



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



Université Abbès Laghrour Khenchela
Institut des Sciences de la Nature et de la Vie

N° d'ordre :

N° de série :

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magistère en Biologie
Option: Microbiologie des écosystèmes aquatiques

Présenté par

HAMAMES Mokhtar

Thème

**Etude *in vitro* de l'effet antibactérien des associations
d'antibiotiques : cas des bactéries isolées de Sebket
Ouled M'barek (El-Mahmel, wilaya de Khenchela)**

Soutenu le : 04 /04 /2012

Devant le jury:

Président :	M^r DARBOUCHE A. (Prof)	Université Abbès Laghrour - Khenchela
Encadreur :	M^r HOUHAMDI M. (Prof)	Université 08 Mai 1945 - Guelma
Examineurs :	M^r HOUHA B. (MCA)	Université Abbès Laghrour – Khenchela
	M^r BENOUNIS M. (MCA)	Université Abbès Laghrour – Khenchela
Membre invité :	M^{lle} METALLAOUI S. (MCB)	Université de Skikda

Année universitaire : 2011-2012

Sommaire

Liste des abréviations**Liste des figures****Liste des tableaux****Introduction**..... 02**Chapitre I : Les antibiotiques**

1. Historique..... 05

2. Définition..... 05

3. Classification et mode d'action des antibiotiques..... 06

3.1. Les antibiotiques inhibant la synthèse de peptidoglycane..... 06

3.1.1. Les β -lactamines..... 06

3.1.1.1. Mécanisme d'action..... 07

3.1.1.2. Classification..... 07

3.1.1.2.1. Les pénames ou pénicillines..... 07

3.1.1.2.2. Les pénèmes..... 08

3.1.1.2.3. Les céphèmes ou céphalosporines..... 09

3.1.1.2.4. Les monobactames 11

3.1.1.2.5. Les inhibiteurs des β -lactamases..... 11

3.1.2. Les antibiotiques phosphoniques : la fosfomycine..... 11

3.1.3. La bacitracine..... 12

3.1.4. Les glycopeptides..... 12

3.2. Les antibiotiques inhibant la synthèse protéique..... 12

3.2.1. Les aminosides ou aminoglycosides..... 12

3.2.2. Les tétracyclines ou cyclines..... 14

3.2.3. Les phénicolés..... 15

3.2.4. Les macrolides, les lincosamides et les streptogramines (MLS)..... 15

3.2.5. L'acide fusidique..... 17

3.2.6. Les oxazolidinones..... 17

3.3. Les antibiotiques inhibant la synthèse des acides nucléiques 17

3.3.1. Les quinolones..... 17

3.3.2. Les rifamycines..... 18

3.3.3. Les imidazolés..... 19

3.3.4. La mupirocine.....	19
3.3.5. La novobiocine.....	19
3.3.6. Les nitrofuranes.....	20
3.4. Les antibiotiques inhibant la synthèse des folates.....	20
3.4.1. Les sulfamides.....	20
3.5. Les antibiotiques provoquant l'altération des membranes.....	21
3.5.1. Les polymyxines.....	21
3.5.2. La gramicidine.....	21

Chapitre II : L'antibiothérapie

1. Introduction.....	23
2. Critères de choix d'un antibiotique.....	23
2.1. Les critères bactériologiques.....	23
2.2. Les critères pharmacologiques.....	23
2.3. Les critères individuels.....	23
3. La résistance bactérienne.....	24
3.1. Types de résistance.....	24
3.1.1. Résistance naturelle (intrinsèque).....	24
3.1.2. Résistance acquise.....	25
3.2. Mécanismes de la résistance.....	25
3.2.1. Mécanismes génétiques de la résistance.....	25
3.2.1.1. Résistance chromosomique.....	25
3.2.1.2. Résistance extra-chromosomique.....	26
3.2.1.2.1. Les plasmides.....	26
3.2.1.2.2. Les transposons et les intégrons.....	27
3.2.2. Mécanismes biochimiques de la résistance.....	28
3.2.2.1. Phénomènes d'imperméabilité et d'efflux.....	29
3.2.2.2. Modification de la cible.....	31
3.2.2.2.1. Modification des protéines de liaison à la pénicilline.....	31
3.2.2.2.2. Modifications des précurseurs de peptidoglycane.....	32
3.2.2.2.3. Modifications du ribosome.....	32
3.2.2.2.4. Modifications des topoisomérases.....	32
3.2.2.2.5. Modifications de l'ARN polymérase.....	32
3.2.2.2.6. Modification du facteur d'élongation.....	33

3.2.2.3. Inactivation enzymatique de l'antibiotique.....	33
4. Monothérapie et association d'antibiotique (Bithérapie).....	34
4.1. Bases théoriques et expérimentales de l'association des antibiotiques.....	34
4.1.1. Elargir le spectre.....	35
4.1.2. Obtenir une synergie.....	35
4.1.3. Diminuer l'émergence de souches résistantes.....	35
4.1.4. Diminuer la toxicité du traitement.....	35
4.2. Les effets des associations d'antibiotiques.....	36
4.3. Méthodes d'étude de l'activité bactérienne d'un antibiotique.....	36
4.3.1. Détermination de la CMI.....	36
4.3.1.1. Méthode de dilution.....	36
4.3.1.2. Méthode de diffusion.....	37
4.3.2. Détermination de la CMB.....	37
4.4. Techniques d'étude de l'association binaire des antibiotiques.....	38
4.4.1. Méthodes en milieu solide.....	38
4.4.2. Méthodes par dilution en milieu liquide.....	38
4.4.2.1. Le schéma triangulaire.....	38
4.4.2.2. La technique de l'échiquier.....	39
4.5. Corrélation entre études <i>in vitro</i> et résultats <i>in vivo</i>	40

Chapitre III : matériel et méthodes

1. Introduction.....	42
2. Description du site.....	42
3. L'échantillonnage.....	43
4. L'analyse bactériologique.....	44
4.1. Les méthodes générales de dénombrement.....	45
4.1.1. Dénombrement des bactéries aérobies revivifiables par incorporation dans un milieu gélosé.....	45
4.1.2. Dénombrement en milieu liquide par détermination du nombre le plus probable (NPP).....	47
4.1.2.1. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et des coliformes fécaux (thermotolérants).....	47
4.1.2.2. Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux.....	50
4.1.2.3. Recherche et dénombrement des bactéries sulfito-réductrices.....	51

4.2. Les méthodes d'isolement et d'identification des bactéries.....	52
4.2.1. Mode opératoire.....	52
4.2.1.1. L'observation microscopique.....	52
4.2.1.2. L'isolement des bactéries.....	52
4.2.1.3. L'identification biochimique.....	53
4.2.1.3.1. Galeries classiques.....	53
4.2.1.3.2. Galeries miniaturisées (système API).....	53
4.3. L'étude de l'antibiorésistance.....	55
4.3.1. L'antibiogramme standard (méthodes des disques).....	56
4.3.2. L'étude de l'association des antibiotiques.....	58
4.3.2.1. Techniques en milieu solide (technique des bandelettes).....	58
4.3.2.2. Techniques en milieu liquide.....	59
4.3.2.2.1. Schéma triangulaire.....	60
4.3.2.2.2. Schéma carré.....	61
4.3.2.2.3. Technique de l'échiquier.....	62
 Chapitre IV : Résultats et discussion	
1. Résultats de dénombrement.....	65
1.1 Dénombrement des bactéries aérobies revivifiables par incorporation dans un milieu gélosé.....	65
1.2. Dénombrement des coliformes totaux, des coliformes fécaux (<i>E.coli</i>) et des entérocoques intestinaux.....	66
1.3. Dénombrement des bactéries sulfito-réductrices.....	69
2. Résultats de l'isolement et de l'identification.....	70
3. Résultats de l'antibiorésistance.....	73
3.1. Résultats de l'antibiogramme standard.....	73
3.2. Résultats de l'étude de l'association des antibiotiques.....	77
3.2.1. Résultats des techniques en milieu solide (la technique des bandelettes).....	78
3.2.2. Résultats des techniques en milieu liquide.....	79
3.2.2.1. Schéma triangulaire.....	79
3.2.2.2. Schéma carré.....	80
3.2.2.3. Technique de l'échiquier.....	81
Conclusion.....	83

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

- ADN** : Acide désoxyribonucléique.
- AFNOR** : Association française de normalisation.
- ARN** : Acide ribonucléique.
- BCPL** : Bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol.
- BEA** : Bile esculine azide.
- BLBVB** : Bouillon lactosé bilié au vert brillant.
- CMB** : Concentration minimale bactéricide.
- CMI** : Concentration minimale inhibitrice.
- C1G** : Céphalosporine de première génération.
- C2G** : Céphalosporine de deuxième génération.
- C3G** : Céphalosporine de troisième génération.
- D/C** : Double concentration.
- D.O** : Densité optique.
- Glu** : Glucose.
- H₂S** : Sulfure d'Hydrogène.
- ISO** : International Organization of Standardization.
- Lac** : Lactose.
- MLS** : Macrolides, Lincosamides et Streptogramines.
- MRI** : Intégrons de multirésistance.
- NF EN** : Normes européenne et française.
- NPP** : Nombre le plus probable.
- PCA** : Plate count agar.
- PLP** : Protéines de liaison à la pénicilline.
- Sacch** : Saccharose.
- S/C** : Simple concentration.
- SI** : Super-intégrons.
- TSI** : Triple Sugar Iron.
- UFC** : Unité formant colonie.
- VP** : Voges-Proskauer.

Liste des figures

Figure 1 : Structure du noyau péname.....	07
Figure 2 : Structures de base des pénèmes.....	09
Figure 3 : Structure du noyau céphème.....	09
Figure 4 : Structures des inhibiteurs des β -lactamases.....	11
Figure 5 : Structure du noyau central des aminosides.....	13
Figure 6 : Structure de base des tétracyclines.....	14
Figure 7 : Structure de base des quinolones.....	17
Figure 8 : Structure du noyau para-amino-bezène sulfamide.....	20
Figure 9 : Schéma d'un intégron.....	28
Figure 10 : Représentation schématique des cinq familles de pompes d'efflux...	30
Figure 11 : Détermination de la CMI par méthode de dilution.....	37
Figure 12 : Détermination de la CMI par méthode de diffusion.....	37
Figure 13 : Détermination des effets des associations d'antibiotiques par bandelettes.....	38
Figure 14 : Schéma triangulaire d'étude de l'association d'antibiotiques.....	39
Figure 15 : Etude de l'association par la technique de l'échiquier.....	39
Figure 16 : Situation géographique des zones humides des hautes plaines de l'Est algérien.....	42
Figure 17 : Sebket Ouled M'barek.....	43
Figure 18 : Ensemencement du milieu présomptif pour le dénombrement des coliformes.....	48
Figure 19 : Représentation des résultats positifs du test présomptif.....	49
Figure 20 : Représentation des résultats positifs du test confirmatif.....	49
Figure 21 : Préparation de la gamme de concentration de l'antibiotique A.....	62
Figure 22 : Préparation de la gamme de concentration de l'antibiotique B.....	63
Figure 23 : Représentation des valeurs du nombre des bactéries aérobies révivifiables.....	66
Figure 24 : Représentation des valeurs NPP pour les coliformes (totaux et fécaux) et les entérocoques intestinaux.....	68
Figure 25.a : Résultats de la technique des bandelettes.....	78
Figure 25.b : Résultats de la technique des bandelettes.....	79

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des aminosides.....	13
Tableau 2 : Spectre d'activité des macrolides, lincosamides et streptogramines.....	16
Tableau 3 : Classification des macrolides et apparentés.....	16
Tableau 4 : Classification des quinolones.....	18
Tableau 5 : Spectre d'activité des sulfamides.....	21
Tableau 6 : Les antibiotiques en monothérapie et leurs fréquences d'utilisation....	34
Tableau 7 : Les antibiotiques en association et leurs fréquences d'utilisation.....	34
Tableau 8 : Les antibiotiques testés pour les antibiogrammes.....	57
Tableau 9 : Schéma triangulaire (pour 10 antibiotiques : A, B, C...).	60
Tableau 10 : Schéma carré.....	61
Tableau 11 : Distribution des concentrations pour la technique de l'échiquier.....	63
Tableau 12 : Dénombrement des bactéries aérobies revivifiables.....	65
Tableau 13 : Valeurs du nombre d'unités génératrices de colonies (Cs).....	66
Tableau 14 : Résultats de dénombrement des coliformes totaux.....	67
Tableau 15 : Résultats de dénombrement des coliformes fécaux (<i>E.coli</i>).....	67
Tableau 16 : Résultats de dénombrement des entérocoques intestinaux.....	67
Tableau 17 : Les valeurs NPP des trois dénombrements précédant.....	67
Tableau 18 : Résultats du dénombrement des bactéries anaérobies sulfito-réductrices.....	69
Tableau 19 : Caractères macroscopiques et microscopiques de colonies isolées.....	70
Tableau 20 : Résultats des tests biochimiques et des galeries API des espèces identifiées.....	72
Tableau 21 : Résultats de l'antibiogramme de <i>Escherichia coli</i>	74
Tableau 22 : Résultats de l'antibiogramme de <i>Aeromonas hydrophila</i>	74
Tableau 23 : Résultats de l'antibiogramme de <i>Methylobacterium mesophilicum</i>	75
Tableau 24 : Résultats de l'antibiogramme de <i>Shewanella putrefaciens</i>	75
Tableau 25 : Résultats de l'antibiogramme de <i>Comamonas testosteroni</i>	76
Tableau 26 : Résultats de l'antibiogramme de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	77
Tableau 27 : Résultats de l'antibiogramme de <i>Enterococcus faecium</i>	77
Tableau 28 : Résultats de l'association suivant le schéma triangulaire.....	79
Tableau 29 : Résultats de l'association (CS+CTX) suivant le schéma carré.....	80
Tableau 30 : Résultats de la technique de l'échiquier pour l'association (CS-CTX)..	81

Introduction :

Les bactéries obéissent aux règles communes du monde vivant. Elles sont capables de s'adapter aux contraintes du milieu où elles se développent et de résister aux agents antibactériens. Elles sont capables de développer des résistances aux antibiotiques du fait de leur multiplication rapide et de leur plasticité génétique. Depuis que les anti-infectieux sont utilisés, la résistance des micro-organismes (bactéries, champignons, parasites, mais également virus) à ces médicaments n'a cessé d'augmenter. Cette évolution a été particulièrement spectaculaire pour les antibiotiques.

La résistance aux antibiotiques est considérée comme l'un des problèmes de santé publique les plus cruciaux au monde. Cette résistance bactérienne relève de divers mécanismes, chacun impliquant des modifications du bagage génétique des bactéries. Le recours répété aux antibiotiques et leur mauvaise utilisation constituent les deux principales causes de l'augmentation des bactéries résistantes.

Nous sommes au temps où une utilisation plus raisonnable de ces molécules, plus réfléchie et plus restreinte est absolument nécessaire. Dans le but d'augmenter la vitesse bactéricide, d'élargir le spectre antibactérien, voire de prévenir l'émergence de mutants résistants, les antibiotiques sont souvent utilisés en association.

Ce travail vise à étudier *in vitro* l'effet antibactérien des associations d'antibiotiques sur des bactéries isolées de Sebket Ouled M'barek (El-Mahmel, wilaya de Khenchela).

Notre travail sera réparti en quatre chapitres, initié par une recherche bibliographique où nous apportons dans le premier chapitre un aperçu général sur les antibiotiques (historique et définition, classification, rôle, effet...). Le deuxième chapitre définit l'antibiothérapie et explique les mécanismes de résistance ainsi que la façon d'utilisation des antibiotiques, en traitement, soit séparément ou par association.

La partie pratique est subdivisée en deux chapitres, le premier (3^{ème} chapitre) présente les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail à savoir :

- L'estimation et la détermination de la qualité microbiologique de l'eau de Sebket Ouled M'barek (El-Mahmel, wilaya de Khenchela) ;
- L'étude de la résistance et/ou de la sensibilité de ces bactéries vis-à-vis des antibiotiques commercialisés (pris isolément) ;
- L'étude en milieu gélosé et en bouillon l'effet des associations (deux à deux) des antibiotiques ayant engendrés des effets de sensibilité.

En fin, le quatrième chapitre discute les résultats obtenus dans ce travail.

1. Historique

Bien que l'on attribue officiellement la découverte des antibiotiques à l'écossais Sir Alexander Fleming, il ne fut pourtant pas le premier à étudier les effets de certaines moisissures et les phénomènes de compétition chez les micro-organismes.

Les plus grandes étapes des découvertes des antibiotiques sont les suivantes [1, 2, 3] :

- Pasteur et Joubert en 1877, avec l'effet de *Bacillus anthracis* sur le développement de maladies bactériennes ;
- Ernest Duchesne en 1897, avec l'interaction entre *Escherichia coli* et la moisissure *Penicillium glaucum* ;
- Rodolf Emmerich et Oscar Löw en 1899, avec l'activité antibactérienne de l'extrait de *Pseudomonas pyocyanea*, la pyocyanase ;
- Fleming en 1928, avec la mise en évidence de la « pénicilline » de la moisissure *Penicillium notatum* ;
- Dix ans plus tard, une série d'antibiotiques furent décrits : la citrinine par Hetherington et Raistrick en 1931, la gliotoxine par Emerson et Weindling en 1936, la tyrothricine de *Bacillus brevis*, avec son extraordinaire antagonisme contre les microcoques à Gram positif, par René Dubos en 1938... ;
- L'effort entrepris pour trouver un ou plusieurs antibiotiques dont l'action serait complémentaire de celle de la pénicilline, conduisit à la découverte de plusieurs antibiotiques au cours du temps : la streptomycine en 1943 par Selman Waksman, la bacitracine en 1945 par Frank Meneley, Balbina Johnson et leurs collaborateurs, la chlromycine et l'auréomycine en 1948 par B.N. Duggar, la terramycine en 1950 par Finlay...

Depuis 1965, une période est caractérisée par le développement des antibiotiques semisynthétiques. Actuellement, il n'est plus possible de développer des antibiotiques sans en connaître la structure chimique, les propriétés pharmacologiques et toxicologiques.

2. Définition

Après la notion de « antibiose », exprimée par Pasteur en 1877, l'antibiotique peut se définir comme toute substance élaborée par des microorganismes, ou pouvant être reproduite par synthèse, qui possède la propriété de détruire les bactéries ou d'inhiber leur croissance [4].

L'action d'un antibiotique est le résultat des interactions organisme-antibiotique d'une part et antibiotique-bactéries d'autre part. Pour résumer ces dernières, on peut dire que pour être actif, un antibiotique doit [5]:

- Pénétrer jusqu'à sa cible bactérienne ;
- Ne pas être inactivé ;
- Etre capable de se lier à sa cible.

3. Classification et modes d'action des antibiotiques

Il existe de nombreuses façons de classer les antibiotiques. La classification basée sur le mécanisme d'action rend compte des propriétés particulières de chaque groupe d'antibiotique. La classification chimique permet de classer les antibiotiques en groupes assez homogènes mais éloignés des objectifs cliniques [5]. La classification la plus utilisée et retrouvée se base à la fois sur la structure chimique et sur les mécanismes d'action qui y ont lié [6] :

- Les antibiotiques ayant une même structure chimique, à l'origine de leur mécanisme d'action, se classent dans une même famille ;
- Au sein d'une même famille, les antibiotiques peuvent se différencier par leur spectre d'activité et sont réunis alors dans des groupes ;
- Au sein d'un même groupe, l'activité bactérienne est identique mais les antibiotiques peuvent se différencier par leurs propriétés pharmacologiques ou par leur tolérance.

Selon leur mode d'action, on distingue cinq catégories d'antibiotiques :

- Les antibiotiques inhibant la synthèse du peptidoglycane ;
- Les antibiotiques inhibant la synthèse protéique ;
- Les antibiotiques inhibant la synthèse des acides nucléiques ;
- Les antibiotiques inhibant la synthèse des folates ;
- Les antibiotiques provoquant l'altération des membranes.

3.1. Les antibiotiques inhibant la synthèse du peptidoglycane

3.1.1. Les β -lactamines

C'est la famille d'antibiotiques la plus importante, aussi bien par le nombre et la diversité des molécules utilisables que par leurs indications en thérapeutique et en prophylaxie des infections bactériennes. Elle est caractérisée par la présence constante du

cycle β -lactame associé à des cycles et des chaînes latérales variables qui expliquent les propriétés pharmacocinétiques et le spectre d'activité des différents produits [7].

3.1.1.1. Mécanisme d'action

Les β -lactamines présentent une analogie structurale avec la terminaison D-Ala-D-Ala du précurseur du peptidoglycane. Elles se fixent de manière covalente sur les PLP (protéines de liaison aux pénicillines) ; enzymes impliquées dans la phase finale de la synthèse du peptidoglycane, c'est-à-dire l'étape de polymérisation à partir de sous-unités faites d'un disaccharide-peptide. Les PLP ont une activité transpeptidasique, carboxypeptidasique et transglycolasique. L'inhibition des PLP aboutit à l'inhibition de la formation des ponts pentacycliques responsables de la structure réticulée de la paroi. On obtient ainsi des formes bizarroïdes (rondes ou filamenteuses) qui aboutissent à la lyse bactérienne [8].

3.1.1.2. Classification

En fonction de leur structure chimique et de leur activité antibactérienne, les β -lactamines sont divisées en cinq groupes : les pénames ou pénicillines, les pénèmes, les céphèmes ou céphalosporines, les monobactames et les inhibiteurs des β -lactamases [8].

3.1.1.2.1. Les pénames ou pénicillines

Leur noyau de base associe un cycle β -lactame à un cycle thiazolidine. Il intègre le grand groupe des β -lactamines ayant un noyau péname (Figure 1) [7].

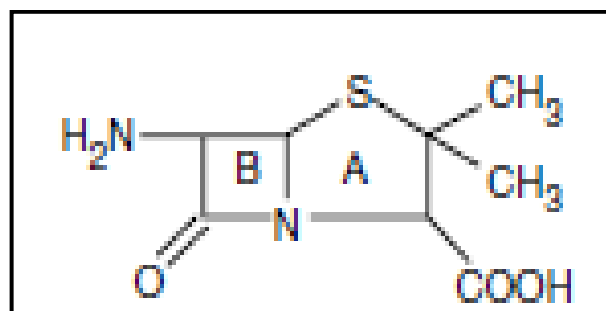


Figure 1 : Structure du noyau péname. A: cycle thiazolidine; B: cycle β -lactame [7].

Selon le spectre, on peut citer [7, 8, 9]:

- les pénicillines à spectre étroit (pénicillines G et V) dont l'activité est limitée sur les bactéries à Gram positif (cocci et bacilles), les cocci à Gram négatif mais elles sont inactives sur les bacilles à Gram négatif ;

- les pénicillines à spectre étroit (pénicillines M), résistantes aux pénicillinases staphylococciques et inactives sur la plupart des bactéries à Gram négatif et sur les entérocoques. On peut trouver la méticilline où des résistances puissent s'observer avec des staphylocoques Méti-résistants et les isoxazolylopénicillines (oxacilline, cloxacilline, dicloxacilline) ;
- les pénicillines à spectre élargi vers les bacilles à Gram négatif (pénicillines A), elles agissent aussi sur les bactéries à Gram positif ainsi que les coques à Gram négatif. Cependant, elles sont détruites par des β -lactamases de certains staphylocoques et bacilles à Gram négatif ;
- les pénicillines à spectre élargi vers les entérobactéries multirésistantes et vers les *Pseudomonas* mais sensibles aux β -lactamases : il s'agit des N-acylpénicillines (antipyocyaniques) : carboxypénicillines (la carbénicilline, la carfécilline, la ticarcilline, l'association ticarcilline + acide clavulanique), les uréidopénicillines (la mézlocilline, l'azlocilline, l'apalcilline, la pipéracilline, l'association pipéracilline + tazobactam) ;
- les amidinopénicillines (la mécilliname, la pivmécilliname) qui sont actifs sur les bacilles à Gram négatif uniquement, à l'exception du *Pseudomonas*. Toutefois les *Serratia* et les *Proteus* sont rarement sensibles.

3.1.1.2.2. Les pénèmes

Les pénèmes sont caractérisés par un noyau pénème (par analogie avec les céphèmes avec une double liaison dans le noyau péname) et dérivent de la thiénamycine, produite naturellement par *Streptomyces cattleya*. Le noyau pénème assure une stabilité importante vis-à-vis de l'action d'une grande variété de β -lactamases et augmente l'activité vis-à-vis d'espèces comme *Pseudomonas aeruginosa*, les entérobactéries et certaines bactéries à Gram positif alors que certaines bactéries résistent à l'action des ces antibiotiques [10].

Ils sont divisés en (Figure 2) :

- oxapénèmes ;
- carbapénèmes (imipénème, méropénème) ;
- sulfopénèmes.

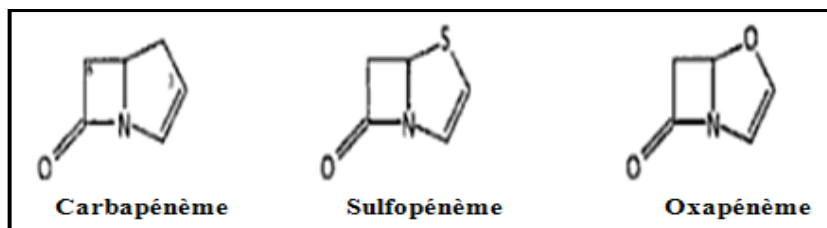


Figure 2 : Structures de base des pénèmes [11].

3.1.1.2.3. Les céphèmes ou céphalosporines

Ce sont tous des produits à large spectre dont l'intérêt réside surtout dans leur activité sur les bacilles à Gram négatif [4]. Elles présentent une meilleure stabilité vis-à-vis des β -lactamases (pénicillinasés ou céphalosporinasés) de ces bacilles [8].

Leur noyau de base associe un cycle β -lactame à un cycle dihydro-thiazine pour former l'acide-7-aminocéphalosporanique (noyau céphème) (Figure 3) [7].

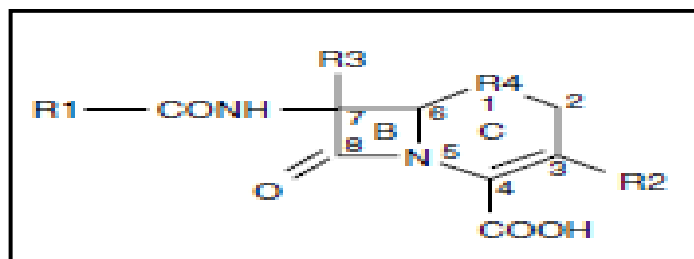


Figure 3 : Structure du noyau céphème. **B** : cycle β -lactame ; **C** : cycle dihydro-thiazine [7].

Les substitutions effectuées sur les radicaux de ce noyau modifient soit la stabilité aux β -lactamases (radicaux R1, R3, R4), soit l'activité intrinsèque (radical R1 et/ou R2) ou la pharmacocinétique (radical R2). D'autres substitutions peuvent modifier la vitesse de pénétration au travers des porines de la membrane externe, l'affinité de l'antibiotique pour les PLP ou son pouvoir inducteur sur les β -lactamases constitutives [7].

Suivant les substitutions, on distingue les oxacéphèmes (R3 : H, R4 : O), les céphalosporines (R4 : S) (1^{ère} génération, 2^{ème} génération et 3^{ème} génération), les céphamycines (R3 : H₃CO, R4 : S) et les carbacéphèmes (R4 : C) [4, 7, 8] :

- les oxacéphèmes dont le moxalactame est l'un des principaux produits. La présence du noyau dihydro-oxazine (oxacéphème) permet une meilleure pénétration à travers la paroi des bacilles à Gram négatif, en raison de la plus grande hydrophilie de la molécule, et une activité inhibitrice de certaines β -lactamases par une analogie de structure avec les clavames (acide clavulanique) ;

- les céphalosporines de 1^{ère} génération (C1G) ayant un spectre limité aux bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus* producteurs ou non de pénicillinase, streptocoques, pneumocoques) et à quelques bactéries à Gram négatif (*Haemophilus*, *Branhamella catarrhalis*, *E.coli*, *K.pneumoniae*, *Salmonella* et *shigella*). les bactéries du groupe 3 (*Enterobacter*, *serratia*, *Morganella*...) ont une résistance naturelle liée à une production des céphalosporinase. On peut citer : la céfalotine, la céfalexine, la céfatrizine, la céfazoline, la céfapirine, la céfradine, la céfacétrile, et la céfaloridine ;
- les céphalosporines de 2^{ème} génération (C2G) ayant une grande efficacité vis-à-vis de certaines souches de bactéries à Gram négatif (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*) et une efficacité amoindrie vis-à-vis des bactéries à Gram positif (pneumocoque, streptocoque). Cependant, les *Streptococcus D*, les *Staphylococcus méti-R*, les *Pseudomonas* et les *Acinetobacter* sont souvent résistantes. On distingue les molécules suivantes : la céfamandole, la céfoxitine, et la céfuroxime.
- Les céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) : ils ont une excellente activité vis-à-vis des bactéries à Gram négatif, grâce à leur stabilité vis-à-vis des β -lactamases mais elle est variable vis-à-vis des bactéries à Gram positif. Elle dépend cependant de la molécule. On distingue : la céfépime, la céfopérazone, la céfotaxime, la céfotétan, la cefpirome, la cefsulodine, la ceftazidime, la ceftizoxime, la ceftriaxone, la céfixime, la céfotiam et la cefpodoxime. La céfotaxime et la ceftriaxone sont très actives vis-à-vis des entérobactéries, mais elles ne sont pas actives sur des bacilles à Gram négatifs comme *pseudomonas aeruginosa*. La ceftazidime en revanche a une très bonne activité sur *P.aeruginosa* et sur les entérobactéries. Les céphalosporines à spectre étendu sont représentées par le céfépime et le cefpirome qui ont une activité vis-à-vis de certaines entérobactéries ayant acquis une résistance aux autres C3G par hyperproduction de céphalosporinases. Certains auteurs classent ces deux antibiotiques comme des céphalosporines de 4^{ème} génération (C4G).
- Les céphamycines : les principales molécules sont la céfoxitine et le céfotétane qui sont rattachées, du fait de leurs propriétés, aux céphalosporines de deuxième génération. Elles sont actives sur la plupart des entérobactéries, sur les staphylocoques sensibles à la méticilline, sur *S.pneumoniae* sensible à la pénicilline et sur les bactéries anaérobies à Gram négatif.

- Les carbacéphèmes où l'atome de soufre dans le noyau céphème est remplacé par un atome de carbone.

3.1.1.2.4. Les monobactames

Les premiers monobactames ont été isolés de substances naturelles produites par certaines bactéries (*Chromobacterium violaceum*), mais les produits récents sont entièrement synthétiques. Le seul produit utilisé actuellement est l'aztréonam. Ils sont résistants aux β -lactamases et ont une activité sur les entérobactéries, *P.aeruginosa* et aussi sur la plupart des cocci à Gram négatif. Par contre, les bactéries à Gram positif et les anaérobies sont toujours résistants [7, 10].

3.1.1.2.5. Les inhibiteurs des β -lactamases

Ils ont une structure chimique proche de celle des β -lactamines mais leur activité antibactérienne propre est faible. Ils doivent donc toujours être utilisés en association avec une β -lactamine dont ils élargissent le spectre grâce à l'inhibition des β -lactamases. On peut citer : l'acide clavulanique (avec l'amoxicilline ou la ticarcilline), le tazobactam (avec la pipéracilline) et le sulbactam (avec l'ampicilline) [8] (Figure 4).

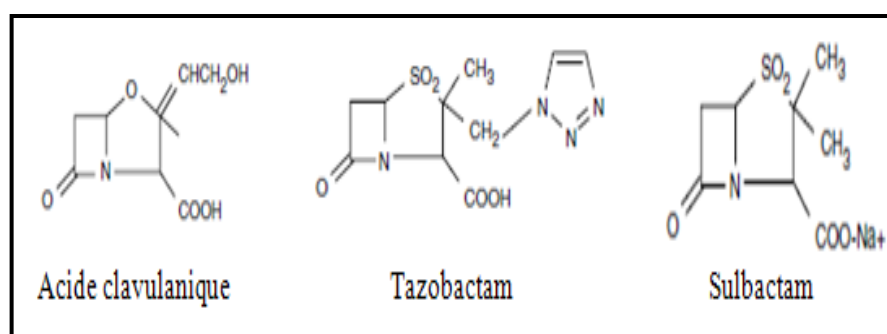


Figure 4 : Structures des inhibiteurs des β -lactamases [7].

3.1.2. Les antibiotiques phosphoniques : la fosfomycine

Le fosfomycine, produite par *Streptomyces fradiae*, agit sur la synthèse de la paroi à un stade très précoce en inhibant la pyruvyl-transférase (responsable de l'incorporation du phosphoénolpyruvate à l'UDP-N-acétylglucosamine, étape intermédiaire à la formation de l'UDP-acétylmuramique indispensable à la formation du peptidoglycane) [12].

C'est un antibiotique bactéricide à large spectre. Certaines bactéries sont habituellement sensibles telles que : *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*..., par contre d'autres sont résistantes telles que : les streptocoques A, B, D, *Acinetobacter*, *Proteus morganii* [10].

3.1.3. La bacitracine

C'est une substance trop toxique pour une utilisation générale et dont il fait un très large usage dans des préparations locales très diverses. Son spectre d'action est variable, incluant des bactéries à Gram positif et négatif (surtout *Staphylococcus aureus*) [11].

3.1.3.1. Mécanisme d'action

Elle empêche la déphosphorylation du phospholipide nécessaire à la synthèse de la chaîne longitudinale du peptidoglycane composée d'acide N-acétyl-muramine et d'acide N-acétyl-glucosamine [12].

3.1.4. Les glycopeptides

Ce sont des antibiotiques bactéricides indiqués principalement dans les infections aux staphylocoques méti-R. chez les entérocoques, des résistances acquises sont apparues [8]. La vancomycine et la téicoplanine sont les seuls représentants de ce groupe [5].

3.1.4.1. Mécanisme d'action

Les glycopeptides se lient de manière spécifique au niveau de la chaîne pentapeptidique du peptidoglycane sur le dipeptide D-Ala-D-Ala, formant une poche rigide et masquant le site d'action des transpeptidases chargées de former les ponts peptidiques du peptidoglycane. De plus, par leur taille, les glycopeptides empêchent la réaction de transglycosilation nécessaire à la synthèse du peptidoglycane [13].

3.2. Les antibiotiques inhibant la synthèse protéique

3.2.1. Les aminosides ou aminoglycosides

Les aminosides sont des antibiotiques constitués d'enchaînement de sucres aminés reliés entre eux par des ponts osidiques [14]. Ce sont des molécules (naturelles ou semi-synthétiques) ayant un spectre d'activité large et une bactéricidie importante et rapide [8].

Ils sont actifs *in vitro* sur les bacilles à Gram négatif aérobies (entérobactéries, *P.aeruginosa* et *Acinetobacter spp.*), les coques à Gram positif aérobies (les staphylocoques) et les bacilles à Gram positif aérobie (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus spp.*, corynébactéries). Ils sont, en revanche, inactifs sur les bactéries anaérobies strictes, sur les entérocoques et les streptocoques (une résistance naturelle de bas niveau) et sur *Stenotrophomonas maltophilia* et *Burkholderia cepacia* [15].

3.2.1.1. Mécanisme d'action

Les aminosides agissent en se fixant sur des sites de la sous-unité 30S des ribosomes bactériens entraînant ainsi leur déformation, ce qui perturbe la synthèse des protéines. Ils induisent également des erreurs de lecture de l'ARN m [10].

3.2.1.2. Classification

On distingue 3 groupes qui se diffèrent par la structure du noyau central (figure 5) [12].

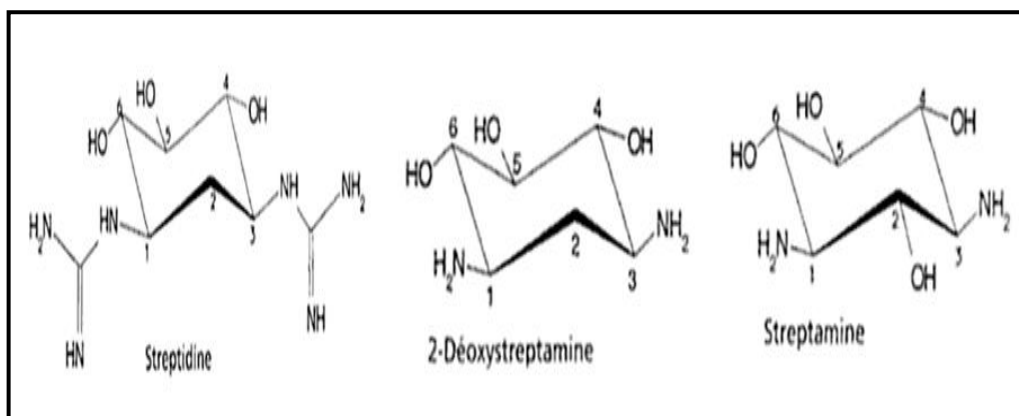


Figure 5 : Structure du noyau central des aminosides [12].

Le tableau suivant résume certaines molécules disponibles :

Tableau 1 : Classification des aminosides [12].

Formule chimique	Dénomination commune internationale (DCI)	Origine naturelle (N), synthétique (S)
Streptomycine	Streptomycine	N
Désoxystreptamines	Néomycine	N
	Paromomycine	N
	Framycétine	N
	Kanamycine	N
	Amikacine	S
	Tobramycine	N
	Gentamicine	N
Fortimicines	Nétilmicine	S
	Astromicine	N
	Dactamicine	N
	O-déméthyl- fortimicine A	S

3.2.2. Les tétracyclines ou cyclines

Les tétracyclines ont en commun une structure chimique de base formée d'un squelette tétracyclique (Figure 6).

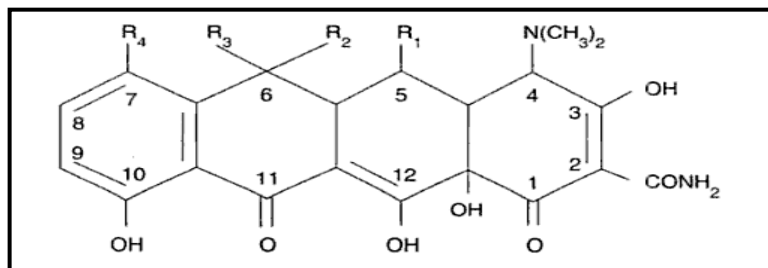


Figure 6 : Structure de base des tétracyclines [12].

Quelque soit de nature chimique ou semi-synthétique, ce sont des antibiotiques bactériostatiques à spectre très large, qui comprend [10] :

- Bactéries à multiplication intracellulaire : *Chlamydia*, *Brucella*, *Rickettsia*, *Mycoplasma*, *Borrelia*, *Leptospira*, *pasteurella*... ;
- Bactéries à Gram positif et à Gram négatif : *Neisseria gonorrhoeae*, *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*.

Certaines bactéries sont toujours résistantes tels que les staphylocoques et les entérobactéries [10].

3.2.2.1. Mécanisme d'action

Les tétracyclines agissent au niveau de la phase d'élongation de la synthèse protéique. Après fixation sur la sous-unité 30S du ribosome bactérien, ils bloquent l'accès de l'aminoacyl-tARN sur son site ribosomal. De ce fait, la synthèse protéique est inhibée [13].

3.2.2.2. Classification

Le chlortétracycline et l'oxytétracycline sont les deux premiers membres des tétracyclines à être découverts. Ces deux molécules naturelles sont produits respectivement par *Streptomyces aureofaciens* et *S. rimosus* [12].

Selon leurs caractéristiques synthétiques, on peut distinguer [13]:

- Les tétracyclines naturelles : tétracyclines de base ;
- Les tétracyclines semi-synthétiques : doxycycline, minocycline, métacycline, lymocycline ;

- Les glycylicyclines sont les molécules les plus récemment découvertes, elles sont représentées par la tigécycline dont l'usage est réservé aux hôpitaux.

3.2.3. Les phénicolés

Les phénicolés sont des antibiotiques bactériostatiques dérivées de l'acide dichloracétique. Ils sont caractérisés par un large spectre antibactérien, une biodisponibilité satisfaisante et une excellente diffusion tissulaire [8].

Ils sont actifs sur les mycoplasmes, les rickettsies, les pneumocoques, les *Chlamydiae*, les *Vibrio*, les *Listeria*, *Bacillus subtilis*, les *Neisseria*, les *Shigella*, les *Salmonella*, les *Brucella* et les *Bacteroides*..., alors que certaines bactéries sont inconstamment sensibles, telles que : les staphylocoques, les entérocoques, les colibacilles, les *Klebsiella*, les *Proteus*. Les espèces toujours sensibles sont : les *Acinetobacter*, les *Providencia*, les *Serratia*, les *Pseudomonas* [10].

3.2.3.1. Mécanisme d'action

Ils se fixent sur la sous unité 50S du ribosome et inhibent la formation des liaisons peptidiques. Ses antagonistes compétitifs sont les macrolides et les lincosamides [10, 16].

3.2.3.2. Classification

Deux molécules seulement sont utilisées en clinique : le chloramphénicol, réservé à l'usage topique en raison de sa toxicité, et le thiamphénicol caractérisé par une activité intrinsèque légèrement moindre que celle du chloramphénicol et surtout par une moindre toxicité, liée à l'absence de métabolisme hépatique [8].

3.2.4. Les macrolides, les lincosamides et les streptogramines (MLS)

Les macrolides sont des antibiotiques basiques formés d'un noyau central lactonique possédant, selon les molécules, 14 à 16 atomes de carbones. Ils sont soit bactériostatiques, soit bactéricides sur les germes qui leur sont sensible. *Streptomyces* et *Micromonospora* sont à l'origine des macrolides les plus anciens. Plus récemment, les molécules apparentées à cette famille ont été obtenues par hémi-synthèse. Toutes les molécules sont liposolubles, ce qui leur confère un pouvoir de diffusion tissulaire et cellulaire important [8].

Les lincosamides et les streptogramines (ou synergistines) ont une structure chimique différente de celle des macrolides mais ayant le même spectre et mécanismes d'action [8]. Les streptogramines comportent un mélange de deux composés, streptogramine A et B, dont l'association confère au produit une synergie d'activité [12].

Les MLS ont un spectre d'activité comparable, résumé dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Spectre d'activité des macrolides, lincosamides et streptogramines [11].

	Macrolides	Lincosalides	Streptogramines
Habituellement sensibles	<i>Streptococcus pyogenes</i> , Staphylocoque méti-S, Leptospires...	Staphylocoque, Streptocoque, <i>Clostridium</i> , <i>Bacteroides</i>	Bactéries à Gram positif, <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> .
Parfois sensibles	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Toxoplasma gondii</i>	Pneumocoques	
Toujours résistants	Staphylocoques Méti- R, Entérobactéries, <i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i>	Gonocoques, Méningocoques, <i>Haemophilus influenzae</i>	

3.2.4.1. Mécanisme d'action

Comme pour tous les inhibiteurs de la synthèse des protéines bactériennes, ils agissent au niveau de la sous unité 50S du ribosome en inhibant la croissance de la chaîne polypeptidique en formation [5, 8].

3.2.4.2. Classification

Les principaux antibiotiques utilisés dans ce groupe sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 3 : Classification des macrolides et apparentés [17, 18].

Familles	Antibiotiques
Macrolides	Erythromycine, Spiramycine, Oléandomycine, Azithromycine Sporéamicine, Clarithromycine, Azithromycine, Flurithromycine, Josamycine, Midécamycine, Roxithromycine Miocamycine
Lincosamides	Lincomycine, Clindamycine
Streptogramines	Pristinamycine, Virginiamycine, Quinupristine + Dalfopriline

3.2.5. L'acide fusidique :

C'est le seul représentant de cette famille, il a été isolé de *Fusidium coccineum* en 1962 et possède un effet bactériostatique. Il est actif sur les bactéries à Gram positif et plus particulièrement sur les staphylocoques sensibles et résistants à la méticilline, les cocci à Gram négatif, les *Neisseria*, les *Clostridium*, les corynébactéries et les cocci à Gram positif anaérobies [5, 12].

3.2.5.1. Mécanisme d'action

Il agit sur le facteur d'élongation G au cours de la synthèse protéique, ceci entraîne le blocage de la traduction de l'ARNm au niveau de la sous unité 50S du ribosome [10].

3.2.6. Les oxazolidinones

Le linézolide est le premier agent de cette classe. Il s'agit d'une molécule synthétique agissant au niveau de la phase d'initiation de la synthèse protéique. Il empêche l'assemblage des deux sous-unités ribosomales, 50S et 30S. Son spectre d'action couvre essentiellement les bactéries à Gram positif [19].

3.3. Les antibiotiques inhibant la synthèse des acides nucléiques

3.3.1. Les quinolones

Les quinolones sont des antibiotiques de synthèse, de structure simple fondée sur deux cycles aromatiques accolés (Figure 7). Les fonctions en 3 et 4 sont indispensables à l'activité antibactérienne.

Les radicaux en 1, 5, 6, 7 ou 8 modifient le spectre d'activité antibactérienne. L'adjonction d'un atome de Fluor en 6 transforme les quinolones classiques en fluoroquinolones. La première quinolone synthétisée est l'acide nalidixique [8].

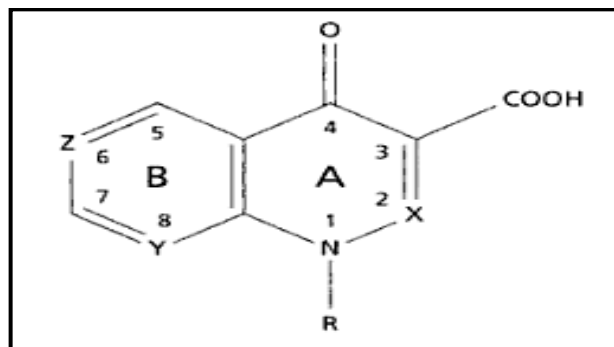


Figure 7 : Structure de base des quinolones [8].

3.3.1.1. Mécanisme d'action

Les quinolones ont pour cible les topoisomérases, enzymes essentielles à la réplication et à la transcription de l'ADN bactérien. L'inhibition de ces enzymes entraîne l'arrêt de la réplication et de la transcription, donc de la synthèse des acides nucléiques (bactériostase), puis la mort de la bactérie (bactéricide). Les topoisomérases bactériennes ciblées sont l'ADN gyrase et la topoisomérase IV [8].

3.3.1.2. Classification

Les différentes générations des quinolones sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 4 : Classification des quinolones [11].

1 ^{ère} génération	2 ^{ème} génération	3 ^{ème} génération
Acide nalidixique	Ciprofloxacine	Sparfloxacine
Acide oxolinique	Enoxacine	Trovafloxacine
Acide pipémique	Loméfloxacine	Clinafloxacine
Fluméquine	Norfloxacine	Moxifloxacine
Rosoxacine	Péfloxacine	
	Ofloxacine	

3.3.1.3. Spectre d'activité [8]

- Les quinolones de 1^{ère} génération sont activés uniquement sur les bactéries à Gram positif, les bacilles à Gram négatif (entérobactéries, *Haemophilus*, *Vibrio*, *Moraxella* et les cocci à Gram positif (méningocoque, gonocoque) ;
- Les fluoroquinolones ou quinolones de 2^{ème} génération sont plus actives sur les autres bacilles à Gram négatif comme *P.aeruginosa* et sur des bactéries à Gram positif comme les staphylocoques ;
- Les nouvelles fluoroquinolones (3^{ème} génération) sont actives sur les bactériennes à développement intracellulaire comme les rickettsiales, les clamydiales, les légionelles et les mycobactéries.

3.3.2. Les rifamycines

Les rifamycines sont des antibiotiques macrocycliques dont le chef de file est la rifamycine B, isolée à partir de *Streptomyces mediterranei*. Cette molécule fournit, par héli-synthèse, trois dérivés principaux [11]:

- La rifamycine SV, active sur les bactéries à Gram positif et les cocci à Gram négatif ;
- La rifampicine, réservée au traitement de la tuberculose et aux affections à mycobactéries atypiques ou résistantes à la rifamycine, parce que très actives sur le BK ;
- La rifabutine, réservée également au traitement de la tuberculose (forme multirésistante) ou à la prévention des infections à *Mycobacterium avium*.

3.3.2.1. Mécanisme d'action

Ce sont des antibiotiques inhibant la synthèse des ARNm par inhibition de l'ARN-polymérase ADN-dépendante. La bactéricidie induite par la rifampicine est due à la formation de superoxydes apparaissant lors de l'oxydation de la molécule [20].

3.3.3. Les imidazolés

Il s'agit des 5-nitro-imidazolés, dont le chef de file est le métronidazole. Les autres produits sont obtenus par héli-synthèse : tinidazole, ornidazole et nimorazole [8].

3.3.3.1. Spectre d'activité

Ils sont actifs sur la plupart des bactéries anaérobies (sauf *Propionibacterium acnes* et *Actinomyces*) : *Clostridium*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Fusobacterium* et *Veillonella* [8].

3.3.4. La mupirocine

La mupirocine n'a aucune apparenté avec les autres classes d'antibiotiques. C'est une molécule issue de la bactérie *Pseudomonas fluorescens* et est utilisée par voie topique. Elle est efficace contre les bactéries à Gram positif (staphylocoques, streptocoques) ; elle est bactériostatique à faible concentration et bactéricide à forte concentration [21].

3.3.4.1. Mécanisme d'action

Elle agit d'une manière compétitive en inhibant l'isoleucyl-tRNA synthétase, enzyme responsable de la synthèse de l'ARN de transfert, et bloque la synthèse protéique [21].

3.3.5. La novobiocine

La novobiocine est un antibiotique bactériostatique dont le mécanisme d'action n'est pas bien élucidé. Il est actif principalement sur les bactéries à Gram positif (staphylocoques, *Neisseria*, *Haemophilus*...) alors que les entérobactéries et les *Pseudomonas* sont toujours résistants [10].

3.3.6. Les nitrofuranes

Ce sont des molécules utilisées principalement dans le traitement des infections urinaires. Elles agissent directement sur l'ADN bactérien, après avoir subi une réduction par les nitroréductases présentes chez les bactéries sensibles. Les molécules disponibles sont : la nifurzide, la nifuroxazide et la nitrofurantoïne [8].

3.3.6.1. Spectre d'activité

Ils sont actifs principalement sur les staphylocoques, les streptocoques D, *E.coli*, alors que les *pseudomonas* sont toujours résistants [10].

3.4. Les antibiotiques inhibant la synthèse des folates

3.4.1. Les sulfamides

Ce sont des molécules de synthèse ayant un pouvoir bactériostatique. Ils sont caractérisés par une unité structurale : le noyau para-amino-benzène sulfamide nécessaire de ses activités antibactériennes (Figure 8). Ils sont le plus souvent utilisés en association avec une diaminopyridine (la triméthoprime et la pyriméthamine) [8].

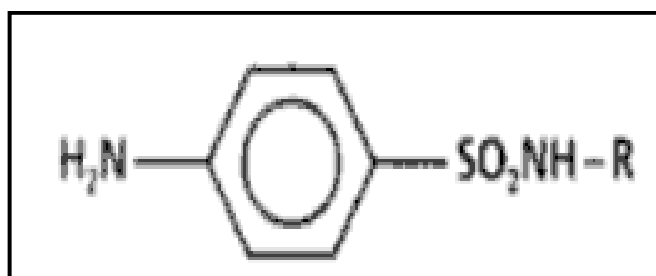


Figure 8 : Structure du noyau para-amino-benzène sulfamide [11].

3.4.1.1. Mécanisme d'action

L'unité structurale des sulfamides est proche de l'acide para-amino-benzoïque, substrat naturel de la dihydroptéroate synthétase. Grâce à cette analogie structurale, ils inhibent compétitivement cette enzyme et bloquent ainsi la synthèse de l'acide tétrahydrofolique, précurseur indispensable de la synthèse des bases puriques et pyrimidiques [8].

3.4.1.2. Classification

Pour les sulfamides seuls, on peut citer : la sulfadiazine, la sulfaméthoxazole, la sulfadoxine, la sulfaméthizol, la sulfanilamide, la sulfacétamide, la sulfadiazine argentine, la sulfaguanidine, la salazosulfa-pyridine, la mésalazine et l'olsalazine.

Pour les sulfamides en association, les plus utilisés sont : le cotrimoxazole ou bactrime (sulfaméthoxazole + triméthoprime) et l'association sulfadiazine+ triméthoprime [10]. Leur spectre d'action est résumé dans le tableau suivant :

Tableau 5 : Spectre d'activité des sulfamides [11].

Habituellement sensibles	Parfois sensibles	Toujours résistants
<i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Listeria</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Toxoplasma</i> ...	<i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Providencia</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> et <i>Streptococcus viridans</i> .	Staphylocoques Tréponèmes, <i>Neisseria</i> <i>Mycobacterium</i> , <i>Borrelia</i> <i>Pseudomonas</i> , <i>Brucella</i> <i>Bacteroides</i> , rickettsies Amibes, virus

3.5. Les antibiotiques provoquant l'altération des membranes

3.5.1. Les polymyxines

Ce groupe d'antibiotiques, de nature polypeptidique cyclique, isolés de bacilles du sol *Bacillus polymyxa*, comprend deux antibiotiques essentiels utilisés en clinique, très voisins l'un de l'autre : la polymyxine B et la colistine (polymyxine E). Les autres formes ne sont plus utilisées à cause de leur forte toxicité. Les propriétés de la colistine sont très voisines de celles de la polymyxine B avec une toxicité moindre pour le méthane sulfonate [11]. Ils sont actifs contre les bactéries à Gram négatif : *E.coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*,... [10].

3.5.1.1. Mécanisme d'action

Les polymyxines (antibiotiques cationiques) agissent en désorganisant les enveloppes bactériennes. Dans un premier temps, elles se fixent sur la membrane externe de la paroi des bacilles à Gram négatif au niveau de sites présentant des cations bivalents. Ensuite, il y a fixation sur les phospholipides de la membrane cytoplasmique [16].

3.5.2. La gramicidine

La gramicidine, pentadécapeptide linéaire, est un antibiotique naturel dont sa forme dimérique forme des canaux ioniques dans la membrane cytoplasmique des bactéries [22]. Elle est active sur les bactéries à Gram négatif [10].

1. Introduction

L'antibiothérapie est une discipline en mouvement constant du fait de la mise sur le marché chaque année de nouvelles molécules d'antibiotiques suite à l'évolution de la résistance bactérienne. Il est donc nécessaire d'adopter des règles de bon usage des antibiotiques une fois pour avoir une antibiothérapie correcte et fiable et aussi pour prévenir l'émergence de cette résistance bactérienne.

2. Critères de choix d'un antibiotique

La multitude des antibiotiques disponibles aujourd'hui nécessite le choix d'un traitement le plus adapté à une infection donnée. Trois critères essentiels doivent être pris en compte [23] :

2.1. Les critères bactériologiques

- **Identification bactérienne** : le choix initial de l'antibiotique dépend de la bactérie en cause. Dans la plupart des cas, une antibiothérapie dite « probabiliste » est souvent débutée sans attendre la confirmation bactériologique de l'infection et l'identification de son agent causal ;
- **Détermination de la sensibilité** : par la suite, ce choix dépend de la sensibilité de la bactérie en cause vis à vis de différents antibiotiques.

2.2. Les critères pharmacologiques

Ces critères sont en relation avec la concentration tissulaire de l'antibiotique, qui dépend de plusieurs paramètres :

- **Absorption** : liée à la biodisponibilité des antibiotiques ;
- **Diffusion** : liée à la qualité de la diffusion tissulaire et cellulaire des antibiotiques ainsi que la façon dont ils traversent certaines barrières naturelles ;
- **Élimination** : la voie d'élimination est utile à connaître pour adapter la posologie en cas de défaillance.

2.3. Les critères individuels

- **Femme enceinte** : seuls les β -lactamines et les aminosides peuvent être utilisés en sécurité ;
- **Nouveau-né et nourrisson** : où certains antibiotiques sont déconseillés, voir contre-indiqués (cyclines, phénicolés, quinolones et sulfamides) ;

- **Immunodéprimé** : l'antibiotique choisi doit être bactéricide, un déficit des facteurs de défense de l'organisme entraîne une infection sévère [23].

3. La résistance bactérienne

Après la découverte de la pénicilline en 1928, on croyait que le problème des infections bactériennes était résolu. Cependant, avec l'utilisation croissante et parfois injustifiée de ces molécules, les bactéries ont appris à se défendre et à s'adapter et certaines sont devenues résistantes aux antibiotiques.

La « résistance à un antibiotique » est une propriété d'une bactérie qui confère une capacité pour inactiver ou exclure l'antibiotique, ou un mécanisme qui bloque les effets bactéricides ou bactériostatiques des antibiotiques [24]. En d'autres termes, c'est un caractère phénotypique caractérisant la capacité d'une bactérie à survivre (et à se multiplier), en présence de cet antibiotique, à une concentration qui est habituellement bactéricide ou bactériostatique [25].

Actuellement, les définitions éditées de la résistance bactérienne aux antibiotiques changent considérablement. La résistance aux antibiotiques est souvent définie dans un contexte clinique (comme indicateur des résultats probables de la thérapie, y compris la capacité d'un antibiotique d'éliminer une infection), plutôt que comme attribut épidémiologique. Elle est décrite en termes des caractéristiques phénotypiques et/ou génotypiques des bactéries, et peut être classée par catégorie selon l'origine (intrinsèque ou acquise) ou le type (simple, multiple ou croisée) [26].

3.1. Types de résistance

Selon leur origine, on distingue deux types de résistance :

3.1.1. Résistance naturelle (intrinsèque)

La résistance naturelle est une caractéristique propre aux souches d'une espèce bactérienne. Elle détermine les phénotypes sauvages des espèces bactériennes. Elle est transmissible à la descendance car portée par un chromosome (fait partie du patrimoine génétique habituel de l'espèce) [13, 27]. Elle contribue à définir le spectre antibactérien d'un antibiotique. On peut citer comme exemple la résistance des entérobactéries aux macrolides, des *Proteus mirabilis* aux tétracyclines, des streptocoques aux aminosides (bas niveau de résistance) [13].

3.1.2. Résistance acquise

La résistance acquise ne s'applique qu'à certaines souches au sein de la même espèce bactérienne, variable dans le temps. Elle est transmissible horizontalement entre bactéries d'une même espèce, parfois entre espèces différentes (rôle dans les épidémies). La transmission verticale de la bactérie mère à fille est possible, en l'absence d'une pression de sélection permettant de la stabiliser. La résistance acquise est due à une modification génétique : mutation ponctuelle, remaniement du génome ou acquisition de matériel génétique étranger [26].

3.2. Mécanismes de la résistance

Les mécanismes de la résistance aux antimicrobiens traitants les maladies infectieuses ont été connus avant même que les antibiotiques ont été introduits dans l'utilisation clinique courante [28].

Les bactéries peuvent manifester la résistance aux antibiotiques par une variété de mécanismes. Les mécanismes génétiques incluent des mutations et des phénomènes d'acquisition de nouvelles molécules d'ADN (plasmides, éléments génétiques transposables et intégrons). Les mécanismes biochimiques permettent l'inactivation des antibiotiques, réduction de l'accès intracellulaire des antibiotiques (impermeabilité) ou le changement du site d'action des antibiotiques (modification de la cible) [29].

3.2.1. Mécanismes génétiques de la résistance

Sur le plan génétique, une bactérie peut ainsi acquérir une résistance aux antibiotiques par deux grands mécanismes. L'un a pour support le chromosome et définit une résistance chromosomique, l'autre a pour support les plasmides ou les éléments transposables ou les intégrons et ils définissent une résistance extra-chromosomique [27].

3.2.1.1. Résistance chromosomique

Les bactéries susceptibles peuvent acquérir la résistance à un agent antimicrobien par l'intermédiaire de nouvelles mutations chromosomiques [29]. Ces mutations sont responsables d'une modification ou d'une perte d'un gène et peuvent donc entraîner [13] :

- Une modification de la perméabilité à un ou plusieurs antibiotiques (cas des porines ou du lipopolysaccharide de paroi) ;

- Une modification de la cible pariétale (cas des protéines liant la pénicilline ou PLP) ou intracellulaire (ADN gyrase pour les quinolones, ARN polymérase, ribosomes).

La résistance par cette mutation chromosomique présente plusieurs caractères spécifiques. C'est un phénomène rare, spontané et spécifique pour une seule famille d'antibiotique. La résistance résultante est stable et transmissible (présente un caractère héréditaire). L'indépendance, c'est-à-dire la probabilité de deux mutations simultanées est égale au produit du taux des mutations et elle est donc très faible. Cette indépendance des mutations constitue un des meilleurs arguments pour justifier l'association des antibiotiques [13].

3.2.1.2. Résistance extra-chromosomique

La résistance par l'acquisition de nouvelles molécules d'ADN permet à une bactérie d'acquérir une nouvelle information génétique soit sous forme d'ADN plasmidique ou de transposons.

3.2.1.2.1. Les plasmides

Les plasmides sont des segments d'ADN circulaire qui se répliquent indépendamment du chromosome bactérien et transmettent des résistances multiples à différentes espèces bactériennes par des mécanismes d'échange génétique. Trois mécanismes permettent ces transferts de plasmides [4] :

- Transduction : dans la transduction, le vecteur est un bactériophage (virus) qui, en se répliquant, intègre son ADN à celui de la bactérie. Quand il quitte la bactérie, il peut amener des gènes bactériens dont celui de la résistance à l'antibiotique. Il pourra ensuite transférer ces gènes de résistances aux nouvelles bactéries qu'il contaminera ;
- Transformation : elle correspondre à la capture d'ADN exogène par des bactéries. Cet ADN exogène peut provenir d'une bactérie lysée ;
- Conjugaison : c'est un processus au cours duquel de l'ADN est transféré d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse par un mécanisme nécessitant le contact entre les deux bactéries. C'est le phénomène le plus répandu des trois.

Dans les années 1960, la première β -lactamase plasmidique TEM-1 a été décrite. Cette enzyme a été retrouvée chez *E.coli* isolée du sang d'un patient en Grèce dont les trois premières lettres du nom étaient TEM (Temoniera) [18]. Par le biais d'une transmission plasmidique, cette souche s'est propagée à plusieurs espèces d'entérobactéries. Elle est responsable de presque 80% des résistances plasmidiques liées à une β -lactamase [30].

Ces transferts sur un mode horizontal par conjugaison, transduction et transformation sont à l'origine d'une dissémination très importante au sein des populations bactériennes ce qui fait qualifier la résistance plasmidique de contagieuse ou d'infectieuse. Cette dissémination des gènes de résistance est exacerbée par la présence d'éléments génétiques transposables et d'intégrons.

3.2.1.2.2. Les transposons et les intégrons

Les transposons et les intégrons sont des séquences d'ADN mobile qui peuvent s'insérer dans des régions d'ADN chromosomique ou plasmidique des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, autrement dit capables de promouvoir leur translocation d'un réplicon à un autre.

Les transposons associés à la résistance aux antibiotiques peuvent être classés en 3 classes majeurs selon leurs structures générales et leurs mécanismes d'insertion. Les deux premières classes consistent des transposons composites et non-composites qui peuvent interagir avec la cible d'ADN en générant des répétitions directes sur cette séquence cible. Les gènes de résistance aux antibiotiques existant sur ces deux classes de transposons sont flanqués entre des séquences d'insertion, apportant l'information génétique nécessaire au processus de transposition, (pour les transposons composites) ou des séquences répétées inversées (pour les non-composites) [16].

La troisième classe définit les transposons conjugatifs qui sont capables de s'exciser d'une molécule d'ADN chromosomique ou plasmidique d'une bactérie donneuse et de se transférer à une bactérie receveuse par conjugaison [31]. Ces transposons expliquent la présence de gènes chez des espèces éloignées génétiquement et celle de plasmides non autotransférables. Chez *Streptococcus pneumoniae*, aucun plasmide n'a encore été retrouvé, et l'on pense que l'apparition de multirésistance dans le chromosome est liée à l'acquisition de transposons [16].

Les intégrons sont des éléments génétiques de capture et d'expression de régions codantes exogènes généralement sans promoteur connues sous le nom de « cassettes » [32]. Les intégrons ont surtout été étudiés chez les bactéries à Gram négatif mais ont aussi été mis en évidence chez des bactéries à Gram positif (Corynebactéries, Entérocoques) [33].

Décrits pour la première fois vers la fin des années 1980, ils sont composés de trois éléments fonctionnels essentiels : un gène (*intI*) codant une intégrase responsable de l'acquisition des cassettes par recombinaison spécifique de site, un site de recombinaison (*attI*) et un promoteur Pc (Figure 9). L'intégrase est capable de catalyser l'intégration ou l'excision d'une cassette. L'intégration se fait généralement au site *attI*, en aval du promoteur Pc, permettant ainsi l'expression du gène nouvellement inséré [32].

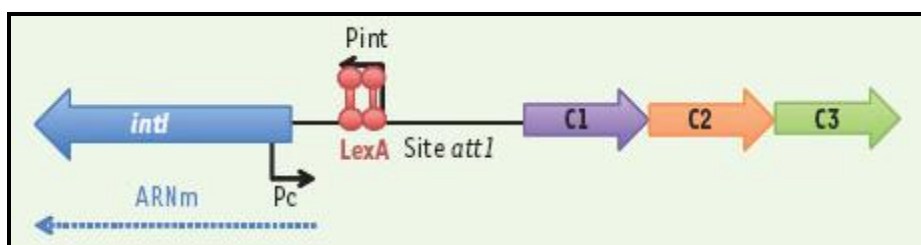


Figure 9: Schéma d'un intégron [32].

On distingue deux types d'intégrons : les intégrons de multirésistance (MRI) généralement portés par des plasmides ou des transposons, et les intégrons chromosomiques, appelés aussi super-intégrons (SI) car ils contiennent un grand nombre de cassettes (entre 20 et 200 cassettes aux fonctions pour la plupart inconnues) [34].

3.2.2. Mécanismes biochimiques de la résistance

A partir des conditions d'activités des antibiotiques (pénétrer dans la bactérie, ne pas être inactivés, se lier à la cible), on peut imaginer les principaux moyens dont disposent les bactéries pour résister aux antibiotiques. Ces moyens sont regroupés en trois types de stratégies de résistance :

- La réduction des concentrations intracellulaires d'antibiotique. Ce phénomène peut être dû à une imperméabilité et/ou à un transport actif vers l'extérieur de la cellule *via* des transporteurs membranaires appelés pompes d'efflux ;
- La modification des cibles des antibiotiques empêchant l'action de ces derniers ;
- La production d'enzymes inactivatrices des antibiotiques.

3.2.2.1. Phénomènes d'imperméabilité et d'efflux

Pour qu'il soit actif, un antibiotique doit atteindre son site bactérien en traversant les différents obstacles mis par la bactérie et s'accumuler à une certaine concentration pouvant donner une réponse efficace. Les obstacles potentiels varient selon la localisation de la cible de l'antibiotique et selon le type bactérien : Gram positif et Gram négatif. On peut retenir : la capsule, la membrane externe, l'espace périplasmique, le peptidoglycane et la membrane cytoplasmique.

La capsule n'est pas un obstacle pour la rétention des antibiotiques, en plus le peptidoglycane est un réseau lâche qui ne joue pas de rôle dans la rétention des substances, y compris des antibiotiques. L'espace périplasmique n'est qu'un bain où peuvent se trouver des enzymes qui détruiront les antibiotiques. Ça reste donc les deux membranes lipidiques : la membrane externe (bactéries à Gram négatif) et la membrane cytoplasmique [5].

Le mécanisme d'imperméabilité ne concerne que les bactéries à Gram négatif, habituellement enveloppée d'une membrane externe où se situent les porines et que certaines antibiotiques pénétrant uniquement par des canaux (dont les parois sont formées par des protéines ou porines) traversant cette membrane. Cette bicouche lipidique est peu perméable aux molécules hydrophiles que sont la majorité des antibiotiques. L'absence de porines, donc de canaux ne permet plus à ces antibiotiques de pénétrer et confère une résistance [5, 35].

Pour la résistance naturelle ; la pénicilline G, les macrolides et glycopeptides ne peuvent traverser la membrane externe des bactéries à Gram négatif. En plus, la moindre sensibilité des *Pseudomonas* par rapport aux autres entérobactéries vis-à-vis d'un grand nombre de molécules est due au nombre beaucoup plus réduit de ces canaux et leur moindre perméabilité [5].

Le même mécanisme est aussi mis en cause pour les résistances acquises, la démonstration première en fut apportée en 1981 [36]. La plus notable concerne une bactérie difficile à éradiquer et un antibiotique considéré comme extrêmement puissant, l'imipénème : l'absence de porines OprD est suivie d'une résistance à l'imipénème [37].

Après la membrane externe, la membrane cytoplasmique possède aussi un rôle important dans la résistance. Les aminosides franchissent cette membrane par un mécanisme de transport actif nécessitant de l'énergie provenant de la chaîne respiratoire.

Or, les bactéries anaérobies strictes et les bactéries anaérobies aéro-tolérantes comme les streptocoques en sont dépourvus, ce qui explique leur résistance naturelle vis-à-vis des aminosides [5].

Le système d'efflux, comme un mécanisme de résistance aux antibiotiques, est décrit originellement pour les tétracyclines [38] et est maintenant bien apprécié et généralement trouvé. Les transporteurs bactériens d'efflux de drogues sont actuellement classifiés dans cinq familles (Figure 10) :

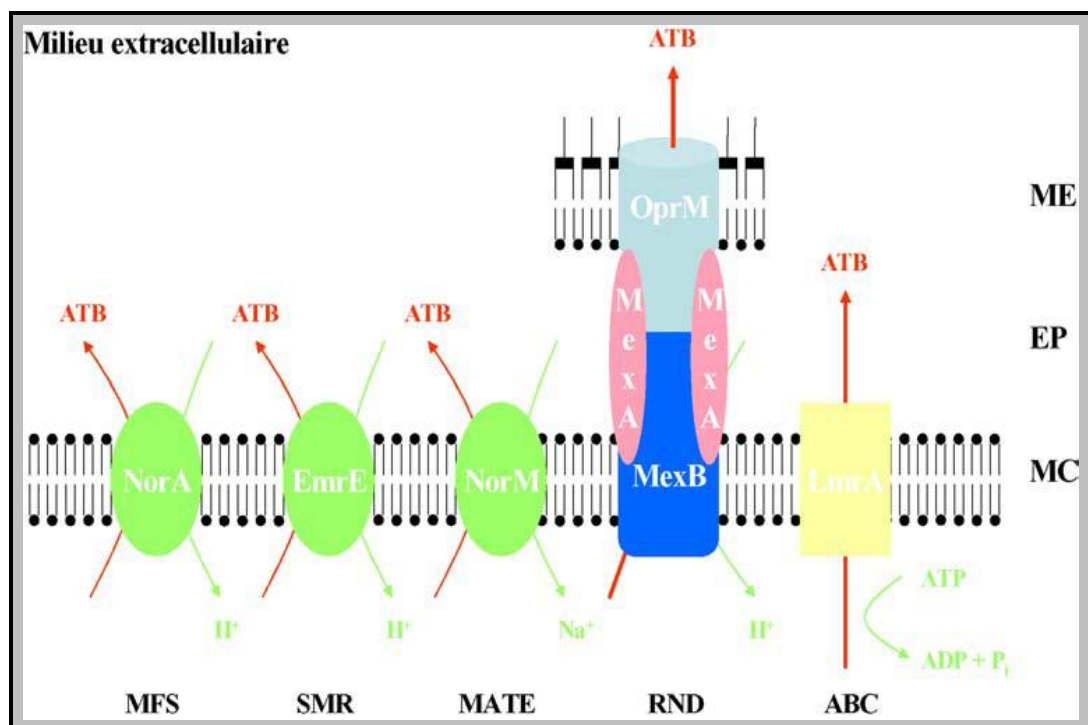


Figure 10 : Représentation schématique des cinq familles de pompes d'efflux [39]. **MFS** ou *major facilitator superfamily* (ex : **NorA** chez *Staphylococcus aureus*) ; **SMR** ou *small multidrug resistance* (ex. **EmrE** chez *Escherichia coli*) ; **MATE** ou *multidrug and toxic compound extrusion* (ex. **NorM** chez *Vibrio parahaemolyticus*) ; **RND** ou *resistance-nodulation cell division* (ex. **MexB** chez *Pseudomonas aeruginosa*) avec **MexA** (*membrane fusion protein*) et **OprM** (*outer membrane factor*) ; **ABC** ou *ATP-binding cassette* (ex. **LmrA** chez *Lactococcus lactis*) ; **ME** : membrane externe ; **EP** : espace périplasmique ; **MC** : membrane cytoplasmique ; **ATB** : antibiotique.

Ces pompes peuvent être des transporteurs drogue-spécifiques et conférer une résistance vis-à-vis d'une seule classe d'antibiotiques (ex. pompes d'efflux des tétracyclines «Tet» ou des macrolides «Mef») [40]. Cependant, la plupart de ces transporteurs peuvent prendre en charge des composés de structure très différente et contribuer ainsi de manière significative à la multi-résistance (MDR : multidrug resistance) naturelle et acquise des bactéries vis-à-vis des antibiotiques [41].

Les gènes encodant les pompes drogue-spécifiques sont souvent retrouvés sur des éléments génétiques mobiles (plasmides ou transposons) alors que ceux qui encodent les pompes MDR sont pour la plupart chromosomiques [42].

Pour fonctionner, les pompes d'efflux utilisent l'énergie fournie par dissipation d'un gradient de protons (familles MFS, RND et SMR) ou d'ions sodium (famille MATE) ou encore par hydrolyse d'ATP (famille ABC) [39].

Chez les bactéries à Gram négatif, les systèmes d'efflux sont souvent des complexes protéiques ternaires avec une pompe transmembranaire, une protéine périplasmique de jonction et une porine de la membrane externe. Les pompes les plus fréquemment rencontrées sont de type RND comme AcrB chez *Escherichia coli* ou MexB chez *Pseudomonas aeruginosa*. Chez les bactéries à Gram positif, les systèmes d'efflux ne sont constitués que de la pompe. Les plus étudiés sont les pompes MFS comme NorA ou QacA chez *Staphylococcus aureus* et PmrA chez *Streptococcus pneumoniae* [39, 43].

3.2.2.2. Modification de la cible

La fixation de l'antibiotique sur sa cible constitue le plus souvent une étape essentielle dans son mode d'action. Une modification de cette cible peut entraîner une diminution de l'affinité et donc de l'efficacité de l'antibiotique. Plusieurs cibles sont concernées :

3.2.2.2.1. Modification des protéines de liaison à la pénicilline (PLP)

Les PLP sont des enzymes impliquées dans la synthèse du peptidoglycane et dont les activités transpeptidasiques et carboxypeptidasiques peuvent être inhibées après fixation de différentes β -lactamines.

La résistance de *Staphylococcus aureus* à la méticilline (SARM) par modification de la cible, appelée aussi résistance intrinsèque, est due à la production d'une nouvelle PLP appelée «PLP2a» ou «PLP2'» présentant peu d'affinité pour la méticilline et toutes les autres β -lactamines [44]. La «PLP2a» est codée par le gène *mecA* dont l'expression dépend au moins de deux systèmes régulateurs agissant au niveau transcriptionnel [45].

Chez *Streptococcus pneumoniae*, Les PLP altérées sont produits par des événements de recombinaison entre les gènes *PBP* du *S. pneumoniae* et les gènes *PBP* d'autres espèces de streptocoques étroitement liées, acquis par transformation naturelle de cette compétence [46, 47].

Une mutation sur le PLP1 (codé par le gène *ponA*) peut aussi contribuer à un haut niveau de résistance à la pénicilline. Cette mutation, produisant un changement d'un acide aminé sur le PLP1, a été identifiée pour la résistance aux pénicillines chez des souches de *Neisseria gonorrhoeae* [48].

3.2.2.2.2. Modifications des précurseurs de peptidoglycane

La plus fréquente cause de la résistance des *Enterococcus faecalis* et *E. faecium* aux glycopeptides est l'acquisition d'un ou deux gènes nommés *VanA* et *VanB*. Ces faisceaux de gène codent pour des enzymes produisant des précurseurs modifiés de peptidoglycane au niveau de la chaîne terminale (D-Ala-D-Lac) au lieu de (D-Ala-D-Ala) [49].

3.2.2.2.3. Modifications du ribosome

Les macrolides, les lincosamides et streptogramine B bloquent la synthèse protéique des bactéries en se fixant sur la sous unité 50S du ribosome [50]. La résistance à ces antibiotiques, dite MLS (B), résulte d'une modification post-transcriptionnelle de l'ARNr 23S de la sous unité 50S du ribosome, impliquant une méthylation ou diméthylation d'une adénine dans le domaine fonctionnel de la peptidyl-transférase. Ces mutations au niveau des sites de méthylation sont associées à la résistance aux macrolides des différents groupes d'organismes [51, 52].

3.2.2.2.4. Modifications des topoisomérases

L'ADN gyrase et la topoisomérase IV sont inhibées par les fluoroquinolones [53]. La résistance à ces antibiotiques peut résulter de mutations chromosomiques de ces deux enzymes [54].

L'altération de l'une des deux sous unités de l'ADN gyrase (GyrA ou GyrB) est la plus commune des résistances aux fluoroquinolones chez les bactéries à Gram négatif, en diminuant l'affinité du complexe de l'ADN gyrase à l'antibiotique [55].

3.2.2.2.5. Modifications de l'ARN polymérase

La résistance à la rifampicine est due à une altération de la sous unité β de l'ARN polymérase codée par le gène *rpoB*. Des mutations sur ce gène conduisent à une forte résistance à la rifampicine chez *Mycobacterium tuberculosis* [56].

3.2.2.2.6. Modification du facteur d'élongation

L'acide fusidique bloque la synthèse protéique bactérienne chez les staphylocoques en interférant avec la fonction du facteur d'élongation [57].

3.2.2.3. Inactivation enzymatique de l'antibiotique

L'inactivation enzymatique des antibiotiques par hydrolyse ou par modification est le mécanisme majeur de la résistance aux antibiotiques naturels (comme les β -lactamines « pénicillines et céphalosporines », les aminoglycosides et le chloramphénicol) chez les bactéries pathogènes. Le cas le plus ancien est l'hydrolyse enzymatique du cycle β -lactame des pénicillines et des céphalosporines par les β -lactamases, donnant des produits incapables d'inhiber leurs cibles, les PLP [58,59].

A l'inverse des β -lactamines, les aminoglycosides ne possèdent pas de groupement facilement hydrolysable, l'inactivation enzymatique consiste donc à une modification des groupements OH et NH₂ de ces antibiotiques. Trois types d'enzymes de modification sont connus : les acétyltransférases, les phosphotransférase et les adényltransférases [60, 61].

Malgré que l'hydrolyse et la modification représentent les deux voies principales de la résistance enzymatique aux antibiotiques, il existe de nombreuses voies alternatives exploitées par les bactéries pour cette résistance [62] :

- Les enzymes d'oxydoréduction (redox) : le cas le plus étudié pour cette stratégie est l'oxydation de la tétracycline par une enzyme TetX ; le gène codant cette enzymes a été trouvé dans un transposon conjugatif chez une espèce anaérobique obligatoire, *Bacteroides fragilis* ;
- Les lyases : il y a une lyase de résistance bien caractérisé, Vgb, qui est responsable de la résistance du type Streptogramine B. La résistance aux streptogramines B [catégorie d'antibiotique composée de deux sous-groupes d'antibiotiques, notamment Groupe A (ex. dalfopriline) et Groupe B (ex. quinopriline)] est conférée par des enzymes lyases streptogramine B (Vgb), qui scindent la structure cyclique de ces antibiotiques.

4. Monothérapie et association d'antibiotique (Bithérapie)

L'optimisation de l'utilisation des antibiotiques impose la recherche d'une efficacité maximale, de conséquences écologiques minimales sur l'évolution des flores bactériennes, d'une moindre toxicité et du meilleur rapport coût/bénéfice. En début du traitement des infections, l'association est la règle pour élargir le spectre d'activité. Dès que le diagnostic bactériologique est obtenu et que le traitement peut être ciblé, il soit raisonnable de supprimer un des partenaires de l'association pour passer à une monothérapie [16].

Les différents antibiotiques en monothérapie et ceux en bithérapie ainsi que leurs fréquences d'utilisation sont représentés dans les tableaux suivants :

Tableau 6 : Les antibiotiques en monothérapie et leurs fréquences d'utilisation [16].

Les antibiotiques	%
β -lactamines (tout)	71,2
dont céphalosporines	28,8
Clindamycine	15,3
Glycopeptides	6,7
Amoxicilline et acide fusidique	3,4
Fosfomycine	1,7
Fuoroquinolones	1,7

Tableau 7 : Les antibiotiques en association et leurs fréquences d'utilisation [16].

Association	%
β -lactamines - aminosides	22,7
Céphalosporines - aminosides	18,2
Céphalosporines - fosfomycine	15,2
β -lactamines - β -lactamines	12,1
Acide fusidique - macrolides	4,5
Autres	27,3

4.1. Bases théoriques et expérimentales de l'association des antibiotiques

La décision de l'utilisation ou non d'une association d'antibiotiques dépend de nombreux facteurs liés principalement aux bactéries responsables et aussi de l'état général du malade.

Ces facteurs, la difficulté de traiter ces bactéries, l'émergence de mutants résistants et la gravité des malades, sont à la base des objectifs théoriques de la pratique d'une association et qui sont les suivants [63] :

4.1.1. Elargir le spectre

L'intérêt de l'élargissement du spectre est d'augmenter la chance de succès dans les premiers jours d'une antibiothérapie probabiliste ou dans des infections polymicrobiennes.

4.1.2. Obtenir une synergie

Le recours aux associations pourrait se justifier lorsque l'index thérapeutique de l'antibiotique (rapport de sa concentration et la CMI du germe au site de l'infection) est faible ou que les défenses locales ou générales sont inopérantes, en raison par exemple à une immunodépression. Les données expérimentales *in vitro* d'une synergie ne sont pas toujours extrapolable en clinique. En effet, les conditions d'action *in vivo* de deux antibiotiques peuvent être influencés par des paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques mal pris en compte *in vitro*.

4.1.3. Diminuer l'émergence de souches résistantes

L'un des arguments mis en avant pour choisir des associations d'antibiotiques tient au fait que la probabilité d'avoir affaire à une souche résistante simultanément aux deux antibiotiques est très faible. Si l'on admet que les deux événements de résistance sont indépendants, cette probabilité est en effet le produit des probabilités de chaque événement. En plus, il faut recommander une association de deux antibiotiques non affectés par le même mécanisme de résistance, et pénétrant tous deux correctement au site de l'infection, afin d'obtenir une bithérapie affective.

4.1.4. Diminuer la toxicité du traitement

C'est l'objectif illusoire d'une association d'antibiotiques, car il n'est pas question d'utiliser l'un ou l'autre des antibiotiques à une posologie suboptimale. On peut craindre au contraire de voir les toxicités des médicaments s'additionner, voire se potentialiser lorsqu'elles partagent la même cible : par exemple la toxicité rénale lorsque l'on associe la vancomycine et un aminoside.

4.2. Les effets des associations d'antibiotiques

On distingue quatre effets d'association d'antibiotique [64] :

- **Indifférence** : l'activité de l'association n'est ni supérieure ni inférieure à celle de chacun des deux antibiotiques pris isolément ;
- **Addition** : l'effet de l'association est égale à la somme des effets de chaque antibiotique pris isolément ;
- **Synergie** : l'effet est supérieur à la somme des effets de chaque antibiotique pris isolément ;
- **Antagonisme** : l'activité est inférieure à la somme des effets de deux antibiotiques.

4.3. Méthodes d'étude de l'activité bactérienne d'un antibiotique

Pour connaître le pouvoir bactériostatique et bactéricide d'un antibiotique, deux paramètres doivent être déterminés, la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) :

4.3.1. Détermination de la CMI

C'est la plus faible concentration d'antibiotique inhibant 100% de la croissance bactérienne. Elle est mesurée soit par méthode de dilution ou par méthode de diffusion [65] :

4.3.1.1. Méthode de dilution

- **En milieu liquide** : des dilutions sériées d'une solution mère d'antibiotique sont préparées suivant une progression géométrique de raison de 1/2. Par la suite, une addition, pour chaque dilution, d'une même quantité d'inoculum du germe à étudier permet de déterminer, après incubation à 37°C pendant 18 à 24 heures, la plus faible concentration de l'antibiotique pour laquelle il n'y a pas de croissance visible ;
- **En milieu solide** : chaque dilution de l'antibiotique est incorporée dans une gélose, maintenue liquide à 42°C, puis coulée en boîte Pétri. Après solidification, les boîtes sontensemencées avec la suspension de la bactérie à étudier. Après incubation à 37°C pendant 18 à 24 heures, la CMI est déterminée par la plus faible concentration ne donnant pas de croissance (Figure 11).

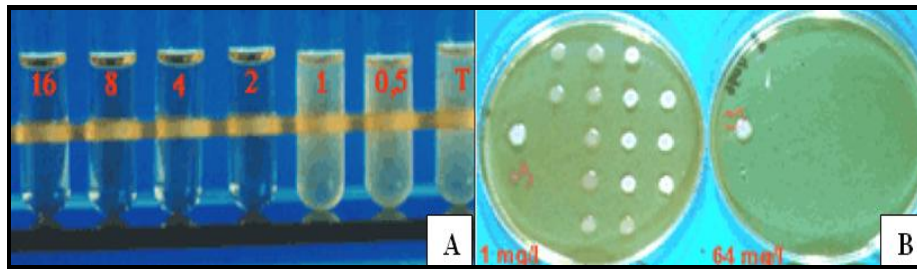


Figure 11 : Détermination de la CMI par méthode de dilution. **A** : en milieu liquide ;
B : en milieu solide [66].

4.3.1.2. Méthode de diffusion

- **Par des disques** : elle consiste en premier lieu àensemencer en surface d'un milieu solide, par inondation ou par écouvillonnage, la bactérie à tester puis à déposer des disques de papier buvard contenant un antibiotique à une certaine concentration. Après incubation d'une nuit à 37°C, des zones d'inhibitions à proximité de chaque disque sont observées. Il est possible de calculer la CMI en reportant le diamètre de la zone d'inhibition sur une courbe de concordance, préétablie à l'avance avec une centaine de souches de sensibilités différentes ;
- **Par les bandelettes E-test** : une bandelette est imprégnée de quantité croissante d'antibiotique. Elle est placée sur une gélose ensemencée par la bactérie à étudier. Après incubation au même conditions, la zone d'inhibition a la forme d'un ellipse et la lecture est alors directe sur la bandelette (Figure 12).

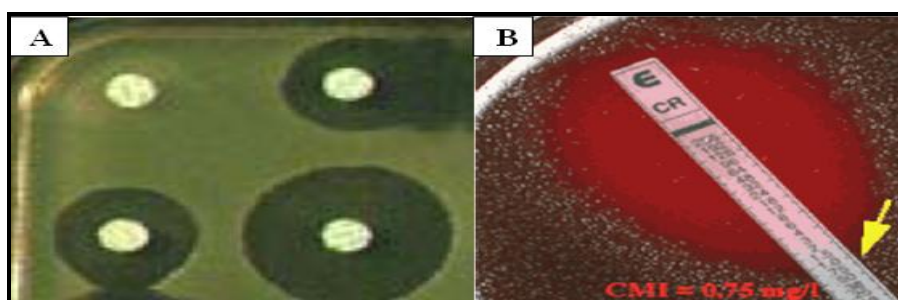


Figure 12 : Détermination de la CMI par méthode de diffusion. **A** : par des disques ;
B : par les bandelettes E-test [66].

4.3.2. Détermination de la CMB

C'est la plus faible concentration d'antibiotique laissant moins de 0,01% de survivants de l'inoculum initial après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C. Cette valeur peut se mesurer à temps fixe ou à temps variable, souvent avec 18 heures de contact bactérie/antibiotique.

Les techniques de calcul sont basées sur des dénombrements des survivants dans l'inoculum bactérien avant et après l'action des antibiotiques [65].

4.4. Techniques d'étude de l'association binaire des antibiotiques

La difficulté de l'étude des associations réside dans la mise au point de techniques qui, pour chaque couple testé, permettent de définir quantitativement les effets conjoints bactériostatiques et bactéricides du plus grand nombre possible de concentrations de chaque antibiotique [67].

Différentes techniques d'évaluation de l'activité antibactérienne peuvent être mises en œuvre. Elles reposent principalement sur la mesure de la CMI et de la CMB :

4.4.1. Méthodes en milieu solide

Il est possible d'utiliser des bandes de papier imprégnées d'une quantité adéquate d'antibiotique. L'observation des images permet de prédire l'effet de l'association en examinant avec attention la zone où les deux antibiotiques ont codiffusé (Figure 13) [65].

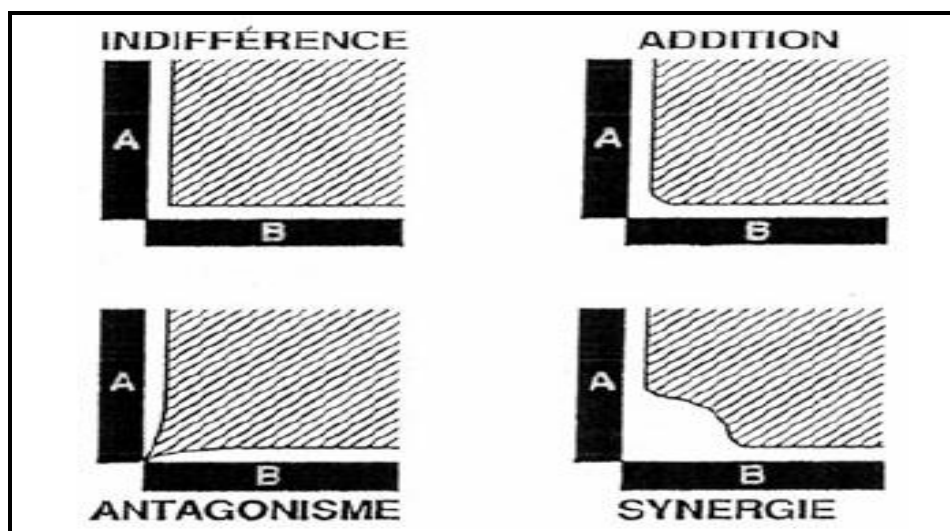


Figure 13 : Détermination des effets des associations d'antibiotiques par bandelettes [65].

4.4.2. Méthodes par dilution en milieu liquide

4.4.2.1. Le schéma triangulaire

Cette technique utilise seulement une concentration de chaque antibiotique, choisie dans la zone des taux sériques obtenus à posologie normale, c'est le schéma triangulaire (Figure 14). L'utilisation des disques d'antibiotique réimprégnés du commerce allège la « logistique antibiotique » mais se révèle moins précise que les solutions titrées [64, 67].

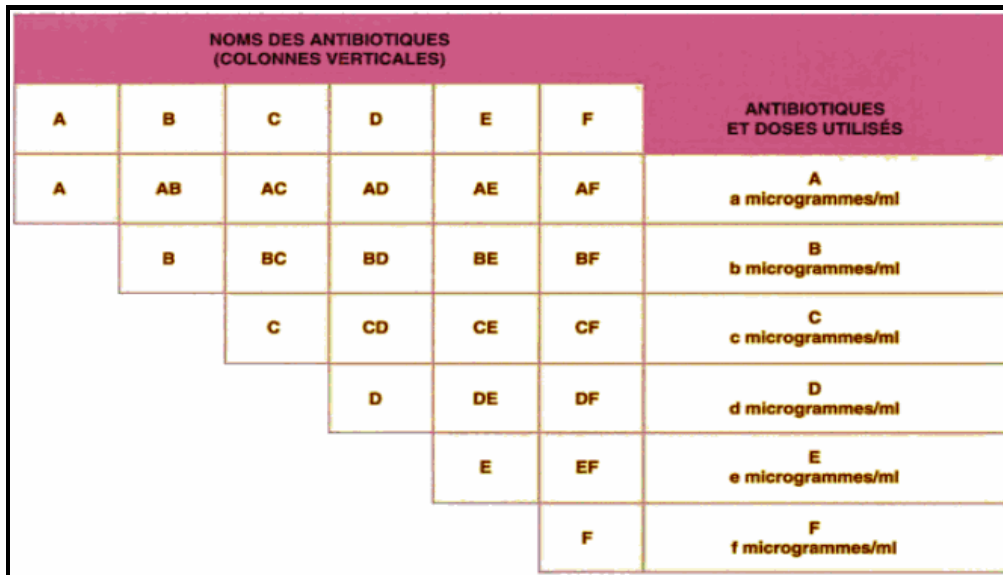


Figure 14 : Schéma triangulaire d'étude de l'association d'antibiotiques [64].

A et a sont respectivement le nom et la concentration de l'antibiotique n° 1 (etc...)

4.4.2.2. La technique de l'échiquier

La méthode est identique à la détermination de la CMI en milieu liquide mais les concentrations d'antibiotiques sont associées entre elles deux à deux selon un schéma carré en microplaque. Chaque concentration d'un antibiotique A est couplée à une concentration d'un antibiotique B et vis vers ça [64] (Figure 15). La technique sera mieux décrite dans la partie expérimentale.

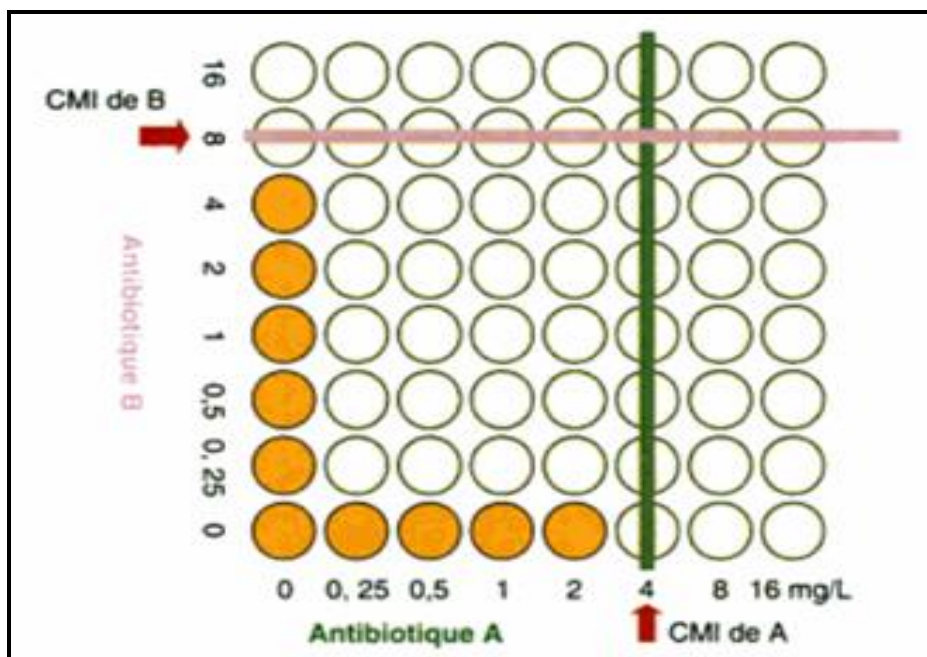


Figure 15 : Etude de l'association par la technique de l'échiquier [64].

4.5. Corrélation entre études *in vitro* et résultats *in vivo*

Les mesures de l'activité antibactérienne sont effectuées avec une suspension bactérienne de densité définie et des concentrations en antibiotiques qui restent stable pendant la durée de l'étude. Chez les patients, la concentration d'antibiotique varie dans le temps et selon les compartiments de l'organisme dont le compartiment plasmatique est le plus connu alors que les autres étant plus difficiles à étudier. De plus, la multiplication intracellulaire de certaines bactéries influence la capacité de pénétration de l'antibiotique ce qui le rend un paramètre important. Pour ces raisons, l'évaluation de l'efficacité des antibiotiques (isolés ou en association) s'appuie aussi sur des modèles expérimentaux et en dernier ressort sur les résultats d'essais cliniques [18].

1. Introduction

Notre objectif dans cette étude est, dans un premier temps, d'estimer la qualité microbiologie de Sebket Ouled M'barek puis étudier l'antibiorésistance des espèces bactériennes isolées afin de voir l'effet de certaines associations d'antibiotiques sur ces dernières.

2. Description du site

Les zones humides les plus spacieuses des hautes plaines de l'Est algérien se trouvent encerclés dans la région des Sebchas enclavée entre les wilayas d'Oum El-Bouaghi, de Khenchela et de Batna. Ces milieux sont dans leur majorité très salés, difficilement accessibles et très peu de littérature scientifique les décrit [68] (Figure 16).

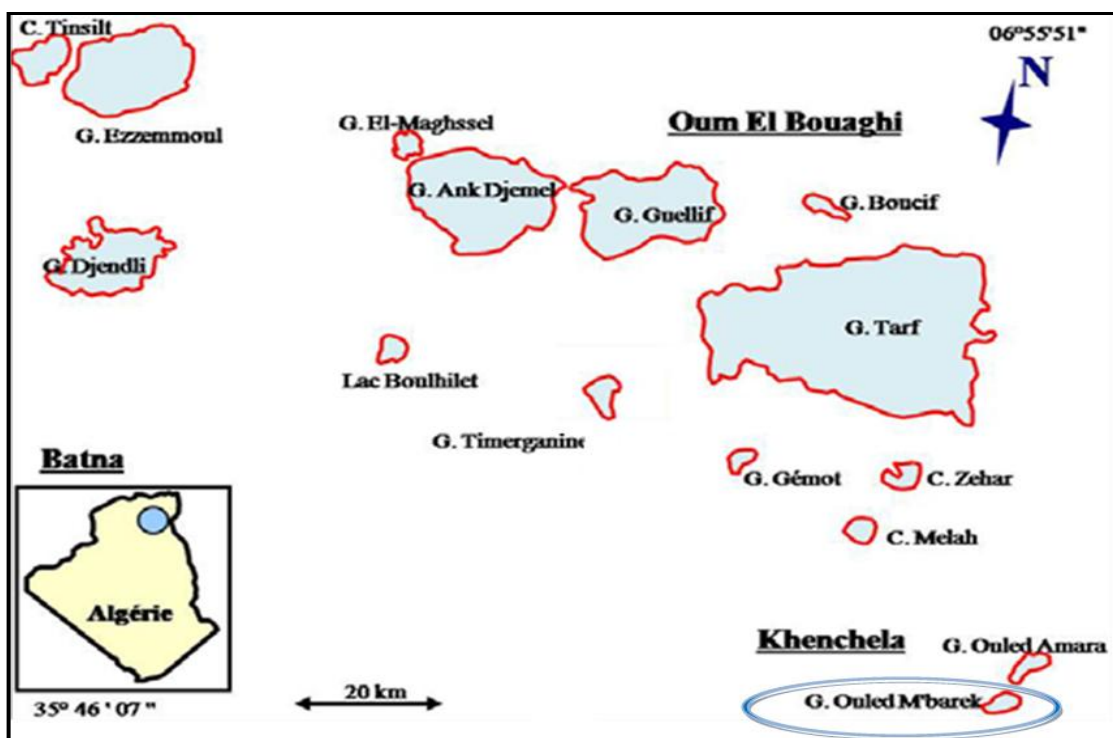


Figure 16 : Situation géographique des zones humides des hautes plaines de l'Est algérien [69].

La Sebcha d'Ouled M'barek (950ha) [69] constitue une des zones humides les plus importantes de la wilaya de Khenchela. Elle est pratiquement en eau pendant toute l'année en plus qu'elle est fréquentée par une avifaune aquatique diversifiée. Actuellement, elle reçoit un apport important des rejets des eaux usées de la région, conduisant à une pollution remarquable du site.

Ce plan d'eau (35°23,378'N, 07°20,315'E) [69] est situé au Nord de la route nationale N° 32 reliant Khenchela à Zoui. Pour sa localisation géographique, elle est encerclée, avec Sebkheth Ouled Amara (35°20,261'N, 07°15,429'E) [69], par Djebel Chettaïa à l'Ouest, Djebel Tafrennt au Nord, Djebel Tadelist et Djebel Tadinart au Sud, alors qu'à l'Est elle s'ouvre sur la plaine de Dhalaa [68] (figure 17).

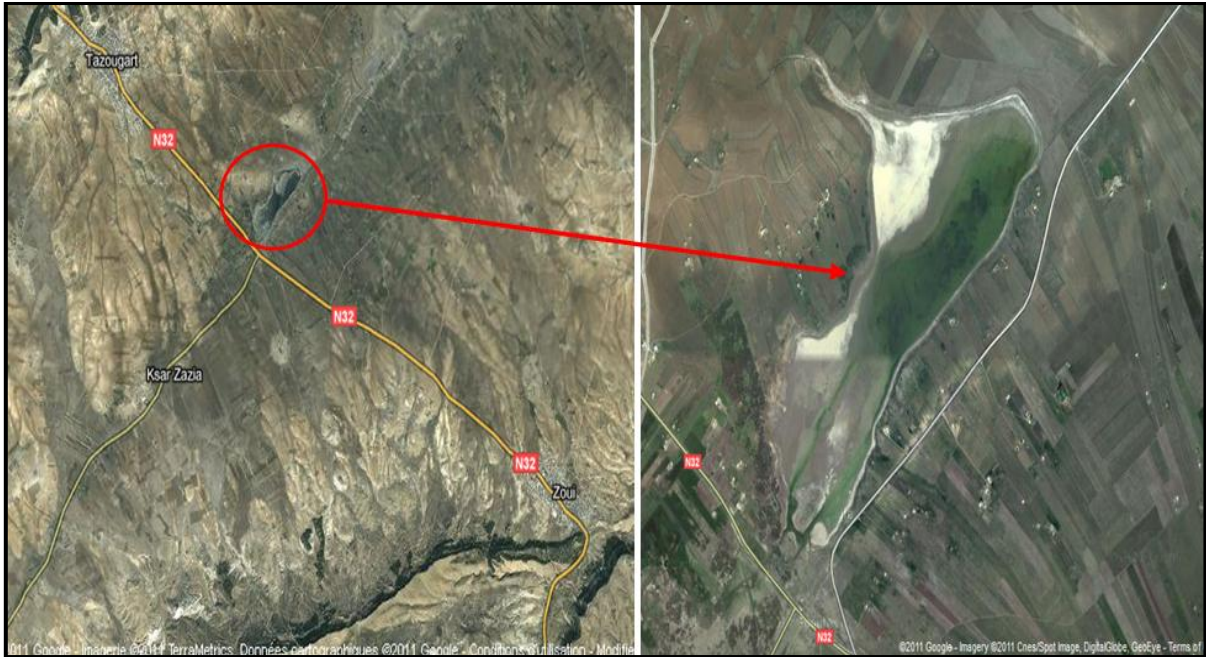


Figure 17 : Sebkheth Ouled M'barek [70].

3. L'échantillonnage

Nos prélèvements ont été réalisés entre les mois de Mars et d'Avril au niveau de Sebkheth Ouled M'barek. Trois points de prélèvement (P1, P2 et P3) ont été choisis. Ce choix n'est pas fortuit mais a pour but de bien estimer la qualité de ce plan d'eau :

- Le point P1, situé à l'Est du lac, est caractérisé par la présence d'une végétation dégagée et par la présence du rejet d'égout des eaux usées de la région ;
- Le point P2, au milieu du lac, est caractérisé par une absence de la végétation ;
- Le point P3, à l'Ouest du lac, est caractérisé par une absence de la végétation et présence d'une avifaune plus ou moins importante.

Pour ces prélèvements, des flacons en verre d'une contenance de 250ml, préalablement stérilisés dans un four Pasteur à 180°C pendant 1 heure, ont été utilisés. On fait introduire le flacon fermé dans le lac (2 à 3m du bord) à mi profondeur (environ 25cm), puis l'ouvrir et laisser se remplir tout en évitant la remise en suspension des dépôts. Avant de faire sortir, le flacon est fermé hermétiquement sans laisser des bulles d'air.

Les échantillons ont été transportés au laboratoire le plus vite possible dans une glacière à 4°C pour minimiser les risques de subir des modifications dans les flacons.

Le délai maximum entre le prélèvement et l'analyse ne doit pas excéder les 24 heures et il est préférable de raccourcir ce délai lorsque l'eau est présumée très polluée [71].

4. L'analyse bactériologique

L'évaluation de la qualité microbiologique des eaux est basée sur le concept de germes dits "indicateurs". Ces indicateurs (ou bactéries indicatrices de contamination) n'ont pas nécessairement par eux-mêmes un caractère pathogène, mais leur présence indique l'existence d'une contamination par des matières fécales et leur abondance est une indication du niveau de risque de présence de micro-organismes pathogènes [72].

Différents groupes de bactéries sont utilisés comme indicateurs de contamination fécale, les coliformes sont les plus intéressantes (indicateurs fécaux de première importance) [71].

Les germes recherchés dans notre étude sont : les bactéries aérobies révivifiables, les coliformes totaux, les coliformes fécaux, *Escherichia coli*, les entérocoques intestinaux (streptocoques D) et les bactéries sulfite-réductrices. Certaines caractéristiques de ces indicateurs sont présentées ci-dessous [71, 72, 73] :

- Les bactéries aérobies révivifiables sont en particulier les bactéries se développant dans les conditions aérobies habituelles de culture. Il faut noter que les conditions de culture ne permettent jamais le développement de l'ensemble des bactéries présentes, certaines espèces demandent des apports nutritifs et des conditions de milieu qui sont défavorables à la prolifération d'autres espèces ;
- Les coliformes totaux : selon la définition adoptée par l'Organisation internationale de standardisation (ISO), Le terme « coliforme » correspond à des organismes en bâtonnets, non sporogènes, Gram négatifs, oxydase négatifs, facultativement anaérobies, capables de croître en présence de sels biliaires ou d'autres agents de surface possédant des activités inhibitrices de croissance similaires, et capables de fermenter le lactose (et le mannitol) avec production d'acide et d'aldéhyde en 48 heures, à des températures de 35 à 37 °C. le dénombrement de ces microorganismes à cette température est désigné sous l'expression « dénombrement des coliformes totaux ».

- Les coliformes fécaux ou thermotolérants : ils correspondent à des coliformes présentant les mêmes caractéristiques après incubation à 44°C. ils sont considérés comme plus appropriés comme indicateur de contamination fécale que les coliformes totaux.
- *E.coli* : elle est considérée comme le meilleur indicateur de contamination fécale récente du milieu aquatique. Elle correspond à des coliformes thermotolérants qui produisent de l'indole à partir du tryptophane, à 44°C ;
- Les entérocoques intestinaux (streptocoques D) : ce sont aussi un bon indicateur de contamination fécale car tous ont un habitat fécal ;
- Les bactéries sulfite-réductrices qui sont aussi considérées comme témoin d'une pollution fécale.

Les méthodes utilisées pour l'examen bactériologique de nos prélèvements sont divisées en deux grandes lignes : des méthodes de dénombrement et des méthodes d'isolement et d'identification. Les premières ont pour but une estimation quantitative de la flore microbienne des eaux à analyser, alors que les deuxièmes visent à bien caractériser les espèces bactériennes existantes.

Il faut noter que malgré le développement de ces méthodes, il n'est toujours pas possible de détecter de manière exhaustive, dans un échantillon d'eau, l'ensemble des microorganismes présents. Les conditions de culture, la grande variété et diversité des microorganismes ainsi que la faible abondance de certaines espèces par rapport à d'autres espèces sont les inconvénients de l'évaluation des qualités microbiologique des eaux.

Nos analyses bactériologiques ont été effectuées au niveau du laboratoire d'hygiène de la commune d'Aïn Smara (Wilaya de Constantine) pour le dénombrement et au niveau du laboratoire d'analyse médicale de l'hôpital militaire régional universitaire de Constantine (HMRUC) pour l'isolement, l'identification et l'étude de l'antibiorésistance.

4.1. Les méthodes générales de dénombrement

4.1.1. Dénombrement des bactéries aérobies revivifiables par incorporation dans un milieu gélosé [Norme AFNOR NF EN ISO 6222 (juillet 1999).] [71]

Dans ce type de méthodes, les bactéries maintenues dispersées dans un milieu solide, donnent naissance, dans des conditions favorables, à des colonies isolées les unes des autres qui, de ce fait, peuvent être directement comptées. Connaissant le volume

d'échantillonensemencé, il est possible d'exprimer le résultat final du dénombrement en fonction d'un volume d'eau pris comme unité.

4.1.1.1. Principe

L'échantillon d'eau est inoculé par incorporation dans un milieu de culture solide préalablement fondu et refroidi à une température proche de la température de solidification. Après incubation, on compte les colonies qui se développent à la surface et à l'intérieur de la gélose.

4.1.1.2. Mode opératoire

4.1.1.2.1. Préparation des dilutions

Pour les eaux polluées, une préparation des dilutions pour l'ensemencement est en premier lieu. Dans notre cas, on a choisi des dilutions arrivant jusqu'à 10^{-5} .

Dans des conditions stériles (proche du bec Bunsen), on agite soigneusement le flacon de l'échantillon à analyser pour faire homogénéiser la suspension en bactéries. 4 tubes stériles contenant chacun 9ml de l'eau physiologique stérile ainsi que 5 boîtes Pétri de 90mm vides, stériles et marquées sont préparé pour ce test.

A l'aide d'une pipette stérile, on prélève trois fois 1ml de l'échantillon à analyser en déposant les deux premiers volumes dans deux boîtes de Pétri et le troisième dans le tube contenant 9ml d'eau physiologique stérile (diluante) pour avoir la première dilution (10^{-1}).

On agit soigneusement le tube de la première dilution (10^{-1}) à l'aide d'un vortex. Ensuite, on prélève 3 fois 1ml de ce tube en utilisant une nouvelle pipette stérile et on procède comme précédemment. On continue de la même façon jusqu'à la dilution 10^{-5} .

4.1.1.2.2. Ensemencement

On fait couler la gélose PCA fondue et ramenée à une température de 45°C dans les boîtes de Pétri déjà préparées, contenant chacune 1ml de l'échantillon et ses dilutions [10^{-1} à 10^{-5}] (environ 18ml par boîte) puis on agite soigneusement sur paillasse sous forme de 8 pour assurer un mélange homogène de la prise d'essai et de la gélose. On laisse refroidir les boîtes sur paillasse jusqu'à solidification de la gélose.

4.1.1.2.3. Incubation

La moitié des boîtes ensemencées avec chacun des différentes dilutions et l'échantillon mère est incubée à 37°C pendant 48 heures, couvercle en dessous. L'autre est incubée sur paillasse à une température de 20 à 22°C pendant 72 heures.

4.1.1.2.4. Expression des résultats

On compte les colonies existantes sur chaque boîte. Chaque colonie étant par convention considéré comme ayant été engendrée par un seul microorganisme, les résultats sont exprimés par unité formant colonie (UFC).

Pour effectuer un dénombrement significatif, le nombre de colonies comptées doit être compris entre 30 et 300, puis ramené à la dilution correspondante.

La norme NF T 90-400 propose une formule de calcul du nombre d'unités génératrices de colonies qui tient compte de toutes les colonies comptées mais inférieures à 300 [74].

$$C_s = [N/(n_1.V_1.F_1) + (n_2.V_2.F_2) \dots (n_i.V_i.F_i)]. V_s$$

N : la somme de toutes les colonies comptées dans les boîtes.

n₁, n₂, n_i : les nombres de boîtes comptées pour chaque dilution.

V₁, V₂, V_i : les volumes d'essai utilisés pour chaque dilution.

F₁, F₂, F_i : les dilutions utilisées pour les prises d'essai V₁, V₂, V_i (F₁ = 1 pour un échantillon non dilué, F = 0,1 pour une dilution décimale, etc.).

V_s : la quantité de référence choisie pour exprimer la concentration de l'échantillon en microorganisme.

4.1.2. Dénombrement en milieu liquide par détermination du nombre le plus probable (NPP)

C'est une estimation statistique du nombre de micro-organismes supposés distribués dans l'eau de manière parfaitement aléatoire. Dans ce type de méthode, les bactéries se multiplient librement dans le milieu liquide provoquant un virage de la couleur de ce dernier [71].

4.1.2.1. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et des coliformes fécaux (thermotolérants) [NF EN ISO 9308-3 (mars 1999).] [71]

Le principe de cette méthode se divise en deux étapes : un test présomptif et Un test confirmatif :

4.1.2.1.1. Mode opératoire

4.1.2.1.1.1. Ensemencement et incubation des milieux présumptifs

A partir de l'échantillon mère et de ses dilutions déjà préparées et bien agiter pour les homogénéiser, on ensemence des volumes bien précis à raison de 3 tubes de milieu BCPL (Bouillon Lactosé au Pourpre de Bromocrésol) par dilution.

Septes séries de trois tubes contenant chacun 10ml de milieu BCPL avec la cloche de Durham sont utilisées pour ce test présumptif, le milieu est en double concentration (D/C) pour la première série et en simple concentration (S/C) pour le reste. La figure suivante résume cette manipe.

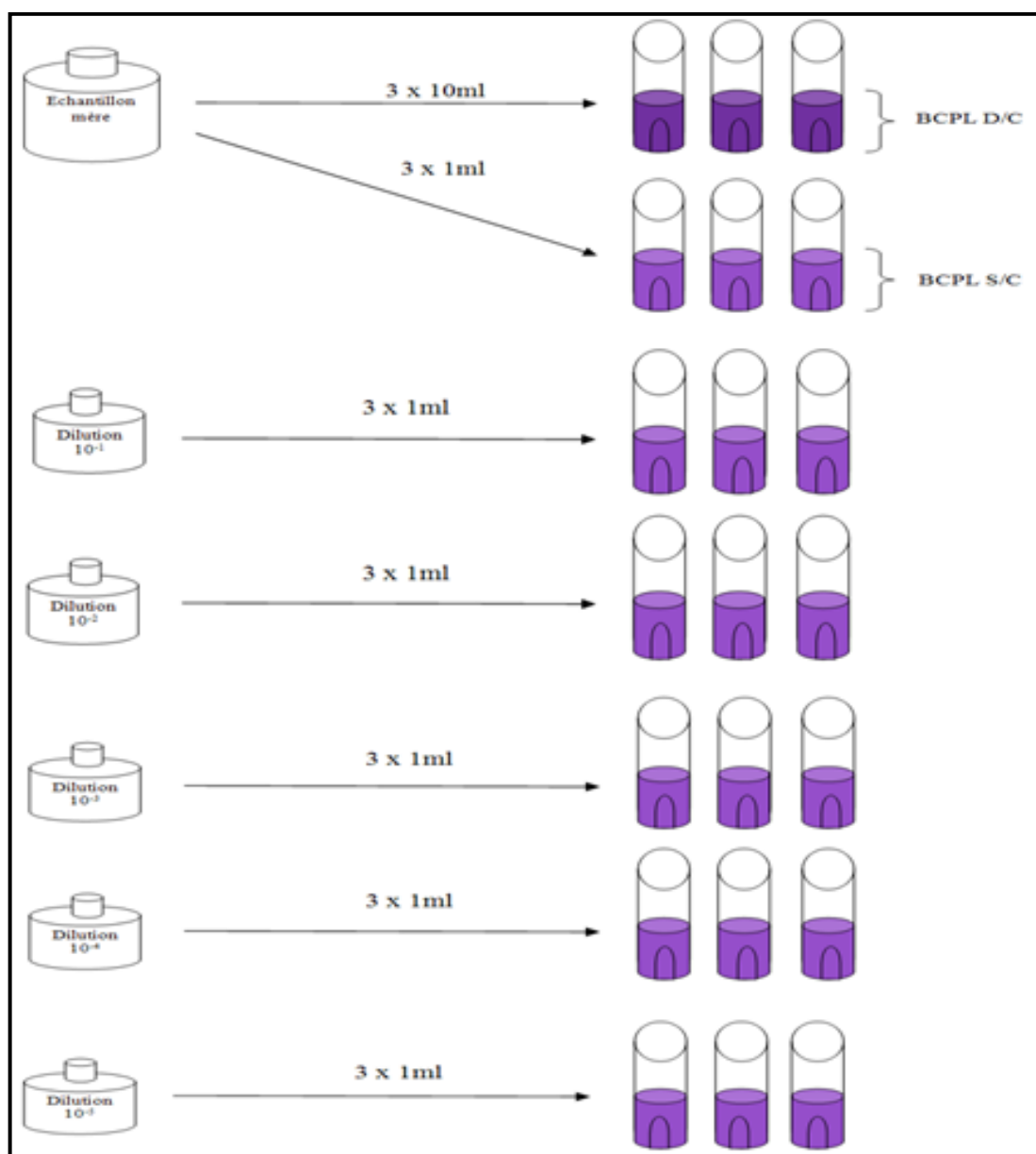


Figure 18 : Ensemencement du milieu présumptif pour le dénombrement des coliformes.

Après une incubation des tubes ensemencés à 30°C pendant 24 à 48 heures, on considère comme positif les tubes pour lesquels on observe un trouble, un dégagement gazeux notable (1/10 du volume de la cloche de Durham), ainsi qu'un virage au jaune de l'indicateur (Figure 19).

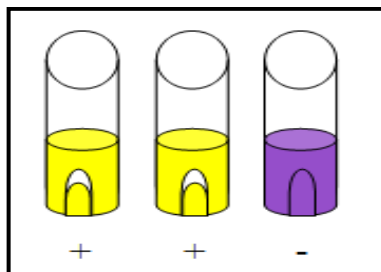


Figure 19 : Représentation des résultats positifs du test présomptif.

4.1.2.1.1.2. Ensemencement et incubation des milieux confirmatifs

A partir de chaque tube positif, on ensemence avec une anse de platine stérilisée :

- Un milieu BLBVB (bouillon lactosé bilié au vert brillant) pour la recherche des coliformes ;
- Un milieu BLBVB ou un milieu Schubert pour la recherche des coliformes thermotolérants.

L'incubation se fait pendant 48 heures, à 37°C pour la recherche des coliformes et à 44°C pour la recherche des coliformes thermotolérants ou pendant 24 heures à 44°C pour le milieu Schubert.

On considère comme positif les tubes dans les quels on observe un trouble visible et un dégagement gazeux dans la cloche de Durham.

On peut mettre en évidence la présence *d'E.coli* par l'ajout du réactif Kovacs dans les tubes positifs du milieu Schubert ; la réaction est le résultat de la production d'indole par les coliformes thermotolérants (Figure 20).

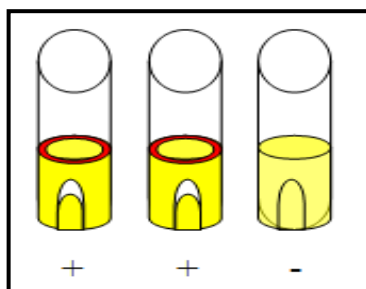


Figure 20 : Représentation des résultats positifs du test confirmatif.

Il est possible aussi de chercher la production de l'indole en ensemençant des tubes d'eau peptonée en plus des tubes BLBVB à partir des tubes présumptifs positifs, puis, après incubation à 44°C pendant 48 heures, on ajoute le Kovacs aux tubes présentant un trouble (positifs), la production se manifeste par l'apparition d'un anneau rouge au niveau du ménisque [71, 74].

4.1.2.1.2. Expression des résultats

On utilise la méthode du NPP à 3 tubes par série (table de Mac Grady) (Annexe 1), en tenant compte des résultats positifs des milieux confirmatifs. On détermine d'abord le nombre caractéristique (les tubes positifs dans chaque série), qui correspond sur la table NPP au nombre de coliformes par 100ml de l'eau analysée.

4.1.2.2. Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux [NF EN ISO 7899-1 (mars 1999).] [71]

Ce sont des streptocoques du groupe D, essentiellement : *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *Streptococcus bovis*, *S. suis* et *S. equinus*. Les dénombrements des entérocoques présumés sont rarement effectués indépendamment des dénombrements de coliformes et coliformes thermotolérants présumés. Les méthodes sont analogues pour ces deux types d'indicateurs et seuls les milieux diffèrent.

Le principe de cette méthode est le même décrit dans le dénombrement des coliformes.

4.1.2.2.1. Mode opératoire

4.1.2.2.1.1. Ensemencement et incubation des milieux présumptifs

De la même façon que pour la colimétrie, onensemence l'échantillon mère et ses dilutions dans septes séries de 3 tubes contenant chacun 10ml de milieu Roth (bouillon glucosé à l'azote). Le milieu est en double concentration pour la première série et en simple concentration pour le reste.

Après 24 à 48 heures d'incubation des tubes à 37°C, on considère comme positif les tubes présentant un trouble du à une croissance bactérienne.

4.1.2.2.1.2. Ensemencement et incubation des milieux confirmatifs

A partir de chaque tube positif, onensemence, à l'aide d'une anse de platine stérilisée, un milieu de Litskey et une gélose biliée à l'esculine (BEA). L'incubation est à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Après cette période, la positivité du milieu de Litsky s'exprime par un trouble du milieu avec ou sans formation d'une pastille violète au fond du tube résultant de l'agglomération de la culture après fixation du colorant du milieu.

Pour la gélose BEA, la présence des streptocoques D se développe par l'apparition des colonies présentant un halo noir dans le milieu.

4.1.2.2.2. Expression des résultats

Par la même méthode du NPP à 3 tubes par série, on détermine le nombre des entérocoques intestinaux par 100ml de l'eau à analyser, toujours en tenant compte des résultats positifs des milieux de confirmation.

4.1.2.3. Recherche et dénombrement des bactéries sulfito-réductrices [Norme NF T 90-415.] [71]

Cette méthode consiste en la recherche et le dénombrement des spores des bactéries anaérobies sulfito-réductrices et de *Clostridium* sulfito-réducteurs. Les formes sporulées sont des indicateurs d'une pollution fécale ancienne ou intermittente à cause de leur résistance considérable par rapport aux formes végétatives des coliformes fécaux et des entérocoques intestinaux.

4.1.2.3.1. Mode opératoire

4.1.2.3.1.1. Destruction des formes végétatives

Dans un bain marie à 80°C, on introduit 5 tubes contenant chacun 5 ml de l'eau à analyser. On les laisse environ 10 minutes pour détruire les formes végétatives des bactéries sulfito-réductrices présentes. Après chauffage, on refroidit immédiatement les tubes sous l'eau de robinet jusqu'à une température de 45°C.

4.1.2.3.1.2. Inoculation et incubation

Dans chacun des tubes, on ajoute environ 20 ml de la gélose Viande – Foie (VF), déjà fondu, refroidie à 45°C et additionnée de ses additifs (alun de fer et sulfite de sodium). On mélange tous doucement le milieu et l'inoculum en évitant la formation des bulles d'air. On laisse solidifier la gélose sur pailleasse environ 30 minutes avant l'incubation à 37°C pendant 48 heures. Un résultat positif se traduit par la formation d'une colonie noire entourée d'un halo noir. Une lecture après 16 à 18 heures d'incubation est indispensable pour éviter une coloration noire uniforme du tube, ce qui rend le dénombrement impossible à la 48^{ème} heure.

4.1.2.3.2. Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en nombre de spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices présentes dans 20 ml.

4.2. Les méthodes d'isolement et d'identification des bactéries

L'étape de base des méthodes d'isolement est l'ensemencement de l'échantillon à analyser sur des milieux de cultures non sélectifs permettant la croissance de la majorité des groupes de bactéries. A la suite de leurs mis en culture, diverses techniques ont été utilisées afin d'identifier les bactéries isolées.

4.2.1. Mode opératoire

A l'aide d'une anse de platine stérilisée et à partir de notre échantillon bien homogénéisée, on ensemence par la méthode des stries 3 boîtes de Pétri contenant la gélose nutritif (une boîte pour chaque point de prélèvement). L'utilisation de la gélose nutritive permet d'obtenir un mélange de différentes colonies qui ont été étudiées individuellement par la suite.

4.2.1.1. L'observation microscopique

A partir des différentes colonies obtenues sur gélose nutritive, après incubation à 37°C pendant 24 heures, on peut noter les différents caractères morphologiques de chaque type (contour, élévation, couleur, surface, diamètre...). Selon ces différences, l'observation microscopique permet de bien caractériser les différents types de bactéries. Pour cela, on a fait une coloration de Gram des différents types de colonies qui nous a permis de différencier les bactéries à Gram positif (bacilles et coques) des bactéries à Gram négatif (bacilles et coques).

4.2.1.2. L'isolement des bactéries

Après l'identification au microscope, on fait isoler les bactéries du mélange pour être identifiées. Pour ce faire, on a fait des réisolements sur des milieux sélectifs permettant de différencier chaque type de colonies. Les milieux de culture qu'on a utilisé sont : gélose nutritive, l'Hektoen, gélose au sang frais et gélose au sang cuit.

4.2.1.3. L'identification biochimique

A la suite de leur mise en culture sur les différents milieux sélectifs, les bactéries sont identifiées par la recherche de différentes caractéristiques biochimique en utilisant des galeries classiques et des galeries miniaturisées (système API).

4.2.1.3.1. Galeries classiques (principalement pour les entérobactéries)

4.2.1.3.1.1. Test oxydase

C'est un test très important pour l'orientation des bacilles à Gram négatif, les Gram positif ne possédant pas cette enzyme en général (la cytochrome oxydase). Il est basé sur l'étalement d'une quantité de la culture bactérienne à tester sur le disque d'oxydase imprégné du réactif. Un résultat positif est obtenu par la formation d'une tache violette sur le disque [65].

4.2.1.3.1.4. Etude en milieu TSI

Milieu décrit pour l'identification des entérobactéries. Il permet de mettre en évidence l'attaque du glucose, du lactose, du saccharose, la production de gaz et la production d'H₂S. L'attaque de l'un des sucres se traduit par une acidification du milieu, donc un virage au jaune du rouge de phénol. La production du gaz se traduit par l'apparition de bulles dans le culot. La production d'H₂S se traduit par un précipité noir [75].

4.2.1.3.1.2. Test catalase

La plupart des microorganismes possèdent une catalase, en particulier presque tous les bacilles à Gram négatif aérobies. Son absence est donc un caractère d'identification intéressant pour différencier les coques à Gram négatif entre eux. Un résultat positif se traduit par un dégagement des bulles d'oxygène après contact de l'eau oxygénée avec les colonies à tester [65].

4.2.1.3.2. Galeries miniaturisées (système API)

Les galeries API est une miniaturisation des tests biochimiques classiques destinés à l'identification bactérienne. Le système de base se présente généralement sous la forme d'une plaque rectangulaire de 10 à 32 microtubes en plastique ayant la forme soit d'un simple puits, soit d'un sabot permettant de mélanger une partie anaérobie (tube) et une partie aérobie (cupule). Chaque tube contient, sous forme déshydratée, des substrats et, éventuellement un réactif permettant de révéler l'activité recherchée. Selon les tests, soit on ensemence tout le microtube (tube et cupule) soit uniquement le tube.

Dans ce dernier cas, la cupule est remplie d'huile de paraffine pour créer l'anaérobiose et empêcher les échanges gazeux pendant l'incubation [76]. Les galeries API qu'on a utilisé sont les suivantes :

- API 20E (pour les entérobactéries) ;
- API 20NE (pour les non entérobactéries) ;
- API 20Strep (pour les streptocoques) ;
- API Staph (pour les staphylocoques).

4.2.1.3.2.1. Galerie API 20E [76]

- **Préparation de l'inoculum :** On fait une suspension bactérienne, dans un tube d'eau distillée stérile, d'opacité légère avec une seule colonie prélevée sur un milieu gélosé.
- **Inoculation de la galerie :** Pour les tests CIT, VP et GEL, on remplit tout le microtube (tube et cupule) alors pour le reste, uniquement les tubes. Puis, on ajoute d'huile de paraffine dans les cupules des tests suivants : ADH, LDC, ODC, H₂S et URE pour créer une anaérobiose. On incube par la suite la galerie à 37°C pendant 24 heures.
- **Lecture et identification:** Après l'addition des réactifs nécessaire, on se réfère au tableau de lecture (Annexe 2). Dans une fiche de résultats, on note les réactions par (+) ou (-) et on identifie l'espèce à l'aide d'un logiciel d'identification (API Excel).

4.2.1.3.2.2. Galerie API 20NE [76]

- **Préparation de l'inoculum :** On fait une suspension bactérienne, dans un tube d'eau distillée stérile, de turbidité égale à celle de l'étalon 0,5 Mcfarland.
- **Inoculation de la galerie :** On remplit les tubes et non les cupules des tests NO₃ à PNPG avec la suspension préparée en évitant la formation des bulles d'air. Pour les tests GLU, ADH et URE, on remplit la cupule avec l'huile de paraffine. On transfère 200 µl (2 à 8 gouttes) de cette suspension dans une ampoule AUX Medium puis on l'agite pour homogénéiser. A partir de cette nouvelle suspension, on remplit les tubes et les cupules des tests restants. L'incubation est à 37°C pendant 24 à 48 heures.

- **Lecture et identification :** De la même façon, on fait la lecture (Annexe 3) et l'identification.

4.2.1.3.2.3. Galerie API 20Strep [76]

- **Préparation de l'inoculum :** On fait une suspension bactérienne, dans un tube d'eau distillée stérile, très dense (opacité supérieur à celle de l'étalon 4 Mcfarland).
- **Inoculation de la galerie :** Pour les tests VP à ADH, on remplit, avec la suspension préparée, les tubes et les cupules sauf pour le test ADH où la cupule est remplie avec l'huile de paraffine. On transfère par la suite 0,5 ml de la suspension dans une ampoule API 20Strep Medium. A partir de cette nouvelle suspension, on remplit uniquement les tubes des tests restant, les cupules sont remplies par l'huile de paraffine. On incube la galerie à 37°C pendant 24 heures.
- **Lecture et identification :** Pareil des autres galeries, en se référant au tableau de lecture (Annexe 4).

4.2.1.3.2.4. Galerie API Staph [76]

- **Préparation de l'inoculum :** A partir d'une culture sur gélose au sang, on fait une suspension bactérienne, dans une ampoule API Staph Medium, d'opacité égale à 0,5 Mcfarland.
- **Inoculation de la galerie :** On remplit uniquement les tubes de la galerie par la suspension préparée en évitant toujours la formation des bulles d'air. Pour les caractères ADH et URE, on remplit les cupules par l'huile de paraffine. On incube à 37°C pendant 24 heures.
- **Lecture et identification :** Pareil des autres galeries, en se référant au tableau de lecture (Annexe 5).

4.3. L'étude de l'antibiorésistance

Par la suite des méthodes d'isolement et d'identification, on passe à l'étude de l'antibiorésistance (résistance et/ou sensibilité vis-à-vis de différents antibiotiques) des bactéries qu'on a pu isolée à partir de nos prélèvements. Sur le plan théorique, différentes techniques sont utilisées pour cette étude. En milieu solide (gélose), deux principales techniques sont connues : technique des disques et technique de bandelettes.

En milieu liquide, la détermination de la sensibilité d'une bactérie à un antibiotique se fait vis-à-vis de différentes concentrations de ce dernier (par dilution), ces techniques de dilution sont beaucoup plus utilisées pour la détermination de la CMI d'un antibiotique par rapport à une bactérie.

Dans notre étude, la méthode des disques (diffusion en milieu solide ou antibiogramme standard) est utilisée pour l'étude de l'antibiorésistance de toutes les espèces qu'on a pu isoler, alors que la technique de bandelettes ainsi que la technique des dilutions en milieu liquide ont été utilisées pour l'étude de l'association des antibiotiques pour une des espèces isolées.

4.3.1. L'antibiogramme standard (méthodes des disques)

C'est un test de sensibilité aux antibiotiques selon la technique de diffusion en milieu gélosé. Il permet d'une part le choix d'un antibiotique pour traiter une infection bactérienne et d'autre part la surveillance des résistances bactériennes aux antibiotiques [77].

4.3.1.1. Mode opératoire [77]

- **Milieu** : c'est la gélose Mueller Hinton (MH), coulé en boîte Pétri sur une épaisseur de 4mm. Les géloses sont séchées avant l'emploi.
- **Inoculum** : à partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement, on prépare une suspension bactérienne d'opacité d'environ 0,5 McFarland (10^8 bactéries par ml) en utilisant 5 à 10ml d'eau physiologique stérile à 0,9 %.
- **Ensemencement** : à l'aide d'un écouvillon trempé dans la suspension, on ensemence par stries serrées toute la surface du milieu en 3 reprises en changeant l'angle à chaque fois (60°).
- **Application des disques d'antibiotiques** : on a déposé les disques dans la plupart des cas à l'aide de distributeur automatique ou par fois à la pince bactériologique stérile. Des précautions à respecter lors de l'application, c'est par exemple : presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de la pince pour s'assurer de son application, respecter une distance minimale de 15 mm entre deux disques. Les antibiotiques qu'on a utilisés sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 8 : Les antibiotiques testés pour les antibiogrammes.

Antibiotiques (DCI)	Abréviations (codes)	Charge des disques (µg)	Date de péremption
-Ampicilline	AM	10	30/01/2013
-Céfuoxime	CXM	30	30/01/2013
-Céfazoline	CZ	30	30/09/2012
-Ticarciline	TIC	75	15/02/2013
-Imipénème	IPM	10	30/01/2013
-Ampicilline + Acide clavulanique	AMC	20+10	30/08/2012
-Céfotaxime	CTX	30	30/01/2013
-Ciprofloxacine	CIP	5	15/12/2012
-Colistine	CS	50	15/02/2009
-Fosfomycine	FOS	50	30/01/2013
-Bactrim (Triméthoprime+ Sulfaméthoxazole)	SXT	1,25+23,7	15/02/2013
-Chloramphénicol	C	30	15/01/2012
-Gentamycine	GM	10UI	28/02/2012
-Amikacine	AN	30	15/01/2013
-Clindamycine	CM	2	15/01/2012
-Ceftazidime	CAZ	30	15/02/2013
-Pipéracilline	PIP	75	15/12/2012
-Aztréonam	ATM	30	30/01/2011
-Cefopérazone	CFP	30	15/01/2013
-Ticarcilline + Acide clavulanique	TCC	75+10	15/12/2012
- Céfoxitine	FOX	30	30/01/2012
-Acide fucidique	FA	10	30/08/2004
-Pénicilline	P	10 UI	15/01/2011
- Spiramycine	SP	100	15/12/2012
-Erytromycine	E	15	15/02/2009
-Prestinamycine	PT	15	15/10/2012
-Tétracycline	TE	30	10/01/2012

Tableau 8 (suite).

Antibiotiques (DCI)	Abréviations (codes)	Charge des disques (μg)	Date de péremption
-Lincomycine	L	15	15/02/2011
-Tobramycine	TM	10	30/10/2004
-Rifampicine	RA	30	30/10/2004
-Vancomycine	VA	30	15/12/2012
-Teicoplanine	TEC	30	30/12/2011
-Oxacilline	OX	1	30/12/2011
-Lévofloxacine	LVX	5	31/01/2008
-Linézolide	LZD	30	15/09/2010

- **Incubation :** les boîtes sont par la suite incubées à 37°C pendant 24 heures, couvercle en bas.
- **Lecture :** on mesure avec précision les diamètres des zones d'inhibitions et on compare les résultats obtenus aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture (Annexe 6). On classe la bactérie dans l'une des catégories : sensible (S), intermédiaire (I) et résistante (R).

4.3.2. L'étude de l'association des antibiotiques

Comme on a déjà cité, deux techniques ont été utilisées pour l'étude de cette association, l'une qualitative en milieu solide et l'autre quantitative en milieu liquide :

4.3.2.1. Techniques en milieu solide (technique des bandelettes)

Cette technique partage le même principe avec l'antibiogramme standard qui repose sur la diffusion des antibiotiques sur milieu gélosé. Elle permet l'étude de nombreuses associations d'antibiotiques à la fois.

4.3.2.1.1. Préparation des bandelettes

Dans des tubes en verre stériles, on met, dans chacun, 5 ml d'eau distillée stérile puis 5 disques d'un même antibiotique.

Par la suite, on dépose, dans chacun des tubes préparés, 10 bandelettes de papier buvard de 40mm de longueur et 6mm de largeur, préalablement découpées. On laisse les tubes sur paillasse pendant 24 à 48 heures pour assurer, d'une part, une bonne dissolution des disques dans l'eau distillée stérile et d'autre part, une bonne imprégnation des bandelettes.

Le fait de déposer 5 disques d'antibiotiques avec 5ml d'eau distillée stérile permet d'avoir une concentration proche à la charge d'un disque.

On récupère les bandelettes dans des écouvillons et on les laisse se sécher avant l'application. L'opération se fait à l'aide d'une pince flambée.

4.3.2.1.2. Préparation de l'inoculum et ensemencement

De la même façon que pour l'antibiogramme standard, on prépare une suspension bactérienne d'opacité de 0,5 McFarland à partir de la culture de la souche à étudier. L'ensemencement se fait par méthode d'écouvillonnage sur gélose Mueller-Hinton.

4.3.2.1.3. Application des bandelettes

A la surface de la gélose ensemencée, on dépose 3 bandelettes de différents antibiotiques d'une façon à avoir une forme de U (deux angles droits). On incube les boîtes à 37°C pendant 24 heures.

4.3.2.1.4. Lecture des résultats

Après l'incubation, on observe une plage d'inhibition de la croissance bactérienne en parallèle à chaque bandelette. L'intersection de deux zones d'inhibition permet de déduire le type d'interaction entre deux antibiotiques.

4.3.2.2. Techniques en milieu liquide

Bien qu'elles soient d'utilisation importante en bactériologie médicale, les techniques de dilution en milieu liquide présentent certaines difficultés de l'étude de l'association des antibiotiques. Ces difficultés résident dans la détermination quantitative des effets bactériostatiques et bactéricides du plus grand nombre possible de concentration de chaque antibiotique [67]. Les différentes techniques de dilution en milieu liquide sont les suivantes :

4.3.2.2.1. Schéma triangulaire

4.3.2.2.1.1. Principe

La technique consiste à faire répartir, avec des mêmes volumes, un boillon ensemencé de la bactérie à étudier dans une série de tubes stériles disposés selon un schéma triangulaire.

L'adjonction de disques d'antibiotiques, dans chaque tube, en quantité convenable permet de voir l'effet des antibiotiques (seuls ou en association deux à deux) sur la croissance bactérienne [67].

4.3.2.2.1.2. Technique

On ensemence 120ml de bouillon nutritif avec une culture jeune de la bactérie à étudier. Ensuite, on dépose, à l'aide d'une pince flambée, les disques d'antibiotiques choisis pour l'étude de l'association dans la série des tubes selon le schéma triangulaire suivant (un disque pour chaque antibiotique):

Tableau 9 : Schéma triangulaire (pour 10 antibiotiques : A, B, C...).

A	A+B	A+C	A+D	A+E	A+F	A+G	A+H	A+I	A+J
	B	B+C	B+D	B+E	B+F	B+G	B+H	B+I	B+J
		C	C+D	C+E	C+F	C+G	C+H	C+I	C+J
			D	D+E	D+F	D+G	D+H	D+I	D+J
				E	E+F	E+G	E+H	E+I	E+J
					F	F+G	F+H	F+I	F+J
						G	G+H	G+I	G+J
							H	H+I	H+J
								I	I+J
									J

On distribue 2ml du bouillon ensemencé dans chaque tube, on agite un petit peu les tubes et on les incube à 37°C pendant 24 heures. On mesure la densité optique (DO) du bouillon ensemencé avant l'incubation.

4.3.2.2.1.3. Lecture des résultats

Après l'incubation, on prélève à partir de chaque tube, à l'aide d'une micropipette, 200µl du bouillon en les déposant dans les puits d'une microplaque selon le même schéma précédant.

On mesure, à l'aide d'un spectrophotomètre de microplaque, la DO dans chaque puits de la microplaque et au même temps, on mesure la DO du bouillon seul après incubation.

En comparant les différentes DO obtenues du schéma triangulaire avec celle du bouillon seul avant et après incubation, on peut déduire le pourcentage de la croissance bactérienne au cours de l'incubation et de ce fait l'effet des antibiotiques, seuls ou en association, sur cette croissance. Cette comparaison permet de déterminer l'association la plus performante.

La mesure de la DO par microplaque est plus performante que l'utilisation des cuves du spectrophotomètre simple. Elle facilite beaucoup la manipulation tout en évitant les différents phénomènes de contamination.

4.3.2.2.2. Schéma carré

Après la détermination des deux antibiotiques assurant une meilleure association, le reste des techniques d'étude permet de quantifier l'interaction de ces deux antibiotiques. Cette technique est plus facile par rapport à la technique de l'échiquier qu'on viendra de l'expliquer par la suite puisque on utilise toujours les antibiotiques sous forme de disque seulement que les concentrations pour le même antibiotique sont multiples et obtenus par dédoublement ou découpage des disques.

4.3.2.2.2.1. Technique

On ensemence 50 ml de bouillon nutritif avec la bactérie à étudier. Ensuite, on dépose, à l'aide d'une pince flambée, les disques ou les fractions de disques d'antibiotiques découpés stérilement dans la série des tubes stériles selon le schéma carré suivant :

Tableau 10 : Schéma carré.

2A+2B	2A+1B	2A+1/2B	2A+1/4B	2A
1A+2B	1A+1B	1A+1/2B	1A+1/4B	1A
1/2A+2B	1/2A+1B	1/2A+1/2B	1/2A+1/4B	1/2A
1/4A+2B	1/4A+1B	1/4A+1/2B	1/4A+1/4B	1/4A
2B	1B	1/2B	1/4B	

De la même façon, on distribue 2ml du bouillon ensemencé dans chaque tube, on incube les tubes, après agitation, à 37°C pendant 24 heures. On mesure toujours la DO du bouillon ensemencé avant l'incubation.

4.3.2.2.2. Lecture des résultats

Comme pour le schéma triangulaire, on utilise une microplaque pour la mesure des DO après l'incubation. On détermine cette fois ci les doses des deux antibiotiques (en disque) donnant le meilleur effet sur la croissance bactérienne.

4.3.2.2.3. Technique de l'échiquier

Dans cette technique, l'interaction des deux antibiotiques a été réalisée par une gamme de concentrations de ces derniers. Les concentrations utilisées représentent habituellement une progression géométrique de raison 1/2.

4.3.2.2.3.1. Technique

On ensemence 130ml de bouillon nutritif avec la bactérie à étudier. Pour la préparation de la gamme de concentrations de chaque antibiotique, on a utilisé des flacons contenant l'antibiotique en poudre pour préparation injectable. Pour avoir les concentrations désirées pour chaque antibiotique, on a fait des dilutions à partir de la préparation mère. La plus forte concentration désirée est préparée dans 10ml du bouillon ensemencé puis on prépare des dilutions successives, toujours dans le bouillon ensemencé, à une progression géométrique de raison 1/2.

Les figures suivantes représentent les différentes étapes de la manipulation :

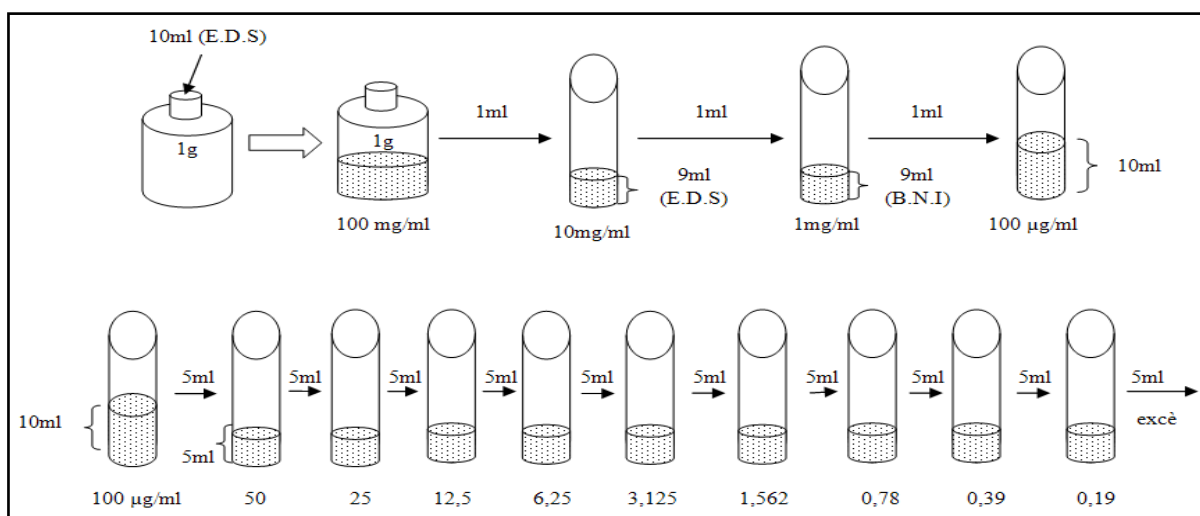


Figure 21 : Préparation de la gamme de concentration de l'antibiotique A. (E.D.S) : eau distillée stérile ; (B.N.I) : bouillon nutritif inoculé.

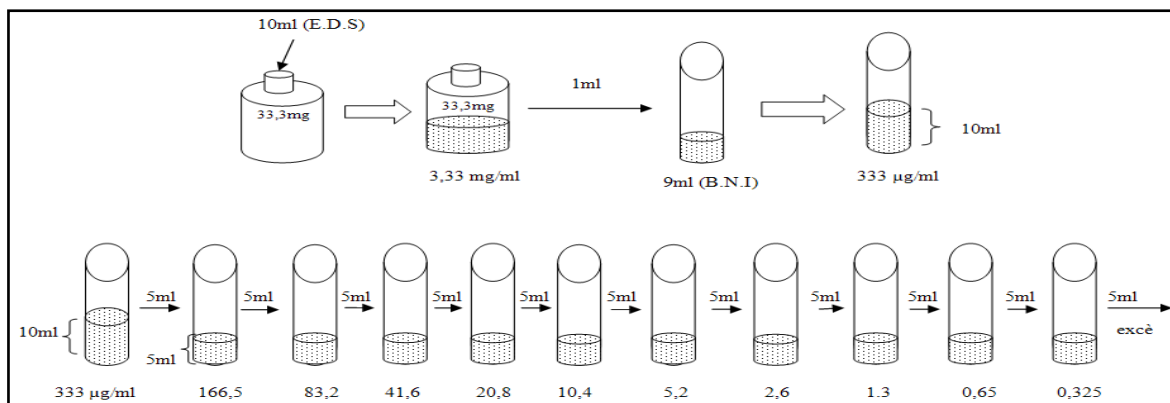


Figure 22 : Préparation de la gamme de concentrations de l’antibiotique B.

La combinaison des deux gammes à raison de 400µl pour chaque concentration permet d’avoir le schéma de la technique de l’échiquier (Tableau 11) :

Tableau 11 : Distribution des concentrations « µg/ml » pour la technique de l’échiquier.

0,19		0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19
		166,5	83,2	41,6	20,8	10,4	5,2	2,6	1,3	0,65	0,325
0,39		0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39
		166,5	83,2	41,6	20,8	10,4	5,2	2,6	1,3	0,65	0,325
0,78		0,78	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78
		166,5	83,2	41,6	20,8	10,4	5,2	2,6	1,3	0,65	0,325
1,562		1,562	1,562	1,562	1,562	1,562	1,562	1,562	1,562	1,562	1,562
		166,5	83,2	41,6	20,8	10,4	5,2	2,6	1,3	0,65	0,325
3,125		3,125	3,125	3,125	3,125	3,125	3,125	3,125	3,125	3,125	3,125
		166,5	83,2	41,6	20,8	10,4	5,2	2,6	1,3	0,65	0,325
6,25		6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25
		166,5	83,2	41,6	20,8	10,4	5,2	2,6	1,3	0,65	0,325
12,5		12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
		166,5	83,2	41,6	20,8	10,4	5,2	2,6	1,3	0,65	0,325
25		25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
		166,5	83,2	41,6	20,8	10,4	5,2	2,6	1,3	0,65	0,325
50		50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
		166,5	83,2	41,6	20,8	10,4	5,2	2,6	1,3	0,65	0,325
100		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
		166,5	83,2	41,6	20,8	10,4	5,2	2,6	1,3	0,65	0,325
A	B	166,5	83,2	41,6	20,8	10,4	5,2	2,6	1,3	0,65	0,325

De la même façon, la mesure des DO permet de déterminer les deux meilleures concentrations en association, et d’une façon approximative, on peut déterminer la CMI de chaque antibiotique.

1. Résultats de dénombrement

1.1. Dénombrement des bactéries aérobies revivifiables par incorporation dans un milieu gélosé

Après l'incubation, nous avons compté le nombre de colonies dans chaque boîte de Pétri. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 12 : Dénombrement des bactéries aérobies revivifiables.

Echantillons Dilutions	Echantillon 1 (UFC)		Echantillon 2 (UFC)		Echantillon 3 (UFC)	
	Après 48h à 37°C	Après 72h à 22°C	Après 48h à 37°C	Après 72h à 22°C	Après 48h à 37°C	Après 72h à 22°C
10 ⁰	310	406	320	410	350	440
10 ⁻¹	80	102	172	98	102	100
10 ⁻²	70	130	34	59	14	12
10 ⁻³	00	04	07	08	02	01
10 ⁻⁴	05	00	03	04	00	01
10 ⁻⁵	00	00	02	02	00	00

Selon la norme NF T 90-400, pour calculer le nombre d'unités génératrices de colonies (Cs), seules les boîtes comptant entre 30 et 300 colonies ont été prises en considération. Ce nombre se calcule selon l'équation suivante:

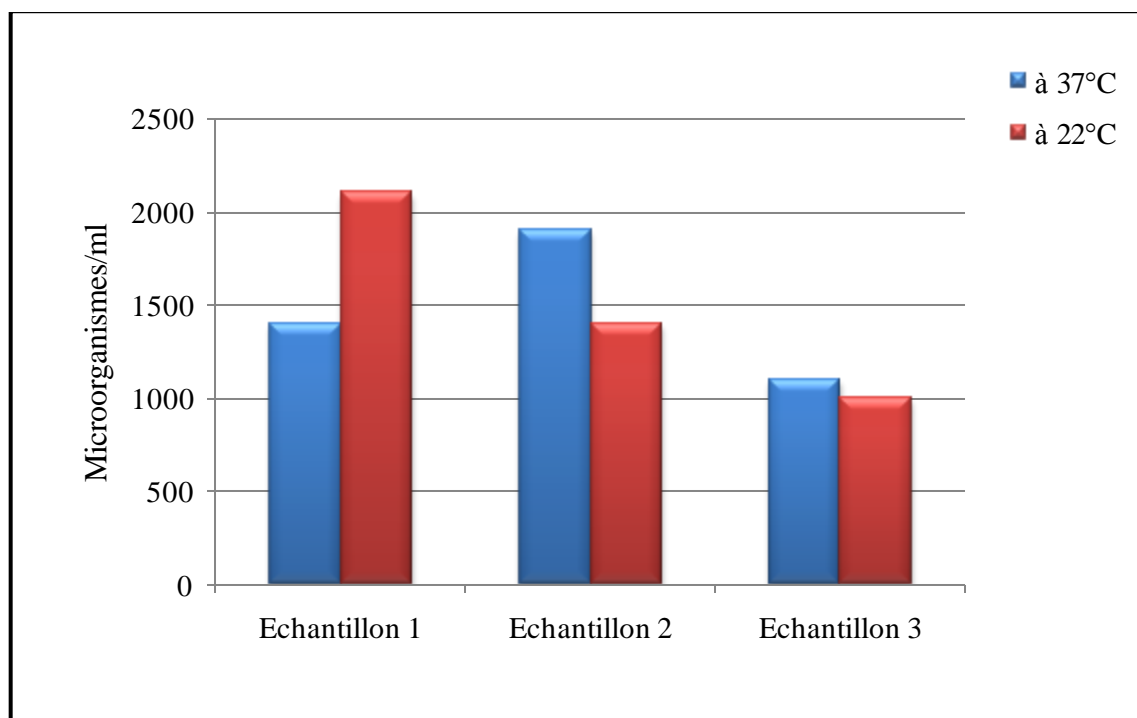
$$Cs = [N/(n1.V1.F1) + (n2.V2.F2)...(ni.Vi.Fi)]. Vs$$

Les résultants calculés ont été arrondies à deux chiffres significatifs après la virgule. Le résultat final (microorganismes revivifiables dénombrés par ml) est présenté par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par 10^x. Les résultats sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 13 : Valeurs du nombre d'unités génératrices de colonies (Cs).

	Après 48h à 37°C	Après 72h à 22°C
Echantillon 1 (microorganismes/ml)	1,4 x 10 ³	2,1 x 10 ³
Echantillon 2 (microorganismes/ml)	1,9 x 10 ³	1,4 x 10 ³
Echantillon 3 (microorganismes/ml)	1,1 x 10 ³	1,0 x 10 ³

La représentation graphique des résultats obtenus est la suivante :

**Figure 23** : Représentation des valeurs du nombre des bactéries aérobies révivifiables.

1.2. Dénombrement des coliformes totaux, des coliformes fécaux (*E.coli*) et des entérocoques intestinaux

Nous avons noté, pour les deux tests «présomptif et confirmatif», le nombre de tubes positifs dans chaque série pour avoir le nombre caractéristique qui correspond, suivant la table de Mac Grady, au NPP (nombre de coliformes totaux, de coliformes fécaux ou d'entérocoques intestinaux par 100 ml). Les résultats sont regroupés dans les tableaux suivants :

Tableau 14 : Résultats de dénombrement des coliformes totaux.

	Test présomptif	Test confirmatif	NPP par 100ml
Echantillon 1	3330000	3320000	1100
Echantillon 2	3320000	3300000	240
Echantillon 3	3000000	0000000	0

Tableau 15 : Résultats de dénombrement des coliformes fécaux (*E.coli*).

	Test confirmatif	NPP par 100ml
Echantillon 1	3310000	460
Echantillon 2	3200000	93
Echantillon 3	0000000	0

Tableau 16 : Résultats de dénombrement des entérocoques intestinaux.

	Test présomptif	Test confirmatif	NPP par 100ml
Echantillon 1	3330000	3300000	240
Echantillon 2	3100000	3100000	43
Echantillon 3	0000000	0000000	0

La couleur rouge indique le nombre caractéristique.

Nous avons regroupé les valeurs des NPP des trois dénombrements précédant dans le tableau suivant :

Tableau 17 : Les valeurs NPP des trois dénombrements précédents.

	Coliformes totaux	Coliformes fécaux	Entérocoques intestinaux
Echantillon 1	1100	460	240
Echantillon 2	240	93	43
Echantillon 3	0	0	0

La représentation graphique de ces valeurs est la suivante :

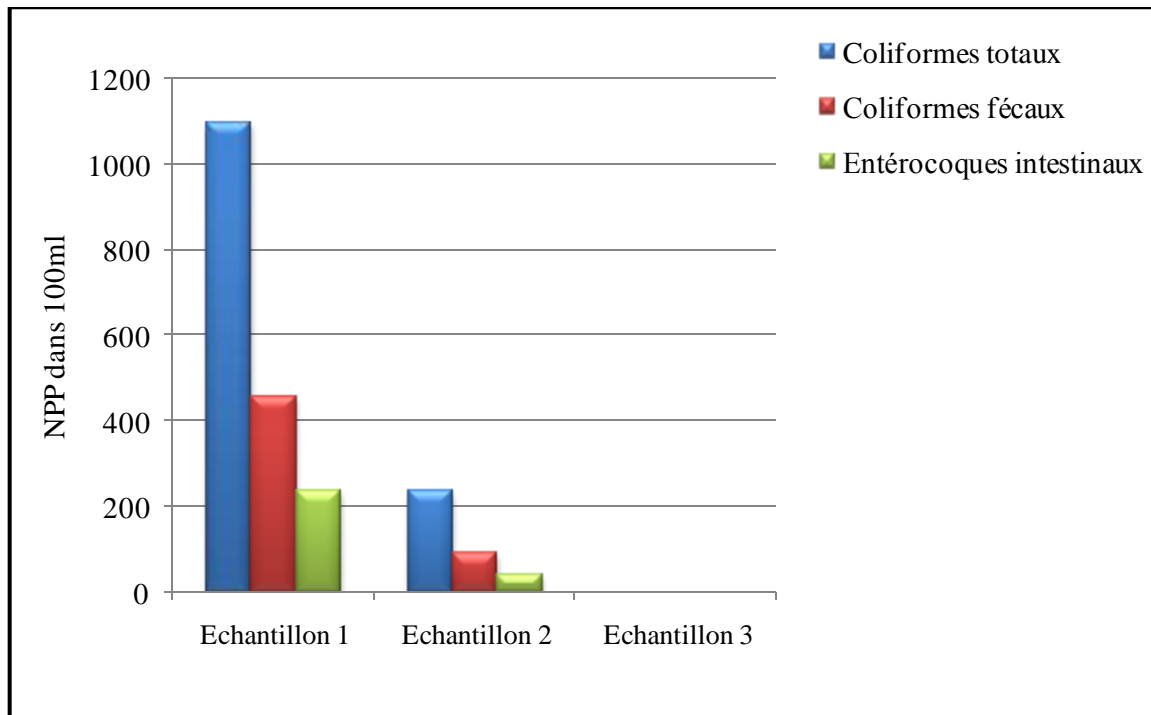


Figure 24 : Représentation des valeurs NPP pour les coliformes (totaux et fécaux) et les entérocoques intestinaux.

L'ensemble de ces résultats montre que le plan d'eau de notre zone d'étude est fortement contaminé. Les nombres de germes totaux (Figure 23) et ceux du NPP des coliformes (totaux et fécaux) et des entérocoques intestinaux (Figure 24) indiquent une diminution du degré de contamination, autrement dit, une diminution de la concentration des microorganismes au niveau des trois points du prélèvement en partant du point P1 situé en aval du point de rejet des eaux usées.

Nous remarquons qu'au niveau du premier point, la concentration en microorganismes dénombrés à 37°C est plus faible que celles dénombrées à 22°C (Figure 23). Elle est aussi nettement plus faible que ceux dénombrés dans le deuxième point. Ceci est du probablement aux conditions de prélèvement ou à une manipulation inadéquate.

Idem, nous avons aussi remarqué dans le point P3 un taux de croissance faible de germes totaux et un taux nul pour les coliformes et les entérocoques intestinaux. Nous pensons que ces teneurs en germes totaux sont d'origine tellurique et non fécale.

Les concentrations élevées en coliformes totaux, coliformes fécaux et en entérocoques intestinaux dans les points P1 et P2 (Figure 24) et leurs diminutions dans le point P3 sont liés à de nombreux facteurs. Les rejets des eaux usées en amont du point P1 sont la principale cause.

Les diminutions progressives du nombre des microorganismes d'origine fécale sont en relation direct avec les processus de dilution, de dispersion et de sédimentation qui jouent un rôle important dans leur élimination dans les milieux naturels. Les phénomènes biotiques (prédation par les protozoaires, lyse par les bactériovirus, compétition avec les flores autochtones) et les processus physiologiques (adaptation de ces bactéries face aux conditions environnementales) peuvent aussi agir sur la présence de ces microorganismes dans les eaux de surface.

1.3. Dénombrement des bactéries sulfito-réductrices (*Clostridium* sulfito-réducteurs)

Après 18 heures d'incubation, quelques colonies noires sont apparues sur la gélose.

Tableau 18 : Résultats du dénombrement des bactéries anaérobies sulfito-réductrices.

	Nombre de colonies
Echantillon 1	24
Echantillon 2	16
Echantillon 3	14

Nous remarquons une concentration bactérienne décroissante au fur et à mesure qu'on s'éloigne du point de rejet. L'apparition des bactéries sulfito-réductrices au niveau du point P3 est synonyme d'une contamination fécale du fait que la forme spore est plus résistante que les formes végétatives des coliformes et des entérocoques intestinaux. Il faudra aussi noter que les *Clostridium* sulfito-réducteurs sont également des germes telluriques et de ce fait, nous ne pouvons pas être sûrs qu'ils sont d'origine fécale, exception faite pour *Clostridium perfringens* espèce la plus susceptible d'être d'origine fécale [71]. Cette mise en évidence n'a pas été réalisée à cause de l'absence de réactifs sélectifs pour identifier l'espèce.

2. Résultats de l'isolement et de l'identification

Nos ensemencements ont révélés que les bacilles à Gram négatif sont plus abondants que les cocci à Gram positif. Des repiquages successifs de ces colonies sur des milieux sélectifs nous a permis de bien les purifier et les caractériser morphologiquement (Annexe 7). Les résultats sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 19 : Caractères macroscopiques et microscopiques de colonies isolées.

	Caractères macroscopiques	Caractères microscopiques
Gélose nutritive	<ul style="list-style-type: none"> -colonies jaune citron, brillantes, lisses, bombées, à contour régulier, de consistance crémeuse, de 1 à 2mm de diamètre. -colonies jaune pâle, muqueuses, semi-bombées, à contour irrégulier, de consistance crémeuse, de 0,5 à 1 mm de diamètre. -colonies blanchâtres, lisses, bombées, à contour régulier à irrégulier, à consistance crémeuse, de 1 à 2mm de diamètre. 	<ul style="list-style-type: none"> -Bacilles isolées ou en courtes chainettes, à Gram négatif. -Cocci en paire, en tétrade ou en amas, à Gram positif.
Héktoen	<ul style="list-style-type: none"> -colonies bleu-vertes, lisses, bombées, arrondies, à contour régulier, de consistance muqueuse à sèche, de 1 à 2mm de diamètre. -colonies jaunes, lisses, bombées, arrondies, à contour régulier et par fois irrégulier, de consistance crémeuse, de 1 à 2mm de diamètre. 	<ul style="list-style-type: none"> Bacilles isolées ou en courtes chainettes, à Gram négatif.
Gélose au sang frais	<ul style="list-style-type: none"> -colonies blanchâtres, lisses, brillantes, bombées, à contour régulier, de consistance crémeuse, de 1 à 2mm de diamètre. -colonies translucides, lisses, bombées, à contour régulier, de consistance crémeuse, de 0,5 à 1 mm de diamètre. 	<ul style="list-style-type: none"> -Cocci en paires, en tétrades ou en amas, à Gram positif.
Gélose au sang cuit (gélose chocolat)	<ul style="list-style-type: none"> -colonies translucides, lisses, bombées, à contour régulier, de consistance crémeuse, de 0,5 à 1 mm de diamètre. 	<ul style="list-style-type: none"> -Cocci en paires ou en courtes chainettes, à Gram positif.

Les tests biochimiques classiques et les galeries API (20E, 20NE, 20STREP et STAPH) nous ont permis, à l'aide du logiciel API Excel (Annexe 8), d'identifier ces espèces :

- *Escherichia coli* ;
- *Aeromonas hydrophila* ;
- *Methylobacterium mesophilicum* ;
- *Shewanella putrefaciens* ;
- *Comamonas testosteroni* ;
- *Staphylococcus epidermidis* ;
- *Enterococcus faecium*.

Mise à part *E. coli* et *E. faecium* qui sont les principaux indicateurs d'une contamination fécale, le reste des bactéries que nous avons isolées sont des bactéries autochtones des milieux aquatiques.

Aeromonas hydrophila est une espèce ubiquiste des écosystèmes aquatiques qui a été fréquemment isolée aussi bien des eaux douces qu'en eau de mer. C'est une espèce non entérobactérie, anaérobie facultative. Sa présence est constatée dans les effluents et les estuaires, les eaux potables et minérales et dans certaines aliments ainsi que dans des prélèvements pathologiques chez l'homme et les animaux [84, 85].

Le genre *Methylobacterium* définit un groupe de plus de 20 espèces appartenant à la classe des α -protéobactéries. Ce sont des bactéries aérobies strictes, à Gram négatif, en forme de bacilles, méthylophiles facultatives. Les membres de ce genre sont omniprésents dans la nature et sont donc trouvés dans une grande variété d'habitats, y compris le sol, la poussière, les eaux douces et les sédiments des lacs, milieu hospitalier...etc. [78]. Plus récemment, des souches de ce genre ont été associées aux infections des voies urinaires chez les personnes immunodéprimées [79].

Les bactéries du genre *Shewanella*, classe des γ -protéobactéries, sont des bacilles à Gram négatif, non fermentant, caractérisées par la présence d'une thiosulfate-réductase. Elles sont ubiquistes, très répandues dans l'environnement, retrouvées dans les sols et les eaux saumâtres où ces microorganismes sont impliqués dans le recyclage des métaux comme le fer et le manganèse. Seules les deux espèces, *S. putrefaciens* et *S. algae* sont des pathogènes opportunistes [80].

Comamonas testosteroni est un bacille aérobie strict, à Gram négatif, non sporulé. Cette espèce, connue comme *Pseudomonas testosteroni* avant sa reclassification par les

techniques de biologie moléculaire, est capable d'utiliser la testostérone. Elle n'est que rarement impliquée dans les infections humaines de l'abdomen, la circulation sanguine, le système nerveux central et les voies urinaires [81]. *C. testosteroni* possède la capacité de donner une pigmentation rouge-orange après 48 à 72 heures d'incubation. L'ajout du naphthalène rend cette synthèse plus significative [82].

Staphylococcus epidermidis constitue la majorité de la flore cutanée et muqueuse humaine et animale. Il est également retrouvé dans l'environnement (eau, sol, air...). Il est aussi impliqué dans des pathologies variées et souvent responsable d'infections contractées dans les hôpitaux fréquemment associé à une colonisation des cathéters intra-vasculaires ou du matériel orthopédique [83].

Tous les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 20 : Résultats des tests biochimiques et des galeries API des espèces identifiées.








	oxydase	catalase	TSI	Coagulase /Antigène du groupe D
<i>E. coli</i>	-	-	Lac et/ou Sacch+, Glu+ H ₂ S -, Gaz -	/
				
<i>A. hydrophila</i>	+	-	Lac et/ou Sacch+, Glu+ H ₂ S -, Gaz -	/
				
<i>M. mesophilicum</i>	+	-	Lac et Sacch-, Glu- H ₂ S +, Gaz -	/
				
<i>S. putrefaciens</i>	+	-	Lac et Sacch-, Glu- H ₂ S +, Gaz -	/
				

Tableau 20 (suite).

	oxydase	catalase	TSI	Coagulase/Antigène du groupe D
<i>C. testosteroni</i>	+	-	Lac et Sacch-, Glu- H ₂ S -, Gaz -	/
				
<i>S. epidermidis</i>	/	+	/	Coagulase +
				
<i>E. faecium</i>	/	-	/	Antigène du groupe D +
				

3. Résultats de l'antibiorésistance

3.1. Résultats de l'antibiogramme standard

La lecture des diamètres des zones d'inhibition (Annexe 9) nous a permis de différencier les phénotypes de résistance des espèces identifiées :

➤ *Escherichia coli* :

D'après les données bibliographiques, *E. coli* est naturellement sensible aux β -lactamines : aminopénicillines (AM), carboxypénicilline (TIC), carbapénème (IPM) et aux céphalosporines (CZ, CXM et CTX). La fréquence du phénotype sauvage est de 50% dans le milieu hospitalier. Pour les aminosides (gentamicine et amikacine), la quasi-totalité des entérobactéries sont naturellement sensibles, à l'exception de *Providencia*. De même pour la polymyxine E (CS), la fosfomycine (FOS), le cotrimoxazole (SXT) et le chloramphénicol (C), *E. coli* présente un phénotype sauvage de résistance [86].

Nos résultats nous montrent que *E. coli* présente une résistance acquise à trois antibiotiques testés : l'ampicilline (AM), la ticarcilline (TIC) et le chloramphénicol (C) (Tableau 21).

La résistance aux AM et TIC est due à la production d'une pénicillinase à bas niveau (PBN) alors que la résistance au C est principalement due à l'acquisition d'un gène *cat* codant pour une enzyme, la chloramphénicol acétyltransférase (CAT) [86].

Tableau 21 : Résultats de l'antibiogramme de *Escherichia coli*.

Antibiotiques	Interprétation		Antibiotiques	Interprétation
AM	R		GM	S
AMC	S		CIP	S
CXM	S		CS	S
CZ	S		AN	S
TIC	R		FOS	S
IPM	S		SXT	S
CTX	S		C	R

➤ *Aeromonas hydrophila* :

Pour *A. hydrophila*, les résultats obtenus montrent une résistance à trois antibiotiques (AM, AMC et TIC) (Tableau 22). Il s'agit d'une résistance naturelle due à la production d'une oxacillinase de classe D [85].

Tableau 22 : Résultats de l'antibiogramme de *Aeromonas hydrophila*.

Antibiotiques	Interprétation		Antibiotiques	Interprétation
AM	R		GM	S
AMC	R		CIP	S
CXM	S		CS	S
CZ	S		AN	S
TIC	R		FOS	S
IPM	S		SXT	S
CTX	S		C	S

➤ *Methylobacterium mesophilicum* :

M. mesophilicum présente une sensibilité à tous les antibiotiques testés, excepté la fosfomycine (Tableau 23). Pour la céfazoline (CZ), la résistance est faible (diamètre égal à 18 mm). Généralement, les espèces appartenant à ce genre présentent une sensibilité aux aminosides, aux tétracyclines et à l'association sulfamides-triméthoprime. Pour les β -lactamines, la sensibilité est variable [87]. Pour la fosfomycine, la plupart des bacilles à Gram négatif non fermentaires, excepté *P. aeruginosa* y sont résistants [86].

Tableau 23 : Résultats de l'antibiogramme de *Methylobacterium mesophilicum*.

Antibiotiques	Interprétation		Antibiotiques	Interprétation
AM	S		GM	S
AMC	S		CIP	S
CXM	S		CS	S
CZ	R		AN	S
TIC	S		FOS	R
IPM	S		SXT	S
CTX	S		C	S
CFP	S		ATM	S
CAZ	S		TCC	S
PIP	S		TM	S

➤ *Shewanella putrefaciens* :

Les résultats obtenus pour *S. putrefaciens* ressemblent à ceux obtenus pour *M. mesophilicum*, soit une sensibilité à tous les antibiotiques utilisés sauf pour la fosfomycine avec une résistance faible à la céfazoline (Tableau 24). Ces résultats sont identiques à ceux obtenus dans des études antérieures (sensibilité aux β -lactamines, aux fluoroquinolones, aminoglycosides, chloramphénicol, polymyxine avec une résistance partielle la fosfomycine) [80, 86].

Tableau 24 : Résultats de l'antibiogramme de *Shewanella putrefaciens*.

Antibiotiques	Interprétation		Antibiotiques	Interprétation
AM	S		GM	S
AMC	S		CIP	S
CXM	S		CS	S
CZ	R		AN	S
TIC	S		FOS	R
IPM	S		SXT	S
CTX	S		C	S
CFP	S		ATM	S
CAZ	S		TCC	S
PIP	S		TM	S

➤ *Comamonas testosteroni* :

Le phénotype obtenu de *C. testosteroni* présente plus de résistance que ceux des espèces précédentes (Tableau 25). Des études antérieures ont montrées que cette espèce est sensible à une grande variété d'antibiotiques y compris les β -lactamines, les fluoroquinolones, les aminoglycosides, le triméthoprime/sulfaméthoxazole [88]. La comparaison de ce phénotype de résistance avec le phénotype de *C. acidiferans* (espèce présentant un haut degré d'homologie d'acides nucléiques avec *C. testosteroni*) [86] nous a montré que les deux espèces présentent les mêmes résistances sauf pour l'ampicilline, la gentamycine et la colistine pour lesquels *C. testosteroni* est sensible.

Tableau 25 : Résultats de l'antibiogramme de *Comamonas testosteroni*.

Antibiotiques	Interprétation		Antibiotiques	Interprétation
AM	S		GM	S
AMC	S		CIP	S
CXM	R		CS	S
CZ	R		AN	S
TIC	S		FOS	R
IPM	S		SXT	S
CTX	S		C	R
CFP	S		ATM	S
CAZ	S		TCC	S
PIP	S			

➤ *Staphylococcus epidermidis* :

S. epidermidis est résistante à la pénicilline, à l'oxacilline et à l'érythromycine (Tableau 26). Aujourd'hui, 90% de souches des staphylocoques isolées en milieu hospitalier et en milieu extra-hospitalier résistent à la pénicilline [86]. La résistance à l'oxacilline (ou à la méticilline) doit considérer la souche comme résistante à toutes les β -lactamines (souche métilino-résistante). Deux mécanismes expliquent la résistance des staphylocoques aux β -lactamines : la production de β -lactamases et la modification de cible. Pour ce dernier mécanisme, deux possibilités existent : l'acquisition d'une PLP exogène et/ou la modification des PLP endogènes [86, 89]. Chez les staphylocoques, la résistance à l'érythromycine est normalement associée à la résistance aux autres macrolides. Cette résistance s'exprime par l'induction des gènes *ermA*, *ermC* et plus rarement *ermB* qui produit des méthylases.

Un autre mécanisme de la résistance inductible à l'érythromycine est conféré par le gène *msrA* qui code pour une pompe d'efflux ATP-dépendante [86, 90]. D'autre part, la résistance aux macrolides par le phénomène d'efflux est codée par le gène *mef* [90].

Tableau 26 : Résultats de l'antibiogramme de *Staphylococcus epidermidis*.

Antibiotiques	Interprétation		Antibiotiques	Interprétation
FOX	R		L	S
FA	S		CM	S
P	R		C	S
FOS	S		TM	S
LZD	S		GM	S
SXT	S		RA	S
CIP	S		VA	S
TE	S		TEC	S
SP	S		AN	S
E	R		OX	R
PT	S			

➤ *Enterococcus faecium* :

D'après les résultats obtenus, *E. faecium* possède un phénotype sauvage de résistance et ne présente donc aucune résistance aux antibiotiques testés.

Tableau 27 : Résultats de l'antibiogramme de *Enterococcus faecium*.

Antibiotiques	Interprétation		Antibiotiques	Interprétation
AM	S		L	S
AMC	S		CM	S
LZD	S		E	S
RA	S		PT	S
LVX	S		VA	S
TE	S		TEC	S
GM	S			

3.2. Résultats de l'étude de l'association des antibiotiques

Vu que c'est difficile d'étudier l'association d'antibiotiques pour toutes les espèces identifiées (manque d'antibiotiques et de milieux de culture ainsi que la difficulté de la mise en œuvre des techniques d'association), nous avons préféré choisir une seule espèce à Gram négatif (*Aeromonas hydrophila*) pour des raisons multiples. Entre autre, c'est prouvé dans des études antérieures qu'une corrélation positive et significative existe toujours entre l'abondance des germes indicateurs de contamination fécale et l'abondance

des *Aeromonas* dans un milieu aquatique pollué. Ainsi, une pollution fécale ne peut qu'accentuer le risque sanitaire liée à ces germes [91].

3.2.1. Résultats des techniques en milieu solide (la technique des bandelettes)

Sur les 11 antibiotiques auxquels *Aeromonas hydrophila* est sensible, 9 ont été choisis pour l'étude de l'association (CZ, CS, CTX, IPM, C, FOS, AN, GM, CIP). Les deux antibiotiques éliminés (CXM, SXT) se trouvent en quantité insuffisante pour réaliser cette pratique.

Selon les résultats obtenus (Figure 25.a et 25.b), nous observons trois effets : une synergie pour (CTX-CS), (FOS-C), (CZ-AN) et (FOS-IPM) ; une addition pour (CTX-CZ), (CZ-FOS), (CIP-CZ), (CIP-GM) et (CS-IPM) et une indifférence pour (CZ-CS), (CTX-IPM), (CZ-C), (GM-AN), (CIP-AN) et (CIP-CS). L'effet synergique le plus important est celui obtenu pour l'association (CTX-CS) où les deux antibiotiques présentent une action bactéricide ; la céfotaxime (CTX) inhibe la synthèse de la paroi alors que la colistine (CS) modifie la perméabilité membranaire de la bactérie. Pour les autres associations (FOS-C), (CZ-AN) et (FOS-IPM), l'augmentation de la perméabilité par l'un des deux antibiotiques facilite la pénétration du deuxième.

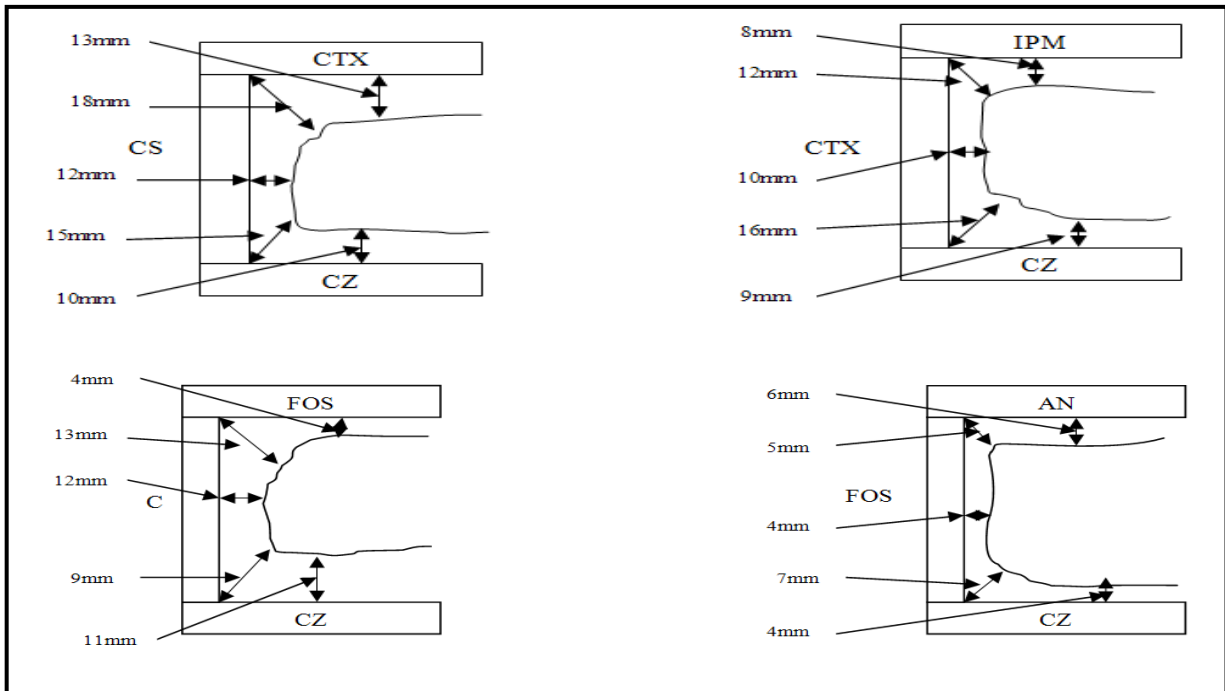


Figure 25.a : Résultats de la technique des bandelettes.

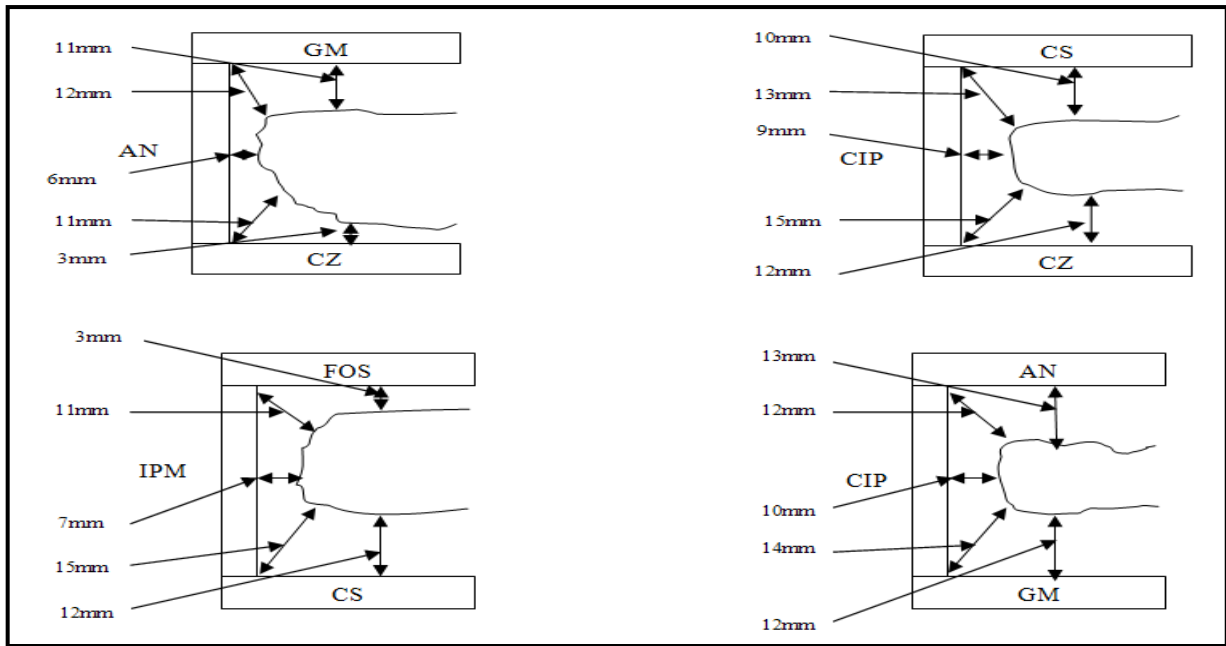


Figure 25.b : Résultats de la technique des bandelettes.

3.2.2. Résultats des techniques en milieu liquide

3.2.2.1. Schéma triangulaire

Les résultats des différentes densités optiques mesurées sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 28 : Résultats de l'association suivant le schéma triangulaire.

CZ 0.128	CZ+CS 0.111	CZ+CTX 0.08	CZ+IPM 0.109	CZ+C 0.110	CZ+FOS 0.100	CZ+AN 0.098	CZ+GM 0.101	CZ+CIP 0.168
	CS 0.086	CS+CTX 0.066	CS+IPM 0.165	CS+C 0.143	CS+FOS 0.072	CS+AN 0.095	CS+GM 0.122	CS+CIP 0.116
		CTX 0.121	CTX+IPM 0.143	CTX+C 0.121	CTX+FOS 0.113	CTX+AN 0.104	CTX+GM 0.105	CTX+CIP 0.106
			IPM 0.203	IPM+C 0.207	IPM+FOS 0.138	IPM+AN 0.148	IPM+GM 0.118	IPM+CIP 0.132
				C 0.225	C+FOS 0.115	C+AN 0.161	C+GM 0.145	C+CIP 0.130
					FOS 0.158	FOS+AN 0.151	FOS+GM 0.149	FOS+CIP 0.148
						AN 0.127	AN+GM 0.125	AN+CIP 0.171
							GM 0.170	GM+CIP 0.173
								CIP 0.189

D'après les résultats obtenus, en tenant compte de la DO du bouillon inoculé avant et après incubation (0.165 et 0.337) respectivement, la meilleure association est représentée par la colistine (CS) et la céfotaxime (CTX). Elle donne la plus faible valeur de DO. L'effet synergique de cette association, montré déjà par la technique des bandelettes, est bien élucidé en milieu liquide. L'effet de l'association est plus important que l'effet de chaque antibiotique pris isolément.

Ces deux antibiotiques ont un effet bactéricide sur la croissance bactérienne, les DO obtenues (antibiotiques seules ou en association) sont plus faibles que la DO de l'inoculum initial. De même, les deux antibiotiques donnent, isolément, les meilleurs effets sur la croissance bactérienne, une DO de 0.086 pour CS et de 0.121 pour CTX.

Le schéma carré ainsi que la technique de l'échiquier vont nous aider à déterminer, pour ces deux antibiotiques, les doses ou les concentrations les plus faibles donnant le meilleur effet sur la croissance bactérienne de notre espèce.

3.2.2.2. Schéma carré

Idem, les mesures de la DO pour les différentes concentrations des deux antibiotiques sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 29 : Résultats de l'association (CS+CTX) suivant le schéma carré.

2CS+2CTX 0.156	1CS+2CTX 0.157	1/2CS+2CTX 0.152	1/4CS+2CTX 0.153	2CTX 0.139
2CS+1CTX 0.171	1CS+1CTX 0.166	1/2CS+1CTX 0.152	1/4CS+1CTX 0.156	1CTX 0.155
2CS+1/2CTX 0.170	1CS+1/2CTX 0.159	1/2CS+1/2CTX 0.162	1/4CS+1/2CTX 0.151	1/2CTX 0.152
2CS+1/4CTX 0.159	1CS+1/4CTX 0.160	1/2CS+1/4CTX 0.148	1/4CS+1/4CTX 0.147	1/4CTX 0.163
2CS 0.165	1CS 0.169	1/2CS 0.158	1/4CS 0.163	CS \ CTX

D'après ces résultats, en comparant toujours avec les DO de l'inoculum avant et après incubation (0,168 et 0,338), on a remarqué que les plus faibles doses des deux antibiotiques donnant le meilleur effet sur la croissance bactérienne est de 1/4 disque pour chaque antibiotique.

3.2.2.3. Technique de l'échiquier

De même que pour les autres techniques, la comparaison des DO obtenues pour les différentes concentrations d'antibiotiques avec ceux de l'inoculum avant et après incubation (0,145 et 0,231) permet de déterminer le meilleur effet avec les plus faibles concentrations. Le tableau suivant représente les résultats obtenus :

Tableau 30 : Résultats de la technique de l'échiquier pour l'association (CS-CTX).

0.230		0.128	0.153	0.171	0.186	0.203	0.200	0.211	0.227	0.228	0.217
0.175		0.143	0.137	0.176	0.174	0.210	0.227	0.225	0.234	0.232	0.243
0.170		0.131	0.146	0.154	0.145	0.164	0.196	0.226	0.198	0.205	0.198
0.158		0.131	0.152	0.159	0.158	0.150	0.145	0.139	0.176	0.140	0.138
0.160		0.126	0.146	0.141	0.136	0.145	0.145	0.142	0.136	0.134	0.135
0.152		0.116	0.143	0.139	0.144	0.144	0.140	0.139	0.149	0.129	0.134
0.143		0.124	0.133	0.137	0.137	0.136	0.137	0.139	0.133	0.137	0.139
0.139		0.132	0.139	0.140	0.135	0.136	0.141	0.141	0.138	0.134	0.133
0.140		0.132	0.135	0.127	0.132	0.133	0.135	0.142	0.137	0.133	0.131
0.128		0.133	0.125	0.125	0.124	0.128	0.136	0.129	0.135	0.132	0.132
CTX CS		0.138	0.150	0.158	0.162	0.190	0.212	0.179	0.209	0.273	0.270

D'une manière générale, nous pouvons constater que la CMI de la colistine est située dans l'intervalle (166.5 µg/ml et 83.2 µg/ml). Elle est proche de 90 µg/ml, alors que celle de la céfotaxime est située dans l'intervalle (12.5 µg/ml et 6.25 µg/ml), proche de 12 µg/ml. Ces deux valeurs de CMI confirment mieux la fiabilité de la technique ainsi que les résultats obtenus en tenant compte des diamètres de zones d'inhibition obtenus pour ces deux antibiotiques. Il existe une corrélation inverse entre le diamètre d'inhibition et la CMI d'un même antibiotique (relation appelée droite de concordance ou de régression) ; en fonction de l'augmentation de la sensibilité, la valeur de la CMI décroît et la zone d'inhibition s'élargit [13, 92], ce qui a renforcé nos résultats : une CMI de 90 µg/ml avec un diamètre de 18 mm pour la colistine et une CMI de 12 µg/ml avec un diamètre de 38 mm pour la céfotaxime.

Par ailleurs, le meilleur effet de l'association (D.O = 0.116) est obtenu avec les deux concentrations suivantes : 166.5 µg/ml de colistine et 6.25 µg/ml de céfotaxime.

Conclusion

La pollution fécale des eaux de surface conduit à une diffusion des bactéries fécales qui sont le plus souvent antibiorésistantes. La coexistence de ces germes avec les germes autochtones conduit, à son tour, à une dissémination de cette antibiorésistance qui constitue l'objectif majeur de notre étude.

Au début, il en ressort de cette étude que le plan d'eau de la Sebkhah d'Ouled M'barek est fortement pollué. La présence de forte concentration de germes test de contamination fécale et l'isolement de bactéries susceptibles de provoquer des maladies est un bon indicateur.

L'étude de la sensibilité des bactéries identifiées (*Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Methylobacterium mesophilicum*, *Shewanella putrefaciens*, *Comamonas testosteroni*, *Staphylococcus epidermidis* et *Enterococcus faecium*) vis-à-vis de différents antibiotiques, pris isolément dans un premier temps, nous a permis d'avoir de nombreux phénotypes de résistance.

L'étude *in vitro* de leur effet en association, pour l'espèce *Aeromonas hydrophila*, nous a montré, sur milieu solide, que l'effet est souvent positif (allant de l'indifférence jusqu'à une synergie parfaite) alors que l'utilisation d'un milieu liquide avec différentes concentrations montre le même effet avec la minimisation des doses. La meilleure association est obtenue avec la colistine et la céfotaxime (avec les concentrations 166.5 µg/ml et 6.25 µg/ml respectivement).

Cette minimisation de doses d'antibiotiques est souvent l'effet recherché (les plus faibles concentrations donnant le meilleur effet sur la croissance bactérienne) afin d'éviter les surcharges de ces xénobiotiques souvent néfastes pour l'être humain et au même temps pour éviter les phénomènes d'acquisition de la résistance envers ces molécules.

En plus, nous avons déterminé, d'une manière approximative, les valeurs de CMI des deux antibiotiques en association (90 µg/ml pour la colistine et 12 µg/ml pour la céfotaxime).

L'obtention de ces résultats montre la fiabilité des techniques utilisées pour l'étude des associations d'antibiotiques. Pour cette raison, nous recommandons fortement que cette étude se poursuive en multipliant les expériences afin de s'assurer des résultats.

Pour cette poursuite, d'autres perspectives peuvent être envisagées :

- Confirmation de l'identification bactérienne par l'utilisation des outils de la biologie moléculaire.
- Utilisation de l'automatisation pour l'étude des antibiogrammes, ce qui permet d'étudier plus d'associations et donne plus de précision pour la détermination des CMI.
- Comparaison de l'antibiorésistance des espèces identifiées à celles des espèces isolées dans des infections pour bien spécifier ces résistances acquises.
- Localisation génomique de ces résistances en utilisant toujours les outils de la biologie moléculaire.

Annexes

Annexe 1 : La table de Mac Grady.

Nombre de tubes donnant une réaction positive sur			NPP dans 100 ml	Limites de confiance à 95%	
3 tubes de 10 ml	3 tubes de 1 ml	3 tubes de 0,1 ml		Limite inférieure	Limite supérieure
0	0	1	3	< 0,5	9
0	1	0	3	< 0,5	13
1	0	0	4	< 0,5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	149
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	379
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800

Annexe 2 : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20E.

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	Ortho-nitro-phenyl-galactosidase	B-galactosidase	Incolore	Jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orangé
LDC	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orangé
ODC	Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orangé
CIT	Citrate de Sodium	Utilisation du citrate	Vert pale/jaune	Bleu-vert/vert
H₂S	Thiosulfate de Sodium	Utilisation d'H ₂ S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/fin liseré
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orangé
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA / Immédiat	
			Jaune	Marron foncé
IND	Tryptophane	Production d'indole	IND / 2 min, max	
			Jaune	Anneau rouge
VP	Pyruvate de Sodium	Production d'acétoïne	VP 1 + VP 2 / 10 min	
			Incolore	Rose-rouge
GEL	Gélatine de Kohn	gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	Glucose	Fermentation/oxydation	Bleu-vert/vert	Jaune
MAN	Mannitol	Fermentation/oxydation	Bleu-vert/vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation/oxydation	Bleu-vert/vert	Jaune
SOR	Sorbitol	Fermentation/oxydation	Bleu-vert/vert	Jaune
RHA	Rhamnose	Fermentation/oxydation	Bleu-vert/vert	Jaune
SAC	Saccharose	Fermentation/oxydation	Bleu-vert/vert	Jaune
MEL	Melibiose	Fermentation/oxydation	Bleu-vert/vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation/oxydation	Bleu-vert/vert	Jaune
ARA	Arabinose	Fermentation/oxydation	Bleu-vert/vert	Jaune
Ox	Sur papier filtre	Cytochrome-oxydase	Ox / 5-10 min	
			Incolore	Anneau violet

Annexe 3 : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20NE.

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
NO ₃	Nitrate de Potassium	Réduction des nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 min	
			Incolore	Rose/rouge
		Réduction des nitrites en Azote	ZN / 5 min	
			Rose	Incolore
TRP	Tryptophane	Formation d'indole	TRP / 3-5 min	
			Incolore	Goutte rouge
GLU	Glucose	Fermentation	Bleu à vert	Jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange/rose/rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Orange/rose/rouge
ESC	Esculine	Hydrolyse	Jaune	Gris/marron/noir
GEL	Gélatine de Kohn	Hydrolyse	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment
PNPG	p-nitro-phényl-βD-galactopyranoside	B-galactosidase	Incolore	Jaune
GLU	Glucose	Assimilation	Transparence	Trouble
ARA	Arabinose			
MNE	Mannose			
MAN	Mannitol			
NAG	N-acétyl-glucosamine			
MAL	Maltose			
GNT	Gluconate			
CAP	Caprate			
ADI	Adipate			
MLT	Malate			
CIT	Citrate			
PAC	Phényl-acétate			
Ox	Tetraméthyl-p-phenylène diamine			

Annexe 4 : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20Strep.

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
VP	Sodium pyruvate	Production d'acétoïne	VP 1 + VP 2 / jusqu'à 10min	
			Incolore	Rose/rouge
HIP	Acide hippurique	Hydrolyse	NIN / jusqu'à 10min	
			Incolore/bleu pâle	Bleu foncé/violet
ESC	Esculine Citrates de fer	Hydrolyse β -glucosidase	Incolore/jaune pâle	Noir/gris
PYRA	Acide pyroglutamique- β -naphtylamine	Pyrolidonyl Arylamidase	ZYM A + ZYM B / 10min	
			Incolore/orange pâle	Orange
α GAL	6-bromo-2-naphtyl- α D-galactopyranoside	β -galactosidase	Incolore	Violet
β GUR	Acide naphto-ASBI-glucuronique	β -glucuronidase	Incolore	Bleu
β GAL	2-naphtyl- β D-galactopyranoside	β -galactosidase	Incolore ou violet pâle	Violet
PAL	2-naphtyl phosphate	Phosphatase Alcaline	Incolore ou violet pâle	Violet
LAP	L-leucine- β -naphtylamide	Leucine aminopeptidase	Incolore	Orange
ADH	L-arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge
RIB	D-ribose	acidification	Orange/rouge	Jaune
ARA	L-arabinose			
MAN	D-mannitol			
SOR	D-sorbitol			
LAC	D-lactose			
TRE	D-tréhalose			
INU	Inuline			
RAF	D-raffinose			
AMD	Amidon			
GLYG	glycogène			

Annexe 5 : Tableau de lecture de la galerie API Staph.

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
0	Aucun	Témoin négatif	Rouge	-
GLU	D-glucose	Témoin positif	Rouge	Jaune
FRU	D-fructose	Acidification à partir du carbohydate		
MNE	D-mannose			
MAL	Maltose			
LAC	Lactose			
TRE	D-tréhalose			
MAN	D-mannitol			
XLT	Xylitol			
MEL	D-melibiose			
NIT	Nitrate de Potassium		Réduction des nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 10min
			Incolore/rose	Rouge
PAL	β -naphtyl ac.phosphate	Phosphatase alcaline	ZYM A + ZYM B / 10min	
			Jaune	Violet
VP	Pyruvate de Sodium	Production d'acétyl méthyl-carbonyl	VP 1 + VP 2 / 10min	
			Incolore/rose	Violet/rose
RAF	Raffinose	Acidification à partir du carbohydate	Rouge	Jaune
XYL	Xylose			
SAC	Saccharose			
MDG	α -méthyl-D-glucosamine			
NAG	N-acétyl-glucosamine			
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange/rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/violet

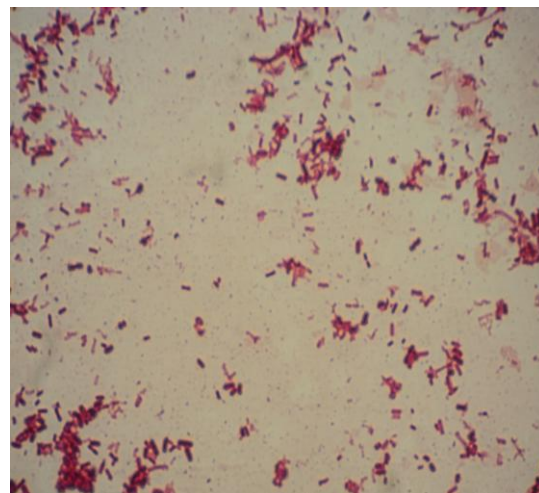
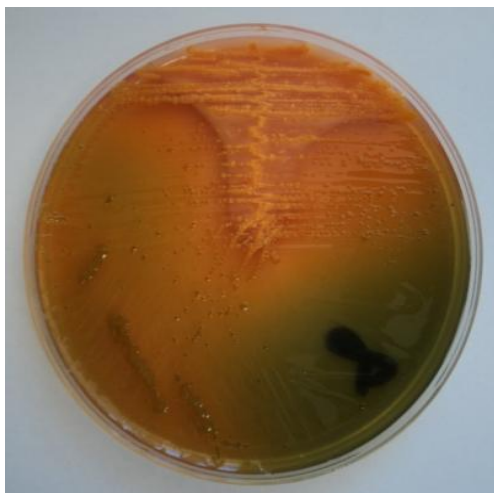
Annexe 6 : Concentrations et diamètres critiques des diverses classes d'antibiotiques.

Antibiotiques	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
	S	R	S	R
PENICILLINES				
Pénicilline G	≤ 0,25	> 2	≥ 29	< 18
Ampicilline	≤ 2	> 8	≥ 21	< 16
Ampicilline/sulbactam	≤ 2/8	> 8/8	≥ 21	< 16
Amoxicilline	≤ 2	> 8	≥ 23	< 16
Amoxicilline/ac.clavulanique	≤ 2/2	> 8/2	≥ 23	< 16
Ticarcilline	≤ 8	> 16	≥ 24	< 22
Ticarcilline/ac.clavulanique	≤ 8/2	> 16/2	≥ 24	< 22
Pipéracilline	≤ 4	> 16	≥ 22	< 18
Pipéracilline/tazobactam	≤ 4	> 16	≥ 22	< 18
Sulbactam	≤ 8	-		
CARBAPENICILLINES				
Imipénème	≤ 2	> 8	≥ 24	< 17
Méropénème	≤ 2	> 8	≥ 22	< 15
Ertapénème	≤ 0,5	> 1	≥ 28	< 26
Doripénème	≤ 1	> 4	≥ 24	< 19
MONOBACTAME				
Aztréonam	≤ 4	> 8	≥ 23	< 21
CEPHALOSPORINES				
Céfazoline	≤ 1	> 2		
Céfalotine	≤ 8	> 32	≥ 18	< 12
Céfuroxime	≤ 4	> 8	≥ 25	< 22
Céfoxitine	≤ 8	> 32	≥ 22	< 15
Céfotaxime	≤ 1	> 2	≥ 26	< 23
Ceftriaxone	≤ 1	> 2	≥ 26	< 23
Ceftazidime	≤ 4	> 8	≥ 21	< 19
Cefpirome	≤ 4	> 8	≥ 21	< 19
Céfixime	≤ 1	> 2	≥ 25	< 22
AMINOSIDES				
Streptomycine				
-streptocoques, entérocoques	≤ 205	> 500	≥ 14	< 12
-autres bactéries	≤ 8	> 16	≥ 15	< 13
Gentamycine				
-streptocoques, entérocoques	≤ 250	> 500	≥ 17	< 11
-autres bactéries	≤ 2	> 4	≥ 18	< 16
Kanamycine				
-streptocoques, entérocoques	≤ 250	> 500	≥ 14	< 10
-autres bactéries	≤ 8	> 16	≥ 17	< 15
Tobramycine	≤ 2	> 4	≥ 18	< 16
Amikacine	≤ 8	> 16	≥ 17	< 15

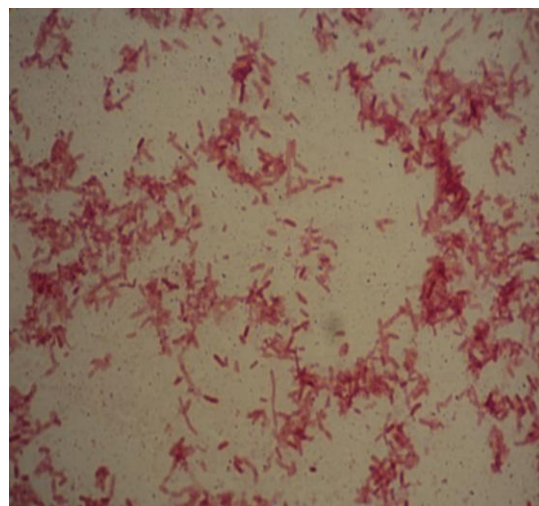
Annexe 6 (suite) : Concentrations et diamètres critiques des diverses classes d'antibiotiques.

Antibiotiques	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
	S	R	S	R
PHENICOLES				
Chloramphénicol	≤ 8	> 16	≥ 23	< 19
TETRACYCLINES				
Tétracycline	≤ 4	> 8	≥ 19	< 17
Oxytétracycline	≤ 4	> 8	≥ 19	< 17
Doxycycline	≤ 4	> 8	≥ 19	< 17
Minocycline	≤ 4	> 8	≥ 19	< 17
MACROLIDES				
Erythromycine	≤ 1	> 4	≥ 22	< 17
Azithromycine	≤ 0,5	> 4	≥ 22	< 17
Spiramycine	≤ 1	> 4	≥ 24	< 19
LINCOSAMIDES				
Lincomycine	≤ 2	> 8	≥ 21	< 17
Clindamycine	≤ 2	> 2	≥ 15	< 15
STREPTOGRAMINES				
Pristinamycine	≤ 1	> 2	≥ 22	< 19
OXAZOLIDINONES				
Linézolide	≤ 2	> 4	≥ 28	-
GLYCOPEPTIDES				
Teicoplanine	≤ 4	> 8	≥ 17	-
Vancomycine	≤ 4	> 8	≥ 17	-
POLYPEPTIDES				
Bacitracine	≤ 2	> 2	≥ 15	< 15
Colistine	≤ 2	> 2	≥ 15	< 15
NITROFURANES				
	≤ 64	> 64	≥ 15	< 15
QUINOLONES				
Acide oxolinique	≤ 2	> 4	≥ 20	< 17
Acides nalidixique	≤ 8	> 16	≥ 20	< 15
Acide piromidique	≤ 16	> 32	≥ 20	< 16
FLUOROQUINOLONES				
Ciprofloxacine	≤ 0,5	> 1	≥ 25	< 22
Lévofloxacine	≤ 1	> 2	≥ 20	< 17
Loméfloxacine	≤ 1	> 2	≥ 22	< 19
Norfloxacine	≤ 0,5	> 1	≥ 25	< 22
Ofloxacine	≤ 0,5	> 1	≥ 25	< 22
Péfloxacine	≤ 1	> 4	≥ 22	< 16
DIVERS				
Acide fusidique	≤ 2	> 16	≥ 22	< 15
Fosfomycine	≤ 32	> 32	≥ 14	< 14
Rifampicine	≤ 4	> 16	≥ 19	< 14
Mupirocine	≤ 2	-	≥ 19	-

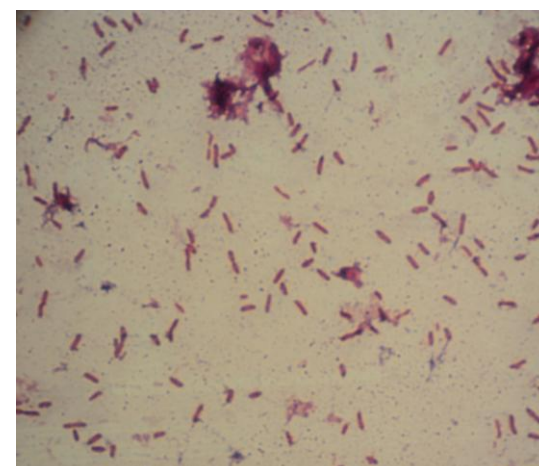
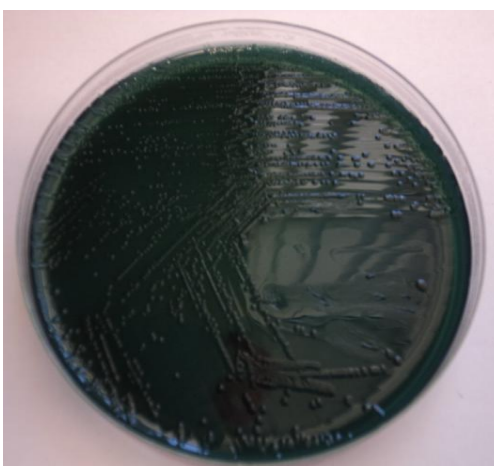
Annexe 7 : Photos des cultures et des colorations de Gram des espèces identifiées.



Escherichia coli

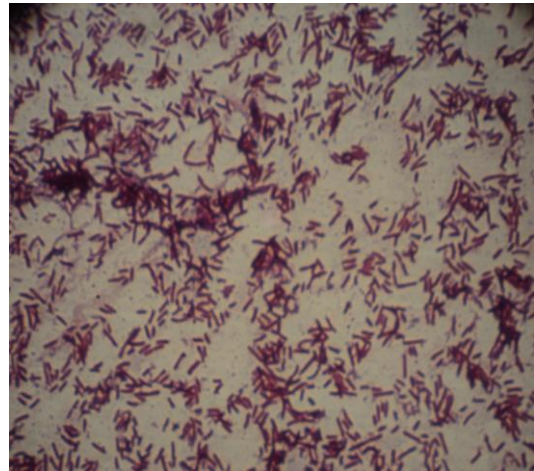
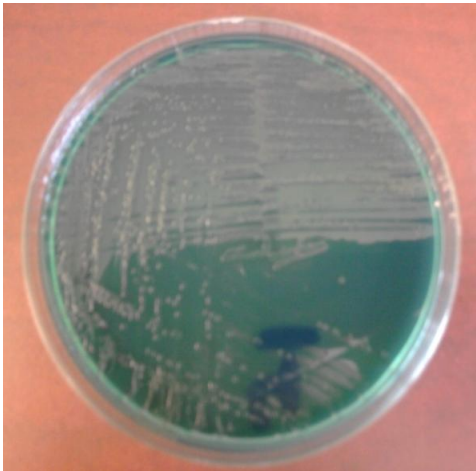


Aeromonas hydrophila

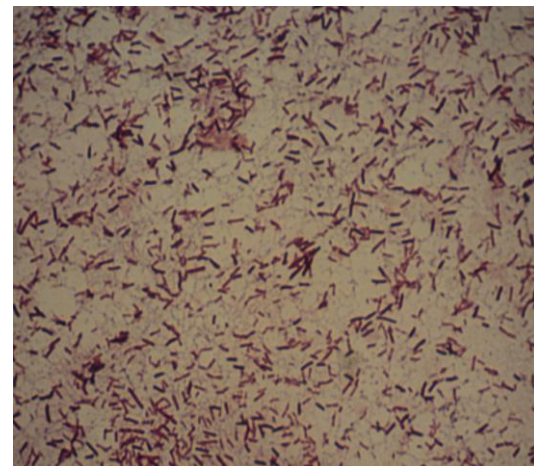
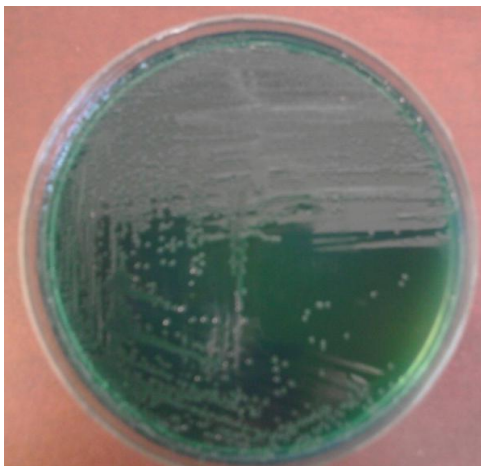


Methylobacterium mesophilicum

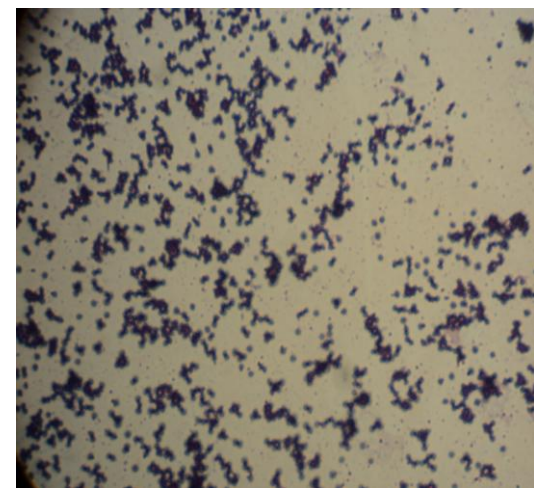
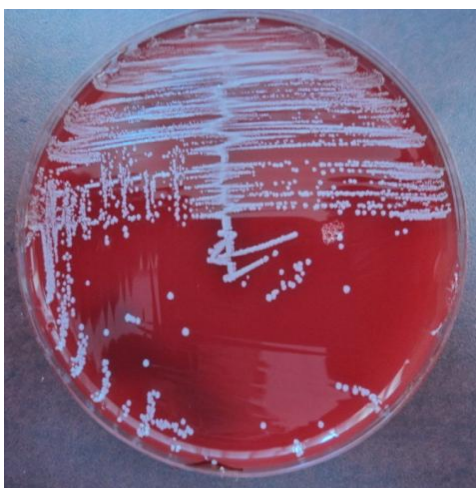
Annexe 7 (suite) : Photos des cultures et des colorations de Gram des espèces identifiées.



Shewanella putrifaciens

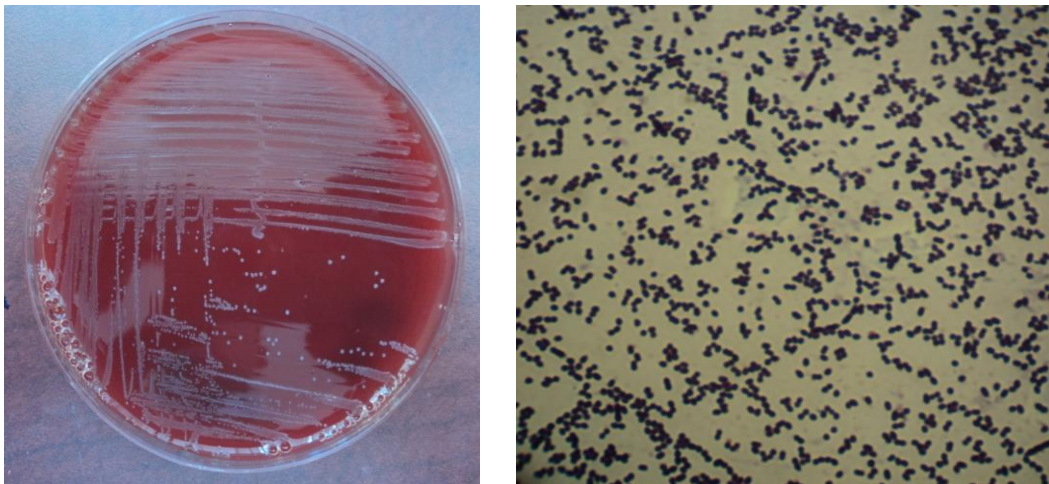


Comamonas testosteroni



Staphylococcus epidermidis

Annexe 7 (suite) : Photos des cultures et des colorations de Gram des espèces identifiées.

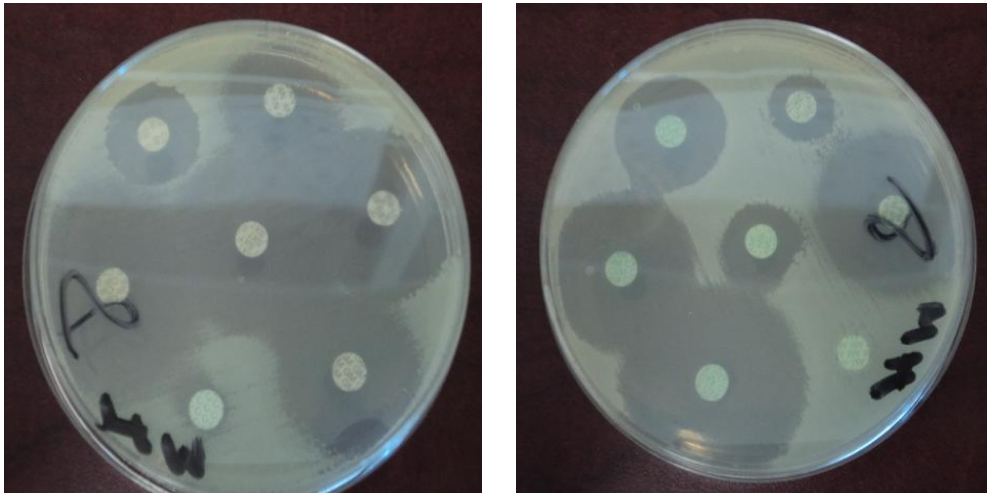


Enterococcus faecium

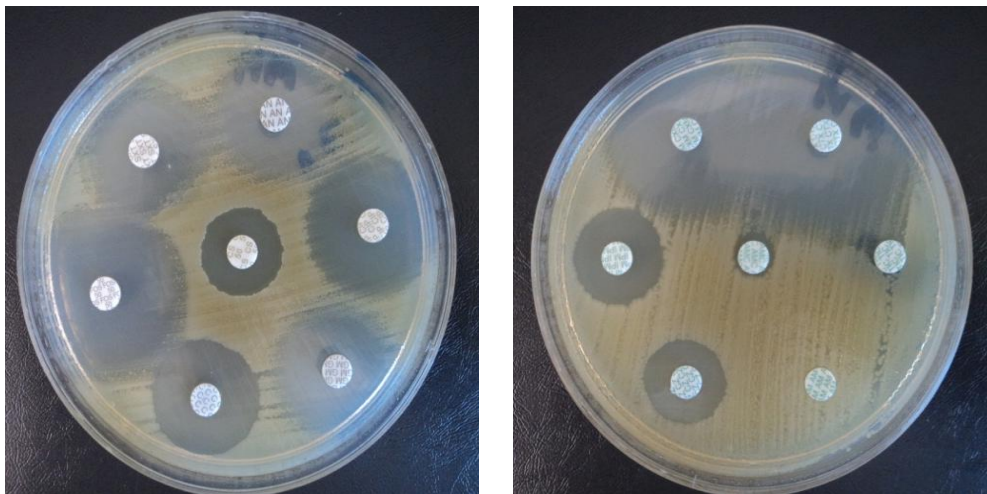
Annexe 8 : Interface du logiciel d'identification API Excel.

1	API 20E	Taxon le plus probable	probabilité
2	Escherichia coli 1	Excellente Id	0,998
3	T	0,93	
4	ONPG	+	
5	ADH	-	
6	LDC	+	
7	ODC	-	
8	CIT	-	
9	H2S	-	
10	URE	-	
11	TDA	-	
12	IND	+	
13	VP	-	
14	GEL	-	
15	GLU	+	
16	MAN	+	
17	INO	-	
18	SOR	+	
19	RHA	+	
20	SAC	-	
21	MEL	+	
22	AMY	-	
23	ARA	+	
24	OX	-	
25			

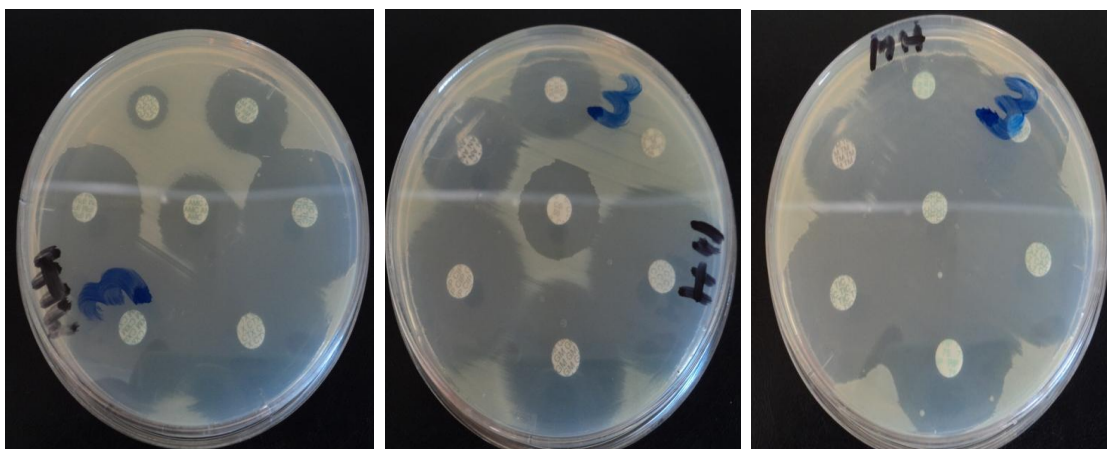
Annexe 9 : Photos des antibiogrammes des espèces identifiées.



Escherichia coli

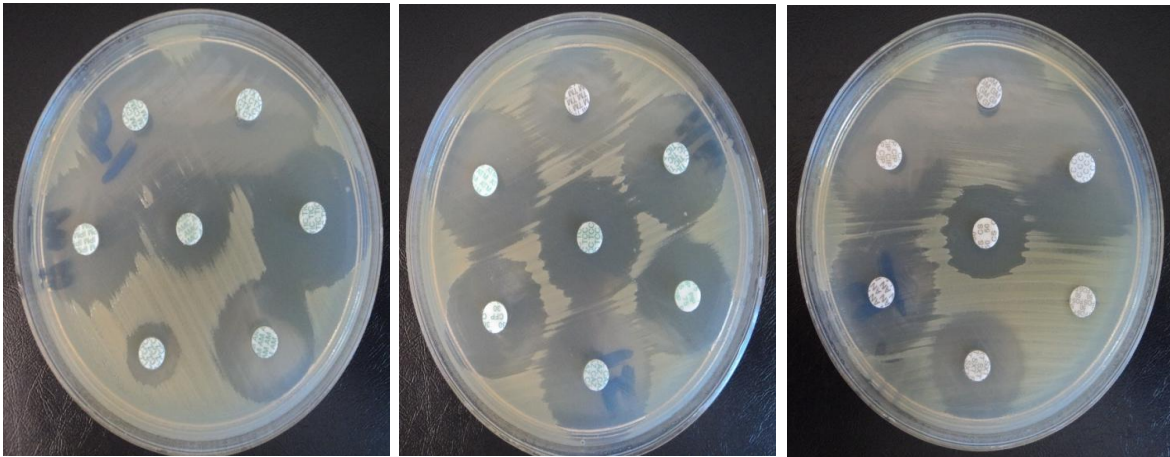


Aeromonas hydrophila

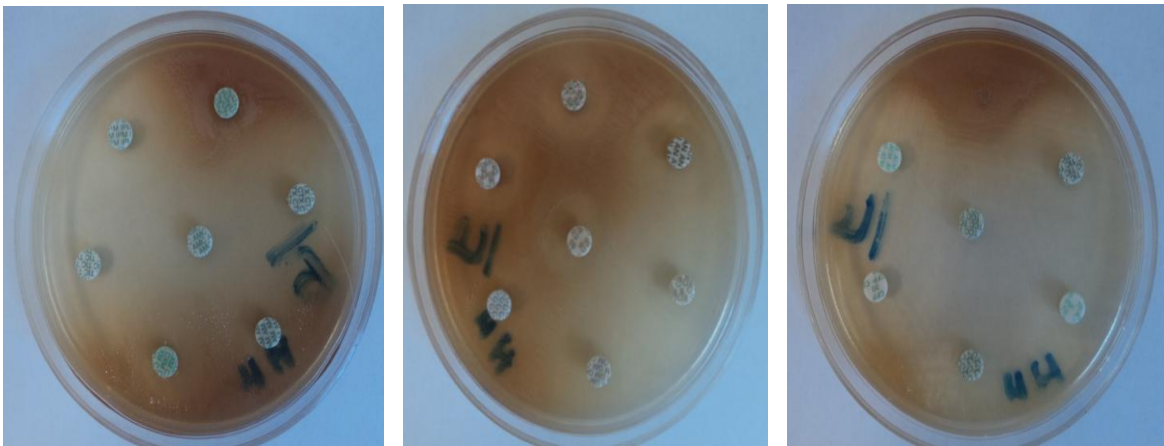


Methylobacterium mesophilicum

Annexe 9 (suite) : Photos des antibiogrammes des espèces identifiées.



Shewanella putrefaciens

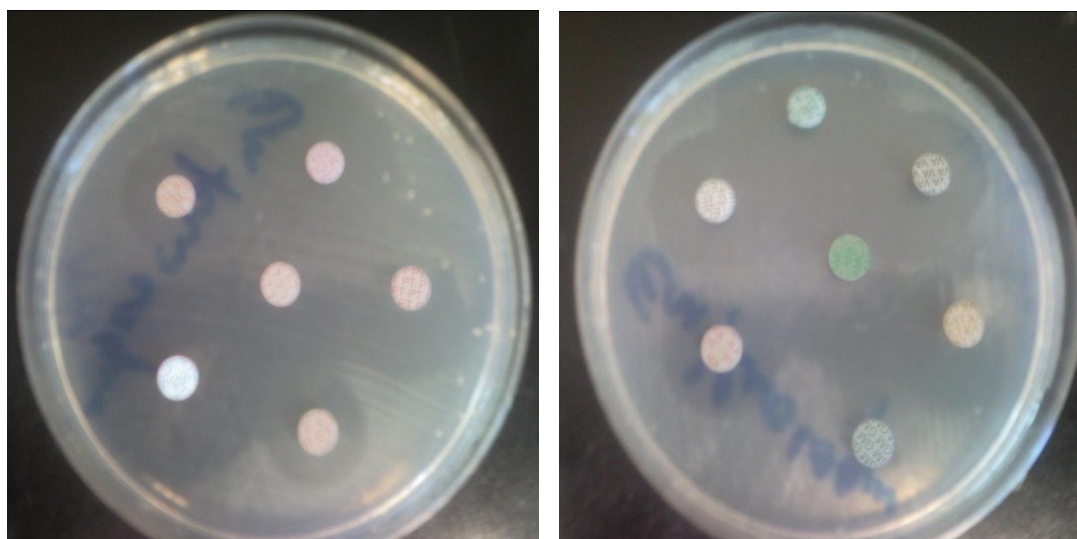


Comamonas testosteroni



Staphylococcus epidermidis

Annexe 9 (suite) : Photos des antibiogrammes des espèces identifiées.



Enterococcus faecium

Annexe 10 : composition des milieux de culture.

- **Milieu BCPL** (Bouillon Lactosé au Pourpre de Bromocrésol)
 - Peptone.....5,0 g
 - Extrait de viande.....2,0 g
 - Lactose.....5,0 g
 - Bromocrésol pourpre.....25 mg
 - Eau distillée.....1000 ml
 - pH = 6,9
- **Milieu BLBVB** (Bouillon Lactosé Bilié au Vert Brillant)
 - Peptone.....10,0 g
 - Lactose.....10,0 g
 - Bile.....20,0 cm³
 - Vert brillant.....13,0 mg
 - Eau distillée.....1000 ml
 - pH = 7,4
- **Milieu Roth**
 - Extrait de viande de bœuf.....4,5 g
 - Tryptone.....15,0 g
 - Glucose.....7,5 g
 - Chlorure de sodium.....2,0 g
 - Azoture de sodium.....0,2 g
 - Eau distillée.....1000 ml
 - pH = 6,8
- **Milieu Schubert**
 - Tryptophane.....0,2 g
 - Acide glutamique.....0,2 g
 - Sulfate de magnésium.....0,7 g
 - Sulfate d'ammonium.....0,4 g
 - Citrate de sodium.....0,5 g
 - Chlorure de sodium.....2,0 g
 - Peptone.....10,0 g
 - Mannitol.....7,5 g
 - Eau distillée.....500 ml
 - pH = 7,6
- **Gélose BEA** (Gélose Biliée à l'Esculine)
 - Tryptone.....17,0 g
 - Peptone.....3,0 g
 - Extrait de levure.....5,0 g
 - Bile de bœuf déshydraté.....10,0 g
 - Chlorure de sodium.....5,0 g
 - Esculine.....1,0 g
 - Citrate double de fer (III) et d'ammonium.....0,5 g
 - Azoture de sodium.....0,15 g
 - Agar.....15 à 20 g
 - Eau.....1000 ml
 - pH = 7,1

Annexe 10 (suite) : composition des milieux de culture.**• Milieu Litsky**

Peptone.....	20 g
Glucose.....	5 g
Chlorure de sodium.....	5 g
Dihydrogénophosphate de potasium.....	2,7 g
Monohydrogénophosphate de sodium.....	2,7 g
Azoture de sodium.....	0,3 g
Solution de violet d'éthyle.....	5 ml
Eau.....	1000ml
Ph = 6,9	

• Gélose Hektoen

Protéose- peptone.....	12,0 g
Extrait de levure.....	3,0 g
Lactose.....	12,0 g
Saccharose.....	12,0 g
Salicine.....	2,0 g
Citrate de fer III et d'ammonium.....	1,5 g
Sels biliaires.....	9,0 g
Fuchsine acide.....	0,1 g
Bleu de bromothymol.....	0,065 g
Chlorure de sodium.....	5,0 g
Thiosulfate de sodium.....	5,0 g
Agar.....	13,0 g
pH = 7,5	

• Gélose nutritive

Extrait de viande.....	1,0 g
Extrait de levure.....	2,0 g
Peptone.....	5,0 g
Chlorure de sodium.....	5,0 g
Agar.....	15,0 g
pH = 7,3	

• Gélose VF (Viande-Foie)

Base viande-foie.....	30 g
Glucose.....	2 g
Amidon.....	2 g
Agar.....	11 à 18 g
Eau.....	1000 ml
pH = 7,4	

• Gélose PCA (Plat Count Agar)

Tryptone.....	6,0 g
Extrait de levure déshydraté.....	3,0 g
Gélose en poudre	10 à 20 g
Eau.....	1000 ml

• Gélose MH (Mueller-Hinton)

Infusion de viande de bœuf.....	300,0 cm ³
Peptone de caséine.....	17,5 g
Amidon de maïs.....	1,5 g
Agar.....	17,0 g
pH = 7,4	

• Gélose Columbia (base de gélose au sang)

Mélange spécial de peptone.....	23,0 g
Amidon.....	1,0 g
Chlorure de sodium.....	5,0 g
Agar.....	10,0 g
pH = 7,3	

Références bibliographiques

- [1] : W. Kingston, 2000. Antibiotics, invention and innovation. *Research Policy* **29**, 679-710.
- [2] : S. Duckett, 1999. Ernest Duchesne and the concept of fungal antibiotic therapy. *The Lancett* **354**, 2068-2071.
- [3] : D. Papp, 1954. Histoires des antibiotiques. In : revue d'histoire des sciences et de leurs applications. Tome 7 n° 2, 124-138.
- [4] : C. Baudry, H. Brezellec, 2006. Microbiologie-immunologie, exercices d'application. 2^{ème} édition Wolters Kluwer France, 126 p.
- [5] : C. Gaudy, J. Buxeraud, 2005. Antibiotiques : pharmacologie et thérapeutique. *Collection Pharma, Elsevier*, 269 p.
- [6] : M. Talbert, G. Willoquet, R. Gervais, 2009. Le guide pharmaco clinique. *Edition Wolters Kluwer France*, 1063 p.
- [7] : J.D. Cavallo, R. Fabre, F. Jehl, C. Rapp, E. Garrabé, 2004. Bêtalactamines. *EMC. Maladies infectieuses* **1**, 129-202.
- [8] : C. Perronne, 1999. Maladies infectieuses volume1. *Edition DOIN*, 406 p.
- [9] : F. Pebret, 2003. Maladies infectieuses. *Edition Heures De France*, 592 p.
- [10] : P-N. Zoumahon, 2004. Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées des infections urinaires au laboratoire de bactériologie du centre hospitalier universitaire – Hubert Koutoukou MAGA de Cotonou. *Thèse de Doctorat, université de Mali*, 107 p.
- [11] : M. Moulin, A. Coquerel, 2002. Pharmacologie. 2^{ème} édition, *Masson, Paris*, 1000 p.
- [12] : E. Bergogne-Bérézin, P. Dellamonica, 1999. Antibiothérapie en pratique clinique. 2^{ème} édition *Masson*, 496 p.
- [13] : M. Vaubourdolle, 2007. Infectiologie. 3^{ème} édition, *Tome 3, collection LE MONITEUR*, 1036 p.
- [14] : Y. Cohen, C. Jacquot, 2008. Pharmacologie. 6^{ème} édition *Elsevier Masson*, 487 p.
- [15] : R. Gauzit, 2011. Actualités en antibiothérapie-aminosides toujours et encore : bon usage et suivi thérapeutique. *Réanimation* **20**, 290-298.

- [16] : J-L. Pourriat. C. Martin, 2005. Principe de réanimation chirurgicale. 2^{ème} édition Arnette, 1430 p.
- [17] : X. Anglaret, E. Mortier, 2002. Maladies infectieuses. Editions Estem, éditions Med-Line, 292 p.
- [18] : C. Nauciel, J-L. Vildé, 2005. Bactériologie médicale. 2^{ème} édition Masson, 257 p.
- [19] : H. Dutronc, F. Bocquentin, T. Galpérine, S. Lafarie-Castet, M. Dupon, 2005. Le linézolide, premier antibiotique de la famille des oxazolidinones. *Médecine et maladies infectieuses* **35**, 427-434.
- [20] : J-P. Flandrois, 1997. Bactériologie médicale. Presses universitaires de Lyon, 309 p.
- [21] : B. Regnier, 1994. Chimio prophylaxie par la mupirocine. *Médecine et maladies infectieuses* **24**, 1207-1213.
- [22] : A.N. Nekrasov, A.V. Stepanov, V.P. Timofeev, 1995. The features of the special structure of the gramicidine A-cesium complex. *FEBS Letters* **371**, 35-38.
- [23] : R. Belounir, 2007. Critères de choix d'un antibiotique. *Médecine du Maghreb* **21**, 26-27.
- [24] : P. F. Harrison, J. Lederberg, 1998. Antimicrobial Resistance: Issues and Options Workshop Report. *National Academy Press*, 115 p.
- [25] : Y. C. Zhang, Vilcheze, W. R. Jacobs, 2005. Mechanisms of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In V. Mathys. Contribution à la compréhension des mécanismes moléculaires de résistance de *Mycobacterium tuberculosis* aux antituberculeux. *Thèse de doctorat en sciences biomédicales et pharmaceutiques. Université libre de Bruxelles*, 224 p.
- [26] : H. C. Davison, J. C. Low, M. E. J. Woolhouse, 2000. What is antibiotic resistance and how can we measure it? *Trends in Microbiology* **8 (12)**, 554-559.
- [27] : J. L. Mainardi, F. W. Goldstein, L. Gutman, 1996. Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques. In A-L. Tarbouriech. Etude de l'épidémiologie des bactéries résistantes, des facteurs de risque d'antibiorésistance et de la prescription d'une antibiothérapie probabiliste. *Thèse de Doctorat*, 95 p.

- [28] : E. P. Abraham, E. Chain, 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* **146**, 837-837. In K. Poole, 2002. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* **92**, 55-64.
- [29] : MC. McManus, 1997. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Am J Health System Pharm* **54 (23)**, 2747-2748.
- [30] : AA. Shah, F. Hasan, S. Ahmed, 2004. Extended-spectrum β -lactamases (ESbLs): characterization, epidemiology and detection. In C-M. Samama, J. Duranteau, P-Y. Gueugniand. Conférence d'actualisation, 47^{ème} congrès national d'anesthésie et de réanimation. *Collection de la SFAR*, 569 p.
- [31] : C. F. Amábile-Cuevas, 2006. Antimicrobial resistance in bacteria. *Edition Horizon Bioscience*, 28.
- [32] : D. Mazel, 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. In É. Guérin, G. Cambray, Sandra Da Re, D. Mazel, M-C Ploy. Les antibiotiques induisent la capture de gènes de résistance par les bactéries. *Médecine/Science* **1(26)**.
- [33] : M-C. Ploy, A. Gassama, D. Chainier, F. Denis, 2005. Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques. *Immuno-analyse & biologie spécialisée* **20 (6)**, 343-352.
- [34] : DA. Rowe-Magnus, AM. Guerout, P. Ploncard, 2001. The evolutionary history of chromosomal super-integrons provides an ancestry for multiresistant integrons. In É. Guérin, G. Cambray, Sandra Da Re, D. Mazel, M-C. Ploy. Les antibiotiques induisent la capture de gènes de résistance par les bactéries *Médecine/Science* **1 (26)**.
- [35] : Y. Michel-Briand, 2009. Une histoire de la résistance aux antibiotiques. *Edition L'Harmattan*, 360 p.
- [36] : K.T. Harder, H. Nikaido, M. Matsushashi, 1981. Mutants of *Escherichia coli* that are resistant to certain β -lactam compounds lack the Omp F porin. In Y. Michel-Briand. Une histoire de la résistance aux antibiotiques. *Edition L'Harmattan*, 360 p.
- [37] : J. Trias, J. Dufresne, RC. Levesque, H. Nikaido, 1989. Decrease outer membrane permeability in imipenem-resistant mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. In Y. Michel-Briand. Une histoire de la résistance aux antibiotiques. *Edition L'Harmattan*, 360 p.

- [38] : L. McMurry, R. E. Petrucci, S. B. Levy, 1980. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. In N. Michael, Alekshun, B. S. Levy. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell* **128**, Elsevier Inc, 1037-1050.
- [39] : V. Cattoir, 2004. Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathologie Biologie* **52**, 607-616.
- [40] : P.N. Markham, AA. Neyfakh, 2001. Efflux-mediated drug resistance in Gram positive bacteria. In V. Cattoir. Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathologie Biologie* **52**, 607-616.
- [41] : K. Poole, 2004. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. In V. Cattoir. Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathologie Biologie* **52**, 607-616.
- [42] : P. Butaye, A. Cleeckaert, S. Schwarz, 2003. Mobile genes coding for efflux mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram negative bacteria. In V. Cattoir. Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathologie Biologie* **52**, 607-616.
- [43] : A. Kumar, P. Herbert, Schweizer, 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**, Elsevier, 1486-1513.
- [44] : M. Matsushashi, M. Sang, F. Ishino, M. Wachi, M. Doi, M. Inoue, 1986. Cloning of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to β -lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. In M. Nour, M. Mastouri, M. Ben Nejma. Le staphylocoque doré résistant à la méticilline : émergence et bases moléculaires de la résistance. *Pathologie Biologie* **53**, 334-340.
- [45] : C. Hackbarth, H. Chamber, 1993. blaI and blaR1 regulate β -lactamase and PLP2a production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In M. Nour, M. Mastouri, M. Ben Nejma. Le staphylocoque doré résistant à la méticilline : émergence et bases moléculaires de la résistance. *Pathologie Biologie* **53**, 334-340.
- [46] : C.G. Dowson, T.J. Coffey, B.G. Spratt, 1994. Origin and molecular epidemiology of penicillin-binding-protein-mediated resistance to β -lactam antibiotics. In A. Peter, Lambert. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**, 1471-1485.

- [47] : T.J. Coffey, C.G. Dowson, M. Daniels, B.G. Spratt, 1995. Genetics and molecular biology of β -lactam-resistant pneumococci. In A. Peter, Lambert. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**, 1471-1485.
- [48] : P.A. Ropp, M. Hu, M. Olesky, R.A. Nicholas, 2002. Mutations in *ponA*, the gene encoding penicillin-binding protein 1, and a novel locus, *penC*, are required for high-level chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. In A. Peter, Lambert. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**, 1471-1485.
- [49] : T.D. H. Bugg, G.D. Wright, S. Dutka-Malen, M. Arthur, P. Courvalin, C. T. Walsh, 1991. Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. In A. Peter, Lambert. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**, 1471- 1485.
- [50] : P. Vannuffel, C. Cocito, 1996. Mechanism of action of streptogramins and macrolides. In A. Peter, Lambert. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**, 1471– 1485.
- [51] : P. Vannuffel, M. Di Giambattista, E. A. Morgan, C. Cocito, 1992. Identification of a single base change in ribosomal RNA leading to erythromycin resistance. In A. Peter, Lambert. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**, 1471– 1485.
- [52] : J.I. Ross, E.A. Eady, J.H. Cove, C.E. Jones, A.H. Ratyal, Y.W. Miller, S. Vyakrnam, W.J. Cunliffe, 1997. Clinical resistance to erythromycin and clindamycin in cutaneous propionibacteria isolated from acne patients is associated with mutations in 23S rRNA. In A. Peter, Lambert. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**, 1471- 1485.
- [53] : D.C. Hooper, 2001. Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. In A. Peter, Lambert. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**, 1471– 1485.
- [54] : C.J. Willmott, A. Maxwell, 1993. A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase–DNA complex. In A. Peter, Lambert. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**, 1471- 1485.

- [55] : D.C. Hooper, 1999. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. In A. Peter, Lambert. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**, 1471-1485.
- [56] : D.H. Mariam, Y. Mengistu, S.E. Hoffner, D.I. Andersson, 2004. Effect of *rpoB* mutations conferring rifampin resistance on fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. In A. Peter, Lambert. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**, 1471-1485.
- [57] : J. Turnidge, P. Collignon, 1999. Resistance to fusidic acid. In A. Peter, Lambert. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**, 1471– 1485.
- [58] : C. Walsh, 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. In H. Yoneyama, R. Katsumata. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **70**, 1060-1075.
- [59] : J. Davies, 1994. Inactivation of antibiotics and dissemination of resistance genes. In H. Yoneyama, R. Katsumata. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **70**, 1060-1075.
- [60] : G.E. Wright, 1999. Aminoglycoside-modifying enzymes. In H. Yoneyama, R. Katsumata. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **70**, 1060-1075.
- [61] : L. P. Kotra, J. Haddad, S. Mobashery, 2000. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. In H. Yoneyama, R. Katsumata. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **70**, 1060-1075.
- [62] : G. D. Wright, 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**, 1451-1470.
- [63] : C. Auboyer, G. Beaucaire, 1999. Association d'antibiotiques ou monothérapie en réanimation chirurgicale et en chirurgie. *Conférence d'experts*, 8 p.
- [64] : F. Denis, M-C. Poly, C. Martin, E. Bingen, 2007. Bactériologie médicale : techniques usuelles. *Elsevier Masson*, 573 p.
- [65] : J-N. Joffin, G. Leyral, 2006. Microbiologie technique, tome 1, dictionnaire des techniques. 4^{ème} édition Scérèn, 368 p.

- [66] : Anonyme, 2007. Cours de bactériologie. Faculté de médecine de Nantes, 91 p.
- [67] : X. Nassif, A.A. Marmonier, B. Carbonelle, 1987. Etude de l'activité bactéricide des associations binaires d'antibiotiques. In A.A. Marmonier, B. Carbonelle, F. Denis, G. Pinon, R. Vargues. Bactériologie médicale : techniques usuelles. 3^{ème} tirage SIMEP, 330 p.
- [68] : M. Saheb, 2003. Cartographie et rôle de la végétation dans le maintien de l'avifaune aquatique des sebkhas de Guellif et de Boucif (Oum-El-Bouaghi). *Mémoire de Magister, Université d'Oum El-Bouaghi*, 96 p.
- [69] : S. Seddek, M-C. Maazi, M. Hafid, M. Saheb, B. Mayache, S. Mettlaoui, M. Houhamdi, 2010. Statut et écologie des peuplements de Laro-limicoles et d'Echassiers dans le Lac de Timerganine (Oum El-Bouaghi, Algérie). *Bulletin de l'institut scientifique, Rabat, sciences de la vie* **32**, 111-118.
- [70] : <<http://maps.google.fr/>>. Date de consultation : 17/11/2011.
- [71] : J. Rodier, B. Legube, N. Merlet et coll, 2009. L'analyse de l'eau. 9^{ème} édition DUNOD, Paris, 1526 p.
- [72] : P. Tallon, B. Magajna, C. Lofranco, K. T. Leung, 2005. Microbial indicators of faecal contamination in water: a current perspective. *Water, Air and Soil pollution* **166**, 139-166.
- [73] : T. Gracia-Armisen, 2006. Etude de la dynamique des *Escherichia coli* dans les rivières du bassin de la Seine. *Thèse de Doctorat en sciences, écologie des systèmes aquatiques, université libre de Bruxelles*, 81 p.
- [74] : F. Røjsøk, 2002. Analyse des eaux, aspects réglementaires et techniques. *Edition Scérèn*, 358 p.
- [75] : Lebers, 2008. Cours d'hygiène et de microbiologie de l'eau. *Institut Pasteur d'Algérie*, 60 p.
- [76] : Anonyme, 2006. Notice pour API, Ref 20100/20160, 20500. *Biomérieux® SA*.
- [77] : C.J. Soussy, 2010. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. *Société française de microbiologie*, 49p.
- [78] : V. Gallego, M.T. Gracia, A. Ventosa, 2005. *Methylobacterium variabile* sp. nov., a methylotrophic bacterium isolated from an aquatic environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**, 1429-1433.

- [79] : X. Wang, F. Sahr, T. Xue, B. Sun, 2007. *Methylobacterium salsuginis* sp. nov., isolated from Seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 1699-1703.
- [80] : H. Pagnier, P. Berche, 2005. Les infections à *Shewanella*, un pathogène opportuniste émergent. *Médecine et maladies infectieuses* **35**, 186-191.
- [81] : T-L. Tsui, S-M. Tsao, K-S. Liu, T-Y. Chen, Y-L. Wang, Y-H. Teng, Y-T. Lee, 2011. *Comamonas testosteroni* infection in Taiwan: Reported two cases and literature review. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* **44**, 67-71.
- [82] : K.C. Patel, M.P. Patel, K. Chauhan, H. Anto, U. Trivedi, 2007. Production of an antioxidant naphthoquinone pigment by *Comamonas testosteroni* during growth on naphthalene. *Journal of scientific and industrial research* **66**, 605-610.
- [83] : J-P. O’Gara, H. Humphreys, 2001. *Staphylococcus epidermidis* biofilms : importance and implications. *J.Med.Microbiol* **50**, 582-587.
- [84] : F. Lakhal, M. El-Bour, B. Balkis, A. El-Abed, 2005. Etude préliminaire des caractéristiques biochimiques et moléculaires d’*Aeromonas hydrophila* isolées du milieu marin. *Mar Life* **15**, 13-18.
- [85] : T. Fosse, C.Giraud-Morin, I. Madinier, 2003. Phénotypes de résistance aux β -lactamines dans le genre *Aeromonas*. *Pathologie Biologie* **51**, 290-296.
- [86] : P. Courvalin, R. Leclercq, E. Bingen, 2006. AntibioGramme. 2^{ème} édition ESKA, 687 p.
- [87] : R. Hogue, M. Graves, S. Moler, J.M. Janda, 2007. Pink-pigmented non-fermentative Gram-negative rods associated with human infections: a clinical and diagnostic challenge. *Infection* **35**, 126-133.
- [88] : J.M. Abraham, G.L. Simon, 2007. *Comamonas testosteroni* bacteremia ; a case report and review of the literature. *Infectious Diseases in Clinical Practice* **15**, 272-273.
- [89] : J.L. Avril, H. Dabernat, F. Denis, 1992. Bactériologie clinique. 2^{ème} édition Ellipses, 511 p.
- [90] : K. Chaieb, K. Mahdouani, A. Bakhrouf, 2007. Antibiotic resistance genes detected by multiplex PCR assays in *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from dialysis fluid and needles in a dialysis service. *Japanese Journal of Infectious Diseases* **60**, 183-187.

[91] : B. Imzilen, M. Barakate, 1997. Impact de la pollution fécale sur la distribution des *Aeromonas hydrophila* dans différents milieux aquatiques à Marrakech, Maroc. *JAHS Publ* **243**, 129-137.

[92] : L.M. Prescott, J.P. Harley, D.A. Klein, 2003. Microbiologie. 2ème édition De Boeck, 1164 p.

Résumé

Dans le but d'évaluer les phénomènes de la résistance bactérienne aux antibiotiques dans les écosystèmes aquatiques, notamment dans les eaux de surface, nous nous sommes intéressés à étudier Sebkheth Ouled M'barek de la wilaya de Khenchela, un plan d'eau exposé à une pollution microbienne d'origine fécale. Dans notre étude, nous avons commencé par une estimation de la qualité microbiologique de l'eau en utilisant différentes méthodes de recherche et de dénombrement des germes test de contamination fécale. Les résultats obtenus ont montré une pollution microbienne importante de notre zone d'étude. Sept espèces bactériennes ont été identifiées : *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Methylobacterium mesophilicum*, *Shewanella putrefaciens*, *Comamonas testosteroni*, *Staphylococcus epidermidis* et *Enterococcus faecium*.

L'étude de l'antibiorésistance a montré, pour *E. coli*, une résistance acquise à l'Ampicilline et à la Ticarcilline (par une pénicillinase à bas niveau) et au Chloramphénicol (par chloramphénicol acétyltransférase). *A. hydrophila* ainsi que les trois autres bacilles non fermentant, présentent un phénotype sauvage de résistance. *S. epidermidis* présente une résistance acquise à la Pénicilline (par une pénicillinase plasmidique), à l'Oxacilline et à l'Erythromycine (par mécanisme d'efflux). *E. faecium* présente un phénotype sauvage de résistance. L'étude de l'association des antibiotiques sur *A. hydrophila* a montré une meilleure synergie entre la colistine et la céfotaxime. La technique de l'échiquier nous a permis de révéler pour ces deux antibiotiques, les plus faibles concentrations donnant un meilleur effet sur la croissance de cette espèce. Elles équivalent respectivement 166,5 et 6,25 µg/ml.

Mots clé : Sebkheth, zone humide, contamination fécale, antibiorésistance, association d'antibiotiques.

Abstract

In order to evaluate the phenomena of bacterial resistance to antibiotics in aquatic ecosystems, particularly in surface waters, it was interested to study Sebkheth Ouled M'barek of the City of Khenchela, a water plan exposed to microbial pollution of fecal origin. In our study, we have begun by estimating the microbiological quality of water using different research methods and enumeration of test germs of fecal contamination. The results showed a significant microbial pollution of our study area. Seven bacterial species were identified: *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Methylobacterium mesophilicum*, *Shewanella putrefaciens*, *Comamonas testosteroni*, *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecium*.

The study of antibiotic resistance showed, for *E.coli*, acquired resistance to Ampicillin and Ticarcillin (by a low-level penicillinase) and to Chloramphenicol (by chloramphenicol acetyltransferase). *A. Hydrophila* and the three other non-fermenting bacilli have a wild-type resistance. *S. epidermidis* has acquired resistance to penicillin (by penicillinase plasmid), Oxacillin and Erythromycin (by efflux mechanism). *E. faecium* have a wild-type resistance. The study of the association of antibiotics on *A. Hydrophila* showed greater synergy between colistin and cefotaxim. The technique of the chessboard allowed us to reveal, to these two antibiotics, the lowest concentration giving a better effect on the growth of this species. They amount respectively 166.5 and 6.25 µg / ml.

Keywords: Sebkheth, wetland, fecal contamination, antibiotic resistance, antibiotic combination.

ملخص

بهدف تقييم مظاهر المقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية في الأوساط المائية، خصوصا المياه السطحية، قمنا بدراسة سبحة أولاد مبارك بولاية خنشلة و التي هي عبارة عن سطح مائي معرض لتلوث جرثومي برازي المنشأ. في دراستنا هذه، بدأنا بتقدير الجودة الميكروبيولوجية للمياه و ذلك باستعمال عدة طرق للبحث و تعداد الجراثيم الدالة على التلوث ذو المصدر البرازي. النتائج المتحصل عليها تبين تلوث جرثومي معتبر لمنطقة دراستنا . قمنا بتحديد سبع أنواع بكتيرية:

Escherichia coli, *Aeromonas hydrophila*, *Methylobacterium mesophilicum*, *Shewanella putrefaciens*, *Comamonas testosteroni*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium*.

دراسة مقاومة المضادات الحيوية أوضحت، بالنسبة لـ *E.coli* مقاومة مكتسبة لـ Ampicilline و Ticarcilline (بواسطة أنزيم pénicillinase بمستوى منخفض) و لـ Chloramphénicol (بواسطة chloramphénicol acétyltransférase). *A. Hydrophila* ، إضافة إلى الثلاث عصيات غير التخمرية أوضحت مظهر مقاومة بري. *S. epidermidis* أوضحت مقاومة مكتسبة لـ Pénicilline (بواسطة أنزيم pénicillinase بلازميدي)، لـ Oxacilline و لـ Erytromycine (بواسطة آلية efflux). *E.faecium* أوضحت مظهر مقاومة بري. دراسة تجميع المضادات الحيوية بالنسبة لـ *A. Hydrophila* ، بينت أفضل تآزر بين colistine و céfotaxime. طريقة طاولة الشطرنج مكنتنا من كشف أقل تراكيز المضادين الحيويين القادرة على إعطاء أفضل التأثيرات على نمو هذه البكتيريا. هذه التراكيز هي على التوالي : 166,5 ميكروغرام/ل و 6,25 ميكروغرام/ل .

الكلمات المفتاحية: سبحة، أراضي رطبة، تلوث برازي، مقاومة المضادات الحيوية، تجميع المضادات الحيوية.

Nom : **HAMAMES**

Date de soutenance : **04 /04 /2012**

Prénom : **Mokhtar**

Diplôme: **Magistère en Biologie**

Thème: **Etude *in vitro* de l'effet antibactérien des associations d'antibiotiques : cas des bactéries isolées de Sebkheth Ouled M'barek (El-Mahmel, wilaya de Khenchela)**

Résumé

Dans le but d'évaluer les phénomènes de la résistance bactérienne aux antibiotiques dans les écosystèmes aquatiques, notamment dans les eaux de surface, nous nous sommes intéressés à étudier Sebkheth Ouled M'barek de la wilaya de Khenchela, un plan d'eau exposé à une pollution microbienne d'origine fécale. Dans notre étude, nous avons commencé par une estimation de la qualité microbiologique de l'eau en utilisant différentes méthodes de recherche et de dénombrement des germes test de contamination fécale. Les résultats obtenus ont montré une pollution microbienne importante de notre zone d'étude. Sept espèces bactériennes ont été identifiées : *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Methylobacterium mesophilicum*, *Shewanella putrefaciens*, *Comamonas testosteroni*, *Staphylococcus epidermidis* et *Enterococcus faecium*.

L'étude de l'antibiorésistance a montré, pour *E. coli*, une résistance acquise à l'Ampicilline et à la Ticarcilline (par une pénicillinase à bas niveau) et au Chloramphénicol (par chloramphénicol acétyltransférase). *A. hydrophila* ainsi que les trois autres bacilles non fermentant présentent un phénotype sauvage de résistance. *S. epidermidis* présente une résistance acquise à la Pénicilline (par une pénicillinase plasmidique), à l'Oxacilline et à l'Erytromycine (par mécanisme d'efflux). *E. faecium* présente un phénotype sauvage de résistance. L'étude de l'association des antibiotiques sur *A. hydrophila* a montré une meilleure synergie entre la Colistine et la Céfotaxime. La technique de l'échiquier nous a permis de révéler, pour ces deux antibiotiques, les plus faibles concentrations donnant un meilleur effet sur la croissance de cette espèce. Elles équivalent respectivement 166,5 et 6,25 µg/ml.

Mots clés

Sebkheth, zone humide, contamination fécale, antibiorésistance, association d'antibiotiques.

Devant le jury:

Président :	M^r DARBOUCHE A. (Prof)	Université Abbès Laghrour - Khenchela
Encadreur :	M^r HOUHAMDI M. (Prof)	Université 08 Mai 1945 - Guelma
Examineurs :	M^r HOUHA B. (MCA)	Université Abbès Laghrour – Khenchela
	M^r BENOUNIS M. (MCA)	Université Abbès Laghrour – Khenchela
Membre invité :	M^{lle} METALLAOUI S. (MCB)	Université de Skikda

