laiton AB+ sur le long terme. Pour la virologie, durant l'étude *in vitro*, un effet du laiton AB+ a été mis en évidence sur l'Entérovirus.

Mots clés : Cuivre ; laiton ; antimicrobien ; bactéries ; virus; poignées ; *in situ* ; *in vitro* ; infections nosocomiales.

P71. Action de l'inuline sur le microbiote intestinal

Reygnier J.¹, Joly C.², Delanaud S.², Depeint F.³, Gadonna P.³, Bach V.², Abdennebi-Najar L.³, Khorsi-Cauet H.²

¹UFR Médecine UPJV Laboratoire PERITOX-INERIS UMR-Io1 Ineris

²Laboratoire PériTox-INERIS, UFR de Médecine d'Amiens

³Institut Polytechnique LaSalle Beauvais

Objectifs :

L'usage excessif de produits phytosanitaires, retrouvés en tant que résidus dans notre alimentation, est devenu au cours de ces dernières années un problème de santé publique. L'exposition quotidienne à ces substances est susceptible d'avoir de graves et irréversibles conséquences sur la maturation et le développement d'organes, notamment sur l'appareil digestif, premier système en contact avec les pesticides. Une étude antérieure sur un intestin artificiel (SHIME®) a montré qu'une exposition chronique à une faible dose de Chlorpyrifos (CPF), pesticide très utilisé dans l'agriculture picarde, entraîne une dysbiose intestinale (augmentation des populations d'Entérocoques et de Bactéroïdes au détriment des Lactobacilles et des Bifidobactéries) (C. Joly et al., 2012). La solution envisagée afin de réduire l'impact du CPF sur la microflore, est l'utilisation de prébiotiques dont les effets bénéfiques sur la restauration d'écosystèmes bactériens sont largement reconnus. A terme, l'objectif principal de cette étude est d'analyser l'impact d'une exposition chronique à une faible dose de CPF associée à l'inuline, sur la stabilité de la microflore. Tout d'abord, il convient de mener une étude contrôle sur l'effet de l'inuline sur la microflore intestinale.

Matériel et Méthodes :

Un intestin artificiel humain (SHIME®) a été utilisé pour réaliser cette étude *in vitro*. Il s'agit d'un dispositif artificiel composé de 6 fermenteurs sous agitation, à double paroi modélisant les principaux compartiments du tractus digestif (K. Molly et al., 1993). Les fermenteurs sont reliés les uns aux autres par des pompes péristaltiques et contiennent une solution primaire apportant les nutriments essentiels à la croissance des micro-organismes. Les 3 derniers fermenteurs (côlon ascendant, transverse et descendant) sontensemencés par un mélange de selles humaines. Trois points de cinétiques sont étudiés Jo (avant administration de l'inuline = témoin), J15 (effet court terme) et J30 (effet long terme).

Résultats :

Les résultats obtenus à l'issue de cette expérimentation contrôle indiquent une augmentation significative de la flore bénéfique que sont les Lactobacilles et les Bifidobactéries (J30 vs Jo $p < 0.05$; J30 vs Jo $p < 0.001$) au niveau du côlon mais également une diminution significative des Streptocoques et Entérocoques (J30 vs Jo $p < 0.05$).

Conclusion :

La prochaine expérimentation *in vitro* testera l'effet de l'apport d'inuline combiné à une faible dose de CPF (1 mg) afin de voir si le prébiotique contre l'effet néfaste du CPF sur la microflore intestinale.

P72. Trois syndromes hémolytiques et urémiques à *Escherichia coli* entérohémorragiques O91

Limelette A.¹, Guillard T.¹, Le Magrex Debar E.¹, Brasme L.¹, Wynckel A.², Guyot C.², Gouali M.³, Mariani-Kurkdjian P.⁴, De Champs C.¹

¹Laboratoire de bactériologie

²Service de néphrologie, Hôpital Robert Debré (CHU), Reims

³Centre National de Référence (CNR) des *Escherichia coli* et *Shigella*, Institut Pasteur, Paris

⁴Laboratoire associé au CNR des *Escherichia coli* et *Shigella*, Service de microbiologie, Hôpital Robert Debré, Paris

Introduction

Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) du sérogroupe O91 sont très rarement retrouvés en France. Les EHEC O157:H7 sont toujours prédominants, surtout chez les enfants de moins de 5 ans présentant un syndrome hémolytique et urémique (SHU). Mais, depuis l'épidémie de 2011 à EHEC O104:H4 en Europe, il est recommandé de renforcer la recherche des EHEC non-0157 également chez les adultes présentant des diarrhées sanglantes ou un SHU, pathologie sévère et potentiellement fatale.

Présentation des cas et résultats bactériologiques

Trois patients originaires de Champagne-Ardenne, âgés de plus de 65 ans, hospitalisés au CHU de Reims, l'un en juillet 2012, les deux autres en juillet 2013, ont présenté un SHU post-diarrhéique typique à EHEC O91. Tous trois sont décédés malgré une prise en charge thérapeutique adaptée. L'étude par PCR multiplex de ces souches virulentes d'*Escherichia coli* isolées dans les selles des trois patients a été réalisée par le laboratoire de bactériologie du CHU et a permis de détecter la présence des gènes *stx2* codant la shiga-toxine 2, principal facteur de virulence des EHEC, l'absence des gènes *stx1* codant la shiga-toxine 1 et *eae* codant l'intimine. Ces souches d'*E. coli* productrices de shigatoxine (STEC), mais *eae* négatif, sont dites «atypiques», elles appartiennent au sérogroupe O91 et sont classées actuellement dans le même sérotypage que les EHEC O104. Le typage moléculaire par électrophorèse en champ pulsé montre que les deux STEC retrouvés en juillet 2013 présentent le même profil, pouvant faire supposer une origine commune de contamination.

Conclusion

Les laboratoires de bactériologie médicale ont un rôle important dans l'isolement des souches cliniques de STEC non-O157 responsables de diarrhées sanglantes ou de SHU en France. La mise en évidence de leurs caractéristiques moléculaires et épidémiologiques, en collaboration avec le CNR, permet de renforcer les mesures de prévention.

P73. Co-infection à *Clostridium difficile* et *Escherichia coli* entérohémorragique O91

*Le Magrex Debar E.*¹, *Limelette A.*¹, *Guillard T.*¹, *J. Madoux J.*¹, *Wynckel A.*², *Guyot C.*², *De Champs C.*¹

¹Laboratoire de bactériologie

²Service de néphrologie, Hôpital Robert Debré (CHU), Reims

Introduction

Parmi les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC), certains appartiennent au séro groupe O91, très rare en France, et peuvent être responsables de diarrhées sanglantes et de syndrome hémolytique et urémique (SHU). Nous rapportons un cas de SHU post-diarrhéique à EHEC O91, faisant suite à une infection à *Clostridium difficile*.

Présentation du cas et résultats bactériologiques

Un homme de 71 ans, hospitalisé pour un syndrome occlusif, présente au 5^{ème} jour postopératoire, une diarrhée aiguë pour laquelle le diagnostic bactériologique d'infection à *Clostridium difficile* est positif. L'évolution initiale est favorable sous métronidazole per os. Au 17^{ème} jour d'hospitalisation, devant la réapparition de diarrhées sanglantes, le métronidazole est remplacé par de la vancomycine. L'état général du patient s'aggrave progressivement, avec la survenue d'une insuffisance rénale aiguë (IRA) sévère et de troubles neurologiques. Le diagnostic de microangiopathie thrombotique (MAT) est posé devant l'association d'une thrombopénie profonde, d'une anémie hémolytique avec schizocytose, et d'une IRA. La détection de *C. difficile* et des toxines A et B est alors négative, mais la recherche d'EHEC dans les selles du patient révèle la présence d'un *Escherichia coli* producteur de shiga-toxine (STEC). L'amplification par PCR multiplex, réalisée par le laboratoire de bactériologie du CHU de Reims, met rapidement en évidence le gène *stx2* codant la shiga-toxine 2, principal facteur de virulence des EHEC, l'absence des gènes *stx1* codant la shiga-toxine 1 et *eae* codant l'intimine. Cette souche dite «atypique» (*eae* négatif) appartient au séro groupe O91. Le diagnostic de SHU typique dû à un STEC non-O157 est confirmé. Malgré le traitement adapté, le patient décède dans la semaine suivant ce diagnostic.

Conclusion

En cas de diarrhée aiguë chez un patient d'âge supérieur à 65 ans et hospitalisé depuis plus de 3 jours, la recherche de *C. difficile* est systématiquement réalisée. Mais si les selles sont sanglantes ou si une thrombopénie, même modérée, apparaît, il faut penser à rechercher sans retard les EHEC. Depuis l'épidémie de 2011 à EHEC O104:H4 en Europe, il est actuellement recommandé de renforcer la recherche des EHEC non-0157 chez les adultes présentant des diarrhées sanglantes ou un SHU, pathologie sévère et potentiellement fatale. La précocité du diagnostic est importante pour la prise en charge thérapeutique.

P74. Nocardiosis: Clinical and Microbiological Aspects of a case series

Hamdad F.¹, Boiron P.², Rodriguez V.², Domont F.¹

¹CHU Sud

²UMR CNRS 5557, Center for Microbial Ecology

Members of the genus *Nocardia* are an ubiquitous group of environmental bacteria that usually manifest as an opportunistic pathogen, with the majority of infections occurring in patients with immunosuppressive conditions. The number of species that make up the genus *Nocardia* is rapidly expanding with the identification of more than 80 species.

Material and methods

We retrospectively revised through database analysis of all cases of nocardial infections diagnosed between August 2000 and December 2012. Most patients had follow-up for at least one year. Bacteriological diagnosis has mainly been established by isolation of *Nocardia*.

Results

During this period, 19 cases of nocardial were diagnosed. Mean age at presentation was 58.5 years (range: 16 to 90 years), and there was significant difference in the sex ratio (M/F, 3:1).

Six isolates (31.2%) were identified as *N. farcinica*, 3 isolates (15.2%) as *N. nova*, 2 isolates (10.5%) as *N. abscessus*, 1 isolate as *N. asteroides sensu stricto*, 1 isolate (5.2%) as *N. puris*, 1 isolate (5.2%) as *N. higoensis-shimofusensis*, and 1 isolate (5.2%) as *N. otitidiscavarium*. We did not provide species identification for 3 isolates (15.2%) and they are described as *Nocardia spp.*

We had 17 cases (89.5%) of lung nocardiosis, being five (29.4%) out of them also a systemic disease. Thirteen (68.4%) out of 19 patients were immunosuppressed. Mortality by nocardial infection was 36.8%.

Conclusion

Nocardiosis is difficult to diagnose on the basis of clinical, radiological or histological findings. The definitive diagnosis depends on the isolation and identification of *Nocardia* species which often involves the use of invasive samples. Due to the nature and gravity of nocardiosis, rapid and precise identification of these agents are important.

P75.Effets de la génotoxine CdtB des Hélicobacters sur les cellules épithélialesPéré-Védrenne C.^{1,2}, Mocan J.^{1,2}, Varon C.^{1,2}, Mégraud F.^{1,2}, Ménard A.^{1,2}¹INSERM U853, F-33076 Bordeaux, France²Université de Bordeaux, F-33076 Bordeaux, France.**Contexte et objectif**

L'implication des infections bactériennes chroniques dans la cancérogenèse est clairement établie avec *Helicobacter pylori*. Depuis, plusieurs Hélicobacters entéro-hépatiques ont été retrouvés au niveau des voies biliaires de patients atteints de cholangiocarcinomes ou du foie de patients atteints de carcinome hépatocellulaire, laissant envisager un rôle éventuel de ces bactéries dans le(s) processus carcinogène(s) hépatobiliaire(s). La démonstration du rôle de la génotoxine CDT « Cytolethal Distending Toxin » de *Helicobacter hepaticus*, via sa sous unité active CdtB, dans le développement de l'hépatocarcinome chez la souris fait de cette toxine un candidat pertinent dans l'activation de processus pro-cancéreux, au même titre que la protéine inflammatoire et oncogène CagA de *Helicobacter pylori*. La sous unité CdtB est la sous unité active de la toxine. Elle induit des dommages à l'ADN, un changement de la structure du cytosquelette et un arrêt du cycle cellulaire en phase G₂/M. La CDT est sécrétée par de nombreux pathogènes des muqueuses tels que les Campylobacters, certains Hélicobacters, certains *Escherichia*, *Haemophilus ducreyi* ... Malgré l'importance de cette toxine en pathologie humaine, les données concernant son rôle restent peu nombreuses. Ceci est dû à sa forte toxicité et aux difficultés relatives à sa production/pénétration dans les cellules cibles.

Afin de contourner ce problème, la CdtB a été directement exprimée dans les cellules à l'aide de lentivirus. Ainsi, nous étudions le rôle de la CdtB de *H. pullorum* et *H. hepaticus* dans l'inflammation et le développement de la carcinogenèse.

Méthodologie et résultats

La séquence du gène *cdtB* fusionnée à la séquence de l'épitope de l'hémagglutinine du virus humain influenza répétée 3 fois (séquence CdtB-3HA) a été clonée dans un plasmide, permettant la production des particules lentivirales. Ces lentivirus ont permis le transfert du gène *cdtB* dans différentes cellules épithéliales intestinales et hépatiques. Les résultats préliminaires ont permis de valider cette stratégie lentivirale. En effet, les effets connus de la CDT ont été reproduits : formation de cellules cytodistendues et plurinucléés avec un arrêt du cycle cellulaire en phase G₂/M.

De plus, la CdtB des Hélicobacters induit 1) des remaniements majeurs du cytosquelette; 2) la formation de lamellipodes ; 3) la translocation nucléaire de la β -caténine et du NF-KB et 4) la surexpression du microARN miR-155 et des gènes codant pour la cortactine et l'IL-8.

Conclusion

Ce modèle lentiviral a permis de faire sauter un verrou technologique et d'attribuer les effets observés directement à la CdtB. Nous avons montré que cette génotoxine entraîne un remodelage du cytosquelette, régule certains gènes et est pro-inflammatoire. Une étude globale de l'expression des gènes et microARN est envisagée afin 1) d'identifier de nouvelles voies de signalisation cellulaire affectées par la CdtB et 2) de déterminer son potentiel oncogénique.

P76. Antiseptics & antibiotics resistant *S. haemolyticus* causing bacteremia in pediatric intensive care unit

Mantion B., Cavalié L., Milhes M., Bertin F., Vieu G., Marty N., Bloom M.-C., Prère M.-F.

CHU-PURPAN Toulouse, laboratoire de Bactériologie-Hygiène

Among *Staphylococcus* species, *S. haemolyticus* is commonest isolated in neonatal blood infections in Toulouse and shows antibiotics multi-resistance.

The purpose of the present study was to update our knowledge of the prevalence and distribution of antiseptic resistance genes in clinical isolates of *S. haemolyticus* (SH) and to determine whether there is a difference between methicillin resistant and susceptible SH.

We studied 76 *S. haemolyticus* strains isolated from blood culture of neonates during 2012 and 2013 years in intensive care unit of children Toulouse hospital.

All isolates were analyzed for antimicrobial susceptibility of antibiotics by disk diffusion method and Vitek® MIC determination.

Antiseptics resistance was detected by PCR of *qacA/B* and *qacC* genes that confer resistance to quaternary ammonium by means of proton motive force-dependent multidrug efflux.

Results:

None of the isolates was found to be resistant to glycopeptides (vancomycin and teicoplanin). Antibiotics with the highest percentages of resistance were: oxacilline 92%, gentamicin 92%, erythromycin 89% and rifampicin 84%.

The *qacA/B* genes were found in 53% of isolates (40/76). The *qacC* gene was detected in only one isolate, concomitantly with *qacA/B* gene. We were also not able to detect a significant difference between MRSH and MSSH isolates with regard to the prevalence of *qacA/B* gene: MRSH *qacA/B*+ 51% (36/70), MSSH 67% (4/6).

The high prevalence of ammonium quaternaires resistance genes might be the result of selective pressure imposed by the disinfection agents used in hospital care unit.

P77. SigX, un nouveau facteur sigma de réponse aux stress de l'enveloppe ?

Duchesne R., Bouffartigues E., Maillot O., Feuilloley M. G. J., Orange N, Chevalier S.

Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM), EA4312, Université de Rouen, France.

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène opportuniste de l'homme, responsable d'infections aiguës et chroniques, notamment dans le cadre d'infections respiratoires et urinaires¹. Doté de grandes capacités d'adaptation, ce germe est capable de se développer dans tous types d'environnements humides. Sa faculté d'adaptation est liée à un grand nombre de systèmes de perception de stress et de transduction, parmi lesquels les facteurs sigma à fonction extracytoplasmique (ECF). Les facteurs sigma ECFs sont des régulateurs transcriptionnels qui ont été classés en 2 groupes majeurs, à savoir les Fecl-like et les RpoE-like, qui sont activés en réponse à une carence en Fer ou à un stress de l'enveloppe, respectivement². Chez *P. aeruginosa*, 19 facteurs sigma ECFs ont été prédits, parmi lesquels 13 appartiennent au groupe des Fecl-like, et AlgU est à ce jour, le seul facteur sigma de type RpoE³. SigX est l'un de ces 19 facteurs sigma ECF. Il est impliqué dans la transcription d'*oprF*, codant la porine majeure de la membrane externe^{4,5}, nécessaire à l'expression de la virulence chez *P. aeruginosa*⁶, et au maintien de la structure pariétale^{4,5}.

Notre étude vise à mieux comprendre les fonctions de SigX et à découvrir les signaux menant à son activation. A cette fin, des études transcriptomiques, protéomiques et phénotypiques ont été menées, ainsi que des essais de son activité dans de nombreuses conditions environnementales. Nous avons montré que la mutation de *sigX* affecte l'expression de 307 gènes parmi lesquels 9 régulateurs maître, suggérant que SigX se situe au sommet d'une cascade de régulation⁷. SigX est impliqué dans l'adhésion et la formation de biofilm en agissant en partie sur le métabolisme du c-di-GMP, ainsi que dans l'expression de la virulence de *P. aeruginosa*. Une analyse protéomique a révélé une sous production générale de 8 porines majeures, suggérant que SigX pouvait avoir un rôle dans le contrôle et /ou la régulation de la composition membranaire, de sa perméabilité et plus généralement de son homéostasie⁸. Enfin, SigX est activé en présence de fortes concentrations de sucrose, un composé non métabolisé, ainsi qu'en faibles concentrations salines, deux conditions qui altèrent la structure de l'enveloppe⁵.

L'ensemble de ces données, en plus de la découverte récente de l'implication de SigX dans la biosynthèse des acides gras^{9,10}, suggère que SigX pourrait être un nouveau facteur sigma ECF impliqué dans la réponse au stress de l'enveloppe chez *P. aeruginosa*.

¹Staron et al., 2009 ; ²Bastiaansen et al., 2010 ; ³Potvin et al., 2008 ; ⁴Brinkman et al., 1999 ; ⁵Bouffartigues et al., 2012 ;

⁶Fito-Boncompagni et al., 2011 ; ⁷Gicquel et al., 2013 ; ⁸Duchesne et al., 2013 ; ⁹Blanka et al., 2014 ; ¹⁰Boechat et al., 2014

P78. Prévalence de *Bordetella holmesii* dans les prélèvements de patients présentant un tableau de coqueluche

V. Jacomo, O. Schaal, G.A. Denoyel

Département des maladies infectieuses

Laboratoire Biomnis, Lyon

Bordetella holmesii est un agent infectieux potentiellement responsable d'un tableau clinique de type coqueluche, et ayant fait l'objet de nombreuses investigations dans la littérature. Sa prévalence est très variable selon les pays et les populations ciblées, s'échelonnant de 0 à plus de 20 %.

Le nombre d'analyses pour la recherche de coqueluche par PCR dans notre laboratoire est important et le recrutement couvre tout le territoire national et outre-mer. Nous avons donc voulu estimer la prévalence de cette bactérie dans les prélèvements de patients suspects de coqueluche par PCR en temps réel spécifique de *Bordetella pertussis* et de *Bordetella holmesii*.

1027 échantillons positifs par PCR de la séquence d'insertion IS 481 ont été évalués par PCR de l'insertion IS 1001-like spécifique de *Bordetella holmesii*.

3 se sont avérés positifs (0.29 %) pour cette bactérie.

Différentes hypothèses pouvant expliquer la variabilité du nombre de cas positifs sont à explorer.

P79. Le milieu urée-indole au secours de la spectrométrie de masse ?P. Gérôme¹, F. Biot³, L. Crevon², D. Rabar, F. Thibault³¹-Laboratoire de biologie médicale, HIA Desgenettes, 108, bd Pinel, 69275 Lyon cedex 03²-Service de médecine interne et pathologie infectieuse et tropicale, HIA Desgenettes, 108, bd Pinel, 69275 Lyon cedex 03³-Institut de recherche biomédical des armées-ERL, HIA Desgenettes, 108, bd Pinel, 69275 Lyon cedex 03**Observation :**

Un homme de 50 ans n'ayant pas quitté la France était hospitalisé pour un amaigrissement de 15 kg, une fièvre, des douleurs abdominales et des diarrhées. A l'entrée la température était de 38,5°C et l'examen clinique normal. Sur le plan biologique existaient : une anémie (Hb= 95g/L), une thrombopénie à 115 G/L, une lymphopénie à 0,9 G/L, une élévation de la protéine C-réactive à 100 mg/L et de la créatinine à 118 mmol/L. L'imagerie révélait un épanchement dans le cul de sac de Douglas. Une antibiothérapie par ceftriaxone et ciprofloxacine était instaurée.

Les flacons d'hémocultures (3 aérobies et 1 anaérobie) incubés sur automate Bact/Alert (bioMérieux) révélait au bout de 19h des bacilles immobiles, Gram négatif. Ces bacilles aéro-anaérobie facultatifs donnaient en 18h sur milieux enrichis et trypticase-soja des colonies de petite taille translucides. L'oxydase était négative. L'identification sur colonie par spectrométrie de masse était faite sur système MALDI Biotyper® Bruker. Les spectres ont été comparés aux deux bases de données natives du système : Bruker Taxonomy (4613 profils) et SR Taxonomy (agents hautement pathogènes, 120 profils). Le premier choix d'identification obtenu était *Yersinia pestis* (score de 2,388, un score supérieur à 2 étant considéré comme une identification au niveau de l'espèce). Ce résultat n'étant pas en accord avec le contexte, l'isolement d'une autre espèce du genre *Yersinia* était évoqué. La production d'uréase en moins de 2 heures sur milieu urée-indole confortait cette hypothèse. Une *Y. pseudotuberculosis* O:1 (CNR *Yersinia*, Institut Pasteur) était identifiée sur galerie Vitek2 GN (bioMérieux) (score de 99%), identification confirmée par séquençage de l'ADNr 16S. Cette bactériémie occasionnait la découverte d'une infection par le VIH.

Commentaires :

Cette difficulté d'identification peut s'expliquer par la proximité des deux espèces et le nombre limité de profils référencés dans les bases de données du système (6 pour *Y. pseudotuberculosis* et 4 pour *Y. pestis*). Ces limites sont connues. A titre d'exemple, il est impossible de différencier *Shigella* spp d'*E. coli* et les difficultés pour différencier *Burkholderia pseudomallei* de *B. thailandensis* ont été décrites. Concernant le genre *Yersinia*, il a été montré que *Y. pestis* pouvait être identifiée comme *Y. pseudotuberculosis* avec la base Bruker, difficulté disparaissant avec l'inclusion de profils de souches supplémentaires. Par contre, l'inverse qui peut conduire à identifier « à tort » une bactérie de la menace ne semble pas avoir été rapporté. Ces limites pour les identifications différentielles de bactéries rares en clinique ne pourront être levées dans le futur sans un enrichissement significatif des bases de données, traduisant la diversité biologique des genres concernés. Cette observation rappelle que tout résultat de laboratoire doit être confronté à son contexte épidémiologique et clinique, et que les techniques conventionnelles d'identification peuvent encore rendre quelques services.

P80. Chryseobacterium indologenes in a woman with acute leukemia in Senegal: a case report

Arouna O¹, Camara M¹, Fall S², Ngom-Cisse S¹, Fall B³, Ba-Diallo A¹, Diop-Ndiaye H¹, Toure-Kane C¹, Mboup S¹, Gaye-Diallo A¹.

¹ Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Université Cheikh Anta DIOP. CHU Aristide Le

Dantec, BP 7325, Dakar, SENEGAL.

² Service de Médecine interne, Université Cheikh Anta DIOP. CHU Aristide Le

Dantec, Dakar, SENEGAL

³ Hôpital Principal de Dakar. 1, avenue Nelson Mandéla. BP 3006, Dakar, SENEGAL.

Introduction:

This report documents a rare case of *Chryseobacterium indologenes* urinary tract infection in Senegal. *C. indologenes* is an uncommon human pathogen reported in hospital outbreaks in Taiwan and some sporadic cases reported in Europe and in the USA mainly from immune suppressed patients.

Case presentation:

This case report was from a 42 years old female patient of Wolof ethnic group hospitalized in the Department of Internal Medicine of a Senegalese university teaching hospital, with acute leukemia who died of severe sepsis 10 days following her hospitalization. A strain of *C. indologenes* was isolated from an urine sample was resistant to several beta-lactam including ampicillin (MICs ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$), cefotaxime (MICs, 32 $\mu\text{g/ml}$) and imipenem (MICs, ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$), while it was susceptible to piperacillin (MICs, 16 $\mu\text{g/ml}$), cefepime (MICs, 4 $\mu\text{g/ml}$), ceftazidime (MICs, 4 $\mu\text{g/ml}$), cotrimoxazole (IZD, 22 mm) and all tested quinolones including nalidixic acid (MICs ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$). Research of Metallo- β -lactamase by double disc diffusion (IPM + EDTA) was done and was positive. Hydrolysis tests performed with imipenem (substrate) and a crude extract of our strain objective the production of betalactamase, by measuring the absorbance variation with a Carry 100 UV-vis spectrophotometer (Varian, Walnut Creek, CA). The activity inhibited (>95%) after incubation with 5 mM EDTA, revealed the presence of an MBL.

Conclusion:

C. indologenes although uncommon, is an important pathogen causing infection in hospitalized patients. The management of this infection needs a better identification, of drug susceptibility testing and monitoring of immunosuppressed patients with long hospitalizations.

Keywords: *Chryseobacterium indologenes*, Leukemia, Metallo- β -lactamase, resistance.

P81. Epidémiologie de la coqueluche chez l'enfant en Tunisie (2007-2013)

A.KECHRID¹, A. ZOUARI¹, A. BOUAFSOUN¹, A. BORGIP², N. GUISO³, H. SMAOUI¹

¹Laboratoire de Microbiologie

²Service de Réanimation Pédiatrique -Hôpital d'Enfants Béchir Hamza de Tunis-

³Institut Pasteur, Centre de référence de la coqueluche et autres Bordetelloses, Paris

La coqueluche est une maladie respiratoire très contagieuse, elle est particulièrement grave chez le nouveau-né et le nourrisson. Afin de préciser les caractéristiques épidémiologiques de la coqueluche chez l'enfant tunisien, une étude prospective a été faite au Laboratoire de Microbiologie de l'Hôpital d'Enfants de Tunis sur la période allant de Mars 2007 à Décembre 2013.

Les aspirations naso-pharyngées ont été effectuées chez des enfants suspects de coqueluche. L'infection à *Bordetella* a été confirmée par la PCR en temps réel en amplifiant les cibles suivantes : IS481, IS1001, ptx et recA.

Durant la période d'étude, 1433 échantillons provenant de 1372 enfants ont été reçus pour analyse. L'infection à *Bordetella* a été confirmée chez 207 enfants (15.02%). *Bordetella pertussis* a été détectée chez 176 patients (85%) par l'amplification des gènes IS481 et ptx, 14 patients (6.7%) avaient une RT-PCR positive pour *B. parapertussis* par l'amplification de IS1001 et *Bordetella* spp a été détectée dans 4 cas (2%). La co-infection *B. pertussis* et *B. parapertussis* a été retrouvée dans 13 cas (6.3%). Parmi les 207 enfants confirmés en RT-PCR, 196 sont âgés de moins de 6 mois et n'ont pas eu une vaccination complète. Durant cette étude 2, pics épidémiques sont survenus : le premier en 2009 (63 cas) et le second en 2013 (79 cas). Au cours de ces épidémies *B. pertussis* était prédominante (57 cas en 2009 et 76 cas en 2013).

La coqueluche est fréquente en Tunisie malgré une couverture vaccinale importante (97%) pour la primo-vaccination et le rappel à l'âge de 18 mois. A l'instar des pays développés, cette pathologie concerne essentiellement les nourrissons. Ces derniers sont contaminés par les adultes et les adolescents dont l'immunité anti-coqueluchuse a diminué en absence de rappels vaccinaux. Il semble de ce fait très important de revoir le calendrier vaccinal tunisien pour introduire un rappel chez les adolescents et/ou les adultes dans le but de protéger les nourrissons.

P82. Facteurs de virulence et sensibilité aux antibiotiques de souches de *Escherichia coli* isolées de selles diarrhéiques en situation pathogène au Sénégal

Dia ML¹, Wane AA², Diagne R¹, KA R¹, Sow AI¹, Cisse MF¹, Gassama Sow A²

¹. Laboratoire de Bactériologie-Virologie, CHU de FANN, Dakar, Sénégal

². Laboratoire de Bactériologie Expérimentale, Institut Pasteur, Dakar, Sénégal

1. Introduction

Les diarrhées infectieuses constituent un problème de santé publique au Sénégal. Avec la multiplication des foyers d'épidémies de diarrhées dans le pays, le plus souvent sans confirmation bactériologique, nous avons jugé nécessaire de faire l'état des lieux sur la part occupée par *E. coli* dans les étiologies bactériennes de ces diarrhées d'allure infectieuse.

2. Matériel et Méthodes

Nous avons réalisé une étude prospective qui a couvert la période allant du 01 janvier 2010 au 31 décembre 2011. Les selles provenaient de la région de Dakar mais également des autres régions du pays. Les malades présentant une diarrhée ont été prélevés par écouvillonnage rectal. L'isolement des souches a été fait sur milieu Eosine Bleu de Méthylène (EMB). La recherche des facteurs de virulence a été effectuée par PCR suivie d'une migration sur gel d'agarose. La comparaison génotypique des souches a été effectuée par la technique du RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). La technique de diffusion en gélose a été utilisée pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches.

3. Résultats

Nous avons reçu au total 104 échantillons de selles qui provenaient majoritairement de la région de Dakar (82). Parmi ces échantillons, 19 (18,27 %) étaient positifs à *E. coli*. Deux types de pathovars ont été identifiés: *E. coli* entéro-aggrégatif (gène Eagg) et *E. coli* entéro-pathogène (gène bfp et gène eae). Tous les pathovars ont été retrouvés dans la tranche d'âge 0-5ans. Les bêtalactamines ont inhibé 80 % des souches. Les souches étaient résistantes au cotrimoxazole mais demeuraient sensibles aux aminosides (84 %) et aux quinolones (84,2 %).

4. Conclusion

Cette étude montre que *E. coli* occupe une part non négligeable dans les étiologies des diarrhées infectieuses au Sénégal. C'est pourquoi il faudra améliorer les conditions d'acheminement des selles (Chaîne de froid, milieu de transport Cary Blair) et renforcer le plateau technique des laboratoires pour une prise en charge plus adaptée des patients.

Mots clés: *E. coli*; Facteurs de Virulence; Antibiotiques; Sénégal

P83. Etude des phénotypes de résistance d'*Escherichia coli* dans les urines

DIARRA Luka

Unité bactériologie/Virologie au laboratoire de l'Hôpital de Sikasso/Mali

OBJECTIF

Interpréter les phénotypes de résistance d'*Escherichia coli* chez les patients faisant une infection urinaire lors d'un bilan par la méthode d'antibiogramme dans le cadre du diagnostic de routine à l'hôpital de Sikasso/ Mali.

METHODOLOGIE

L'étude a porté sur 40 patients infectés par *Escherichia coli*, âgés de plus de 18 ans, naïfs de tout traitement d'antibiotique, reçus au laboratoire de l'hôpital de Sikasso (Mali) entre Janvier et Décembre 2013.

Les phénotypes ont été déterminés par la méthode d'inondation de réalisation d'antibiogramme sur la gélose Mueller Hinton.

La lecture d'interprétation des phénotypes de résistance a été faite selon les critères du comité d'antibiogramme de la société française de microbiologie Edition Janvier 2012

RESULTATS

La moyenne d'âge des patients dans notre étude est de 55 ans avec un sexe ratio de 1,08 en faveur des hommes.

33 patients soit 82,5% infectés avec des phénotypes de résistance à *Escherichia coli*.

8 patients soit 20 % infectés avec des phénotypes de résistance (AMC, CRO, GTA, CIP, NOR)

4 patients soit 10% infectés avec des phénotypes de résistance (CRO, GTA, CIP, NOR)

3 patients soit 7,5% infectés avec des phénotypes de résistance (IPM, GT, CIP, NOR) ou (AMC) ou (AMC, CRO, GTA)

2 patients soit 5% infectés avec des phénotypes de résistance (GT, CIP, NOR) ou (GTA)

1 patient soit 2,5% infectés avec des phénotypes de résistance (AMC, CRO, GT, CIP, NOR) ou (AMC GTA NOR) ou (CRO, GA, CIP, NOR) ou (AMC, CIP, NOR) ou (AMC, GTA) ou (CRO, CIP, NOR) ou (CRO).

CONCLUSION

Plus de la moitié des patients infectés à *Escherichia coli* présentaient des phénotypes de résistance. L'antibiogramme est réalisé après une antibiothérapie. Ceci pourrait être expliqué le nombre élevé de phénotypes de résistance.

Il y a nécessité de continuer l'information et de renforcer la sensibilisation des populations sur la conséquence de l'automedicalisation.

Mots clés : phénotypes de résistance.

P84. *Dickeya dadantii* : Vers la compréhension du rôle biologique des glucanes périplasmiques osmorégulésLacroix J.-M., Bontemps-Gallo S.

Université de Lille 1 - UMR 8576 CNRS/Lille 1

Les glucanes périplasmiques osmorégulés sont retrouvés chez la plupart des Protéobactéries. Uniquement constitué de glucose, les OPG peuvent être soit linéaire soit circulaire. Chez les entérobactéries, le squelette glucosidique, synthétisé par les produits de l'opéron *opgGH*, est linéaire lié en b-1,2 et ramifié en b-1,6. L'inactivation de cette opéron conduit à une absence d'OPG ce qui provoque une perte de virulence chez toutes les bactéries où cela a été étudié comme *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Dickeya dadantii*.

Dickeya dadantii, notre modèle d'étude, provoque la maladie de la pourriture molle qui se traduit par une macération des tissus. Cette macération est permise par la sécrétion d'exoenzymes qui vont dégrader la paroi végétale. Chez cette bactérie, un mutant dépourvu d'OPG est non virulent, présente une diminution de la motilité, de la synthèse et de la sécrétion des exoenzymes, une incapacité à former un biofilm et une sécrétion accrue d'expolysaccharides qui confèrent un aspect muqueux aux colonies.

Une approche protéomique a mis en évidence une forte perturbation du catabolisme trahissant un fort besoin en énergie caractéristique d'une induction de la réponse générale au stress. Cette analyse a ainsi mis en lumière une altération globale des performances de la bactérie ainsi qu'une altération dans la perception de l'environnement. Cette hypothèse a été confirmée par l'identification d'une mutation suppressive dans le système RcsCDB qui permet la restauration de presque la totalité des phénotypes du mutant *opgG* excepté la virulence en feuille d'endive. Le système RcsCDB est un système phosphorelais impliqué dans l'adaptation à l'environnement contrôlant plus d'une centaine de gènes impliqué dans la motilité, la virulence ou la sécrétion des expolysaccharides. De plus, nous avons montré que la concentration en OPG régule le niveau d'activation du système RcsCDB et que cette régulation permet à la bactérie de développer correctement sa pathogenèse. L'ensemble de nos études montrent que les OPG joueraient un rôle – non seulement - structural puisque leur perte affecte la fluidité de la membrane cellulaire mais également un rôle dans la signalisation cellulaire via les systèmes phosphorelais pour la bactérie et dans la signalisation des défenses de l'hôte.

P85. Microbial Resource Research Infrastructure: A large-scale research infrastructure for microbiological services

Hurtado-Ortiz R.¹, Clermont D.¹, Casaregola S.², Bizet C.¹

¹Centre de Ressources Biologiques, Institut Pasteur

²Centre International de Ressources Microbiennes, INRA

Microbiological resources and their derivatives are the essential raw material for the advancement of human health, agro-food, food security, biotechnology, research and development in all life sciences. The microbial raw material, and their genetic and metabolic products, are utilised in many areas such as production of healthy and functional food, identification of new antimicrobials against emerging and resistant pathogens, fighting agricultural disease, identifying novel energy sources on the basis of microbial biomass and screening of new active molecules for the bio-industries. The complexity of legitimate collections, distribution and use of living biological material, demands the coordination and sharing of policies, processes and procedures.

The Microbial Resource Research Infrastructure (MIRRI) is an initiative within the European Strategy Forum Infrastructures (ESFRI), including 16 European public microbial culture collections and biological resource centres, supported by several European and non-European partners.

The objective of MIRRI is to support innovation in microbiology by provision of a one-stop shop for well-characterized microbial resources and high quality services on a not-for-profit basis for biotechnology in support of microbiological research. In addition, MIRRI contributes to the structuring of microbial resources capacity both at the national and European levels. This will facilitate access to microorganisms for biotechnology for the enhancement of the bio-economy in Europe.

MIRRI will overcome the fragmentation of access to current resources and services, develop harmonised strategies for delivery of associated information, ensure bio-security and other regulatory conditions to bring access and promote the uptake of these resources into European research. It is considered essential that, to ensure the uptake of high quality microbial resources into research, data mining of the landscape of current information is needed to discover potential and drive innovation.

MIRRI is on its Preparatory Phase focusing on governance and structure including technical, legal governance and financial issues.

MIRRI will help the Biological Resources Centres (BRCs) to work more closely with policy makers, stakeholders, funders and researchers, to deliver resources and services needed for innovation.

P86. Rapid detection of pathogenic microorganisms in blood and fluids using the multiplex PCR ready-to-use FilmArray blood culture (FABC) assayAmarsy-Guerle R.

C.H. Saint Louis, Lariboisière, F.vidal

Objectives. Rapid and accurate identification of pathogens directly from biological samples could improve patient outcomes. The FilmArray® (Idaho Technology, Salt Lake City, UT, USA) is a ready-to-use diagnosis test using multiplex PCR coupled to array hybridization with results available in one hour. We evaluated the FilmArray Blood Culture (FABC) assay which can detect 25 pathogenic microorganisms.

Methods. We performed the FABC on 49 specimens: 10 blood cultures, 15 fluids (pericardial, peritoneal, cerebrospinal, pleural, articular and bronchoalveolar lavage) and 24 biopsies or abscesses. They have been previously collected from patients suffering severe infections, and were positive for at least one pathogen.

Results. Out of 45 specimens with positive culture, 43 (96%) were also positive with the FABC test. Whereas 59 microorganisms were obtained by culture and identified by MaldiToF, 62 were detected by FABC with 54 (82%) concordant results. According to microorganisms, the results were the following: out of 30 Gram-positive bacteria (10 streptococci with 3 *S. agalactiae*, 3 *S. pneumoniae*, 3 *S. pyogenes*, 9 *S. aureus*, 7 enterococci, 4 coagulase negative staphylococci) 25 and 27 were detected by culture and FABC respectively, with a concordance of 92%. Out of 41 Gram-negative bacteria (8 *K. pneumoniae*, 5 *Proteus* sp, 5 *E. coli*, 4 *E. cloacae*, 3 *Serratia* sp, 9 *P. aeruginosa*, 2 *Acinetobacter* sp, 3 *Neisseria meningitidis* and 2 *Haemophilus influenzae*), 31 and 33 were detected by culture and FABC respectively with a concordance of 75%. For 3 specimens with *Candida* species in culture, 2 were positive.

Conclusions. The FABC assay is an easy-to-use test for rapid detection of pathogens not only from blood culture but also from other specimens such as fluids and tissues. It can be performed in case of high suspicion of severe infection with a result obtained in only one hour. Sensitivity to detect gram-negative pathogen or *Candida* appeared lower than gram-positive bacteria but this needs to be studied further.

P87. BRC-LIMS : logiciel de gestion de CRB de micro-organismes

Demey S.¹, Begaud E.², Clermont D.², Talignani L.³, Helloin E.⁴, Villena I.⁵, Bizet C.²

¹Centre d'Informatique pour la Biologie, Institut Pasteur, Paris, France

²Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur, Paris, France

³Centre de Ressources Biologiques des *Leishmania*, IRD 224-CNRS 5290-UM1-UM2, Montpellier, France

⁴Centre International de Ressources Microbiennes de l'INRA, INRA, Centre de Tours, France

⁵Centre de Ressources Biologiques *Toxoplasma*, Université de Reims Champagne-Ardenne (EA 3800)/Hôpital Maison Blanche, Reims et Université de Limoges/CHU Dupuytren, Limoges, France

Objectifs :

Le fonctionnement et le développement des Centres de Ressources Biologiques (CRB) rendent indispensable l'utilisation d'un logiciel pour la gestion de toutes les données se rapportant à l'acquisition, à la caractérisation, à la production, à la conservation ainsi qu'à la distribution des ressources biologiques. Ce logiciel doit également contribuer à assurer la traçabilité et le respect des réglementations en vigueur. Avant le projet BRC-LIMS, aucun des logiciels utilisés par les CRB, souvent élaborés en interne, ne permettait d'assurer en routine toutes les fonctions attendues et ce, pour un maximum de types de ressources biologiques. Ainsi ce projet, financé par une allocation GIS IBISA, a abouti au développement d'un logiciel générique doté d'une flexibilité permettant de répondre aux spécificités de chaque collection de ressources microbiennes. Ce logiciel, distribuable sous accord de consortium, est interopérable avec des bases de données des réseaux nationaux et internationaux.

Matériels et méthodes :

Le développement de l'application a été réalisé par une société de service en collaboration avec les CRB partenaires et le CIB de l'Institut Pasteur. La solution développée est composée d'une application Web (FBRCMi-catalog) publique et centralisée ainsi que d'une application BRC-LIMS, privée. Une reprise des données existantes des CRB partenaires a été également faite.

Résultats :

Depuis la mise en production de ces applications en janvier 2013, les CRB partenaires dispose d'un outil dessiné sur mesure pour la gestion des souches microbiennes (BRC-LIMS), ainsi que d'une application Web FBRCMi-catalog (accessible via le site www.fbrcmi.fr/) faisant office de catalogue commun à tous les CRB participant au projet. Ces outils permettent à la fois la gestion en interne des ressources biologiques, leur visibilité externe, ainsi que l'export des données vers d'autres sites.

Conclusions :

BRC-LIMS a pour vocation d'être un outil utilisé au quotidien par les CRB pour accompagner les utilisateurs dans leurs tâches et dans leurs processus, parfois complexes, de gestion de ressources biologiques. Ce logiciel, en permettant aux CRB intéressés d'échanger des données, facilitera la mise en place d'un réseau national de CRB de micro-organismes. Il a été conçu pour être générique, portable, interopérable et ergonomique ainsi que pour contribuer à faire connaître la biodiversité représentée dans les CRB auprès des communautés scientifiques et industrielles. En 2014, de nouvelles évolutions des applications seront couvertes par le projet 'Extended BRC-LIMS'.

P88. Dégénérescence protéique, une stratégie d'adaptation bactérienne à la multiplicité des signaux du microenvironnement

Mijouin L., Hillion M., N'Diaye A., Enault J., Jaouen T., Merieau A., Norris V., Lesouhaitier O., Chevalier S., Orange N., Feuilloley MGJ.

Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement LMSM EA4312, Université de Rouen

En tant qu'organisme unicellulaire la bactérie est potentiellement exposée à une combinaison infinie d'environnements et de signaux moléculaires. L'adaptation à ces signaux environnementaux est pourtant capitale car elle conditionne la survie du micro-organisme. Cependant entre la multiplicité des signaux et la taille limitée de son génome, la bactérie ne peut pas exprimer autant de senseurs que nécessaire, et encore moins anticiper sur ceux qui pourraient l'être. La dégénérescence protéique pourrait être une réponse à ce défi. La dégénérescence protéique suggère qu'une même protéine peut exister dans plusieurs localisations et sous différents conformères où elle serait capable de reconnaître différents ligands. Un ensemble de travaux suggère que le facteur d'élongation ribosomal thermo-sensible Ef-Tu pourrait se comporter ainsi. Alors qu'il devrait être exprimé dans un rapport stoechiométrique avec le nombre de ribosomes, on en trouve de 4 à 14 fois plus dans les bactéries¹ et il a été montré que sous l'effet du stress il est intégré dans la membrane où il change de conformation et se comporterait en tant que senseur². Nous avons ainsi mis en évidence récemment que chez des bactéries aussi diverses que *Pseudomonas aeruginosa* ou *Bacillus cereus*, un site de liaison et de reconnaissance pour des facteurs tels que l'acide γ -amino butyrique (GABA)³, la Substance P₄, voire les peptides natriuretiques, pourrait être cette protéine Ef-Tu. Un rôle similaire d'Ef-Tu dans la perception de la Substance P et des tachykinines produites au niveau de peau par des bactéries cutanées telles que *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*⁴ et même *Pseudomonas fluorescens*⁵ est en cours d'étude. Ef-Tu pourrait donc être une protéine dégénérée servant de senseur multifonctionnel dans un grand nombre de bactéries à Gram + et Gram-.

Références :

1 Jacobson GR, Rosenbusch JP (1976) Nature 261: 23-26.

2 Dallo SF, Kannan TR, Blaylock MW, Baseman JB Mol. Microbiol. (2002) 46: 1041-1051

3 Dagorn A, Hillion M, Chapalain A, Lesouhaitier O, Duclairoir Poc C, Vieillard J, Chevalier S, Taupin L, Le Derf F, Feuilloley MG (2013) Microbiology 159:339-351.

4 Mijouin L, Hillion M, Ramdani Y, Jaouen T, Duclairoir-Poc C, Follet-Gueye ML, Lati E, Yvergnaux F, Driouich A, Lefevre L, Farmer C, Misery L, Feuilloley MG (2013) PLoS One. 8: e78773.

5 Hillion M, Mijouin L, N'Diaye A, Percoco G, Enault J, Follet-Gueye M-L, Yvergnaux F, Lefevre L, Feuilloley MGJ. FEMS Microbiol. Lett. (Submitted FEMSLE-14-01-0047)

P89. Diversité d'*Aeromonas media* : quel impact taxonomique ?

Talagrand E.¹, Kimper J.-L.¹, Roger F.¹, Marchandin H.^{1,2}, Jumas-Bilak E.^{1,3}, Lamy B.^{1,2}

¹Équipe Pathogènes et Environnements, UMR 5119 Ecosym, UFR Pharmacie, Université Montpellier 1.

²Laboratoire de Bactériologie, CHRU de Montpellier.

³Département d'Hygiène Hospitalière, CHRU de Montpellier.

Les bactéries du genre *Aeromonas* sont des bactéries pathogènes opportunistes d'origine environnementale, dont la taxonomie a subi de très nombreux remaniements. L'espèce *A. media* est subdivisée en deux groupes d'hybridation ADN/ADN (HG 5A et 5B) dont le statut taxonomique reste mal défini. Des travaux préliminaires suggèrent une hétérogénéité importante, non observée pour les autres espèces du genre, de 6 souches d'*A. media*, notamment en termes de polymorphisme génétique en phylogénie multilocus et de diversité de la répartition des opérons ribosomiques au sein du génome.

Objectifs: Structurer une plus large population d'*A. media* pour en préciser la taxonomie.

Matériels et Méthode:

32 souches d'*A. media* d'origine environnementale et clinique ont été étudiées par une approche polyphasique comprenant: i) une analyse phylogénétique multilocus basée sur 16 gènes (*atpD*, *dnaJ*, *dnaK*, *dnaX*, *gltA*, *groL*, *gyrA*, *gyrB*, *metG*, *ppsA*, *radA*, *recA*, *rpoB*, *rpoD*, *tsf*, *zipA*) inclus dans 3 schémas de MultiLocus Sequence Typing (MLST) précédemment publiés, ii) une caractérisation phénotypique incluant l'utilisation du DL-lactate par les isolats, iii) une analyse de la diversité génétique de la boucle V3 de l'ADNr 16S (électrophorèse en gradient temporel de température), iv) une étude de la diversité de la distribution génomique des opérons ribosomiques (électrophorèse en champ pulsé après digestion par I-CeuI).

Résultats :

Trois clusters apparaissent bien différenciés par l'analyse phylogénétique multilocus suggérant une structure plus complexe que celle en 2 groupes d'hybridation précédemment décrite. Les 2 clusters majoritaires regroupent 50 et 30% des souches étudiées. La capacité des isolats à utiliser le DL-lactate, et la présence d'une séquence conservée dans la boucle V3 de l'ADNr 16S, apparaissent bien corrélées à ces 2 clusters. Nous confirmons la remarquable diversité génétique et génomique d'une collection élargie d'*A. media*.

Conclusion:

Nos résultats sont en faveur d'un groupe polyphylétique comprenant plusieurs taxons dont le niveau taxonomique reste à préciser. De nouvelles expériences d'hybridation ADN-ADN ou le séquençage complet de représentants des trois clusters pourraient permettre de préciser leur statut taxonomique.

P90. Phages in therapy, mini review on the effectiveness of treatment*Chatain M. H.*

ISARA-LYON

In recent years, the use of lytic bacteriophages as antimicrobial agents controlling pathogenic bacteria has appeared as a promising new alternative strategy in the face of growing antibiotic resistance which has caused problems in many fields including medicine, veterinary medicine and aquaculture. The use of bacteriophages has numerous advantages over traditional antimicrobials. The effectiveness of phage applications in fighting against pathogenic bacteria depends on several factors such as the bacteriophages/target bacteria ratio, the mode and moment of treatment, environmental conditions (pH, aw, temperature ...), the neutralization of phage and accessibility to target bacteria, amongst others. This report presents these factors and the challenges involved in developing phage therapy applications.

P91. Mammmites bovines : prevalence des bacteries pathogenes et de leur resistance aux antibiotiques

*Radhwane S.*¹, *Khelef D.*², *Kaidi R.*³

¹ *Université de laghouat, Algérie*

² *Ecole nationale vétérinaire d'Alger*

³ *Université de Blida*

Le présent travail a pour objectif de reconnaître les principaux germes impliqués dans les mammites subcliniques chez les bovins en Algérie et apprécier la résistance aux antibiotiques des bactéries à l'origine de mammites bovines. Pour cela, 100 vaches appartenant à 15 troupeaux du centre algérien sont dépistées par le CMT (California Mastitis Test). Les prélèvements positifs font l'objet d'une analyse bactériologique par la méthode classique et le Speed® Mam Color et d'un antibiogramme. Les résultats obtenus montrent que les germes en cause sont : 40% des staphylocoques, 12% des streptocoques, 4% des entérobactéries, 4% des *Pseudomonas*, 12% des associations staphylocoques + streptocoques, 8% pour les associations streptocoques + *E. coli*, 8% pour les associations staphylocoques + *E. coli*, 4% pour les associations staphylocoques + mycoplasmes, et 4% pour les associations staphylocoques + streptocoques + *E. coli* (ou contamination). L'étude de l'antibiorésistance des germes isolés révèle l'existence de résistances aux antibiotiques testés mais avec des proportions variables. Cependant, aucune résistance de ces germes n'est notée pour la Danofloxacin et l'association Amoxiciline + Ac. clavulanique. ces résultats sont à exploiter pour lutter contre les mammites dans la région, objet de notre enquête.

Mots clés : Lait, mammite subclinique, bactérie, antibiorésistance.

P92. Biofilms et antibiothérapies des infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus*

*Marquès C.*¹, *Tasse J.*², *Collin V.*³, *Franceschi C.*³, *Laurent F.*², *Chatellier S.*³, *Forestier C.*⁴

¹ Université d'Auvergne; bioMérieux

² Université Lyon I

³ bioMérieux

⁴ Université d'Auvergne

Dans les cas d'infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus*, les biofilms jouent un rôle essentiel dans la chronicité de la pathologie en conférant aux bactéries une résistance accrue aux antibiotiques. Afin d'optimiser le traitement, il est nécessaire de connaître le pouvoir d'éradication des antibiotiques sur des biofilms de *S. aureus* constitués, mais également leur capacité à inhiber la formation de ces biofilms. Pour cela, 9 antibiotiques anti-staphylococciques ont été testés à différentes concentrations vis-à-vis d'une souche clinique de *S. aureus* issue d'infection ostéo-articulaire. Ont été déterminées les concentrations minimales inhibitrices (CMI) vis-à-vis des formes planctoniques et les concentrations minimales d'éradication du biofilm (CMEB) vis-à-vis de biofilms constitués *in vitro* pendant 24h. La capacité de ces mêmes antibiotiques à inhiber la formation de biofilm *in-vitro* (action préventive) a également été déterminée. Certaines des molécules testées ont montré une capacité à inhiber la formation de biofilm, y compris à des concentrations voisines des CMIs. L'éradication de biofilms matures par ces mêmes antibiotiques requiert cependant des concentrations d'au moins 2500 fois supérieures aux CMIs. Les données ainsi générées sont importantes car elles permettraient de mieux choisir les molécules antibiotiques dans le traitement de ces infections, que ce soit dans un but préventif et/ou curatif notamment pour limiter la formation de micro-embolus septiques.

P93. Effets de l'huile essentielle d'anis étoilé (*Illicium verum* Hook.f.) sur la croissance des moisissures

Dao Thien¹, Tran Thanh Hoa², Chatain Mai Huong³

¹Faculty of Food Technology (FST), Ho Chi Minh city University of Food Industry, Vietnam

²Cai Lan Oils & Fats Industries Company (CALOFIC) – Vietnam

³Laboratoire BioDymia, ISARA-Université Lyon 1-France

Objectifs :

Les moisissures ont un rôle déterminant dans l'altération des aliments car indépendamment de la production de mycotoxines, ils entraînent une modification de l'aspect physique, les valeurs nutritionnelles et ainsi que les propriétés organoleptiques des produits. Par conséquent, il est nécessaire de limiter la contamination des produits agricoles par les moisissures. Afin de limiter la croissance ces moisissures, nous étudions dans cette étude l'effet antifongique de l'huile essentielle d'anis étoilé (*Illicium verum* Hook.f.).

Matériels et méthode :

Trois souches d'*Aspersillus flavus*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium italicum* ont été isolées à partir des produits contaminés et identifiés selon les descriptions de Samson et al. (1995). Les spores de ces souches ($1 \text{ à } 5 \times 10^3$) ont été inoculés sur un milieu PDA. Ce milieu a été ajouté de l'huile essentielle d'anis étoilé (*Illicium verum* Hook.f.) à différentes concentrations : de 0 à 7% m/m. La croissance des souches fongiques a été suivie par la mesure de 2 diamètres perpendiculaires au travers des boîtes de Petri.

Résultats :

Les résultats ont montré que dans les conditions : T= 30°C, aW = 0,99, l'huile essentielle d'anis étoilé de 7% m/m inhibent complètement le développement de trois souches *Aspersillus flavus*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium italicum*.

Conclusions :

Ces résultats confirment que l'activité antifongique de l'huile essentielle extrait à partir de l'anis étoilé sur trois souches testées. Pour la suite de l'étude, nous allons étudier l'application de cette huile comme des traitements antifongiques pour des matières premières agricoles ou pour des équipements dans les industries agro-alimentaires.

Mots-clés: Moisissure, *Aspersillus flavus*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, inactivation, huile essentielle, *Illicium verum* Hook. f.

P94. Effets synergiques d'un nouvel inhibiteur du Quorum Sensing associé aux antibiotiques sur la formation du biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*Furiga A., Lajoie B., El Hage S., Baziard G., Roques C

Laboratoire de Génie Chimique (UMR 5503), Université Paul Sabatier, Université de Toulouse, Faculté de Pharmacie

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie ubiquiste pouvant provoquer des infections pulmonaires graves et chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose, notamment en établissant au stade infectieux un biofilm difficile à éliminer. La mise en place de ce biofilm est principalement régulée par des mécanismes de Quorum Sensing (QS), contrôlés par de petites molécules, les N-acyl homoserine lactones (HSL) : C4-HSL et 3-oxo-C12-HSL. Ainsi, l'objectif de notre étude est donc de concevoir et tester l'activité anti-biofilm de nouveaux analogues des HSL afin d'inhiber le développement du biofilm à *P. aeruginosa*. Parmi les analogues de la C4-HSL synthétisés, un composé (C11, N-pyrimidyl butanamide) a montré une inhibition dose-dépendante significative de la formation du biofilm, doublée d'une absence de cytotoxicité sur les cellules pulmonaires. De plus, l'activité anti-biofilm de ce composé est conservée sur un biofilm développé en conditions d'anaérobiose, analysée dans l'intention de se rapprocher des conditions de colonisation de la bactérie in vivo. Le composé C11 a ensuite été testé en association avec les antibiotiques antipyocyaniques et un effet synergique anti-biofilm significatif a été obtenu avec la ciprofloxacine, la tobramycine et la colistine, aussi bien en conditions aérobies et anaérobies. Actuellement, l'étude de différentes associations du C11 avec les antibiotiques sur l'expression des gènes de virulence de *P. aeruginosa* est analysée par qRT-PCR. Ainsi, cette étude devrait nous permettre de sélectionner la meilleure association de molécules inhibitrices de la formation du biofilm à *P. aeruginosa*, puis de définir les conditions optimales pour des essais ultérieurs sur modèle murin. Ce travail fait l'objet d'un soutien par l'Association Vaincre la Mucoviscidose.

P95. Sélection in vitro de staphylocoques isolés d'ostéites résistants au linézolide

ROUARD C.¹, BOURGEOIS-NICOLAOS N.^{1,2}, DOUCET-POPULAIRE F.^{1,3}, ASLANGHUL E.⁴, RIVIERE A.¹, BUTEL M.-J.^{1,2}

¹ Affiliation Hopital Antoine Beclere

² Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes

³ Faculté de Pharmacie, Université Paris Sud

⁴ Hopital Hotel Dieu

Objectif :

De par son activité contre les staphylocoques, sa bonne biodisponibilité et sa bonne diffusion dans l'os, le linézolide (LZ) est une alternative dans le traitement d'infections osseuses. Cependant l'émergence de la résistance au LZ chez les staphylocoques à coagulase négative (SCoN) pourrait constituer un problème. L'objectif de cette étude était d'évaluer la sélection de mutants résistant au LZ à partir de 3 souches de SCoN isolées d'ostéites.

Matériels et méthode :

Les mutants ont été obtenus par passages successifs sur milieu additionné de concentration croissante de LZ à partir de 3 souches de SCoN sensibles au LZ (CMI=1mg/L): SW1977 (*Staphylococcus warneri*), GUL2175 et SE6910 (*Staphylococcus epidermidis*). La CMI du LZ, la sensibilité à l'érythromycine, les séquences des gènes *rrl*, *rplC* et *rplD* (codant respectivement l'ARNr 23S et les protéines ribosomales L3 et L4), le nombre d'allèles mutés du gène *rrl* (pyroséquençage) et le temps de génération ont été déterminés.

Résultat :

La fréquence d'émergence des mutants résistants au LZ était faible (< 10⁻¹⁰) quelle que soit la souche. Pour SW1977, les mutants sont apparus après 7 passages. L'augmentation de la CMI au LZ à 32 mg/L a été associée à une augmentation du nombre d'allèles mutés du gène *rrl* (mutation G2576T). Pour GUL2175, les mutants sont apparus après 8 passages et ont été associés à 3 mutations différentes dans la protéine L3 (Gly152Arg, Gly152Val et Gly155Arg). Après 14 passages, seule la mutation Gly152Val a été conservée associée à la mutation G2447T dans 2 allèles du gène *rrl* sans augmentation de la CMI. Une perte de la résistance à l'érythromycine a été mise en évidence lors de la sélection de mutants chez cette souche.

Pour SE6910, les mutants ont été obtenus après 9 passages avec la mutation Gly152Asp dans la protéine L3. Après 10 passages, la mutation G2447T était présente dans 2 allèles du gène *rrl* et dans 4 après 15 passages avec une CMI à 64mg/L.

La mutation G2576T n'a pas montré d'impact sur la croissance bactérienne des mutants, par contre l'acquisition d'une mutation dans la protéine L3 et de la mutation G2447T a augmenté le temps de génération de 35 à 45% par rapport aux souches parentales.

Conclusion :

La sélection *in vitro* de souches de SCoN résistantes au LZ est possible mais nécessite plusieurs passages. Nous avons observé un polymorphisme dans les mécanismes de résistance et certains mécanismes ont induit un ralentissement de la croissance. Ces caractéristiques peuvent expliquer la faible émergence de souches de SCoN résistantes au LZ dans les ostéites.

P96. Antibiorésistance chez la volaille : légère amélioration de la situation (Résapath)Jouy E.¹, Chauvin C.¹, Le Devendec L.¹, N_Balan O.¹, Gay E.², Madec J.-Y.², Kempf I.¹¹ Anses - Laboratoire de Ploufragan ; Université Européenne de Bretagne² Anses - Laboratoire de Lyon

En France, la surveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes pour les animaux est assurée par le Résapath qui collige les résultats d'antibiogrammes des laboratoires d'analyses vétérinaires adhérant à ce réseau.

Entre 2003 et 2012, 40110 antibiogrammes relatifs à la volaille ont été enregistrés. Ils ont été transmis par 61 laboratoires. Parmi la volaille, le groupe des poules pondeuses et des poulets de chair (*Gallus gallus*) ainsi que la dinde représentaient la majorité des antibiogrammes réalisés avec respectivement 43 % et 35 % des données.

Chez ces espèces animales, *E. coli* a fait l'objet de la majorité des antibiogrammes : 79 % chez *Gallus gallus* ainsi que chez la dinde. L'analyse de l'évolution de l'antibiorésistance de cette bactérie a été réalisée pour les antibiotiques les plus fréquemment testés : l'amoxicilline, le ceftiofur, la néomycine, la gentamicine, l'acide oxolinique, la fluméquine, l'enrofloxacin, la tétracycline et l'association triméthoprim-sulfamide.

Entre 2003 et 2010, les analyses statistiques (Chi-2 de tendance, $p < 0,05$) ont mis en évidence une diminution de la proportion des *E. coli* sensibles à l'ensemble de ces antibiotiques, à l'exception de la gentamicine pour *Gallus gallus*, de la tétracycline pour la dinde et, pour ces deux espèces, de la néomycine et de l'association triméthoprim-sulfamide. Cette diminution était particulièrement marquée pour le ceftiofur (céphalosporine de 3^{ème} génération) chez *Gallus gallus* : de 94 % en 2008 à 78 % en 2010 ($n = 1890$). Parmi 149 souches non sensibles au ceftiofur analysées à l'Anses, 82 % possédaient un gène codant pour une bêta-lactamase à spectre étendu CTX-M du groupe 1.

Pour les antibiotiques vis-à-vis desquels les taux de *E. coli* sensibles ont diminué entre 2003 et 2010, les données 2011 et 2012 montrent une inversion de tendance, que ce soit chez *Gallus gallus* ou chez la dinde. Seule la néomycine testée vis-à-vis des *E. coli* isolés chez la dinde échappe à ce constat.

Les données de l'année 2013 seront particulièrement importantes pour confirmer l'évolution vers la récupération de sensibilité, notamment pour *Gallus gallus* où la très forte augmentation du nombre d'antibiogrammes sur la période étudiée (+262%, $n = 593$ à 2856) pourrait partiellement influencer les taux de souches sensibles. Le Résapath constitue donc l'un des outils importants pour mesurer les effets attendus du plan Ecoantibio2017 dédié à la préservation de l'activité des antibiotiques en médecine vétérinaire et piloté par le Ministère de l'Agriculture, de l'Agro-alimentaire et de la Forêt.

P97. Intérêt de la phagothérapie dans les infections respiratoires : l'utilisation de bactériophages ciblant les souches d'*Escherichia coli* impliquées dans les pneumonies acquises sous ventilation mécaniqueDufour N.¹, Fromentin M.², Henry M.¹, Galter M.¹, Messika J.², Ricard J.-D.², Debarbieux L.¹¹ Institut Pasteur² Inserm IAME**Introduction**

En réanimation, les pneumonies acquises sous ventilation mécanique (PAVM) sont une complication fréquente et grave où les souches d'*E. coli* sont fréquemment rencontrées. Ces souches appartiennent souvent au groupe phylogénique B2 (impliqué dans les infections extra-digestives) et expriment un nombre important de facteurs de virulence. Nous souhaitons valider ici l'utilisation des bactériophages (phages) en tant qu'agents antibactériens *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin de pneumonie.

Matériels et Méthodes

L'isolement des phages et les tests *in vitro* ont ciblé une collection clinique de 23 souches d'*E. coli* issues de PAVM (Messika, 2012). Les expérimentations *in vivo* ont utilisé un modèle précédemment validé (Debarbieux, 2010) avec une infection par la souche 536 (souche de groupe phylogénétique B2, archétypale des souches extra-intestinales) ou une souche responsable de PAVM (souche SC1). La souche 536 a été transformée en une souche bioluminescente, permettant ainsi le suivi en temps réel de l'infection et la comparaison de l'efficacité des traitements (phage et antibiotique).

Résultats

41 phages ont été amplifiés à partir d'eaux usées, utilisant 6 des 23 souches de PAVM et la souche 536. L'étude du spectre d'hôte montrait que 8 de ces 41 phages lysaient 20 (86%) des 23 souches, avec une efficiency of plating >10⁻³. Lorsque traités par une unique administration du phage 536-P1 (3.10e7 pfu), 100% des animaux infectés par la souche 536 (1.10e7 cfu) survivaient alors qu'ils n'étaient que 25% si non traités. Une augmentation de l'inoculum (4.10e7 cfu) s'accompagnait d'une mortalité de 100% dans le groupe contrôle mais la totalité des animaux traités par 536-P1 ou la ceftriaxone survivait. La décroissance du signal lumineux était identique entre les animaux traités par 536-P1 et par ceftriaxone.

Le couple souche SC1 / phage 536-P7n a été testé. A l'état natif, 536-P7n pourtant actif *in vitro*, était inefficace *in vivo* (mortalité de 80% vs 88% sans traitement). L'adaptation de 536-P7n à la souche SC1 a généré un virus plus efficace (536-P7a) : les souris traitées avec 536-P7a présentaient une survie supérieure à celles traitées par 536-P7n (respectivement 75% vs 20%, p<0.01).

Conclusion

L'utilisation de bactériophages ciblant des souches d'*E. coli* impliquées dans des PAVM apparaît ici conceptuellement fondée. L'effet lytique obtenu est comparable à celui généré par un traitement antibiotique classique. Compte tenu de l'augmentation de la résistance aux antibiotiques, la phagothérapie pourrait être une voie thérapeutique d'intérêt majeur.

P98. Profil de sensibilité aux antibiotiques des *Staphylococcus aureus* dans la région de Nouakchott

OULD SALEM ML, OULD MAOULOUD MM, GHABER SM

Service des Laboratoires

CHN de Nouakchott, Mauritanie

L'objectif de cette étude était d'évaluer la sensibilité des souches de *Staphylococcus aureus* communautaires aux antibiotiques.

Il s'agit d'une étude rétrospective sur 156 souches de *S. aureus* isolés dans le Pus et le urines des malades non hospitalisés.

Les antibiotiques testés étaient : Pénicilline, Cefoxitine, Oxacilline, Erythromycine, Fosfomycine, Chloramphénicol, Lincomycine, Gentamicine, Amikacine, Spiramycine, Ofloxacin, Ciprofloxacine, Vancomycine, Cotrimoxazole.

Plus de 96% des souches étaient résistant à la Pénicilline.

La résistance à la Mécicilline était de 26% des souches isolées dans le Pus et de 34% des souches isolées dans les examens cytobactériologiques des urines.

L'activité de l'érythromycine est nettement diminuées sur les isolants du Pus (30,76%) et à moindre degré sur les souches urinaires (8,16%).

Environ la moitié des souches était résistant au chloramphénicol.

Le taux de résistance au fosfomycine était de 9 à 11% et de 8 à 10% pour la Gentamicine

Toutes les souches isolées du Pus étaient sensible aux fluoroquinolones, en revanche 12,5% des souches urinaires était résistant à ces antibiotiques.

-L'activité de la lincomycine était bonne (2 à 3% de résistance)

-La spiramycine, l'amikacine et la vancomycine gardent une bonne activité sur toutes les souches isolées.

-L'activité du cotrimoxazole était faible dans notre série.

L'activité de la Pénicilline G sur les souches de *Staphylocoques aureus* isolées dans la région de Nouakchott est quasi nulle, le taux de SARM communautaire est important atteignant jusqu'à 34%.

En revanche la spiramycine, la lincomycine pourraient constituer une bonne alternative pour le traitement de ces infections.

P99. Franchissement d'un modèle cellulaire de barrière hémato-encéphalique par les entérovirus

Volle R.¹, Archimbaud C.², Couraud P.-O.³, Romero I.-A.⁴, Weksler B.⁵, Mirand A.¹, Pereira B.⁶, Henquell C.¹, Peigue-Lafeuille H.¹, Bailly J.-L.¹

¹ Laboratoire Epidémiologie, Pathogenèse des Infections à Entérovirus, Université d'Auvergne

² Laboratoire Epidémiologie, Pathogenèse des Infections à Entérovirus, Université d'Auvergne, CHU Clermont-Ferrand, France

³ Institut Cochin, Paris

⁴ Open University, Milton Keynes, UK

⁵ Weill Cornell Medical College, NY, USA

⁶ CHU, Clermont-Ferrand

Les entérovirus humains (EV) sont des virus à ARN dont les représentants les plus connus sont les poliovirus. Une majorité de génotypes sont associés à des troubles neurologiques (méningite, encéphalite, paralysie flasque). Cependant, les processus d'entrée dans le système nerveux central (SNC) sont encore mal connus. Comme de nombreux génotypes EV non poliomyélitiques sont associés à des manifestations neurologiques semblables, des processus pathologiques communs sont envisageables. Une infection de la barrière hémato-encéphalique (BHE), peut représenter une voie d'accès commune aux EV neurotropes vers le SNC. Pour modéliser cette hypothèse, nous avons employé la lignée cellulaire endothéliale microvasculaire cérébrale humaine (hCMEC/D3).

La perméabilité des cellules hCMEC non polarisées a été testée avec 88 souches d'EV (43 génotypes). Un criblage de la perméabilité cellulaire aux EV a été effectué par RT-qPCR et titrage, la proportion de cellules infectées par immunomarquage de la protéine de capsid VP1 et la mortalité cellulaire viro induite par cytométrie en flux. Les données ont ensuite été analysées au sein d'une analyse statistique multidimensionnelle. Pour étudier la transmigration des EV à travers un modèle in vitro de BHE, les cellules ont été cultivées sur membrane microporeuse (Transwell). Les profils cytopathologiques ont été observés par microscopie électronique et confocale.

Les cellules hCMEC/D3 présentent d'importantes différences de perméabilité entre les génotypes et les souches d'EV. Deux groupes EV ont été caractérisés lors de ce criblage. Le 1^{er} comprend des EV cytoxydants causant la mort des cellules (nécrose et apoptose). Le 2nd groupe comprend des souches faiblement infectieuses et peu cytoxydantes. Les observations en microscopie montrent des caractéristiques communes aux deux groupes: perte d'actine, relocalisation des mitochondries près du noyau et formation d'amas vésiculaires évocateurs d'usines virales. Les barrières endothéliales sont productivement infectées par différentes souches d'EV. L'infection par les EV hautement cytoxydants (génotypes fréquemment associés aux méningites) se traduit par une perte d'étanchéité et une lyse de la barrière. D'autres EV peu cytoxydants (génotypes plus fréquemment associés à des atteintes profondes et sévères du SNC) provoquent l'infection prolongée de quelques cellules sans effet sur l'étanchéité.

Ces résultats valident la lignée hCMEC/D3 comme modèle expérimental pour étudier la relation physiopathologique entre les EV et la BHE, qui servirait d'avant-poste pour des infections profondes du SNC.

P100. Activité de réplication des Entérovirus persistants dans les cardiomyocytes

Michel WEHBE^{1,5}, Fanny RENOIS^{1,2}, Yohan NGUYEN^{1,2}, Nicolas LEVEQUE^{1,2,3}, Paul FORNES^{1,4}, Laurent ANDREOLETTI^{1,2}.

¹- EA-4684 CardioVir, SFR CAP-Santé, Faculté de Médecine, Reims, France

²- Unité de virologie médicale et moléculaire, CHU de Reims, France

³- Department of Microbiology and Molecular Genetics, School of Medicine, University of California, Irvine, CA 92697, USA

⁴- Unité d'anatomopathologie, CHU de Reims, France

⁵-Centre AZM pour la recherche en biotechnologie et ses applications, Ecole Doctorale des Sciences et de Technologie, Université Libanaise, Tripoli, Liban.

Objectifs :

Les Entérovirus (HEVs) et plus spécifiquement les virus Coxsackies B (6 sérotypes, espèce-B) sont considérés comme la première cause infectieuse de myocardite aiguë de l'enfant et de l'adulte jeune. Ces virus à ARN sont également responsables de myocardites chroniques dont 10% vont évoluer vers le stade clinique de cardiomyopathie dilatée (CMD). Les mécanismes moléculaires viraux impliqués dans la progression de la myocardite aiguë vers le stade chronique de cardiomyopathie dilatée ne sont pas élucidés, de ce fait, il n'existe pas à ce jour de traitement curatif pour les CMD idiopathiques (CMDi).

Au cours de cette étude, nous avons caractérisé les activités de réplication et de synthèse protéique des HEVs persistants dans les cardiomyocytes des patients CMDi

Sujets/mat et met :

Au cours de cette étude, 29 patients (âge moyen: 43.8 ; H/F : 18/6) souffrant de CMD au stade final d'évolution ont été analysés rétrospectivement pour mettre en évidence une infection à HEVs. Les ARN viraux (+) et (-) ont été quantifiés par RT-qPCR ciblant spécifiquement les brins génomiques ou anti-génomiques à partir d'acides nucléiques totaux extraits des tissus cardiaques des patients. Une hybridation in situ spécifique de l'ARN viral des HEVs a également été effectuée sur des coupes histologiques issues d'échantillons de tissu cardiaque. Un immunomarquage de la dystrophine cardiaque a été réalisé et comparé entre les sujets HEV + et HEV-.

Résultats :

Huit (27,5%) des 29 patients étaient positifs pour la détection des ARN + des HEVs (+) ; 6 de ces 8 patients infectés par HEV-B ont présenté une activité de réplication génomique caractérisée par la présence de brins ARN anti-génomiques avec des ratios ARN+ /ARN- compris entre 2 à 20 (valeur médiane de 7,4). Une technique d'hybridation in situ spécifique de l'ARN génomique des HEVs a montré que seuls les cardiomyocytes étaient infectés de manière persistante au sein du tissu cardiaque. L'utilisation des techniques d'immunohistochimie couplées à la microscopie confocale ont montré que seules les cellules cardiaques positives en HIS pour les ARN+ des HEVs présentaient un effacement focal de la dystrophine chez les patients CMDi.

Conclusion :

Nos résultats indiquent que les activités de réplication persistante des HEVs dans les tissus cardiaques humains seraient associées une destruction focale de la dystrophine cardiaque. Ce phénomène secondaire à une infection chronique cardiaque par les HEVs pourrait contribuer de manière significative au développement de la CMD.

P101. Persistance cardiaque des Entérovirus tronqués en 5'NC

Michel Wehbe¹, Fanny Renois^{1,2}, Nicolas Lévêque^{1,2,3}, Alexis Bouin¹, Yohan N'Guyen^{1,4}, Paul Fornes^{1,5}, Laurent Andréoletti^{1,2}
EA-4684 Cardiovir, SFR-CAP santé, Faculté de médecine, Reims, France (1) ; Service de Virologie clinique et moléculaire, CHU Robert Debré, Reims France (2) ; Department of Microbiology and Molecular Genetics, School of Medicine, University of California, Irvine, CA 92697, USA (3) ; Service de Pathologie Infectieuse, CHU Robert Debré, Reims, France (4) ; Service d'Anatomopathologie, CHU Robert Debré, Reims, France (5)

Objectifs

Les entérovirus humains sont des virus à ARN+ responsables de myocardites aiguës et chroniques pouvant évoluer vers le stade clinique de cardiomyopathie dilatée (CMD). Au cours de cette étude rétrospective, une caractérisation moléculaire des populations persistantes d'HEVs dans les tissus cardiaques de sujets souffrant de cardiomyopathie dilatée idiopathique (CMDi) a été réalisée.

Sujets/Matériel et Méthodes

Cent dix-neuf explants cardiaques issus de 29 patients adultes (âge moyen: 43.8 ans ; H/F : 18/6) souffrant de CMDi ont été rétrospectivement testés par une technique RT-qPCR ciblant la région 5'NC des HEVs. Pour chaque sujet HEV positif, une banque d'ADNc a été réalisée permettant de caractériser l'extrémité 5' terminale du génome des populations virales par une approche de séquençage à moyen débit (NGS, Ion Torrent, Life Technologies).

Résultats principaux

Chez 8 des 29 patients (27.5%) la présence de l'ARN génomique des HEVs a été détectée par RT-qPCR temps réel de référence avec des valeurs de charge virale comprises entre 127 et 3368 copies d'ARN viral/ μ g d'ARN total extrait (valeur médiane: 357 copies d'ARN viral/ μ g d'ARN total extrait). L'amplification et l'analyse des séquences génomiques partielles de la région 5'NC réalisées par PCR ont permis d'identifier uniquement des Entérovirus humains appartenant à l'espèce B (HEV-B). Chez les 8 patients infectés par HEV-B, 6 (75%) ont présenté une infection persistante active caractérisée par la présence de brins ARN anti-génomiques avec des ratios ARN+/ARN- compris entre 2 à 20 (valeur médiane de 7,4). A l'aide d'une technique de séquençage NGS, il a été démontré dans les tissus cardiaques de ces 8 patients, la présence de populations majoritaires (>30%) tronquées de 36 et 50 nt systématiquement associées à une population minoritaires (<5%) non-tronquées (sauvages) et à des populations avec des délétions de 19 et 26nt dans 80% des cas. Les délétions détectées de l'extrémité terminale induisent une perte partielle de la structure secondaire en feuille de trèfle de l'ARN génomique (IRES) qui est impliquée dans les mécanismes de régulation de la réplication génomique virale.

Conclusion

Cette étude montre pour la première fois l'existence de mélanges de populations virales tronquées et non tronquées au niveau de leurs extrémités 5'NC dont l'activité de réplication génomique persistante dans le tissu cardiaque pourrait contribuer au développement de la myocardite chronique et de la cardiomyopathie dilatée.

P102. Evaluation des recommandations EUCAST pour les antibiogrammes des *Campylobacters* et pour les trois principales espèces isolées en France.

Lehours P.¹, Chardon H.², Megraud F.¹, Ducournau A.¹, Sifre E.¹, Ben Amor S.¹

¹ Université de Bordeaux, Centre National de Référence des *Campylobacters* et des *Hélicobacters*, Laboratoire de Bactériologie; ²CHU de Bordeaux, 33076 Bordeaux, France.

²CH de Aix en Provence, Service de diagnostic biologique des maladies infectieuses, Centre Hospitalier du Pays d'Aix, Aix en Provence, France.

Objectifs : L'EUCAST propose des conditions de réalisation et d'interprétation des antibiogrammes (basés sur des cut-off épidémiologiques) des *Campylobacters* et en particulier pour *Campylobacter jejuni* (CJ) et *Campylobacter coli* (CC). Le but de notre étude était 1) de tester ces recommandations sur un grand nombre de souches, 2) de les évaluer également pour *Campylobacter fetus* (CF) et 3) de définir des valeurs critiques pour d'autres antibiotiques que ceux proposés par l'EUCAST.

Méthodes : La méthode EUCAST a été testée sur 326 souches de CJ, 114 CC et 100 CF (MH 5% de sang, suspension 0,5 McFarland, incubation 37°C). La méthode par diffusion autour des disques d'érythromycine (ERY-15UI); ciprofloxacine (CIP-5µg); tétracycline (TET-30UI); ampicilline (AM-10µg); amoxicilline+ac clavulanique (AMC-20/10µg); et gentamicine (GM-10µg), a été utilisée. Des CMI par la méthode du E-test ont également été déterminées pour AM, AMC et ertapénème (ETP).

Résultats : ERY : Considérant les diamètres critiques EUCAST, CJ (R<20 mm) et CC (R<24 mm), aucun CJ n'était résistant contre 17 CC (14,91%). Huit CC avaient un diamètre compris entre 20 et 24 mm mais tous étaient sensibles sur la base des CMI vérifiées par E-test (S<4 mg/L). Aussi, le même diamètre critique peut être utilisé pour CJ et CC soit R<20 mm. En revanche, pour CF aucun diamètre critique n'était adapté.

CIP : Le diamètre critique EUCAST (R<26 mm) était adapté pour CJ et CC mais pas pour CF : 174 des 326 souches de CJ (53,37%) et 87 des 114 CC (76,31%) étaient résistantes.

TET : Avec le diamètre critique R<30 mm, 199 souches des 326 CJ (61,04%), 89 des 114 CC (78,07%) et 31 des 101 CF (30,69%) étaient résistantes.

AM, AMC et ETP : Les mêmes diamètres et CMI critiques pour l'AM et l'AMC, peuvent être utilisés pour CJ, CC et CF : S>19 mm and R<14 mm et S<4 and R>16mg/L. Étaient catégorisées résistantes à l'AM par méthode des disques, 123 des 326 CJ (37,73%) et 25 des 114 CC (21,92%), et sur la base de leurs CMI, 21 des 326 CJ (37,1%) et 24 des 114 CC (21,92%). Aucune souche de CF n'était résistante. Pour l'ETP, la même CMI critique peut être utilisée pour les 3 espèces, soit R >1 mg/L.

GM : Une seule souche de CC était résistante.

Conclusion : Les recommandations EUCAST sont donc adaptées aux antibiogrammes des *Campylobacters*, cependant quelques modifications notamment pour les macrolides, peuvent être apportées. Nous proposons des critères d'interprétation pour d'autres classes d'antibiotiques non considérées par l'EUCAST. Les antibiogrammes de CF par la méthode des disques doivent être interprétés avec précaution.

P103. PCR IS6110 et antigène MPT64 dans l'identification du complexe *tuberculosis*

Marzouk M., Ben Kahla I., Dhaou M., Ferjani A., Hannachi N., Boukadida J.

Laboratoire de Microbiologie et d'Immunologie UR12SP34, CHU Farhat Hached

Objectifs :

Evaluer l'apport de deux techniques : la PCR IS6110 et la détection immunochromatographique de l'antigène MPT64 dans l'identification du complexe *Mycobacterium tuberculosis* à partir des cultures.

Matériels et méthodes :

La PCR avait pour but d'amplifier une séquence de 580 pb (IS6110) spécifique du complexe *Mycobacterium tuberculosis*. Le volume réactionnel contenait 10 µl de tampon (Promega), 1.5 mM, MgCl₂, 0.2 mM de désoxynucleotidetriphosphate, 0.2 mM de chaque amorce, 1.25 U GoTaq Hot Start Polymerase (Promega) et 5 µl d'ADN. La détection de l'antigène MPT64 a été effectuée par méthode immuno-chromatographique à l'aide du kit SD BIO-LINE TB Ag MPT64 (Standard Diagnostics (SD), Yongin, Korea) suivant les recommandations du fabricant. Toutes les souches ont été identifiées par les méthodes biochimiques conventionnelles et par technique d'hybridation inverse à l'aide des kits moléculaires GenoType MTBC, GenoType CM, GenoType AS (Hain Lifescience, Nehren, Germany). Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel EPI6.EXE.

Résultats :

Un total de 210 cultures positives à mycobactéries du complexe *tuberculosis* : 192 *M. tuberculosis*, et 18 *M. bovis*, ainsi que 28 mycobactéries atypiques : 5 *M. gordonae*, 3 *M. fortuitum*, 1 *M. szulgai*, 1 *M. kansasii*, and 18 *M. spp.* ont été incluses. La sensibilité, la spécificité, les valeurs prédictives positives et négatives de la PCR et de l'antigène MPT64 étaient identiques et respectivement de : 99% [96,1-99,8], 100% [97,7-100], 100% [97,6-100] et 99% [96,1-99,8].

Conclusion :

Les deux techniques présentent d'excellentes sensibilité et spécificité dans l'identification du complexe *Mycobacterium tuberculosis*, et sont de plus d'utilisation simple et rapide permettant un gain de temps dans la prise en charge des patients tuberculeux.

P104. Rôle de MgtC dans la virulence de *Mycobacterium* et *Pseudomonas* et son inhibition potentielle par un antagoniste naturel

*Belon C.*¹, *Bernut A.*¹, *Soscia C.*², *Lutfalla G.*¹, *Kremer L.*¹, *Bleves S.*², *Blanc-Potard A.*¹

¹UMR 5235 - DIMNP

²UMR 7255 - LISM

Objectifs

MgtC est un facteur de virulence impliqué dans la survie intra-macrophagique chez plusieurs pathogènes intracellulaires, notamment *Mycobacterium tuberculosis*. MgtC est également présent chez le pathogène extracellulaire *Pseudomonas aeruginosa*. De plus, un peptide MgtR a été identifié comme être un antagoniste naturel potentiel de MgtC. Cette étude porte donc à la fois sur le rôle de MgtC dans la virulence des Mycobactéries et de *Pseudomonas* mais également sur son inhibition potentielle par un antagoniste naturel.

Matériels et méthode

Pour étudier le rôle de MgtC dans la virulence des mycobactéries, nous avons analysé le comportement d'un mutant *mgtC* de *Mycobacterium marinum* dans le modèle d'infection d'embryons de *Danio rerio* en utilisant une lignée transgénique de *Danio* qui marque spécifiquement les neutrophiles. Nous avons également analysé le comportement de ce mutant dans un modèle d'infection cellulaire de macrophages J774. Nous avons également utilisé ces deux modèles d'infection pour l'analyse d'un mutant *mgtC* de *Pseudomonas*. Enfin, les propriétés antagonistes du peptide MgtR ont été étudiées par analyse du comportement d'une souche de *Mycobacterium bovis* BCG exprimant *mgtR* dans le modèle d'infection cellulaire de macrophages et par analyse du comportement d'une souche de *Pseudomonas* exprimant *mgtR* dans les deux modèles d'infection.

Résultats

Concernant le rôle de MgtC dans la virulence des Mycobactéries, nous avons pu observer dans les embryons de *Danio* que la phagocytose par les neutrophiles était plus importante avec le mutant *mgtC* en comparaison à la souche sauvage. De même, nous avons observé une augmentation de la phagocytose du mutant *mgtC* par les macrophages en culture. Concernant le rôle MgtC dans la virulence de *Pseudomonas*, nous avons montré que le mutant *mgtC* était atténué dans l'embryon de *Danio* mais uniquement en présence de macrophages. Ce phénotype est corrélé *ex vivo* par une grande sensibilité du mutant *mgtC* vis-à-vis du killing par les macrophages. Enfin, les souches exprimant *mgtR* semblent se comporter de la même manière que les mutants *mgtC*, suggérant des propriétés anti-virulence pour le peptide MgtR.

Conclusion

Ces travaux nous ont permis de découvrir un rôle pour MgtC dans la phagocytose. MgtC nous fournit également un exemple singulier d'un déterminant de virulence qui promouvoit la subversion des macrophages aussi bien par des pathogènes intracellulaires qu'extracellulaires. Quant à MgtR, les résultats préliminaires nous encouragent à poursuivre et à utiliser les propriétés anti-virulence de ce peptide.

P105. Recherche des mycobactéries dans les biopsies et ganglions : apport de l'automate VersaTREKPaz M., Fornoff D., Habermacher J., Moser A., Souillard N., Delarbre J.-M., Gravet A.

Laboratoire de Microbiologie, Hôpital Emile Muller, 20 avenue du Dr. Laennec, 68070 Mulhouse

En avril 2009, le laboratoire de Microbiologie de l'Hôpital de Mulhouse s'est équipé d'un système VersaTREK/ESP Culture System II de détection de croissance automatique des mycobactéries (distribué en France par la société Biocentric, Bando).

Le système associe un milieu de culture liquide, un supplément de croissance et des antibiotiques. Des éponges placées dans les flacons VersaTREK Myco fournissent une matrice de support de croissance et augmentent la surface exposée à l'oxygène. La technologie est basée sur la détection des modifications de pression dans la partie supérieure du flacon fermé, production ou consommation de gaz dues à la croissance bactérienne (mesure toutes les 24 min). L'algorithme développé peut détecter les mycobactéries à croissance très lente. Le système a été validé pour tous types de prélèvements : respiratoires (y compris lavages, expectorations, etc), aspirations gastriques, liquides céphalorachidiens, liquides articulaires, liquides pleuraux, urines, matières fécales, tissus, sang et moelle osseuse. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux prélèvements de tissus (biopsies, ganglions...) pour lesquels l'examen direct et/ou la culture étaient positifs entre 1^{er} avril 2009 au 31 octobre 2013. Les dossiers de 24 patients ont été inclus. Dans 12 cas il s'agissait de ganglions et les 12 autres cas étant des prélèvements de biopsies (plèvre, péritoine, foie...). Les prélèvements ont étéensemencés après broyage sans décontamination préalable, selon les recommandations du fabricant ; un tube Coletsos a étéensemencé en parallèle. Pour 4 patients avec un examen direct positif après coloration de Ziehl, 2 avaient des cultures négatives en milieu liquide et solide, 2 des cultures contaminées. Pour les 20 autres patients, 18 souches de *Mycobacterium tuberculosis* ont été isolées, 1 souche de *M. bovis* (BCG), une souche de *M. avium*. Pour un patient la culture était positive à *M. tuberculosis* sur VersaTREK mais contaminée en milieu solide. Pour 7 patients, seules les cultures VersaTREK étaient positives, les milieux solides restant négatifs après 4 mois d'incubation. Pour 12 patients les cultures étaient positives en VersaTREK et coletsos (pour 5 le nombre de colonies était inférieur à 5 colonies/tube). Il n'y avait aucune culture positive en milieu solide isolément. La culture en milieu VersaTREK permet d'augmenter le rendement de la culture (8 patients) et une positivité plus rapide. Les prélèvements de tissus restent peu fréquents mais peuvent s'avérer très intéressants pour la documentation d'une infection à mycobactéries.

P106. Caractérisation de souches d'*Escherichia coli* multi-résistantes isolées de poulets atteints de colibacillose en Algérie.

Ghalmi A.¹, Ghalmi F.¹, Azzag N.¹, China B.², Boukhors K.¹

¹Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger

²Institut Scientifique de Santé Publique

Sur 200 foies de poulets présentant des signes cliniques compatibles avec la colibacillose aviaire, 150 souches d'*Escherichia coli* ont été isolées (doit une prévalence de 75%).

Sur les 150 souches isolées, 30 (22,7%) appartenait au sérotype O78, 26 (17,3%) au sérotype O2, 20 (13,3%) au sérotype O1 et 70 (46,7%) n'ont pu être typées.

Les 150 souches ont été testées pour leur sensibilité à 12 antibiotiques différents.

Par ordre décroissant, 143 souches (95,3%) étaient résistantes à la céfalotine, 139 (92,66%) à la tétracycline, 134 (89,33%) à l'acide nalidixique, 130 (86%) à l'amoxicilline, 124 (82,6%) à la combinaison triméthoprim+ sulfaméthoxazole, 119 (79,3%) à l'ampicilline, 83 (55,3%) à la combinaison amoxicilline+acide clavulanique, 62 (41,33%) au chloramphénicol, 37 (24,66%) aux nitrofuranes, 36 (24%) à la norfloxacine, 34 (22,6%) à la colistine et 13 (8,6%) au céfotaxime.

Toutes les souches étaient multi-résistantes : 38 souches (25%) résistaient à 6 antibiotiques différents, 35 (23%) à 8 antibiotiques, 33 (22%) à 7 antibiotiques, 14 (9%) à 9 antibiotiques, 11 (7%) à 5 antibiotiques, 10 (7%) à 10 antibiotiques, 5 (3,3%) à 4 antibiotiques, et 4 (3%) à 3 antibiotiques différents.

Certaines résistances sont significativement ($p < 0,01$) associées entre elles laissant supposer des supports génétiques communs ou des mécanismes de résistance croisés.

De plus, 13 souches étaient résistantes au céfotaxime (une céphalosporine de troisième génération) et ont été confirmées par un test de synergie (image en bouchon de champagne) et un test de confirmation (double disque) pour leur phénotype producteur de bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE).

Des caractérisations moléculaires ultérieures devront venir confirmer ces résultats préliminaires. Néanmoins, la présence en grande quantité d'*E. coli* multi-résistantes chez le poulet doit nous alerter quant au bon usage des antibiotiques en médecine vétérinaire.

P107. Etude génétique de *E. coli* de poulets résistants aux céphalosporinesKempf I.¹, Anjum M.², Kirchner M.², AbuOun M.², Le Devendec L.¹, Jouy E.¹, Baron S.¹, Perrin-Guyomard A.¹, Bruneau M.¹¹ANSES²AHVLA, UK

L'objectif de l'étude était de caractériser des souches de *E. coli* isolées de poulets de chair en 2010-2011, résistantes aux céphalosporines de troisième génération (R-C3G) et porteuses du gène *bla*CTX-M-1, et/ou du gène *bla*CMY-2, les gènes les plus fréquents sur les souches aviaires R-C3G en France. Douze souches isolées de caeca de poulets à l'abattoir (plan de surveillance annuel) et douze souches isolées de lésions de colibacilloses (réseau Résapath) ont été incluses. Le gène *bla*CTX-M-1 était présent chez 20 de ces souches, le gène *bla*CMY-2 chez deux souches et les deux gènes conjointement chez deux souches. Les concentrations minimales inhibitrices d'antibiotiques ont été déterminées par dilution en milieu liquide à l'aide de plaques Sensititre et interprétées selon les cut-offs épidémiologiques EUCAST. Les gènes de résistance à différents antibiotiques et les gènes de virulence ont été détectés par hybridation sur microarrays (VLA, Weybridge, UK). Les gènes recherchés comprenaient 79 gènes de virulence et 159 gènes de résistance aux antimicrobiens.

Les résistances associées les plus fréquentes étaient la résistance aux sulfamides (21 souches), à la tétracycline (17 souches), à la ciprofloxacine (13 souches) et à la streptomycine (10 souches). Les gènes présents sur les souches permettaient le plus souvent d'expliquer les phénotypes observés : gènes *sul1* (5 souches), *sul2* (21 souches), *tetA* (21 souches), *tetB* (2 souches), *aadA* (10 souches), *strA-strB* (6 souches). Les gènes *qnr* et *qep* n'étaient pas trouvés. Six souches portaient également un gène *bla*TEM et 5 un gène *bla*OXA-2. Dix souches avaient le gène d'intégrase *int1*.

Certains gènes de virulence étaient significativement plus fréquents sur les souches isolées de colibacilloses : *mchF* (ABC transport protein) : 6/12 souches d'abattoir vs 12/12 souches de colibacillose ; *hp_iha* (adherence protein) : 0/12 vs 7/12 ; *mchC* (MchC protein) : 1/12 vs 7/12 ; *ireA* (Siderophore receptor) : 1/12 vs 8/12 ; *hp_vat* (vacuolating autotransporter protein) : 0/12 vs 6/12. D'autres gènes étaient fréquemment détectés sur les deux types de souches : *iroN* (Enterobactin siderophore receptor protein) 8/12 vs 12/12) ; *iss* (Increased serum survival) 11/12 vs 12/12.

Les résultats obtenus permettent de mieux connaître le potentiel de virulence et de résistance des souches aviaires de *E. coli* R-C3G. Le séquençage des plasmides porteurs des gènes *bla*CTX-M-1, ou *bla*CMY-2, est en cours de réalisation et permettra de déterminer la position des différents gènes et de comparer les plasmides en fonction de leur origine épidémiologique.

P108. Biovar 7 de *Brucella abortus*, le retour !

Gilles Le Carrou¹, Sebastien Allix¹, Adrian M. Whatmore², Bruno Garin-Bastuji¹ et Virginie Mick¹.

¹Université Paris-Est-ANSES, Laboratoire de Santé Animale, Unité Zoonoses Bactériennes, Centre National de référence des *Brucella*, Laboratoire de Référence National et UE/OIE/FAO pour la Brucellose Animale, 23 avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort Cedex (France)

²FAO/WHO Collaborating Centre for Brucellosis/OIE Brucellosis Reference Centre, Animal Health and Veterinary Laboratories Agency (AHVLA), Addlestone, Surrey, KT15 3NB, United Kingdom.

Objectif :

La taxonomie de *Brucella* est en perpétuel remaniement, tant au niveau de l'espèce qu'au niveau intra-espèce. Des travaux non publiés de Verger et al. ont montré que la souche de référence 63/75 de *Brucella abortus* biovar (bv) 7 s'avérait être un mélange de *B. abortus* bv3 et bv5. De ce fait, le biovar 7 a été retiré de la classification officielle du genre *Brucella* en 1988. Cependant, la littérature actuelle abonde encore d'investigations de typage, incluant cet exbiovar.

Notre étude se proposait de clarifier la situation des souches préalablement identifiées comme *B. abortus* bv7 dans les collections internationales.

Méthodes :

L'identification de cet ex-biovar reposait exclusivement sur des approches phénotypiques, avec notamment une agglutination avec les deux sérums monospécifiques anti-A et anti-M. Les collections de l'AHVLA et de l'ANSES comptaient 14 souches, incluant l'ancienne souche de référence 63/75, autrefois identifiées comme *B. abortus* bv7. Après un ré-isolément exhaustif, une analyse phénotypique approfondie a été conduite sur ces souches. La stratégie classique a été complétée par de multiples approches moléculaires (RT-PCR, AMOS-PCR, Bruce-Ladder, omp polymorphism, IS711 fingerprinting, VNTR21, MLVA-16, MultiLocus Sequence Analysis-MLSA).

Résultats :

Après isolement, sur les 14 souches étudiées, seules 4, toutes d'origine bovine, isolées au Kenya, en Turquie et Mongolie, possédaient réellement les caractéristiques phénotypiques attendues. Les 10 autres, qui présentaient le caractère agglutinant de l'ex-biovar 7, devaient ce caractère « erroné » à un mélange de biovars, comme montré par Verger.

De façon intéressante, les méthodes spécifiques de genre, espèce et biovar confirmaient l'appartenance des 4 souches à l'espèce *B. abortus*, tout en infirmant leur affiliation aux biovars reconnus (biovars 1-6 et 9). Des analyses phylogénétiques et épidémiologiques (MLSA, VNTRs) renforçaient l'idée que ces souches formaient un groupe distinct. Étonnamment, la souche kenyane, qui partageait le même phénotype que le biovar 7, était génétiquement divergente par rapport aux trois autres isolats.

Les résultats de cette étude polyphasique nous permettent de proposer la réintroduction du biovar 7 dans la classification de *Brucella*, avec au moins trois souches représentatives.

Conclusion :

Nos résultats illustrent la complexité de la taxonomie de *Brucella*. Cette étude suggère que d'autres collections de *Brucella* pourraient contenir des souches mal identifiées comme *B. abortus* bv7, pour lesquelles il serait nécessaire de révérifier la position taxonomique.

Pro9. Optimisation du diagnostic du botulisme aviaire par PCR temps réel

Le Marechal C.¹, Chemaly M.¹, Le Bouquin S.², Woudstra C.³, Fach P.³, Bayon-Auboyer M.-H.⁴, Houard E.¹, Souillard R.², Rouxel S.¹

¹ Anses - UEB, Laboratoire de Ploufragan – Plouzané, Unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins, Ploufragan, France

² Anses - UEB, Laboratoire de Ploufragan – Plouzané, Unité d'Epidémiologie et bien-être en aviculture et cuniculture, Ploufragan, France

³ Anses, Laboratoire de sécurité des aliments, Maisons Alfort, France

⁴ Labocea, Ploufragan, France

Objectif : Le botulisme est une affection nerveuse due à l'action de la toxine botulique produite par *Clostridium botulinum*. On distingue 8 types toxiques annotés de A à H, le botulisme aviaire étant majoritairement concerné par les types toxiques C et C-D. Le diagnostic du botulisme aviaire est établi dans un premier temps sur la base des symptômes cliniques qui sont révélateurs mais non spécifiques et nécessite donc une confirmation en laboratoire. La méthode actuelle consiste en la démonstration de la présence de la toxine botulique par le test de létalité sur souris et par l'identification du type toxique impliqué par PCR après enrichissement du contenu intestinal des animaux suspects. Bien que cette méthode soit reconnue, la confirmation du diagnostic clinique par cette approche est souvent difficile (compétition avec la flore annexe, prélèvements délicats à réaliser...). L'objectif de cette étude est de tester l'analyse de nouveaux prélèvements dans l'optique d'améliorer la confirmation du diagnostic clinique en laboratoire.

Matériels et méthodes : Pour une trentaine de suspicions de botulisme aviaire, les foies, rates et écouillons cloacaux prélevés sur des animaux suspects ont été analysés par PCR temps réel après enrichissement en parallèle des analyses classiques (test de létalité sur souris et PCR temps réel sur contenu intestinal après enrichissement) pour détecter *C. botulinum* de type C, D, C-D, D-C et E.

Résultats : Une trentaine de suspicions de botulisme aviaire a été analysée par l'approche classique et par l'analyse des nouveaux prélèvements. L'analyse des foies, rates et écouillons cloacaux par PCR temps réel après enrichissement a permis d'améliorer la confirmation du diagnostic de plus de 20 % par rapport au test de létalité sur souris et de plus de 45 % par rapport à la PCR sur contenus intestinaux. Des prélèvements réalisés dans l'environnement des élevages identifiés comme positifs par l'analyse des nouveaux prélèvements ont permis de confirmer la présence de spores de *C. botulinum* dans l'environnement de ces élevages et ainsi de valider les résultats obtenus par cette nouvelle approche. Parmi les nouveaux prélèvements testés, les résultats montrent que le foie est le prélèvement qui permet d'obtenir le meilleur taux de confirmation et serait donc à privilégier lors de suspicions de botulisme aviaire.

Conclusion : Cette étude montre que l'analyse des foies par PCR temps réel après enrichissement est pertinente pour confirmer en laboratoire les suspicions de botulisme aviaire.

P110. Biocides et *Listeria monocytogenes* dans la filière saurisserie*La Carbone S.*¹, *Desmarais C.*², *Levert D.*¹, *Anger-Lemaître B.*², *Soumet C.*²¹ACTALIA Sécurité des Aliments, Villers Bocage, France²ANSES- Unité Antibiotiques, Biocides, Résidus et Résistance - Fougères, France

Objectifs: Déterminer si l'utilisation des biocides en conditions sub-optimales a une incidence sur la tolérance et la virulence de *L. monocytogenes*.

Introduction: Si les biocides appliqués dans les conditions recommandées d'utilisation sont démontrés comme efficaces, qu'en est-il dans des conditions sub-optimales ? *L. monocytogenes* est-elle capable de s'adapter et devenir tolérante à d'autres biocides ? Les souches tolérantes sont-elles plus difficiles à détruire aux concentrations d'emploi des biocides et présentent-elles une virulence accrue ?

Matériels & Méthodes: La sensibilité intrinsèque de 56 souches de *L. monocytogenes* (issues de la filière saurisserie) vis-à-vis de 8 biocides représentatifs des usages industriels a été définie par une méthode de dilutions basée sur la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI). La capacité d'adaptation a ensuite été évaluée vis-à-vis de 4 substances actives en transférant les cultures bactériennes dans un milieu avec des concentrations croissantes de biocide, quotidiennement pendant 7 jours. Pour la survie, les Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) ont été déterminées par des tests normalisés en suspension et sur support en inox. Enfin, l'impact de l'exposition aux biocides sur l'expression de gènes associés à la virulence (*prfA*, *actA*, *inlA* et *hlyA*) a été évalué par RT-PCR.

Résultats: Seul le chlorure de benzalkonium (BC, ammonium quaternaire) induit une grande variabilité des valeurs de CMI (0,75 à 6 µg/ml). L'adaptation (CMI multipliée par au moins 2) est observée le plus fréquemment avec le BC qui favorise l'apparition de tolérances croisées, principalement vis-à-vis des produits biocides commerciaux à base d'ammoniums quaternaires. Aucune différence significative de survie (p-value > 0,01) n'est observée entre les souches adaptées et non adaptées dans les essais en suspension et sur support. Les biocides testés sont généralement efficaces (réduction >= 4 log₁₀) aux concentrations d'emploi dans les essais en suspension et sur support. L'expression de certains gènes associés à la virulence est induite suite aux traitements biocides et favorisée par une adaptation préalable.

Conclusions: le contact répété avec des biocides peut favoriser le développement de tolérances non croisées, mais aussi croisées chez des souches de *L. monocytogenes*. L'utilisation des produits biocides dans des conditions sub-optimales (ex : biofilms) pourrait ainsi introduire un risque de sélection de bactéries tolérantes à d'autres biocides et présentant potentiellement une expression accrue de certains facteurs de virulence.

P111. Etude de l'efficacité des opérations de nettoyage et désinfection dans la filière viande : mise au point d'un protocole spécifique et harmonisé*Frémaux B., Denis C., Rivollier M., Bellon Fontaine M-N.***Objectifs**

L'efficacité des produits de nettoyage et désinfection (N&D) est impactée par de nombreux paramètres dans l'industrie agroalimentaire (nature de la souillure, type de matériaux, état physiologique des bactéries...). La plupart ne sont pas pris en compte dans les protocoles normalisés (NF EN 13 697 ou 1276) utilisés pour valider leur efficacité. L'objectif de ce travail était d'établir un protocole adapté à la filière viande pour l'obtention de surfaces encrassées et contaminées par des cellules adhérentes de façon harmonisée et répétable, pré-requis pour évaluer de manière fiable l'efficacité des produits de N&D.

Matériels et méthode

La contamination et l'encrassement surfacique de 2 matériaux natifs (INOX et PVC) ont été réalisés par sédimentation d'une suspension bactérienne préparée dans de l'exsudat de viande de porc, bœuf ou dinde, et dans les solutions de bovine serum albumine (BSA) à 3 g/L et 0,3 g/L prévues par la norme NF EN 13 697. Une incubation de 6h à 10°C a permis aux bactéries d'adhérer. La robustesse du protocole a été évaluée à l'aide de 6 souches d'espèces bactériennes différentes. L'impact de l'encrassement sur les propriétés de surface des matériaux a été déterminé (mesures d'angle de contact et microscopie en force atomique). Les matériaux ainsi contaminés et encrassés ont servi à évaluer l'efficacité de 2 produits de N&D, un alcalin chloré et un ammonium quaternaire combiné à des peroxydes. En parallèle, le protocole de la norme NF EN 13 697 a été suivi.

Résultats

Les pourcentages d'adhésion étaient répétables et relativement reproductibles pour l'ensemble des 6 souches bactériennes, quels que soient la souillure et le matériau utilisés. En plus d'être rapide et homogène, l'encrassement des surfaces d'INOX et de PVC a engendré une diminution de l'hydrophobie de surface nettement plus marquée avec les exsudats de viande qu'avec les solutions de BSA. Cette modification de surface était associée à une nette diminution de l'adhésion des bactéries. L'efficacité inhibitrice des produits de N&D était variable selon la souche, les types de souillure et de matériau utilisés. Les bactéries adhérentes présentaient une sensibilité accrue par rapport aux bactéries ensemencées par dépôt selon le protocole de la norme NF EN 13 697.

Conclusion

Un protocole fiable et harmonisé a été développé pour la contamination et l'encrassement de matériaux en présence d'une souillure complexe typique de la filière viande. L'utilisation de biofilms est nécessaire pour une mesure encore plus fiable de l'efficacité des produits de N&D.

P112. Caractérisation des exopolysaccharides dans les biofilms de *Listeria monocytogenes*.T. Brauge³, I. Sadovskaya⁴, G. Midelet-Bourdin³, C. Faille⁵, T. Benezech⁵, E. Maes^{1,2}, Y. Guérardel^{1,2}¹ Université Lille1, UGSF (Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle), Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, France² CNRS UMR 8576, Université des Sciences et Technologies de Lille 1, Villeneuve d'Ascq, France³ ANSES, Laboratoire de Sécurité des Aliments, Unité B3PA (Bactériologie et Parasitologie des Produits de la Pêche et de l'Aquaculture), Bassin Napoléon, Boulogne-sur-Mer, France⁴ Université du Littoral-Côte d'Opale, Bassin Napoléon, Boulogne-sur-Mer, France⁵ INRA, UR0638 PIHM (Processus aux Interfaces et Hygiène des Matériaux), Villeneuve d'Ascq, France

Listeria monocytogenes (*L. monocytogenes*) est une bactérie pathogène impliquée dans des toxi-infections alimentaires (TIAC) à l'origine de la listériose, une maladie peu fréquente mais avec un taux de mortalité de 12,7 % chez l'homme (EFSA, 2011). On distingue 17 sérotypes dans l'espèce *L. monocytogenes* dont les plus répandus lors des TIAC sont les sérotypes 1/2a et 4b. Cette bactérie est capable de se fixer à des surfaces biotiques ou abiotiques et de sécréter une matrice extracellulaire adhésive et protectrice lui permettant de former des biofilms. Cette matrice extracellulaire est composée d'exopolysaccharides, de protéines, d'ADNe et d'eau (Combrouse et al., 2013). Quelques travaux ont eu lieu sur la caractérisation des EPS mais uniquement pariétaux (Uchikawa et al., 1986).

Dans le but de mieux définir les biofilms de *L. monocytogenes*, nous avons caractérisé les exopolysaccharides excrétés dans la matrice extracellulaire des biofilms de 5 souches de *L. monocytogenes* de sérotype 1/2a et 4b et nous les avons comparés aux exopolysaccharides pariétaux et excrétés dans le milieu de culture. Les biofilms ont été cultivés sur polystyrène dans un milieu pauvre en source carboné MCDB 202 (Hebraud et Guzzo, 2000) à 37°C. Après 48 heures d'incubation, les exopolysaccharides ont été extraits des parois bactériennes, de la matrice extracellulaire et du milieu de culture (Sadovskaya et al., 2005). Ces derniers ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse (GC MS) (ULCO Boulogne sur Mer) puis par résonance magnétique nucléaire 900 MHz (RMN 900 MHz) (UGSF, Université Lille 1).

Nous avons observé que les exopolysaccharides majeurs excrétés dans la matrice extracellulaire ainsi que dans le milieu de culture étaient des acides téichoïques structurellement identiques aux acides téichoïques pariétaux. Comme dans les travaux d'Uchikawa et al. (1986) qui avait décrit des compositions d'acides téichoïques pariétaux en fonction des sérogroupes, nous avons également observé des structures d'acides téichoïques différents en fonction du séro groupe.

Ces résultats nous ont permis de mieux caractériser la matrice extracellulaire des biofilms de *L. monocytogenes* ce qui contribue à mieux appréhender et gérer le risque sanitaire lié à cette bactérie dans les industries.

P113. Impact de traitements biocides sur la sensibilité bactérienne aux antibiotiques

Pissavin C.¹, Soumet C.², Fremaux B.³, Denis M.⁴, Meheust D.¹, N'Dongo H.¹, Le Grandois P.⁵

¹ IUT Saint-Brieuc, Université Rennes 1, Département Génie Biologique, 18 rue Henri Wallon, 22004 Saint-Brieuc, France

² Laboratoire de Fougères - Unité Antibiotiques, Biocides, Résidus et Résistance – 10 rue Claude Bourgelat –Javené – CS40608 – 35306 Fougères Cedex – France

³ IFIP Institut du porc- 7, avenue du Général de Gaulle - 94700 Maisons-Alfort – France

⁴ ANSES - Laboratoire de Ploufragan-Plouzané - Unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins – Site de Beaucemaine – BP 53- 22440 Ploufragan – France

⁵ ANSES- Laboratoire de Fougères - Unité Antibiotiques, Biocides, Résidus et Résistance – 10 rue Claude Bourgelat –Javené – CS40608 – 35306 Fougères Cedex – France

Objectifs :

Les biocides désinfectants sont généralement efficaces lorsqu'ils sont utilisés dans les conditions recommandées. Cependant, dans certaines situations, les bactéries sont exposées sur le terrain à des concentrations résiduelles ou sublétales de biocides. Cette étude vise à connaître l'impact de l'utilisation de biocides en conditions sub-optimales sur l'évolution de la sensibilité aux biocides et aux antibiotiques (ATB) de 4 espèces bactériennes préoccupantes en milieu alimentaire.

Matériels et méthode :

20 souches issues de la filière porcine ont été sélectionnées pour chacune des espèces suivantes : *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Campylobacter coli* et *Escherichia coli*. Leur sensibilité vis-à-vis de 5 biocides représentatifs des usages industriels et différents ATB a été définie par une méthode standardisée de dilutions basée sur la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI). La capacité d'adaptation a ensuite été évaluée en transférant les cultures bactériennes dans un milieu contenant des concentrations croissantes d'un biocide de la famille des ammoniums quaternaires (AQ), quotidiennement pendant 7 jours. Les CMI de différents biocides et ATB ont alors été déterminées. L'identification des mécanismes de résistance a été réalisée via la détection de gènes spécifiques codant notamment des pompes à efflux.

Résultats :

Suite aux contacts répétés avec le biocide à base d'AQ, la sensibilité à plusieurs ATB est diminuée. L'augmentation de la CMI de certains ATB est la plus marquée pour les souches d'*E. coli* tant en nombre d'ATB impactés, qu'en amplitude (4 à 32 fois). La majorité des souches d'*E. coli* a acquis une à deux nouvelles résistances à des antibiotiques. Notamment, deux souches sont résistantes à 7 antibiotiques. La CMI des antibiotiques est le plus souvent augmentée d'un facteur 4 pour les souches *Salmonella* et varie peu pour celles de *Listeria* et *Campylobacter*. Pour ces 3 espèces, seules quelques souches sont résistantes à au moins un antibiotique. Globalement, pour les biocides, la sensibilité aux AQ est diminuée de 3 à 4 fois pour les souches *E. coli* et *Salmonella*, et de 2 fois pour *L. monocytogenes*. Il n'y a pas de modification de la sensibilité aux autres biocides (chlorés et peracides) quelle que soit l'espèce bactérienne.

Conclusions :

L'exposition répétée de souches bactériennes à un biocide conduit au développement d'une tolérance vis-à-vis d'autres biocides, et à une diminution de la sensibilité, voire une résistance, aux ATB. Le lien entre la capacité d'adaptation et la présence de certains gènes de résistance est en cours d'exploration.

P117. Transferts bactériens aliment - surface de *Listeria monocytogenes*G. Midelet-Bourdin¹, G. Leleu¹, C. Couvreur¹, S. Lacarbona², C. Denis²¹ ANSES, Laboratoire de Sécurité des Aliments, Unité B3PA (Bactériologie et Parasitologie des Produits de la Pêche et de l'Aquaculture), Bassin Napoléon, Boulogne-sur-Mer, France² ACTALIA Sécurité des Aliments, Boulevard du 13 juin 1944, Villers Bocage, France

Selon Haeghebaert *et al.* (2001), la contamination des équipements pourrait avoir été responsable de près de 40% des TIAC survenues en France entre 1996 et 1998. La présence de biofilms sur les surfaces affecte largement l'hygiène de l'environnement de fabrication des produits alimentaires. Il a été estimé que *Listeria monocytogenes* par exemple, dont la principale voie de contamination est la voie alimentaire, causait plus de 2500 maladies par an aux Etats-Unis dont 500 cas mortels. Le nombre de cas humains de listérioses a par ailleurs augmenté de 59% ces 5 dernières années dans l'Union Européenne avec un taux élevé de mortalité (14,2%). Différentes voies de contamination des aliments ont été décrites dans la littérature (personnel, environnement,...) et matière première.

L'objectif de ces travaux a été de quantifier les transferts bactériens (aliment-surface) et de déterminer comment se développe la population bactérienne transférée sur la surface. Nous avons quantifié les bactéries transférées à partir de saumon cru ionisé artificiellement contaminé par des cocktails définis (*L. monocytogenes* et bactéries d'altération) sur une surface inerte. Le taux de transfert de *L. monocytogenes* était important (environ 55 à 60%) et comparable sur les coupons en PVC conditionnés par de l'exsudat de saumon (simulant une surface souillée) ou non conditionnés (simulant une surface propre) lorsque la souche était étudiée seule. En présence d'une flore annexe, le taux de transfert de *L. monocytogenes* du saumon contaminé vers le coupon PVC était plus faible sur les coupons conditionnés. Pour les flores annexes, le taux de transfert (40 à 65%) était comparable sur coupons conditionnés ou non conditionnés sauf pour les entérobactéries (taux de transfert plus faible sur coupons conditionnés). La survie des cellules adhérentes à 8°C durant 24 heures était meilleure sur les coupons conditionnés pour *L. monocytogenes* et les deux souches de *Carnobacterium*.

Ce travail a permis de confirmer que différents facteurs sont à prendre en compte pour modéliser la contamination des surfaces par les aliments entrant dans la chaîne de fabrication et notamment : la nature des surfaces (hydrophobicité), la propreté ou le niveau d'encrassement des surfaces, la nature des flores en présence.

Ce projet a contribué à mieux quantifier les transferts bactériens ainsi que la survie des microorganismes sur les surfaces.

P114. Nouvelle méthode de typage moléculaire de *Pneumocystis jirovecii* par analyse de marqueurs microsatellitesGits-Muselli M.¹, Alanio A.^{1,2,3}, Menotti J.^{1,2,3}, Guigue N.^{1,2}, Hamane S.¹, Bretagne S.^{1,2,3}¹ Laboratoire de Parasitologie-Mycologie; AP-HP, Groupe Hospitalier Saint-Louis-Lariboisière-Fernand-Widal² Université Paris-Diderot, Sorbonne Paris Cité;³ Institut Pasteur, Unité de Mycologie Moléculaire, CNRS URA3012, Paris, France

Objectifs : La pneumocystose est une infection pulmonaire opportuniste sévère causée par le champignon ascomycète *Pneumocystis jirovecii* survenant chez des patients immunodéprimés. La transmission aérienne de *P. jirovecii* survient entre individus immunocompétents considérés comme hôte réservoir et hôtes immunodéprimés. De nombreuses épidémies d'infections à *P. jirovecii* ont été rapportées chez des transplantés rénaux ainsi que dans des unités de pédiatrie, soulignant l'importance du développement de méthode de typage moléculaire afin de caractériser l'acquisition nosocomiale. Des techniques de PCR-SSCP ou de typage MLST sont largement utilisées pour différencier les génotypes. Ces méthodes ne permettent pas de détecter les mélanges de façon rapide et efficace.

Méthodes : Nous avons profité de la publication récente du séquençage du génome complet de *P. jirovecii* (Cissé et al. mBio 2013) pour développer une méthode de typage moléculaire basée sur l'étude de marqueurs microsatellites, permettant une détection aisée des mélanges de génotypes (de Valk et al. 2005).

A partir de 10 séquences courtes (2 à 4 bases) répétées en tandem définies à l'aide d'outils bioinformatiques, nous avons sélectionné 6 marqueurs. Une collection de 95 prélèvements respiratoires positifs à *P. jirovecii* par PCR (52 LBA et 43 autres prélèvements respiratoires) issus de 80 patients prélevés entre octobre 2010 et août 2013 ont ensuite été testés.

Résultats : Parmi ces 95 échantillons, un génotype unique a été observé pour 32 prélèvements (33.7%) correspondant à 29 patients pour lequel nous avons obtenu 23 génotypes distincts. Nous avons de plus observé des mélanges de génotypes avec ≥ 1 marqueur/locus dans 63 (66.3%) échantillons issus de 51 (63.8%) patients, parmi lequel 44 (46.3%) échantillons issus de 36 (45%) patients avaient ≥ 2 marqueurs/locus. Aucune différence de répartition des génotypes n'a été objectivée en fonction de la charge fongique ou du type de prélèvement respiratoire (LBA ou expectoration induite).

Conclusion : Les marqueurs microsatellites développés et caractérisés permettent une analyse rapide et facilement transformable en données numérisées. Nous avons observé une large proportion de mélanges de génotypes, dont la mise en évidence aurait été difficile ou non réalisable par les techniques usuelles type MLST ou SSCP.

P115. Catalase de *Pseudallescheria boydii* : un facteur de pathogénicité

Mina S., Marot A., Robert R., Bouchara J.-P., Cimon B., Fleury M.

Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, GEIHP UPRES EA 3142, Université d'Angers, Institut de Biologie en Santé PBH-IRIS, CHU, 4 rue Larrey, 49 933 Angers Cedex 9, France

Objectifs:

Les espèces du complexe *Pseudallescheria/Scedosporium* sont des champignons filamenteux reconnus comme agents de colonisation des voies respiratoires chez les patients atteints de la mucoviscidose. Pour se protéger contre les espèces réactives de l'oxygène produites par les cellules phagocytaires de l'hôte, le champignon produit des enzymes, parmi lesquelles les catalases. Les catalases constituent une grande famille d'enzymes qui clivent le peroxyde d'hydrogène, permettant un échappement partiel à la réponse immunitaire, celles-ci sont considérées comme facteurs de pathogénicité. Le but de notre étude était d'étudier l'équipement catalasique du clade de *Pseudallescheria boydii* (souche IHEM 15155), le caractériser biochimiquement et génétiquement et d'évaluer son rôle dans la pathogénicité.

Matériels et Méthodes:

L'équipement catalasique a été identifié par PAGE et coloration négative, puis purifié par un procédé chromatographique en trois étapes. La séquence nucléotidique du gène a été identifiée par Walking-PCR puis l'ADNc a été séquencé. Afin d'analyser l'expression du gène des PCR quantitatives ont été réalisées à différents temps de germination, et à différentes concentrations de stimulation de peroxyde d'hydrogène. Afin d'analyser l'importance de la production de cette enzyme au cours de l'infection, la recherche d'anticorps dirigés contre cette enzyme a été évaluée par ELISA en utilisant 69 sérums de patients atteints de mucoviscidose.

Résultats:

Trois catalases ont été identifiées et la catalase mycélienne A2 a été purifiée. L'enzyme, de 460 kDa, est une protéine monofonctionnelle constituée de quatre sous-unités glycosylées de 82 kDa. Le gène de la catalase A2, de 2563 pb, est constitué de six exons et cinq introns. La séquence codante correspondante est constituée de 2178 pb. Les résultats des PCR quantitatives nous montrent que le gène est exprimé dès 24h de germination et il est stimulé par le peroxyde d'hydrogène à des concentrations de 0,125-2 mM. Des anticorps anti-catalase sont détectés dans tous les sérums de patients suspectés d'une infection à *Pseudallescheria/Scedosporium*.

Conclusion:

L'ensemble de ces résultats suggère que la catalase A2 a une importance dans la réponse au stress oxydatif et donc dans le mécanisme de pathogénicité de *Pseudallescheria boydii*. L'expression de ce gène sera évaluée en présence de macrophages humains activés. De plus cette catalase semble être un bon candidat pour le développement d'un test immunologique, pour cela, une protéine recombinante est en cours de production.

P116. Recherche de levures sur endoscopes au CHU de Tlemcen Algérie

Lahfa Imane, Boucherit-Otmani Zahia, Boucherit Kebir, Gheffour Kamila, Benmansour Wafaâ, Mezerai Rabiha, Adida Houria et Seghir Abdelfatteh

Laboratoire Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique (LapSab), Département de biologie, Université AboubekrBelkaïd.

Les infections nosocomiales posent un réel problème dans le domaine de la santé publique. En effet, ces dernières sont l'une des causes principales de mortalité essentiellement chez les immunodéprimées.

En dehors des infections nosocomiales bactériennes constatées, il apparait que les infections nosocomiales d'origine fongique commencent à prendre de plus en plus d'ampleur, les dispositifs médicaux sont de ce fait les principales sources de ces dernières.

Objectif

L'objectif de notre étude est de rechercher des contaminations d'origine fongique liées aux genres *Candida* et *Cryptococcus* sur les endoscopes au CHU de Tlemcen (Algérie).

Matériel et méthodes

Nous avons procédé à l'isolement, la purification et l'identification des souches à partir des prélèvements effectués sur les trois canaux des endoscopes

Résultats

Sur les 100 prélèvements effectués, 33 souches ont été isolées et identifiées.

Des souches de l'espèce *Candia albicans*, *Candida glabrata*, *Candida famata*, *Candia Kresei* et *Saccharomyces cerevisiae* ont été retrouvés avec une prédominance de *Candida albicans* et *Candida glabrata*.

Conclusion

Les infections d'origine fongique sur les dispositifs médicaux sont donc largement présentes en milieu hospitalier.

P121. Epidémiologie et sensibilité aux antifongiques des souches pathogènes de *Candida non-albicans*

Meriem BENDJELLOUL¹, BOUCHERIT Kebir², BOUCHERIT-OTMANI Zahia¹

¹ Université de Tlemcen-Algérie

² Centre universitaire de Naâma

Objectifs : L'incidence croissante des espèces de *Candida non-albicans*, et le pronostic vital souvent compromis pour les patients atteints de septicémie à *Candida*, rendent urgente la connaissance exacte de leur distribution à travers le monde et d'échappement à l'action des antifongiques actuellement utilisés en clinique. Pour cela, nous nous sommes proposés de réaliser une étude épidémiologique des espèces de *Candida non-albicans* et tester la sensibilité des souches isolées vis-à-vis de deux antifongiques : l'amphotéricine B et la caspofungine.

Matériel et méthodes : Un total de 300 prélèvements cliniques des pièces de cathéters veineux périphériques a été effectué pendant 08 mois des services de médecine interne, chirurgie A et néonatalogie du Centre Hospitalo-Universitaire d'Oran (Algérie). L'étude de la sensibilité des espèces de *Candida non-albicans* aux deux antifongiques utilisés a été réalisé selon la méthode décrite en 2008 par Clinical Laboratory Standards Institute M27-A3.

Résultats : Les germes en cause dans la colonisation étaient *Candida parapsilosis* avec 72,72% des cas, 9,09% pour *Candida glabrata*, ainsi que pour *Candida Krusei*, 4,54% pour *Candida famata* et *Candida lusitaniae*.

Les isolats montrent des concentrations minimales inhibitrices (CMI) entre 0,25 et 1µg/ml pour l'amphotéricine B. Les CMI de différentes *Candida (Candida non-albicans)* vis-à-vis de la caspofungine sont comprises entre 0,0625 et 2µg/ml. La résistance aux échinocandines est observée dans 4,54% des isolats obtenus dont la CMI est supérieure à 8µg/ml.

Conclusions : Une amélioration surtout des pratiques de soins des cathéters est la principale recommandation à tous les porteurs de dispositifs médicaux afin de prévenir le développement d'une infection fongique.

L'amphotéricine B reste toujours l'antifongique leader contre les infections fongiques et la caspofungine semble être une bonne alternative.

Mots clés : Amphotéricine B; *Candida non-albicans*; caspofungine; cathéters; CMI; infections nosocomiales fongiques.

P119. Rôle des perceptions dans la prévention des toxi-infections alimentairesNgueutsa R.¹, Kouabenan D. R.², Issartel B.³¹ Université de Grenoble 2, Laboratoire LIP/PC2S; IUT Lumière, Université de Lyon 2² Université de Grenoble 2, Laboratoire LIP/PC2S³ Centre de vaccination internationales et de Médecine des Voyages du Tonkin

Les foyers de toxi-infections alimentaires augmentent avec l'expansion de la restauration commerciale. Ces toxi-infections génèrent d'importantes pertes économiques pour les entreprises de restauration commerciale qui s'engagent de plus en plus dans la prévention. Seulement, les connaissances sur les leviers à activer pour améliorer l'efficacité des dispositifs de prévention et notamment ceux qui ont trait aux comportements humains, ne sont pas toujours disponibles. La présente communication expose une partie des résultats d'une étude réalisée pour le compte d'une entreprise de restauration rapide. Le but de l'étude était de comprendre les comportements des équipiers vis-à-vis des mesures d'hygiène et de sécurité en vue d'améliorer les dispositifs de prévention auprès de ces derniers. On s'intéresse ici à la pertinence perçue des mesures et la perception par les équipiers de leur capacité à les mettre en œuvre. Le lien entre ces perceptions et leur engagement dans des comportements hygiéniques et sécuritaires est analysé. On s'attend à un engagement conséquent des équipiers dans des comportements hygiéniques et sécuritaires lorsqu'ils trouvent que les mesures qu'on leur demande d'appliquer sont pertinentes et se sentent capables de les appliquer.

Les données sont recueillies auprès d'un échantillon de 217 équipiers relevant de 14 restaurants en France. Ils répondent en face-à-face à un questionnaire mesurant la pertinence perçue des mesures d'hygiène et de sécurité, la capacité perçue à les appliquer tant en période normale qu'en période de rush et l'engagement dans des comportements hygiéniques et sécuritaires.

Les résultats montrent qu'outre la formation, $F(1, 215) = 4.13$; $p = .043$, la pertinence perçue des mesures d'hygiène et de sécurité, $b = .31$; $F(1, 215) = 12.73$; $p < .001$; $R^2 = .056$, la capacité perçue à les appliquer en période normale, $b = .29$; $F(1, 215) = 12.64$; $p < .001$; $R^2 = .056$ et en période de rush, $b = .26$; $F(1, 215) = 20.19$; $p < .001$; $R^2 = .086$, apparaissent comme d'importants prédicteurs de l'engagement dans des comportements hygiéniques et sécuritaires.

Ces résultats suggèrent qu'on peut mieux prévenir les toxi-infections alimentaires en associant les salariés à la définition des mesures et en étant attentif aux difficultés que ces derniers peuvent éprouver pendant leur application. La prise en compte de ces difficultés peut permettre d'améliorer les formations en vue de les rendre plus efficaces.

P120. Le laboratoire de sécurité biologique de niveau 2. Entre exigences réglementaires et réalités de fonctionnement.

PAUCOD J.-C., RICHARD S.

IRBA, BRETIGNY/ORGE FRANCE

Le laboratoire de sécurité biologique de niveau 2 représente le premier niveau de sécurité dont le fonctionnement se doit d'être en conformité avec divers textes réglementaires. L'arrêté du 16 juillet 2007 n'est que l'un des textes de référence applicables, l'autre partie, essentiellement extraite du code du travail, concerne les obligations réglementaires vis-à-vis de l'environnement de travail et les pièces dites « à pollution spécifique » qui incluent les locaux « pouvant contenir des souches de microorganismes potentiellement pathogènes ». Cette définition englobe le laboratoire de niveau 2 puisque les souches microbiennes ou parasitaires étudiées « peuvent provoquer une maladie grave et constituer un danger pour les travailleurs ».

Cette présentation se propose de faire le point sur les principales mesures à respecter et celles, non obligatoires, qu'il serait logique de mettre en place afin de promouvoir un environnement de travail conforme aux obligations de sécurité biologique.