

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère De l'Enseignement Supérieur et De la Recherche Scientifique



Université Abbès Laghrou Khenchela  
Faculté des Sciences de la Nature Et de la Vie  
Département de biologie



**Mémoire**

**Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en Biologie**

**Option: Microbiologie**

**Par**

**Benhenia Leyla et Krazdi Nawel**

*Thème*

**Caractérisation et antibiorésistance des entérobactéries  
des effluents hospitaliers de l'E.P.H. 120 lits  
de la wilaya de Khenchela**

*Soutenu le : 26 /06 /2013*

*Devant le jury*

Président : M<sup>me</sup> Bendjemana K. (M.C.A) Univ. Abbès Laghrou - Khenchela  
Encadreur : M<sup>elle</sup> Chorfi K. Univ. Abbès Laghrou - Khenchela  
Examineur : M<sup>elle</sup> Halassi I. (M.A.B) Univ. Abbès Laghrou - Khenchela

2012-2013



*A la fin de ce travail réalisé au sein des laboratoires de l'Université Abbés laghrour et à l'unité de Bactériologie de l'E.P.H.120 lits de la wilaya de khenchela, nous aimerions réserver ses lignes en signe de gratitude et de reconnaissance pour tous ceux qui ont apporté une contribution scientifique ou morale à ce modeste travail.*

*Nos remerciements s'adressent d'abord au **Dr. Bendjemana K** docteur à l'université Abbes Laghrour Khenchela. Vous nous faites un grand honneur en présidant ce jury. On vous prie de bien vouloir recevoir le témoignage de notre profond respect.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à **M<sup>elle</sup> Halassi I** Maître assistante à l'université Abbes Laghrour, khenchela. On vous remercie de nous avoir honorées par votre présence en tant qu'examineur et pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire.*

*Nous remercions très vivement notre encadreur, **M<sup>elle</sup> Chorfi K**. Vous nous avez guidées dans la réalisation de ce travail malgré vos multiples occupations. Infatigable, toujours disponible, aimable, ces qualités vous ont valu l'estime de tous les étudiants et forcent l'admiration de tous. Apprendre à vos cotés a été un réel plaisir. J'ai gardé de bons souvenirs de vos enseignements avec clarté et précision. Que Dieu vous récompense.*

*Nos remerciements vont aussi au corps professoral et administratif de la Faculté des Science de la nature et de la vie, pour la richesse et la qualité de leur enseignement et qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée.*

*Nous remercions **M<sup>r</sup> Remadnia Rachid** (chef de service), **M<sup>r</sup> Khiari Abdelhamid** et tout le personnel du laboratoire de l'E.P.H 120 lits de la wilaya de Khenchela pour nous avoir accueillies au sein de leur service.*

*Nous remercions aussi **M<sup>me</sup> Chorfi R**. responsable des laboratoires de l'université Abbes Laghrour Khenchela pour son accueil et son aide dans le déroulement de ces expérimentations et aussi tous les ingénieurs et les techniciens.*

*Enfin, un immense merci à, nos camarades de promotion, nos amies et nos collègues de travail pour les encouragements et soutiens inaltérables, sans qui ce travail de thèse n'aurait pas été possible.*



***A mon cher père***

*Tes conseils m'ont suivi et m'ont permis d'atteindre le bout du chemin. Sois fier de moi aujourd'hui et vois à travers ce travail mon amour sincère et ma gratitude profonde.*

***A ma chère mère***

*Ma douce et tendre mère. Quoique je fasse, je ne pourrais te rendre ce que tu as fait pour moi. Si je suis arrivée là, c'est bien grâce à toi. Que dieu te donne longue vie et te protège.*

***A ma tendre sœur Hayet***

*La généreuse, au cœur d'or. Je souhaite simplement que Dieu nous accorde une longue vie et une bonne santé pour que nous puissions cheminer ensemble sur la route du destin avec amour, honnêteté, sincérité, respect mutuel, solidarité, dignité comme nous l'ont enseigné nos parents.*

***A mes chers frères Farid, Karim, Hichem, Jalil***

*J'ai beaucoup apprécié l'estime et l'amour fraternel que vous me portez. Que Dieu vous préserve.*

*À mon cher frère, **Mohamed** et son épouse, **Amel**.*

*Et surtout leur adorable fille choyée **Amira***

*A mes sœurs **Dounia**, **Wahiba***

*A mes chères-amies **Besma**, **Sara**, **Ieyla** Vers lesquelles j'ai un grand respect.*

*A toute ma famille.*

*A toutes mes camarades de promotion, surtout **Fadhila**, **Saliha**, **Kenza**, **Hassina**, **Rawia**,*

***Ahlem***

*Et plus particulièrement à **Nawel**, Tu as été pour moi durant ces années passées ensemble plus qu'une amie, une sœur. Toute ma gratitude et ma sympathie.*

**B. Leyla**



*Avec mes sentiments les plus sincères et mes émotions les plus intenses, je dédie ce travail :*

*À Mes très chers parents*

*À Ma mère, tu as été toujours à mes cotés, merci pour tous tes sacrifices. Que dieu le  
tout puissant te protège et te garde en bonne santé.*

*À Mon père qui m'a toujours aidé et soutenu, vous m'avez transmis l'amour de la  
science et le savoir*

*À Mes frères : **Imad, Houssam, Fahd***

*À Mon unique sœur : **Madiha***

*A ma grande mère*


*Vos prières ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui.*

*À tous mes collègues et amis de promotion de master Microbiologie, pour l'atmosphère à la  
fois critique et amicale qui a régnée pendant nos années d'étude,*

*Et spécialement à Leyla, pour moi tu es plus qu'une amie, une sœur, toute ma gratitude et  
mon amour.*

*Enfin, à tous ceux qui, par leur présence et leur amitié, ont joué un rôle important pour la  
concrétisation de ce travail.*

*K, Nawel*



**« Toute avancée des connaissances  
génère autant d'interrogations qu'elle  
apporte de réponses. »**

**Pierre Joliot**

## Table des matières

Liste des tableaux.....	i
Liste des figures.....	ii
Liste des abréviations.....	iii
Liste des photographies.....	v
Liste des annexes.....	iv

## Revue bibliographique

Introduction .....	01
--------------------	----

### Chapitre 1: les effluents hospitaliers

I. Les effluents hospitaliers.....	05
I.1. Définition.....	05
I.2. Problématique des effluents hospitaliers.....	05
I.3. Origine des effluents hospitaliers.....	06
I.3.1. Les rejets d'origine domestique.....	06
I.3.2. Les rejets d'origine industrielle.....	06
I.3.3. Les rejets de nature spécifique à l'hôpital.....	06
I.4. Caractéristiques des effluents hospitaliers.....	07
I.4.1. Caractéristiques microbiologiques des effluents hospitaliers.....	07
I.4.1.1. Présentation de la flore hospitalière.....	07
I.4.1.2. Caractéristiques bactériologique des effluents hospitaliers.....	07
I.4.1.3. Caractéristiques virologique des effluents hospitaliers.....	08
I.5. Risque infectieux des effluents hospitaliers.....	09
I.6. Risques pour la santé publique.....	10

### Chapitre 2 : Entérobactéries et Résistance aux Antibiotiques

I. Les antibiotiques.....	12
I.1. Définition.....	12
I.2. Classification.....	12
II. Résistance bactérienne aux antibiotiques .....	13
II.1. Définitions .....	13
II.2. Principaux types de résistances .....	13
II.2.1. La résistance naturelle .....	13
II.2.2. La résistance acquise .....	14
II.3. Les mécanismes de résistances bactériennes aux antibiotiques.....	14
II.4. Les transferts de gènes horizontaux : principaux mécanismes.....	15
III. Méthodologies des tests de sensibilité aux antimicrobiens.....	16
IV. Les bactéries pathogènes résistantes préoccupantes.....	17
IV.1. Les entérobactéries.....	18
IV.1.1. Définition et caractères généraux.....	18
IV.1.2. Taxonomie.....	19
IV.1.3. Habitat.....	19
IV.1.4. Culture.....	20

IV.1.5. Structure antigénique.....	20
IV.1.6. Pouvoir pathogène .....	20
IV.2. Les entérobactéries productrices de BLSE (EBLSE).....	21
IV.3. Entérobactéries productrices de céphalosporinases de haut niveau.....	22

## **Matériels et méthodes**

I. Caractéristiques générales du site d'étude.....	24
I.1. L'établissement hospitalier .....	24
I.2. Réseau d'assainissement de l'établissement hospitalier.....	24
II. Echantillonnage.....	25
III. Les Paramètres microbiologiques.....	26
III.1. Réalisation des dilutions en série.....	26
III.2. Isolement des entérobactéries.....	27
III.3. Biodiversité morphologique des isolats .....	28
III.3.1. Etude l'aspect macroscopique.....	28
III.3.2. Etude l'aspect microscopique.....	29
III.3.2.1. Coloration de Gram .....	29
III.4. Purification des souches bactériennes.....	30
III.5. Identification biochimique classique.....	30
III.5.1. Etude de la dégradation du glucose, saccharose et lactose en milieu TSI .....	30
III.5.2. Utilisation du citrate comme source de carbone.....	31
III.5.3. Test du mannitol mobilité .....	31
III.5.4. Recherche de la B-galactosidase .....	32
III.5.5. Recherche de l'uréase.....	32
III.5.6. Recherche de l'indole.....	32
III.5.7. Recherche de tryptophane désaminase (TDA).....	33
III.5.8. Recherche du nitrate réductase .....	33
III.5.9. Etude des voies fermentatives intermédiaires .....	33
III.5.10. Recherche des décarboxylases .....	34
III.6. L'antibiogramme .....	35

## **Résultats et discussions**

I. Caractéristiques microbiologiques.....	38
I.1. biodiversité morphologiques des isolats.....	38
I.1.1. Aspect macroscopique et Aspect microscopique des isolats .....	38
I.2. Identification biochimiques classique des isolats .....	40
I.3. Antibiorésistance des entérobactéries .....	44
I.4. Multirésistance.....	49
I.5. Distribution des principaux phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines.....	50

<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>52</b>
--	-----------

<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>55</b>
---	-----------

**Annexes**

**Résumé**

**Abstract**

**Résumé Arabe**



## Liste des tableaux

<b>Tableau I :</b> Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques.....	10
<b>Tableau II :</b> Principaux genres et espèces des Entérobactéries .....	12
<b>Tableau III :</b> Liste des antibiotiques testés, charge et classification des disques.....	36
<b>Tableau IV :</b> Observation des caractères culturels et morphologique des bactéries isolées..	39
<b>Tableau V:</b> Résultats biochimiques obtenus après lecture de la galerie classique.....	41
<b>Tableau VI :</b> Espèces bactériennes identifiées par galerie biochimique classique.....	43
<b>Tableau VII :</b> Classes de résistance obtenues vis-à-vis de chaque antibiotique après lecture de l'antibiogramme .....	46
<b>Tableau VIII :</b> Les taux de résistance aux antibiotiques .....	47
<b>Tableau IX :</b> Phénotypes et mécanismes de résistance des entérobactéries aux $\beta$ - lactamines.....	50

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Problématique des effluents hospitaliers .....	05
<b>Figure 02</b> : Mécanismes génétiques de dissémination de la résistance aux antibiotiques.....	15
<b>Figure 03</b> : Mécanisme d'inactivation des $\beta$ -lactames par les $\beta$ -lactamases .....	21
<b>Figure 04</b> : Préparation d'une dilution décimale en série.....	27
<b>Figure 05</b> : Lecture du milieu Triple Sugar Iron agar .....	31
<b>Figure 06</b> : Lecture du milieu urée indole .....	33
<b>Figure 07</b> : Lecture de milieu Clark et Lubs.....	34
<b>Figure 08</b> : Lecture des décarboxylases .....	35
<b>Figure 09</b> : Nombre d'espèces bactériennes identifiées à partir des Entérobactéries .....	44
<b>Figure 10</b> : Pourcentage d'isolats des entérobactéries résistants à divers antibiotiques .....	47
<b>Figure 11</b> : Pourcentage d'isolats des entérobactéries résistants à au moins 1, 2, 3, 4 et antibiotiques.....	49
<b>Figure 12</b> : Répartition des principaux phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines .....	50

## Liste des abréviations

**% : Pourcentage**  
**°C : Degré Celsius**  
**µm : Micromètre**  
**µg : Microgramme**  
**AC : acide**  
**ADH : Arginine dehydrolase**  
**ADN : Acide désoxyribonucléique**  
**AML = AMX : Amoxicilline**  
**AMC : Amoxicilline + Acide clavulanique**  
**AM : Aminopénicilline**  
**ARN : Acide ribonucléique**  
**ATCC: American Type Culture Collection**  
**BLSE : bêtalactamases à spectre étendu**  
**BMR : Bactéries multi résistantes.**  
**C1G : Céphalosporine de première génération.**  
**C2G : Céphalosporine de deuxième génération.**  
**C3G : Céphalosporine de troisième génération.**  
**CAZ : Ceftazidime**  
**CZ : Céfazoline**  
**CIP : Ciprofloxacine**  
**CIT : Citrate de sodium**  
**CMI : Concentration minimale inhibitrice.**  
**CTX : Céfotaxime**  
**CXM : Céfuroxime**  
**CTT : Céfotétan**  
**EBLSE : Les entérobactéries productrices de BLSE**  
**E.P.H : Etablissement public hospitaliers**  
**EVR : *Enterococcus* résistants à la Vancomycine**  
**g : Gramme**  
**G : Grossissement**  
**GEL : Gélatine de Kohn**  
**GLU : Glucose**  
**GC : Guanine/Cytosine**  
**CN : Gentamicine**  
**h : Heure**  
**H<sub>2</sub>S : Thiosulfate de sodium**  
**βL : les inhibiteurs des β-lactamases**  
**IMP : Imipénème**  
**IND : Indole**  
**I : Intermédiaire**

**KI : Iodure de Potassium**  
**Lac : Lactose.**  
**L : Litre**  
**LDC : Lysine décarboxylase**  
**MAN: Mannitol**  
**MA:Céfamandole**  
**min : Minute**  
**ml : Millilitre**  
**mm : Millimètre**  
**MEC : Mécillinam**  
**NA : Acide nalidixique**  
**ODC : Ornithine décarboxylase**  
**OFX : Ofloxacine**  
**OMS : L'Organisation Mondiale de la Santé**  
**ONPG: Ortho-nitro-phenyl β-D- galactopyranoside**  
**OXA: Oxacilline**  
**Oxalate d'Ammonium :  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$**   
**PCR : Réaction en chaîne par polymérase**  
**PH : Potentiel hydrogène**  
**PEN :PénicillineG**  
**PIP :Pipérailline**  
**PI : Particules infectieuses**  
**R : Résistante**  
**RM: Rouge de Méthyle**  
**S : Sensible**  
**SAC: Saccharose**  
**SARM : Staphylococcus aureus résistant à la méticilline**  
**SFM : Société Française de Microbiologie**  
**SIDA : Syndrome Immunodéficience Acquise**  
**sp: Espèce**  
**T : Température**  
**t : Temps**  
**TDA: Tryptophane Désaminase**  
**TE : Tétracycline**  
**TIC :Ticarcilline**  
**TOB : Tobramycine**  
**TSI : Triple Sugar Iron.**  
**UREE : Urée**  
**VA : Vancomycine**  
**VIH : Virus d'Immunodéficience Humain**  
**VP : Voges-Proskauer.**  
**VRE : Entérocoques résistants à la vancomycine**

## Liste des photographies

<b>Photographie 01 :</b> Vue générale de l'hôpital 120 lits .....	24
<b>Photographie 02 :</b> Collecteur principal de l'établissement hospitalier .....	25
<b>Photographie 03 :</b> Paillasse de bactériologie de l'établissement hospitalier.....	26
<b>Photographie 04 :</b> Un microscope équipé d'un appareil photographique numérique .....	30
<b>Photographie 05:</b> Aspect macroscopique des souches des entérobactéries sur gélose Hektoen .....	38
<b>Photographie 06 :</b> Photographies des antibiogrammes des espèces identifiées. ....	45

## Liste des annexes

**Annexe 01.** Tableau d'identification % de réactions positives après 24 h d'incubation à 37°C

**Annexe 02.** Composition des colorants de gram.

**Annexe 03.** Composition des milieux de culture.

**Annexe 04.** Composition des additifs.

**Annexe 05.** Résistances naturelles aux  $\beta$  lactamines des espèces de bacilles non exigeants

**Annexe 06.** Valeurs limites des diamètres des zones d'inhibition pour les souches de référence utilisées pour le contrôle de qualité.

**Annexe 07.** Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour Entérobactéries.

**Annexe 08.** Phénotypes de résistance des entérobactéries aux  $\beta$ -lactamines.

**Annexes 09.** Matériel et réactifs utilisés



# ***Introduction***

## **Introduction**

D'une façon générale, les hôpitaux agissent à deux niveaux sur les écosystèmes aquatiques. Ils ont une demande en eau potable importante. Parallèlement, ils produisent des effluents liquides, pollués par des microorganismes pathogènes dont certains sont multirésistants, par des radioéléments et par des substances chimiques dont certaines peuvent avoir un caractère peu biodégradable. Dans de nombreux pays en voie de développement, les effluents liquides hospitaliers sont rejetés directement dans le milieu récepteur (les cours d'eau ou les sols), le plus souvent sans aucun traitement au préalable.

L'intérêt actuel pour les effluents liquides hospitaliers, est le fruit d'une prise de conscience par rapport à l'efficacité des stations d'épuration. Depuis la fin des années 70, la question des rejets des établissements de santé a intéressé par le nombre de substances différentes et parfois dangereuses qu'ils utilisent (**Emmanuel, 2004**). En effet, des scientifiques mettent en avant des résultats assez troublant quant aux concentrations de résidus médicamenteux, de germes pathogènes multirésistants aux antibiotiques ou encore les produits de contraste aux rayons X en sortie de stations d'épuration (**Edder et al., 2006**).

De nombreuses souches bactériennes d'intérêt clinique, présentant ou non des phénotypes de résistance ou de multirésistance ont été isolées et caractérisées à partir d'effluents hospitaliers. Plusieurs de ces études font ressortir la prévalence du caractère de multirésistance comme étant très élevée dans les effluents hospitaliers, (**Chitnis et al., 2004; Passerat et al., 2010 ; Chorfi, 2012**) Par ailleurs certaines structures génétiques comme les intégrons ont été retrouvées à de fortes proportions (~50%) chez les Enterobacteriaceae isolées d'effluents hospitaliers (**Guo et al., 2011**).

Les entérobactéries sont parmi les germes multirésistants préoccupants en milieu hospitalier, ce sont des bacilles à Gram négatif qui constituent une part importante des bactéries isolées lors du diagnostic bactériologique des infections humaines. Leur abondance dans l'intestin, leur mobilité, leur rapidité de multiplication, leur fréquente résistance aux antibiotiques expliquent qu'elles soient les bactéries les plus impliquées en pathologie infectieuse humaine.

On les rencontre dans des prélèvements très divers, mais particulièrement dans les urines et les prélèvements sanguins, qui constituent une part importante de l'activité du laboratoire de bactériologie.

La multirésistance des entérobactéries aux antibiotiques et leur pouvoir d'adaptation expliquent la variété des espèces et les multiples circonstances dans lesquelles elles sont isolées. L'importance médicale des entérobactéries, et leur grand intérêt comme matériel de recherche, font de ce groupe bactérien l'un des mieux connus et des plus étudiés.

Des fluides biologiques variés, de patients colonisés ou infectés par les entérobactéries sont rejetés dans le réseau des eaux usées de l'hôpital et pourraient contaminer l'environnement. La dissémination de souches résistantes aux antibiotiques pourrait alors représenter un risque de santé publique,

### **Objectifs du travail :**

Pour notre étude, nous nous sommes intéressés aux déchets liquides de l'établissement hospitalier 120 lits de la wilaya de Khenchela qui sont rejetés sans traitement préalable au même titre que les effluents urbains vers le réseau d'assainissement de la ville de Khenchela pour être finalement acheminer vers la station d'épuration. Les eaux épurées à la sortie de la station d'épuration, sont rejetées dans Oued Baghai et sont utilisées par les habitants pour l'irrigation de leur culture et l'élevage des animaux.

L'objectif de notre travail est donc d'étudier la présence des espèces appartenant aux entérobactéries dans les effluents de l'établissement hospitalier 120 lits, de les identifier, de déterminer leur abondance et finalement déterminer leur profil de résistance aux antibiotiques.

# *Chapitre 1*

## *Les effluents hospitaliers*

## I. Les effluents hospitaliers

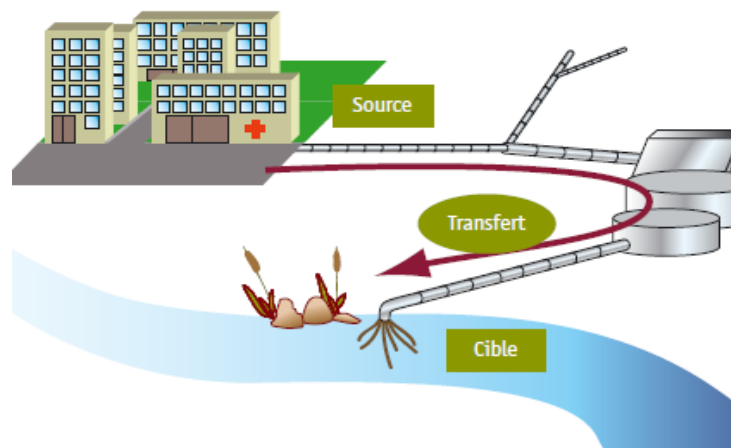
A l'heure actuelle, les établissements de santé ne sont que partiellement mobilisés sur la gestion environnementale. Seuls, ou presque, les déchets solides font l'objet d'une gestion de flux et d'un suivi jusqu'à leur destruction. Tout comme les déchets solides, les établissements doivent pourtant maîtriser la gestion de leurs effluents.

### I.1. Définition

Un effluent est par définition tout rejet liquide véhiculant une certaine charge polluante (dissoute, colloïdale ou particulaire). Ces effluents recèlent des composants organiques ou chimiques nuisibles à l'environnement.

### I.2. Problématique des effluents hospitaliers

L'un des principaux problèmes environnementaux posés par les effluents hospitaliers est leur rejet, au même titre que les effluents classiques urbains, vers le réseau d'assainissement communal sans traitement préalable (**Leprat, 1998**). Le dosage des polluants d'origine hospitalière montre que certaines substances, particulièrement les composés organohalogénés et les résidus de médicaments, quittent le plus souvent les stations d'épuration avec peu de dégradation. La figure 01 illustre la problématique des effluents hospitaliers.



**Figure 01 :** Evacuation des effluents hospitaliers

Ces effluents peuvent donc présenter un danger potentiel pour l'homme et son environnement compte tenu de la nature et de l'importance des substances spécifiques qu'ils contiennent (résidus médicamenteux, réactifs chimiques, désinfectants, détergents, révélateurs et fixateurs radiographiques...) et sont susceptibles de disséminer des germes pathogènes (bactéries multi-résistantes...).

### I.3. Origine des effluents hospitaliers

L'hôpital est un grand consommateur d'eau, cette importante consommation en eau donne naissance à de grands volumes de rejets liquides très diverses et hybrides, à la fois domestiques et industriels, mais aussi très spécifiques des activités de soins et de recherches médicales (**Deloffre-Bonnamour, 1995**)

#### I.3.1. Les rejets d'origine domestique

Ces rejets regroupent les eaux provenant des cuisines, les rejets résultant de l'hygiène des patients non contagieux et du personnel. Les eaux grasses rejetées en cuisine ne posent pas de risque sanitaire mais peuvent provoquer un colmatage des réseaux et engendrer un développement bactérien.

La consommation de détergents et de produits d'entretien dans un hôpital est considérable compte-tenu de l'usage intensif qu'il en est fait : nettoyage des surfaces, nettoyage du matériel médico-chirurgical, toilette des patients et du personnel.

#### I.3.2. Les rejets d'origine industrielle

Ces rejets sont générés par certains équipements spécifiques (blanchisseries, chaufferies, climatisations, ateliers, zones techniques, groupe électrogène, espaces verts)

Les garages et les ateliers utilisent des produits chimiques (détergent, savons, huiles...). (**C. CLIN Paris-Nord, 1999**).

Il faut également ajouter à cela les eaux pluviales (eaux de ruissellement des toitures ou des zones imperméabilisées), qui ne correspondent évidemment à aucune activité, mais qui peuvent constituer une part significative du volume d'un effluent hospitalier.

#### I.3.3. Les rejets de nature spécifique à l'hôpital :

Ces rejets sont spécifiques d'une part de l'activité de soins concernant de nombreux services et d'autre part de l'activité de certains autres services.

On trouve dans la catégorie des rejets spécifiques communs aux différents services de soins tout ce qui est relatif :

- \*aux produits désinfectants et antiseptiques : surtout des produits chlorés et des aldéhydes
- \*aux rejets de germes pathogènes qui peuvent être multirésistants aux antibiotiques.
- \*aux médicaments : antibiotiques, anticancéreux, analgésiques, hormones sexuelles.....etc.
- \*aux métaux lourds : mercure (casse des thermomètres) et argent (développement de films radiologiques). (**Boillot, 2008**)

On trouve dans la catégorie des rejets spécifiques à l'activité de certains autres services tout ce qui est relatif :

\* aux rejets de service d'hémodialyse qui sont de deux types d'une part le rejet consécutif au traitement du malade et d'autre part les rejets de désinfection des appareils.

\* aux rejets de service de radiologie chargés en révélateurs, fixateurs et sels d'argent. Ces produits sont des sources de pollutions importantes. (C. CLIN Paris-Nord, 2000).

\* aux rejets de service de médecine nucléaire chargés en élément radioactifs (Chareyron, 2008).

\* aux rejets de laboratoire et de pharmacie

La pharmacie utilise dans ces activités des produits chimiques dangereux pour l'environnement et la santé publique.

Différents types de laboratoires existent dans un établissement de santé, on retrouve alors les laboratoires d'analyses mais aussi les laboratoires anatomo-pathologiques et de recherches qui donne tous naissance à différents types d'effluents pouvant être biologiques, chimiques, chimico-biologiques et d'autres recueillis lors des préparations sur pièces anatomiques et tissus analysés pouvant provenir de patients infectés. (Jehannin, 1999)

#### **I.4. Caractéristiques des effluents hospitaliers**

Globalement, les effluents hospitaliers présentent des caractéristiques très proches de celles des eaux usées domestiques. La biodégradabilité est légèrement plus faible et la toxicité sensiblement plus élevée mais sans commune mesure avec les effluents industriels.

##### **I.4.1. Caractéristiques microbiologiques des effluents hospitaliers**

###### **I.4.1.1. Présentation de la flore hospitalière**

Pour bien appréhender la qualité microbienne d'un effluent hospitalier, il faut connaître les germes présents dans l'environnement de l'établissement. La flore hospitalière est composée :

- La flore des malades(ou porteurs en incubation, ou convalescents), du personnel soignant, des visiteurs, des écoles paramédicales...
- Les germes de l'environnement existant sur les sols, les surfaces, le matériel (fibroscopes, appareils de ventilation aérosols...), l'eau, l'air.

###### **I.4.1.2. Caractéristiques bactériologique des effluents hospitaliers**

Le premier objectif des études qualitatives et quantitatives sur la flore bactérienne des effluents hospitaliers est de dénombrer les marqueurs de pollution fécale des eaux « les coliformes fécaux, les streptocoques fécaux et les spores des bactéries sulfitoréductrices ». Le deuxième objectif est d'arriver à identifier la présence ou non de bactéries multirésistantes aux antibiotiques (avec des marqueurs comme : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticiline (SARM) et *Klebsiella pneumoniae* porteuse de  $\beta$ - lactamase à spectre étendu. Le

second objectif est justifié par le fait que les déjections et les excréments (urines, selles) des patients porteurs de microorganismes multirésistants sont rejetés sans aucun traitement dans le réseau d'assainissement hospitalier (**Bernet et Fines, 2000**).

Sur le plan bactériologique, les effluents des établissements de santé seraient globalement moins chargés que les eaux usées urbaines (**Leprat, 1998; Mansotte, 2000**). **Chorfi, (2012)** a trouvé des concentrations de  $5,01 \cdot 10^5$  coliformes fécaux par 100 ml dans les effluents d'un hôpital d'une agglomération moyenne de l'est de l'Algérie alors que la concentration moyenne est de  $10^8$  / 100 ml dans les effluents urbains (**Metcalf et Eddy, 1991**), ce qui est probablement lié à des concentrations plus élevées en désinfectants et antibiotiques.

Des concentrations de  $2,05 \cdot 10^7$ ,  $1,92 \cdot 10^7$  et  $9,10 \cdot 10^5$  U.F.C / 100 ml ont été respectivement décomptés dans les effluents hospitaliers pour les coliformes totaux, l'*Escherichia coli* et les *Enterocoques fécaux* (**Laber et al., 1999**).

Le danger résiderait plus dans la présence de certaines bactéries multirésistantes aux antibiotiques (*Proteus vulgaris*, Mycobactéries) et de certaines souches typiquement hospitalières (*Enterobacter sakazakii*) (**Schwartz et al., 2003; Emmanuel, 2004; Hartemann et al., 2005**).

En utilisant des *Entérocoques*, des *Staphylocoques*, des *Enterobactériaceae* et des bactéries hétérotrophes en tant qu'indicateurs de présence des bactéries multirésistantes dans les biofilms formés dans le réseau d'assainissement hospitalier, **Schwartz et al., (2003)** ont relevé une importante présence de germes multirésistants aux antibiotiques.

Certaines bactéries ont été identifiées comme étant plus concentrées dans les eaux usées hospitaliers (**Schlosser, 1999**) comme *Pseudomonas aeruginosa* (plus de 10 fois supérieur dans les effluents hospitaliers) et des staphylocoques pathogènes (**Drasy et al., 2002**).

#### **I.4.1.3. Caractéristiques virologique des effluents hospitaliers**

Des marqueurs de pollution virale des eaux de surface tels les entérovirus et d'autres virus tels les adénovirus ont été identifiés dans les effluents hospitaliers (**Mansotte et Justin, 2000**). Les entérovirus se présentent en quantité importante dans les eaux usées. Leur présence, en tant que marqueur de pollution virale, dans les effluents hospitaliers est à corrélérer avec celle d'autres virus, le VIH par exemple (Le VIH, agent causal du SIDA).

En effet, les personnes infectées par les entérovirus et les entérobactéries libèrent en moyenne  $10^6$  à  $10^7$  PI « particules infectieuses » (ou colonies) pour chaque litre de selles excrété (**McJunkin, 1982**).

Certains travaux dénotent l'intérêt accordé au monitoring du VIH dans le milieu aquatique. La plupart des scientifiques sont unanimes à reconnaître que le nombre de PI pouvant activer la virulence du VIH en milieu liquide inhumain doit être supérieure à 100 (Casson *et al.*, 1997; Lue-Hing *et al.*, 1999). Toutefois, la corrélation entre les entérovirus et le VIH dans les eaux usées semble être un problème sanitaire réel qui sur le plan scientifique nécessite une définition précise et un objet spécifique de recherche. (Emmanuel, 2004)

### **I.5. Risque infectieux des effluents hospitaliers**

L'utilisation de marqueurs à bactéries multirésistantes aux antibiotiques a permis de mettre en évidence la présence de bactéries résistantes à la tétracycline, l'érythromycine ou encore à la vancomycine (Emmanuel, 2004).

Ces microorganismes, une fois rejetés dans le réseau d'assainissement, ont la possibilité de survivre au traitement d'une station d'épuration. Les stations d'épuration ont l'obligation de faire des analyses en amont et en aval de la structure afin de contrôler la qualité des eaux et d'évaluer l'efficacité du processus. En effet tout n'est pas détruit et le temps de survie des microorganismes est intéressant pour évaluer le risque pour l'environnement. (Monfort, 2003).

Très peu de données sont disponibles sur le devenir à long terme des gènes de résistance dans l'environnement, sur les conditions de la réversibilité de la résistance acquise, et sur les conséquences de la résistance aux antibiotiques pour l'écologie du milieu incluant les organismes supérieurs. Néanmoins, des études récentes ont montré que les bactéries résistantes continuent à évoluer pour améliorer leurs performances et compenser leur désavantage initial.

D'autres part, les antibiotiques contribuent au développement de la multi résistance des bactéries (Levy, 1998; Levy et Marshall, 2004; Salmond et Welch, 2008; Martinez, 2009). Les concentrations en antibiotiques atteintes dans les effluents hospitaliers sont compatibles avec le maintien d'une pression de sélection. Les germes sensibles meurent et favorisent ainsi la croissance des germes non sensibles qui se retrouvent sans compétiteurs. Les bactéries peuvent acquérir ce caractère de résistance par mutation spontanée ou par transfert horizontal de plasmides. Ce phénomène de pharmacorésistance a donné naissance aux infections communément appelées « maladies nosocomiales ».

Les rejets de ces effluents contribuent à disséminer dans l'environnement des bactéries fécales avec un niveau de multi-résistance nettement plus élevé qu'avec les effluents domestiques. (Oppliger, 2009 ; Passerat *et al.*, 2010).

**I.6. Risques pour la santé publique**

L'homme a différentes occasions d'entrer en contact avec des réservoirs de bactéries résistantes. Pour que cette exposition soit en définitive préjudiciable à l'homme il faudrait que les événements suivants soient réalisés:

- Transmission d'un pathogène résistant d'origine humaine ou animale ou passage des déterminants de la résistance des bactéries non pathogènes de l'eau aux bactéries commensales humaines et passage des déterminants de la résistance des bactéries commensales humaines à des bactéries humaines pathogènes.

- Expression de la maladie
- Traitement de l'infection résultante avec un antibiotique vis à vis duquel la bactérie est résistante : échec thérapeutique.

Pour aborder ce sujet, il est essentiel de tenir compte des capacités immunitaires de l'homme qui conduit à avoir des personnes plus sensibles que d'autres au sein de la population exposée. Pour cela, il sera distingué 2 types d'exposition à savoir une exposition communautaire d'individus que l'on considérera en bonne santé et une exposition à l'hôpital de personnes malades et/ou fragilisées.



*Chapitre 2*

*Entérobactéries et Résistance  
aux Antibiotiques*

## I. Les antibiotiques

### I.1. Définition

Par définition les antibiotiques sont des molécules de bas poids moléculaire produites par le métabolisme secondaire de certains micro-organismes, bactéries ou champignons (*Streptomyces*, *Bacillus*, *Penicillium*, *Cephalosporium*...). Ces substances d'origine naturelle exercent une toxicité sélective à des concentrations très faibles, non toxique pour l'hôte lors de traitement d'infections bactériennes. Les antibiotiques peuvent avoir un effet bactéricide (destruction des bactéries) ou bactériostatique (inhibition de la croissance bactérienne). (Gautier, 2007).

L'ensemble des bactéries affecté par un antibiotique donné est appelé le **spectre d'activité** de cet antibiotique. Les antibiotiques efficaces contre de nombreuses bactéries à Gram positif et négatif sont dits à "large spectre", tandis que ceux actifs uniquement contre certaines bactéries à Gram positif ou bien à Gram négatif sont dits à "spectre étroit" (Walsh, 2003).

D'après les bactériologistes, les antibiotiques sont des composés naturels ou chimiques qui agissent à faibles doses sur les micro-organismes et qui n'ont pas de toxicité sur l'hôte.

Les antibiotiques peuvent avoir diverses autres utilisations à savoir une protection des cultures, une prévention des infections bactériennes dans un élevage d'animaux et une utilisation en tant qu'additif alimentaire. (Bonot, 2010).

### I.2. Classification

La variété des molécules antibiotiques connues rend nécessaire un essai de classification qui prend en compte l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action de ces molécules. (Verhoef *et al.*, 2004).

Les grandes familles d'antibiotiques sont actuellement les suivantes :

- **$\beta$  lactamines** : Le noyau de base est le cycle  $\beta$  lactame. Les antibiotiques de cette famille sont des bactéricides. On y trouve les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames.
- **Les aminosides ou aminoglycosides** : qui sont des hétérosides naturels formés par un ou plusieurs glycosides liés à un aminocyclitol. Ce sont des bactéricides et il en existe plusieurs centaines, naturels ou semi synthétiques.
- **Les phénicolés** : de type chloramphénicol et thiamphénicol qui sont des bactériostatiques.
- **Les tétracyclines** : sont des bactériostatiques naturels ou semi synthétiques.

- **Les polypeptides** : sont des bactéricides qui se subdivisent en sous groupes en fonction de leur structure chimique, de l'activité antibactérienne, du mécanisme d'action et de la nature de leur cible cellulaire.
- **Les macrolides, lincosamides et synergistines** : les macrolides possèdent un noyau lactone central qui est à la base de leur classification selon le nombre d'atomes de carbone. Ce sont des molécules lipophiles. Les lincosamides et les synergistines sont associés aux macrolides car elles ont le même mode d'action consistant en l'inhibition de la synthèse protéique au niveau de la sous unité 50s du ribosome. Ce sont des bactériostatiques.
- **Les sulfamides** : sont constitués d'un noyau paraminobenzène sulfonamide sur lequel se greffe un radical variable qui détermine leur pharmacocinétique, leur durée d'action et/ou leur site d'action. Le plus utilisé est le sulfaméthoxazole.
- **Les quinolones ou fluoroquinolones** : ce sont des bactéricides qui sont classés en quinolones de première et deuxième génération selon l'étendue de leur spectre antibactérien et la nature fluorée ou non de leur squelette.

D'autres classes existent mais sont quantitativement moins importantes

## II. Résistance bactérienne aux antibiotiques

### II.1. Définitions

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a proposé une définition de la résistance bactérienne aux antibiotiques, elle stipule qu'une souche est dite " résistante " quand elle supporte une concentration d'antibiotique notablement plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce.

### II.2. Principaux types de résistances

#### II.2.1. La résistance naturelle

La résistance naturelle ou résistance intrinsèque correspond à la capacité de résister à la présence d'un antibiotique pour toutes les souches d'une espèce ou d'un genre bactérien. Habituellement le support de cette résistance est un gène chromosomique commun à toutes les bactéries de l'espèce. Dans tous les cas la résistance naturelle détermine le niveau de sensibilité " basal " des bactéries et définit le phénotype sauvage d'une espèce. (Tarbouriech, 2004).

#### II.2.2. La résistance acquise

Les bactéries peuvent également acquérir la résistance à un antibiotique. Dans ce cas, la résistance est présente seulement dans certaines souches de l'espèce. Cette résistance résulte d'une modification génétique par mutation ponctuelle ou d'une acquisition de

matériel génétique étranger . Les résistances acquises relèvent, la grande plasticité des génomes bactériens et l'adaptation rapide des bactéries à de nouvelles conditions stringentes (dues à la présence d'un antibiotique par exemple). (**Davison et al., 2000**).

Les résistances mutationnelles sont chromosomiques, spontanées, rares (fréquence de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$ ), stables et transmissibles uniquement de façon verticale. L'antibiotique n'est pas l'agent mutagène, il sélectionne seulement les mutants devenus résistants. Elles n'intéressent qu'un antibiotique ou qu'une famille d'antibiotique à la fois. (**Carle, 2009**).

Les résistances par acquisition d'ADN sont la conséquence d'un transfert horizontal y compris entre espèces éloignées phylogénétiquement. Les gènes de résistance aux antibiotiques, pour la plupart chromosomiques, proviennent généralement de microorganismes producteurs d'antibiotiques pour lesquels ils sont immunisés. Le transfert de ces gènes sera rendu plus efficace après leur intégration sur des éléments mobiles tels que les plasmides, les transposons, les intégrons ou encore sur des phages. Ces mécanismes de résistance peuvent alors diffuser très rapidement dans une population. (**Faure, 2009**).

### II.3. Les mécanismes de résistances bactériennes aux antibiotiques

Outre les résistances naturelles des bactéries, il existe un nombre important de mécanismes de résistance développés par les bactéries en réponse à la pression de sélection exercée par les antibiotiques. Ces résistances relèvent d'un mécanisme biochimique dont le support est génétique et elles peuvent être transmissibles à d'autres bactéries

Les modes de résistance connus actuellement sont au nombre de quatre, (**Carle, 2009**) une même bactérie peut en présenter plusieurs :

**Tableau I : Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques (Mandell et al., 2009).**

Mécanismes de résistance	Conséquences
L'inhibition enzymatique	Production d'une enzyme qui inactive ou détruit l'antibiotique ; Mécanisme de résistance le plus répandu.
Pompes à efflux	Antibiotique éjecté de la cellule par transport actif et site d'action devenant inaccessible.
Altération des sites de liaison ciblés par l'antibiotique	Baisse de l'affinité de l'antibiotique pour son site d'action.
Réduction de la perméabilité cellulaire	Changements de perméabilité de la paroi ou de la membrane bactérienne empêchant le médicament d'atteindre sa cible.

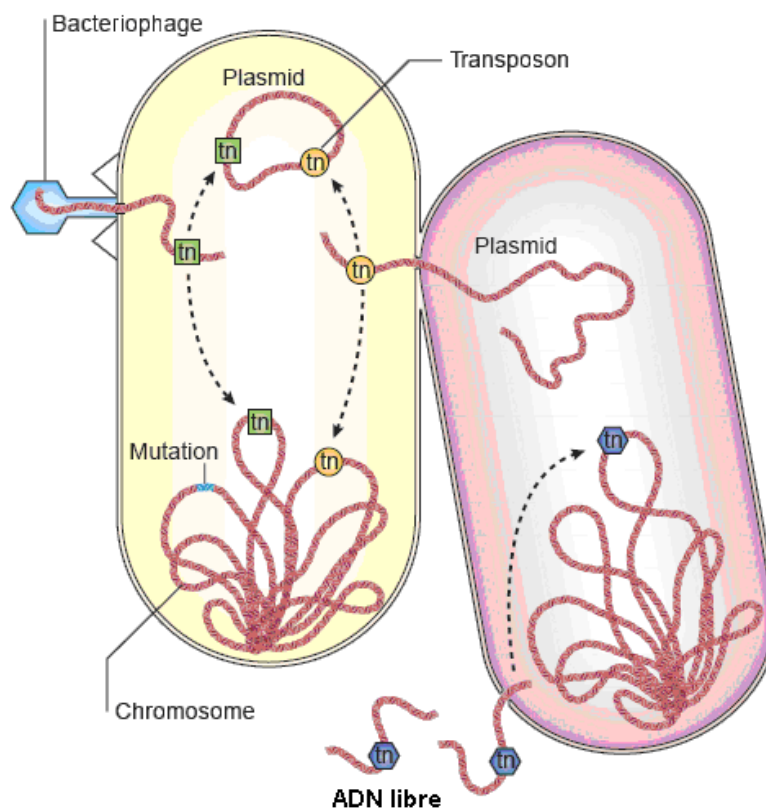
### II.4. Les transferts de gènes horizontaux : principaux mécanismes

Lorsque la résistance aux antibiotiques est inhérente à une espèce bactérienne, la dissémination de la résistance s'opère principalement par une diffusion clonale de la bactérie résistante (transfert vertical). A l'opposé, la résistance acquise par mutation ponctuelle, par

hyperproduction d'un gène déjà présent ou par acquisition de gènes de résistance exogènes peut être transférée verticalement (à la descendance) ou horizontalement (aux autres lignées bactériennes).

Ce transfert peut s'effectuer entre bactéries très éloignées phylogénétiquement, voire même entre bactérie à Gram positif et Gram négatif. Le transfert horizontal est le principal mécanisme responsable de la dissémination des gènes de résistance au sein du monde bactérien et concerne 80 % des cas de résistance observés en médecine humaine. Pour être efficace, le transfert horizontal nécessite la présence de supports génétiques autonomes capables de se répliquer et de s'exprimer dans la cellule réceptrice. **(Faure, 2009).**

Le passage d'ADN d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse peut se faire de trois manières (**Figure 02**) : le transfert d'ADN nu (la transformation) le transfert direct entre deux bactéries ayant établi temporairement un contact physique (conjugaison), et le transport d'ADN bactérien par des bactériophages (transduction).



**Figure : 02.** Mécanismes génétiques de dissémination de la résistance aux antibiotiques **(Tremblay, 2012)**

### III. Méthodologies des tests de sensibilité aux antimicrobiens

Il n'existe pas à l'heure actuelle une méthode optimale pour tester la sensibilité aux antibiotiques. Bien qu'une grande variété de méthodes existe, le but des essais in vitro de sensibilité des agents pathogènes aux antimicrobiens est de prédire comment un micro-

organisme répondra vraisemblablement à une thérapie antimicrobienne chez l'hôte infecté. Les trois méthodes suivantes sont les seules qui fournissent des résultats reproductibles et répétables quand elles sont réalisées correctement : diffusion en disque, dilution en bouillon, dilution en gélose. (Peyrou, 2001).

La méthode de diffusion en gélose ou méthode des disques est la plus fréquemment utilisée. Elle est plus rapide et plus facile à effectuer en routine que les méthodes de dilution. Son principe consiste à déposer des disques de papier buvard imprégnés d'une charge donnée d'antibiotique à la surface d'un milieu gélosé Mueller-Hinton préalablement ensemencé avec une suspension d'environ  $10^6$  bactéries/ml. Dès l'application des disques, l'antibiotique diffuse dans la gélose, les concentrations diminuant au fur et à mesure que l'on s'éloigne du disque. Une zone d'inhibition de la culture microbienne est observable autour du disque d'antibiotique après 18 heures d'incubation à 37 °C. (Tremolieres, 1998). Lorsque la technique est parfaitement standardisée, les diamètres des zones d'inhibition dépendent uniquement de la sensibilité du germe.

Dans son communiqué 2000-2001, le **comité de l'antibiogramme** de la Société Française de Microbiologie (SFM) définit les trois catégories de souches bactériennes:

- Les souches **sensibles** sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est forte dans le cas d'un traitement avec la posologie recommandée.
- Les souches **résistantes** sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quel que soit le type de traitement.
- Enfin, entre ces deux catégories se place la catégorie **intermédiaire** qui prend en compte les situations incertaines dans lesquelles le succès du traitement est imprévisible.

L'avènement des techniques moléculaires a permis de s'affranchir des techniques basées sur la culture bactérienne. Différentes techniques basées sur la PCR ont été développées dans le but d'estimer les concentrations dans l'environnement des gènes de résistance aux antibiotiques ou d'éléments génétiques mobiles auxquels sont associés des gènes de résistance. Les éléments mobiles les plus étudiés par cette technique restent les intégrons.

Ces méthodes, quand elles sont utilisées en association avec des analyses phénotypiques, permettent d'espérer une amélioration de la sensibilité, de la spécificité et de la rapidité dans la détection des gènes de résistance connus et peuvent être utilisées en même temps que les méthodes de détection traditionnelles.

#### **IV. Les bactéries pathogènes résistantes préoccupantes**

Les bactéries sont dites multirésistantes aux antibiotiques (BMR) lorsque, du fait de l'accumulation des résistances acquises à plusieurs familles d'antibiotiques, elles ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques utilisables en thérapeutique. La multirésistance est une étape vers l'impasse thérapeutique. Elle concerne les bactéries des infections communautaires et les bactéries des infections nosocomiales. (Jarlier, 2004).

En raison de leur fréquence élevée, de leur potentiel pathogène, de leur caractère commensal qui expose au risque de diffusion hors de l'hôpital, de leur caractère clonal ou du caractère aisément transférable des mécanismes de résistance impliqués, les bactéries multirésistantes font l'objet d'un programme de lutte et de prévention qui implique toute la communauté hospitalière. (Marty et Jarlier, 1998).

Actuellement, on compte un peu moins d'une dizaine d'espèces bactériennes concernées par la résistance aux antibiotiques. Ces bactéries sévissent pour la grande majorité en milieu hospitalier c'est le cas pour :

- *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline (SARM),
- *Pseudomonas aeruginosa* multirésistant,
- *Klebsiella pneumoniae*,
- *Acinetobacter baumannii*,
- *Clostridium difficile*,
- *Enterococcus* résistants à la Vancomycine (EVR)
- et plus récemment l'émergence de bactéries "super résistantes" les entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à Spectre Etendue (BLSE) principalement impliquées dans des infections nosocomiales (Boyce *et al.*, 1994 ; Hocquet *et al.*, 2010 ; Dulong *et al.*, 2011).

D'autres bactéries sont plutôt communautaires ; c'est le cas du *Streptococcus pneumoniae* résistant à la pénicilline et d'*Escherichia coli* productrice de  $\beta$ -lactamases à Spectre Etendue (Coque *et al.*, 2008 ; Dunais *et al.*, 2011).

Certaines de ces bactéries évoluent soit sur un mode pandémique se propageant de façon certaine sur tous les continents ; c'est le cas du SARM que l'on retrouve également en milieux communautaires depuis quelques années (Frei *et al.*, 2010).

D'autres, en revanche évoluent sur un mode plutôt épidémique ; c'est le cas de *Clostridium difficile*, des ERV et des entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à Spectre Etendue (BLSE).

#### IV.1. Les entérobactéries

Les Enterobacteriaceae sont des bacilles à Gram négatif de la flore fécale commensale de l'homme et des animaux. Ce caractère ubiquitaire n'est cependant pas général puisque

quelques espèces occupent des niches écologiques précises. Elles occupent une place très importante en pathologie humaine infectieuse. Cette importance s'explique aussi bien par la variété des espèces bactériennes qui les composent qu'à leur incidence au niveau de la santé des populations. Certaines espèces comme *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, *Serratia*, *Citrobacter* ne provoquent pas de pathologies intestinales mais apparaissent fréquemment dans des infections extra-intestinales comme les infections urinaires. Les espèces pathogènes les plus fréquemment isolées dont l'ingestion provoque une infection gastro-intestinale sont *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella* et certaines souches d'*Escherichia coli*. (Faure, 2009).

La fréquence, la gravité des infections dont elles sont responsables (septicémies, infections nosocomiales, méningites...), traduisent des difficultés de prise en charge liées entre autres à des difficultés d'identification et à leur résistance aux antibiotiques. (Mirabaud, 2003).

#### IV.1.1. Définition et caractères généraux

Les Entérobactéries sont définies par un ensemble de caractères généraux communs :

- Ce sont des bacilles à Gram négatif ; de 2-3 µm de long sur 0,6 µm de large, généralement polymorphes.
- le plus souvent mobiles grâce à une ciliature péritriche, mais immobiles dans le cas des genres *Klebsiella*, *Shigella* et *Yersinia pestis*
- Aérobie anaérobie facultatif ;
- Se développant aisément sur milieu ordinaire (18 à 24 heures à 37°C).
- Fermentant le D-glucose avec ou sans production de gaz ;
- Ne possédant pas d'oxydase ;
- Possédant une catalase à l'exception de *Shigella dysenteriae* ;
- Réduisant les nitrates en nitrites (quelques exceptions parmi les quelles, on cite *Erwinia* et *Yersinia*).
- Elles sont chimio-organotrophes, de nombreuses espèces sont prototrophes et quelques-unes sont auxotrophes. (Denis et al., 1998)

Les Entérobactéries ont une composition caractéristique des bases constituant leur ADN (GC% compris généralement entre 50 et 60) ce qui les différencie des *Pseudomonas* et des *Vibrionaceae* (Le Minor et al., 1989 ; Murray et al., 1999).

#### IV.1.2. Taxonomie

Actuellement, les Entérobactéries sont placées sur la base du séquençage des ARN 5S et 16S dans l'un des 10 groupes formant les Eubactéries, celui des Protéobactéries. Dans ce

groupe, elles appartiennent à la sous-classe gamma. La subdivision des genres et espèces à l'intérieur de la famille des Entérobactéries est basée sur la comparaison des caractéristiques physiologiques, biochimiques, antigéniques et génétiques des bactéries. Même si la classification est en constante évolution, les Enterobacteriaceae comptent aujourd'hui près de 140 espèces regroupées en 33 genres (Prescott *et al.*, 2003).

Les espèces les plus communément isolées en bactériologie clinique appartiennent à 12 genres : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia*.

On peut les classer dans le tableau suivant :

**Tableau II** : Principaux genres et espèces des Entérobactéries (Moreda, 2004).

	Genre	Principales espèces
Genres rencontrés en bactériologie clinique et/ou en microbiologie alimentaire	<i>Salmonella</i>	Espèce <i>enterica</i> qui comprend 6 sous espèces (dont <i>enterica</i> , <i>arizonae</i> ...). La sous espèce <i>enterica</i> est divisées en plus de 2000 sérovars déterminés par sérotypage (dont <i>Paratyphi A</i> , <i>Typhimurium</i> ...)
	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>
	<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i> , <i>diversus</i> , <i>amolanaticus</i>
	<i>Shigella</i>	<i>dysenteriae</i> , <i>flexneri</i> , <i>boydii</i> , <i>sonnei</i>
	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i> , <i>oxytoca</i>
	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i> , <i>aerogenes</i> , <i>agglomerans</i>
	<i>Serratia</i>	<i>marcecens</i> , <i>liquefaciens</i> , <i>rubideae</i>
	<i>Hafnia</i>	<i>alvei</i>
	<i>Proteus</i>	<i>mirabilis</i> , <i>vulgaris</i>
	<i>Morganella</i>	<i>morganii</i> (seule espèce du genre)
	<i>Providencia</i>	<i>alcalifaciens</i> , <i>rettgeri</i> , <i>stuartii</i>
	<i>Yersinia</i>	<i>pestis</i> , <i>enterocolitica</i> , <i>pseudotuberculosis</i>
Autres genres ne présentant pas d'intérêt en bactériologie clinique ou en microbiologie alimentaire.	<i>Buttiauxella</i> , <i>Cedecea</i> , <i>Edwardsiella</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Ewingella</i> , <i>Kluyvera</i> , <i>Moellerella</i> , <i>Koserella</i> , <i>Leclercia</i> , <i>Obesumbacterium</i> , <i>Rahnella</i> , <i>Tatumella</i> , <i>Xenorhabdus</i> , <i>Yokenella</i>	

#### IV.1.3. Habitat:

Elles sont largement répandues dans l'environnement (sols, végétaux, eaux... ) et dans l'intestin de l'homme et des animaux. Certaines espèces ont une niche écologique très étroite. Ainsi *Salmonella typhi* (responsable de la fièvre typhoïde) n'est retrouvée que dans l'intestin de l'homme. D'autres, les plus nombreuses, sont ubiquitaires. *Klebsiella pneumoniae* par

exemple, très présente dans l'environnement, est aussi retrouvée dans l'intestin de nombreuses espèces de primates (Prescott *et al.*, 2003).

#### IV.1.4. Culture :

Les entérobactéries aérobies-anaérobies facultatives se développent facilement sur milieux nutritifs simples.

Sur milieux gélosés, les colonies d'entérobactéries sont habituellement lisses, brillantes, de structure homogène (type « smooth » ou S). Cet aspect peut évoluer après cultures successives pour donner des colonies à surface sèche rugueuse (type « rough » ou R). Les colonies des bactéries capsulées telles que les *Klebsiella* sont mucoïdes, plus grandes que les colonies S avec une tendance à la confluence.

#### IV.1.5. Structure antigénique :

Chez les entérobactéries on peut distinguer :

Des antigènes de paroi ou antigènes O toujours présents.

Des antigènes flagellaires ou antigènes H.

Des antigènes de surface (capsule ou enveloppe)

#### IV.1.6. Pouvoir pathogène:

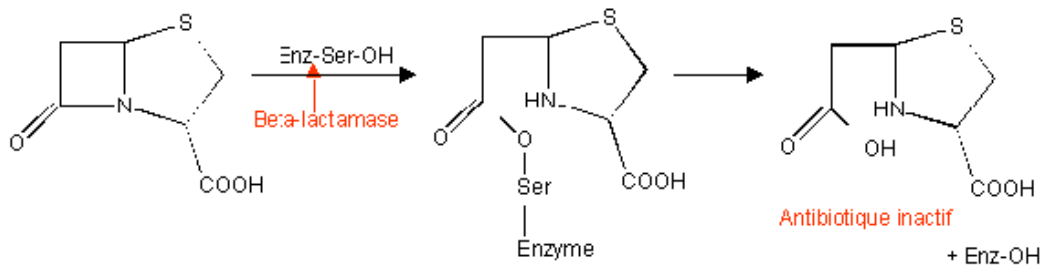
Le pouvoir pathogène des Entérobactéries chez l'homme est considérable. Les infections sont soit bien définies et peuvent concerner tous les sujets, soit non spécifiques touchant les sujets immunodéprimés. Dans le premier cas, les espèces responsables sont précises. Ainsi, *Yersinia pestis* est responsable de la peste, *Salmonella Typhi* de la fièvre typhoïde. Une dizaine d'espèces, dont *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Shigella sp.* et *Yersinia enterocolitica* sont à l'origine de syndromes diarrhéiques et d'autres infections intestinales. De nombreuses espèces (environ 40) sont impliquées dans des processus infectieux de localisation et de fréquence très diverses. (Bouteleux, 2005).

Outre une résistance naturelle aux antibiotiques actifs sur les germes à Gram positif (pénicillines, macrolides) les *Entérobactéries* présentent fréquemment une résistance acquise aux antibiotiques à large spectre. Cette résistance est souvent conditionnée par la présence de plasmides porteurs de déterminants de résistance multiples et transférables à d'autres bactéries à Gram négatif. La détermination de la sensibilité par l'antibiogramme est donc indispensable.

#### IV.2. Les entérobactéries productrices de BLSE (EBLSE)

Les **bêta-lactamines** représentent la classe thérapeutique la plus utilisée en médecine humaine, il n'est pas étonnant que la résistance à cette importante classe de médicaments pose un problème inquiétant. (Cattoir, 2008).

Cette classe thérapeutique regroupe de nombreuses molécules qui possèdent toutes un noyau bêta-lactame, associé à des cycles et des chaînes latérales variables, qui expliquent les propriétés pharmacocinétiques et le spectre d'activité des différentes molécules. Le noyau bêta-lactame est la cible des bêta-lactamases qui l'hydrolysent, et qui rendent l'antibiotique inactif. (Vander Stichele *et al.*, 2006).



**Figure 03 :** Mécanisme d'inactivation des  $\beta$ -lactames par les  $\beta$ -lactamases (Faure, 2009).

Les **bêta-lactamases** produites par les entérobactéries sont des enzymes qui constituent leur principal mécanisme de résistance aux bêta-lactamines. L'inactivation des bêta-lactamines est due à l'ouverture du cycle bêta-lactame au niveau de la liaison amide, selon une réaction d'hydrolyse suite à l'activation d'une molécule d'eau. Les bêta-lactamases sont réparties en 4 classes selon la classification d'Ambler qui les désigne de A à D. (Ambler, 1980).

Les **bêta-lactamases à Spectre Étendue** (BLSE) ont été décrites pour la première fois en 1983, en Allemagne. Au début des années 1980, les céphalosporines de troisième génération (C3G) ont été commercialisées, mais à la suite de leur surutilisation pour le traitement de plusieurs infections, des changements relativement mineurs des séquences des gènes originaux ont entraîné une modification significative de l'affinité des enzymes pour le substrat, et il s'est développé un groupe de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu. Les BLSE sont plasmidiques donc transférables et sont capables de conférer une résistance bactérienne vis-à-vis des pénicillines, des céphalosporines de première, deuxième et troisième génération ainsi que l'aztreonam par hydrolyse de ces antibiotiques. (Bush *et al.*, 1995).

Elles sont isolées dans plus de 80% des cas chez *Klebsiella pneumoniae* mais elles ont été observées également chez les entérobactéries comme *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, etc. (Pitout *et al.*, 2004).

Les BLSE sont sensibles à la présence d'inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase comme l'acide clavulanique. Ce sont des  $\beta$ -lactamines qui ne possèdent par eux même qu'une faible activité antibactérienne intrinsèque sans intérêt clinique. Mais contrairement aux autres  $\beta$ -lactamines, ces inhibiteurs se lient de façon irréversible au site catalytique des  $\beta$ -lactamases, produisant un complexe inactif. N'étant pas relargués, ils sont définis comme des "inhibiteurs suicides". (Livermore, 1995).

L'acide clavulanique, produit naturellement à partir de *Streptomyces clavuligerus*, a été découvert dans les années 1970. Il est considéré comme un inhibiteur des  $\beta$ -lactamases plasmidiques des bactéries à Gram positif et Gram négatif ainsi que des  $\beta$ -lactamases chromosomiques de *K. pneumoniae* et *Bacteroides fragilis*. Depuis ce temps d'autres molécules inhibitrices de  $\beta$ -lactamases ont été découvertes chez des microorganismes ou semi-synthétisées comme le sulbactame et le tazobactame. L'approche thérapeutique la plus utilisée en clinique est l'utilisation de la combinaison des inhibiteurs suicides avec les pénicillines. Les combinaisons amoxicilline/acide clavulanique, ampicilline/sulbactame et piperacilline/tazobactame inhibent la croissance des bactéries produisant les  $\beta$ -lactamases. (Stapleton *et al.*, 1995).

#### IV.3. Entérobactéries productrices de céphalosporinases de haut niveau.

Initialement, les céphalosporinases étaient connues comme des enzymes chromosomiques inductibles retrouvées chez le *Pseudomonas aeruginosa* et pouvaient être induites par les céphalosporines de troisième génération (la céfoxitine, la céfotaxime et la ceftazidime). L'hyperproduction de ces enzymes est associée à une diminution du nombre de porines dans la membrane externe des bactéries inhibant ainsi l'accès de l'antibiotique à son site d'action. La transmission plasmidique et la promiscuité dans la famille des entérobactéries entraînent des taux très élevés de céphalosporinases chez les *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* mais aussi chez les souches d'*Enterobacter* et de *Citrobacter*.

L'expression de cette céphalosporinase est médiée par le gène Amp-C. Plus de 20 lactamases de type Amp-C différentes ont été retrouvées. Ceci entraîne une résistance de haut niveau aux lactamines. Seule la sensibilité à la céfépime et aux carbapénèmes est maintenue (Pitout *et al.*, 2004).



# *Matériel et méthodes*

## **I. Caractéristiques générales du site d'étude**

### **I.1. L'établissement hospitalier**

L'établissement hospitalier sélectionné pour notre étude est situé à wilaya de Khenchela. Il dispose actuellement d'une capacité litière de 120 lits. C'est un hôpital de classe 4 (AHA, 1986). Des travaux d'agrandissement de l'hôpital sont en cours.

L'établissement public hospitalier 120 lits (nouvel hôpital) est une unité hospitalière construite dans le cadre du programme de son excellence le président de la république algérienne, pour améliorer la prise en charge des habitants khenchelois en matière de soins médicaux et renforcer le secteur sanitaire avec une capacité litière de 240 lits dont 120 sont déjà opérationnels. Le nouvel hôpital a ouvert ses portes en 2008. Situé à la sortie ouest de la wilaya au niveau de la route nationale 88 reliant les deux wilayas Batna et Khenchela, il occupe une superficie de 04 hectares dont 02 hectares déjà construits.



#### **Photographie 01 : Vue générale de l'hôpital**

C'est un établissement à prédominance chirurgicale dont l'activité recouvre des disciplines et services médicaux et médicotechniques variés ainsi que la prise en charge de pathologies très diverses. Il rejette un volume important de déchets liquides dont la traçabilité n'a jamais été suivie.

### **I.2. Réseau d'assainissement de l'établissement hospitalier**

Le réseau d'assainissement de l'hôpital se compose d'un collecteur qui reçoit les effluents des services. Il est associé à un réseau de collecteurs de pluie et à celui d'assainissement des logements des personnels.

Ces effluents liquides sont directement rejetés dans le réseau d'assainissement urbain de la ville de kenchela, pour être finalement acheminés vers la station d'épuration.

Le point de prélèvement se situe au niveau du collecteur principal du site d'étude qui réceptionne tout les effluents liquides de l'hôpital. Il est notamment raccordé aux services suivants : Médecine générale, médecine interne, médecine infectieuse, hématologie, chirurgie (infantile, générale, maxillo-faciale et urinaire), réanimation, pharmacie, radiologie, médecine légale et laboratoire.

En plus des effluents des différentes activités hospitalières le collecteur principal reçoit aussi les rejets liquides d'origine domestique et industrielle issus des cuisines, des garages, d'ateliers et des blanchisseries.

## **II. Echantillonnage**

La campagne de prélèvement a été réalisée durant les mois de Mars (2 fois), Avril (1 fois) 2013 à 10 heures du matin. Au total nous avons obtenu 03 échantillons.

Les échantillons d'eaux ont été prélevés au niveau du site d'étude dans des conditions d'asepsie rigoureuse à l'aide de flacons en verre de 1000 ml lavés puis rincés à l'eau déminéralisée, ensuite, ils sont séchés à l'abri de l'air, bouchés au coton cardé, étiquetés et enfin stérilisés par la chaleur au four Pasteur à 180 °C pendant 1 h 30. (**Rodier, 2009**).

Les récipients utilisés ne doivent pas apporter de substances toxiques et assurer une fois bouchés, une protection totale contre toute contamination extérieure. Il convient d'être très attentif pour éviter toute contamination accidentelle de l'échantillon durant le prélèvement, ce implique le respect de règles précises. (**Rejsek, 2002**).

Les échantillons sont rapidement transportés au frais, jusqu'au laboratoire. D'une façon générale, le transport à une température de 4 °C et à l'obscurité dans des sacs isothermes permet d'assurer une conservation satisfaisante.



**Photographie 02:** Collecteur principal de l'établissement hospitalier

### **III. Les paramètres microbiologiques**

Une partie de ce travail a été réalisée au sein de laboratoire central de l'établissement hospitalier au niveau de la paillasse de bactériologie. L'autre partie a été réalisée au sein des laboratoires de Biologie de l'Université Abbés Laghrour Khenchela. Elle a consisté :

- ✓ à effectuer un isolement des Entérobactéries sur milieux sélectifs appropriés au moyen des méthodes normalisées ISO actuellement en vigueur,
- ✓ à isoler les différentes colonies présentes, au moyen de milieux de culture spécifiques, ceci à partir de repiquage sur les cultures de l'étape précédente,
- ✓ à identifier les souches correspondantes, au moyen de tests complémentaires et biochimiques spécifiques,
- ✓ à évaluer la résistance de ces souches vis à vis de différents antibiotiques.



**Photographie 03** : Paillasse de bactériologie de l'établissement hospitalier

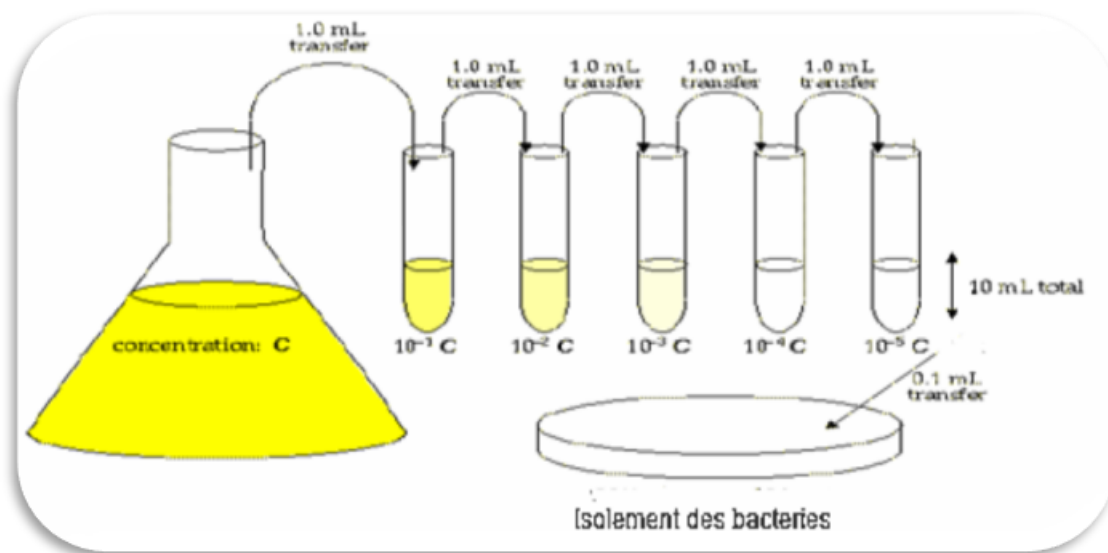
#### **III.1. Réalisation des dilutions en série**

Les dilutions sont nécessaires car on doit prélever de très faibles volumes à cause de la charge bactérienne souvent très élevée. Le principe de la technique repose sur le fait qu'après plusieurs dilutions, seuls les microorganismes dominants persistent dans les dilutions les plus élevées. Elle consiste à diluer successivement l'échantillon d'eau à analyser à l'aide de l'eau distillée.

Toutes les manipulations ont été effectuées avec un maximum de précision et d'une manière aseptique (**Rejsek, 2002**).

- ✓ On a d'abord bien mélangé l'échantillon en agitant vigoureusement le flacon avant l'examen afin de permettre une répartition homogène des microorganismes. puis à l'aide d'une pipette graduée stérile on a prélevé 1 ml.

- ✓ On a introduit stérilement le volume prélevé dans un tube contenant 9 ml d'eau distillée stérile. On obtient ainsi une dilution au 1/10, le tube est ensuite agité manuellement,
- ✓ Puis on prélève 1 ml de la dilution 1/10 et on l'introduit dans un deuxième tube contenant 9 ml d'eau distillée stérile, on obtient ainsi une dilution 1/100.
- ✓ Une troisième, quatrième et cinquième opération on été effectuées de la même manière afin d'obtenir une dilution au 1/1000, au 1/10000 et au 1/100000 enfin, on met la pipette dans un récipient contenant de l'eau javellisée.
- ✓ Une homogénéisation par au moins 10 secondes d'agitation est nécessaire avant chaque dilution.



**Figure 04 :** Préparation d'une dilution décimale en série

### III.2. Isolement des entérobactéries

0.1 ml de chaque dilution est déposé à la surface du milieu gélosé Hektoen coulé en boîte de pétri. L'inoculum a été étalé soigneusement sur toute la surface gélosée grâce à un râteau étaleur. La technique requiert certaines précautions : on a séché au préalable, à l'étuve à 37°C, les milieux gélosés afin de faire évaporer l'eau de cristallisation, la surface de la gélose doit être complètement sèche sinon on obtient une « pâte de colonies » sur la boîte de pétri.

Les boîtes de Pétri sont ensuite mises dans l'étuve couvercle en bas pour une incubation de 24 heures à 37°C.

### III.3. Biodiversité morphologique des isolats

#### III.3.1. Etude l'aspect macroscopique

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification. D'après **Delarras (2007)** les éléments importants de l'identification macroscopique sont:

- La forme des colonies: rondes, irrégulières, ondulées,...etc.
- La taille des colonies: par la mesure du diamètre.
- La chromogène: la couleur de la colonie.
- L'élévation: convexe, légèrement convexe, plate....etc.
- L'opacité: opaque, translucide, transparente.
- La surface: lisse, rugueuse, sèche, dentelée,...etc.

- La consistance : les colonies grasses, crémeuse donnant facilement des suspensions homogènes, correspondent au type S (Smooth = lisse). Tandis que les colonies sèches correspondent au type R (Rough = rugueux) et les colonies muqueuses (filantes) correspondant au type M (Muqueux); elles donnent difficilement des suspensions homogènes.

Le principe de lecture sur gelose Hektoen est fondé sur la fermentation éventuelle des 3 glucides présents dans le milieu (lactose, saccharose, salicine). Les microorganismes qui fermentent au moins l'un d'entre eux forment des colonies de couleur "saumon", les autres donnant des colonies vertes. En présence de thiosulfate de sodium, les microorganismes producteurs de sulfure d'hydrogène donnent, avec le citrate ferrique, des colonies à centre noir. (**Delarras, 2007**)

L'aspect des microorganismes est le suivant :

Caractéristiques	Microorganismes
Colonies jaune saumon	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Citrobacter sp</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Arizona</i> , <i>Serratia</i>
Colonies jaune saumon à centre noir	<i>Proteus vulgaris</i> ,
Colonies vertes à centre noir	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Salmonella</i>
Colonie vertes ou bleuâtres	<i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Providencia</i> , <i>Proteus morgani</i> , <i>Proteus rettgeri</i>
Petites colonies bleues ou brunâtres	<i>Pseudomonas</i> (oxydase positive)

### III.3.2. Etude l'aspect microscopique

#### III.3.2.1. Coloration de Gram

La coloration de Gram est une coloration différentielle qui permet la distinction des bactéries Gram (+) et Gram (-) sur la base de différence de composition chimique et d'ultra-structure des parois cellulaires. Cette méthode permet aussi d'observer :

- La morphologie des bactéries
- Leur mode de regroupement

#### 1- Réalisation du frottis

Fixer le frottis par la chaleur

Passer la lame lentement au-dessus de bec bunsen et laisser refroidir.

#### 2- Coloration par le violet de gentiane

Recouvrir la lame par violet de gentiane

Laisser ↓ 1 min.

Rincer à l'eau distillée

#### 3-Mordantage par le lugol

Recouvrir le frottis par lugol

Laisser ↓ 1 min

Eliminer l'excès de lugol et rincer la lame

#### 4-Décoloration par l'alcool

Recouvrir le frottis d'alcool (éthanol)

Laisser ↓ 30 s

Laver le frottis à l'eau distillée

#### 5- Recoloration par la fuchsine

Recouvrir le frottis par la fuchsine

Laisser ↓ 1min.

Rincer le frottis à l'eau distillée

Sécher la lame entre 2 feuilles de papier essuie-tout

Une fois séchés, les lames ont été examinées sous microscope optique à l'aide de l'objectif à immersion (x100). Des microphotographies sont réalisées à l'aide d'un microscope trinoculaire doté d'un appareil photographique numérique.



**Photographie 04 :** Un microscope équipé d'un appareil photographique numérique

#### **III.4. Purification des souches bactériennes**

Quinze colonies isolées ont été reprises de manière aléatoire et sont purifiées par repiquages successifs sur gélose Hektoen, les souches bactériennes purifiées ont fait l'objet d'une étude des caractères morphologiques macroscopiques, microscopiques et biochimiques.

Après purification et identification, le profil de résistance aux antibiotiques des colonies reprises précédemment est déterminé par la méthode de diffusion sur milieu Mueller Hinton.

#### **III.5. Identification biochimique classique**

Cette identification nous oriente sur le métabolisme suivi par les microorganismes et les enzymes qu'ils possèdent. Ces tests ont été réalisés en utilisant des mini galeries classiques (Delarras, 2007). La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le tableau d'identification. (Voir annexe 01)

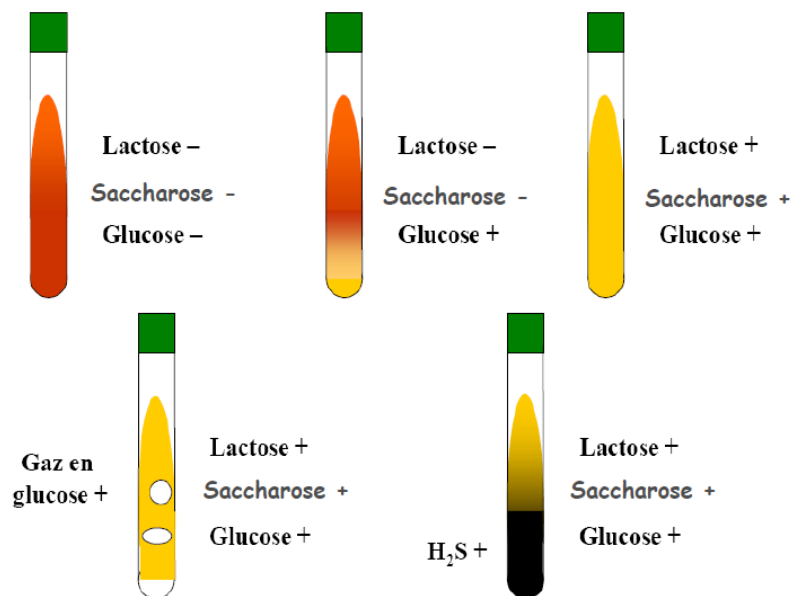
##### **III.5.1. Etude de la dégradation du glucose, saccharose et lactose en milieu TSI**

Le milieu Triple Sugar Iron agar (TSI) permet de mettre en évidence la dégradation du glucose, lactose, et du saccharose, la production éventuelle du sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) et la

production de gaz (CO<sub>2</sub>). Ce milieu est composé d'un culot et d'une pente, et contient le rouge de méthyle comme un indicateur de pH.

On ensemence le milieu à l'aide d'une anse stérile par des stries longitudinales au niveau de la pente et par une piqûre centrale dans le culot. On incube les tubesensemencés à 37 °C pendant 24 heures. Les résultats se manifestent comme suit:

- ✓ Glucose positif : culot jaune.
- ✓ Saccharose et lactose positif : la pente vire au jaune.
- ✓ H<sub>2</sub>S positif : noircissement du milieu au niveau de la zone joignant le culot et la pente.
- ✓ Production de gaz : présence de bulles de gaz dans le culot (**Halassi, 2009**).



**Figure 05 :** Lecture du milieu Triple Sugar Iron agar

### III.5.2. Utilisation du citrate comme source de carbone

Le milieu utilisé est le citrate de Simmons, dont l'unique source de carbone est le citrate de sodium, seules les bactéries contenant une enzyme citrate perméase seront donc capables de se développer sur ce milieu.

On ensemence le milieu par la suspension bactérienne, en strie longitudinale. Les tubes sont ensuite légèrement fermés et incubés à 37°C pendant 24 Heures. L'utilisation du citrate provoque l'alcalinisation du milieu qui se traduit par une couleur bleue (**Akmouci-Toumi, 2009**).

### III.5.3. Test du mannitol mobilité

Le Mannitol-Mobilité est un milieu de culture qui permet de mettre en évidence l'utilisation du mannitol et permet simultanément d'établir la mobilité bactérienne.

On ensemence le milieu par piqure centrale, à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée chargée de la culture à étudier, puis incubé à 37 °C pendant 24 heures à 48h.

- ✓ La fermentation du mannitol entraîne le virage du milieu au jaune.
- ✓ Les souches mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement en créant un trouble du milieu, tandis que les souches immobiles croissent uniquement le long de la strie d'ensemencement (Delarras, 2007).

#### **III.5.4. Recherche de la $\beta$ galactosidase**

Cette enzyme permet de scinder la molécule du lactose, après sa pénétration dans la cellule bactérienne en glucose et galactose.

La présence de la  $\beta$ -galactosidase est mise en évidence à l'aide d'un analogue structural du lactose, l'ONPG (orthonitrophenyl  $\beta$ -D-galactoside) qui diffuse librement à l'intérieur des bactéries où il est alors dégradé par  $\beta$ -galactosidase en galactose et en orthonitrophénol. Ce dernier donne une couleur jaune citron lors de sa libération dans le milieu (réaction positive).

On ajoute un disque d'ONPG dans une suspension bactérienne dense. L'incubation est faite à 37 °C pendant 24 heures.

- ✓ Apparition d'une coloration jaune citron : bactérie ONPG positive.
- ✓ Absence de coloration : bactérie ONPG négative.

#### **III.5.5. Recherche de l'uréase**

L'uréase est une enzyme qui hydrolyse l'urée ( $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ ) en dioxyde de carbone et ammoniac qui se lient entre eux pour donner le complexe du carbonate d'ammonium.



Le milieu urée-indole permet de mettre en évidence ce caractère, dont le virage de l'indicateur de pH au rouge violacé en raison de l'alcalinisation du milieu, indique l'utilisation de l'urée par les bactéries.

#### **III.5.6. Recherche de l'indole**

L'indole est le métabolite terminal de la dégradation du tryptophane présent initialement dans le milieu. Seules les bactéries indologènes permettent cette dégradation jusqu'à la formation de l'indole. Ce test s'effectue en utilisant un milieu urée-indole (ou un milieu riche en tryptophane exempt d'indole). (Halassi, 2009).

Après 24 h d'incubation, on ajoute quelques gouttes du réactif Kovacs (acide nitrique nitreux) au milieu urée indole inoculé par la souche à étudier. Après agitation l'indole formé va réagir avec le réactif de Kovacs pour former un anneau rouge surnageant (indole positif),

alors que la formation d'un anneau brunâtre (couleur du réactif) signifie que la souche est indole négatif (Akmouci-Toumi, 2009).

### III.5.7. Recherche de tryptophane désaminase (TDA)

Le tryptophane désaminase agit sur l'acide aminé L-tryptophane en formant l'acide indole pyruvique. Ce dernier donne avec le perchlorure de fer une coloration brun rouge.

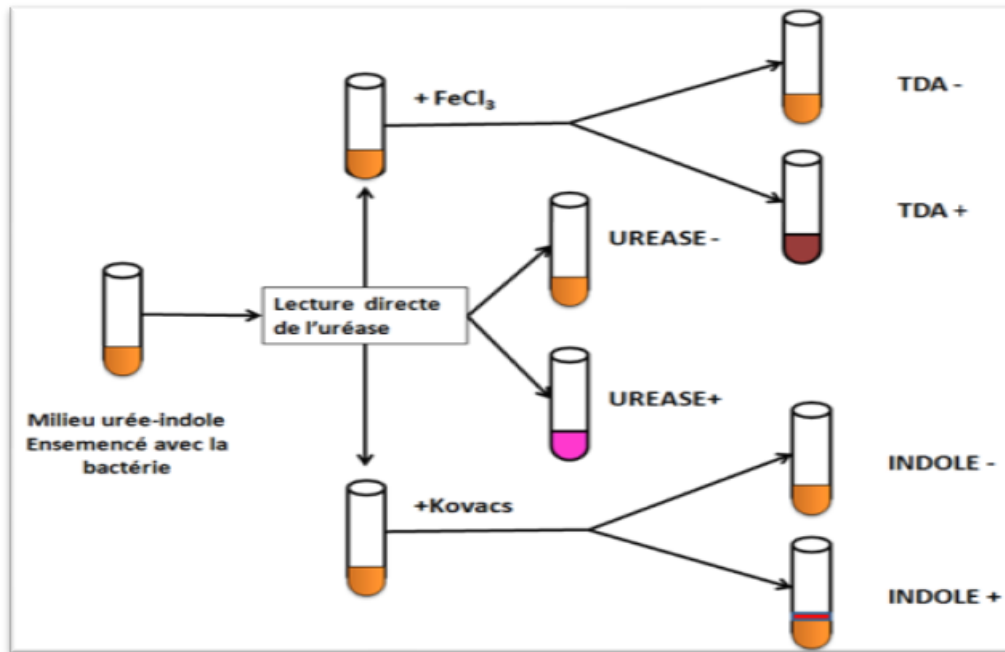


Figure 06 : lecture du milieu urée indole

### III.5.8. Recherche du nitrate réductase

Ce test permet de mettre en évidence le nitrate réductase, une enzyme capable de réduire les nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) en nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ). Des tubes contenant un bouillon nitraté sont ensemencés par les souches isolées, puis incubés à 37 °C jusqu'à l'obtention d'une culture abondante. Après l'incubation, on ajoute aux cultures quelques gouttes du réactif I (acide para sulfanilique) ensuite du réactif II (alpha-naphtylamine).

L'apparition d'une coloration rose ou rouge traduit une réaction positive (réduction des nitrates en nitrites).

### III.5.9. Etude des voies fermentatives intermédiaires

Cette étude permet d'effectuer une différenciation entre la fermentation des acides mixtes (réaction au Rouge de Méthyle) et celle du butylène glycolique (réaction de Voges Proskauer).

✓ **Réaction au Rouge de Méthyle:** elle consiste à mettre en évidence l'acidification finale du milieu par la fermentation du glucose.

✓ **Réaction de l'acétoïne (réaction de Voges Proskauer):** Ce test détecte la capacité de synthèse de l'acétoïne (acétyl-méthyle carbinol) par les microorganismes, qui est un métabolite spécifique intermédiaire de la fermentation butandiolique (VP +).

Dans un milieu bien aéré et fortement alcalinisé, il se produit une auto-oxydation de butanediol en acétoïne et en diacétyl. L'acétoïne réagit avec le réactif VP I (soude ou potasse) pour former le diacétyl; ce dernier après addition du VP II va réagir avec le groupe guanidine de l'arginine pour former un complexe coloré en rose.

Afin de réaliser ces deux tests, On ensemence la souche à étudier sur un milieu Clark et Lubs puis incubé à 37 °C pendant 24h à 48h. Après l'incubation on divise le milieu dans deux tubes à hémolyse stériles, dans le premier tube on ajoute quelques gouttes de VP I puis quelques gouttes de VP II, et on laisse le tube incliné (réaction facilité par l'air), alors que dans le deuxième tube on ajoute quelques gouttes de RM. (Akmouci-Toumi, 2009).

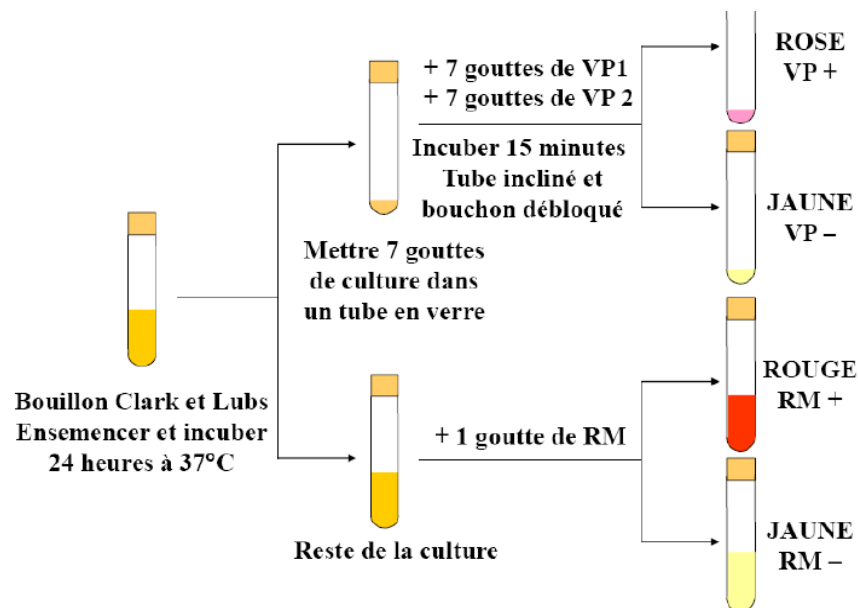


Figure 07 : Lecture de milieu Clark et Lubs

**Test VP**

- ✓ Coloration rouge : VP positif.
- ✓ Coloration jaunâtre : VP négatif.

**Test RM**

- ✓ Coloration rouge: RM positif.
- ✓ Coloration jaunâtre : RM négatif

**III.5.10. Recherche des décarboxylases**

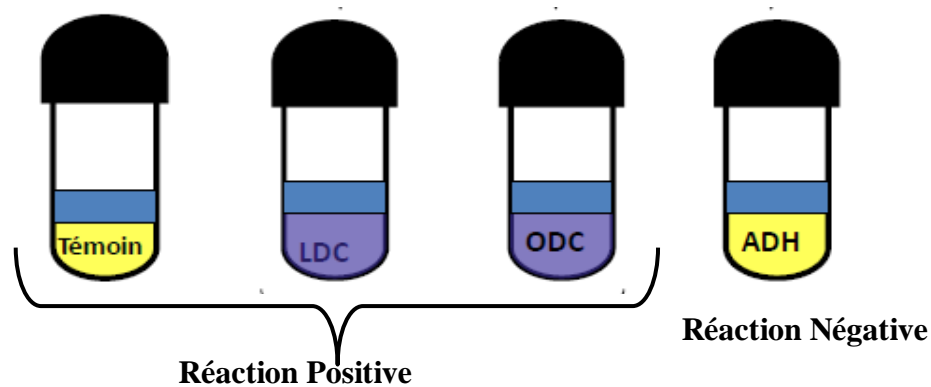
Ce test permet de détecter la production des décarboxylases suivantes : la lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC) et l'arginine dihydrolase (ADH) qui décarboxylent respectivement la lysine, l'ornithine et l'arginine en cadavérine, putrescine et agamatine par ordre successif

Le test est réalisé avec le milieu Moëller réparti en 4 tubes à hémolyse différents :

Le premier tube constitue le témoin, il contient essentiellement du glucose et du pourpre de bromocrésol comme indicateur de pH. Les trois autres tubes contiennent en plus du milieu témoin, un des trois acides aminés suivants : Lysine, Ornithine, ou Arginine.

Après ensemencement, on ajoute 1ml d'huile de vaseline stérile dans chaque tube, tous les tubes seront incubés à 37°C pendant 24h à 48h.

- ✓ Apparition d'une coloration jaune : réaction positive pour témoin.
- ✓ Apparition d'une coloration jaune : réaction négative pour les enzymes.
- ✓ Apparition d'une coloration pourpre : réaction positive (**Benammar, 2012**)



**Figure 08 :** Lecture des décarboxylases

### III.6. L'antibiogramme

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique (**Soussy, 2010**).

Un antibiogramme permet de tester sur milieu de culture, l'action de molécules antibiotiques sur une souche bactérienne. Il donnera donc des indications sur l'efficacité *in vitro* de ces antibiotiques.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion des disques imprégnés d'antibiotiques en milieu Mueller-Hinton, Les antibiotiques testés sont représentés dans le **tableau III**. Le mode opératoire est pratiqué selon la Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS.

- ✓ La gélose Mueller-Hinton fondue au bain-marie a été coulée en boîte de Pétri en respectant une épaisseur d'environ 4 mm.
- ✓ On prépare la suspension à partir d'une souche bactérienne de 18 heures. On prélève des colonies de la bactérie à étudier avec la pipette pasteur qu'on introduit dans un tube contenant 10 ml d'eau physiologique.

✓ On fait l'ensemencement par inondation de la surface entière de la gélose avec quelques gouttes de la suspension bactérienne en s'assurant d'une bonne répartition des bactéries.

✓ Enfin, on laisse sécher les boîtes de Pétri pendant quelques minutes à température ambiante.

✓ Après le séchage, on dépose les disques sur la gélose à l'aide d'un distributeur de disques, en appuyant doucement sur chaque disque par pince flambée pour assurer un contact uniforme avec le milieu. Ensuite, on laisse les boîtes à la température ambiante pendant 30 minutes sur la paille pour permettre la diffusion de l'antibiotique dans la gélose.

**Tableau III :** Liste des antibiotiques testés, charge et classification des disques

**Conditions du test**

**Milieu :** Mueller Hinton

**Inoculum :** Colonies en suspension

**Incubation :** 37°C, atmosphère ordinaire, 24h

**Control de qualité**

*Escherichia coli* ATCC27853

Antibiotiques	Abréviation	Charge du disque	Classe
Amoxicilline	AML	10 µg	β-lactames (famille des pénicillines)
Amoxicilline/acide clavulanique	AMC	20/10 µg	β-lactames (famille des pénicillines et des clavames)
Céfazoline	CZ	30 µg	β-lactames (famille des céphalosporines 1 <sup>ère</sup> génération)
Céfotaxime	CTX	30 µg	β-lactames (famille des céphalosporines 3 <sup>ème</sup> génération)
Imipenème	IMP	10 µg	β-lactames (famille des carbapénèmes)
Acide nalidixique	NA	30 µg	Quinolones
Ciprofloxacine	CIP	05 µg	Fluoroquinolones
Ofloxacine	OFX	5 µg	Fluoroquinolones
Gentamicine	CN	10 µg	Aminosides
Furanes	F	300 µg	Nitrofurantoïne

Pendant l'incubation à 37°C pendant 18 à 24 heures, les antibiotiques diffusent hors du disque dans la gélose, créant un gradient de concentration décroissante. Une fois la période d'incubation écoulée, on a retiré les boîtes de pétri de l'étuve pour commencer la lecture, la zone entourant le disque où aucune croissance bactérienne n'est visible détermine la zone d'inhibition. Son diamètre est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse métallique et comparé aux diamètres critiques figurant dans les tables de lecture (Annexe 07). La souche est ainsi classée sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R) à l'antibiotique, les souches I étant ensuite incluses dans la catégorie R.

Des souches de référence *Escherichia coli* ATCC 25922, ont servi pour le contrôle de la qualité de l'antibiogramme. (Annexe 06).

A decorative border resembling a scroll, with a black outline and small circular details at the corners, framing the text.

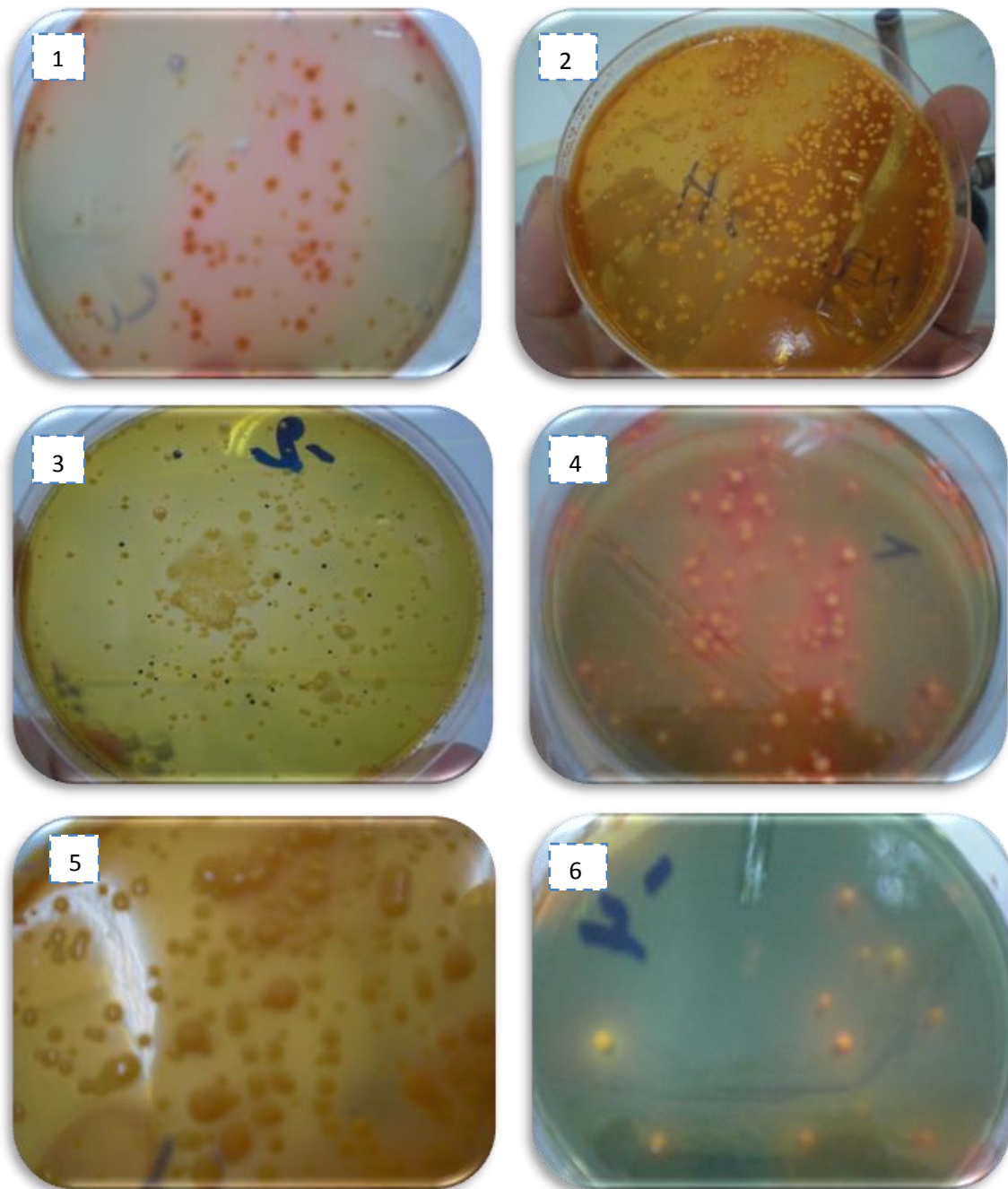
# *Résultats et discussions*

## I. Caractéristiques microbiologiques

### I.1. Biodiversité morphologique des isolats

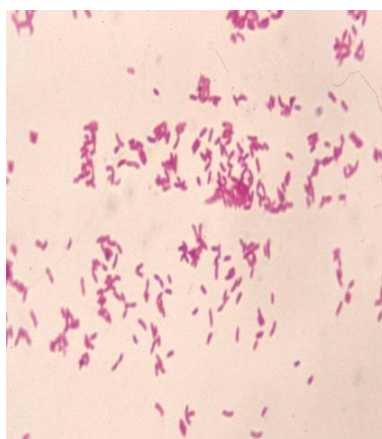
#### I.1.1. Aspect macroscopique et microscopique des isolats

La photographie 05 montre le résultat de l'isolement des échantillons d'eaux sur la gélose Hektoen, on remarque qu'après incubation, il y a apparition de plusieurs types de colonies à la surface du milieu. Une coloration de Gram a été pratiquée sur quelques colonies prises au hasard. Les résultats de l'étude des différents caractères macroscopiques et microscopiques des colonies sont représentés dans le tableau IV.



**Photographie 05** : Aspect macroscopique des souches des entérobactéries sur gélose Hektoen

**Tableau IV:** Observation des caractères cultureux et morphologique des bactéries isolées.

Milieu de culture	Caractères cultureux	Caractères microscopiques
<b>Gélose Hektoen</b>	Petites colonies saumon, rondes, lisses, à bords réguliers, bombées, brillantes,	
	Colonies moyennes saumon irrégulières, plates et rugueuses	
	Grandes colonies saumon irrégulières, lisses, brillantes, muqueuse	
	Colonies moyennes, vertes à centre noir rondes, lisses, à bords réguliers, bombés.	
	Colonie vertes rondes, lisses, à bords réguliers, plat brillante, sèche	

La gélose Hektoen est un milieu sélectif permettant l'isolement et la différenciation des entérobactéries à partir de différents prélèvements. Son utilisation est basée sur les principes suivants :

- ✓ L'inhibition de la flore à Gram positif est due à la présence des sels biliaires qui peuvent également inhiber légèrement la croissance de quelques souches de microorganismes à Gram négatif.

- ✓ Le milieu contient trois glucides : lactose, saccharose et salicine. La forte concentration en lactose favorise la visualisation des entérobactéries en évitant le problème des fermentations tardives. Les autres glucides ont été introduits afin d'assurer une différenciation plus performante et de réduire la toxicité engendrée par les indicateurs colorés.

- ✓ En présence de thiosulfate de sodium, les microorganismes producteurs de sulfure d'hydrogène réduisent le citrate ferrique ammoniacal et se manifestent par un noircissement dû à l'apparition de sulfure de fer au centre des colonies.

- ✓ Le système d'indicateurs colorés, composé de bleu de bromothymol et de fuchsine acide permet de colorer en saumon les entérobactéries lactose-positif et en bleu vert les lactose-négatif

Le principe de lecture est fondé sur la fermentation éventuelle des 3 glucides présents dans le milieu (lactose, saccharose, salicine). Les microorganismes qui fermentent au moins l'un d'entre eux forment des colonies de couleur "saumon", les autres donnant des colonies bleues ou vertes. En présence de thiosulfate de sodium, les microorganismes producteurs de

sulfure d'hydrogène donnent, avec le citrate ferrique, des colonies à centre noir. (**Bakhoum, 2004**).

En se basant sur le principe de lecture de la gélose Hektoen, on peut avancer que les colonies saumon apparues à la surface du milieu sont lactose positif (Photo 06 -01-), les colonies vertes sont lactose négatif (Photographie 05 -03-), et les colonies à centre noir sont H<sub>2</sub>S positif (Photographie 05 -03-).

L'observation microscopique des lames colorées par la technique de Gram, montre des bacilles isolées ou en courtes chainettes colorés en rose. Les colonies apparues à la surface de la gélose sont donc issues de bacilles Gram négatif, ceci concorde avec le caractère de la gélose Hektoen qui est un milieu sélectif pour les bacilles Gram négatif.

## **I.2. Identification biochimiques classique des isolats**

Pour chaque échantillon, quinze colonies ont été prélevés de manière aléatoire, ces colonies ont été par la suite purifiées par repiquages successifs sur gélose Hektoen. Après purification des souches, on a procédé à une identification biochimique sur galerie classique.

Grace aux tests biochimiques, il est possible de connaître certaines caractéristiques du métabolisme des bactéries analysées. Plusieurs résultats ont été obtenus après ajout des additifs, ce qui nous renseigne sur la voie d'attaque des glucides, la présence d'enzymes respiratoires, les voies fermentatives et le métabolisme des acides aminés. (**Meziani, 2012**)

Les résultats obtenus avec photographies sont représentés dans le tableau V, en se basant sur le tableau de lecture (Annexe 01), on a pu identifier 07 espèces bactériennes (Tableau VI)

Tableau V : Résultats biochimiques obtenus après lecture de la galerie classique.

Les milieux	Photographie des résultats	Interprétation des résultats
<p><b><u>Triple Sugar Iron agar (TSI)</u></b></p>		<p>C'est un milieu au niveau duquel nous avons recherché 5 caractères :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- la fermentation du lactose sur la pente qui se traduit par virage au jaune.</li> <li>- la fermentation du saccharose également qui se matérialise par virage au jaune.</li> <li>- la fermentation du glucose : culot jaune.</li> <li>- la présence de gaz qui se matérialise par le décollement du culot et/ou la présence de bulles d'air.</li> <li>- la production de H<sub>2</sub>S qui se traduit par une coloration noire.</li> </ul>
<p><b><u>Utilisation du citrate</u></b></p>		<p>L'utilisation du citrate comme seule source de carbone entraîne une alcalinisation du milieu, d'où le virage du vert au bleu.</p>
<p><b><u>Le milieu Mannitol-mobilité</u></b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- La fermentation du mannitol entraîne le virage du milieu au jaune.</li> <li>- Les souches mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement en créant un trouble du milieu, tandis que les souches immobiles croissent uniquement le long de la strie d'ensemencement.</li> </ul>
<p><b><u>Production de la β-Galactosidase (test ONPG)</u></b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Absence de coloration : bactérie ONPG négative.</li> <li>- Apparition d'une coloration jaune citron : bactérie ONPG positive ce résultat est dû à la présence d'enzyme β-galactosidase qui dégrade l'ONPG en galactose et en orthonitrophénol.</li> </ul>
<p><b><u>Production d'uréase</u></b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Le virage de l'indicateur de pH au rouge violacé en raison de l'alcalinisation du milieu, indique l'utilisation de l'urée par les bactéries.</li> <li>- Le milieu garde sa couleur d'origine si la bactérie est Uréase négative</li> </ul>

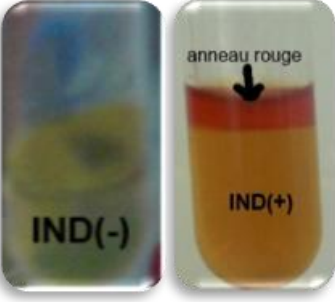

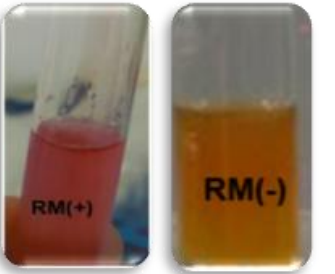
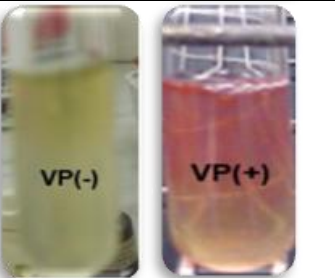
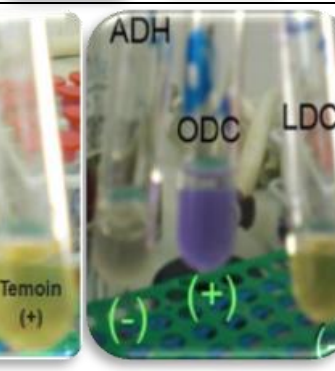
<p><b><u>Test d'indole et tryptophane désaminase (TDA)</u></b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- la formation d'un anneau brunâtre (couleur du réactif) signifie que la bactérie est indole négatif,</li> <li>- La formation d'un anneau rouge après addition du réactif de Kovacs indique une bactérie indole positif.</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aucune réaction : TDA négatif</li> <li>- TDA positif : Le tryptophane désaminase agit sur l'acide aminé L-tryptophane en formant l'acide indole pyruvique. Ce dernier donne avec le perchlorure de fer une coloration brun rouge.</li> </ul>
<p><b><u>Recherche du nitrate réductase</u></b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- L'apparition d'une coloration rose ou rouge traduit une réaction positive (réduction des nitrates en nitrites)</li> <li>- La couleur jaune : réaction négative.</li> </ul>
<p><b><u>Etude des voies fermentatives intermédiaires</u></b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- RM positif l'acidification du milieu par la fermentation du glucose donne la couleur rouge</li> <li>- RM négatif le milieu reste incolore donc aucune réaction de fermentation.</li> </ul>
<p><b><u>Production de décarboxylases</u></b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Apparition d'une coloration jaune : réaction positive pour témoin : la fermentation de glucose.</li> <li>- Apparition d'une coloration jaune: réaction négative pour les enzymes.</li> <li>- Apparition d'une coloration pourpre : réaction positive qui signifie la présence des enzymes décarboxylases.</li> </ul>

Tableau VI : Espèces bactériennes identifiées par galerie biochimique classique.

Tests Bactéries	Tests																	Espèces	
	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	RM	LAC	GLU	SAC	GAZ	MAN	MOB		NO <sub>2</sub>
<u>1</u>	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Serratia sp</i>
<u>2</u>	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Citrobacter freundii</i>
<u>3</u>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<u>4</u>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<u>5</u>	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter aérogènes</i>
<u>6</u>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	<i>Yersinia sp</i>
<u>7</u>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
<u>8</u>	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	<i>Proteus sp</i>
<u>9</u>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
<u>10</u>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
<u>11</u>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	<i>Yersinia sp</i>
<u>12</u>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
<u>13</u>	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	<i>Enterobacter aérogènes</i>
<u>14</u>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<u>15</u>	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	<i>Proteus sp</i>

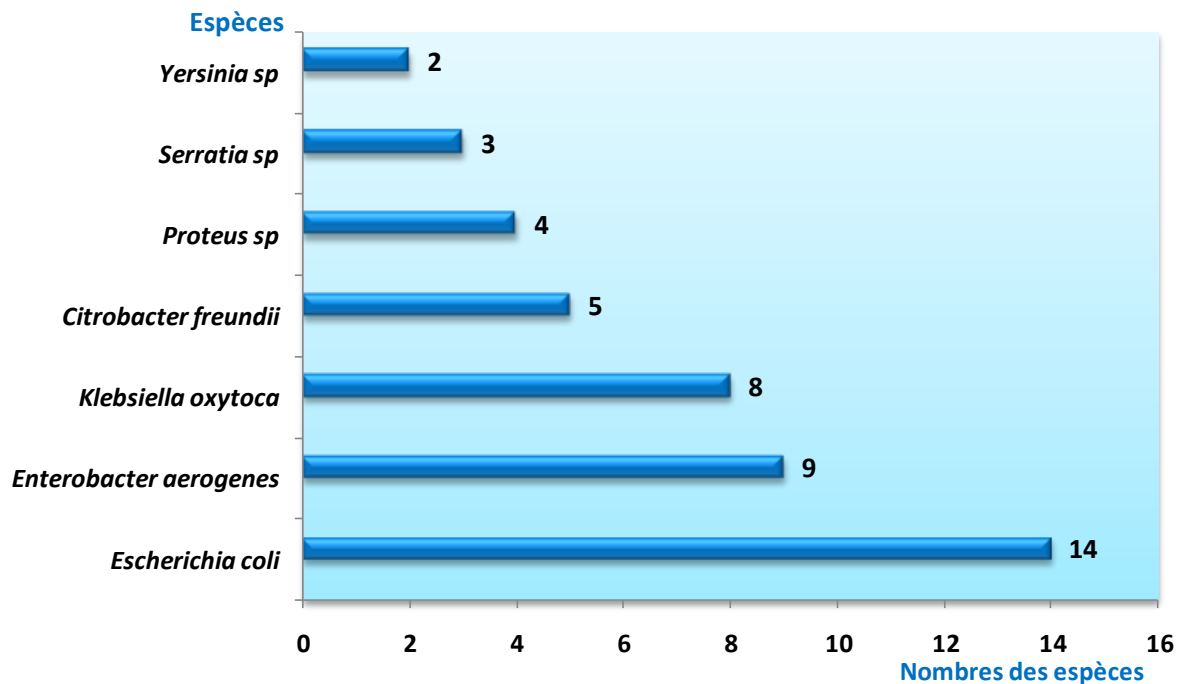
Tests Bactéries	Tests																	Espèces	
	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	RM	LAC	GLU	SAC	GAZ	MAN	MOB		NO <sub>2</sub>
<u>1</u>	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter aérogènes</i>
<u>2</u>	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter aérogènes</i>
<u>3</u>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<u>4</u>	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Citrobacter freundii</i>
<u>5</u>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<u>6</u>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<u>7</u>	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Serratia sp</i>
<u>8</u>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
<u>9</u>	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter aérogènes</i>
<u>10</u>	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Serratia sp</i>
<u>11</u>	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Citrobacter freundii</i>
<u>12</u>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
<u>13</u>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
<u>14</u>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
<u>15</u>	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter aérogènes</i>

Tests Bactéries	Tests																	Espèces	
	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	RM	LAC	GLU	SAC	GAZ	MAN	MOB		NO <sub>2</sub>
<u>1</u>	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	<i>Proteus sp</i>
<u>2</u>	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	<i>Proteus sp</i>
<u>3</u>	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter aérogènes</i>
<u>4</u>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
<u>5</u>	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter aérogènes</i>
<u>6</u>	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter aérogènes</i>
<u>7</u>	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Citrobacter freundii</i>
<u>8</u>	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Citrobacter freundii</i>
<u>9</u>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
<u>10</u>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
<u>11</u>	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<u>12</u>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
<u>13</u>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
<u>14</u>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
<u>15</u>	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella oxytoca</i>

(+):caractère positif

(-):caractère négatif

45 colonies ont été identifiées à partir de site d'étude. Le nombre de bactéries de chaque espèce retrouvée est représenté dans la figure 09 :



**Figure 09 :** Nombre d'espèces bactériennes identifiées à partir des Entérobactéries

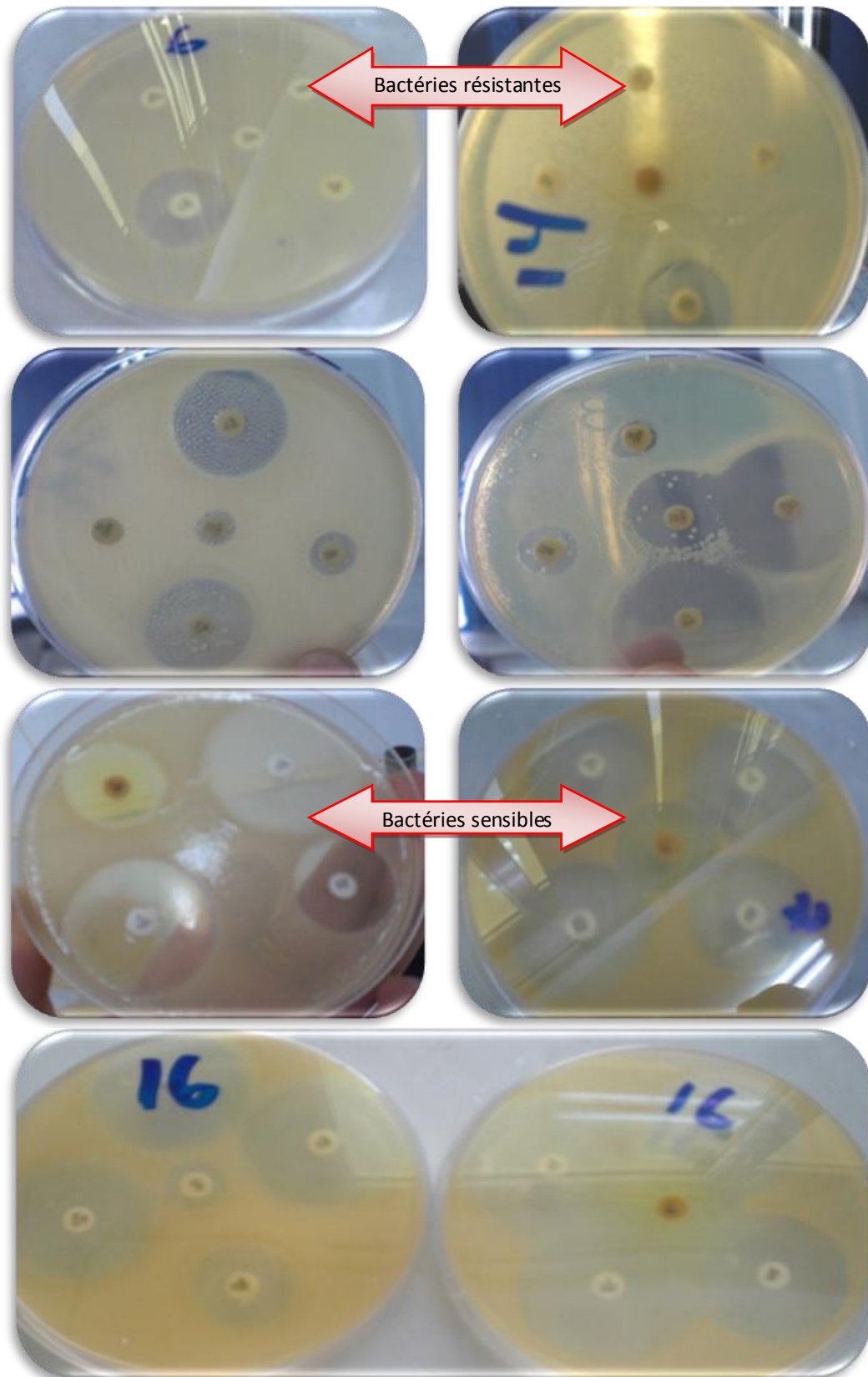
Les espèces isolées à partir du site d'étude appartiennent pour **31.11%** à l'espèce *Escherichia coli*. La diversité phylogénétique observée y est moins importante. On trouve également des espèces des genres *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Yersinia* et *Proteus*. (**Figure 09**)

La diversité phylogénétique peu importante observée est probablement liée à la dilution et à la présence de désinfectants, de détergents et d'antibiotiques en quantité importante, dans les effluents hospitaliers. Les espèces bactériennes identifiées sont généralement celles isolées chez les patients ayant effectué un séjour à l'hôpital.

### I.3. Antibiorésistance des Entérobactéries

La résistance aux antibiotiques a été testée pour chacune des bactéries identifiées vis-à-vis de 10 antibiotiques. Les résistances naturelles des souches isolées n'ont pas été prises en considération. (Annexe 05)

La photographie 06 montre les antibiogrammes obtenus, les valeurs des diamètres d'inhibitions sont comparées aux valeurs du tableau de lecture (Annexe 07).



**Photographie 06 :** Photographies des antibiogrammes des espèces identifiées.

Les valeurs obtenues nous ont permis de classer les bactéries en sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R) à chaque antibiotique,

**Tableau VII :** Classes de résistance obtenues vis-à-vis de chaque antibiotique après lecture de l'antibiogramme

Bactéries ATB	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
AML	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AMC	R	R	R	R	I	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
CZ	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	R	S	R	S
CTX	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S
IMP	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NA	S	R	I	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	R	S
CIP	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S
OFX	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S	S
CN	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
F	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	I	I	S	R

Bactéries ATB	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
AML	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AMC	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
CZ	R	S	S	R	S	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R
CTX	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R
IMP	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NA	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R
CIP	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
OFX	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
CN	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
F	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S	I

Bactéries ATB	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
AML	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
AMC	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
CZ	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S
CTX	S	S	R	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
IMP	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NA	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
CIP	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
OFX	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
CN	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
F	S	S	R	S	R	R	R	S	R	R	I	S	S	S	S

R : résistant

S : sensible

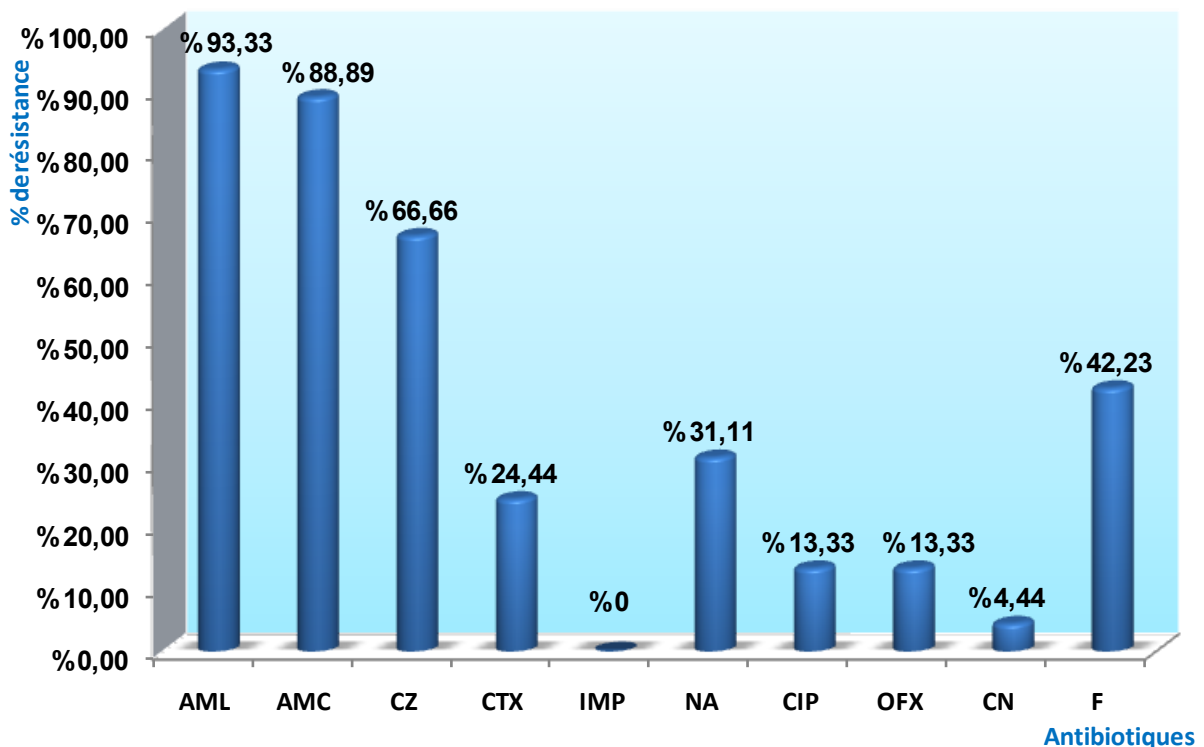
I : intermédiaire

Les taux de résistance pour chaque antibiotique sont calculés, les espèces Intermédiaires étant ensuite incluses dans la catégorie R. les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau VIII

**Tableau VIII :** Les taux de résistance aux antibiotiques.

Profil de résistance ATB	% de résistance des bactéries	% de sensibilité des bactéries	% d'intermédiaire des bactéries
AML	91,11	6,67	2,22
AMC	84,45	11,11	4,44
CZ	64,44	33,34	2.22
CTX	24,44	75,56	0
IMP	0	100	0
NA	28,89	68,89	2,22
CIP	13,33	86,67	0
OFX	11,11	86,67	2,22
CN	4,44	95,56	0
F	33,34	57,77	8.89

La figure 10 présente le pourcentage des souches résistantes (taux de résistance) à chacun des antibiotiques testés.



**Figure 10 :** pourcentage d'isolats des entérobactéries résistants à divers antibiotiques

On observe que les taux de résistance varient nettement d'un antibiotique à l'autre. L'amoxicilline (AML) est l'antibiotique qui présente le plus haut taux de résistance **93,33 %**. Cet antibiotique est utilisé aussi bien en médecine humaine que vétérinaire, et ce, sans limite d'usage (il appartient à la famille d'antibiotiques la plus prescrite en pratique ambulatoire) ce qui peut expliquer la présence de nombreuses souches résistantes à son égard.

Le taux de résistance à l'association amoxicilline/acide clavulanique (AMC) est plus bas que celui pour l'amoxicilline (**88,89 %**), ce qui est cohérent avec l'effet de l'acide clavulanique. C'est un inhibiteur de  $\beta$ -lactamases, il est utilisé en association avec les  $\beta$ -lactames telles l'amoxicilline pour contrer les résistances dus à la présence de  $\beta$ -lactamases. Notons également qu'à chaque fois que la souche est résistante à l'association amoxicilline/acide clavulanique, une résistance logique à l'ampicilline est observée.

Les céphalosporines étudiées possèdent différents taux de résistance. La céfazoline (CZ) présente le taux le plus élevé, à savoir **66,66 %**, la céfotaxime (CTX) a présenté un taux de résistance de l'ordre de **24,44 %**. Le taux élevé de résistance observé pour la céfazoline s'explique par le fait que cet antibiotique appartient aux céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération. Celles-ci sont moins résistantes aux  $\beta$ -lactamases que les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération dont font partie la céfotaxime.

Suite à l'utilisation récente et restreinte de l'imipenème en milieu hospitalier, le taux de résistance à cet antibiotique est nul.

Le taux de résistance obtenu pour l'antibiotique appartenant à la classe des aminosides, c'est-à-dire la gentamicine (CN), est relativement faible **4,44%**. L'explication possible de ce faible taux est son faible consommation, étant donné l'existence de molécules moins toxiques et plus efficaces.

Si l'on regarde les quinolones dans leur ensemble, on constate que les souches résistent de manière décroissante à l'acide nalidixique (NA) (**31,11 %**), à l'ofloxacin (OFX) (**13,33 %**) et la ciprofloxacine (CIP) (**13,33 %**).

L'acide nalidixique appartient à la famille des quinolones tandis que les autres molécules appartiennent à la famille des fluoroquinolones, famille plus récente et ayant un spectre d'action plus large. Il est donc normal de constater un taux de résistance plus élevé à l'acide nalidixique que pour les autres molécules.

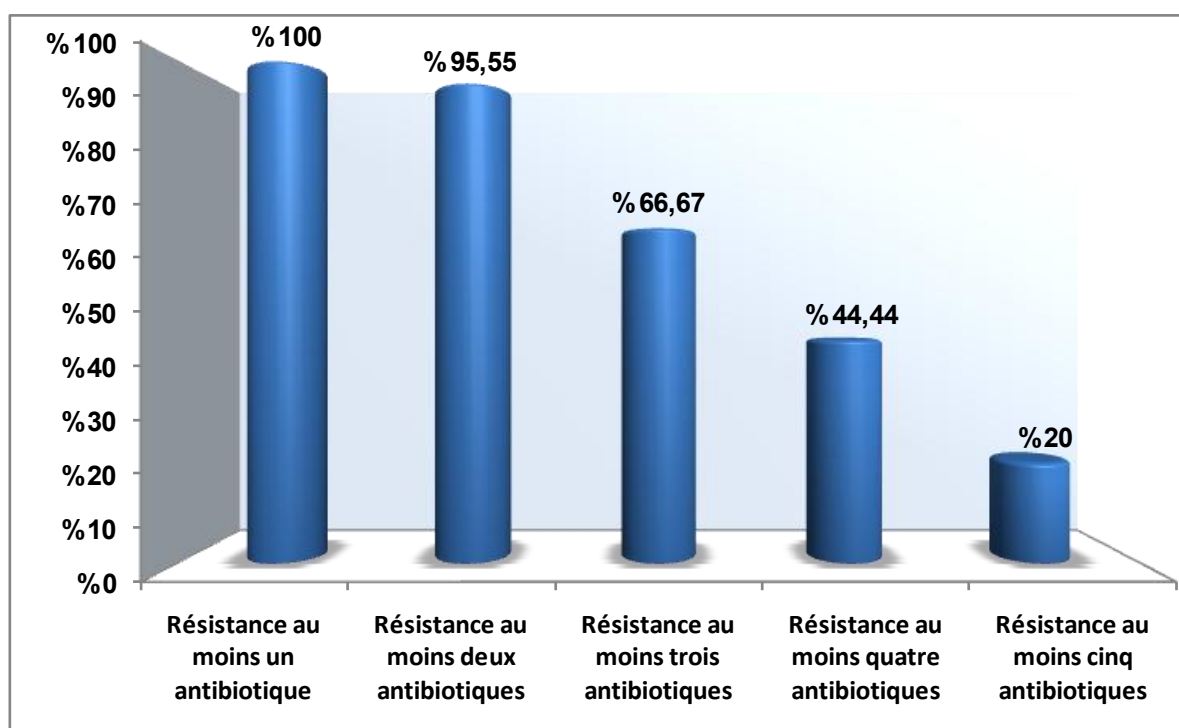
Comme la consommation des fluoroquinolones a considérablement augmenté ces dernières années, une augmentation de leur taux de résistance est donc à attendre dans les années à venir.

Les taux élevés de souches résistantes au niveau des rejets hospitaliers ne sont pas étonnants étant donné l'intense utilisation des antibiotiques au sein des hôpitaux.

#### **I.4. Multirésistance**

Notre travail a également permis d'étudier le phénomène de multirésistance. Une souche multirésistante est une souche qui présente une résistance à au moins deux antibiotiques. Les pourcentages de souches résistantes à au moins un antibiotique, à au moins deux antibiotiques, à au moins trois antibiotiques, à au moins quatre antibiotiques et à au moins cinq antibiotiques ont été calculés et rapportés dans la figure 11

La totalité des 45 espèces d'entérobactéries identifiées c'est-à-dire **100%** résistent à au moins un antibiotique, **95,55%** résistent à au moins deux antibiotiques, **66,67%** résistent à au moins trois antibiotiques, **44,44%** résistent à au moins quatre antibiotiques, et faible pourcentage **20%** de résistance à au moins cinq antibiotique, **Chitnis et al., (2004)** avaient également mis en évidence un taux plus important de souches multirésistantes au niveau des effluents hospitaliers.



**Figure 11 :** Pourcentage d'isolats des entérobactéries résistants à au moins 1, 2, 3, 4 et 5 antibiotiques

### I.5. Distribution des principaux phénotypes de résistance aux β-lactamines

Sept phénotypes de résistance aux β-lactamines, dont un non déterminé sont représentés dans notre étude. (Tableau IX). Celui des céphalosporinases bas niveau domine dans **37.78%** des cas, suivi de celui de pénicillinase résistante aux inhibiteurs des β lactamines avec un pourcentage de **15.56%**, qui reflète une évolution des β-lactamases, , **06.66%** des espèces identifiées ont une céphalosporinase haut niveau et **06.66%** des espèces ont une BLSE (β-lactamases à spectre étendu) capables d'inactiver des céphalosporines de troisième génération. Les pourcentages obtenus pour les pénicillinases bas et haut niveau sont identiques et sont de **04.44%**. **24%** des espèces ont des phénotypes non identifiés (Figure 12).

Tableau IX: Phénotypes et mécanismes de résistance des entérobactéries aux β-lactamines.

Antibiotiques marqueurs	Pénicillinase Bas niveau	Pénicillinase haut niveau	Pénicillinase résistante aux IβL	Céphalosporinase bas niveau	Céphalosporinase haut niveau	BLSE
Amoxicilline AMX	R	R	R	R	R	R
Amoxicilline + Ac.clavulanique AMC	S	I	R	R	R	R3
Céfazoline CZ (C1G)	S	R	S	R	R	R
Ceftazidime CTX (C3G)	S	S	S	S	R	R
Nombre	02	02	07	17	03	03
Pourcentage	04.44%	04.44%	15.56%	37.78%	06.66%	06.66%

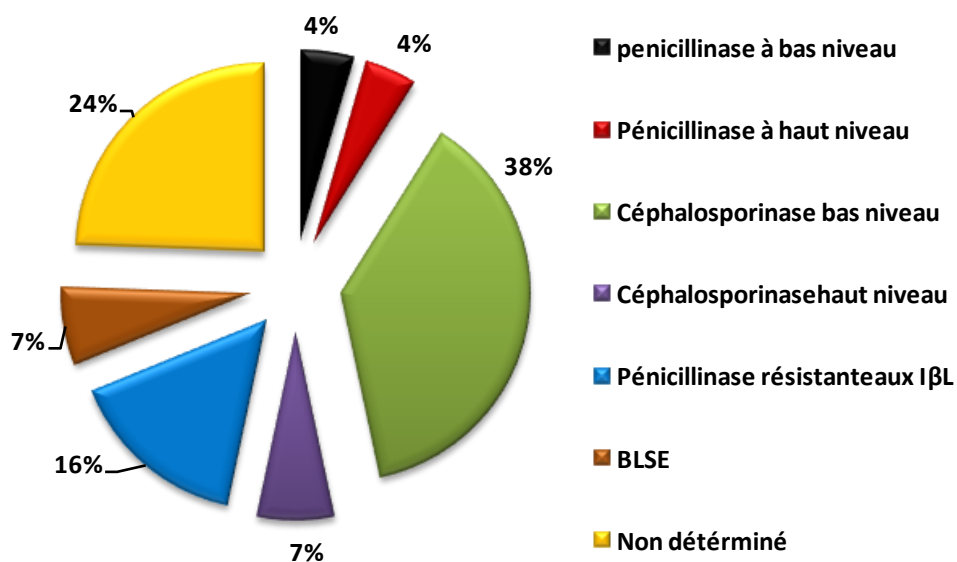


Figure 12 : Répartition des principaux phénotypes de résistance aux β-lactamines



# **Conclusion et perspectives**

## **Conclusion et perspectives**

Ce mémoire de thèse s'inscrit dans la problématique de l'évaluation du risque infectieux lié aux rejets des effluents d'un hôpital. Les résultats de l'étude bibliographique permettent d'avancer que les rejets des établissements de soins sont particuliers car ils cumulent une série de dangers chimiques et microbiologique et peuvent ainsi, contribuer à disséminer dans l'environnement des pathogènes multirésistants, et donc potentiellement plus dangereux, ainsi que les gènes de résistance qui sont associés. Les effluents hospitaliers ne sont pas la source majoritaire de bactéries antibiorésistantes, mais les bactéries qu'ils rejettent sont potentiellement plus problématiques car plus multirésistantes.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes fixés comme objectifs de travail d'étudier la présence des espèces appartenant aux entérobactéries dans les effluents de l'établissement hospitalier 120 lits de la wilaya de Khenchela, de déterminer leur abondance et finalement déterminer leur profil de résistance aux antibiotiques.

Notre étude montre la présence des entérobactéries en concentration élevée, les espèces identifiées sont très diversifiées. Les caractéristiques de résistance sont préoccupantes, pas de phénotype sauvage, beaucoup de résistance acquises et d'importantes multirésistances surtout aux bétalactamines.

Les résultats obtenus nous ont ainsi conduits à un certain nombre d'interrogations qui donnent lieu aux perspectives de cette étude.

La portée de ces résultats, qui corroborent en grande partie ceux d'autres études, doit toutefois être nuancée par la faiblesse de l'échantillonnage. Des prélèvements complémentaires, sur ce même site ou sur des sites de tailles et d'activités différentes, ainsi qu'une comparaison du profil de résistance des germes transitant dans des collecteurs d'hôpitaux avec ceux transitant dans des collecteurs communaux (avant et après mélange des effluents), compléteraient utilement cette approche.

C'est finalement au sein même de l'établissement hospitalier que le devenir des déchets liquides doit être pris en charge, en sensibilisant notamment le personnel sur l'impact de ses rejets et en organisant le tri et la collecte à la source des déchets présentant les risques les plus élevés.

Cependant, c'est certainement au niveau des rejets directs à l'évier que la majeure partie des problèmes peut être résolue. Une station d'épuration autonome propre à l'établissement hospitalier est donc justifiée au regard de la nature des effluents à traiter.



# **Références bibliographiques**

1. **Akmouci-Toumi, S. (2009).** Contribution à l'étude des boues de forages : Isolement et évaluation de la capacité de quelques souches microbiennes à dégrader le gasoil. Thèse de Magistère. Univ. M'Hamed Bougara, Boumerdes. 158p.
2. **Ambler R. P. (1980).** The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 289:321-31.
3. **American Hospital Association (AHA). (1986).** Hospital Statistics. Chicago: American Hospital Association, 250 p.
4. **Andremont A. (2002).** Pression de sélection antibiotiques, flores commensales et évolutions de la résistance. *J Pédiatr Puericulture* ; **15**(3) : 160-65.
5. **Bakhom I.M.N.S. (2004).** Contrôle de qualité et validation de différentes microméthodes d'identification bactérienne. *Thèse de doctorat.* Université Cheikh Anta Diop de Dakar. Mali. p 20
6. **Benamar L. (2012).** Elimination des phosphates par procédé biologique des eaux usées de la région de Khenchela. *Thèse de Magistère.* Université Abbès Laghrour Khenchela.78p.
7. **Bernet S et Fines M. (2000).** Effluents du CHU de CAEN : Etude qualitative et quantitative de la flore microbienne et recherche de bactéries multirésistantes. Poster. Caen : Quatrième journée du Réseau Régional d'Hygiène de Basse-Normandie, 1 p.
8. **Bio-Mérieux. (2009).** Catalogue Analytique API 20 E. Système d'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux (Réf. 20100/20160). biomérieux.p52.
9. **Boillot C. (2008).** Évaluation de l'écotoxicité de détergents/désinfectants - Modélisation mathématique prédictive - Évaluation du risque écotoxicologique. Mémoire de DEA - Mention Sciences et Techniques du Déchet. Villeurbanne: POLDEN, INSA de Lyon, 49p.
10. **Bonot S. (2010).** Persistance et dissémination du plasmide pB10, vecteur de gènes de résistance aux antibiotiques, dans des biomasses issues de stations d'épuration d'eaux usées urbaines. *Thèse doctorat.* Université Henri Poincaré. France. 225p.
11. **Bouteleux C. (2005).** Survie d'entérobactéries dans les eaux de distribution: rôle de la matière organique d'origine algale .*Thèse doctorat.* Université Henri-Poincaré - Nancy 1. France.
12. **Boyce JM., Opal SM., Chow JW., Zervos MJ., Potter-Bynoe G., Sherman CB., Romulo RL., Fortna S., Medeiros AA. (1994),** Outbreak of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* with transferable van B class vancomycin resistance. *J Clin Microbiol.* **32** (5):1148-53.
13. **Bush K., Jacoby GA., Medeiros AA. (1995).** A functional classification scheme for  $\beta$ s-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemoth;* **39**:1211-33.
14. **C. CLIN Paris-Nord. (1999).** Élimination des effluents liquides des établissements hospitaliers – Recommandations. Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales de l'Inter région Paris - Nord, Institut Biomédical des Cordelier : Ile de France, Picardie, Haute- Normandie, Nord Pas-de-Calais, Paris: 74p.
15. **C. CLIN Paris-Nord. (2000).** Antiseptiques et désinfectants. Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales de l'Interrégion Paris - Nord, Institut Biomédical des Cordelier : Ile de France, Picardie, Haute-Normandie, Nord Pas-de-Calais, Paris: 87p.
16. **Carle S. (2009).** La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important. Le parrainage des antimicrobiens : vision 2010. *Pharmactuel* Vol. **42** Supplément 2. 20p

17. **Casson L.W., Ritter M.O.D., Cossentino L.M., Gupta P. (1997).** Survival and recovery of seeded HIV in water and wastewater. *Water Environment Research*, Vol. 69, pp. 130-142.
18. **Cattoir V. (2008).** Les nouvelles beta-lactamases à spectre étendu (blse) Communications scientifiques *MAPAR (Mises Au Point en Anesthésie-Réanimation)*. 203.
19. **Cavallo D., Fabre R., Jehl F., Rapp C., Garrabé E. (2004).** Bêtalactamines. *EM Consulte. Maladies infectieuses* 1:129-202.
20. **Chareyron B. (2008).** Les effluents radioactifs directs et diffus générés par les activités médecine nucléaire et de Curiethérapie Colloque "Les effluents liquides des établissements de santé" CHAMBERY 26 novembre 2008. Laboratoire de la CRIIRAD
21. **Chitnis V., Chitnis S., Vaidya K., Ravikant S., Patil S., and Chitnis D.S. (2004).** Bacterial population changes in hospital effluent treatment plant in central India. *Water Research*. 38 : 441-447.
22. **Chorfi K. (2012).** Etude microbiologique des effluents hospitaliers de la wilaya de Khenchela (Cas de l'établissement hospitalier 120 lits). *Thèse de Magistère*. Université Abbès Laghrour Khenchela. 89p.
23. **Comité de l'antibiogramme - Société française de microbiologie, communiqué 2000-2001.** Adresse URL : <http://www.sfm.asso.fr>
24. **Coque TM., Baquero F., Canton R. (2008).** Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill.* 20; 13(47).
25. **Davison H. C., Low J. C., Woolhouse M. E. J. (2000).** What is antibiotic resistance and how can we measure it? *Trends in Microbiology*. 08 (12) ; 554-559.
26. **Delarras C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Tec & Toc, Lavoisier. 476p.
27. **Deloffre Bonnamour N. (1995).** Les rejets des établissements de santé : des effluents liquides aux déchets solides. Mémoire de maîtrise - Institut Universitaire Professionnalisé, Génie de l'Environnement - Ecodéveloppement - Université Claude Bernard - Lyon 1. Lyon: 75p.
28. **Denis F., Dabernat H., Monteil H., Avril J. L. (1998).** Bactériologie clinique. *Edition marketing*, Paris ; 144-145.
29. **Drasy C., Lescure I., Payot V., Rouland G. (2002).** Effluents des établissements hospitaliers : teneur en microorganismes pathogènes, risques sanitaires, procédures particulières d'épuration et de gestion des boues. Office International de l'Eau, Document de synthèse, 10p.
30. **Dulon M., Haamann F., Peters C., Schablon A., Nienhaus A. (2011).** MRSA prevalence in European healthcare settings: a review. *BMC Infect Dis.* 20; 11(1):138.
31. **Dunais B., Bruno-Bazureault P., Carsenti-Dellamonica H., Touboul P., Pradier C. (2011).** A decade-long surveillance of nasopharyngeal colonisation with *Streptococcus pneumoniae* among children attending day-care centres in south-eastern France: 1999-2008 *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 30(7):837-43.
32. **Edder P., Ortelli D., Ramseier S. (2006)** Métaux et micropolluants organiques – Campagne 2005. *Commission Internationale pour la Protection des Eaux du Léman contre la Pollution*, Rapport, p.65-87.
33. **Emmanuel E. (2004).** Évaluation des risques sanitaires et écotoxicologiques liés aux effluents hospitaliers. Thèse INSA de Lyon - Spécialité Sciences et Techniques du Déchet. Lyon: 259p.
34. **Faure S. (2009).** Transfert d'un gène de résistance aux β-lactamines bla CTX-M-9 entre *Salmonella* et les entérobactéries de la flore intestinale humaine : impact d'une antibiothérapie. *Thèse de Doctorat*. Université de Rennes. France. 190p.
35. **Frei CR., Makos BR., Daniels KR., Oramasionwu CU. (2010).** Emergence of community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue

infections as a common cause of hospitalization in United States children. *J Pediatr Surg.* **45** (10): 1967-74.

**36. Gautier V. (2007).** Caractérisation et expression des gènes codant pour les  $\beta$ -lactamases chromosomiques au sein des entérobactéries de l'environnement. *Thèse de fin d'étude.* Ecole Pratique Des Hautes Etudes Sciences Et Vie De La Terre. France.25p.

**37. Guo X., Xia R., Han N., et Xu H. (2011).** Genetic diversity analyses of class 1 integrons and their associated antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae* strains recovered from aquatic habitats in China. *Lett. App. Microbiol.* **52**, 667–675.

**38. Halassi, I. (2009).** Degré de contamination du Lac des Oiseaux et contribution à l'étude du pouvoir auto-épurateur de l'eau : Isolement et étude de *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Mémoire de Magistère.* Univ. 08 Mai 1945 de Guelma.148p.

**39. Hartemann P., Hautemaniere A et Joyeux M. (2005).** La problématique des effluents hospitaliers. *Hygiène*, Vol. 13, n° 5, pp. 369-374

**40. Hocquet D., Plésiat P., Dehecq B., Mariotte P., Talon D., Bertrand X. (2010)** ONERBA. Nation wide investigation of extended-spectrum beta-lactamases, metallo-betalactamases, and extended-spectrum oxacillinases produced by ceftazidime resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains in France. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**(8):3512-5.

**41. Jarlier V. (2004).** Bactéries multirésistantes dans les hôpitaux français : des premiers indicateurs au Réseau d'alerte d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (Raisin). *Bulletin épidémiologique hebdomadaire BEH* n°**32-33**. 08p.

**42. Jehannin P. (1999).** Caractérisation et gestion des rejets liquides hospitaliers – Etude particulière de la situation du Centre Hospitalier de Hyères (Var). Mémoire de fin d'études, Ecole Nationale de la Santé Publique, Rennes, 71 p.

**43. Laber J., Raimund H., Shrestha R. (1999).** Two-stage constructed wetland for treating hospital wastewater in Nepal. *Wat. Sci. Tech.* Vol. 40, pp. 317-324.

**44. Le minor L., Veron N. (1989).** Bactériologie Médicale. *Flam Med. Science*, Paris : 333-318 ; 773-823

**45. Leprat P. (1998).** Les rejets liquides hospitaliers, quels agents et quelles solutions techniques? Les Assise Nationales QUALIBIO 1998 « Santé et Environnement Hospitalier », Caen, p. 10-13.

**46. Levy S.B et Marshall B. (2004).** Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses, *Nature Medicine*, 10:122-219.

**47. Levy S.B. (1998).** Multidrug resistance: a sign of the times, *New England Journal of Medicine*, 338:1376-1378.

**48. Livermore D. M. (1995).** beta-lactamase in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* **8**: 557-584.

**49. Lue-Hing C., Zmuda J.T., Sedita S.J., Tata P. (1999).** Indigenous levels of HIV in wastewater : an empirical estimate and discussion. In. **WEF : HIV in wastewater, presence, survivability, and risk to wastewater treatment plant workers.** Water Environment Federation, Alexandria, Virginia, 80 p.

**50. Mandell GL., Bennett JE., Dolin R., Mandell. Douglas and Bennett's. (2009).** principes and practice of infectious diseases. Sixième édition, *Elsevier, Churchill Livingstone éditeurs, USA.* [Edition en ligne . http://www.ppidonline. Com](http://www.ppidonline.com)

**51. Mansotte F et Jestin E. (2000).** Les rejets liquides des établissements de santé : Caractérisation à la source et impact sur l'environnement marin côtier. Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales de la Seine Maritime, Agence de l'Eau de la Seine Normandie, Nanterre, 73 p.

**52. Mansotte F. (2000).** Les rejets des établissements de santé. DDAS Seine-Maritime - Synthèse réalisé et complété sur la base du travail de F. Lebrun - Chargé d'études Environnement - Centre hospitalier du havre - CLIN - Club Environnement: 68p.

53. **Martinez J.L. (2009).** The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria, *Proceedings of the Royal Society B*, 276:2521-2530.
54. **Marty L., Jarlier V. (1998).** Surveillance des bactéries multirésistantes : justification, rôle du laboratoire, indicateurs, données françaises récentes. *Path. Biol.* 46:217-26.
55. **Mcjunkin F.E. (1982).** Water and human health. U.S. Agency for International Development, Washington D.C. 147 p.
56. **Metcalf et Eddy. (1991).** Wastewater Engineering. 3<sup>ème</sup> ed New York, McGraw-Hill, 1334 p.
57. **Meziani M. (2012).** Contribution du diagnostic biochimique bactérien dans l'établissement des parentés phylogénétiques : Cas des Entérobactéries et *Pseudomonas*. *Mémoire de Magistère*. Université Mentouri Constantine.39-45p
58. **Mirabaud M-I. (2003).** Entérobactéries à beta-lactamases a spectre élargi en pédiatrie. *Thèse de Doctorat*. Faculté de Médecine. Université de Genève. 52p
59. **Monfort P. (2003).** Microbiologie et coquillages. Ifremer, Document de synthèse, 18p
60. **Moreda R. (2004).** Genres de la famille Enterobacteriaceae. Lycée Docteur Lacroix - Narbonne
61. **Murray P.R., Baron E.J., Tenover F.C. and White T.A. (1999).** *Enterobacteriaceae* : Introduction and identification.7<sup>th</sup> ed. American Society for Microbiology, Washington DC : 442-458.
62. **Oppliger A. (2009).** Antibiotiques et bactéries antibiorésistantes dans les effluents d'hôpitaux. État des lieux en Europe (revue de la littérature). Colloque : Les effluents Liquides des établissements de santé : état des Lieux et perspectives de gestion 26-27 novembre 2008 – Chambéry. Techniques Hospitalières 714 •.
63. **Passerat J., Tamtam F., LE Bot B., Eurin J., Chevreuil M., Servais P. (2010).** Rejets hospitaliers d'antibiotiques et de bactéries fécales antibiorésistantes dans les rivières du bassin de la Seine. *Eur. j. water qual.* Disponible en ligne sur : [www.water-quality-journal.org](http://www.water-quality-journal.org)
64. **Peyrou M. (2001).** Antibioresistance des souches bactériennes d'origine équine : Etude bibliographique et exemple de l'Hôpital Vétérinaire de Saint Hyacinthe. *Thèse de fin d'étude*. Université de Montréal. 88p
65. **Pitout JD., Hanson ND., Church DL., Laupland KB. (2004).** Population-based laboratory surveillance for *Escherichia coli*-producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: importance of community isolates with blaCTX-M Genes. *Clin Infect Dis*; 38:1736-41.
66. **Prescott L., Harley J et Klein DA. (2003).** Microbiologie. 2<sup>ème</sup> édition De Boeck, 1164 p
67. **Rejsek F. (2002).** Analyse des eaux. Aspects réglementaires et techniques. SCEREN – CRDP Aquitaine. Biologie technique - environnement. Bordeaux. 360p.
68. **Rodier J. (2009).** L'analyse de l'eau. 9<sup>ème</sup> édition DUNOD, Paris, 1526 p.
69. **Rolinson GN. (1998).** Forty years of beta-lactam research. *J Antimicrob Chemother.* 41(6):589-603.
70. **Salmond G.P et Welch M. (2008).** Antibiotic resistance: adaptive evolution, *Lancet*, 372:97-103.
71. **Schollosser O. (1999).** Docteur en médecine, VIVENDI, Exposition aux eaux usées et risques microbiologiques.
72. **Schwartz T., Kohnen W., Jansen B., Obst U. (2003).** Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*, 1470, pp. 1-11.
73. **Soussy C.J. (2010).** Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. *Société française de microbiologie*, 49p.
74. **Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS. (2008).** 5<sup>ème</sup> édition.

- 75. Stapleton P., Wu P.-J., King A., Shannon K., French G., and Phillips I. (1995).** Incidence and mechanisms of resistance to the combination of amoxicillin and clavulanic acid in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:2478-2483.
- 76. Tarbouriech A.L. (2004).** Etude de l'épidémiologie des bactéries résistantes, des facteurs de risque d'antibiorésistance et de la prescription d'une antibiothérapie probabiliste. *Thèse de Doctorat*. Université De Montpellier. France. 95 p.
- 77. Tremblay C.L. (2012).** Étude de la résistance aux antibiotiques des entérocoques d'origine animale du Québec. *Thèse de philosophiae doctor (Ph.D.)*. Faculté de médecine vétérinaire. Université de Montréal. 326p.
- 78. Vander Stichele R. H., Elseviers M. M, et al., (2006).** "Hospital consumption of antibiotics in 15 European countries: results of the ESAC Retrospective Data Collection (1997-2002)." *J Antimicrob Chemother* 58(1): 159-67.
- 79. Verhoef J., Jansen W.T.M., Van der Bruggen J.T., Fluit A.C. (2004).** A general introduction to the field of antimicrobials and antimicrobial resistance : the past and the present in *Resistance : a sensitive issue*, The European roadmap to combat antimicrobial resistance, 21-29, 206p.
- 80. Walsh C. (2003).** "Antibiotics: actions, origins, resistance." *American Society for Microbiology, Washington, D.C.*



***Annexes***

Annexe 01. Tableau d'identification % de réactions positives après 24 h d'incubation à 37°C

API 20 E	V41	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	N2	MOB
	<i>Subdoligranulum</i>	100	0	0	86	25	0	0	0	0	0	0	100	100	0	1	99	0	92	99	100	0	100	0
	<i>Clostridium</i>	99	99	0	99	76	0	0	0	0	89	0	100	100	10	0	0	100	0	100	1	0	99	0
	<i>Clostridium</i>	99	99	0	76	0	0	0	0	0	90	0	100	99	0	0	0	100	0	100	0	0	99	0
	<i>Clostridium</i>	50	45	0	99	76	81	1	0	4	0	0	100	100	1	100	100	1	91	99	99	0	100	0
	<i>Clostridium</i>	90	24	0	0	76	76	1	0	1	0	0	100	99	25	99	99	90	82	40	99	0	98	0
	<i>Clostridium</i>	99	76	0	100	97	0	1	0	99	0	0	100	100	25	99	99	1	1	98	99	0	100	0
	<i>Clostridium</i>	99	2	0	100	25	0	1	0	99	0	0	100	100	1	99	99	90	90	99	99	0	100	0
	<i>Clostridium</i>	100	50	0	1	80	80	0	0	1	0	0	100	100	0	95	100	1	0	25	100	0	86	0
	<i>Edwardsiella</i>	0	0	100	99	50	94	0	0	99	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0	1	0	100	0
	<i>Edwardsiella</i>	0	0	100	99	1	76	0	0	99	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0
	<i>Eubacterium</i>	99	0	99	98	82	0	1	0	0	86	0	99	99	99	99	99	99	99	99	99	0	100	0
	<i>Eubacterium</i>	99	25	0	99	40	0	0	0	0	76	0	100	100	0	1	100	90	99	99	99	0	100	0
	<i>Eubacterium</i>	99	80	0	99	80	0	0	0	0	76	0	100	100	0	99	100	1	99	99	99	0	100	0
	<i>Eubacterium</i>	100	25	0	99	80	0	0	0	0	10	0	100	99	25	100	0	90	0	100	100	0	100	0
	<i>Eubacterium</i>	100	76	0	99	99	0	0	0	0	89	0	100	100	0	1	100	1	1	100	100	0	100	0
	<i>Eubacterium</i>	98	82	1	92	90	0	1	0	0	86	0	99	99	12	90	86	96	90	99	99	0	100	0
	<i>Eubacterium</i>	99	0	32	100	76	0	0	0	0	90	0	100	99	23	1	100	90	100	99	100	0	100	0
	<i>Eubacterium</i>	99	0	0	99	1	0	0	0	2	0	0	100	97	0	88	99	40	100	99	99	0	100	0
	<i>Eubacterium</i>	100	98	0	91	94	0	1	0	25	91	10	100	100	75	8	99	99	99	99	99	0	100	0
	<i>Eubacterium</i>	90	1	74	70	0	1	3	0	89	0	0	99	98	1	91	82	36	78	3	99	0	100	0
	<i>Eubacterium</i>	26	1	45	20	0	1	1	0	50	0	0	99	90	1	42	30	3	3	1	70	0	98	0
	<i>Eubacterium</i>	96	1	99	100	1	0	0	0	99	0	0	100	99	1	0	87	0	1	99	99	0	100	0
	<i>Eubacterium</i>	100	0	1	100	1	0	0	0	99	0	0	100	100	0	0	99	25	0	99	99	0	100	0
	<i>Eubacterium</i>	100	30	50	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	1	95	7	95	95	99	0	100	0
	<i>Escherichia</i>	98	0	0	76	0	0	0	0	0	96	1	99	99	0	0	1	0	1	50	1	0	100	0
	<i>Escherichia</i>	75	0	99	98	50	0	10	0	0	50	0	99	99	0	1	99	0	0	25	99	0	100	0
	<i>Escherichia</i>	50	0	99	99	1	0	1	0	10	0	0	99	98	0	1	1	1	0	0	1	0	100	0
	<i>Escherichia</i>	99	0	80	0	89	0	76	0	99	80	0	100	100	99	100	99	99	100	100	100	0	100	0
	<i>Escherichia</i>	94	18	25	1	18	0	1	0	0	1	0	99	98	57	66	58	20	80	97	85	0	92	0
	<i>Escherichia</i>	99	0	73	0	86	0	76	0	0	90	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	0	100	0
	<i>Escherichia</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	100	90	90	76	76	1	99	10	0	100	0
	<i>Escherichia</i>	96	0	25	99	60	0	0	0	80	0	0	100	99	0	25	93	89	99	99	99	0	96	0
	<i>Escherichia</i>	99	0	0	0	0	0	1	0	99	0	1	100	99	0	2	100	66	99	99	100	0	100	0
	<i>Escherichia</i>	97	0	0	0	40	0	0	0	15	1	0	100	1	0	0	0	100	99	0	0	0	90	0
	<i>Escherichia</i>	1	0	10	98	1	1	99	93	99	0	0	99	0	0	0	0	1	0	0	0	0	88	0
	<i>Escherichia</i>	86	1	0	0	13	0	1	0	1	9	1	100	99	1	26	1	98	26	59	61	0	86	0
	<i>Escherichia</i>	99	1	0	0	99	0	1	0	53	62	4	100	99	36	82	90	98	81	99	99	0	86	0
	<i>Escherichia</i>	99	1	0	0	21	0	1	0	1	86	15	100	99	34	1	97	93	23	65	97	0	86	0
	<i>Escherichia</i>	86	1	0	0	29	0	1	0	59	1	1	99	100	10	32	99	72	89	99	99	0	86	0
	<i>Escherichia</i>	1	0	0	99	50	76	99	98	1	1	82	98	0	0	0	0	1	0	0	0	0	93	0
	<i>Escherichia</i>	1	0	0	0	1	20	100	99	0	0	50	99	0	0	0	0	100	0	1	0	0	99	0
	<i>Escherichia</i>	1	0	0	0	12	83	99	99	92	0	74	99	1	1	0	1	80	0	66	1	0	100	0
	<i>Escherichia</i>	1	0	0	0	80	0	0	100	99	0	0	99	1	1	0	0	1	0	0	1	0	100	0
	<i>Escherichia</i>	1	1	0	0	74	0	99	99	90	0	0	98	82	78	1	50	25	0	40	1	0	98	0
	<i>Escherichia</i>	1	0	0	0	85	0	30	98	96	0	0	98	3	80	0	0	15	0	0	0	0	100	0
	<i>Escherichia</i>	100	0	0	0	60	0	0	1	99	0	0	100	100	0	98	99	100	97	100	98	0	100	0
	<i>Escherichia</i>	100	0	99	99	99	0	85	0	100	65	0	100	100	99	100	100	100	100	100	100	0	100	0
	<i>Escherichia</i>	100	0	99	6	52	0	0	0	76	0	0	99	99	99	99	99	100	100	100	99	0	100	0
	<i>Escherichia</i>	98	75	97	98	75	99	0	0	1	0	0	100	99	0	99	99	1	78	0	99	0	100	0
	<i>Escherichia</i>	0	15	99	99	6	64	0	0	0	0	0	100	99	0	98	99	0	20	0	0	0	100	0
	<i>Escherichia</i>	0	1	100	1	0	25	0	0	0	0	0	100	100	0	0	1	0	0	0	100	0	100	0

API 20 E	V.4.1	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	N2	MOB	
	<i>Salmonella</i> ser. <i>Paratyphi</i> A	0	5	0	99	0	1	0	0	0	0	0	100	99	0	99	96	0	96	0	99	0	100	0	96
	<i>Salmonella</i> ser. <i>Pullorum</i>	0	1	76	100	0	85	0	0	0	0	0	100	100	0	0	100	0	0	0	75	0	100	0	0
	<i>Salmonella</i> spp	0	1	99	0	0	0	0	0	0	0	0	100	99	0	99	0	0	99	0	0	0	100	0	97
	<i>Salmonella</i> spp	1	56	82	93	65	83	0	0	1	0	1	99	100	40	99	86	1	90	1	99	1	100	0	96
	<i>Serratia florentiae</i>	99	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100	100	50	99	74	99	99	100	99	0	92	0	100
	<i>Serratia fonticola</i>	99	0	73	99	76	0	0	0	0	0	0	100	100	97	100	99	30	99	99	99	0	99	0	91
	<i>Serratia liquefaciens</i>	96	1	78	98	80	0	2	0	0	59	65	100	99	80	98	2	99	72	97	97	0	100	0	96
	<i>Serratia marcescens</i>	94	0	96	96	96	0	25	0	1	70	87	100	99	85	98	1	99	68	97	25	0	96	0	97
	<i>Serratia odantifera</i> 1	96	0	96	99	96	0	0	0	99	50	99	100	99	99	99	99	99	99	99	99	0	99	0	100
	<i>Serratia odantifera</i> 2	96	0	96	1	96	0	0	0	99	50	99	100	99	99	99	99	1	99	99	99	0	99	0	100
	<i>Serratia plymuthica</i>	99	0	0	0	65	0	0	0	0	65	50	100	90	70	70	1	99	88	98	98	0	99	0	50
	<i>Serratia rubikane</i>	99	0	30	0	92	0	1	0	0	71	82	99	99	76	1	3	99	96	99	99	0	100	0	86
	<i>Shigella</i> spp	1	0	0	1	0	0	0	0	29	0	0	99	63	0	7	7	1	20	0	50	0	100	0	0
	<i>Shigella sonnei</i>	96	0	0	93	0	0	0	0	0	0	0	99	99	0	1	76	1	1	0	99	0	100	0	0
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	80	0	0	90	0	0	98	0	50	5	0	99	99	25	96	1	99	4	76	75	0	98	0	2
	<i>Yersinia frederictonii</i> / <i>Yersinia media</i>	99	0	0	76	1	0	99	0	99	1	0	100	99	25	99	99	99	1	99	99	0	98	0	5
	<i>Yersinia kristensenii</i>	80	0	0	80	0	0	99	0	97	0	0	100	99	10	99	0	0	0	99	99	0	98	0	5
	<i>Yersinia pestis</i>	68	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	99	99	0	70	0	0	0	30	30	0	47	0	0
	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	98	0	0	0	1	0	99	0	0	0	0	99	97	0	0	76	0	0	30	50	0	96	0	0
	<i>Aeromonas hydrophila</i> gr. 1	98	90	25	1	25	0	0	0	85	25	90	99	99	1	3	5	97	1	76	75	100	97	0	96
	<i>Aeromonas hydrophila</i> gr. 2	99	97	80	1	80	0	0	0	86	80	97	97	99	9	9	1	80	1	76	5	100	97	0	96
	<i>Aeromonas salmonicida</i> spp. <i>salmonicida</i>	1	60	1	0	0	0	0	0	1	0	76	50	54	0	0	0	0	0	1	0	100	0	1	
	<i>Gramella tolucae</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	94	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
	<i>Photobacterium damsela</i>	1	99	75	0	1	0	98	0	0	10	1	50	0	0	0	0	1	0	0	0	100	0	0	
	<i>Photobacterium shufeldtii</i>	96	99	100	100	0	0	0	0	100	0	0	99	0	99	0	0	0	0	0	0	100	0	25	
	<i>Vibrio alginolyticus</i>	0	0	98	76	60	0	1	0	100	10	76	99	100	0	1	0	100	0	10	1	100	0	100	
	<i>Vibrio cholerae</i>	98	1	94	97	76	0	0	0	99	58	92	98	98	0	0	0	94	0	5	0	100	0	100	
	<i>Vibrio fluvialis</i>	96	99	0	0	1	0	0	0	99	80	76	76	80	0	1	0	76	0	36	75	100	0	100	
	<i>Vibrio mimicus</i>	99	0	99	99	50	0	0	0	99	1	99	99	99	0	0	0	0	0	0	0	100	0	100	
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0	0	100	99	50	0	1	0	100	1	76	100	99	0	0	0	1	0	12	50	100	0	100	
	<i>Vibrio vulnificus</i>	99	0	91	90	25	0	0	0	99	1	99	99	75	0	0	0	1	0	90	0	99	0	100	
	<i>Vibrio vulnificus</i> 1	4	0	0	25	0	0	0	0	99	0	0	29	1	0	1	0	0	0	0	76	76	100	0	0
	<i>Vibrio vulnificus</i> 2	7	0	0	45	0	0	0	0	99	0	0	44	99	0	99	0	0	0	0	0	99	0	0	
	<i>Pasteurella pneumolytica</i> / <i>Mannheimia haemolytica</i>	0	0	0	10	0	0	25	0	15	7	3	36	12	12	12	1	36	1	2	1	80	0	0	
	<i>Aerobacter baumannii</i> / <i>Aerobacter</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	5	5	99	0	0	0	0	0	0	99	1	99	0	0	
	<i>Bordetella avium</i> / <i>Bordetella pertussis</i>	0	0	0	0	0	0	14	1	0	25	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	96	0	0	
	<i>Bordetella pertussis</i>	50	0	25	16	78	0	0	0	0	1	43	60	1	0	0	0	13	0	7	20	90	62	1	76
	<i>Chromobacterium violaceum</i>	0	99	0	0	76	0	0	0	14	0	99	99	0	0	0	0	10	0	0	0	99	76	0	99
	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	5	0	0	0	12	0	90	0	75	0	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	20	0	0
	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	77	0	0	0	20	0	1	0	85	0	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	6	0	0
	<i>Enterobacteriaceae</i>	0	0	76	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	96	0	1
	<i>Myxobolus</i> / <i>Chryseobacterium indologenes</i>	0	0	0	0	50	0	76	0	0	1	76	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0
	<i>Citrobacterium freundii</i>	15	0	0	0	30	0	25	1	0	15	0	1	0	0	0	0	0	0	0	10	90	42	60	99
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	89	0	0	92	0	25	0	0	1	76	50	0	0	0	0	1	10	1	25	97	12	56	97
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> / <i>Pseudomonas</i>	0	76	0	0	76	0	0	0	0	10	27	25	0	0	0	0	0	20	1	20	99	26	0	100
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	86	76	0	0	94	0	0	0	0	25	13	84	0	1	0	1	1	15	1	85	0	30	0	100
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0	0	0	0	89	0	0	0	25	1	10	0	0	1	0	0	1	1	1	1	83	7	0	100
	<i>Non fermenter</i> spp	1	1	0	0	37	0	1	0	0	15	9	9	0	0	0	0	1	1	1	1	99	46	35	99
	<i>Shewanella putrefaciens</i> group	0	0	0	0	80	76	76	1	0	0	76	1	0	0	0	0	0	0	0	0	99	96	0	100
	<i>Streptopneumoniae</i> <i>melitensis</i>	70	0	76	1	76	1	0	0	0	0	90	1	0	0	0	0	0	0	0	0	99	26	1	100

**Annexe 02. Composition des colorants de gram****Cristal violet ou violet de gentiane (pour coloration de Gram)**• **Solution mère A**

Cristal Violet ou Violet de Gentiane..... 25 g  
 Ethanol à 96 %..... 250 ml

La solution est vigoureusement agitée à trois reprises dans la même journée. On laisse déposer. La Solution est prête à l'emploi dès le lendemain.

**Conservation :** Quelques années en flacon brun Hermétiquement bouché.

• **Solution mère B**

Oxalate d'Ammonium (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O.....5 g  
 Eau Distillée..... 500 ml

**Conservation :** 2 à 3 mois dans un flacon hermétiquement bouché.

**Fuchsine**• **Fuchsine mère saturée**

Fuchsine Basique..... 25 g  
 Ethanol à 96 %..... 250 ml

**Conservation :** Quelques années dans un flacon brun hermétiquement bouché.

• **Solution mère aqueuse de Phénol à 5 % (v/v) :**

Phénol Cristallisé fondu .....50 ml  
 Eau distillée..... 950 ml

**conservation :** Quelques mois dans un flacon hermétiquement bouché.

**Fuchsine (solution de travail)**

Solution saturée de Fuchsine Basique, filtrée..... 100 ml  
 Solution aqueuse de Phénol à 5 %..... 900 ml

**Conservation :** Au moins 2 ans.

**Fuchsine diluée (pour coloration de Gram)**

Fuchsine Phéniquée ..... 01 ml  
 Eau Distillée..... 09 ml

**Conservation :** 1 mois tout au plus, et Faire la dilution avant chaque coloration.

**Lugol faible (pour coloration de Gram)**

Iodure de Potassium (KI)..... 2,34 g  
 Iode en Cristaux ou Iode Sublimée..... 1,66 g  
 Eau Distillée.....500 ml

**Conservation :** non filtré : 3 mois. Le Lugol doit avoir une coloration brun rouge. S'il est jaune, il ne fonctionnera plus et doit être jeté.

**Annexe 03. Composition des milieux de culture****Gélose Hektoen**

La gélose Hektoen est un milieu sélectif différentiel des bactéries entéro-pathogènes, particulièrement de *Salmonella* et de *Shigella*. La composition du milieu permet la différenciation des colonies fermentant rapidement un des 3 sucres (virage du bleu au rouge-saumon) et/ou produisant de l'H<sub>2</sub>S (centre noir).

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Peptone .....	12,00	Chlorure de sodium.....	5,00
Extrait de levure.....	3,00	Thiosulfate de sodium.....	5,00
Sels biliaires N° 3.....	9,00	Citrate ferrique ammoniacal.....	1,50
Lactose.....	12,00	Bleu de bromothymol.....	0,065
Saccharose.....	12,00	Fuchsine acide.....	0,10
Salicine.....	2,00	Agar.....	14,00

Ph final à 25°C : 7,5 ± 0,2

Le milieu en flacons ou boîtes se conserve à l'obscurité entre 2 et 8°C jusqu'à la date d'expiration

**Gélose Mueller Hinton**

La gélose Mueller-Hinton est le milieu de référence pour les tests de sensibilité des germes aux antibiotiques. Sa formulation est conforme aux recommandations du de l'O.M.S.

Elle peut également être additionnée de sang pour réaliser l'antibiogramme des germes fragiles, tels que *Haemophilus influenzae*, *Neisseria*, *Enterococcus sp* et *Streptococcus pneumoniae*.

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Infusion de bœuf.....	300,00	Ph final à 25°C : 7,3 ± 0,2
Peptone de caséine.....	17,50	Le milieu en flacons ou boîtes se conserve
Amidon.....	1,50	entre 2 et 8°C
Agar.....	17,00	

**Gélose TSI (Triple Sugar Iron.)**

La gélose TSI est utilisée pour l'identification présomptive des entérobactéries basée sur la fermentation du glucose, du lactose, du saccharose et sur la production de gaz et d'H<sub>2</sub>S.

Son utilisation est recommandée pour la recherche de *Salmonella* dans les produits pharmaceutiques, et pour la recherche de *Salmonella* et *Campylobacter* dans les aliments.

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Peptone.....	20,00	Chlorure de sodium.....	5,00
Extrait de bœuf.....	3,00	Citrate ferrique ammoniacal.....	0,30
Extrait de levure.....	3,00	Thiosulfate de sodium.....	0,30
Saccharose.....	10,00	Rouge de phénol.....	0,025
Lactose.....	10,00	Agar.....	12,00
Glucose monohydrate.....	1,00		

Ph final à 25°C : 7,4 ± 0,2

Le milieu en tubes se conserve entre 2 et 8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage.

**Milieu de Clark et Lubs**

Le milieu de Clark et Lubs permet de différencier les *Entérobactériacées* avec les réactions au rouge de Méthyle et de Voges-Proskauer. Le rouge de méthyle différencie le processus de fermentation, il est jaune Au-dessus d'un pH de 6,3 et rouge en dessous de 4,2. La production d'acétylméthylcarbinol se révèle par L'apparition d'une coloration rouge en surface du milieu.

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Peptone.....	7,00	Ph final à 25°C : 7,0 ± 0,2
Glucose.....	5,00	Le milieu en tubes se conserve à
Phosphate dipotassique.....	5,00	l'obscurité entre 15 et 25°C jusqu'à la date
		d'expiration.

**Citrate de Simmons**

La gélose au Citrate de Simmons est utilisée pour l'identification présomptive des entérobactéries basée sur L'utilisation du citrate

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Sulfate de magnésium.....	0,20	Ph final à 25°C : 6,8 ± 0,2
Citrate de sodium.....	2,00	Le milieu déshydraté se
Ammonium dihydrogénophosphate.....	1,00	conserve entre 2 et 30°C
Bleu de bromothymol.....	0,08	jusqu'à la date d'expiration
Phosphate dipotassique.....	0,08	indiquée sur l'emballage.
Chlorure de sodium.....	5,00	
Agar.....	15	

**Bouillon Nitraté**

Milieu nutritif liquide pour la mise en évidence de la réaction des nitrates. Chez les bactéries, au moyen de réactifs appropriés.

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisé

Peptone de viande.....	10	
Extrait de viande.....	5	Ph final 7,2
Chlorure de sodium.....	5	
Nitrate de potassium.....	1	

**Mannitol mobilité**

Milieu de différenciation rapide des *Entérobactériacées*. Il permet de rechercher simultanément la mobilité, l'utilisation du mannitol.

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Peptone de viande.....	15	Ph final 7,8
Extrait de viande.....	3	
Mannitol.....	10	
Potassium nitrate.....	1	
Rouge de phénol.....	0,05	
Agar.....	5	

**Milieu de Moeller**

Milieu auquel on additionne la lysine, l'arginine, l'ornithine, et autre acides aminés. Il est utilisé pour la différenciation des microorganismes selon leur aptitude à effectuer la réaction de décarboxylation des amino-acides.

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Extrait de levure.....	3	L'acide amine à rajouter peut être soit la
Glucose.....	1	l-lysine, l-arginine, l-ornithine, un milieu
Acide amine.....	10	témoin est préparé sans l'addition
Pourpre de bromocrésol.....	2 ml	d'acides aminés.
Pyridoxal.....	0,5ml	Ph final 6,8+/-0,1

**Urée- indole**

Permet de rechercher l'uréase, la production d'indole et le tryptophane désaminase (TDA) indiqué pour l'identification des *salmonella*, *shigella* et *yersinia Entérolitica* dans les selles.

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

L-tryptophane.....	03	
Phosphate dipotassique.....	01	Ph final 6,7
Phosphate monopotassique.....	01	
Chlorure de sodium.....	05	
Urée.....	20	
Rouge de phénol.....	02 ,5	

**Gélose nutritive**

La Gélose Nutritive est un milieu largement utilisé pour la culture des microorganismes peu exigeants. Elle est recommandée dans de nombreuses méthodes standardisées d'analyses des aliments, des laitages, de l'eau et d'autres produits.

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Peptone.....	5,00	Ph final à 25°C : 6,8 +/-0,2
Extrait de viande de bœuf.....	3,00	
Agar.....	15,00	

Le milieu en flacons et tubes se conserve entre 15 et 25°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage. Le milieu en boîtes se conserve entre 2 et 8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage.

## Annexe 04. Composition des additifs

### Kovacs

Le réactif de Kovacs est utilisé pour la mise en évidence de la production d'indole par les micro-organismes possédant une tryptophanase. Le tryptophane, acide aminé notamment présent dans les peptones tryptiques, est dégradé en indole qui réagit avec le P-Diméthylamino-benzaldéhyde du réactif. Une réaction positive, de la présence d'indole, est révélée par la coloration au rouge du réactif de Kovacs.

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée

P-Diméthylaminobenzaldéhyde.....	5,00 g	Conserver en flacon
Alcool amylique.....	75,00 ml	ambré entre 2 et
Acide chlorhydrique pur.....	25,00 ml	8°C

### Réactif de Greiss-Ilosvay

Solution réactionnelle pour la mise en évidence des nitrites formés par les bactéries, pour l'identification des micro-organismes réduisant les nitrates.

**Nitrate réductase 1** : -Acide sulfanilique, - Acide acétique

**Nitrate réductase 2** : - $\alpha$ -naphthylamine,- Acide acétique

### Réactif de Voges – Proskauer 1 et 2

Solution réactionnelle pour la mise en évidence de la présence d'acétyl –méthyle carbinol (acétoïne dans) le milieu. Ce composé est un produit de dégradation de l'acide pyruvique par les bactéries qui empruntent la voie de fermentation butanediolique caractéristique de certaines Entérobactéries.

**VP1** : Soude caustique (NaOH)

**VP2** : Alpha naphthol

### Réactif TDA

Solution réactionnelle pour la mise en évidence de la présence, dans le milieu, de l'acide indol-pyruvique formés par les bactéries possédant la tryptophane désaminase.

**Composition** Chlorure de fer.....80 g/l

### Rouge de méthyle

Solution réactionnelle pour la mise en évidence de l'acidification finale du milieu glucosé après fermentation du glucose en acides mixtes, caractéristiques de certaines Entérobactéries.

**Composition** : Rouge de méthyle Alcool 95 °C

**Annexe 05.** Résistances naturelles aux  $\beta$  lactamines des espèces de bacilles non exigeants (Cavallo *et al.*, 2004).

Espèces	PEN	OXA	AM	AMC	TIC	TCC	PIP	C1G	FOX	CTT	MA	CXM	CTX	CAZ	IPM
<b>Entérobactéries</b>															
<i>Escherichia coli</i>	R	R													
<i>Proteus mirabilis</i>	R	R													
<i>Shigella spp.</i>	R	R													
<i>Salmonella spp.</i>	R	R													
<i>Klebsiella spp.</i>	R	R	R		R										
<i>Citrobacter koseri</i>	R	R	R		R										
<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	R	R				R	R	R					
<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	R	R	R				R	R	R					
<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	R				R	R	R					
<i>Serratia marcescens</i>	R	R	R	R				R			R	R			
<i>Proteus vulgaris</i>	R	R	R					R				R			
<i>Morganella morganii</i>	R	R	R	R				R				R			
<i>Providencia stuartii</i>	R	R	R	R				R							
<i>Yersinia enterocolitica</i>	R	R	R	R	R			R	R		R	R			
<b>Bacilles à Gram négatif non fermentaires</b>															
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	R				R	R	R	R	R	R		
<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	R	R	R				R	R	R	R	R			
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	R	R	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R		R
<i>Burkholderia cepacia</i>	R	R	R	R	R	R		R	R	R	R	R			R
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	R	R	R	R				R	R	R	R	R	R		
<i>Flavobacterium</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<b>Meningosepticum</b>															
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	

R : résistance naturelle ; PEN : pénicilline G ; OXA : oxacilline ; AM : aminopénicillines ; AMC : amoxicilline + acide clavulanique ; TIC : ticarcilline ; TCC : ticarcilline + acide clavulanique ; PIP: pipéracilline ; C1G : céphalosporines de première génération ; FOX : céfoxitine ; CTT : céfotétan ; MA : céfamandole ; CXM : céfuroxime ; CTX : céfotaxime ; CAZ : ceftazidime ; IPM : impénème.

**Annexe 06.** Valeurs limites des diamètres des zones d'inhibition pour les souches de référence utilisées pour le contrôle de qualité.

Antibiotiques testés	Charge des disques	<i>Escherichia coli</i> ATTC 25922
Amikacine	30µg	19 – 26
Amoxicilline + Acide clavulanique	20/10µg	18 – 24
Ampicilline	10µg	16 – 22
Azithromycine	15µg	---
Acide nalidixique	30µg	22 – 28
Aztreonam	30µg	---
Céfazoline	30µg	21 – 27
Cefalotine	30µg	15 – 21
Cefoxitine	30µg	23 – 29
Céfotaxime	30µg	29 - 35
Ceftriaxone	30µg	29 - 35
Ceftazidime	30µg	---
Ciprofloxacine	5µg	30 – 40
Chloramphénicol	30µg	21 – 27
Clindamycine	2µg	---
Doxycycline	30µg	18 – 24
Erythromycine	15µg	---
Fosfomycine	200µg	22 – 30
Furanes	300µg	20 - 25
Gentamicine	10µg	19 – 26
Imipenem	10µg	26 – 32
Kanamycine	30µg	---
Levofloxacine	5µg	---
Nétilmicine	30µg	---
Ofloxacine	5µg	---
Oxacilline	1µg	---
Pénicilline	10UI	---
Piperacilline	100µg	---
Rifampicine	5µg	---
Spectinomycine	100µg	---
Tetracycline	30µg	---
Ticarcilline	75 µg	---
Ticarcilline+Acide Clavulanique	75/10µg	---
Tobramycine	10µg	---
Trimethoprime + Sulfamethazole	1.25/23.75µg	23 – 29
Tiecoplanine	30µg	---

Tableau extrait à partir de standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS 5<sup>ème</sup> édition 2008

**Annexe 07.** Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour Entérobactéries

Antibiotiques testés	Charge de disque	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques ( $\mu\text{g/ml}$ )	
		Résistant	Intermédiaire	Sensible	Résistant	Sensible
<b><u>B-lactamines</u></b> Ampicilline	10 $\mu\text{g}$	$\leq 13$	14 – 16	$\geq 17$	$\geq 32$	$\leq 8$
Amoxicilline + Ac. Clavulanique	20/10 $\mu\text{g}$	$\leq 13$	14 - 17	$\geq 18$	$\geq 32/16$	$\leq 8/4$
Céfazoline	30 $\mu\text{g}$	$\leq 14$	15 - 17	$\geq 18$	$\geq 32$	$\leq 8$
Cefalotine	30 $\mu\text{g}$	$\leq 14$	15 - 17	$\geq 18$	$\geq 32$	$\leq 8$
Cefoxitine	30 $\mu\text{g}$	$\leq 14$	15 - 17	$\geq 18$	$\geq 32$	$\leq 8$
Céfotaxime	30 $\mu\text{g}$	$\leq 14$	15 – 22	$\geq 23$	$\geq 64$	$\leq 8$
Ceftriaxone	30 $\mu\text{g}$	$\leq 13$	14 – 20	$\geq 21$	$\geq 64$	$\leq 8$
Imipenème	10 $\mu\text{g}$	$\leq 13$	14 - 15	$\geq 16$	$\geq 13$	$\leq 4$
<b><u>Aminosides</u></b> amikacine	30 $\mu\text{g}$	$\leq 14$	15 – 16	$\geq 17$	$\geq 32$	$\leq 16$
Gentamicine	10 $\mu\text{g}$	$\leq 12$	13 – 14	$\geq 15$	$\geq 8$	$\leq 4$
<b><u>Quinolones</u></b> Acide nalidixique	30 $\mu\text{g}$	$\leq 13$	14 – 18	$\geq 19$	$\geq 32$	$\leq 8$
Ciprofloxacine	5 $\mu\text{g}$	$\leq 15$	16 – 20	$\geq 21$	$\geq 4$	$\leq 1$
Ofloxacine	5 $\mu\text{g}$	$\leq 12$	13 – 15	$\geq 16$	$\geq 8$	$\leq 2$
<b><u>Autres</u></b> Chloramphénicol	30 $\mu\text{g}$	$\leq 12$	13 – 17	$\geq 18$	$\geq 32$	$\leq 8$
Furanes	300 $\mu\text{g}$	$\leq 14$	15 – 16	$\geq 17$	$\geq 128$	$\leq 32$
Fosfomycine	200 $\mu\text{g}$	$\leq 12$	13 – 15	$\geq 16$	$\geq 256$	$\leq 64$
Triméthoprime + Sulfaméthoxazole	1.25/23 .75 $\mu\text{g}$	$\leq 10$	11 - 15	$\geq 16$	$\geq 8/152$	$\leq 2/38$

Tableau extrait à partir de standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS 5<sup>ème</sup> édition 2008

## Annexe 08. Phénotypes de résistance des entérobactéries aux $\beta$ -lactamines

### Résistances naturelles des entérobactéries aux $\beta$ -lactamines

Les entérobactéries sont naturellement résistantes aux pénicillines G et M, en fonction des résistances supplémentaires aux autres  $\beta$ -lactamines, elles sont classées en quatre groupes :

Groupe de $\beta$ -lactamines	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4
Principaux genres d'entérobactéries rencontrées en milieu hospitalier.	<i>Escherichia coli</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Salmonella</i> <i>Shigella</i>	<i>Klebsiella</i> <i>Citrobacter</i> <i>Koseri</i>	<i>Enterobacter</i> <i>Serratia</i> <i>Morganella</i> <i>Providencia</i> <i>Citrobacter freundii</i>	<i>Yersinia</i>
Aminopénicillines	S	R	R	R
Carboxypénicillines	S	R	S	R
Urédopénicillines	S	I/R	S	I/R
C1G	S	S	R	R
C3G	S	S	S	S
Carbapénèmes	S	S	S	S
Mécanismes de résistances	Absence de $\beta$ -lactamase	Pénicillinase à bas niveau	Céphalosporinase à bas niveau	Pénicillinase + céphalosporinase

### Résistances acquises des entérobactéries aux B-lactamines

Présentation des phénotypes de résistance des entérobactéries aux  $\beta$ -lactamines

Antibiotiques marqueurs	Pénicillinase Bas niveau	Pénicillinase haut niveau	Pénicillinase résistante aux I $\beta$ L	Céphalosporinase bas niveau	Céphalosporinase haut niveau	BLSE1
Amoxicilline AMX aminopénicilline	R	R	R	R	R	R
Amoxicilline + Ac.clavulanique AMC aminopénicilline+ I $\beta$ L	S	I/R	R	R2	R2	R3
Ticarcilline TIC carboxypénicilline	R	R	R	S	R	R
Méccillinam MEC aminidopénicilline	S	R	R	S	S	R
Céfalotine CF (C1G)	S	R	S	R	R	R
Ceftazidime CTX (C3G)	S	S	S	S	R	R ou Synergie <sub>4</sub>

**1** : BLSE :  $\beta$ -lactamase à spectre élargie. | **2** : I $\beta$ L : les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases n'inhibent pas les céphalosporinase (les céphalosporinases sont néanmoins des  $\beta$ -lactamases) | **3** : souche résistante parfois intermédiaire, dans tous les cas le diamètre d'inhibition pour l'AMC est supérieur à celui de l'AMX.

**4** : certaines BLSE peuvent donner un profil intermédiaire ou sensible avec une C3G. La mise en évidence d'une synergie entre l'acide clavulanique (du disque AMC) et la C3G permettent de conclure à la présence d'une BLSE. Chez les entérobactéries on rencontre des BLSE chez *Klebsiella pneumoniae* et plus rarement chez *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Escherichia coli*.

## **Annexes 09. Matériel et réactifs utilisés**

### **Matériel et appareillages**

- Pipettes graduées stériles de 1 ml
- Bec bunsen
- Portoir pour tubes à essai
- Pipettes Pasteur stériles.
- Bain marie
- Boîtes de pétri
- Marqueur
- Des lames
- Applicateur de disque
- Pied à coulisse
- Anse de platine
- Etuve électrique
- Microscope optique
- Pince

### **Milieux de culture et additifs**

- Eau distillée stérile en tubes
- Gélose Hektoen
- Tri Sugar Iron TSI
- Citrate de simmons
- Mannitol mobilité
- urée-indole
- Bouillon nitraté
- Clark et Lubs
- Milieu ADH
- Milieu LDC
- Milieu ODC
- Gélose Mueller Hinton
- Disques d'antibiotiques
- Additif RM
- Additif VP
- Additif Kovacs
- Additif TDA
- Réactif de Greiss-Ilosvay
- Réactif de Voges – Proskauer 1 et 2
- Rouge de méthyle

### **Colorants de Gram**

- L'huile de cèdre
- Violet de Gentiane
- Lugol
- Alcool
- Fuchsine



*Résumés*

## **Caractérisation et antibiorésistance des Entérobactéries des effluents hospitaliers de l'E.P.H. 120 lits de la wilaya de Khenchela**

### **Résumé**

Les hôpitaux sont des lieux de consommation d'antibiotiques et de dissémination de l'antibiorésistance qui est favorisée par la densité des individus dans ces structures augmentant ainsi le risque de transmission croisée. Conséquemment, de fortes prévalences en bactéries multirésistantes sont observées en milieu hospitalier.

Les entérobactéries sont parmi les germes multirésistants préoccupants en milieu hospitalier, ce sont des bacilles à Gram négatif qui constituent une part importante des bactéries isolées lors du diagnostic bactériologique des infections humaines. Leur abondance dans l'intestin, leur mobilité, leur rapidité de multiplication, leur fréquente résistance aux antibiotiques expliquent qu'elles soient les bactéries les plus impliquées en pathologie infectieuse humaine.

L'objectif de ce mémoire était de quantifier et caractériser les espèces d'Entérobactéries dans les effluents hospitaliers de l'E.P.H 120 lits de la wilaya de Khenchela et finalement déterminer leur profil de résistance aux antibiotiques.

Pour cela nous avons utilisé les méthodes normalisées pour la culture et l'identification des espèces des Entérobactéries dans les effluents hospitaliers, le profil de résistance des souches bactériennes a été déterminé par la méthode de diffusion sur milieu Mueller Hinton par écouvillonnage. Des antibiotiques communément utilisés en thérapie humaine ont été retenus.

Nos résultats mettent en évidence de façon systématique la présence de sept espèces d'Entérobactéries ayant acquis des caractères de résistance aux antibiotiques avec des profils multi-résistants.

L'émission de ces bactéries antibiorésistantes dans l'environnement aquatique, par le rejet d'eau usée pourrait constituer une source non négligeable de pollution microbiologique.

**Mots clés :** effluents hospitaliers, Entérobactéries, bactéries multirésistantes, pollution microbiologique.

## **Characterization and antimicrobial resistance of *Enterobacteriaceae* in effluents of hospital 120 beds in the province of Khenchela**

### **Abstract**

Hospitals are places of consumption of antibiotics and spread of antibiotic resistance which is favored by the density of individuals in these structures thereby increasing the risk of cross-transmission. Consequently, high prevalence was observed in resistant bacteria in hospitals.

Enterobacteriaceae are among concern multiresistant germs in hospitals, they are Gram-negative bacilli that are an important part isolated in bacteriological diagnosis of human bacterial infections. Their abundance in the gut, their mobility, speed of propagation, their frequent antibiotic resistances explain whether the bacteria most implicated in human infectious diseases.

The objective of this thesis was to quantify and characterize the species of Enterobacteriaceae in hospital effluents EPH 120 beds in the province of Khenchela and ultimately determine their antibiotic resistance profile.

For this we used the standard methods for culture and species identification of Enterobacteriaceae in hospital effluents, the resistance profile of bacterial strains was determined by the diffusion method on Mueller Hinton medium swab. Antibiotics commonly used in human therapy were selected.

Our results show consistently the presence of seven species of Enterobacteriaceae with acquired antibiotic resistance traits with multi-resistant profiles.

The issuance of these antibiotic-resistant bacteria in the aquatic environment, the wastewater discharge could be a significant source of microbial pollution

**Keywords:** hospital effluents, Enterobacteriaceae, multidrug-resistant bacteria, microbiological pollution.

Nom : Benhenia Prénom : Leyla  
Nom : Krazdi Prénom : Nawel

Date de soutenance : 26 / 06 /2013

**Master Académique en Biologie Option: Microbiologie**

**Caractérisation et antibiorésistance des Entérobactéries des effluents hospitaliers de l'E.P.H. 120 lits de la wilaya de Khenchela**

**Résumé**

Les hôpitaux sont des lieux de consommation d'antibiotiques et de dissémination de l'antibiorésistance qui est favorisée par la densité des individus dans ces structures augmentant ainsi le risque de transmission croisée. Conséquemment, de fortes prévalences en bactéries multirésistantes sont observées en milieu hospitalier.

Les entérobactéries sont parmi les germes multirésistants préoccupants en milieu hospitalier, ce sont des bacilles à Gram négatif qui constituent une part importante des bactéries isolées lors du diagnostic bactériologique des infections humaines. Leur abondance dans l'intestin, leur mobilité, leur rapidité de multiplication, leur fréquente résistance aux antibiotiques expliquent qu'elles soient les bactéries les plus impliquées en pathologie infectieuse humaine.

L'objectif de ce mémoire était de quantifier et caractériser les espèces d'Entérobactéries dans les effluents hospitaliers de l'E.P.H 120 lits de la wilaya de Khenchela et finalement déterminer leur profil de résistance aux antibiotiques.

Pour cela nous avons utilisé les méthodes normalisées pour la culture et l'identification des espèces des Entérobactéries dans les effluents hospitaliers, le profil de résistance des souches bactériennes a été déterminé par la méthode de diffusion sur milieu Mueller Hinton par écouvillonnage. Des antibiotiques communément utilisés en thérapie humaine ont été retenus.

Nos résultats mettent en évidence de façon systématique la présence de sept espèces d'Entérobactéries ayant acquis des caractères de résistance aux antibiotiques avec des profils multi-résistants.

L'émission de ces bactéries antibiorésistantes dans l'environnement aquatique, par le rejet d'eau usée pourrait constituer une source non négligeable de pollution microbiologique.

**Mots clés :** effluents hospitaliers, Entérobactéries, bactéries multirésistantes, pollution microbiologique.

**Devant le jury**

Président : M<sup>me</sup> BENDJEMANA K (MCA)

Univ. Abbès Laghrour - Khenchela

Encadreur : M<sup>elle</sup> CHORFI K

Univ. Abbès Laghrour - Khenchela

Examineurs : M<sup>elle</sup> HALASSI I. (M.A.B)

Univ. Abbès Laghrour - Khenchela