



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

**UNIVERSITE ABBES LAGHROUR KHENCHELA**  
**FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE**  
**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**

**MEMOIRE**

**Présenté pour l'obtention du diplôme de**

**MASTER**

**FILIERE : Biologie**

**OPTION: Microbiologie générale**

**Thème**

*Identification et antibiorésistance des  
bactéries fécales présentes dans les  
eaux d'Oued BAGHAI (Wilaya de  
Khenchela)*

**Présenté par :**

*MAHDI Fatima*

*MERAH Widad*

**Encadré par :**

**CHORFI K.**

*Soutenu le 14/06/2015*

**Jury de soutenance :**

**Président : M<sup>elle</sup> LEULMI N. (M.A.A)**

**Univ. Abbès Laghrou – Khenchela**

**Encadreur : M<sup>elle</sup> CHORFI K. (M.A.B)**

**Univ. Abbès Laghrou – Khenchela**

**Examineur : M<sup>r</sup> BOUSSAA A. (M.A.B)**

**Univ. Abbès Laghrou – Khenchela**

**Promotion : juin 2015**

---

**Ce travail a été réalisé dans les laboratoires pédagogiques de l'université Abbès Laghrou  
Khenchela**



# Remerciements

*Nous remercions **ALLAH** tout puissant qui nous a donné le courage et la volonté et de nous avoir bénie jusqu'à la réalisation de ce modeste travail.*

*Nous tenons à remercier particulièrement notre encadreur Madame **CHORFI Keltoum** d'avoir proposé et dirigé ce travail, pour toute l'aide qu'elle nous a fournit pendant la préparation de ce mémoire. Merci pour votre patience ainsi que votre générosité. Vraiment on n'a pas assez des mots pour décrire votre noblesse. Malgré vos multiples occupations, vous étiez toujours disponible. Apprendre à vos cotés a été un grand honneur. Que Dieu vous récompense.*

*Nos vifs remerciements vont également aux membres de jury:*

*M<sup>elle</sup> **YAKHLEF W.** maitre assistant à l'Université Abbés Laghrour Khenchela qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury. On l'en remercie profondément.*

*M<sup>r</sup> **BOUSSAA**, maitre assistant à l'Université Abbés Laghrour Khenchela, nous vous sommes très reconnaissantes d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*M<sup>elle</sup> **LEULMI N.** maitre assistant à l'Université Abbés Laghrour Khenchela, on vous remercie de nous avoir honorées par votre présence en tant qu'examineur et pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire. Vous étiez nos chers et inoubliables enseignants avant d'être notre jury*

*Nous remercions aussi Madame **CHORFI R.** responsable des laboratoires pédagogiques de l'université Abbes Laghrour Khenchela pour son accueil et son aide dans le déroulement des expérimentations et aussi tout le personnel.*

*Ces remerciements ne seraient pas complets sans associer toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.*



# Dédicaces

*Avec joie et honneur, je dédie cet humble travail à :*

*L'*être le plus cher de ma vie: mon père, qu'il puisse reposer en paix, je prie Dieu le tout puissant de l'accepter dans son vaste paradis.

*A* ma mère, symbole d'amour et de tendresse, qui a tant sacrifié pour notre réussite, qu'ALLAH te protège.

*A* mes sœurs,

*La généreuse, au cœur d'or, Hanaa, et son époux Mahieddine.*

*La très sage Amel,*

*La douce Ibtissem,*

*M*on unique frère Rafik,

*M*a petite adorable Nahoula.

*M*es chers amis : Adel et Mohamed.

*M*a chère binôme Fatima et sa famille  
surtout son père qu'ALLAH le protège.

*M*es copines Soumia et Ibtissem.

*Sans oublier Majda notre cher ingénieur de laboratoire.*

*A tous mes enseignants et enseignantes durant mes 5 années d'études  
universitaires.*

*A toute ma promotion de Master Microbiologie*

*KHENCHELA 2014 /2015.*

*Wided*



# Dédicaces

*Je tiens tout d'abord à remercier **ALLAH** le tout puissant et miséricordieux.*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A **mon père et ma mère**. Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler, mes parents qui ont su construire pour moi un monde parfait.*

*Qu'**ALLAH** leur procure bonne santé et longue vie.*

*A mes adorables sœurs : **Asma, Soumia, Zineb et Amina** vous avez toujours été présentes par vos bons conseils. Votre affection et votre soutien m'ont été d'un grand secours au long de ma vie professionnelle et personnelle Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.*

*A mes tantes **Louiza et Ghida** et mes oncles **Ahmed et Belkacem***

*A la mémoire de ma tante **Khadidja** qu'Allah lui accorde sa miséricorde.*

*A ma grand-mère paternelle **Madjida**.*

*A mes chères cousines : **Yassmina et Kenza**.*

*A mon binôme que j'adore **Wided** et sa famille*

*A mes meilleures copines : **Romaissa, Meriem, Asma**.*

*A l'ingénieur de laboratoire « 4 » **Madjda** qui a été toujours gentille et serviable.*

*A mes chères amies : **Meriem, Ahlem, Ibtissem, Asma, Soumia, Amel, Yasmine, Nihad, Zineb**.*

*A mes amis : **Amine, Yacine, Housseem, Abdelmalek**.*

*A toute la promotion de master microbiologie **KHENCHELA 2014 /2015***

*A tous mes chers enseignants et enseignantes, que ce travail soit un témoignage de ma gratitude et mon profond respect à vous.*

*A tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer .....*

**Fatima**

## Table des matières

Liste des tableaux.....	i
Liste des figures.....	ii
Liste des abréviations.....	iii
Liste des photographies.....	vi
Liste des annexes.....	vii

### Revue bibliographique

Introduction.....	02
-------------------	----

### Chapitre I: Antibiotiques et résistance bactérienne

I. Généralités sur les antibiotiques .....	06
I.1. Définition .....	06
I.2. Mode d'action des antibiotiques.....	06
I.3. Classification.....	07
I.4. Spectre d'activité des antibiotiques.....	09
II. La résistance bactérienne aux antibiotiques ou antibiorésistance .....	09
II.1. Définition de l'antibiorésistance.....	11
II.2. Mécanismes de l'antibiorésistance .....	11
II.3. Plasticité des Génomes bactériens et dissémination de résistance .....	13
II.3.1. Les mutations .....	14
II.3.2. Le transfert horizontal de gènes.....	14
III. Relation entre résistance aux antibiotiques et virulence .....	16
IV. Impacts de la résistance antimicrobienne .....	17
IV.1. Impacts économiques .....	17
IV.2. Impacts sur la santé publique .....	17
V. Perspectives de lutte .....	17

### Chapitre II : Les eaux de surface

I. Liens entre émergence de la résistance bactérienne et environnement. ....	21
II. Dissémination de la résistance aux antibiotiques au sein des écosystèmes .....	21
III. Les eaux superficielles .....	23
III.1. Définition .....	24
III.2. L'origine des eaux de surface .....	24
III.3. Les indicateurs de contamination fécale .....	25
III.3.1. Coliforme totaux ... ..	25
III.3.2. Coliformes thermorésistants ( <i>Escherichia coli</i> ) .....	26
III.3.3. Les entérocoques fécaux .....	26
III.3.4. Clostridies sulfito-réductrices .....	27
IV. La transmission de l'antibiorésistance dans les eaux superficielles .....	27
IV.1. Effluents hospitaliers .....	28
IV.2. L'agriculture .....	28
IV.3. Les eaux usées et les stations d'épuration .....	29
IV.4. Conséquences.....	29

## Chapitre III : Matériels et méthodes

I. Caractéristiques générales du site d'étude .....	32
II. Procédure d'échantillonnage .....	32
III. Les paramètres microbiologiques .....	33
III.1. Recherche et dénombrements des indicateurs de contamination fécale .....	34
III.1.1. les dilutions décimales en série .....	34
III.1.2. Recherche et dénombrement des coliformes totaux .....	34
III.1.2.1. Biodiversité morphologique des isolats.....	34
III.1.2.1.1.Aspect des colonies sur milieu solide.....	34
III.1.2.2. Identification biochimique par galerie API 20 E.....	35
III.2. Recherche et dénombrement des coliformes thermotolérants .....	37
III.3. Recherche et dénombrement des entérocoques fécaux .....	37
III.3.1. Test de présomption.....	37
III.3.2. Tests de confirmation .....	37
III.3.3. Coloration de GRAM .....	38
III.4. Recherche des Salmonelles .....	39
III.5. Antibiogramme .....	39

## Chapitre IV : Résultats et discussion

I. Dénombrement des germes de contamination fécale .....	45
I.1. Dénombrement des coliformes totaux et thermotolérants.....	45
I.1.1. Biodiversité macroscopiques et microscopiques des isolats.....	45
I.1.2. Identification biochimique des isolats.....	47
I.2. Recherche et dénombrement des entérocoques fécaux.....	52
II. Recherche des Salmonelles.....	54
II.1. Identification biochimique.....	55
III. Profil de résistance aux antibiotiques .....	58
III.1. Profil de résistance aux antibiotiques des coliformes totaux et fécaux.....	58
III.1.1. Multirésistance .....	63
III.1.2. Distribution des principaux phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines....	64
III.2. Profil de résistance aux antibiotiques des entérocoques fécaux .....	66
III.2.1. Multirésistance.....	68
Conclusion générale et perspectives.....	71
Références bibliographiques .....	74
Annexes	
Résumé	
Abstract	
Résumé arabe	

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Les critères de classification des antibiotiques.....	<b>08</b>
<b>Tableau II</b> : Exemples de la diversité protéique et génétique impliquée dans la résistance acquise à certaines familles d'antibiotiques.....	<b>13</b>
<b>Tableau III</b> : Liste des antibiotiques testés pour les entérobactéries, charge et classification des disques.....	<b>41</b>
<b>Tableau IV</b> : Liste des antibiotiques testés pour les entérocoques, charge des disques et classification.....	<b>42</b>
<b>Tableau V</b> : Résultats de l'étude macroscopique des isolats.....	<b>46</b>
<b>Tableau VI</b> : Résultats d'identification des coliformes totaux par la galerie API 20E.....	<b>48</b>
<b>Tableau VII</b> : Résultats d'identification des coliformes fécaux par la galerie API 20E.....	<b>49</b>
<b>Tableau VIII</b> : Résultat de l'identification biochimique des bactéries par les galeries API 20 E.....	<b>56</b>
<b>Tableau IX</b> : La résistance aux antibiotiques des coliformes du 1 <sup>er</sup> prélèvement.....	<b>60</b>
<b>Tableau X</b> : La résistance aux antibiotiques des coliformes du 2 <sup>eme</sup> prélèvement.....	<b>61</b>
<b>Tableau XI</b> : Les taux de résistance aux antibiotiques des coliformes.....	<b>59</b>
<b>Tableau XII</b> : Phénotypes et mécanismes de résistance des coliformes totaux et fécaux aux $\beta$ -lactamines.....	<b>65</b>
<b>Tableau XIII</b> : La résistance aux antibiotiques des Entérocoques fécaux.....	<b>67</b>
<b>Tableau XIV</b> : Les taux de résistance pour chaque antibiotique.....	<b>67</b>

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Résumé des principaux sites d'action des antibiotiques .....	<b>07</b>
<b>Figure 02</b> : Dissémination plausible ou avérée des antibiotiques et de leurs résistances à travers les écosystèmes .....	<b>10</b>
<b>Figure 03</b> : Principales stratégies mises en place par les bactéries pour résister à l'action des antibiotiques .....	<b>12</b>
<b>Figure 04</b> : Les trois modes de transmission du matériel génétique : la conjugaison, la transformation et la transduction chez les bactéries .....	<b>15</b>
<b>Figure 05</b> : La planaire <i>Dugesia japonica</i> .....	<b>19</b>
<b>Figure 06</b> : Représentation des quatre principaux réacteurs impliqués dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement .....	<b>22</b>
<b>Figure 07</b> : La galerie API .....	<b>35</b>
<b>Figure 08</b> : l'aspect des bactéries après la coloration de GRAM .....	<b>38</b>
<b>Figure 09</b> : Disposition des disques d'antibiotiques sur les boîtes d'antibiogrammes selon la standardisation nationale .....	<b>41</b>
<b>Figure 10</b> : Nombre d'espèces bactériennes identifiées à partir des coliformes totaux et thermotolérants .....	<b>51</b>
<b>Figure 11</b> : Pourcentage d'espèces bactériennes identifiées à partir de la gélose SS.....	<b>58</b>
<b>Figure 12</b> : Pourcentage d'isolats de coliformes résistants à divers antibiotiques .....	<b>62</b>
<b>Figure 13</b> : Pourcentage d'isolats des coliformes résistants à au moins 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 8 antibiotiques.....	<b>64</b>
<b>Figure 14</b> : Répartition des principaux phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines .....	<b>64</b>
<b>Figure 15</b> : Pourcentage d'isolats d' <i>Enterococcus</i> résistants à divers antibiotiques.....	<b>68</b>
<b>Figure 16</b> : Pourcentage d'isolats des entérocoques résistants à au moins 1, 2, 3, 4 et 5 antibiotiques. ....	<b>69</b>

## Liste des abréviations

**%** : Pourcentage.

**°C** : Degré Celsius.

**Ac** : Acide

**ADH** : Arginine dehydrolase

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AFNOR** : Agence Française de normalisation

**AK** : Amikacine

**AMP** : Ampicilline

**API 20 E** : Appareillage et Procédés d'Identification des Entérobactéries

**ARN** : Acide ribonucléique

**ATB** : Antibiotique

**ATCC**: American Type Culture Collection

**AUG** : Augmentin (Amoxicilline + Acide clavulanique)

**BEA** : Bile esculine azide.

**BLSE** : Bêtalactamases à spectre étendu

**BMR** : Bactéries multi résistantes.

**C** : Chloramphénicol

**C1G** : Céphalosporine de première génération.

**C3G** : Céphalosporine de troisième génération.

**CIT** : Citrate de sodium

**CMB** : Concentration minimale bactéricide.

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice.

**CN** : Gentamicine

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone.

**CT** : Coliformes totaux.

**CTT** : Coliformes thermotolérants.

**CXT** : Céfotaxime

**E** : Érythromycine

**F** : Nitrofurantoïne

**FO** : Fosfomycine

**g** : Gramme.

**G**: Grossissement

**GEL** : Gélatine de Kohn

**GLU**: Glucose

**h** : Heure.

**H<sub>2</sub>S** : Thiosulfate de sodium

**I** : Intermédiaire

**IMP**: Imipenème

**IND**: Indole

**ISO** : Organisation internationale de normalisation

**I $\beta$ L** : les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases

**KI** : Iodure de Potassium

**Km** : Kilomètre.  
**KZ** : Céfazoline  
**Lac** : Lactose.  
**LDC** : Lysine décarboxylase  
**LEV**: Levofloxacin  
**MAN**: Mannitol  
**MEC**: Mécilline  
**ml** : Millilitre.  
**mm**: Millimètre.  
**mn** : Minute.  
**ODC** : Ornithine décarboxylase  
**OFX** : Ofloxacin  
**OMS** : L'Organisation Mondiale de la Santé  
**ONPG**: Ortho-nitro-phenyl  $\beta$ -D- galactopyranoside  
**pH** : Potentiel hydrogène  
**PLP** : Protéines de liaison à la pénicilline.  
**R** : Résistante  
**RHA**: Rhamnose  
**S** : Streptomycine  
**S** : Sensible  
**SAC**: Saccharose  
**SARM** : Staphylococcus aureus résistant à la mécilline  
**sp**: Espèce  
**SS** : Salmonella-Shigella.  
**STEP**: Station d'épuration  
**SXT** : Triméthoprime/Sulfaméthoxazole  
**T** : Température  
**TC**: Tétracycline  
**TDA**: Tryptophane Désaminase  
**TEC** : Teicoplanine  
**TIC** : Ticarcilline  
**TTC** : Chlorure de 2-3-5-triphényl-2H-tétrazolium  
**UFC** : Unité Formant une Colonie  
**URE**: Urée  
**VA** : Vancomycine  
**VP** : Voges-Proskauer.  
 **$\mu$ g/l**: Microgramme par litre.

## Liste des photographies

<b>Photographie 01</b> : Vue générale de la station d'épuration de la ville de kenchela, Oued Baghai .....	32
<b>Photographie 02</b> : Point de sortie des eaux usées traitées .....	33
<b>Photographie 03</b> : Prélèvement des échantillons .....	33
<b>Photographie 04</b> : Résultats d'isolement sur gélose Tergitol 7 .....	45
<b>Photographie 05</b> : Aspect macroscopique des souches des coliformes sur gélose Hektoen	46
<b>Photographie 06</b> : Les espèces bactériennes identifiées et l'aspect de leurs galeries .....	51
<b>Photographie 07</b> : Résultat du dénombrement des Entérocoques fécaux .....	53
<b>Photographie 08</b> : Résultat du test de confirmation sur gélose B.E.A .....	53
<b>Photographie 09</b> : Résultats de la coloration du Gram .....	54
<b>Photographie 10</b> : Résultat de l'enrichissement sur bouillon au sélénite .....	54
<b>Photographie 11</b> : Résultat de la culture sur la gélose Salmonella-Shigella (SS).....	55
<b>Photographie 12</b> : Aspect macroscopique des bactéries sur gélose Hektoen .....	55
<b>Photographie 13</b> : Aspect des galeries biochimique des espèces bactériennes apparues sur la gélose <i>Salmonella -Shigella</i> .....	57
<b>Photographie 14</b> : Photographies des antibiogrammes des espèces de coliformes identifiées.....	59
<b>Photographie 15</b> : Antibiogramme des différentes espèces des Entérocoques fécaux.....	66

## Liste des annexes

**Annexe 01.** Composition des milieux de culture.

**Annexe 02.** Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 E.

**Annexe 03.** Composition des additifs.

**Annexe 04.** Interface du logiciel d'identification API Excel.

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

**Annexe 06.** Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour les entérobactéries.

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

**Annexe 08.** Composition des colorants de gram.

**Annexe 09.** Phénotypes de résistance des entérobactéries aux  $\beta$ -lactamines.

**Annexes 10.** Matériel et réactifs utilisés.

« Celui qui apprend quelque chose de moi enrichit son savoir sans réduire le mien, tout comme celui qui allume sa chandelle à la mienne se donne de la lumière sans me plonger dans l'obscurité. »

[Thomas Jefferson]

# **Introduction**

## **Introduction**

La découverte des antibiotiques au début du XXe siècle a constitué une véritable révolution pour le traitement des maladies infectieuses d'origine bactérienne. Cependant, l'utilisation massive et parfois abusive des antibiotiques (dans l'antibiothérapie ou dans l'alimentation des bétails comme des facteurs de croissance), en ville comme à l'hôpital, a modifié considérablement l'écologie microbienne et tend à augmenter le taux de bactéries résistantes. Le pouvoir d'adaptation des bactéries se manifeste par leur capacité à s'approprier de nouvelles propriétés soit par modification de leur génome (mutations) soit par acquisition d'informations génétiques par l'intermédiaire d'éléments génétiques mobiles que sont les plasmides et les éléments transposables. La plupart des espèces bactériennes sont capables d'intégrer dans leur génome différents déterminants de résistance. Ainsi la dissémination de gènes de résistance entre bactéries a conduit à l'apparition de bactéries résistantes à plusieurs antibiotiques (bactéries multi résistantes ou BMR) qui vont être dans la prochaine décennie des véritables monstres. (Stéphanie, 2009). La multi résistance aux antibiotiques concerne principalement les bactéries à Gram négatif. (Souana, 2011).

En 2001, l'Organisation Mondiale de la Santé considère l'émergence de ce phénomène comme un problème majeur en santé publique. Au cours des 10 dernières années, la problématique de la résistance aux antibiotiques s'est étendue au-delà des contextes cliniques et vétérinaires, et le milieu environnemental est devenu de plus en plus étudié à la fois comme récepteur et source de l'antibiorésistance.

Les bactéries multirésistantes ont aujourd'hui diffusé dans l'environnement, et leur mise en évidence dans les eaux usées, au niveau des stations d'épuration, dans les eaux de surface ou souterraines, ainsi que dans les sols est désormais établie. Un problème de santé publique se pose alors car l'homme, dans les différents milieux où il vit, peut être exposé à ces bactéries multirésistantes, notamment par l'intermédiaire de l'eau. D'autre part, leur présence dans l'environnement pourrait entraîner le transfert de gènes de résistance aux bactéries de l'environnement, provoquant ainsi une diffusion encore plus grande de ces résistances aux antibiotiques. Ainsi une augmentation globale de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement serait observée. Bien que les causes et les facteurs restent encore mal connus, cette augmentation est principalement attribuée à la pollution anthropique aussi bien par des facteurs biotiques qu'abiotiques. (Stalder, 2012).

Les bactéries antibio-résistantes, majoritairement sélectionnées chez les hommes et animaux sous traitement antibiotique, vont ensuite être rejetées dans les eaux usées ou sur les sols et contaminer les environnements aquatiques. A ce problème s'ajoute aujourd'hui celui des

rejets de substances médicamenteuses dont les effets sur les environnements aquatiques sont encore peu connus. En effet, la contamination simultanée par de faibles concentrations en antibiotiques et des bactéries allochtones antibio-résistantes soulève de nombreuses interrogations sur la relation entre ces contaminants et le maintien, la sélection et le transfert de la résistance aux antibiotiques au sein des communautés autochtones des hydrosystèmes. **(Kenny, 2012).**

La contamination des eaux de surface par des agents pathogènes est un problème de pollution qui remonte très loin dans le temps. La pollution de l'eau due à des micro-organismes d'origine fécale est apparue dès que l'eau a été utilisée comme vecteur de l'élimination des déchets. Cependant, lorsque le milieu aquatique reçoit des rejets d'origine animale ou anthropique, le nombre et le type de bactéries présentes sont capables de rendre l'eau impropre à l'utilisation humaine. Ces germes provoquent des maladies le plus souvent transmises par voie féco-orale et la contamination de l'homme se réalise soit par consommation d'eau de boisson, soit par consommation d'aliments contaminés par l'eau, soit encore lors d'un bain ou d'un contact avec des eaux à usage récréatif.

Les indicateurs microbiologiques sont considérés parmi les paramètres les plus importants pour les eaux à usage domestique. Ils correspondent à des germes pathogènes qui proviennent du rejet des eaux usées domestiques ou industrielles directement dans les cours d'eau et/ou des lessivages des sols. **(Hamid et al., 2007).**

La présence de bactéries multirésistantes aux antibiotiques dans l'environnement peut avoir des conséquences néfastes. En effet, il a été suggéré que les résistances dans des populations bactériennes peuvent se disperser d'un écosystème à un autre. Le sol, les eaux de surface et du sous-sol notamment reçoivent des bactéries résistantes qui viennent de l'hôpital, de la population générale, des animaux, et qui se mélangent et interagissent avec les organismes de l'environnement. La dispersion à large échelle de ces bactéries multirésistantes pourrait alors avoir lieu et causer ainsi des problèmes de traitement lors des infections humaines et animales. **(Stalder, 2012).**

La présence de microorganismes pathogènes d'origine fécale dans les eaux de surface pose d'importants problèmes sanitaires quand ces eaux sont utilisées pour la production d'eau potable, pour des activités récréatives ou pour l'irrigation. La présence de bactéries pathogènes antibiorésistantes entraîne un risque sanitaire accru si les infections qu'elles causent ne peuvent pas être traitées par des antibiotiques.

Les eaux de Oued BAGHAI jouent un rôle socio-économique important dans la wilaya de Khenchela car elles sont utilisées directement par les populations riveraines pour l'irrigation de leur culture surtout maraichères et pour l'élevage des animaux.

L'objectif de cette étude est de déterminer le niveau de contamination des eaux de cet Oued par le dénombrement des coliformes fécaux et les streptocoques fécaux. Nous testeront par la suite la résistance à divers antibiotiques des souches des coliformes et d'entérocoques intestinaux isolées. L'utilisation de ces deux groupes de bactéries comme indicateurs de contamination fécale est en effet recommandée dans diverses directives européennes de qualité des eaux.

# **Chapitre I : Antibiotiques et résistance bactérienne**

## I. Généralités sur les antibiotiques

### I.1. Définition

En 1942, Waksman a utilisé le terme d'antibiotique (du grec anti : « contre », et bios : « la vie ») pour définir toute molécule organique inhibant ou détruisant des bactéries. Pour cela, les antibiotiques agissent par interaction avec des cibles bactériennes spécifiques afin d'inhiber des voies métaboliques majeures. Les cibles les plus courantes sont impliquées dans la synthèse de la paroi bactérienne, la synthèse des protéines, ou la réplication et la synthèse d'ADN. Selon les cibles d'action ou la nature chimique des molécules, une vingtaine de classes d'antibiotiques sont distinguées, parmi lesquelles une dizaine est plus couramment employée, comme les  $\beta$ -lactamines, les aminoglycosides, les tétracyclines, les quinolones, les sulfonamides, les macrolides...

Une grande partie des antibiotiques utilisés en thérapeutique est soit directement synthétisée par des microorganismes, ou soit dérivée de molécules produites par ces microorganismes. Quelques microorganismes environnementaux comme les bactéries du genre *Streptomyces*, ou des champignons du genre *Penicillium* contribuent à la majeure partie de la production de ces antibiotiques, c'est le cas aussi de certaines bactéries génétiquement modifiées. (Stalder, 2012). Néanmoins certaines molécules, comme les sulfonamides, le triméthoprim, le chloramphénicol, la ciprofloxacine sont des antibiotiques synthétiques.

En bactériologie médicale, une définition plus large a été retenue : les antibiotiques sont des composés chimiques, élaborés par un micro-organisme ou produits par synthèse et dont l'activité spécifique se manifeste à dose faible sur les micro-organismes. (Zoumahon, 2004).

### I.2. Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques ont la capacité de tuer les bactéries ou encore d'inhiber leur croissance, on parle alors respectivement de bactéricide ou de bactériostatique. Afin qu'il soit efficace et sans danger pour le patient, un antibiotique doit posséder une cible qui soit unique au monde bactérien et absente, ou du moins inaccessible chez le patient. Cette contrainte fait qu'il n'y a que peu de stratégies disponibles pour qu'un antibiotique fonctionne efficacement. Les stratégies les plus exploitées sont les suivantes : (Baudry et Brezellec, 2006).

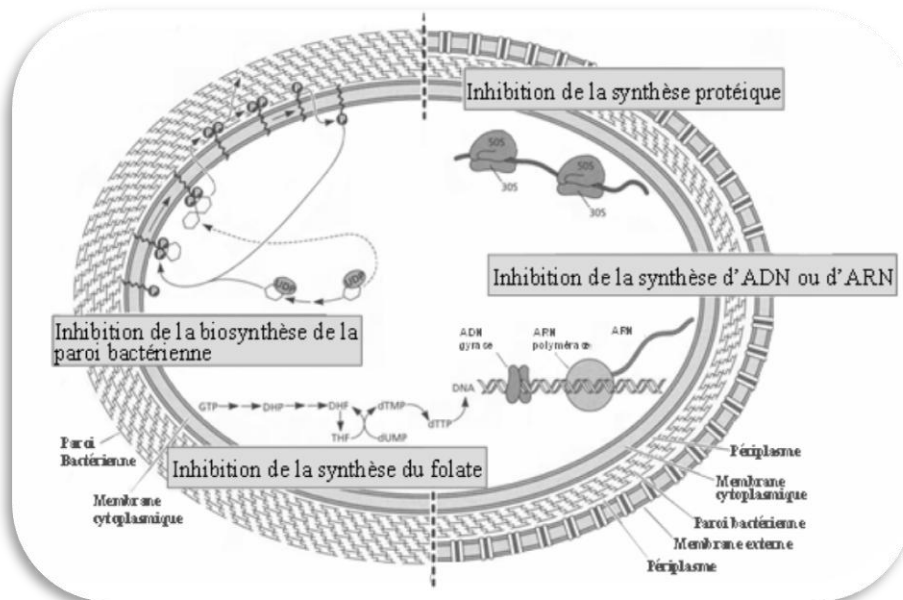
1. Attaque de la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne. Une excellente cible pour les antibiotiques, car elle est présente chez toutes les bactéries et absente chez les eucaryotes.

2. Attaque des membranes bactériennes. Une stratégie peu employée en raison de la grande similitude existant entre les membranes bactériennes et eucaryotes.

3. Perturbation de la synthèse protéique. Attaque au niveau de la traduction, en ciblant le ribosome bactérien 70S, absent chez les eucaryotes.

4. Perturbation de la synthèse des acides nucléiques (ARN et ADN) en exploitant les différences entre les ARN polymérase et les stratégies de répllication des bactéries et des eucaryotes.

5. Inhibition d'une voie métabolique essentielle chez la bactérie, mais absente chez l'hôte. Souvent en utilisant un analogue chimique compétitif pour une réaction enzymatique bactérienne (Figure : 01). (Paquet, 2006).



**Figure 01** : Résumé des principaux sites d'action des antibiotiques. (Paquet, 2006).

### I.3. Classification

Les antibiotiques sont classés en plusieurs familles et ceci selon différents critères : l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action (Verhoef *et al.*, 2004). (Tableau I)

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. (Baudry et Brezellec, 2006).

La classification des antibiotiques évolue plus ou moins rapidement en fonction de l'arrivée de nouvelles molécules et de l'intérêt suscité par leur utilisation thérapeutique. Les grandes familles d'antibiotiques sont actuellement les suivantes :

- ***β* lactamines** : Les bêta-lactamines sont ainsi appelées parce que leur molécule comporte un cycle betalactame. (Le lactame est un amide interne provenant de l'élimination d'une molécule d'eau entre un groupe -COOH et un groupe -NH<sub>2</sub> de la même molécule). Cette famille comprend : les pénames, les céphèmes, les carbapénèmes, les monobactames, ainsi que les inhibiteurs des betalactamases (clavame). C'est la famille des antibiotiques la plus utilisée, cette large utilisation

est due à leur large spectre d'action, leur faible toxicité, leur efficacité et leur faible cout pour certaines molécules. (Bibbal, 2008 ; Chenouf et Nafti, 2008).

- **Les aminosides ou aminoglycosides** : qui sont des hétérosides formés par un ou plusieurs glycosides liés à un aminocyclitol. Ce sont des bactéricides et il en existe plusieurs centaines, naturels ou semi synthétiques.

- **Les phénicolés** : de type chloramphénicol et thiamphénicol qui sont des bactériostatiques.

- **Les tétracyclines** sont des bactériostatiques naturels ou semi synthétiques.

**Tableau I** : Les critères de classification des antibiotiques. (Chenouf et Nafti, 2008).

Le critère de classification	Exemple
<b>Structure chimique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Les bêta-lactamines : présentent toutes le cycle bêta-lactamine caractérisé.</li> <li>- Les phénicolés : possèdent tous un noyau aromatique.</li> <li>- Les tétracyclines ou les cyclines : elles présentent quatre cycles accolés.</li> </ul>
<b>Spectre d'activité</b>	Liste des espèces sur lesquelles les antibiotiques sont actifs (spectre étroit ou large)
<b>Origine</b>	Sont extraits de plusieurs sources : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Bactéries: <i>Licheniformis</i> : Bacitracine ;</li> <li>- Champignons : <i>Penicillium notatum</i> : Pénicilline ;</li> <li>- Actinomycètes : <i>Inyoensis streptomycetes</i> : Sisomycine</li> </ul>
<b>Type d'action</b>	En général, les antibiotiques qui agissent sur la paroi bactérienne ou sur la membrane cytoplasmique sont bactéricides, et ceux qui agissent par inhibition de la synthèse des protéines et /ou des acides nucléiques, sont bactériostatiques.
<b>La cible (le point d'attaque)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Antibiotiques qui inhibent la synthèse des mucopeptides de la paroi bactérienne.</li> <li>- Antibiotiques qui altèrent la membrane cellulaire cytoplasmique bactérienne.</li> <li>- Antibiotiques qui inhibent les mécanismes de réplication et de transcription de L'ADN et l'ARN.</li> <li>- Antibiotiques qui agissent en tant qu'antimétabolites.</li> </ul>

- **Les polypeptides** sont des bactéricides décomposés en sept groupes (peptides linéaires, peptides cycliques, glycopeptides, glycolipeptides, lipopeptides, polypeptides thiazoliques et autres). Ces divers groupes se subdivisent en sous groupes en fonction de leur structure chimique, de l'activité antibactérienne, du mécanisme d'action et de la nature de leur cible cellulaire.

- **Les macrolides, lincosamides et synergistines** : les macrolides possèdent un noyau lactone central qui est à la base de leur classification selon le nombre d'atomes de carbone. Ce sont des molécules lipophiles. Les lincosamides et les synergistines sont associés aux macrolides car elles

ont le même mode d'action consistant en l'inhibition de la synthèse protéique au niveau de la sous unité 50s du ribosome. Ce sont des bactériostatiques.

- **Les sulfamides** qui sont constitués d'un noyau paraminobenzène sulfonamide sur lequel se greffe un radical variable qui détermine leur pharmacocinétique, leur durée d'action et/ou leur site d'action. Le plus utilisé est le sulfaméthoxazole.

- **Les quinolones ou fluoroquinolones** ont une structure générale dérivant de l'acide dihydroxy-1,4-oxo-4-quinoléine carboxylique et sont bactéricides. Elles se classent en quinolones de première et deuxième génération selon l'étendue de leur spectre antibactérien et la nature fluorée ou non de leur squelette.

D'autres classes existent mais sont quantitativement moins importantes. (Hamames, 2012).

#### I.4. Spectre d'activité des antibiotiques

Le champ d'efficacité d'une substance antibiotique ou spectre antibiotique est soit étroit (efficacité des antibiotiques sur une variété restreinte de micro-organismes) soit large (les antibiotiques attaquent de nombreux types d'agents pathogènes différents). Au laboratoire, la mesure de l'activité d'un antibiotique repose sur 2 grandeurs :

- La concentration minimale inhibitrice (CMI) qui correspond à la plus petite concentration qui inhibe la croissance de la bactérie (activité bactériostatique).
- La concentration minimale bactéricide (CMB) qui correspond à la plus petite concentration qui non seulement inhibe la croissance de la bactérie mais tue celle-ci (activité bactéricide). On distingue *spectre naturel* et *spectre clinique*.

Le *spectre naturel* d'un antibiotique comprend les espèces bactériennes dont la croissance est inhibée par des concentrations d'antibiotiques que l'on peut atteindre in vivo. Le *spectre clinique* d'un antibiotique est basé, non seulement sur des données bactériologiques (spectre naturel, fréquence des résistances acquises, répartition des CMI) mais aussi sur des données pharmacocinétiques et cliniques ce qui permet de définir une concentration critique inférieure « c » et une concentration supérieure « C » pour un antibiotique donné :

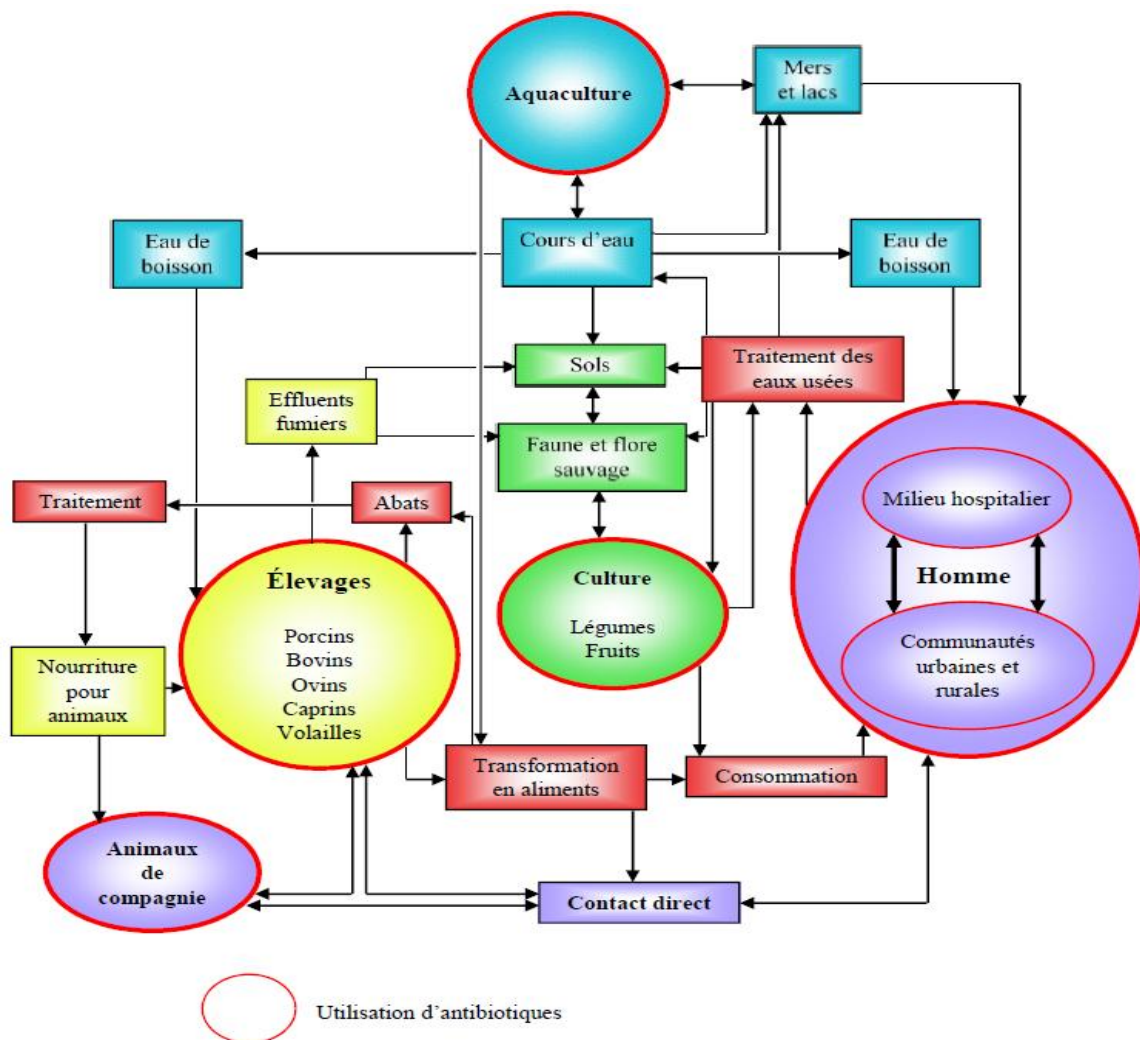
- ✦ Une bactérie dont la CMI est inférieure à « c » est dite sensible à cet antibiotique.
- ✦ Une bactérie dont la CMI est supérieure à « C » est dite résistante à cet antibiotique.
- ✦ Une bactérie dont la CMI est comprise entre « C » et « c » est dite de sensibilité intermédiaire.

Ces données sont régulièrement révisées pour tenir compte de l'évolution des résistances acquises. (Cambau, 1996).

## II. La résistance bactérienne aux antibiotiques ou antibiorésistance

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. (Chenouf et Nafti, 2008).

En effet, plus de la moitié des utilisations d'antibiotiques ne concerneraient pas la médecine humaine. (Davies et Davies, 2010). Les mêmes familles d'antibiotique, voir les mêmes molécules, sont utilisées aussi bien en élevage qu'en médecine humaine. De plus, dans certains élevages, les animaux malades ne sont pas soignés spécifiquement, les antibiotiques sont ajoutés à la nourriture ou à l'eau qui sont consommés aussi bien par les animaux malades que par les animaux sains. Cette utilisation massive d'antibiotiques en métaphylaxie associée à leur emploi comme facteurs de croissance ou en prophylaxie ont sans doute largement contribué à la sélection de bactéries résistantes qui peuvent alors se retrouver dans les produits consommés par l'homme (Figure 02) (Schwarz et al., 2001).



**Figure 02** : Dissémination plausible ou avérée des antibiotiques et de leurs résistances à travers les écosystèmes. (Davies et Davies, 2010).

Des bactéries porteuses de gènes de résistance aux tétracyclines auraient par exemple pu passer d'élevages aquatiques à des patients hospitalisés. Ces résistances pourraient être apparues à cause de l'utilisation prophylactique des tétracyclines en aquaculture. (Rhodes et al., 2000).

L'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques est la conséquence de la pression de sélection exercée sur le microbiote intestinal des hommes et des animaux sous antibiothérapie. Une fois rejetées dans les eaux, les bactéries fécales résistantes aux antibiotiques et les gènes correspondants contribueraient à enrichir le résistome (ensemble des gènes de résistance) des communautés autochtones de l'environnement, notamment en disséminant ces gènes par transfert horizontal et/ou transposition. (Wright, 2007).

### II.1. Définition de l'antibiorésistance

L'antibiorésistance se définit comme la capacité d'une souche bactérienne à survivre et se multiplier en présence d'une concentration en antibiotique significativement plus élevée que celle habituellement active sur les souches de cette espèce. (Vounba, 2012).

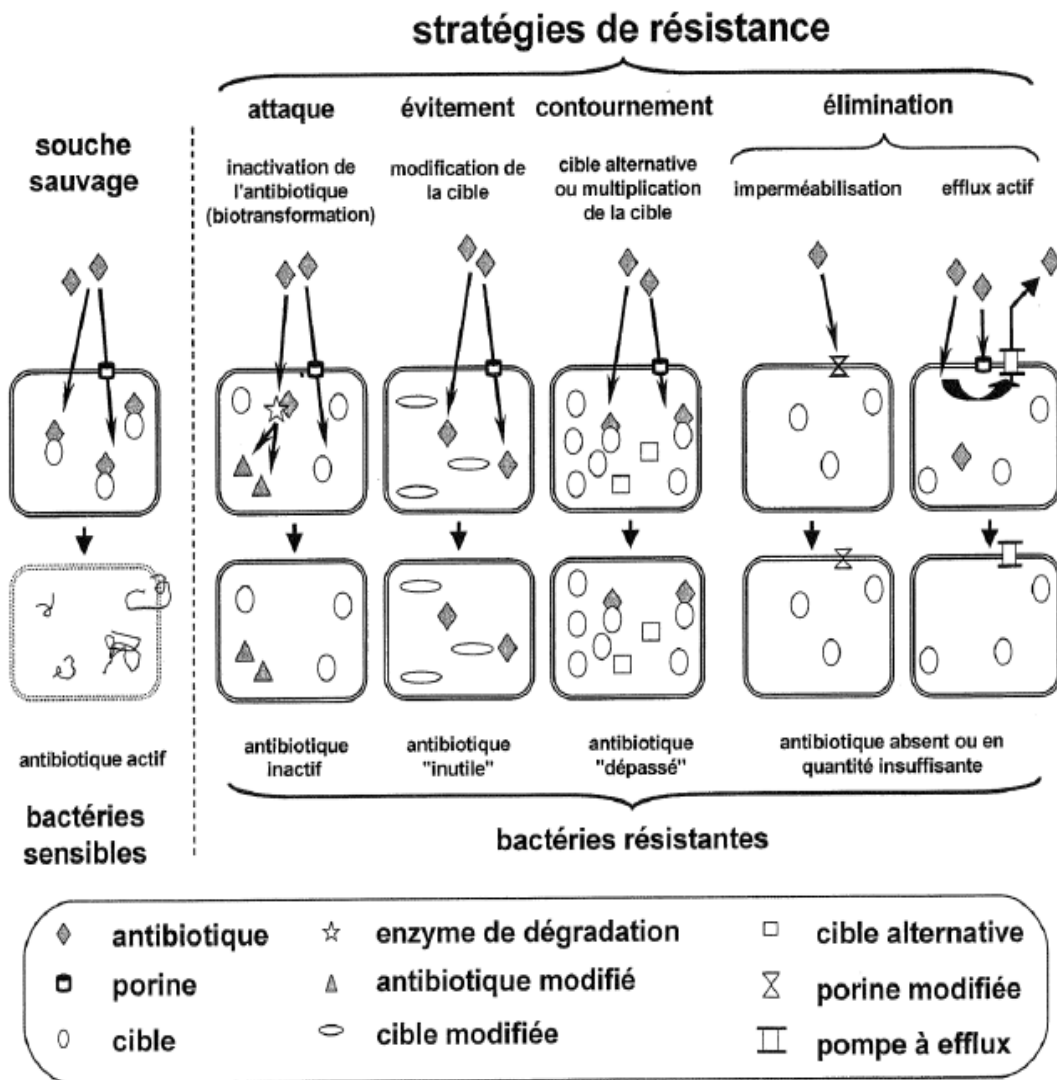
En bactériologie médicale. La définition de la résistance bactérienne à un antibiotique prend également en considération la pharmacocinétique de l'antibiotique : une souche est considérée résistante à un antibiotique quand la CMI de celui-ci est supérieure à la concentration sanguine maximale d'antibiotique obtenue lors d'un traitement. (Stéphanie, 2009).

Il existe actuellement deux hypothèses sur l'origine des mécanismes de résistance. Les micro-organismes producteurs d'antibiotiques naturels (*Streptomyces*, champignons) sont la première source de gènes de résistance pour les autres espèces. Une autre origine possible de l'évolution des gènes du métabolisme bactérien détournés de leur fonction initiale pour contrer l'action des antibiotiques. (Delery, 1999).

### II.2. Mécanismes de l'antibiorésistance

Indépendamment des supports génétiques, plusieurs mécanismes biochimiques sont impliqués dans l'expression de la résistance. Ainsi, quatre types de mécanismes biochimiques de résistance bactérienne aux antibiotiques sont décrits : (Vounba, 2012).

- La non-fixation de l'antibiotique suite à la modification de sa cible;
  - La synthèse d'enzymes bactériennes modifiant ou inactivant l'antibiotique;
  - La diminution de la perméabilité de la bactérie à l'antibiotique;
  - L'utilisation d'une nouvelle voie métabolique remplaçant la voie inhibée par l'antibiotique.
- (Figure 03).



**Figure 03 :** Principales stratégies mises en place par les bactéries pour résister à l’action des antibiotiques. (Mesaros *et al.*, 2005).

Pour chacun des mécanismes, plusieurs familles et sous-groupes de protéines peuvent être impliqués (**Tableau II**). Cette diversité mécanistique et enzymatique se traduit par une grande diversité de gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques. Par exemple pour les aminoglycosides, 4 types de mécanismes de résistance ont été décrits, parmi lesquels l’inactivation de l’antibiotique est très fréquente chez les souches résistantes. Cette inactivation peut être réalisée par 3 types d’enzymes différentes : les acétyltransférases (AAC), les nucléotidyltransférases (ANT), et les phosphotransférases (APH), pour lesquelles plusieurs sous-familles existent selon la réaction catalysée. Pour les  $\beta$ -lactamines, environ 1 253 variants de gènes ont été proposés comme conférant une résistance acquise. (Stalder, 2012).

**Tableau II** : Exemples de la diversité protéique et génétique impliquée dans la résistance acquise à certaines familles d'antibiotiques. (Stalder, 2012).

Famille d'antibiotique	Mécanisme	Protéines	nombre de variants de gène	exemple de famille de gène
Aminoglycosides	Inactivation de l'antibiotique	Acétyltransférases	80	<i>aacA, sat</i>
		nucléotidyltransférases	37	<i>aadA, aadB</i>
		Phosphotransférases	32	<i>aphA</i>
		Méthyltransférase	9	<i>rmt</i>
$\beta$ -lactamines	Inactivation de l'antibiotique	$\beta$ -lactamase, "Amber classA"	594	<i>bla<sub>BEL</sub>, bla<sub>TEM</sub>, bla<sub>CTX-M</sub>, bla<sub>SHV</sub>, bla<sub>GES</sub></i>
		$\beta$ -lactamase, "Amber classB"	219	<i>bla<sub>IMP</sub>, bla<sub>VIM</sub></i>
		$\beta$ -lactamase, "Amber classC"	216	<i>bla<sub>CMT</sub></i>
		$\beta$ -lactamase, "Amber classD"	224	<i>bla<sub>OX4</sub></i>
Chloramphénicol	Inactivation de l'antibiotique	acétyltransférases type A	16	<i>catA</i>
		acétyltransférases type B	6	<i>catB</i>
	Efflux	-	8	<i>cmlA, floR, fexA, cmrA</i>
Quinolones	Protection de la cible	protéines de la famille des "pentapeptide repeat protein"	8	<i>qnrA</i>
			32	<i>qnrB</i>
			1	<i>qnrC</i>
			1	<i>qnrD</i>
			4	<i>qnrS</i>
Tetracyclines	Efflux	-	26	<i>tet</i>
	Protection de la cible	-	11	<i>tet</i>
Thriméthoprimes		dihydrofolate réductase	41	<i>dfrA, dfrB</i>

### II.3. Plasticité des Génomes bactériens et dissémination de résistance

On distingue deux types de résistances : **les résistances innées ou naturelles** et **les résistances acquises**. Une grande partie des antibiotiques étant produite par les bactéries, ces dernières possèdent des systèmes de résistance naturels leur conférant une immunité contre les antibiotiques qu'elles produisent. Certaines bactéries, bien que ne possédant pas de systèmes d'immunité peuvent, de part leur morphologie, résister naturellement à certains antibiotiques. C'est le cas par exemple des bactéries à Gram négatif qui sont résistantes à plusieurs antibiotiques grâce à l'imperméabilité importante que leur confère la présence de deux membranes.

Les résistances acquises qui correspondent à l'acquisition d'une résistance par une souche normalement sensible à l'antibiotique concerné, relèvent, quant à elles, de la grande plasticité des génomes bactériens et de l'adaptation rapide des bactéries à de nouvelles conditions stringentes (dues à la présence d'un antibiotique par exemple). La notion de résistance acquise est à la base de la compréhension de la dissémination des résistances dans plusieurs espèces

bactériennes différentes. Quelques études mettent clairement en évidence ces disséminations de résistances à travers plusieurs espèces et écosystèmes différents. (Stalder, 2012).

La résistance naturelle correspond à la résistance de toutes les souches d'une même espèce ou d'un même genre bactérien. Cette résistance est chromosomique et ne peut se transférer qu'à la descendance, d'une cellule mère vers ses cellules filles ; c'est le transfert vertical. Dans la problématique de la résistance aux antibiotiques, c'est l'acquisition de nouvelles résistances par des bactéries pathogènes qui en est la principale cause.

L'apparition de résistance acquise chez une bactérie est associée à deux phénomènes : les mutations ou le transfert horizontal de gènes.

La dissémination des gènes de résistance nécessite leur présence sur des supports génétiques pouvant être transmis à la descendance (transfert vertical), et capables de diffuser d'une bactérie à une autre non reliées phylogénétiquement (transfert horizontal). Seul le chromosome et les plasmides sont capables de se répliquer et d'être transmis aux cellules filles. Ils sont porteurs des diverses structures génétiques mobiles qui véhiculent les gènes de résistance soit au niveau intra-cellulaire (transposons, cassettes des intégrons) soit au inter-cellulaire (plasmides, transposons, séquences d'insertion). (Douard, 2011).

### II.3.1. Les mutations

Les mutations se produisent de manière aléatoire au cours de la réplication du génome bactérien. Ces mutations sont le plus souvent silencieuses, n'engendrant pas de modification au niveau de la séquence primaire de la protéine codée. Il arrive cependant qu'elles conduisent à des modifications des propriétés physicochimiques de la protéine, comme l'affinité pour un type de substrat donné ou des différences de conformation.

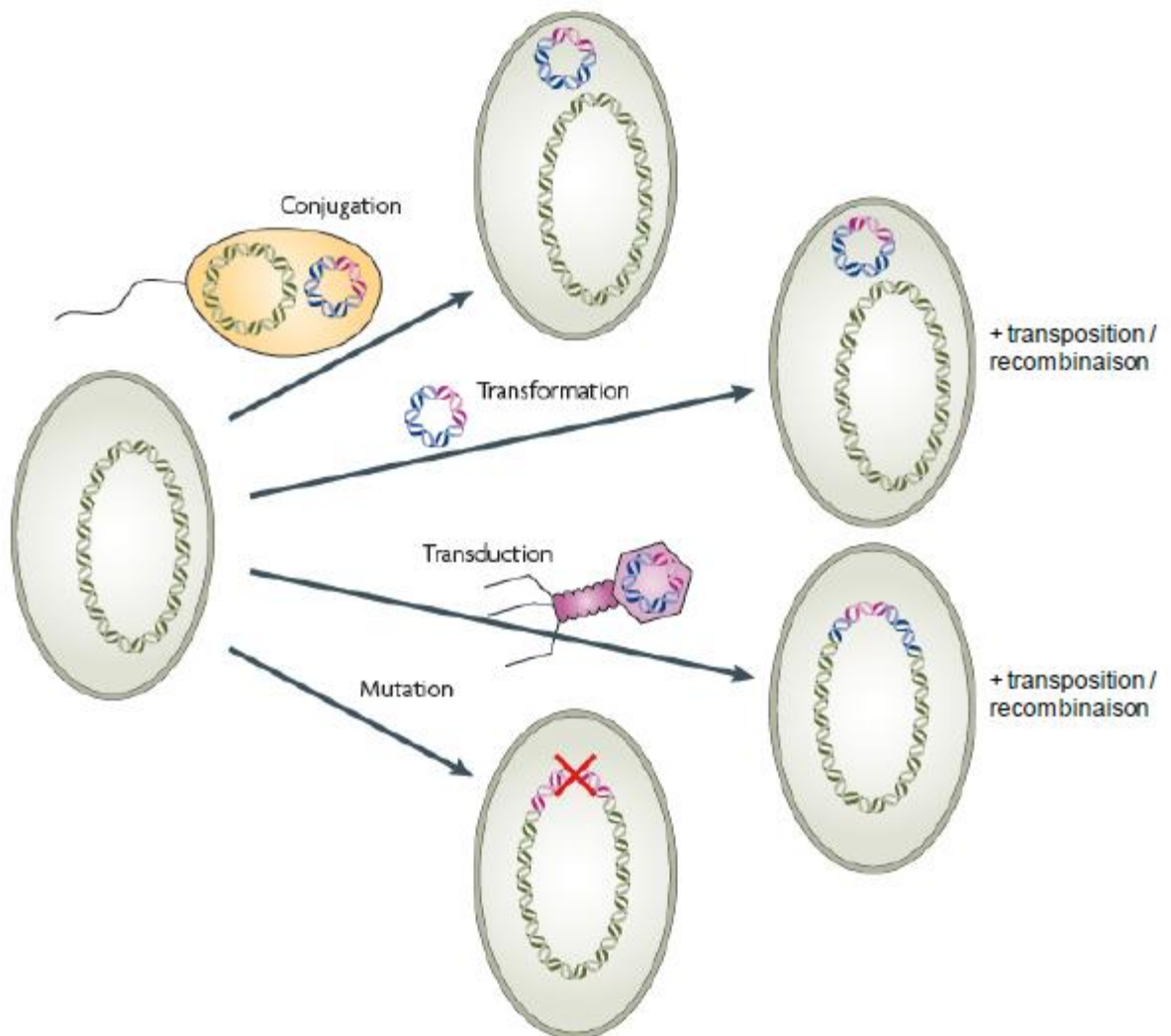
Dans ce cas, lorsque les mutations touchent des gènes dont les produits sont cibles d'antibiotiques, elles peuvent être responsables de l'apparition de nouveaux phénotypes de résistance chez la bactérie. La pression de sélection exercée par ces antibiotiques permet alors de favoriser les clones mutants résistants, et donc de sélectionner et d'enrichir dans une population des mutations au départ à caractère aléatoire. Celles-ci, conférant un bénéfice dans un environnement à forte pression de sélection, sont transmises à la descendance. A des concentrations inhibitrices, le stress causé par les antibiotiques sur les populations bactériennes a été montré comme augmentant les taux de mutation chez certaines espèces et statistiquement l'apparition de souches résistantes. (Stalder, 2012).

### II.3.2. Le transfert horizontal de gènes.

La résistance aux antibiotiques acquise par les bactéries est principalement due à la présence de trois types d'éléments extra-chromosomiques portant des gènes de résistance : les plasmides, les transposons et des cassettes de résistances insérées sur un intégron.

Les résistances chromosomiques ne concernent en général qu'un antibiotique ou une famille d'antibiotiques. Les résistances plasmidiques peuvent quant à elles concerner plusieurs antibiotiques, voire plusieurs familles d'antibiotiques. Elles représentent le mécanisme de résistance le plus répandu, soit 80 % des résistances acquises. (Stéphanie, 2009).

Ce type de résistance est transmissible d'une souche ou d'une espèce à une autre selon trois modes de transmission, à savoir la conjugaison (transfert direct entre deux bactéries ayant établi temporairement un contact physique), la transformation (transfert d'ADN nu) et la transduction (transport d'ADN bactérien par des bactériophages). (Figure : 04) (Delery, 1999).



**Figure 04** : Les trois modes de transmission du matériel génétique : la conjugaison, la transformation et la transduction chez les bactéries. (Davies et Davies, 2010).

- **La transformation** : premier mécanisme de transfert horizontal décrit chez les procaryotes, ce processus implique l'intégration par des bactéries d'ADN linéaire ou circulaire extracellulaire par un mécanisme de translocation effectué par des protéines exprimées chez certaines bactéries naturellement compétentes pour ce type de transfert.

- **La transduction** : c'est une forme de transfert d'ADN qui s'effectue de manière indépendante par l'intermédiaire de virus bactériens appelés bactériophages (ou phage).

A faible fréquence, les bactériophages peuvent accidentellement capturer un segment de l'ADN génomique bactérien hôte dans leur capsid et l'intégrer dans une nouvelle bactérie lors de l'infection et dans laquelle ce fragment pourra se recombinaison dans le génome de la bactérie hôte.

- **La conjugaison** : La conjugaison est probablement le mécanisme le plus important dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques. Il implique le contact entre deux bactéries *via* la formation d'un pont protéique. (Meyer *et al.*, 2004).

### III. Relation entre résistance aux antibiotiques et virulence

La possibilité d'une relation entre la résistance aux antibiotiques et la virulence est une question ancienne et récurrente pour laquelle il n'y a pas de réponse unique et simple. La question posée peut être envisagée à différents niveaux : est-ce que certains mécanismes peuvent être communs à la résistance aux antibiotiques et à la virulence des souches, et est-ce que des gènes de résistance aux antibiotiques et des gènes impliqués dans la virulence peuvent être simultanément présents sur des structures génétiques stables et éventuellement transmissibles. A ces deux niveaux, la pression de sélection par les antibiotiques pourrait favoriser la sélection de souches virulentes.

Sur le premier point, on peut prendre l'exemple de bactéries résistantes aux quinolones. Il a été démontré chez *Escherichia coli*, et *Salmonella* qu'un des mécanismes impliqués est l'efflux actif d'antibiotiques. Les pompes d'efflux impliquées, ont une faible spécificité et sont capables d'exporter différentes molécules autres que des antibiotiques tels que les sels biliaires. La surexpression de telles pompes chez les bactéries résistantes à ces antibiotiques exportés confère également la résistance aux sels biliaires. Cette propriété favorise la colonisation du tube digestif par les bactéries résistantes.

Sur le second point, on peut s'interroger sur la présence de gènes de résistance aux antibiotiques dans les îlots de pathogénicité décrits chez différentes espèces bactériennes. Le seul exemple confirmé est celui de *Shigella flexneri* qui comporte un locus de multirésistance à l'ampicilline, streptomycine, chloramphénicol et tétracyclines, mais également un système de transport de fer impliqué dans la virulence.

Les plasmides qui sont les principaux vecteurs de dissémination de gènes de résistance peuvent également véhiculer des gènes impliqués dans la virulence. On peut ainsi citer la présence sur des plasmides de résistance de gènes codant la synthèse de bactériocines chez *Citrobacter*, de sidérophores chez *Escherichia coli*, de cytotoxines chez *Vibrio cholerae* et *Escherichia coli*, ou de facteurs d'adhésion chez *Escherichia coli*. » (AFSSA, 2006).

#### IV. Impacts de la résistance antimicrobienne

La résistance antimicrobienne est un phénomène dont la société d'aujourd'hui s'inquiète de plus en plus. Les autorités publiques ont pris conscience de ces problèmes de résistances aux antibiotiques, qui peuvent avoir des conséquences aussi bien en termes de santé publique qu'en matière d'économie. (OMS, 2000).

##### IV.1. Impacts économiques

Tout d'abord, il y a les impacts économiques. À ce jour, il existe plus de 15 classes d'antimicrobiens (OMS, 2002). Plus de 150 antibiotiques sont disponibles sur le marché. Cependant, les découvertes et entrées sur le marché de nouvelles molécules efficaces se font moins nombreuses qu'autrefois (Khachatourians, 1998). Ainsi, les infections résistantes aux antibiotiques sont malheureusement de plus en plus fréquentes. Ce type d'infection demande souvent un traitement de longue durée. Un traitement antibiotique de longue durée, plus difficile, nécessitant parfois un changement de molécules ou des combinaisons, occasionne une augmentation des coûts monétaires pour la société. Ceci est surtout le cas des infections à résistance multiple. Une autre conséquence souvent négligée est la perturbation des services de santé due à ces résistances : l'isolement du patient, le contrôle des infections croisées, l'annulation de procédures ou de programmes entraînent une diminution de l'efficacité des services de santé. (Hawkey, 2008).

Ces problèmes de résistance engendrent également des pertes économiques dues à la diminution de production de richesse causée par une personne malade.

##### IV.2. Impacts sur la santé publique

Ces problèmes de résistance ont en premier lieu un coût humain, ils peuvent engendrer des échecs thérapeutiques et donc conduire à une augmentation des taux de mortalité et de morbidité d'une maladie. De plus, les résistances les plus courantes sont celles qui touchent les molécules les plus anciennes, or ce sont ces molécules qui sont les plus abordables d'un point de vue financier. Les résistances aux antibiotiques obligent donc à utiliser des molécules plus récentes, et donc plus coûteuses, mais qui ne sont pas toujours accessibles en quantité suffisante dans les pays en voie de développement.

#### V. Perspectives de lutte

L'OMS, dans son rapport de 2000 sur la résistance aux antimicrobiens, a établi un plan d'action pour lutter contre cette expansion des résistances aux antibiotiques (OMS, 2000). Parmi ces mesures, elle recommande tout d'abord de favoriser la vaccination, empêchant ainsi toutes infections par des bactéries, qu'elles soient résistantes ou sensibles. Outre l'éducation et la responsabilisation des patients et des professionnels de santé, elle préconise de réduire

l'utilisation des antibiotiques en agriculture et dans les élevages, notamment pour les molécules utilisées en médecine humaine.

Il existe également d'autres pistes à explorer qui pourraient conduire à une diminution de la résistance aux antibiotiques. Des médicaments « anti-résistances » qui agiraient sur les principaux mécanismes de résistances développés par les bactéries pourraient être développés. D'autres cibles pourraient être également définies : l'inactivation de gènes dont le rôle dans la résistance était inconnu a permis de réduire le niveau de résistance contre plusieurs molécules chez *Pseudomonas aeruginosa*, l'identification de tels gènes pourrait permettre de trouver des cibles pour des médicaments anti-résistances (Fajardo *et al.*, 2008). Enfin, beaucoup de résistances aux antibiotiques sont dues à des inactivations enzymatiques dont les gènes responsables sont portés par des plasmides, de nouvelles molécules pourraient donc être développées pour empêcher l'action de ces enzymes, à la manière des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases. De la même manière, il pourrait également être intéressant de développer des molécules « anti-plasmides » qui agiraient sur la réplication des plasmides et induiraient leur élimination comme cela a déjà été étudié (DeNap et Hergenrother, 2005).

D'autres équipes tentent de développer des **thérapies « antivirulence »**. L'objectif n'est plus de tuer la bactérie responsable de l'infection, mais de bloquer les systèmes qui la rendent pathogène pour l'Homme. Des antitoxines dirigées contre certaines toxines bactériennes sont à l'étude, ainsi qu'une molécule permettant de bloquer la cible du mécanisme de virulence du méningocoque. Toutefois, l'utilisation de ces produits est encore en phase expérimentale.

La **phagothérapie** est une autre voie intéressante, mais dans laquelle tout reste à faire. Elle consiste à éliminer les bactéries grâce à des phages. Ces derniers sont des virus qui infectent spécifiquement certaines bactéries, s'y reproduisent puis les détruisent en libérant les nouveaux phages produits. Cette spécificité permet d'éliminer les bactéries pathogènes sans affecter les autres, contrairement aux antibiotiques à spectre large qui sont couramment utilisés. Le développement industriel de cocktails de phages, préparés à l'avance ou « sur-mesure » pour lutter contre une bactérie spécifique, paraît complexe. Néanmoins, un essai visant à évaluer cette stratégie dans le traitement des infections cutanées provoquées par les bactéries *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients brûlés a été lancé en juin 2013. (Laurent, 2013).

Une équipe de recherche marseillaise du CNRS a découvert une approche très prometteuse, à partir de l'étude d'un ver plat immortel (**Figure 05**), pour lutter contre les maladies dues à des bactéries résistantes aux antibiotiques telle que la tuberculose.



**Figure 05 :** La planaire *Dugesia japonica*

La planaire n'est utilisée habituellement que dans les études sur la reconstitution des tissus car cet organisme est immortel. Si vous le coupez en 10 fragments cela vous donne 10 nouveaux vers

L'idée originale de l'équipe d'Eric Ghigo a été de tester 17 bactéries sur la planaire, notamment celles responsables de la légionellose, la salmonellose, la tuberculose ou la listériose. Une idée payante puisque le ver immortel s'est montré résistant à ces 17 bactéries "pathogènes voire mortelles pour l'homme". Grâce au séquençage de l'ADN, les chercheurs ont découvert que l'incroyable résistance de la planaire à ces agents pathogènes est due à un gène - MORN2 - également présent dans le génome humain mais non actif. (Abnave *et al.*, 2014).

Toutefois, tous ces moyens qui existent ne pourront être efficaces que s'ils sont appliqués à l'échelle mondiale puisque les bactéries porteuses de résistances aux antibiotiques sont capables d'être véhiculées sur de grandes distances par l'homme ou par la nature.

# **Chapitre II :**

## **Les eaux de**

### **surface**

## **I. Liens entre émergence de la résistance bactérienne et environnement.**

La découverte dans l'environnement d'un vaste pool de déterminants génétiques impliqués dans de multiples résistances a suscité de nombreuses questions sur l'impact clinique de ce résistome. De plus, en parallèle de l'émergence clinique de souches antibiorésistantes, une augmentation globale de l'antibiorésistance dans l'environnement est observée. (Stalder, 2012).

Plusieurs revues bibliographiques soulignent alors les liens plus ou moins évidents entre ce résistome environnemental et les gènes de résistance retrouvés chez des bactéries pathogènes. Par exemple, un gène de résistance aux  $\beta$ -lactamines a été mis en évidence dans le chromosome d'une bactérie environnementale, *Kluyvera georgiana*. (Poirel et al., 2002). Plus récemment, une étude a confirmé l'évidence d'échanges récents de gènes de résistance entre des bactéries environnementales et des pathogènes cliniques, montrant que le résistome environnemental et les résistances chez les pathogènes ne sont pas indépendants. (Forsberg et al., 2012). Ces échanges ont alors eu lieu soit de bactéries environnementales vers des bactéries pathogènes, ou vice versa. Dans le premier cas, le résistome de l'environnement serait à l'origine des multirésistances retrouvées chez les bactéries pathogènes. Dans le second cas, il pourrait y avoir introduction de nouveaux mécanismes de résistances chez certains pathogènes opportunistes saprophytes et impliqués dans de nombreuses infections nosocomiales, tels les *Acinetobacter spp.* ou *Pseudomonas spp.* (Stalder, 2012).

## **II. Dissémination de la résistance aux antibiotiques au sein des écosystèmes**

L'existence de liens entre les différents compartiments écologiques conduit à s'intéresser aux voies d'émissions des bactéries résistantes et des gènes de résistance dans l'environnement.

De nombreuses raisons renforcées par diverses études sur le sujet portent à croire qu'il existe un flux continu de bactéries résistantes et de gènes de résistance entre les bactéries pathogènes et commensales et entre les différents compartiments. Par conséquent, on peut s'attendre à ce que l'apparition de résistance dans un compartiment influence l'apparition de résistance dans les autres.

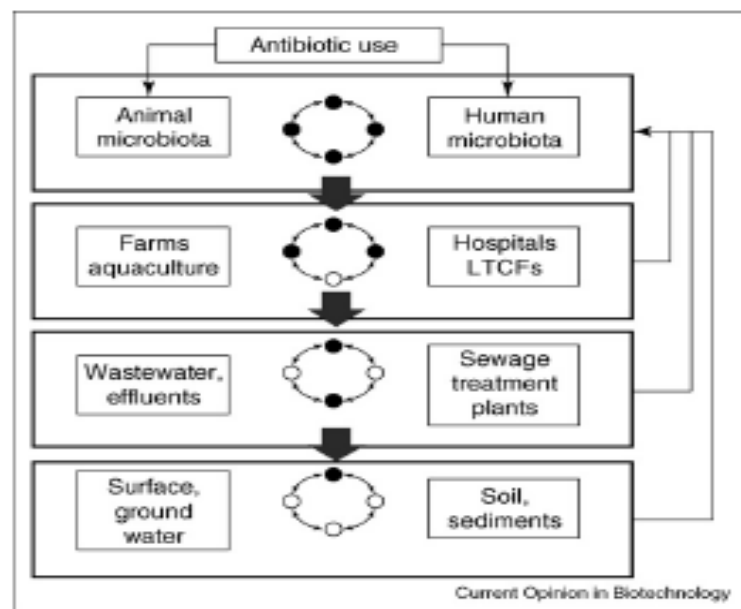
Aujourd'hui, on considère que le transfert des gènes de résistance entre bactéries se produit dans toute la biosphère et plus spécialement dans les sites riches en nutriments comme les systèmes aqueux, le sol, les sédiments. (Delery, 1999).

Le transfert horizontal de gènes a probablement lieu dans tous les écosystèmes terrestres colonisés par les bactéries. Ainsi ces transferts ont été mis en évidence dans de nombreux écosystèmes, tels les sols, les rivières, les environnements marins, mais aussi les tubes digestifs d'insectes ou de mammifères. (Aminov, 2011).

La dissémination de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement peut être schématisée selon le modèle proposé par **Baquero et al., (2008)**, où chaque écosystème représente un réacteur biologique dans lequel les échanges génétiques et les événements de recombinaison, influencés par les conditions biotiques et abiotiques, profilent l'évolution de l'antibiorésistance. (**Baquero et al., 2008**). Dans ce schéma, chaque réacteur est alors connecté au précédent par les déchets produits par ce dernier (**Figure 06**).

Le **premier réacteur** est constitué par les microflores humaines et animales, composées d'environ 500 espèces bactériennes qui par exemple, soumises à la pression exercée lors de traitements antibiotiques, augmentent l'émergence et la proportion de souches bactériennes résistantes et multirésistantes. Cette émergence est d'autant plus rapide qu'elle est facilitée par le réservoir de gènes de résistance initialement présents dans l'appareil digestif humain (non soumis aux antibiotiques), et estimé à plusieurs centaines de gènes. Elle est aussi liée aux échanges d'ADN, favorisés par de nombreux facteurs tels que les fortes densités bactériennes (estimées à  $10^{11}$  à  $10^{12}$  bactéries par gramme de contenu du colon).

Le **second réacteur** comprend tous les lieux où des facteurs, tels que les antibiotiques, augmentent la proportion de bactéries résistantes aux antibiotiques. Ceci en fait des lieux d'émergence, d'échange et de dissémination des gènes de résistance dans les populations. (**Stalder, 2012**).



**Figure 06 :** Représentation des quatre principaux réacteurs impliqués dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement.

Dans chaque réacteur, la mixité entre les bactéries commensales de l'homme et/ou de l'animal (point noir) avec le vaste microbiote de l'environnement (point blanc) combiné avec les transferts horizontaux (flèches), modèlent l'évolution de la résistance aux antibiotiques. A chaque étape, les contacts humains et animaux *via* différentes voies réintroduisent des bactéries. (**Baquero et al., 2008**).

Le **troisième réacteur** correspond aux eaux usées et résidus biologiques provenant des réacteurs précédents, tels que les stations d'épuration, les lagunes, les lisiers, les fumiers, où le mélange entre bactéries commensales et environnementales d'une part, et bactéries résistantes et sensibles d'autre part augmentent la probabilité des échanges entre bactéries, et par conséquent la dissémination de l'antibiorésistance.

Le **dernier réacteur** est constitué de tous les environnements naturels récepteurs des résidus du réacteur précédent. Ces environnements, constitués des milieux aquatiques et terrestres, sont composés pour les sols d'environ 400 à 10 000 espèces bactériennes, pour une densité de  $10^7$  à  $10^8$  bactéries par gramme selon certaines estimations. Comme dans le réacteur précédent, sous les contraintes biotiques et/ou abiotiques, ont lieu des échanges entre bactéries des réacteurs précédents et bactéries indigènes. Ces environnements jouent alors un rôle de récepteur, pouvant faire perdurer des mécanismes de résistance provenant des réacteurs précédents.

Enfin, les produits issus de tout ce parcours peuvent être réintroduits via la chaîne alimentaire ou par contact physique dans le premier réacteur constitué par l'homme et l'animal, et ainsi parcourir de nouveau le circuit. A long terme cette boucle aboutit inexorablement à l'augmentation globale de l'antibiorésistance.

L'eau est un des principaux vecteurs physiques qui lie chacun de ces réacteurs, jouant un rôle crucial dans la dissémination de l'antibiorésistance. Pour éviter la coexistence de souches résistantes, de gènes de résistance, de structures génétiques impliquées dans l'acquisition et la dissémination de gènes, avec des pathogènes, il apparaît donc primordial de mieux comprendre et contrôler ces flux. (Stalder, 2012).

### **III. Les eaux superficielles**

Sur les 13 600 millions de  $\text{km}^3$  d'eau qui couvrent notre planète, seulement 0,014 % est de l'eau douce utilisable par l'homme sous forme d'eaux de surface. Si cette quantité est suffisante pour répondre aux futurs besoins de l'humanité, l'altération de la qualité de l'eau rend la part compatible avec les utilisations humaines de plus en plus petites. En effet, la qualité de l'eau est altérée par une surcharge en matières organiques, par des substances toxiques provenant des activités agricoles et par des effluents industriels, hospitaliers et domestiques rejetés dans le milieu récepteur sans traitement. (Hamid *et al.*, 2007).

L'eau peut être naturellement potable ou débarrassée de microorganismes pathogènes inactivés ou tués par des traitements physiques ou chimiques. La présence dans l'eau de consommation humaine de bactéries, antibiorésistantes ou non, susceptibles d'induire un risque sanitaire peut résulter d'une contamination accidentelle en cours de distribution, d'une croissance

de bactéries autochtones au milieu aquatique ou de la survie de bactéries allochtones à cet environnement ayant franchi la barrière de traitement. (AFSSA, 2006).

La contamination des eaux de surface par des agents pathogènes est un problème de pollution qui remonte très loin dans le temps. Au cours de l’XIX<sup>ème</sup> siècle, les maladies d’origine hydrique ont été responsables de vastes épidémies de dysenterie, fièvre typhoïde, choléra, entre autres.

La pollution de l’eau due à des micro-organismes d’origine fécale est apparue très tôt dès que l’eau a été utilisée comme vecteur de l’élimination des déchets. Cependant, lorsque le milieu aquatique reçoit des rejets d’origine animale ou anthropique, le nombre et le type de bactéries présentes sont capables de rendre l’eau impropre à l’utilisation humaine. Ces maladies sont le plus souvent transmises par voie féco-orale et la contamination de l’homme se réalise soit par consommation d’eau de boisson, soit par consommation d’aliments contaminés par l’eau, soit encore lors d’un bain ou d’un contact avec des eaux à usage récréatif. (Hamid *et al.*, 2007).

### **III.1. Définition**

L'eau de surface est une eau, telle que le ruissellement, qui reste à la surface du sol et qui peut être stockée en étangs ou autres ouvrages de retenue. Elles jouent le plus grand rôle de formation de l'hydrosphère sur terre. Elle résume la collecte de l'eau souterraine ou d'eau atmosphérique. C'est donc une eau qui s'accumule sur le sol ou dans un cours d'eau, le lit d'une rivière, un lac, une zone humide, une mer ou un océan. (Dictionnaire).

Cette eau de surface est naturellement alimentée par les précipitations et naturellement perdues par l'évaporation et l'infiltration souterraine dans le sol. Bien qu'il existe d'autres sources d'eaux souterraines, tels que l'eau fossile et l'eau magmatique, les précipitations sont le principal apporteur d'eaux de surface. (Glossaire DCE).

### **III.2. L’origine des eaux de surface**

Les eaux de surface proviennent surtout des pluies, et sont constituées d’un mélange d’eau de ruissellement et d’eau souterraines. Elles comprennent les eaux des grands cours d’eau, des étangs et des lacs, ainsi que des petits ruisseaux des hauts pays alimentés par des sources et qui recueillent les eaux de ruissellement des bassins versants. La proportion d’eau de ruissellement dépend de nombreux facteurs, dont les plus importants sont la durée et l’intensité des pluies, le climat et la végétation, les conditions géologiques, géographiques et topographiques de la région considérée.

Les eaux de surface véhiculent un grand nombre de bactéries, une grande partie de ces bactéries sont naturellement présentes dans les milieux aquatiques ou elles se multiplient, ces bactéries sont appelées autochtones et jouent un rôle considérable dans les cycles

biogéochimiques de divers éléments constitutifs de la matière vivante comme le carbone, l'oxygène et l'azote. A l'opposé, certaines bactéries dites allochtones, sont apportées dans les milieux aquatiques alors que ceux-ci ne constituent pas leur environnement habituel comme les bactéries d'origine fécale et les bactéries telluriques. Les bactéries allochtones auront un temps de survie variable selon l'espèce et les conditions du milieu. (Pierre, 1999).

### **III.3. Les indicateurs de contamination fécale**

L'eau, essentielle à la survie de tous les êtres vivants, véhicule nombre de microorganismes, bactéries, virus qui y vivent et s'y développent, ainsi qu'un grand nombre de parasites dont les hôtes ont besoin de l'eau pour vivre ou se reproduire. Ces organismes peuvent engendrer des maladies parfois graves lorsqu'ils pénètrent dans le corps humain.

Dans la pratique, il est techniquement et financièrement impossible de contrôler tous les microorganismes pathogènes susceptibles d'engendrer des infections d'origine hydrique. Devant cette impossibilité et compte tenu de leur origine fécale prédominante, on fait appel à des indicateurs de contamination fécale pour révéler la présence possible de germes pathogènes et évaluer la contamination microbiologique des eaux. (Chorfi, 2012).

Ces indicateurs sont des germes témoins ou germes test. Leur présence indique la probabilité, mais non la certitude, d'une contamination de pathogènes d'origine fécale. En revanche, leur absence ne signifie pas l'absence de risque sanitaire, parmi les germes décrits dans les fèces humaines et animales, quatre groupes bactériens ont été rapidement sélectionnés comme indicateurs de contamination fécale en raison de leur omniprésence dans la microflore intestinale et de leur facilité de dénombrement :

- Les coliformes totaux
- Les coliformes thermorésistants (*Escherichia coli*);
- Les Entérocoques fécaux;
- *Clostridium perfringens* (remplacé par la suite par les spores d'anaérobies sulfite-réducteurs).

Leur dénombrement, effectué selon des méthodes normalisées simples et sensibles, se substitue à la recherche des micro-organismes pathogènes, souvent fastidieuse. Les connaissances acquises récemment dans le domaine de l'écologie des coliformes et des entérocoques conduisent cependant à interpréter avec prudence les résultats d'analyses. (Bornert, 1998).

#### **III.3.1. Coliforme totaux**

Constituent un groupe de bactéries d'origine fécale et environnementale. Elles se présentent naturellement dans le sol, la végétation et dans le tube digestif des humains et des animaux. Ce sont des bactéries servant d'indicateurs de pollution ou de contamination

microbiologique. La définition de ce groupe de germes selon les normes ISO (International Organization for Standardization) comprend des bactéries Gram négatives, non sporulées, oxydase négatif, anaérobies ou aérobies facultatives, capables de se développer en présence de sels biliaires ou d'autres agents de surface ayant les mêmes propriétés, capables de fermenter le lactose avec production de gaz et d'acide en 48 heures à une température de  $35 - 37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Leur présence dans l'eau indique une dégradation de la qualité bactérienne de l'eau. Les coliformes totaux sont facilement éliminés par la désinfection. (MDDEFP, 2013 ; Hamsatou, 2005).

### **III.3.2. Coliformes thermorésistants (*Escherichia coli*)**

Sont des bactéries faisant partie du groupe des coliformes. C'est aussi la seule espèce qui soit strictement d'origine fécale. Elles sont considérées comme le meilleur indicateur de contamination fécale.

Leur présence indique une contamination récente par les matières fécales et la possibilité de microorganismes pathogènes tels que bactéries, virus et protozoaires. (MDDEFP, 2013 ; Hamsatou, 2005).

### **III.3.3. Les entérocoques fécaux**

Ce terme désigne les entérocoques généralement présents dans les fèces de l'homme et des animaux. Tous possèdent l'antigène du groupe D de Lancefield. Du point de vue taxonomique, ils appartiennent aux genres *Enterococcus* et *Streptococcus*. La classification générale des streptocoques fécaux a été modifiée dans les années 80 par la création d'un nouveau genre, *Enterococcus*. Dans ce contexte, plusieurs espèces appartenant antérieurement au genre *Streptococcus* ont été transférées vers le genre *Enterococcus*. *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* sont les deux espèces le plus souvent identifiées chez l'humain. Elles sont présentes dans les intestins d'environ 75 % des humains à des concentrations variant de  $10^5$  à  $10^8$  bactéries/g. Sont des bactéries ayant comme habitat naturel le tube digestif de l'homme et des animaux. (Chorfi, 2012).

La plupart de ces espèces peuvent généralement être considérées en pratique comme des indicateurs spécifiques d'une pollution fécale humaine. Ils sont également utilisés en raison de leur meilleure résistance dans le milieu. Ce sont des bactéries à gram positif qui se présentent sous forme de coques en courtes chaînes. Ils ont la capacité de croître à une température entre 10 et  $45^{\circ}\text{C}$ , à un pH alcalin de 9,6, dans une solution contenant 6,5 % de Na Cl.

La culture est généralement favorisée par une incubation dans une atmosphère enrichie en dioxyde de carbone, ces caractéristiques sont utilisées pour leur identification. (Chorfi, 2012).

### III.3.4. Clostridies sulfito-réductrices

Les germes anaérobies sulfitoréducteurs (généralement les *Clostridium*s) sont des hôtes normaux de l'intestin ; mais ils peuvent aussi se rencontrer dans le sol et dans les matières organiques en voie de putréfaction. Leur résistance est beaucoup plus importante que celles des autres germes indicateurs car ils sont sporulés. Ils sont parfois seuls survivants d'une contamination fécale ancienne. Il est difficile lorsqu'ils sont seuls présents de conclure à une contamination fécale ; lorsqu'ils sont présents aux cotés d'*Escherichia coli* ou des coliformes et Entérocoques fécaux, ils confirment l'origine fécale d'une contamination.

Les germes anaérobies sulfitoréducteurs sont des bacilles Gram positif souvent de grande taille, isolés ou en chainettes. Ces bactéries sont généralement mobiles, elles sont capables de sporuler. Elles sont catalase négatif et anaérobies strictes. Cependant quelques espèces sont aérotolérantes. (Lebres, 2008).

### IV. La transmission de l'antibiorésistance dans les eaux superficielles

Il existe une contamination par des bactéries d'origine fécale antibio-résistantes dans les environnements aquatiques, ainsi, les systèmes hydriques sont le lieu de dissémination de souches d'*Escherichia coli* et d'*Enterococcus spp* résistantes aux antibiotiques. L'occurrence de souches d'*Escherichia coli* et d'*Enterococcus spp* résistantes aux antibiotiques rejetées dans les environnements aquatiques dépendra des usages du bassin versant. Dans un fleuve fortement anthropisé, il est retrouvé une circulation permanente de souches d'*Escherichia coli* et d'*Enterococcus* résistantes aux antibiotiques. (Servais et Passerat, 2009).

Des bactéries pathogènes ou potentiellement pathogènes, d'origine humaine ou animale, sont constamment « déversées » dans l'environnement via les eaux. Certaines de ces bactéries ont des gènes de résistance aux antibiotiques, éventuellement localisés sur des éléments génétiques mobiles (plasmides, intégrons, transposons) qui ont la capacité de se répandre à travers les communautés microbiennes du sol et de l'eau. (Baquero *et al.*, 2008). Certaines données montrent que les taux de résistance de haut niveau à plusieurs antibiotiques sont aussi observés chez les bactéries commensales et environnementales. (Kümmerer, 2009).

Les rejets de bactéries d'origine fécale dans l'environnement s'accompagnent de la dissémination de leur matériel génétique lors de la lyse cellulaire. Dans l'environnement, les temps de persistance de l'ADN dans l'eau varient de quelques heures à plusieurs mois. Dans ces environnements, la concentration en ADN bactérien extracellulaire varie ( $\mu\text{g.L}^{-1}$  à  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) en fonction de la dégradation enzymatique, la fragmentation et l'inactivation physique et chimique des molécules d'ADN. L'ADN d'une souche d'*Escherichia coli* inoculée dans un sol a été détecté jusqu'à 40 jours alors qu'après 15 jours la souche n'était plus cultivable. La persistance

d'ADN « nu » dans l'environnement indique qu'il peut être disponible pour des horizontaux de gènes entre bactéries allochtones et autochtones par transformation et ainsi participer à la dissémination de gènes de résistance. La transformation, mécanisme majeur chez les bactéries à Gram positif, permet l'acquisition d'une molécule d'ADN extracellulaire « nu » par une bactérie compétente. (Kenny, 2012).

Les origines de ces contaminations environnementales par des bactéries multirésistantes, sont :

#### **IV.1. Effluents hospitaliers**

Les effluents générés par les activités hospitalières peuvent présenter un danger potentiel pour l'homme et son environnement. Cela, compte tenu de la nature et de l'importance des substances qu'ils contiennent. En outre, Les effluents hospitaliers vont constituer une source importante de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques dans l'environnement. Ces déchets liquides sont évacués au même titre que les rejets urbains classiques vers le réseau d'assainissement communal sans traitement préalable. Les effluents non traités générés par les activités hospitalières peuvent contribuer largement à la dissémination des bactéries multi-résistantes (BMR) dans l'environnement. Ces bactéries multi-résistantes généralement responsables des infections nosocomiales peuvent se retrouver dans l'environnement en particulier dans les eaux de surface et être impliquées dans les infections communautaires. La présence des bactéries multi-résistantes dans les eaux de surface pourrait donc être un maillon important dans la dissémination et la circulation des gènes de résistance véhiculés par ces bactéries. (Guessemnd *et al.*, 2013).

Les résidus d'antibiotiques et les bactéries résistantes sont déversés en quantités variées dans l'environnement, en conséquence d'une utilisation massive et souvent indiscriminée de ces substances dans les domaines médicaux, vétérinaires et en agrochimie. Les eaux de surface sont le réceptacle majeur de ces polluants et représentent également les sources d'eau directement ou indirectement utilisées pour la consommation humaine et animale.

La pharmacocinétique des antibiotiques de la famille des bêta-lactames indique que ces derniers sont sécrétés majoritairement dans les urines et sous une forme chimique encore active. Cependant, l'hydrolyse chimique rapide du noyau bêta-lactame, caractérisant les antibiotiques de cette famille, rend difficile leur détectabilité dans l'environnement aquatique. (Corvaglia, 2006).

#### **IV.2. L'agriculture**

D'autres sources pour la dispersion des bactéries multirésistantes dans l'environnement existent. Notamment l'épandage d'engrais à base de boues d'épuration et de fumiers animaux en agriculture, qui en est une source importante. En effet, dans une étude de Blanco *et al.*, (2009),

les oiseaux vivant à proximité des champs où l'épandage est réalisé possèdent plus de bactéries résistantes à de nombreux antibiotiques dans leurs fèces que les oiseaux qui vivent proches de champs où l'épandage n'est pas réalisé (Blanco, 2009). On imagine alors très bien, avec la distance que peuvent parcourir des oiseaux, que ces bactéries résistantes peuvent se disperser largement dans l'environnement.

### **IV.3. Les eaux usées et les stations d'épuration**

Plusieurs études ont mis en évidence la présence des coliformes multi-résistants dans les eaux usées et par conséquent les stations d'épuration peuvent représenter un important réservoir de bactéries commensales humaines et animales dans lesquelles les déterminants de résistance aux antibiotiques persistent dans l'effluent final et sont rejetés dans l'environnement. Des études montrent une forte proportion de bactéries fécales résistantes (*Escherichia coli* et entérocoques fécaux) dans les affluents et effluents des stations d'épuration, ainsi que la présence de nombreux gènes de résistance différents. (Stalder, 2012).

Les stations d'épuration sont aussi de potentiels points chauds pour le transfert horizontal et la sélection de gènes de résistances antibiotiques parmi les bactéries aquatiques

Ainsi, les antibiotiques et les bactéries résistantes aux antibiotiques peuvent atteindre l'environnement par le biais des égouts, des stations d'épuration et par l'épandage du lisier sur les champs via ces principales voies d'entrée, ces substances et ces micro-organismes peuvent, finalement, atteindre les eaux souterraines et les eaux de surface, deux sources hydriques fondamentales pouvant être, soit directement, soit indirectement, utilisées pour l'approvisionnement en eau et pour la consommation humaine et animale. (Corvaglia, 2006).

Sur le plan bactériologique, le problème majeur demeure dans l'introduction, dans les écosystèmes aquatiques, d'espèces bactériennes polluantes entraînant des perturbations environnementales et des risques sanitaires importants. Universellement, la pollution bactériologique de l'eau est évaluée par la recherche et le dénombrement des germes indicateurs de contamination fécale dont la présence en nombre élevé indique une pollution d'origine fécale et la présence probable de microorganismes pathogènes. (Aboukacem *et al.*, 2007).

### **IV.4. Conséquences**

Parallèlement aux antibiotiques eux-mêmes, les milieux aquatiques reçoivent des bactéries résistantes adaptées à d'autres milieux, notamment au tube digestif humain ou animal (contamination fécale). Cette présence de bactéries multi-résistantes peut avoir des conséquences néfastes. À défaut de pouvoir survivre longtemps dans l'environnement aquatique, certaines de ces bactéries déjà résistantes aux antibiotiques vont pouvoir transmettre leur résistance à d'autres bactéries, dont certaines peuvent être pathogènes pour l'homme. On parle

alors de transfert horizontal de gènes de résistance. Ces transferts peuvent se réaliser lorsque ces gènes de résistance sont situés sur des éléments génétiques mobiles et transférables, ce qui contribue à la dissémination des résistances aux antibiotiques. Cette dissémination de la résistance entre bactéries pourrait être d'autant plus efficace que des antibiotiques sont également présents et exercent une pression de sélection.

Le transfert de bactéries résistantes à l'homme peut se produire par l'eau ou la nourriture si les champs sont arrosés avec des eaux de surface ou si on épand des boues d'épuration... **(Stalder, 2012).**

# **Matériel et méthodes**

## I. Caractéristiques générales du site d'étude

Le site choisi pour cette étude est Oued BAGHAI, il est situé à 2.5Km au nord de la wilaya de Khenchela en aval de la station d'épuration des eaux usées. C'est le récepteur final des eaux usées urbaines de la ville de Khenchela après traitement par boues activées à faible charge.

Les eaux sont utilisées par les habitants résidants le long du parcours de cet Oued pour l'irrigation de différentes cultures (céréales et légumes) et l'élevage des animaux. (O.N.A., 2011).



**Photographie 01:** Vue générale de la station d'épuration de la ville de Khenchela, Oued Baghai.

## II. Procédure d'échantillonnage

La prise des prélèvements a été réalisée durant le mois de mars (2 fois) 2015 à 10 heures du matin à la sortie de la station. Plus précisément à proximité de la source d'évacuation des eaux usées traitées de la station d'épuration au point de contact avec l'eau d'El Oued.

Les échantillons d'eaux ont été prélevés au niveau du site d'étude dans des conditions d'asepsie rigoureuse à l'aide de flacons en verre de 1000 ml lavés puis rincés, ensuite, ils sont séchés à l'abri de l'air, étiquetés et enfin stérilisés par la chaleur au four Pasteur à 180 °C pendant 1h30 min. (Rodier, 2009).

Les échantillons sont transportés à frais, jusqu'au laboratoire dans un laps de temps ne dépassant pas 3 heures. D'une façon générale, le transport à une température de 4 °C et à l'obscurité est recommandé pour assurer une conservation satisfaisante. (Rodier, 2009).



**Photographie 02** : Point de sortie des eaux usées traitées.



**Photographie 03** : Prélèvement des échantillons.

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

Ce travail a été réalisé au sein des laboratoires pédagogiques de Biologie de l'Université Abbés Laghrour Khenchela. Il a consisté :

✚ à effectuer un dénombrement des germes indicateurs de contamination fécale à savoir : les coliformes totaux, les coliformes fécaux et les Entérocoques fécaux sur des milieux sélectifs appropriés au moyen des méthodes normalisées ISO actuellement en vigueur.

✚ à prélever les différentes colonies caractéristiques et procéder à leur purification ceci à partir de repiquage sur les cultures de l'étape précédente.

✚ à identifier les souches correspondantes, au moyen de tests complémentaires et biochimiques spécifiques, (galerie API).

✚ à évaluer la résistance de ces souches vis à vis de différents antibiotiques utilisés en thérapeutique clinique.

### **III.1. Recherche et dénombrements des indicateurs de contamination fécale**

La méthode la plus classique consiste en une numérotation en boîte de Pétri. Les méthodes d'analyse de laboratoire en microbiologie ont été choisies en référence à de nombreuses publications. (AFNOR, 1990).

Ces techniques sont utilisées pour l'analyse des eaux superficielles. Le premier objectif des études qualitatives et quantitatives sur la flore microbiologique des eaux superficielles est de dénombrer les marqueurs de pollution fécale des eaux : **les coliformes totaux, les coliformes fécaux et les entérocoques fécaux.**

#### **III.1.1. Les dilutions décimales en série**

Les dilutions sont nécessaires car on doit prélever de très faibles volumes à cause de la charge bactérienne souvent très élevée, et permettent d'obtenir seulement les microorganismes dominants dans les dilutions les plus élevées. On dilue successivement l'échantillon d'eau à analyser à l'aide de l'eau physiologique.

Toutes les manipulations ont été effectuées avec un maximum de précision et d'une manière aseptique.

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

✚ On a introduit stérilement le volume prélevé dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique. On obtient ainsi une dilution au 1/10, le tube est ensuite agité manuellement,

✚ Puis on prélève 1 ml de la dilution 1/10 et on l'introduit dans un deuxième tube contenant 9 ml d'eau physiologique, on obtient ainsi une dilution 1/100.

✚ Une homogénéisation par au moins 10 secondes d'agitation est nécessaire avant chaque dilution.

#### **III.1.2. Recherche et dénombrement des coliformes totaux**

La recherche des coliformes totaux a été effectuée suivant une méthode AFNOR (AFNOR, 1990), dont le principe consiste en un ensemencement de 0.1 ml, par étalement de surface, sur gélose Tergitol-7 + TTC dans une boîte Pétri. L'incubation se fait à 37°C pendant 18 à 24 heures. Le nombre de germes est estimé à partir du nombre de colonies identifiées comme telles dans la boîte, selon la coloration spécifique sur le milieu de culture.

##### **III.1.2.1. Biodiversité morphologique des isolats**

###### **III.1.2.1.1. Aspect des colonies sur milieu solide**

La première étape de l'identification d'une souche bactérienne est la description macroscopique de ses colonies. À l'œil nu, on peut distinguer plusieurs caractéristiques, la forme, le relief, la taille, la couleur, l'odeur, l'allure du contour.

Après incubation, les boîtes de pétri ont été immédiatement examinées. On compte les colonies (UFC : unité formant une colonie) et sont considérées comme caractéristiques, les colonies qui présentent une coloration jaune à orangé, avec présence d'un halo jaune. Seules les boîtes contenant entre 30 et 300 UFC seront prises en considération. On compte comme coliforme total toutes les colonies appartenant au type caractéristique et qui sont oxydase négative.

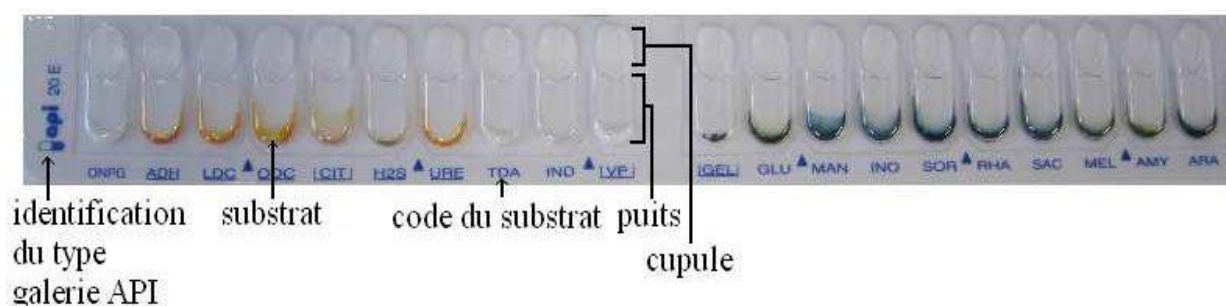
Le principe de lecture sur gélose Hektoen est fondé sur la fermentation éventuelle des 3 glucides présents dans le milieu (lactose, saccharose, salicine). Les microorganismes qui fermentent au moins l'un d'entre eux forment des colonies de couleur "saumon", les autres donnant des colonies vertes. En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

### III.1.2.2. Identification biochimique par galerie API 20 E

Les souches bactériennes purifiées ont fait l'objet d'une étude des caractères biochimiques. L'identification biochimique est l'étape qui précède toujours l'antibiogramme et elle est prise à partir des cultures pures représentées par des colonies que l'on peut différencier par leur aspect.

L'identification a été réalisée par les galeries d'identification biochimiques. Le système API Bio Mérieux est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries.

Une galerie API (Appareil et Procédés d'Identification) est un ensemble de petits puits et cupules prêts à l'emploi permettant l'identification de micro-organismes par la réalisation rapide et facile de tests biochimiques.



**Figure 07 :** La galerie API. (Bio-Mérieux, 2009).

La galerie API 20 E est destinée à l'identification des entérobactéries et autres bacilles Gram négatif, elle se présente sous la forme d'une bandelette comportant 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés (urée, L-arginine, gélatine, inositol, etc.). Au-dessous de chaque tube, un sigle indique la nature du test. (Bio-Mérieux, 2009). Les tubes sontensemencés avec une suspension bactérienne effectuée en eau physiologique. (AFNOR, 1990).

Les différents tests réalisés sont :

- ONPG (recherche de bêta-galactosidase).
- L'arginine-dihydrolase.
- Lysine-décarboxylase.
- L'ornithine-décarboxylase.
- Utilisation du citrate.
- Production du H<sub>2</sub>S.
- Uréase.
- Tryptophane désaminase.
- Production d'indole.
- La réaction de Voges-Proskauer (production d'acétoïne).
- Gélatinase.
- Fermentation / oxydation de Glucose, Mannitol, Inositol, Sorbitol, Rhamanose, Saccharose, Melibiose, Amygdaline et l'Arabinose.

La préparation de la galerie se déroule selon les étapes suivantes :

✚ **Préparation de l'inoculum** : on prélève à l'aide d'une pipette ou une anse une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé puis on la met dans un 9 ml d'eau physiologique pour obtenir une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu. La suspension est étuvée pendant 30 min.

✚ **Inoculation de la galerie** : pour les tests : CIT, VP et GEL on remplit tubes et cupules avec la suspension bactérienne en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement. Pour les autres tests on remplit uniquement les tubes et non les cupules. Dans les tests ; ADH, LDC, ODC, URE, H<sub>2</sub>S on remplit les cupules avec l'huile de paraffine pour créer une anaérobiose.

Après la préparation de la galerie il faut répartir environ 5 ml d'eau physiologiques dans les alvéoles afin de créer une atmosphère humide puis réunir le fond et couvercle. Un fond et un couvercle complètent la galerie et permettent de constituer une boîte d'incubation.

Un délai de 18 à 24h est nécessaire pour pouvoir observer les réactions entre bactéries et substrats. La lecture des résultats se fait soit de manière directe, lorsque la réaction enzyme bactérienne-substrat est révélée par un changement de couleur du milieu du puits (en raison d'un changement de pH), soit de manière indirecte, auquel cas il faut rajouter certains révélateurs dans les puits concernés. (Bio-Mérieux, 2009). La lecture de ces réactions est réalisée à l'aide du tableau de lecture (Annexe 02) et l'identification obtenue à l'aide du Logiciel d'identification API Excel (Annexe 04).

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

### **III.2. Recherche et dénombrement des coliformes thermotolérants**

La recherche des coliformes thermotolérants est réalisée selon la même technique que celle utilisée pour les coliformes totaux sauf que l'incubation se fait à 44°C pendant 18 à 24 heures. (Rejsek, 2002).

Après incubation, les boîtes Pétri sont immédiatement examinées et un comptage des colonies est effectué. Sont considérés comme coliformes thermotolérants, les colonies qui présentent après incubation les mêmes caractéristiques que celles décrites précédemment pour les coliformes totaux. Seules les boîtes contenant entre 30 et 300 UFC seront prises en considération. La recherche de l'oxydase est inutile.

Ces souches bactériennes ont fait l'objet d'une étude des caractères morphologiques macroscopiques et biochimiques selon le même mode opératoire que pour les coliformes totaux.

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

### **III.3. Recherche et dénombrement des entérocoques fécaux**

La recherche des entérocoques fécaux ne peut être considérée comme une indication certaine de pollution fécale, la présence des entérocoques fécaux doit s'accompagner de la présence de coliformes thermotolérants pour être un signe certain d'une contamination fécale. (CREPA, 2007).

#### **III.3.1. Test de présomption**

La recherche des entérocoques fécaux a été effectuée suivant une méthode d'OMS qu'on retrouve dans d'autres publications (Ndiaye, 2005). Elle consiste à ensemercer de 0.1 ml de chaque dilution, par étalement en surface, sur gélose **Slanetz** et **Bartley** dans une boîte Pétri à l'aide d'un râteau. L'incubation se fait à 37°C pendant 18 à 24 heures. Le nombre de germes est estimé à partir du nombre de colonies identifiées comme telles dans la boîte, selon la coloration spécifique sur le milieu de culture. (Ndiaye, 2005).

Après incubation, On compte les colonies caractéristiques (UFC : unité formant une colonie). Seules les colonies qui présentent une coloration violettes, rouges, marron ou rose lisses, légèrement bombées seront prises en considération. On retient seulement les boîtes contenant entre 30 et 300 UFC.

#### **III.3.2. Test de confirmation**

Etant donné le caractère sélectif de la gélose Slanetz ; ne pousseront théoriquement sur ce milieu que les Entérocoques fécaux. Un test de confirmation a quand même été pratiqué, il consiste à prélever aseptiquement quelques colonies de manière aléatoire puis les repiquer sur gélose Bile esculine azide (BEA) en boîte de pétri, le milieu est incubé à 37°C, pendant 24 heures.

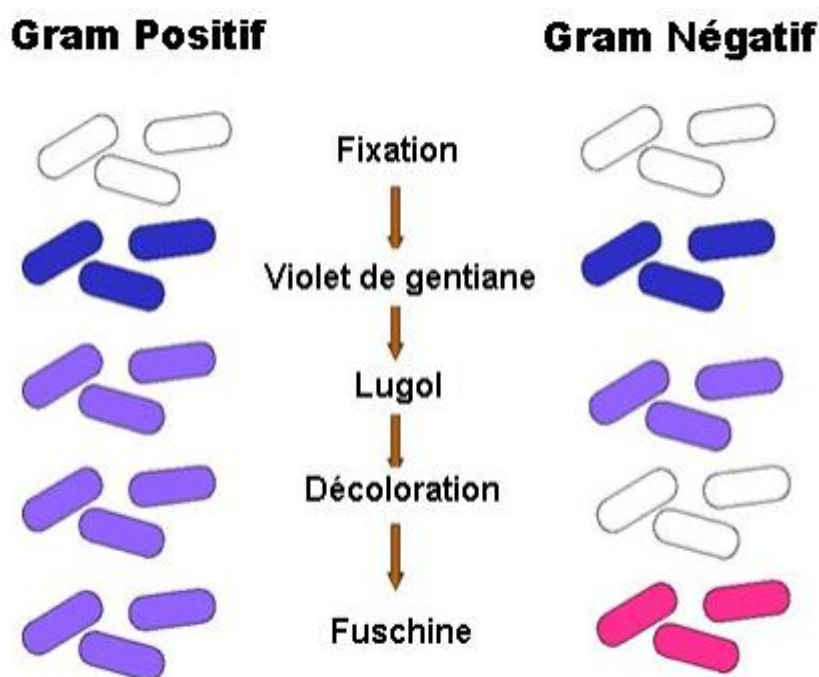
Après l'incubation, les colonies des Entérocoques fécaux apparaîtront alors sous forme de petites colonies noires légèrement bombées et lisses, esculine positive. On a ensuite effectué une coloration de Gram puis une étude de la sensibilité de ces germes aux antibiotiques par la technique d'antibiogramme sur Muller Hinton. (AFNOR, 1990).

### III.3.3. Coloration de GRAM

La coloration de Gram est une coloration différentielle qui permet la distinction des bactéries Gram (+) et Gram (-) sur la base de différence de composition chimique et d'ultra structure des parois cellulaires. C'est une technique qui se déroule comme suit :

- ✚ Réaliser sur une lame propre un frottis puis le fixer.
- ✚ Recouvrir la lame de violet de gentiane phénique pendant 1 minute puis rincer.
- ✚ Recouvrir la lame d'une solution de Lugol durant 30 secondes.
- ✚ Laver la lame à l'éthanol jusqu'à ce que la dernière goutte soit transparente.
- ✚ Laver rapidement à l'eau et recouvrir la lame de Fuschine phénique pendant 10 secondes puis rincer à l'eau distillée, ensuite, sécher la lame à l'aide d'un papier buvard.
- ✚ L'observation s'effectue à immersion (objectif  $\times 100$ ) après avoir déposer une goutte d'huile de cèdre sur la lame (observation à immersion).

Les bactéries Gram positif sont colorées en violet alors que celles colorées en rose sont Gram négatif.



**Figure 08 :** L'aspect des bactéries après la coloration de GRAM.

### III.4. Recherche des Salmonelles

La recherche des salmonelles a été réalisée selon la norme **ISO 6579** modifiée. Elle a consisté à :

✚ **Enrichissement** : Consiste à introduire 1 ml de la solution mère dans 10 ml du bouillon sélectif : bouillon au sélénite. L'objectif de l'étape d'enrichissement sélectif est de favoriser la croissance des bactéries du genre *Salmonella* tout en inhibant la croissance des autres bactéries.

✚ **Incubation** : Les tubes préparés ont été incubés à 37 °C pendant 24h les *Salmonella* (si elles sont présentes dans l'eau) se retrouvent alors majoritaires dans le bouillon utilisé.

✚ **Isolement sur gélose SS (gélose Salmonella-Shigella)** : La norme ISO 6579 impose le milieu gélose SS, à partir du bouillon sélénite, on ensemence par râteau 0,1 ml sur la gélose SS, puis incubation à 37°C pendant 24 heures. Des colonies roses ou incolores apparaîtront avec ou sans un centre noir, la fermentation du lactose est révélée par le virage de l'indicateur coloré, le rouge neutre, à sa teinte acide.

✚ **Purification** : Chaque colonie suspecte est reprise et repiquée sur gélose Hektoen, ensuite incubée à 37°C pendant 24 heures.

Tous ces milieux contiennent des inhibiteurs des bactéries d'origine non intestinale, un ou plusieurs glucides (lactose, saccharose, salicine, xylose), du thiosulfate et du citrate de fer pour la mise en évidence du caractère H<sub>2</sub>S.

La boîte de gélose SS et celle de la gélose Hektoen subiront une lecture en tenant compte du fait que les *Salmonella* se présentent le plus souvent sous forme de colonies incolores (lactose négatif) sur SS et sous formes de colonies vertes ou bleuâtres sur gélose Hektoen. De plus, les bactéries capables de produire de l'H<sub>2</sub>S à partir du thiosulfate de sodium donnent en présence des ions de fer des colonies à centre noir par formation de sulfure de fer. Certains sérotypes de salmonelles produisent de l'H<sub>2</sub>S et d'autres non.

✚ **Identification** : l'identification des souches suspectes de Salmonelles a été réalisée par la galerie API20E selon le protocole cité précédemment.

### III.5. Antibiogramme

L'antibiogramme ou la détermination de la sensibilité aux agents antibactériens est l'étude de la croissance bactérienne en présence d'un gradient de concentration réalisées dans un milieu de culture. Le profil de résistance des souches bactériennes a été déterminé par la méthode de diffusion sur milieu Mueller Hinton. Des antibiotiques communément utilisés en thérapie humaine ont été retenus. (Soude, 2005).

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

de ces antibiotiques. La détermination du diamètre de la zone d'inhibition permet une estimation de la concentration minimale inhibitrice. Les caractères de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne en seront déduits.

### Principe

Antibiogramme standard ou les méthodes par diffusion sont plus utilisées par les laboratoires cliniques. Elles consistent à disposer des disques de papier buvard imprégnés de concentration déterminée d'antibiotiques à la surface d'un milieu gélosé. Dès l'application des disques, l'antibiotique diffuse à partir du disque de manière uniforme dans la gélose. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture. (Soude, 2005).

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques. Les antibiotiques testés sont représentés dans les **Tableaux III** et **IV**. Le mode opératoire est pratiqué selon la standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS. (Standardisation de l'antibiogramme, 2005).

### Mode opératoire pour les Entérobactéries (bactéries non exigeantes)

➤ **Milieu** : La gélose Mueller-Hinton fondue au bain-marie a été coulée en boîte Pétri en respectant une épaisseur d'environ 4 mm.

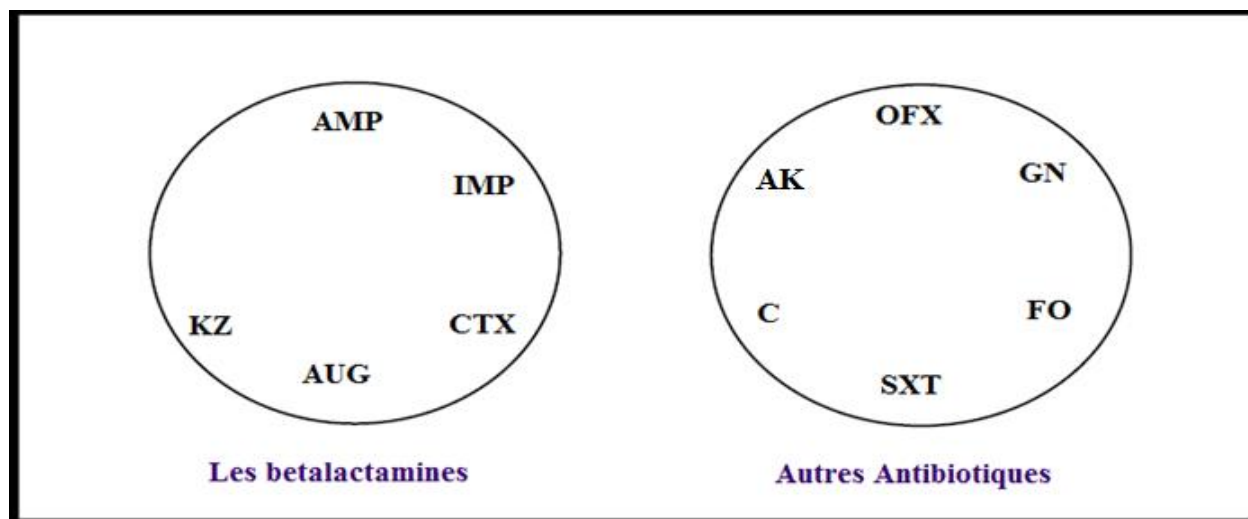
➤ **Inoculum** : On prépare la suspension à partir d'une souche bactérienne de 18 heures. On prélève des colonies de la bactérie étudié à l'aide d'un écouvillon ou d'une anse de platine qu'on introduit dans un tube contenant 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile.

➤ **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 d'angle à chaque fois (30°), enfin on écouvillonne partout autour du bord de la surface de la gélose.

➤ **Application des disques d'antibiotiques** : on a déposé les disques à l'aide d'une pince bactériologique stérile. Il y a des précautions à respecter lors de l'application, les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24 mm, centre à centre. Une fois appliqué le disque ne doit pas être déplacé et finalement presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de la pince pour s'assurer de son application. Les disques d'antibiotiques utilisés sont résumés dans le **Tableau III**.

➤ **Incubation** : les boîtes sont par la suite incubées à 37°C pendant 24 heures, couvercle en bas.

En ce qui concerne les  $\beta$ -lactamines, la disposition des disques se fait par l'ordre suivant :



**Figure 09** : Disposition des disques d'antibiotiques sur les boîtes d'antibiogrammes selon la standardisation nationale. (Standardisation de l'antibiogramme, 2005).

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

Antibiotique	Abréviation	Charge du disque	Classe
Ampicilline	AMP	10 µg	β-lactames (famille des pénicillines)
Amoxicilline + acide clavulanique	AUG	30 µg	β-lactames (famille des pénicillines et des clavames)
Céfazoline	KZ	30 µg	β-lactames (famille des céphalosporines 1ère génération)
Céfotaxime	CXT	30 µg	β-lactames (famille des céphalosporines 3ème génération)
Imipénème	IMP	10 µg	β-lactames (famille des carbapénèmes)
Fosfomycine	FO	200µg	Acides phosphoniques
Ofloxacine	OFX	5 µg	Fluoroquinolones
Chloramphénicol	C	30 µg	Phénicoles
Amikacine	AK	30 µg	Aminoside
Gentamicine	CN	10 µg	Aminosides
Triméthoprime+Sulfaméthoxazole	SXT	25 µg	Sulfamides

➤ **Lecture** : Après avoir retiré les boîtes de pétri de l'étuve, la zone entourant le disque où aucune croissance bactérienne n'est visible détermine la zone d'inhibition. Son diamètre est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse métallique et comparé aux diamètres critiques figurant dans

les tables de lecture (**Annexe 6**). La souche est ainsi classée sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R) à l'antibiotique, les souches I étant ensuite incluses dans la catégorie R.

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

#### 🚦 Mode opératoire pour les Entérocoques intestinaux (bactéries exigeantes)

➤ **Milieu** : c'est la gélose Mueller Hinton (MH) additionnée de 05 % de sang de mouton ou le sang humain (O<sup>+</sup>) et coulé en boîte Pétri sur une épaisseur de 4 mm.

➤ **Inoculum** : à partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement, on prépare une suspension bactérienne en utilisant 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile.

➤ **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 d'angle à chaque fois (30°), enfin on écouvillonne partout autour du bord de la surface de la gélose.

➤ **Application des disques d'antibiotiques** : on a déposé les disques à l'aide d'une pince bactériologique stérile. Il y a des précautions à respecter lors de l'application, il ne faut pas mettre plus de 4 disques dans la boîte, les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24 mm, centre à centre. Une fois appliqué le disque ne doit pas être déplacé et finalement presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de la pince pour s'assurer de son application. Les disques d'antibiotiques utilisés sont résumés dans le **Tableau IV**.

➤ **Incubation** : les boîtes sont par la suite incubées à 37°C pendant 24 heures, couvercle en bas dans une atmosphère enrichie en dioxyde de carbone CO<sub>2</sub>.

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

Antibiotique	Abréviation	Charge	Classe
Ampicilline	AMP	10 µg	β-lactames (famille des pénicillines)
Tétracycline	TC	30 µg	Tétracycline
Vancomycine	VA	30 µg	Glycopeptides
Teicoplanine	TEC	30 µg	Glycopéptides
Streptomycine	S	10 µg	Aminosides
Levofloxacin	LEV	5 µg	Fluoroquinolones
Erythromycine	E	15 µg	Macrolides
Nitrofurantoin	F	300 µg	Nitrofuranes

➤ **Lecture :** Les antibiotiques diffusent hors du disque dans la gélose, la zone entourant le disque où aucune croissance bactérienne n'est visible détermine la zone d'inhibition. 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 7**). On classe la bactérie dans l'une des catégories : sensible (S), intermédiaire (I) et résistante (R).

Des souches de référence, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, ont servi pour le contrôle de la qualité de l'antibiogramme.

# **Résultats et discussion**

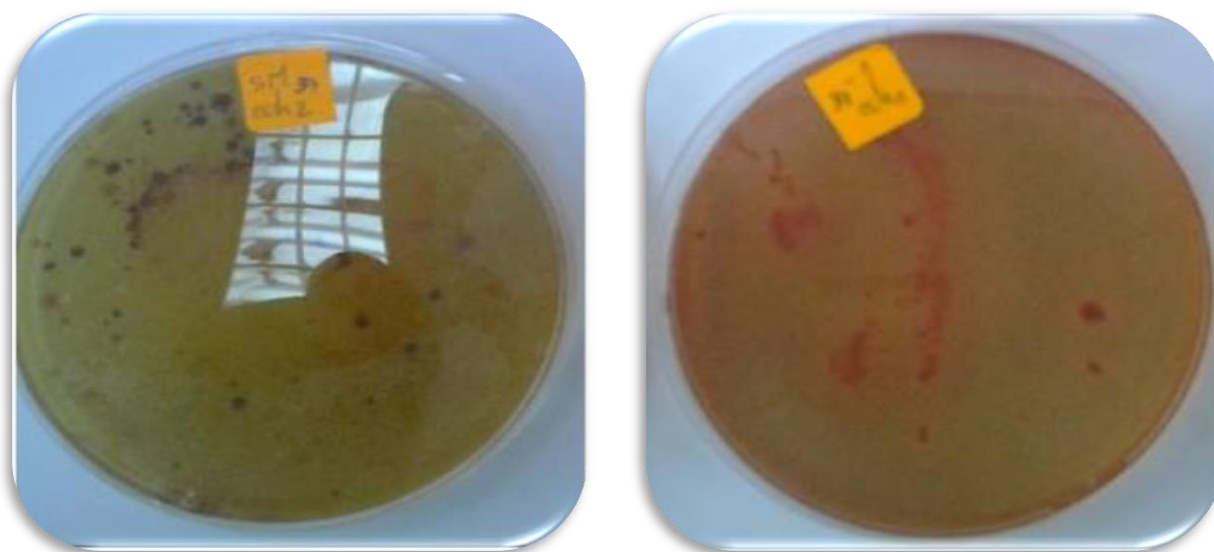
## **I. Dénombrement des germes de contamination fécale**

### **I.1. Dénombrement des coliformes totaux (CT) et thermotolérants (CTT)**

La photographie 01 montre les résultats d'isolement sur le milieu gélosé au Tergitol 7 après incubation à 37°C pour les CT et à 44°C pour les CTT. On remarque l'apparition de colonies à la surface des milieux de culture, seules les colonies ayant une coloration jaune à orange, avec présence d'un halo jaune ont été dénombrées.

Le dénombrement se fait par comptage de colonies formées sur le milieu solide (il s'exprime alors en unités formant colonies : UFC). Seules les boîtes contenant entre 30 et 300 UFC ont été prises en considération.

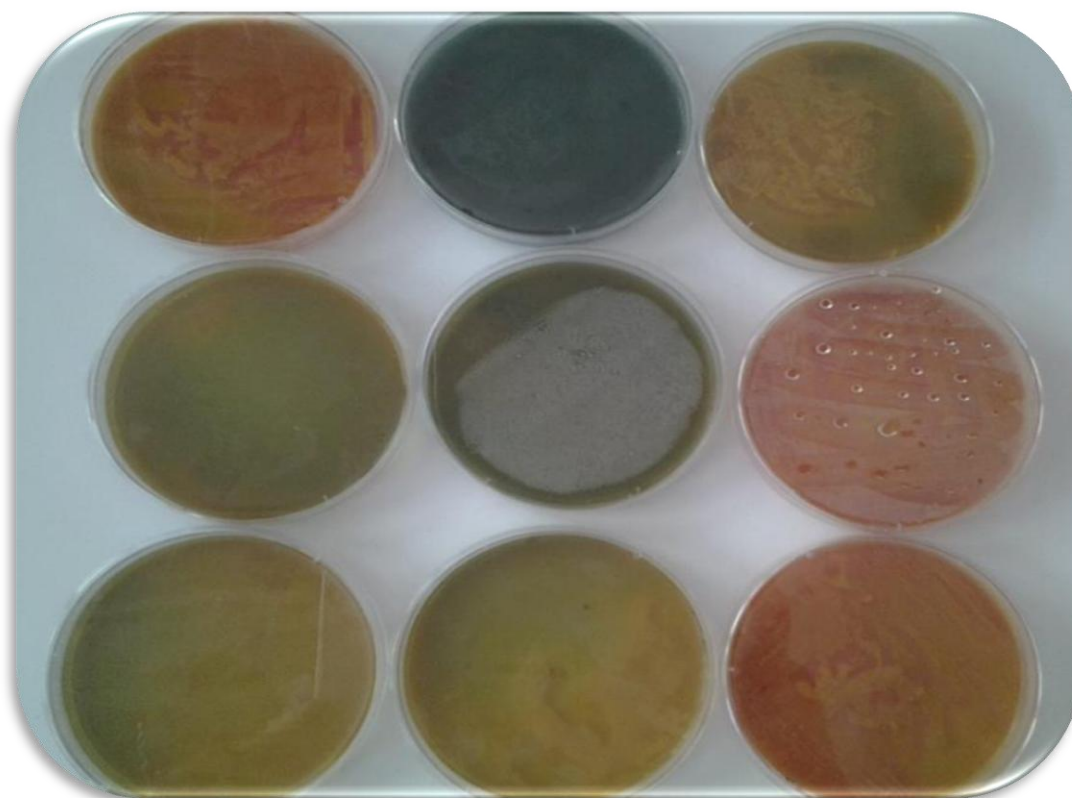
Le résultat du dénombrement est le suivant : Les coliformes totaux :  $1.2 \cdot 10^4$  UFC/ml, les coliformes thermotolérants :  $5.2 \cdot 10^3$  UFC/ml, ce résultat est identique à celui d'une étude sur les hydrosystèmes en France. (Kenny, 2012).



**Photographie 04** : Résultats d'isolement sur gélose Tergitol 7.

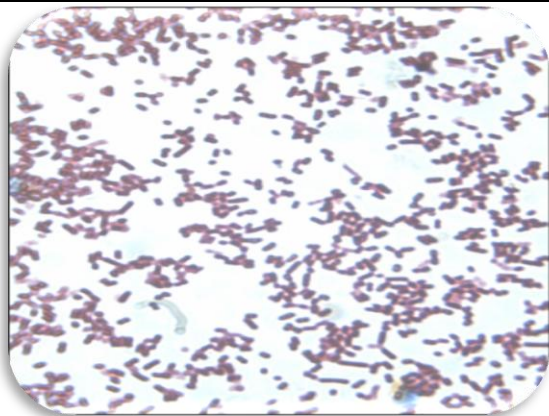
#### **I.1.1. Biodiversité macroscopiques et microscopiques des isolats**

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



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

**Tableau V** : Résultats de l'étude macroscopique des isolats.

Milieu de culture	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
Gélose Hektoen	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colonies bleu-vertes, lisses, bombées, arrondies, à contour régulier, de consistance muqueuse à sèche, de 1 à 2mm de diamètre.</li> <li>- Colonies saumon, lisses, bombées, arrondies, à contour régulier et parfois irrégulier, de consistance crémeuse, de 1 à 2mm de diamètre.</li> </ul>	 <p>Bacilles isolées ou en courtes chainettes, à Gram négatif.</p>

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

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

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

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

✚ Le système d'indicateurs colorés, composé de bleu de bromothymol et de fuchsine acide permet de colorer en saumon les entérobactéries lactose-positif et en bleu vert les lactose négatif. Le principe de lecture est fondé sur la fermentation éventuelle des 3 glucides présents dans le milieu (lactose, saccharose, salicine).

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

### **I.1.2. Identification biochimique des isolats**

Les colonies oxydase négative purifiées par repiquage sur gélose Hektoen ont subi un test d'identification biochimique sur galerie API 20 E.

La lecture des galeries biochimiques est réalisée à l'aide du tableau de lecture (Annexe 02) et du logiciel **API Excel** (Annexe 04), la lecture des résultats se fait soit de manière directe, par un changement de couleur du milieu du puits (en raison d'un changement de pH), soit de manière indirecte, dans ce cas il faut rajouter certains révélateurs dans les puits concernés (réactif TDA, Kovacs, VP1 et VP 2). Les résultats obtenus sont résumés dans les **Tableaux VI** et **VII** :

Tableau V : Résultats d'identification des coliformes totaux par la galerie API 20E

Tests Bactéries	ONPG	ADH	LDC	ODC	CT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	Espèces
CT1	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
CT2	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>
CT3	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>
CT4	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
CT5	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>
CT6	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>
CT7	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Kluyvera spp</i>
CT8	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Kluyvera spp</i>
CT9	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>
CT10	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>
CT11	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>Escherichia coli</i>
CT12	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>
CT1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia vulneris</i>
CT2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	<i>Pantoea spp</i>
CT3	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Proteus mirabilis</i>
CT4	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	<i>Kluyvera spp</i>
CT5	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	<i>Pantoea spp</i>
CT6	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	<i>Pantoea spp</i>
CT7	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>Enterobacter amnigenus</i>
CT8	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Kluyvera spp</i>
CT9	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

Tableau V : Résultats d'identification des coliformes fécaux par la galerie API 20E

Tests Bactéries	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	Espèces
CTT1	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella oxytoca</i>
CTT2	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>Escherichia coli</i>
CTT3	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>Escherichia coli</i>
CTT4	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>Escherichia coli</i>
CTT5	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>Escherichia coli</i>
CTT1	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>Escherichia coli</i>
CTT2	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>Escherichia coli</i>
CTT3	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>Escherichia coli</i>
CTT4	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>Escherichia coli</i>
CTT5	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	<i>Escherichia coli</i>
CTT6	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>Escherichia coli</i>
CTT7	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>
CTT8	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Kluyvera spp</i>
CTT9	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>Escherichia coli</i>
CTT10	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	<i>Escherichia coli</i>
CTT11	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>Escherichia coli</i>
CTT12	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>Escherichia coli</i>

(+) : Résultat positif, (-) : Résultat négatif; (ONPG) :  $\beta$ -galactosidase ; (ADH) : Arginine-dihydrolase ; (LDC) : Lysine-décarboxylase ; (ODC) : Ornithine-décarboxylase ; (CIT) : Citrate ; (H2S) : Production du sulfure d'hydrogène ; (URE) : Uréase ; (TDA) : Tryptophane-désaminase ; (IND) : Indole ; (VP) : Réaction de Voges-Proskauer ; (GEL) : Gélatine ; (GLU) : D-glucose ; (MAN) : D-mannitol ; (INO) : Inositol; (SOR) : D-sorbitol ; (RHA) : L-rhamnose ; (SAC) : D-saccharose ; (AMY) : Amygdaline ; (MEL) : D-melibiose ; (ARA) : L- arabinose.



*Escherichia coli*



*Klebsiella ornithinolytica*



*Kluyvera spp*



*Pantoea spp*



*Klebsiella oxytoca*



*Klebsiella pneumoniae*



*Escherichia vulneris*



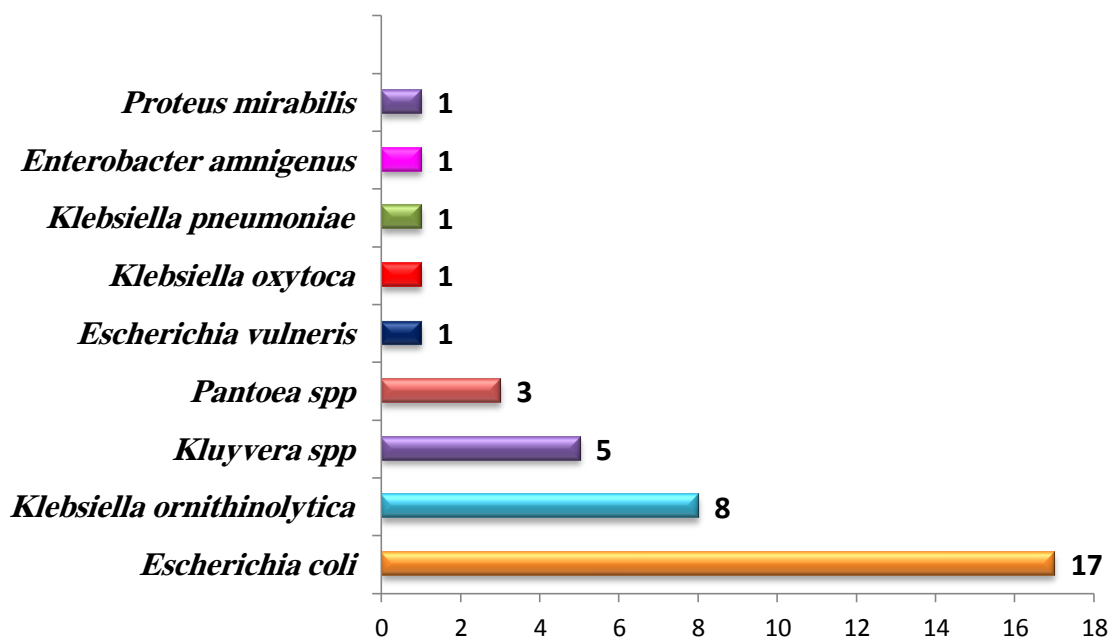
*Proteus mirabilis*



*Enterobacter amnigenus*

**Photographie 06 :** Les espèces bactériennes identifiées et l'aspect de leurs galeries biochimique.

Au total 38 souches ont été identifiées à partir de site d'étude. Le nombre de bactéries de chaque espèce identifiée est représenté dans la figure 10 :



**Figure 10 :** Nombre d'espèces bactériennes identifiées à partir des coliformes totaux et thermotolérants.

Les résultats obtenus montrent une diversité phylogénétique importante. L'analyse des espèces identifiées par rapport à l'ensemble des souches isolées, a montré une prédominance d'*Escherichia coli* avec 17 souches soit **44.73%** suivie de *Klebsiella ornithinolytica* avec 8 souches (**21.05%**), de *Kluyvera spp.* avec 5 souches (**13.15%**) et de *Pantoea spp* avec 3 souches (**7.89%**). On retrouve également *Escherichia vulneris*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella*

*pneumoniae*, *Enterobacter amnigenus* et *Proteus mirabilis* avec un pourcentage de 2.63% chacune. **(Figure 10)**

Les espèces *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* et *Klebsiella pneumoniae* sont les principaux indicateurs d'une contamination fécale, alors qu'*Enterobacter amnigenus* est une bactérie environnementale des milieux aquatiques, *Escherichia vulneris* et *Klebsiella ornithinolytica* sont des pathogènes opportunistes cliniques. **(Rejsek, 2002).**

*Kluyvera spp* est une entérobactérie largement répandue dans l'environnement humide (eaux de boisson, eaux usées, sol, aliments, évier d'hôpital. . .). C'est un commensal du tube digestif, des voies respiratoires et du tractus urinaire de l'homme. Elle est d'origine clinique et elle a été incriminée comme responsable de différents types d'infections, parfois sévères, voire mortelles malgré un traitement antibiotique adapté. **(Bellaoui et al., 2009).**

*Pantoea agglomerans* est présente dans l'environnement (eau, plantes, graines). Au début des années 1970, *Pantoea agglomerans* a été mise en cause dans une vaste épidémie de septicémies dans 25 hôpitaux aux Etats-Unis et causée par l'injection de liquides de perfusion contaminés. **(Parveau, 2011).**

Les espèces du genre *Proteus* sont largement répandues dans la nature et elles sont isolées du sol, de l'eau, de l'intestin de l'homme et de l'intestin de nombreuses espèces animales (souris, rats, chiens, chats, bovins, porcins, oiseaux, reptiles...). Après *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* est la bactérie la plus souvent isolée des urines et elle est à l'origine d'infections graves et parfois mortelles. Ces infections sont fréquentes en milieu hospitalier et chez les patients âgés. **(Bellaoui et al., 2009).**

La présence des coliformes fécaux dans notre site d'étude témoigne d'une pollution fécale. Ceci est dû probablement aux déversements multiples des eaux usées chargées par des polluants abiotiques. Ces résultats, concordent avec les observations faites par **El Addouli et al. (El Addouli et al., 2009).**

La diversité phylogénétique importante observée est probablement liée au fait que Oued Baghai est fortement anthropisé, il est alimenté par les eaux usées traitées ainsi que les ruissellements consécutifs à des événements pluvieux intenses. Une étude a montré qu'à l'échelle du bassin de la Seine, les rejets directs d'eaux usées traitées sont responsables de plus de 95 % des *Escherichia coli* présents dans les cours d'eau. **(Garcia-Armisen et Servais, 2007).**

La station d'épuration de la wilaya de kenchela réceptionne toutes les eaux usées urbaines soit domestique ou les déchets issus des abattoirs qui sont conséquemment une autre source potentielle d'introduction de bactéries fécales. Une fois l'animal abattu le contenu du tube digestif est éliminé, et les eaux de lavage et autres effluents de procédés de ces installations

rejoignent également le réseau d'assainissement. Les effluents hospitaliers sont aussi rejetés au même titre que les rejets urbains sans aucun traitement préalable.

## **I.2. Recherche et dénombrement des entérocoques fécaux**

La photographie 07 montre les résultats d'isolement sur le milieu gélosé Slanetz et Bartley, on remarque l'apparition des colonies après la période d'incubation. Uniquement les colonies ayant une coloration violette, rouge, marron ou rose, lisses, légèrement bombées ont été dénombrées. Seules les boîtes contenant entre 30 et 300 UFC ont été prises en considération. Le résultat obtenu est : **1,96. 10<sup>4</sup> UFC/ ml.**



**Photographie 07 :** Résultat du dénombrement des Entérocoques fécaux

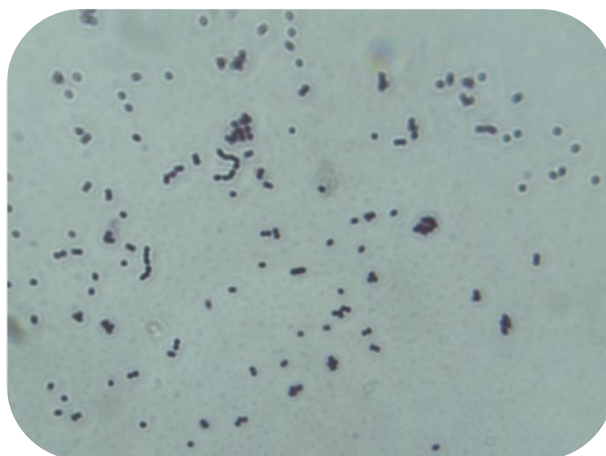
La présence des entérocoques peut s'expliquer par le fait que ces bactéries sont beaucoup plus résistantes dans l'environnement notamment à cause de leur résistance notoire aux agents désinfectants, ce qui fait d'eux des indicateurs privilégiés pour évaluer l'efficacité du traitement de l'eau, et leur présence serait donc le signe d'une contamination fécale de l'eau plus ancienne. [\(Rejsek, 2002\).](#)

Quelques colonies ont été reprises de manière aléatoire etensemencées sur gélose Bile Esculine Azide (BEA) pour un test de confirmation, la photographie 08 montre l'aspect des colonies apparues à la surface du milieu de culture après incubation.



**Photographie 08 :** Résultat du test de confirmation sur gélose B.E.A.

Ce sont de petites colonies translucides entourées d'un halo noir, témoignant de l'hydrolyse de l'esculine. La gélose bile esculine azide (BEA) est un milieu qui contient une base nutritive riche grâce aux peptones et à l'extrait de levure. Il contient deux inhibiteurs : la bile de bœuf et l'azide de sodium. Ces deux inhibiteurs permettent de sélectionner la culture des Entérocoques fécaux.



**Photographie 09** : Résultats de la coloration du Gram.

La coloration de Gram a révélé des cocci Gram positif en diplocoques ou en courtes chaînettes lors de l'observation au microscope. (Photographie 09)

## **II. Recherche des Salmonelles**

La Photographie 10 montre le résultat de l'enrichissement des bactéries dans le bouillon au sélénite, les tubes présentant un trouble sont des tubes positifs.



**Photographie 10** : Résultat de l'enrichissement sur bouillon au sélénite.

La photographie 11 montre le résultat de l'isolement des échantillons d'eaux enrichis sur sélénite sur gélose *Salmonella-Shigella* (S.S.), on remarque qu'après incubation, plusieurs types

de colonies à la surface du milieu ont apparus, ces colonies sont incolores due à l'absence d'acidification du milieu donc sont des bactéries **lactose -**, avec ou sans centre noir (production de sulfure de fer noir due à la réduction du thiosulfate en  $H_2S$ : **souche  $H_2S$  +/-**).



**Photographie 11** : Résultat de la culture sur la gélose *Salmonella-Shigella* (SS).

La photographie 12 montre le résultat du repiquage des colonies obtenues dans la gélose SS sur la gélose Hektoen, après l'incubation on remarque des colonies de couleur saumon avec ou sans centre noir, on peut lire la fermentation du lactose par le virage de la couleur du vert vers une couleur jaune orangée.



**Photographie 12** : Aspect macroscopique des bactéries sur gélose Hektoen.

### **II.1. Identification biochimique**

L'identification biochimique des souches a été réalisée par les galeries biochimiques API 20 E, elles permettent de réaliser plusieurs tests des métabolismes glucidiques, protéiques et enzymatiques visant à identifier la bactérie en basant sur la lecture de ces caractères.

Les galeries biochimiques ont été lues à l'aide du logiciel **API Excel**, La lecture des résultats se fait soit de manière directe, par un changement de couleur du milieu des puits (en raison d'un changement de pH), soit de manière indirecte, auquel cas il faut rajouter certains

révélateurs dans les puits concernés (réactif TDA, Kovacs, VP1 et VP 2). Les résultats des différents caractères biochimiques obtenus sont regroupés dans le **Tableau VIII**.

**Tableau VIII** : Résultat de l'identification biochimique des bactéries par les galeries API 20E

<b>ONPG</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>ADH</b>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
<b>LDC</b>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>ODC</b>	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
<b>CIT</b>	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
<b>H2S</b>	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
<b>URE</b>	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
<b>TDA</b>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>IND</b>	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
<b>VP</b>	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>GEL</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>GLU</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>MAN</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>INO</b>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>SOR</b>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>RHA</b>	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
<b>SAC</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>MEL</b>	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<b>AMY</b>	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
<b>ARA</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Identification</b>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Enterobacter gergoviae</i>	<i>Yersinia intermedia</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Pantoea spp</i>	<i>Pantoea spp</i>	<i>Pantoea spp</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Citrobacter freundii</i>

L'aspect des galeries obtenues après lecture est représenté sur la **photographie 13**. Au total 11 colonies ont été identifiées, les résultats montrent que les genres retrouvés sont autre que celui de *Salmonella* et *Shigella*. Cette absence a été mentionnée dans les travaux de ([Chahlaoui, 1996](#)), ([Aboukacem et al., 2007](#)) et ([Hamaidi et al., 2009](#)).

La majorité des souches isolées appartiennent aux espèces *Citrobacter freundii* et *Pantoea spp* avec un pourcentage de **27%** (3 souches pour chacune), suivi des espèces *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter aerogenes*, *Yersinia intermedia* et *Citrobacter koseri* avec un pourcentage de **9%** (1 souche pour chacune). (**Figure 11**)



*Klebsiella oxytoca*



*Enterobacter gergoviae*



*Yersinia intermedia*



*Enterobacter aerogenes*



*Pantoea spp*



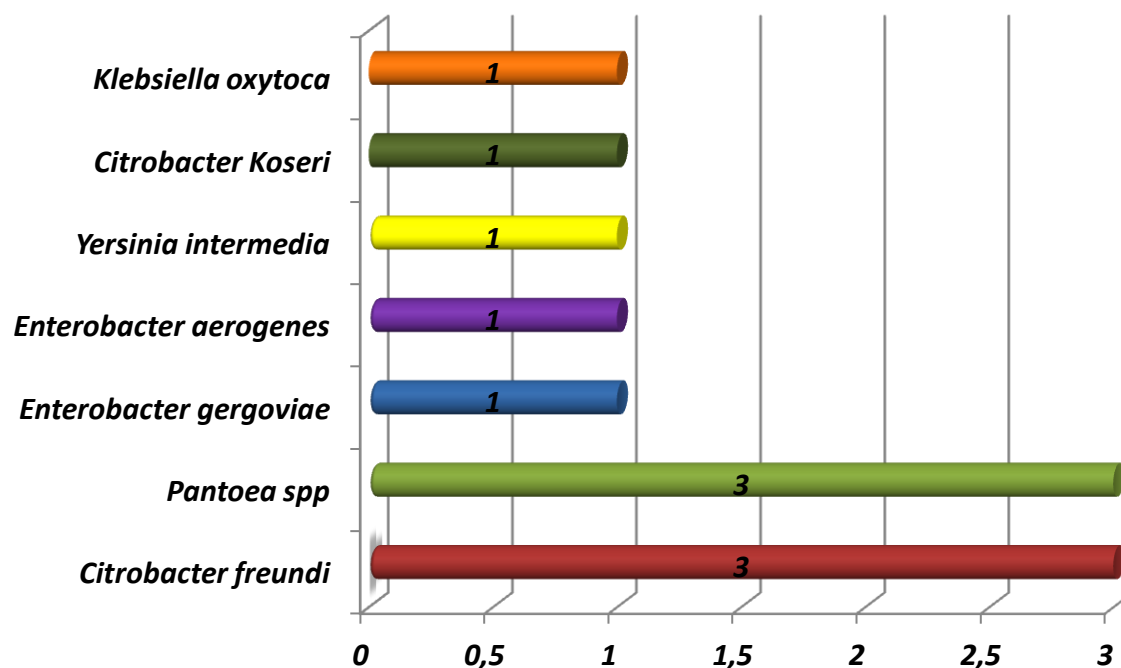
*Citrobacter freundii*



*Citrobacter koseri*

**Photographie 13:** Aspect des galeries biochimique des espèces bactériennes apparues sur la gélose *Salmonella* -*Shigella*

La diversité phylogénétique importante observée est probablement liée au fait que Oued Baghai est fortement anthropisé, il est alimenté par les eaux usées traitées ainsi que les ruissellements consécutifs à des évènements pluvieux intenses.



**Figure 11 :** Nombre d'espèces bactériennes identifiées à partir de la gélose *Salmonella - Shigella*

### III. Profil de résistance aux antibiotiques

#### III.1. Profil de résistance aux antibiotiques des coliformes totaux et fécaux

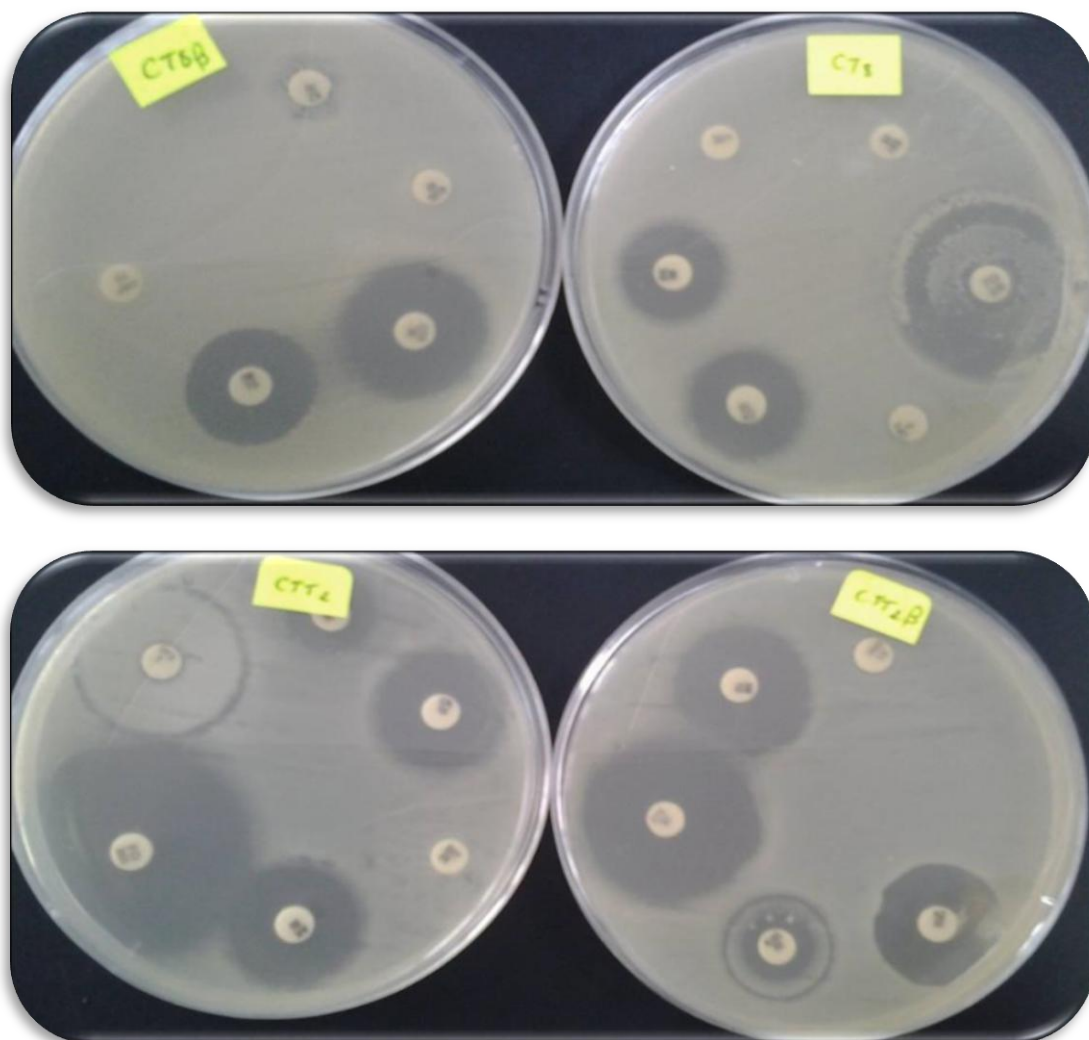
La résistance aux antibiotiques a été testée pour chacune des bactéries identifiées vis-à-vis de 11 antibiotiques déjà mentionnés dans la partie précédente. Les résistances naturelles des souches isolées n'ont pas été prises en considération.

La réalisation des profils de résistance aux antibiotiques a été effectuée sur les eaux traitées après passage par la station d'épuration pour pouvoir suivre l'antibiorésistances après traitement biologique et pouvoir aussi évaluer l'efficacité de ce dernier.

La **photographie 14** montre les antibiogrammes obtenus, les valeurs des diamètres d'inhibitions sont comparées aux valeurs du tableau de lecture (Annexe 06).

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

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



Photographie 14 : Photographies des antibiogrammes des espèces de coliformes identifiées.

Tableau XI : Les taux de résistance aux antibiotiques des coliformes.

	% de résistance des bactéries	% de sensibilité des bactéries	% d'intermédiaire des bactéries
AMP	73.68%	0%	0%
AUG	50.00%	34.21%	15.78%
KZ	36.84%	57.89%	5.62%
CTX	2.63%	97.36%	0%
IMP	2.63%	97.36%	0%
CN	0%	100%	0%
AK	2.63%	97.36%	0%
C	2.63%	92.10%	5.26%
SXT	34.21%	60.52%	5.26%
OFX	15.78%	84.21%	0%
FO	28.94%	68.42%	2.63%

Tableau IX : La résistance aux antibiotiques des coliformes du 1<sup>er</sup> prélèvement.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
AMP	NR	R	NR	R	NR	NR	R	R	NR	NR	R	NR	NR	R	R	R	R
AUG	I	I	R	I	I	I	R	I	R	R	S	R	R	S	S	S	S
KZ	R	S	R	R	I	R	S	R	R	R	S	I	S	S	S	S	S
CTX	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
IMP	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CN	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AK	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SXT	R	S	I	S	R	S	S	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S
OFX	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
FO	S	S	R	S	R	I	R	S	R	R	S	R	R	S	S	S	S
Identification	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	<i>Kluyvera spp</i>	<i>Kluyvera spp</i>	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

Tableau X : La résistance aux antibiotiques des coliformes du 2<sup>ème</sup> prélèvement.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
AMP	R	R	R	R	R	R	NR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NR
AUG	S	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S
KZ	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S
CTX	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
IMP	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
CN	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AK	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
C	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	R	S
SXT	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S
OFX	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
FO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	R	R
Identification	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	<i>Kluyvera spp</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia vulneris</i>	<i>Pantoea spp</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Kluyvera spp</i>	<i>Pantoea spp</i>	<i>Pantoea spp</i>	<i>Enterobacter amnigenus</i>	<i>Kluyvera spp</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	

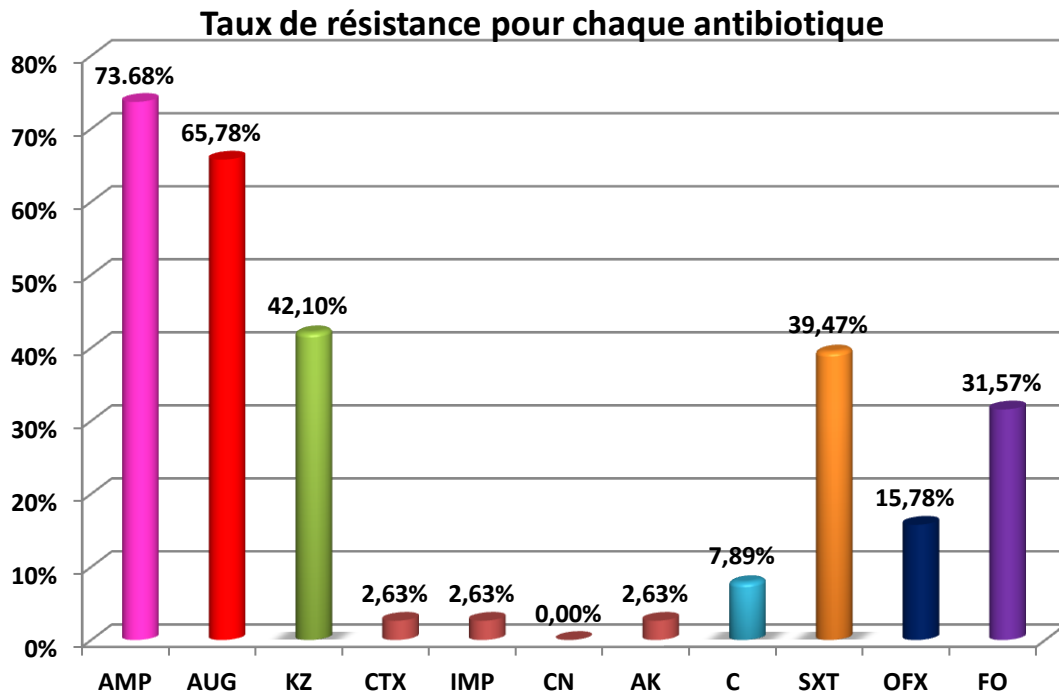
S : Sensible

I : Intermédiaire

R : Résistant

NR : Résistance naturelle

La figure 12 représente le pourcentage des souches résistantes (taux de résistance) à chacun des antibiotiques testés.



**Figure 12 :** Pourcentage d'isolats de coliformes résistants à divers antibiotiques

On observe que les taux de résistance varient nettement d'un antibiotique à l'autre. L'Ampicilline (AMP) est l'antibiotique qui présente le taux de résistance le plus haut avec **73.68%**. Cet antibiotique est très utilisé sans limite d'usage puisqu'il appartient à la famille d'antibiotiques la plus prescrite en pratique ambulatoire, ce qui peut expliquer la présence de nombreuses souches résistantes à son égard. Cette résistance est due à la production d'une pénicillinase à bas niveau.

Le taux de résistance à l'association Amoxicilline/Acide clavulanique (AUG) est plus bas que celui de l'Ampicilline ce qui est cohérent avec l'effet de l'acide clavulanique. Cet inhibiteur de  $\beta$ -lactamases est utilisé en association avec les  $\beta$ -lactames telles l'Amoxicilline pour contrer les résistances dus à la présence de  $\beta$ -lactamases.

Les céphalosporines étudiées possèdent différents taux de résistance. La Céfazoline (KZ) présente le taux le plus élevé, à savoir **42.10%**, la Céfotaxime (CTX) a présenté un taux de résistance très faible de l'ordre de **2.63%**. Le taux élevé de résistance observé pour la Céfazoline s'explique par le fait que cet antibiotique appartient aux céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération. Celles-ci sont moins résistantes aux  $\beta$ -lactamases que les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération dont font partie la Céfotaxime.

La résistance au Céfotaxime est enzymatique; les gènes de ces enzymes proviendraient du chromosome de souches environnementales, notamment de *Kluyvera spp*, germe non pathogène

(Bonnedahl, 2009 ; Cattoir, 2008). Depuis leurs progéniteurs, les gènes ont été capturés grâce à des éléments génétiques mobiles type séquence d'insertion, ou à des phages, et transférés sur des plasmides conjugatifs qui ont ensuite diffusé parmi les entérobactéries pathogènes. Dans notre étude les espèces résistantes à cet antibiotique sont *Kluyvera spp.*, *Pantoea spp.*, *Proteus mirabilis* et *Enterobacter amnigenus*.

Malgré son utilisation récente et restreinte uniquement en milieu hospitalier, un taux de résistance de **2.63%** est retrouvé pour l'Imipenème chez *Proteus mirabilis*.

Le taux de résistance obtenu pour les antibiotiques appartenant à la classe des aminosides, c'est-à-dire la Gentamicine (CN) et l'Amikacine (AK), est relativement faible avec un pourcentage de **2.63%** pour l'Amikacine et aucune résistance observée à l'égard de la Gentamicine. L'explication possible de ce faible taux est son faible consommation, étant donné l'existence de molécules moins toxiques et plus efficaces.

Pour l'Ofloxacin appartenant aux fluoroquinolones, famille plus récente et ayant un spectre d'action plus large ; on constate que le taux de résistance est faible (**15.78%**). Comme la consommation des fluoroquinolones a considérablement augmenté ces dernières années, une augmentation de leur taux de résistance est donc à attendre dans les années à venir.

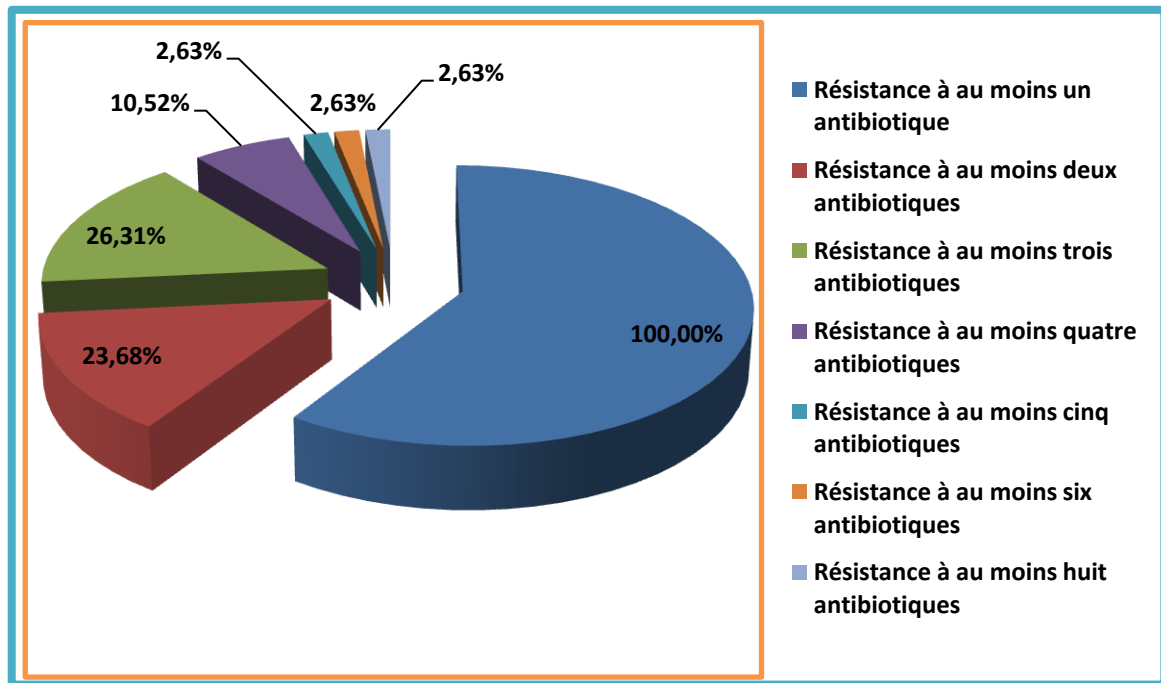
Le Sulfaméthoxazole (SXT) et la Fosfomycine (FO) font partie des antibiotiques testés présentant un taux de résistance élevé respectivement **39.47%** et **31.57%**.

La station d'épuration semble réduire la charge globale des bactéries fécales sans modifier leur profil d'antibiorésistance, elle est seulement équipée d'un traitement secondaire par boues activées, le traitement tertiaire est non fonctionnel, cette étape de traitement d'épuration est essentielle pour éliminer ces contaminants.

### **III.1.1. Multirésistance**

Notre travail a également permis d'étudier le phénomène de multi résistance. Une souche multirésistante est une souche qui présente une résistance à au moins deux antibiotiques. Les pourcentages de souches résistantes à au moins un antibiotique, à au moins deux antibiotiques, à au moins trois antibiotiques, à au moins quatre antibiotiques et à au moins cinq antibiotiques ont été calculés et rapportés dans la figure 13.

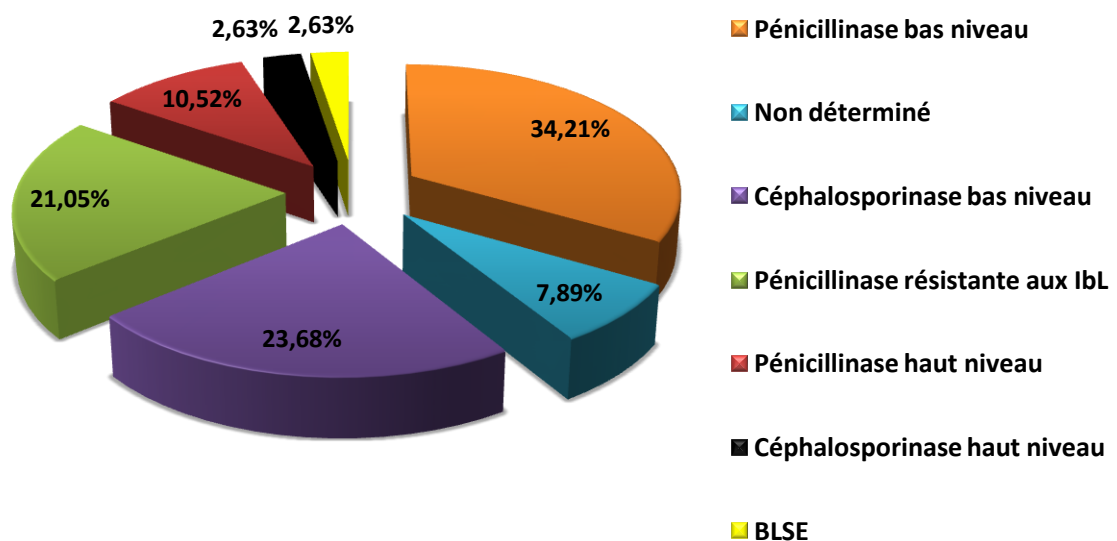
La totalité des 38 espèces des coliformes identifiées c'est-à-dire **100%** résistent à au moins un antibiotique, **23.68%** résistent à au moins deux antibiotiques, **26.31%** résistent à au moins trois antibiotiques, **10.52%** résistent à au moins quatre antibiotiques, et faible pourcentage **2.63%** de résistance à au moins cinq antibiotiques, à au moins à six antibiotiques et le même pourcentage de résistance vis-à-vis 8 antibiotiques.



**Figure 13 :** Pourcentage d’isolats des coliformes résistants à au moins 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 8 antibiotiques

### III.1.2. Distribution des principaux phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines

Sept phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines, dont un non déterminé, sont représentés dans notre étude. (Tableau XII). Celui des Pénicillines bas niveau domine dans **34.21%** des cas, suit de celui de Pénicilline résistante aux inhibiteurs des  $\beta$  lactamines et Céphalosporine bas niveau avec un pourcentage de **21.05%** et **23.68%** respectivement, **10.52%** des espèces identifiées ont une Pénicilline haut niveau. Les pourcentages obtenus pour les Céphalosporines haut niveau et BLSE sont identiques et sont de **02.63%**. **7.89%** des espèces ont des phénotypes non identifiés (Figure 14).



**Figure 14:** Répartition des principaux phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines

Tableau XII: Phénotypes et mécanismes de résistance des coliformes totaux et fécaux aux  $\beta$ -lactamines.

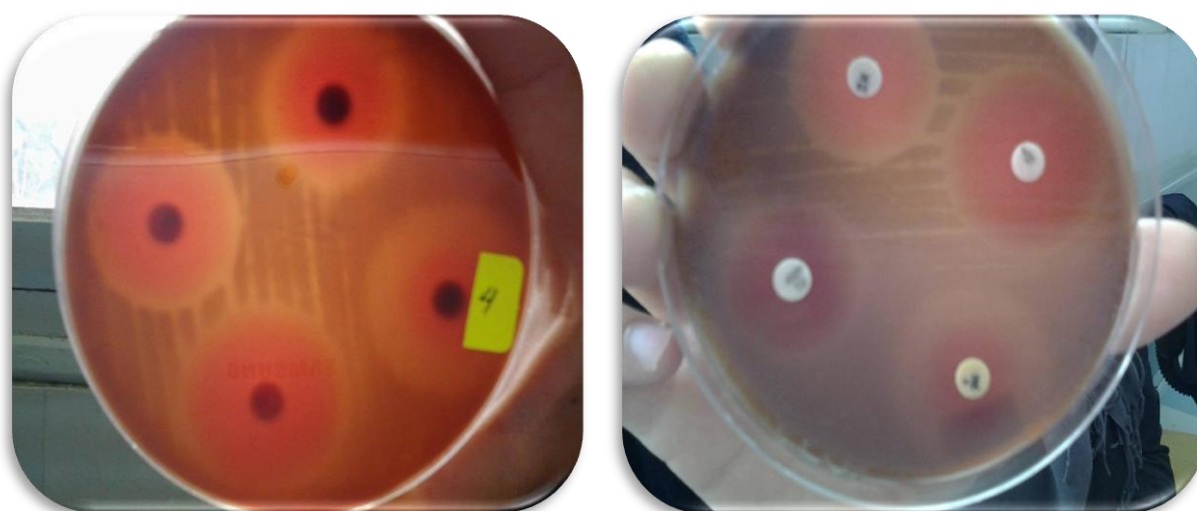
Antibiotiques marqueurs	Pénicillinase bas niveau	Pénicillinase haut niveau	Pénicillinase résistante aux I $\beta$ L	Céphalosporinase bas niveau	Céphalosporinase haut niveau	BLSE
Ampicilline AMP	R	R	R	R	R	R
Amoxicilline + Ac clavulanique AUG	S	I	R	R	R	R
Céfazoline (C1G) KZ	S	R	S	R	R	R
Céfotaxime (C3G) CTX	S	S	S	S	R	R
Nombre	13	4	8	9	1	1
Pourcentage	34.21%	10.52%	21.05%	23.68%	2.63%	2.63%

La fréquence élevée de résistance des entérobactéries aux ampicillines, amoxicilline-acide clavulanique et céphalosporines de première génération est en rapport avec la présence des bactéries ayant un phénotype de céphalosporinase naturelle (*Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*). Ces antibiotiques sont aussi les plus anciens et les plus utilisés. La résistance au Cefotaxime (céphalosporine de troisième génération) est en rapport avec le phénotype bêtalactamase à spectre élargi, phénotype exclusivement hospitalier. **Machado *et al.***, ont montré que des souches de EBLSE étaient présentes dans des échantillons d'eau prélevés dans la rivière Sousa et au niveau de la côte de Porto, au Portugal, à proximité de points de déversement d'eaux usées (**Machado *et al.*, 2009**). Dans cette même région, ainsi qu'aux abords d'un étang en République tchèque, des souches d'EBLSE ont été isolées des excréments d'oiseaux marins, ce qui montre que ces souches sont implantées dans ces écosystèmes. Plusieurs études montrent qu'il existe un lien entre les effluents des stations d'épuration et la contamination des eaux de rivière par des EBLSE. (**Laurence et Vincent, 2014**).

### III.2. Profil de résistance aux antibiotiques des entérocoques fécaux

Quelques colonies esculinase positive ont été reprises de manière aléatoire, leur résistance aux antibiotiques a été testée vis-à-vis de 8 antibiotiques déjà mentionnés. La zone entourant le disque où aucune croissance bactérienne n'est visible détermine la zone d'inhibition. Les résultats obtenus figurent sur la **photographie 15**.

On a mesuré avec précision les diamètres des zones d'inhibitions et on compare les résultats obtenus aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture (Annexe 07). On classe la bactérie dans l'une des catégories : sensible (S), intermédiaire (I) et résistante (R) (**Tableau XIII**).



**Photographie 15** : Antibiotogramme des différentes espèces des Entérocoques fécaux

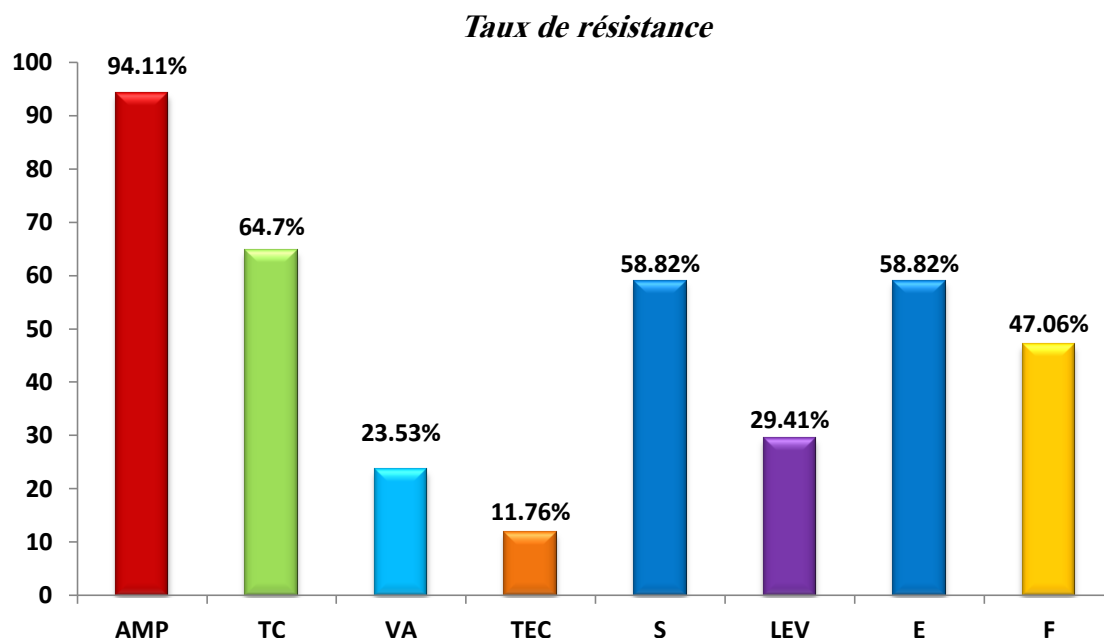
Les taux de résistance pour chaque antibiotique sont calculés, les espèces Intermédiaires étant ensuite incluses dans la catégorie R. les résultats obtenus sont regroupés dans le **tableau XIV**.

**Tableau XIII** : La résistance aux antibiotiques des Entérocoques fécaux

Souches	AMP	TC	VA	TEC	S	LEV	E	F
1	Non réussi							
2	R	R	I	S	S	I	R	R
3	R	R	I	S	I	R	R	R
4	S	R	S	S	S	S	S	I
5	Non réussi							
6	Non réussi							
7	R	S	S	S	R	S	S	R
8	R	S	S	S	R	S	S	I
9	R	S	S	S	R	S	S	S
10	R	S	I	S	R	S	S	R
11	R	R	S	S	S	S	R	S
12	R	R	S	S	R	R	R	I
13	R	R	S	S	R	R	I	R
14	R	R	S	S	S	S	I	S
15	R	S	S	I	S	S	S	S
16	R	S	S	S	S	R	S	S
17	R	R	S	I	R	R	I	S
18	R	R	I	S	S	S	I	S
19	R	R	S	S	R	S	R	S
20	R	R	S	S	R	S	R	S

**Tableau XIV**: Les taux de résistance pour chaque antibiotique

Profil de résistance ATB	% de résistance des bactéries	% de sensibilité des bactéries	% d'intermédiaire des bactéries
AMP	94.11%	5.88%	0.00%
TC	64.70%	35.29%	0.00%
VA	0.00%	70.59%	23.53%
TEC	0.00%	88.23%	11.76%
S	52.94%	41.18%	5.88%
LEV	29.41%	64.70%	0.00%
E	35.29%	41.18%	23.53%
F	29.41%	52.94%	17.65%

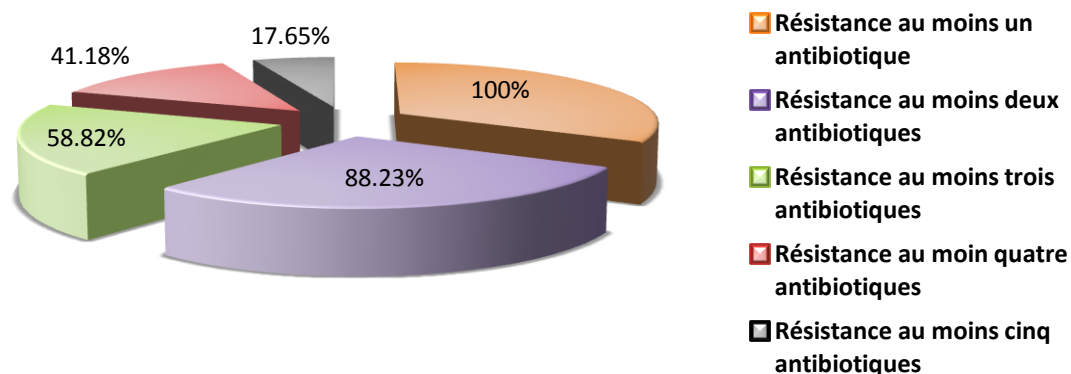


**Figure 15 :** Pourcentage d'isolats d'*Enterococcus* résistants à divers antibiotiques.

On observe que les taux de résistance varient nettement d'un antibiotique à l'autre. L'ampicilline (AMP) est l'antibiotique qui présente le plus haut taux de résistance **94.11 %**. Cet antibiotique est utilisé aussi bien en médecine humaine que vétérinaire, et ce, sans limite d'usage (il appartient à la famille d'antibiotiques la plus prescrite en pratique ambulatoire) ce qui peut expliquer la présence de nombreuses souches résistantes à son égard. Suivi de la Tétracycline (TC) avec un taux de **64.70%** elle est utilisée depuis plusieurs dizaines d'années pour le traitement des infections respiratoires des animaux et même chez les humains. Le taux de résistance des streptomycine (S) et l'érythromycine (E) est un peu élevé **58.82%** pour chacune ainsi que pour le nitrofurantoinne (**47.06%**) car elles sont largement prescrites dans différentes infections. Pour la levofloxacin (LEV), la vancomycine (VA) et la teicoplanine (TEC) qui présentent les taux de résistance **29.41%**, **23.53%** et **11.76%** respectivement, sont les taux les plus faibles car ils sont moins indiqués que les autres antibiotiques.

### III.2.1. Multirésistance

On a étudié ce phénomène de multirésistance, les pourcentages de souches résistantes à au moins un antibiotique, à au moins deux antibiotiques, à au moins trois antibiotiques, à au moins quatre antibiotiques et à au moins cinq antibiotiques, ont été calculés et rapportés dans la **figure17**. La totalité des espèces d'entérocoques c'est-à-dire **100%** résistent à au moins un antibiotique, **88.23%** résistent à au moins deux antibiotiques, **85.82%** résistent à au moins trois antibiotiques, **41.18%** résistent à au moins quatre antibiotiques et faible pourcentage **17.65%** de résistance à au moins cinq antibiotique.



**Figure 16 :** Pourcentage d'isolats des entérocoques résistants à au moins 1, 2, 3, 4 et 5 antibiotiques.

Cette analyse montre aussi les mêmes tendances que pour les coliformes fécaux. Les eaux du site d'étude présente des isolats résistants à au moins un, deux, trois, quatre et cinq antibiotiques. Plusieurs études montrent qu'il existe un lien entre les effluents des stations d'épuration et la contamination des eaux de rivière par les entérocoques intestinaux. (Laurence et Vincent, 2014).

# **Conclusion et perspectives**

## **Conclusion et perspectives**

Ce travail s'inscrit dans la problématique de l'étude de la présence de bactéries d'origine fécale résistantes aux antibiotiques dans les eaux de surface au niveau de la wilaya de Khenchela, de manière à mettre en évidence leur présence dans ce milieu et de les caractériser. Pour cela nous avons choisit Oued Baghai comme site d'étude, l'eau de cet Oued est largement utilisée par les habitants pour l'irrigation de leur culture et l'élevage des animaux, il est continuellement alimenté par les eaux usées traitées par la station d'épuration urbaine.

Les résultats de notre étude ont révélé la présence des bactéries fécales en concentration élevée dans les eaux de Oued Baghai, les espèces identifiées appartiennent majoritairement à l'espèce *Escherichia coli* qui est l'espèce la plus répandue de la flore intestinale suivit de *Klebsiella ornithinolytica* et quelques espèces de *Kluyvera spp* et de *Pantoea spp* qui sont des bactéries environnementales.

Les résultats de l'étude de leur profil de résistance aux antibiotiques sont inquiétants, absence de phénotype sauvage, beaucoup de résistances acquises et plusieurs bactéries multirésistances surtout aux bêtalactamines ainsi que l'apparition de résistances préoccupantes .aux céphalosporines de troisième génération et aux carbapénèmes.

Les résultats obtenus montrent aussi que l'épuration de l'eau au niveau de la station est incomplète et insuffisante parce que l'Oued est le récepteur final des eaux usées urbaines de la ville de Khenchela après traitement et ces eaux sont utilisées par les habitants résidants le long du parcours de cet Oued dans diverses activités quotidiennes donc il faut reprendre en considération la politique et les protocoles pris par la station, toutefois des prélèvements complémentaires, sur ce même site avec des études similaires de celles-ci complèteraient utilement cette approche.

La portée de ces résultats, qui corroborent en grande partie ceux d'autres études, doit toutefois être complétée par d'autres échantillonnages prospectant le même site et d'autres sites judicieusement choisis. Ainsi dans nos perspectives d'avenir il nous semble intéressant de compléter utilement cette approche par :

- La réalisation de nouveaux prélèvements complémentaires sur ce site et d'autres points plus ou moins espacés en aval et en amont pour valider nos premiers résultats.
- Réaliser l'ensemble de la caractérisation détaillée microbiologique sur tous les échantillons.
- Effectuer une comparaison du profil microbiologique obtenu entre ces différents points et surtout du profil de résistance des germes.

- Etendre notre travail à l'étude des risques potentiels engendrés par ces eaux d'une part sur l'homme par le risque infectieux lié à l'existence des microorganismes pathogènes multirésistants ayant un potentiel de transfert horizontal de gène. Et d'autre part évaluer ces risques sur l'environnement et la probabilité de sa contamination, afin d'aider à l'adaptation d'une stratégie de traitement des eaux visant à améliorer sa qualité selon les normes requises.
- Effectuer une campagne de prévention pour les habitants de la wilaya et particulièrement ceux résidants de part et d'autre de OUED BAGHAI et qui utilisent dans leur quotidien les eaux de cette source pour l'irrigation de leurs cultures maraichères et pour l'élevage des animaux.

La prolifération des souches résistantes dans l'environnement est une inquiétude publique, il faut y remédier en mobilisant toute source humaine et financière. Il faut poursuivre la recherche pour garder une longueur d'avance sur les bactéries qui ne cessent de s'adapter et de développer de nouvelles défenses : leur dissémination en environnement aquatique en est une preuve.

**Références**

**Bibliographiques**

## Références Bibliographiques

1. **Abnave P., Mottola G., Gimenez G., Boucherit N., Trouplin V., Torre C., Conti F., Ben Amara A., Lepolard C., Djian B., Hamaoui D., Mettouchi A., Kumar A., Pagnotta S., Bonatti S., Lepidi H., Salvetti A., Abi-Rached L., Lemichez E., Mege J.L. & Ghigo E., 2014.** Screening in Planarians Identifies MORN2 as a Key Component in LC3-Associated Phagocytosis and Resistance to Bacterial Infection. *Cell Host and Microbe*.
2. **Aboukacem A., Chahlaoui A., Soulaymani A., Rhazi-Filali F. et Benali D., 2007.** Etude comparative de la qualité bactériologique des eaux des Oueds Boufekrane et Ouislane à la traversée de la ville de Meknès (Maroc), *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* N°1, 10-22p.
3. **Agence Française de normalisation (AFNOR), 1990.** Eaux : méthodes d'essai ; recueil de normes françaises AFNOR, Paris.
4. **Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), 2006.** Analyse des mécanismes qui aboutissent à la présence de bactéries antibiorésistantes dans les eaux – éléments d'évaluation des risques.
5. **Aminov R.I., 2011.** Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Front. Microbiol.* 2, 158p.
6. **Baquero F., Martínez J-L. & Cantón R., 2008.** Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 260–265p.
7. **Baudry C. et Brezellec H., 2006.** Microbiologie-immunologie, exercices d'application. 2ème édition Wolters Kluwer France, 125p.
8. **Bellaoui N., Belabbes H., Lahsoune M. et El Mdagrhri N., 2009.** Bactériémies à *Kluyvera* : à propos d'une épidémie dans un CHU au Maroc. *Médecine et maladies infectieuses* 39 :133–135p.
9. **Bibbal Delphine, 2006.** L'impact des betalactamines sur l'émergence des entérobactéries résistantes dans la flore digestive chez le porc : caractérisation et stratégie de prévention. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse, 32p
10. **Bio-Mérieux, 2009.** Catalogue Analytique API 20 E. Système d'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux (Réf. 20100/20160). biomérieux.52p.
11. **Blanco G. & Lemus J.A., 2009.** Microbial pollution in wild life: linking agricultural maturing and bacterial antibiotic resistance in red-billed choughs. *Environmental research*, 109, 405-412p.
12. **Bonnedahl J., Drobni M., Gauthier-Clerc M., Hernandez J., Granholm S., Kayser Y., Melhus A., Kahkmeter G., Waldenström J., Johansson A., Olsen B., 2009.** Dissemination of *Escherichia coli* with CTX-M type ESBL between, humans and yellow-legged Gulls in the south of France, *Plos One*, 4,6, 6 p.
13. **Bornert G., 1998.** Les micro-organismes indicateurs de contamination fécale de l'eau et des aliments. 727-738p.
14. **Cambau E., 1996.** Résistance aux quinolones. *Méd. & Thérapeutique*, 98-107p.
15. **Cattoir V., 2008.** Les nouvelles bêta-lactamses à spectre étendu (BLSE), *Pathologie infectieuse en réanimation*, 203-209p.
16. **Cavallo D., Fabre R., Jehl F., Rapp C., Garrabé E. (2004).** Bêtalactamines. *EM Consulte. Maladies infectieuses* 1:129-202.

17. **Centre Régional pour l'Eau Potable et l'Assainissement À Faible Coût (CREPA), 2007.** Contrôle et suivi de la qualité des eaux usées protocole de détermination des paramètres physico-chimiques et bactériologiques. Centre collaborant de l'OMS, 42p.
18. **Chahlaoui A., 1996.** Etude Hydro-biologique de l'oued Boufekrane (Meknès), Impact sur l'environnement et la santé. Thèse de Doctorat en microbiologie, Université de Meknès, Maroc. 234p.
19. **Chenouf A., Nafti Y., 2008.** Contribution à l'étude de la cinétique de libération d'un principe actif: Oxacilline sodique encapsulé en vue de déterminer les conditions de conservation. Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en Biologie. Université de Djelfa, 13-20p.
20. **Chorfi K., 2012.** Etude microbiologique des effluents hospitaliers de la wilaya de Khenchela (Cas de l'établissement hospitalier 120 lits). Thèse de Magistère. Université Abbés Laghrour Khenchela. 12-48p.
21. **Corvaglia Anna Rita, 2006.** Rôle des résidus d'antibiotiques dans l'environnement hydrique sur la sélection et la diffusion de bactéries résistantes des genres "*Aeromonas*", "*Acinetobacter*" et "*Legionella*". Thèse de Doctorat. Université de Genève, 19-22p.
22. **Davies J. & Davies D., 2010.** Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74: 417-433p.
23. **Delarras C., 2007.** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Tec & Toc, Lavoisier. 476p.
24. **Delery Laure, 1999.** Antibiorésistances bactérienne dans l'eau : problématique de la transmission de l'animal à l'homme. Mémoire de formation des ingénieurs du génie sanitaire. Ecole nationale de la santé publique, 15-29p.
25. **DeNap J.C. & Hergenrother P.J., 2005.** Bacterial death comes full circle: targeting plasmid replication in drug-resistant bacteria. *Organic & Biomolecular Chemistry* 3: 959-966p.
26. **Douard G., 2011.** Mécanismes moléculaires impliqués dans le transfert horizontal de l'îlot génomique de multi-résistance aux antibiotiques *Salmonella* genomic island 1. Thèse pour obtenir le grade de : Docteur. Université François – Rabelais, 20p.
27. **El Addouli J., Chahlaoui A., Berrahou A., Chafi A., Ennabili A. et Karrouch L., 2009.** Influence des eaux usées, utilisées en irrigation, sur la qualité des eaux de l'oued Bouishak – région de Meknès (centre-sud du Maroc), *Microbiol. Ind. San. et Environn.*, Vol. 3 (1), 56-75p.
28. **Fajardo A., Martinez-Martin N., Mercadillo M., Galan J.C., Ghysels B., Matthijs S., Cornelis P., Wiehlmann L., Tummler B., Baquero F. & Martinez J.L., 2008.** The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PLoS One* 3: e1619p.
29. **Forsberg K.J., Reyes A., Wang B., Selleck E.M., Sommer M.O.A., & Dantas G., 2012.** The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science* 337, 1107–1111p.
30. **Garcia-Armisen T. et Servais P., 2007.** Respective contributions of point and non-point sources of *E. coli* and *Enterococci* in a large urbanized watershed (the Seine River, France). *J. Environ. Manage.*, 82, 512–518p.
31. **Guessennd N.K., 2013.** Étude des bactéries multi-résistantes des effluents hospitaliers de la ville d'Abidjan (Cote d'Ivoire). *Journal of Applied Biosciences* 69:5456 – 5464. 5457p.
32. **Hamaidi F. & Hamaidi M.S., 2009.** Recherche des indicateurs bactériens de contamination fécale dans les eaux du barrage de Lakhel (Bouira Algérie), *Microbiol. Ind. San. et Environn.*, Vol. 3, (1), 76-95p.

33. **Hamid Bou Saab, Nadine Nassif, Antione G., El Samrani, Rosette Daoud, Samir Medawar et Naim Ouaini, 2007.** Suivi de la qualité bactériologique des eaux de surface (rivière Nahr Ibrahim, Liban). *Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science*, vol. 20, n° 4, 341-352p.
34. **Hawkey P.M., 2008.** The growing burden of antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 62 Suppl 1: 1-9p.
35. **Kenny Oberle, 2012.** Devenir des antibiotiques et des populations d'*Escherichia coli* et d'*Enterococcus spp* dans les hydro-systèmes de surface. Thèse de Doctorat de l'université de Rouen, 18-20p.
36. **Khachatourians G.G., 1998.** Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. 1129-36p.
37. **Kümmerer K., 2009.** Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II. *Chemosphere*, 75, 435-441p.
38. **Lebres Hadj Ahmed, 2008.** Cours d'hygiène et de microbiologie de l'eau. Institut Pasteur d'Algérie, 60 p.
39. **Laurent Gutmann, Service de microbiologie de l'Hôpital Européen Georges Pompidou, 2013.** Unité 872 Inserm/UPMC/Université Paris Descartes.
40. **Mesaros N., Van Bambeke FR., Glupczynski Y., Vanhoof R. et Tulken PM., 2005.** l'efflux des antibiotiques: un mécanisme ubiquitaire conduisant à la résistance. *État de la question et implications microbiologiques et cliniques. Louvain Med.* 124: 308-320p.
41. **Meyer A., Deiana J. et Bernard Z., 2004.** Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. 2<sup>ème</sup> édition. Paris, 285p.
42. **Ministère du Développement durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs (MDDEFP), 2013.** Guide pour l'évaluation de la qualité bactériologique de l'eau en lac, Québec, vol 30 p.
43. **Moussa Moumouni Hamsatou, 2005.** les eaux résiduaires des tanneries et des teintureries : caractéristiques physico-chimiques et bactériologiques et impact sur les eaux de surface et les eaux souterraines, Thèse de Doctorat. Université de Bamako. 45p.
44. **Ndiaye Adja, 2005.** Les entérobactéries sécrétrices des béta-lactamases à spectre élargi, thèse de doctorat en pharmacie. Université Cheikh Antra Diop de Dakar. 39-41p.
45. **Office National d'Assainissement (O.N.A), 2011.** Canevas type pour l'élaboration des bilans d'exploitation de l'année 2011. Ministère des Ressources Humaines. 24p.
46. **Organisation Mondiale de la Santé, 2000.** Overcoming Antimicrobial Resistance. World Health Organization Report in Infectious Diseases. <http://www.who.int/infectiousdisease-report/2000/index.html>, consulté le 29/03/15
47. **Organisation mondiale de la santé, 2002.** L'utilisation des antimicrobiens en dehors de la médecine humaine et les résistances qui en résultent chez l'homme. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs268/fr/index.html>.
48. **Paquet-Bouchard Carine, 2006.** Caractérisation moléculaire de la protéine antibiotique P1 du phage AP205. Maître ès sciences (M.Sc.). Maîtrise en microbiologie-immunologie. Université Laval.
49. **Parveau Pierre, 2011.** Bactéries multi-résistantes dans l'environnement : recherche dans les effluents de la ville de Toulouse. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Limoges, 78-86p.

- 50. Pierre Servais, 1999.** Contamination virale et bactérienne. Université libre de Bruxelles, groupe de microbiologie des milieux aquatiques. 5p.
- 51. Poirel L., Kämpfer P. & Nordmann P., 2002.** Chromosome-encoded Ambler class A betalactamases of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 4038–4040p.
- 52. Rejsek Frank, 2002.** Analyses des eaux aspect réglementaire et technique. Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine. 148p.
- 53. Rhodes G., Huys G., Swings J., McGann P., Hiney M., Smith P. & Pickup R.W., 2000.** Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant tet A. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3883-3890p.
- 54. Rodier J., 2009.** L'analyse de l'eau. 9ème édition DUNOD, Paris, 1526 p.
- 55. Schwarz S., Kehrenberg C. & Walsh T.R., 2001.** Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International Journal of Antimicrobial Agents* 17: 431-437p.
- 56. Servais P. & Passerat J., 2009.** Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine River watershed (France). *Science of the Total Environment*, 408, 365-372p.
- 57. Soude S.G.A.A., 2005.** Bactéries isolées des hémocultures au laboratoire du centre national hospitalier et universitaire Hubert Koutoukou Maga De Cotonou. Thèse pour l'obtention du grade de Docteur en pharmacie diplôme d'état. République du Mali, université de Bamako, faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie, 22p.
- 58. Souna Djahida, 2011.** Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries au niveau du C.H.U de Sidi Bel Abbes. Thèse de Magistère. Université de Tlemcen, 19-20p.
- 59. Stalder Thibault, 2012.** Implication des effluents d'activités hospitalières et de la filière carnée sur la dissémination de l'antibiorésistance : dynamique des intégrons de l'émission au rejet. Thèse de Doctorat. Université de Limoges.16-38p.
- 60. Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS. 2005.** 4<sup>ème</sup> édition.
- 61. Stéphanie Faure, 2009.** Transfert d'un gène de résistance aux  $\beta$ -lactamines blaCTX-M-9 entre *Salmonella* et les entérobactéries de la flore intestinale humaine : impact d'une antibiothérapie. Thèse pour obtenir le grade de Docteur. Université de Rennes 1, 42-89p.
- 62. Verhoef J., Jansen W.T.M., Van der Bruggen J.T. & Fluit A.C., 2004.** A general introduction to the field of antimicrobials and antimicrobial resistance: the past and the present in Resistance: a sensitive issue, *The European roadmap to combat antimicrobial resistance*, 21-29, 206p.
- 63. Vounba Passoret, 2012.** Prévalence des gènes de virulence et d'antibiorésistance des *Escherichia coli* dans les fermes de poulets de chair de la zone périurbaine de Dakar (Sénégal). Mémoire de diplôme de Master en Santé Publique Vétérinaire, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, 19p.
- 64. Wright G. D., 2007.** The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 175–186p.
- 65. Zoumahon P-N., 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, 8p.

**Sites web :**

**Dictionnaire:** <http://www.aquaportail.com/definition-6139-eaude-surface.html#ixzz3MMuCWjTa>

**Glossaire DCE :** <http://www.hydrologie.org/LOI/GlossaireDCE.pdf>

# **Annexes**

## Annexe 01. Composition des milieux de culture

### Gélose au T.T.C. et au Tergitol 7

La Gélose au T.T.C. et Tergitol 7 est utilisée pour l'isolement et le dénombrement des coliformes et des coliformes thermotolérants dans les eaux.

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

Peptone .....	10,00	Agar.....	10,00
Extrait de levure.....	6,00	pH final à 25°C :	7,2 ± 0,2
Extrait de viande.....	5,00	Le milieu en flacons se conserve à	
Lactose.....	20,00	l'obscurité entre	
Tergitol 7.....	0,10	15 et 25°C jusqu'à la date d'expiration	
Bleu de bromothymol.....	0,05	indiquée sur l'emballage.	

### Bouillon Sélénite Cystine

Le bouillon Sélénite Cystine est utilisé pour l'enrichissement sélectif de *Salmonella* dans les selles ou les denrées alimentaires. Il est recommandé par l'AOAC et la Pharmacopée Américaine.

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

Tryptone.....	5,00	pH final à 25°C :	7,0 ± 0,2
Lactose.....	4,00	Le milieu en flacons ou en tubes se conserve	
Sélénite acide de sodium.....	4,00	à l'obscurité entre 2 et 8°C jusqu'à la date	
Phosphate disodique.....	10,00	d'expiration indiquée sur l'emballage.	
L-cystine.....	0,01		

### Gélose *Salmonella-Shigella* (S.S.)

La gélose *Salmonella-Shigella* (S.S.) est utilisée pour l'isolement sélectif des *Salmonella* et des *Shigella* dans les prélèvements cliniques (selles) et les denrées alimentaires.

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

Protéase peptone.....	5,00	Sels biliaires N° 3.....	8,50
Citrate ferrique ammoniacal.....	1,00	Vert brillant.....	0,00033
Extrait de viande de bœuf.....	5,00	Citrate de sodium.....	8,50
Thiosulfate de sodium.....	8,50	Agar.....	13,50
Lactose.....	10,00		
Rouge neutre.....	0,025		

pH final à 25°C :  $7,0 \pm 0,2$

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

### **Gélose Hektoen**

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

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

Peptone .....	1.2 ,00	Lactose.....	1. 2,00
Chlorure de sodium.....	5,00	Bleu de bromothymol.....	0,065
Extrait de levure.....	3., 00	Saccharose.....	1. 2,00
Thiosulfate de sodium.....	5,00	Fuchsine acide.....	0,10
Sels biliaries N° 3.....	9. ,00	Salicine.....	2. ,00
Citrate ferrique ammoniacal.....	1,50	Agar.....	14,00

Ph final à 25°C :  $7,5 \pm 0,2$

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

### **Gélose de SLANETZ et BARTLEY (base)**

La Gélose de Slanetz et Bartley est utilisée pour l'isolement et le dénombrement des entérocoques dans les eaux, les denrées alimentaires et autres types de prélèvements par la technique de membranes filtrantes ou isolement sur boîtes de Pétri .

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

Tryptone.....	20,00	Agar.....	10,00
Extrait de levure.....	5,00	pH final à 25°C : $7,2 \pm 0,2$	
Glucose.....	2,00	Le milieu en flacons se conserve entre 2 et	
Phosphate dipotassique.....	4,00	8°C à l'obscurité jusqu'à la date d'expiration	
Azide de sodium.....	0,40	indiquée sur l'emballage.	

### **Supplément SLANETZ**

Ce produit est destiné à être utilisé avec la gélose de Slanetz et Bartley (base), pour le dénombrement des entérocoques dans les eaux d'alimentation, les boissons, les eaux usées et divers produits biologiques; aussi bien par la technique de filtration sur membranes que par la méthode classique de numération en boîtes de Pétri. Le supplément est constitué par du chlorure

de 2,3,5- triphényltétrazolium. Les entérocoques le réduisent en un formazan insoluble à l'intérieur de la cellule. Cette réaction se manifeste par l'apparition de colonies de couleur rouge à marron.

Ingrédients (pour un flacon)

Triphényltétrazolium (chlorure).....**50 mg**

#### **Gélose Bile-Esculine-Azide (BEA)**

La Gélose Bile-Esculine-Azide est un milieu sélectif pour l'isolement et la numération des Entérocoques dans les produits pathologiques et les eaux. Les Entérocoques développent de petites colonies translucides entourées d'un halo noir, témoignant de l'hydrolyse de l'esculine.

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

Peptone.....	<b>3,00</b>	Azide de sodium.....	<b>0,15</b>
Esculine.....	<b>1,00</b>	Bile de boeuf.....	<b>10,00</b>
Peptone de caséine.....	<b>17,00</b>	Chlorure de sodium .....	<b>5,00</b>
Citrate ferrique ammoniacal .....	<b>0,5</b>	Agar.....	<b>15,00</b>
Extrait de levure.....	<b>5,00</b>		

pH final à 25°C : 7,1 ± 0,2

Le milieu en tubes, flacons ou boîtes se conserve entre 15 et 25°C.

#### **Gélose Mueller Hinton**

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

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

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

Infusion de boeuf.....	300,00
Peptone de caséine.....	17,50
Amidon.....	1,50
Agar.....	17,00

pH final à 25°C : 7,3 ± 0,2

Le milieu en flacons ou boîtes se conserve entre 2 et 8°C.

Annexe 02. Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 E

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultat	
			Négatif	Positif
ONPG	Ortho-nitro-phenyl-galactosidase	$\beta$ galactosidase	Incolore	jaune
ADH	Arginine	Arginine déshydrogénase	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/ bleu
H <sub>2</sub> S	Thiosulfate de sodium	Production d'H <sub>2</sub> S	Incolore/ grisâtre	Dépôt noir/fin liseré
UREE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orangé
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	<b>TDA Immédiat</b>	
			Jaune	Marron foncé
IND	Tryptophane	Production d'indole	<b>IND 2 min max</b>	
			Jaune	Anneau rouge
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	<b>VP1 + VP2 10 min</b>	
			Incolore	Rose/ rouge
GEL	Gélatine de Kohn	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	D-Glucose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MAN	D-Mannitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SOR	D-Sorbitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
RHA	L-Rhamanose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SAC	D-Saccharose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MEL	D-Melibiose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
ARA	L-Arabinose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
OX	Sur papier filtre	Cytochrome oxydase	<b>Disques d'Ox / 5-10 min</b>	
			Incolore	Coloration violette

**Annexe 03. Composition des additifs****Kovacs**

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

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

P-Diméthylaminobenzaldéhyde.....	5,00 g
Alcool amylique.....	75,00 ml
Acide chlorhydrique pur.....	25,00 ml

Conserver en flacon ambré entre 2 et 8°C.

**Réactif de Voges – Proskauer 1 et 2**

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

**VP1 :** Soude caustique (NaOH)

**VP2 :** Alpha naphthol.

**Réactif TDA**

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

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

## Annexe 04 : Interface du logiciel d'identification API Excel.

The screenshot shows the API Excel software interface. The main window displays a spreadsheet with the following data:

API 20E	Taxon le plus probable	probabilité
Escherichia coli 1	Excellente Id	0,998
T	0,93	

Below the main data, there is a list of taxons with their corresponding ONPG values:

ONPG	+	-
ONPG	+	-
ADH	-	-
LDC	+	-
ODC	-	-
CIT	-	-
H2S	-	-
URE	-	-
TDA	-	-
IND	+	-
VP	-	-
GEL	-	-
GLU	+	-
MAN	+	-
INO	-	-
SOR	+	-
RHA	+	-
SAC	-	-
MEL	+	-
AMY	-	-
ARA	+	-
OX	-	-

Callouts in the image provide additional information:

- Taxon le plus probable:** Points to the 'Escherichia coli 1' cell.
- test de l'identification en fonction de l'indice de typicité:** Points to the '0,998' probability cell.
- Rappel de la valeur de l'indice de typicité:** Points to the '0,93' cell.
- rappel de la probabilité du taxon:** Points to the '0,998' probability cell.
- Zone d'introduction des données:** Points to the list of taxons.

The bottom of the window shows a navigation bar with various API test modules: Introduction, API 20 E 4.0, API 10 S 3.0, API 10E, API20 NE 6, API20 Strepto 6.0, ID 32 Staph 2.0, API Staph 4.0, listeria, Rapid20E, and Prêt.

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

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

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

**Annexe 06. Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Entérobactéries*.**

Conditions du test :

Incubation : 37°C, atmosphère ordinaire,

Milieu : Mueller Hinton.

18 à 24h

Inoculum : Colonies en suspension, 0.5

Control de qualité : *Escherichia coli*

Mc Farland.

ATCC 25922

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)	
		Résistant	Intermédiaire	Sensible	Résistant	Sensible
<b>βlactamines :</b> Ampicilline	10µg	≤13	14-16	≥17	≥32	≤8
Amoxicilline + Ac. clavulanique	20/10µg	≤13	14-17	≥18	≥32/16	≤8/4
Céfazoline	30µg	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8
Céfoxitine	30µg	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8
Céfotaxime	30µg	≤14	15-22	≥23	≥64	≤8
Ceftriaxone	30µg	≤13	14-20	≥21	≥64	≤8
Imipenème	10µg	≤13	14-15	≥16	≥16	≤4
<b>Aminosides :</b> Amikacine	30µg	≤14	15-16	≥17	≥32	≤16
Gentamicine	10µg	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4
<b>Quinolones :</b> Ofloxacine	5µg	≤12	13-15	≥16	≥8	≤2
Ciprofloxacine	5µg	≤15	16-20	≥20	≥4	≤1
<b>Autres :</b> Chloramphénicol	30µg	≤12	13-17	≥18	≥32	≤8
Furanes	300µg	≤14	15-16	≥17	≥128	≤32
Fosfomycine	200µg	≤12	13-15	≥16	≥256	≤64
Triméthoprime/ Sulfaméthoxazole	1.25/23.75µg	≤10	11-15	≥16	≥8/152	≤2/38

Tableau extrait à partir de standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS 4eme édition 2005

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

**Conditions du test :**

**Milieu : Mueller Hinton**

**Control de qualité :**

**Inoculum : Colonies en suspension, 0.5**

***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

**Mc Farland.**

***Enterococcus faecalis* ATCC29212**

**Incubation : 37°C, atmosphère riche en**

**CO<sub>2</sub>, 18 à 24h**

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)	
		Résistant	Intermédiaire	Sensible	Résistant	Sensible
<b>βlactamines :</b> Ampicilline	10µg	≤16	---	≥17	≥16	≤8
<b>Cyclines :</b> Tétracycline	30µg	≤14	15-18	≥19	≥16	≤4
<b>Glycopeptides :</b> Vancomycine****	30µg	≤14	15-16	≥17	≥32	≤4
Teicoplanine	30µg	≤10	11-13	≥14	≥32	≤8
<b>Aminosides:</b> Gentamicine HN**	120µg	≤6	7-9	≥10	>500	≤500
Streptomycine HN***	300µg	≤6	7-9	≥10	----	----
<b>Fluoroquinolones :</b> Levofloxacin	5µg	≤13	14-16	≥17	≥8	≤2
<b>Autres :</b> Erythromycine	15µg	≤13	14-22	≥23	≥8	≤0.5
Furanes	300µg	≤14	15-19	≥17	≥128	≤32
Clindamycine*****	2UI	<14	----	>14	>2	≤2

**Tableau extrait à partir de standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS 4eme édition 2005**

\*\* : Haut niveau de résistance.

\*\*\* : CMI par méthode de dilution en milieu liquide : résistant >1000µg/ml et CMI en milieu solide : résistant >2000µg/ml.

\*\*\*\* : Incuber pendant 24h.

\*\*\*\*\* : Valeurs critiques prises du communiqué CA-SFM 2005 (dilution de la suspension bactérienne au 1/100ème).

**Annexe 08: Composition des colorants de gram****Cristal violet ou violet de gentiane****Solution mère A**

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

**Solution mère B**

Oxalate d'Ammonium.....**5 g**  
 Eau Distillée.....**500 ml**

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

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

Mélanger 100 ml de solution A avec 400 ml de solution B. Conserver dans un flacon brun.

**Fuchsine****Fuchsine mère saturée**

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

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

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

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

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

**Fuchsine (solution de travail)**

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

**Conservation** : Au moins 2 ans.

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

C'est à la fois un colorant et un liquide de mordantage (qu'on appelle mordant), qui permet une coloration indirecte : cela signifie qu'il prépare l'objet à colorer à recevoir un autre colorant. Il provoque une combinaison chimique entre deux corps qui n'ont au départ aucune affinité chimique l'un pour l'autre. Il se forme entre le tissu à colorer, le mordant et le colorant, une triple combinaison colorée suffisamment stable pour résister aux agents de décoloration (acides, alcools, eau).

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

**Conservation** : non filtré : 3 mois. Le Lugol doit avoir une coloration brun rouge.

**Alcool Éthylique Ou Éthanol**

Alcool primaire, liquide incolore, d'odeur agréable, miscible à l'eau en toutes proportions, miscible à de nombreux solvants organiques, l'éthanol ou alcool éthylique,  $\text{CH}_3\text{—CH}_2\text{OH}$ ,

## Annexe 09. Phénotypes de résistance des entérobactéries aux $\beta$ -lactamines

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

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

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

### Resistances acquises des entérobactéries aux B-lactamines

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

Antibiotiques marqueurs	Pénicillinase bas niveau	Pénicillinase haut niveau	Pénicillinase résistante aux I $\beta$ L	Céphalosporinase bas niveau	Céphalosporinase haut niveau	BLSE1
Amoxicilline (AMX) Aminopénicilline	R	R	R	R	R	R
Amoxicilline + Ac.clavulanique (AMC) Aminopénicilline + I $\beta$ L	S	I/R	R	R2	R2	R3
Ticarcilline (TIC) Carboxypénicilline	R	R	R	S	R	R
Mécillinam (MEC) Aminidopénicilline	S	R	R	S	S	R
Céfalotine (CF) (C1G)	S	R	S	R	R	R
Ceftazidime (CTX) (C3G)	S	S	S	S	R	R4 ou synergie

1 : BLSE :  $\beta$ -lactamase à spectre élargie.

2 : I $\beta$ L : les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases n'inhibent pas les céphalosporinase (les céphalosporinases sont néanmoins des  $\beta$ -lactamases)

3 : Souche résistante parfois intermédiaire, dans tous les cas le diamètre d'inhibition pour l'AMC est supérieur à celui de l'AMX.

4 : Certaines BLSE peuvent donner un profil intermédiaire ou sensible avec une C3G. La mise en évidence d'une synergie entre l'acide clavulanique (du disque AMC) et la C3G permettent de conclure à la présence d'une BLSE.

Chez les entérobactéries on rencontre des BLSE chez *Klebsiella pneumoniae* et plus rarement chez *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Escherichia coli*.

## **Annexes 10. Matériel et réactifs utilisés**

### **Matériel et appareillages**

- Bec bunsen.
- Portoir pour tubes à essai.
- Pipettes Pasteur stériles.
- des flacons de 1000ml.
- Bain marie.
- Boîtes de pétri.
- Marqueur.
- Des lames.
- Anse de platine.
- Etuve électrique.
- Microscope optique.
- Pince.

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

- Eau physiologique stérile.
- Gélose Tergitol 7 +TTC.
- Gélose SS.
- Gélose Slanetz et Bartley.
- Gélose BEA.
- Gélose Hektoen.
- Gélose Mueller Hinton.
- Disques d'antibiotiques.
- Réactif Kovacs.
- Réactif TDA.
- Réactif de Voges – Proskauer 1et 2.

### **Colorants de Gram**

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

# Résumés

## **Identification et antibiorésistance des bactéries fécales présentes dans les eaux de surface d'Oued BAGHAI (Wilaya de Khenchela).**

### **Résumé**

La dissémination de souches bactériennes résistantes dans l'environnement naturel peut avoir des conséquences non négligeables sur la santé publique et sur les milieux écologiques. Les écosystèmes aquatiques pourraient jouer un rôle clé dans le transfert horizontal des gènes de résistance aux antibiotiques entre communautés bactériennes, voire constituer une voie de retour à l'homme.

Le but de ce travail est de faire un état des lieux sur le niveau de contamination en bactéries fécales antibiorésistantes dans les eaux superficielles de Oued Baghai.

Pour cela Nous avons mené une étude microbiologique des eaux d'Oued BAGHAI de la wilaya de Khenchela pendant le mois de Mars en utilisant des méthodes normalisées pour l'isolement et l'identification des microorganismes. L'analyse effectuée a portée principalement sur la quantification des bactéries indicatrices de contamination fécale à savoir les coliformes totaux, les coliformes thermotolérants et les entérocoques fécaux, la détermination des profils de résistance à quelques antibiotiques fréquents a nécessité la réalisation d'antibiogrammes par la méthode de diffusion en milieu gélosé par écouvillonnage.

Les résultats obtenus montrent la présence d'une contamination fécale importante surtout par *Escherichia coli*, en plus d'autres espèces cliniques et environnementales. Les résultats de l'antibiogramme montrent que les bactéries présentent des profils variables de résistance aux antibiotiques. Les bactéries testées montrent une résistance majoritaire pour les beta-lactamines utilisés. Elles présentent des résistances acquises concernant plusieurs antibiotiques habituellement actifs. Ceci peut engendrer un échec thérapeutique pour les infections causées par ces bactéries multirésistantes.

La dissémination de cette résistance en l'environnement pose des problèmes sanitaires et écologiques redoutables et effrayantes à l'échelle mondiale.

**Mots clés :** Bactéries fécales, coliformes totaux, coliformes fécaux, Entérocoques fécaux, antibiorésistance, eaux de surface.

## **Identification and antimicrobial resistance of fecal bacteria in Oued BAGHAI surface water (the province of Khenchela).**

### **Abstract**

In recent years, enterobacteria supplanted Gram-positive rate in terms of resistance to antibiotics in ambulatory practice. This change, which affects the opportunist currents such as *Escherichia coli*, *Klebsiella*, and other *Kluyvera*, reaching the aquatic environment which is the ultimate repository for many antibiotic-resistant bacteria with fecal origin treated effluent from sewage treatment plants. Aquatic ecosystems may play a key role in the horizontal transfer of antibiotic resistance genes between bacterial communities and even provide a return path to man.

We carried out a microbiological study of surface water Oued BAGHAI of the province of Khenchela during the month of March using standardized methods for the isolation and identification of microorganisms. The analysis has mainly focused on the quantification of indicator bacteria of fecal contamination like total coliforms, thermotolerant coliforms and fecal enterococci,

The resistance profile of isolated bacterial strains was determined by the diffusion method on Mueller-Hinton medium swab. Antibiotics commonly used in human therapy were selected.

The results of the susceptibility testing show that the bacteria have varying profiles. The bacteria tested show a majority resistance to beta-lactam antibiotics used. They have acquired resistance for several antibiotics usually active. In this case, the treatment of infections caused by these resistant bacteria could be very difficult.

The spread of resistance to the environment poses daunting health and environmental problems and globally frightening.

**Keywords:** fecal bacteria, total coliforms, fecal coliforms, fecal enterococci, antimicrobial resistance, surface water.

## البكتيريا البرازية المقاومة للمضادات الحيوية في واد بغاي في ولاية خنشلة

### ملخص

في السنوات الأخيرة حلت البكتيريا القولونية محل البكتيريا ذات الجرام إيجابي من حيث مقاومتها للمضادات الحيوية في الممارسة العملية الإسعافية. هذا التغيير، الذي يؤثر على البكتيريا الانتهازية الحالية مثل كولاي، كليبيلا، كليفيرا وغيرها وصل إلى البيئة المائية التي هي مستودع في نهاية المطاف لكثير من البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية من أصل البرازي الآتية من المياه المعالجة من محطات معالجة مياه الصرف الصحي. النظم الإيكولوجية المائية قد تلعب دورا رئيسيا في النقل الأفقي للجينات مقاومة للمضادات الحيوية بين المجتمعات البكتيرية و توفر مسار العودة إلى الانسان.

أجرينا دراسة ميكروبيولوجية للمياه السطحية واد بغاي في ولاية خنشلة خلال شهر مارس باستخدام أساليب موحدة لعزل والتعرف على الكائنات الحية الدقيقة. وقد ركز التحليل أساسا على القياس الكمي للبكتيريا مؤشرات التلوث البرازي أي مجموع القولونيات، القولونيات المقاومة للحرارة والمكورات المعوية البرازية.

تم تحديد المقاومة للسلاطات البكتيرية المعزولة حسب طريقة النشر على وسط مولر هينتون. وقد تم اختيار المضادات الحيوية التي تستخدم عادة في علاج البشر.

نتائج اختبار الحساسية تظهر أن البكتيريا قد بدت متفاوتة. البكتيريا المختبرة تظهر مقاومة غالبية المضادات الحيوية بيتا لاكتام المستخدمة. و أظهرت مقاومة مكتسبة لعدة مضادات حيوية التي تكون عادة نشطة. وبالتالي، علاج الالتهابات التي تسببها هذه البكتيريا المقاومة يكون صعبا للغاية.

انتشار هذه المقاومة في البيئة يشكل عدة مشاكل صحية و بيئية صعبة ومخيفة على الصعيد العالمي.

**كلمات البحث :** البكتيريا البرازية، مجموع القولونيات، بكتيريا القولون البرازية، المكورات المعوية البرازية، مقاومة المضادات الحيوية للميكروبات، المياه السطحية

Nom : MAHDI  
Nom : MERAH

Prénom : Fatima  
Prénom : Widad

Date de soutenance : 14/06/2015

## Master en Microbiologie

### Identification et antibiorésistance des bactéries fécales présentes dans les eaux de surface d'Oued BAGHAI (Wilaya de Khenchela).

#### Résumé

La dissémination de souches bactériennes résistantes dans l'environnement naturel peut avoir des conséquences non négligeables sur la santé publique et sur les milieux écologiques. Les écosystèmes aquatiques pourraient jouer un rôle clé dans le transfert horizontal des gènes de résistance aux antibiotiques entre communautés bactériennes, voire constituer une voie de retour à l'homme.

Le but de ce travail est de faire un état des lieux sur le niveau de contamination en bactéries fécales antibiorésistantes dans les eaux superficielles d'Oued Baghai.

Pour cela Nous avons mené une étude microbiologique des eaux d'Oued BAGHAI de la wilaya de Khenchela pendant le mois de Mars en utilisant des méthodes normalisées pour l'isolement et l'identification des microorganismes. L'analyse effectuée a portée principalement sur la quantification des bactéries indicatrices de contamination fécale à savoir les coliformes totaux, les coliformes thermotolérants et les entérocoques fécaux, la détermination des profils de résistance à quelques antibiotiques fréquents a nécessité la réalisation d'antibiogrammes par la méthode de diffusion en milieu gélosé par écouvillonnage.

Les résultats obtenus montrent la présence d'une contamination fécale importante surtout par *Escherichia coli*, en plus d'autres espèces cliniques et environnementales. Les résultats de l'antibiogramme montrent que les bactéries présentent des profils variables de résistance aux antibiotiques. Les bactéries testées montrent une résistance majoritaire pour les beta-lactamines utilisés. Elles présentent des résistances acquises concernant plusieurs antibiotiques habituellement actifs. Ceci peut engendrer un échec thérapeutique pour les infections causées par ces bactéries multirésistantes.

La dissémination de cette résistance en l'environnement pose des problèmes sanitaires et écologiques redoutables et effrayantes à l'échelle mondiale.

**Mots clés :** Bactéries fécales, coliformes totaux, coliformes fécaux, Entérocoques fécaux, antibiorésistance, eaux de surface.

#### Devant le jury :

Président : M<sup>elle</sup> LEULMI N. (M.A.A)

Univ. Abbès Laghrour – Khenchela

Encadreur : M<sup>elle</sup> CHORFI K. (M.A.B)

Univ. Abbès Laghrour – Khenchela

Examineur : M<sup>F</sup> BOUSSAA A. (M.A.B)

Univ. Abbès Laghrour – Khenchela