

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر و تهيئة الساحل

Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME
D'INGENIEUR EN SCIENCES DE LA MER

OPTION AQUACULTURE

Thème :

**L'évaluation de la résistance aux antibiotiques chez les
bactéries à Gram négatif isolées au niveau de la ferme
piscicole marine ONDPA Cap Djinet wilaya de Boumerdes**

Présenter par :

- Melle ABER Afaf

Soutenu le 25/07 /2010 devant le jury suivant :

M ^{me} HAOUI N.	Maitre assistante classe A	ENSSMAL	Présidente
M ^{me} CHAOU N.	Maitre assistante classe A	ENSSMAL	Examinatrice
M ^{me} BOUFROUCHE F	Maitre assistante	USTHB	Examinatrice
Melle ALOUACHE S.	Maitre assistante classe A	ENSSMAL	Promotrice
Mr LOURGUIOUI H.	Maitre assistant	ENSSMAL	Co-promoteur

Promotion : 2010

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu Mademoiselle Alouache S maître assistante classe A à l'enssmal pour avoir accepté de m'encadrer, pour sa disponibilité et son aide ses critiques et suggestions et surtout sa simplicité qui ma beaucoup facilité la tâche.

Mon Co-promoteur Mr Lourguioui H, maître assistant à l'ensmal pour son aide précieuse et sa participation à la réalisation de ce travail.

Aux responsables et personnel de la ferme ONDPA Cap Djinet, sans qui ce travail n'aurait pas pu être réalisé. Merci pour votre aide précieuse..

Mes remerciements vont également à Mme Haoui N maître assistante classe A à l'enssmal d'avoir accepté de présider le jury

Mme Boufrouche F maître assistante à l'usthb et Mme Chaou N maître assistante classe A enssmal d'avoir bien voulu examiner et corriger ce travail.

A madame Refes ingénieur du laboratoire de microbiologie à l'enssmal pour sa serviabilité.

A madame Idalia N, Mr Matouk F, Mr tD, Boulimane et Mr Mekki

A toute personne ayant contribué pour la réalisation de ce modeste travail.

Je dédie ce modeste travail

A ma chère et regrettée Maman

Dr Aber Fadéla

*Qui est partie à jamais juste le lendemain de Mon
inscription à l'enssmal.*

*Tu as laissé un grand vide derrière toi tu nous
manques tellement*

Repose en paix

Je t'aime maman.

Mais aussi

A mes grands parents maternelle : ma chère manou qui a toujours été à mes côtés et a su à ça manière me booster et m'encourager dans les rudes moments, mon sidou chéri qui m'a épaulé soutenu et guidé sans rien m'imposer.

A ma petite famille papa, tâtâ, ma khti que j'adore, mes frères chéris Amine Walid et le petit Mounir.

Soumeya Aber cousine et sœur je t'adore et je te souhaite tout le bonheur du monde félicitation pour le Bac.

Aussi à ma confidente ma grande sœur et amie ma khaltou chérie à Facine et l'adorable Anes.

Mes oncles Salim Kamel Farid Lyes leur enfants et femmes.

A vous mes copines et sœurs, Soumeya, Amina Meriem et Sabrina.

A Abd EL djalil et Sarah que j'adore

A mon frère et meilleur ami Thouiref Med Amin ainsi qu'à toute ma promotion aux merveilleux moments partagés je ne vous oublierai jamais.

A une personne très chère à mon cœur qui se connaîtra en lisant cette ligne, merci pour tout sans toi je ne serai jamais arrivée.

Liste des figures

Figure 1.	<i>Dicentrarchus labrax</i>	3
Figure 2.	<i>Sparus aurata</i>	4
Figure 3.	Mécanisme d'action des antibiotiques	10
Figure 4.	Mécanismes de résistance aux antibiotiques	12
Figure 5.	Structure de base et quelques molécules de bêta-lactamines.....	13
Figure 6.	Mode d'action des bêta-lactamines.....	14
Figure 7.	Structure chimique d'Enrofloxacin et la ciprofloxacine.....	16
Figure 8.	Mode d'action des quinolones.....	17
Figure 9.	Vue aérienne de la ferme et de la centrale électrique	19
Figure 10.	Système de filtration de la ferme.....	20
Figure 11.	Système d'aération.....	20
Figure 12.	Bassins de pré grossissement.....	20
Figure 13.	Bassins de grossissement.....	21
Figure 14.	Rejets de la ferme.....	21
Figure 15.	Localisation des points de prélèvements.....	22
Figure 16.	Dispositif de filtration en inox à six poste de marque Sartorius.....	25
Figure 17.	Photo de l'inoculation d'une galerie Api 20 E.....	27
Figure 18.	Disposition des antibiotiques.....	28
Figure 19.	Ensemencement des transconjuguants et des souches parentales sur une boîte de sélection.....	30
Figure 20.	Variation de la température de l'eau en fonction des mois.....	31
Figure 21.	Variation du taux de l'oxygène en fonction des mois dans les différentes stations....	32
Figure 22.	Variation de la salinité dans les différentes stations en fonction des mois.....	32
Figure 23.	Variation de la teneur en MES.....	33
Figure 24.	Variation de la charge en coliformes totaux.....	34
Figure 25.	Variation de la charge en coliformes fécaux	34
Figure 26.	Taux de résistance des coliformes totaux à l'amoxicilline.....	35
Figure 27.	Taux de résistance des coliformes totaux à la ticarcilline.....	35
Figure 28.	Taux de résistance des coliformes totaux au ciprofloxacine	36
Figure 29.	Taux de résistance des coliformes totaux au céfotaxime.....	36
Figure 30.	Taux de résistance des coliformes totaux à la ceftazidime.....	36

Figure 31.	Taux de résistance des coliformes totaux à l'imipénème.....	37
Figure 32.	Taux de résistance des coliformes totaux à la céfoxitine.....	37

Liste des tableaux

Tableau 1.	Dates des opérations des prélèvements.....	23
Tableau 2.	Les différents antibiotiques en disque utilisés pour l'antibiogramme.....	29
Tableau 3.	Variation mensuelles de la DBO en fonction des stations.....	33
Tableau 4.	Identité des souches résistantes aux antibiotiques.....	40
Tableau 5.	Antibiotypes des souches résistantes.....	41

Sommaire

Introduction	1
I. Généralités	
I.1. L'aquaculture en Algérie.....	2
I.1.2. L'aquaculture en eaux chaudes.....	2
I.1.2.1. Avantages et inconvénients de l'augmentation de la température	2
I.1.3. Présentation des espèces élevées.....	4
I.1.3.1. Présentation du loup.....	4
I.1.3.1.1. Systématique.....	4
I.1.3.1.2. Description.....	4
I.1.3.1.3. Habitat et biologie.....	4
I.1.3.2. Présentation de La dorade.....	5
I.1.3.2.1. Systématique.....	5
I.1.3.2.2. Description.....	5
I.1.3.2. 3. Habitat et biologie.....	5
I.1.4. Description des paramètres physico-chimiques et bactériologiques.....	5
I.1.4.1. Température	5
I.1.4.2. Potentiel d'hydrogène :.....	6
I.1.4.3. Matière en suspension.....	6
I.1.4.4. La conductivité électrique.....	6
I.1.4.5. Les bactéries.....	6
I.1.4.5.1. Les bactéries indicatrices.....	6
I.1.5. Aquaculture et usage des agents antimicrobiens.....	7
I.1.5.1. Le choix de l'antibiotique.....	7
I.1.5.2. Voies d'administration.....	7
I.1.5.3. Aquaculture et résistance aux antibiotiques.....	9
I. 2. Les antibiotiques.....	9
I.2.1. Mode d'action des antibiotiques.....	10
I.2.2. La résistance aux antibiotiques.....	11
I.2.2.1. Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	11
I.2.2.1.2. La modification de l'antibiotique.....	11

I.2.2.1.3. La réduction de la perméabilité membranaire.....	11
I.2.2.1.4. L'efflux des antibiotiques.....	11
I.2.3. Les β-lactamines.....	12
I.2.3.1 Mode d'action des béta-lactamines.....	12
I.2.3.2. Mécanismes de résistance.....	13
I.2.3.2.1. Les béta-lactamases.....	13
I.2.4. Les quinolones.....	13
I.2.4.1. Mode d'action des quinoloneS.....	15
I.2.4.2. Mécanismes de résistance aux quinolones.....	16
II. Matériels et méthodes	
II- 1- Présentation de la ferme.....	18
II-2-Prélèvement.....	20
II-3- Etude des paramètres physico-chimiques et microbiologiques	22
II-3-1- Salinité.....	22
II-3-2-Oxygène dissous.....	22
II-3-3-Potentiel hydrogène (pH).....	22
II-3-4- La température.....	23
II-3-5-Demande biologique en oxygène (DBO ₅).....	23
II. 3 .6. Matière en suspension (MES).....	23
II-3-7- Analyse microbiologique par la méthode de filtration sur membrane.....	24
II-4- Prévalence de la résistance aux antibiotiques	24
II-5- Identification des bactéries résistantes.....	25
II-6- Diffusion en milieu gélosé : Antibiogramme.....	26
II-7- Transfert génétique par conjugaison bactérienne.....	28
III. Résultats et discussion	
III-1- les paramètres physico-chimiques et bactériologiques.....	30
III-1- 1- les paramètres physico-chimiques	30
III-1-1-1-La Température.....	30
III-1-1-2- Oxygène dissous.....	31
III-1-1-2- La salinité.....	32
III-1-1-3-La matière en suspension.....	32
III-1-1-4- Demande biologique en oxygène	33
III-1-5- les paramètres bactériologiques.....	34

III-2-Prévalence de la résistance aux antibiotiques chez les coliformes.....	36
III-3- Identification des bactéries résistantes.....	39
III-4- Caractérisation des phénotypes de résistance par antibiogramme.....	41
III-5-Transfert génétique par conjugaison bactérienne.....	42
CONCLUSION.....	43
BIBLIOGRAPHIE	44

Introduction

Introduction

L'activité aquacole, en Algérie, a connu une nette amélioration ces dernières années. Plusieurs projets destinés à l'élevage de poissons marins ou d'eaux douces ont vu le jour ainsi que plusieurs productions conchylicoles tout le long des 1200 km de cote.

La wilaya de Boumerdes, offre divers potentialités aquacoles intéressantes avec ses sites remarquables, une qualité des eaux convenable à l'activité aquacole et l'absence de la compétition entre les différentes activités tout cela sur une bande côtière de 80 km .

En 2006, une nouvelle ferme aquacole a été lancée, située à 3 Km au Sud Ouest du village de Cap Djinet (wilaya de Boumerdes), la ferme aquacole ONDPA Cap Djinet, pratique l'élevage du loup et de la daurade dans des bassins en durs

La résistance antimicrobienne dans les systèmes traditionnels de pisciculture dans les eaux tempérées a été intensément étudiée. Une haute incidence des bactéries résistantes aux antimicrobiens utilisés dans l'aquaculture, y compris les bactéries résistantes a été trouvée dans les exploitations piscicoles et dans les milieux aquatiques environnants.

De plus, les résidus d'antimicrobiens ont été trouvés dans les sédiments de la pisciculture en mer. Ceci peut engendrer la diffusion des gènes de résistance chez un large éventail de bactéries aquatiques.

Malgré que l'homme et l'animal ne partage qu'un faible nombre de molécules d'antibiotiques Néanmoins, la résistance à un antimicrobiens dans une classe d'antimicrobiens confère souvent la résistance à d'autres membres du même groupe. Ceci montre l'intérêt d'évaluer l'état de la résistance dans l'environnement et chez le poisson afin d'estimer l'impact sur l'environnement et sur la santé du consommateur.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'antibio-résistance chez les bactéries à Gram négatif isolées au niveau de la ferme ONDPA de cap Djinéte et cela pour essayer d'évaluer l'impact d'un tel élevage sur la dissipation de ces bactéries résistantes en milieu marin et aussi sur l'impact des bactéries déjà existantes dans le milieu sur un élevage de ce genre.

Pour ce faire nous avons adopté le plan suivant :

- Première partie : Contrôle de la qualité physicochimique et microbiologique du milieu d'élevage des prélèvements au niveau de différents points de la ferme.

- Deuxième partie :

Évaluation de l'antibiorésistance chez les coliformes :

- Isolement et identification des bactéries résistantes.
- Détermination des phénotypes de résistance aux antibiotiques.
- Transfert par conjugaison bactérienne.

Généralités

I.1. L'aquaculture en Algérie

De tous les pays maghrébins, l'Algérie est celui qui, en dépit de la longueur de sa façade littorale 1280 km, offre le moins de prédisposition aux activités halieutiques.

Concernant l'élevage de loup et la daurade en Algérie, la production est insignifiante alors que divers projets d'élevage sont en attente. Une quarantaines d'investisseurs potentiels pour la création de fermes aquacoles marquent le démarrage de cette activité.

L'aquaculture Algérienne naissante, bien que bénéficiant de subventions et d'aides gouvernementales fera l'objet d'une forte concurrence des produits de la mer provenant de la communauté européenne (ARIB, 2005).

I.1.2. L'aquaculture en eaux chaudes

L'aquaculture en eau tiède (sur rejets thermiques industriels) est spécifique, née de la possibilité de disposer de grandes quantités d'eau faiblement réchauffée et rejetée dans le milieu naturel. Avant 1975, en dehors de la théorie qui veut qu'un accroissement de la température du milieu entraîne une accélération de la croissance des animaux aquatiques, très peu de références existaient sur ce sujet. Depuis, de nombreuses expérimentations ont eu lieu aux USA, au Japon et en Europe (Barnabé1991).

Aujourd'hui, l'expérience acquise se concrétise par de nombreuses unités de productions aquacoles de taille industrielle. Ces unités permettent de valoriser au mieux les eaux tièdes et leurs productions sont concurrentielles sur un marché du poisson de consommation déjà très largement mondialisé.

I.1.2.1. Avantages et inconvénients de l'augmentation de la température

Le principal intérêt des eaux tièdes utilisées en aquaculture réside dans le fait qu'elles peuvent contribuer à l'accélération de la croissance car pour la majorité des animaux aquatiques (poissons crustacé et mollusques) l'ensemble des processus métaboliques est modifié directement par la température du milieu en stimulant les activités enzymatiques. L'élévation de la température accélère la croissance des animaux dans les limites propres à chaque espèce cela ne va pas sans quelques effets défavorables sur le milieu d'élevage qu'il convient de prendre en compte :

Avantages

- Diminution de la durée de maturation
- Extension de la période ponte
- Accélération de la croissance à tous les stades
- Diminution des indices de consommation

Inconvénients

- Diminution de la solubilité de l'oxygène dans l'eau.
- Augmentation de la toxicité de certains rejets (chlore).
- Accélération du développement de certaines photogènes bactéries parasites
- Augmentation de la consommation d'oxygène

Le choix de l'espèce à élever est primordial. Les conditions de reproduction doivent être maîtrisées et la croissance en eau tiède doit apporter un gain économique appréciable compensant les investissements liés à l'utilisation d'eau tiède (échangeurs, canalisations, etc.). Par ailleurs, le marché de l'espèce, ou des espèces choisies, doit être suffisamment porteur pour justifier un projet d'élevage industriel de plusieurs centaines de tonnes par an.

Les espèces faisant l'objet d'élevage intensif sur rejets thermiques industriels sont les suivantes :

Eau de mer : bar, dorade, turbot, crevette.

Eau douce : esturgeon, truite, silure, catfish, carpe, perche, tilapia.

Estuaire : esturgeon, bar.

I.1.3. Présentation des espèces élevées

I.1.3.1. Présentation du loup

I.1.3.1.1. Systématique

Embranchement : Vertébrés

Super classe : Poissons

Classe : Ostéichthyens

Sous-classe : Actinoptérygien

Super ordre : Téléostéens

Ordre : Perciformes

Famille : Moronidea

Genre : *Dicentrarchus*

Espèce : *Dicentrarchus labrax*



Figure (1) : *Dicentrarchus labrax*

I.1.3.1.2. Description

Poisson au corps élancé, argenté, avec 2 nageoires dorsales séparées et un pédoncule caudal assez haut. Opercule avec 2 épines plates; pré opercule avec, sur son bord inférieur, de grandes épines dirigées vers l'avant; dents vomériennes en bande en forme de croissant ne se prolongeant pas sur la ligne médiane de la voûte buccale. Première nageoire dorsale à 8-10 épines, seconde dorsale à une épine et 12 ou 13 rayons mous; anale à 3 épines et 10-12 rayons mous; caudale modérément fourchue. Ecailles petites, cycloïdes sur l'espace inter orbitaire; 62-80 (mode 70) sur la ligne latérale. Il a une taille commune de 20 à 25cm avec un maximum de 100cm. Sa couleur peut être gris argenté à bleuâtre sur le dos, argenté sur les flancs, ventre parfois teinté de jaune. Les jeunes peuvent avoir quelques mouchetures noires, en particulier sur le haut du corps mais qui disparaissent chez les adultes. Une tache noire diffuse à l'angle supérieur de l'opercule (FAO 1995).

I.1.3.1.3. Habitat et biologie

Il habite les eaux côtières jusqu'à environ 100 m de profondeur, mais plus commun dans les eaux peu profondes; il pénètre souvent dans les estuaires et remonte parfois les fleuves; se rassemble en groupes compacts pour la reproduction, de janvier à mars. La maturité sexuelle est obtenue au cours de la deuxième année chez le mâle (23-30 cm), et au cours de la troisième année chez la femelle (31-40 cm).

C'est un prédateur vorace qui se nourrit de petits poissons en bancs et d'une large variété d'invertébrés comprenant les crevettes, les crabes, les calmars, etc. Sa présence est notée en méditerranée, l'Atlantique et, de la Norvège au Sénégal (FAO 1995)

I.1.3.2. présentation de la dorade

I.1.3.2. 1 Systématique de La dorade

Embranchement : Vertébrés

Super classe : Poissons

Classe : Ostéichthyens

Sous-classe : Actinoptérygien

Super ordre : Téléostéens

Ordre : Perciformes

Famille : Sparidés

Genre : *Sparus*

Espèce : *Sparus aurata*



Figure(2) : *Sparus aurata*

I.1.3.2.2. Description

La dorade a un corps ovale, assez élevé, comprimé avec une tête de profil régulièrement convexe; petit œil ; joues écailleuses; pré opercule nu; lèvres épaisses; bouche basse, très peu inclinée; 4 à 6 dents caniniformes antérieures à chaque mâchoire, doublées et suivies sur les côtés de dents plus obtuses, devenant rapidement molariformes en 2 à 4 rangées; chez les individus de plus de 20 cm, une très large molaire postérieure aculé par une zone rougeâtre; bande dorée. Souvent, des lignes longitudinales sombres sur le corps; une ligne noire sur la dorsale; fourche caudale et mâchoires et dents pointes caudales bordées de noir. La taille commune est d'environ 20 à 50cm avec un maximum de 70cm. (FAO 1995)

I.1.3.2.3. Habitat et biologie

Poissons côtiers sur herbiers à Posidonies ou fonds sableux et dans la zone des brisants, les juvéniles peuvent se trouver à une profondeur de 30 m alors que les adultes atteignent les 150 m de profondeur. C'est une espèce euryhaline, pénétrant dans les eaux saumâtres, sédentaires, solitaires ou en petits groupes. Reproduction hivernale. C'est une espèce hermaphrodite protandrique (20-30 cm), puis devient femelle vers l'âge de 2-3ans (33-40 cm). Leur reproduction se fait en hiver. C'est un poisson carnivore (mollusques, en particulier les moules qu'ils broient facilement, crustacés et poissons), avec un accessoirement herbivores. Il se trouve en méditerranée, en Atlantique et allant des îles Britanniques au Cap Vert (FAO 1995)

I.1.4. Description des paramètres physico-chimiques et bactériologiques

I.1.4.1. Température

Il est important de connaître la température de l'eau avec précision, celle-ci joue un rôle dans la solubilité des gaz, des sels, dans la détermination du pH (Rodier et al, 1996).

Une élévation de la température influence doublement la physiologie des espèces en augmentant le métabolisme d'une part et en réduisant la solubilité de l'oxygène d'une autre part. (Billard, 2005)

I.1.4.2. Potentiel d'hydrogène

Le pH de l'eau de mer est fixé par la présence des carbonates CO_2 HCO_3^- CO_3^{2-} . La modification de la concentration de ces composés entrainera donc une modification du pH.

En milieu côtier, certains rejets industriels ou les apports d'eaux continentales sont la cause de variations du pH.

I.1.4.3. Matière en suspension

La connaissance de la quantité de matière en suspension **MES** est importante pour l'étude des milieux aquatiques. D'une part, les particules réduisent la transparence de l'eau et de ce fait la production primaire photosynthétique, d'autre part selon leur nature, elles sont une source nutritive non négligeable pour la faune marine. (**Aminot et Chaussepied, 1983**)

I.1.4.4. La conductivité électrique

Elle mesure la capacité du milieu à transmettre un courant électrique celle-ci étant lié à la qualité des particules chargée (anions et cations). Elle permet d'évaluer la minéralisation de l'eau qui augmente avec la salinité. (**Messaoud-Nacer, 2003**)

I.1.4.5. Les bactéries

Les bactéries ce sont des êtres unicellulaires procaryotes, elles ont un rôle écologique fondamental dans la transformation de la matière (cycles des éléments). Certaines espèces ont un pouvoir pathogène vis-à-vis des organismes vivants (bactéries, végétaux, animaux, hommes). Elles sont responsables, avec les amibes, de plusieurs maladies diarrhéiques, qui provoquent des morts chaque année particulièrement chez les enfants. (**Gaujois, 1995**)

Les bactéries sont couramment recherchées dans l'eau, principalement comme témoin de contamination fécale.

A ce titre elles peuvent être :

- Sensibles c'est-à-dire qu'on les rencontre assez fréquemment.
- Spécifiques c'est-à-dire d'origine fécale stricte.
- Résistantes c'est-à-dire qu'elles subsistent longtemps dans l'eau.

I.1.4.5.1. Les bactéries indicatrices

Ce sont des germes d'origine fécale qui existent dans le même environnement que les germes pathogènes, facilement détectables. Les principaux groupes sont :

✓ Les coliformes totaux (CT)

Les coliformes totaux sont définis par l'organisation internationale de standardisation(ISO), comme étant des bactéries en forme de bâtonnets, non sporogène, Gram négatif, oxydase négatif, facultativement anaérobie, capables de croître en présence de sels biliaires, et capable de fermenter le lactose (et le mannitol) avec production d'acide et l'aldéhyde et de gaz en 48heures à des températures de 35-37°C (Rodier, 2005).

✓ Les coliformes fécaux (CF)

Les coliformes fécaux, ou coliformes thermo tolérants, sont un sous groupe des coliformes totaux possédant les mêmes caractères cités précédemment, sont capables de fermenter le lactose à une température de 44.5 °C (Rodier, 2005).

I.1.5. Aquaculture et usage des agents antimicrobiens

La production de denrées d'origine animale est un processus économique qui suppose un profit pour le producteur avec deux considérations économiques : la première consiste dans le fait qu'il est plus économique de prévenir une maladie que de la traiter surtout quand celle-ci affecte plus l'animal que l'homme. Le second intérêt, réside dans la meilleure conversion de l'aliment par les animaux lors de l'utilisation de faibles doses dans l'aliment (Sanders, 2005)

L'objectif sanitaire général des élevages aquacoles, est de maîtriser la population d'agents pathogènes, tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif pour maintenir un équilibre entre les poissons, les bioagresseurs et l'environnement, dans une perspective de rentabilité. L'emploi de la chimiothérapie en aquaculture est appelé à demeurer incontournable. Ainsi le succès du développement de l'aquaculture restera largement dépendant des médicaments et des désinfectants, auxiliaires de la décision thérapeutique du vétérinaire (Petit, 1999).

L'objectif de la thérapeutique en élevage est de réduire la population de bio agresseurs à un niveau supportable par leurs hôtes. Sa mise en pratique repose sur le choix d'un principe actif et d'un schéma posologique. Cette prise de décision nécessite la prise en compte des relations quantitatives qui unissent l'espèce traitée, l'agent pathogène et le médicament utilisé (Petit, 1999).

Les produits couramment utilisés en aquaculture, marine et continentale, dans un but prophylactique et thérapeutique, peuvent être toxiques et dangereuses pour le poisson, l'homme et l'environnement ; il est donc indispensable de respecter scrupuleusement les consignes énoncées par le fabricant : règles de stockage, de manipulation, d'élimination, etc...

Les anesthésiques

Ils s'utilisent en balnéation pour la manipulation des poissons lors des opérations de ponte et de tri. L'aération de l'eau est une mesure de prudence indispensable aux anesthésies de longue durée. Il existe plusieurs substances à savoir : Benzocaïne, Chlorobuthanol, Métomidate, ne pas utiliser chez les poissons destinés à la consommation humaine, MS222, Phénoxyéthanol, Quinaldine (Petit, 1999).

Les antibiotiques

constituant, de loin, la classe thérapeutique la plus utilisée chez les poissons, les anti-infectieux appartiennent à plusieurs familles,

- * Aminosides,
- * Béta-lactamines (Ampicilline),
- * Chloramphénicol
- * Macrolides (Erythromycine),
- * Nitrofuranes (Furoxone), interdit Règlement
- * Quinolones (Fluméquine),
- * Sulfamides et sulfamides associés (Tribrissen),
- * Tétracyclines (Auréomycine , Téramycine).

L'emploi du Chloramphénicol et des nitrofuranes est désormais interdit par la législation française. (Menif, 2007).

I.1.5.1. Le choix de l'antibiotique

En théorie, l'antibiotique doit être actif et ne rencontre pas de phénomène de résistance. Pour cela, seul un antibiogramme est capable de déterminer la (ou les) molécule(s) à employer. Or, en raison des délais (souvent 5 ou 6 jours) que demandent l'isolation, l'identification et la détermination de l'antibio-sensibilité du germe responsable de l'infection, la pratique impose l'emploi immédiat d'une substance dont le choix sera fait empiriquement, en fonction du spectre d'activité de la molécule et d'antécédents pathologiques analogues (Menif, 2007).

I.1.5.2. Voies d'administration

Trois voies sont habituellement utilisées lors des traitements anti-infectieux, - **La voie injectable** : intrapéritonéale, ou intramusculaire, elle est généralement réservée aux sujets de valeur (géniteurs) ;

- **La balnéation** : en raison de son coût élevé et du stress qu'elle engendre, elle n'est à envisager que dans les cas d'infections externes, cutanéobranchiales par exemple

- **La voie buccale** : elle s'adresse aux animaux habitués à recevoir une alimentation artificielle et qui s'alimentent encore. N'engendrant pas de stress, d'un prix de revient acceptable et facile à administrer, c'est la voie la plus employée en élevages intensifs. L'antibiotique est mélangé de façon homogène à l'aliment (aliment médicamenteux) et est distribué suivant les recommandations (quantité, durée...) du fabricant.

Il est important de signaler que le poisson traité à l'antibiotiques doit bénéficier d'un temps de latence de quelques jours à quelques semaines avant d'être livré à la consommation humaine (Menif, 2007).

I.1.5.3. Aquaculture et résistance aux antibiotiques

La pisciculture a connu, comme d'autres secteurs d'élevage intensif, des problèmes de maladies qui nécessitent l'emploi des antibiotiques comme l'amoxicilline, L'acide oxolinique (OXA), l'oxytétracycline (OTC), le triméthoprime, le sulfamerazin et le nifurazolidon (**Spanggaard et al, 1993**).

L'attention a été attirée sur le développement possible des micro-organismes résistants aux antibiotiques et la recherche dans ce domaine s'est principalement concentrée sur les agents pathogènes des poissons. Une résistance importante et forte à plusieurs antibiotiques a été trouvée chez *Aeromonas salmonicida* (**Richards et al, 1991 IN Spanggaard et al, 1993**), *Vibrio salmonicida* (**Hjeltnes et al, 1987 IN Spanggaard et al, 1993**) et *Aeromonas hydrophila* (**DePaola et al, 1988 IN Spanggaard et al, 1993**).

Ces résistances aux antibiotiques peuvent entraîner des pertes économiques vue que l'apparition de différentes maladies ne peut être traitée efficacement. Cependant, les bactéries pathogènes des poissons, ne constituent qu'un faible pourcentage de la flore totale bactérienne dans les fermes piscicoles et le développement de la résistance aux antibiotiques dans la population bactérienne en tant que telle peut avoir de graves conséquences sur l'environnement. Comme la majorité des fermes piscicoles, que ce soit en eau douce ou marine, dispose d'un libre échange de l'eau de ruisseaux ou de l'océan, les antibiotiques et les bactéries résistantes peuvent se propager avec la circulation de l'eau (**Spanggaard et al, 1993**).

Une telle accumulation pourrait établir une pression sélective favorisant la sélection et la croissance des bactéries résistantes aux antibiotiques avec un risque potentiel que les gènes de résistance aux antimicrobiens pourraient être diffusés dans un large éventail de bactéries de l'environnement aquatique. Les agents antimicrobiens approuvés pour l'utilisation comme facteurs de croissance des animaux ne sont pas ou peu associés à la thérapie humaine (macrolides, glycophospholipides, polypeptides, orthosomycines...), pour éviter la sélection de bactéries résistantes à des médicaments importants. Néanmoins, la résistance à un antimicrobiens dans une classe donnée confère souvent la résistance à d'autres membres de la même classe (résistance croisée) (**Petersen et al, 2002 ; Sanders, 2005**).

L'utilisation des antimicrobiens comme activateurs de croissance chez l'animal élevé a été liée à la résistance aux antimicrobiens chez certaines bactéries pathogènes de l'homme, suggérant qu'il existe un flux possible des gènes de la résistance aux antibiotiques entre les pathogènes de l'animal et de l'homme. Le transfert des bactéries résistantes et des gènes de résistance de l'aquaculture vers l'homme peut se produire directement par le biais de la consommation de bactéries résistantes aux antibiotiques présentes dans les poissons (**Petersen et al, 2002**).

I. 2. Les antibiotiques

A l'origine, le terme antibiotique qualifiait toute substance naturelle ou synthétique, capable même à très faible concentration d'inhiber (effet bactériostatique) ou de tuer (effet bactéricide) les microorganismes (Singleton, 1984.)

De nombreux paramètres sont à prendre en compte pour définir l'activité d'un antibiotique Le spectre d'activité d'un antibiotique est la liste des espèces bactériennes sur lesquelles un antibiotique agit. Le spectre est propre à chaque antibiotique et peut varier dans le temps suite à l'apparition de résistance bactériennes (Singleton, 1984.).

- La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) correspond à la concentration minimale d'antibiotique permettant d'inhiber totalement la multiplication bactérienne (bactériostase) après 18 à 24 heures de contact à 37°.
- La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) est la plus faible concentration permettant de détruire 99.9% des bactéries après 18 à 24 heures de contact.
- La CMI et CMB sont caractéristiques d'un antibiotique pour une souche donnée.

Quand le rapport $CMB / CMI = 1$ l'antibiotique est dit "bactéricide absolu"

- ❖ Quand le rapport CMB / CMI est proche de 1 L'antibiotique est dit "bactéricide"
- ❖ Quand le rapport $CMB / CMI = 2$ L'antibiotique est dit "bactériostatique".

I.2.1. Mode d'action des antibiotiques

Leur classification selon le mode d'action nous permet de déterminer cinq mécanismes d'action qui peuvent toucher soit la structure bactérienne, soit une fonction métabolique ; il s'agit de (Colmen et al, 1994) :

- Action sur la paroi bactérienne : **béta-lactamines**.
- Action sur la structure de la membrane plasmique : gentamicine.
- Action sur la synthèse protéique : aminosides, macrolides, lincosamides, cloramphénicol, tétracycline.
- Action sur les acides nucléiques : **Quinolones**.
- Interférence avec le métabolisme de la bactérie : exemple sulfamides.

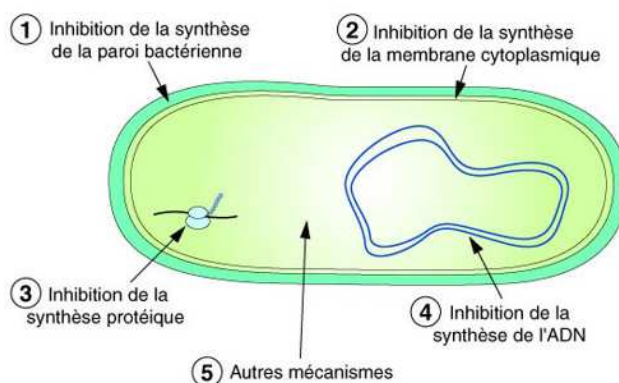


Figure (3) : Mécanisme d'action des antibiotiques. (Singleton, 1984.).

I.2.2. La résistance aux antibiotiques

Est la capacité d'un micro-organisme à résister aux effets des antibiotiques. Elle apparaît suite à une mutation génétique aléatoire ou à un échange de gènes de résistances entre des bactéries (transformation génétique, transduction et conjugaison). Si une bactérie est porteuse de plusieurs gènes de résistance pour différents antibiotiques, elle est nommée multi résistante. La généralisation de la résistance à toute une population de bactéries est générée par une sélection naturelle, dû à une exposition prolongée de cette population à l'antibiotique. **(Doublet, 2004).**

- Résistance naturelle : C'est une résistance chromosomique intrinsèque à toutes les bactéries d'une même espèce. Elle détermine le phénotype sauvage et héréditaire des espèces bactériennes. Elle permet également de définir le spectre d'activité des antibiotiques **(Doublet, 2004).**
- Résistance acquise : C'est une résistance qui apparaît chez une espèce naturellement sensible suite à des modifications génétiques consistant en des mutations des gènes déjà existant chez les bactéries ou en l'acquisition de nouveaux gènes de résistance *via les* transferts horizontaux **(Doublet, 2004).**

I.2.2.1. Mécanismes de résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques peut intervenir par le biais d'un ensemble de mécanismes non exclusifs :

I.2.2.1.1. La mutation de la cible de l'antibiotique.

Chaque antibiotique agit en se fixant sur une cible précise dans la cellule : paroi, ribosome... La présence d'une modification consécutive à une mutation modifie le site de fixation et empêche ainsi la liaison de l'antibiotique **(Cavallo et al, 2004)**

I.2.2.1.2. La modification de l'antibiotique.

De nombreuses souches résistantes produisent une enzyme qui modifie ou qui clive la molécule d'antibiotique, la rendant inactive. C'est le mécanisme principal de résistance aux β -lactamines qui implique les enzymes nommées des β -lactamases **(Cavallo et al, 2004)**

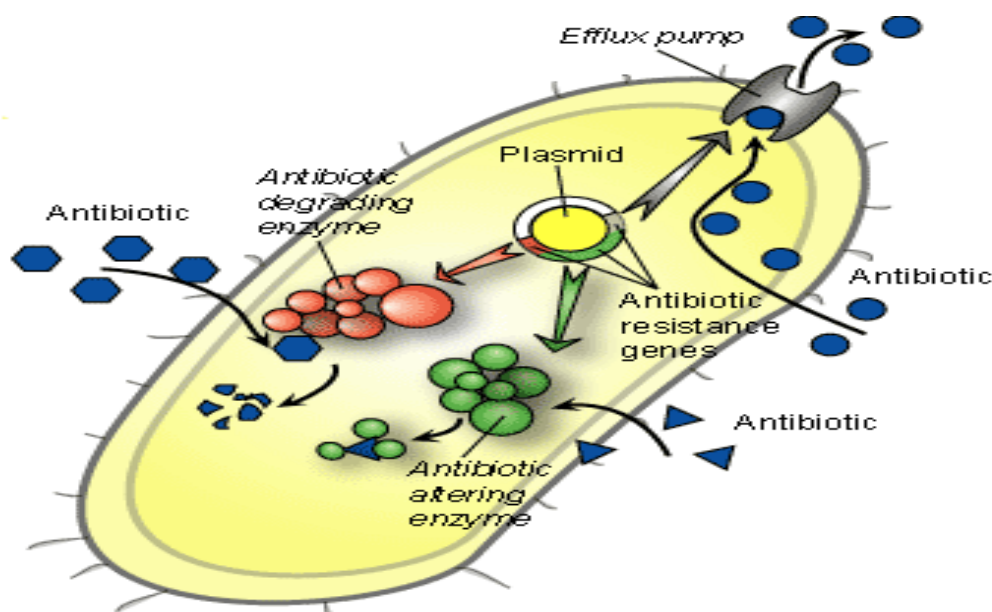
I.2.2.1.3. La réduction de la perméabilité membranaire

La bactérie "ferme" les pores par lesquels l'antibiotique pénètre dans la cellule. L'altération de ces pores nommés porines par mutation empêche ou limite la pénétration de l'antibiotique, soit par une modification structurale d'une des porines essentielles, soit par une diminution quantitative du nombre des porines, qui est la situation la plus fréquente **(Cavallo et al, 2004)**

I.2.2.1.4. L'efflux des antibiotiques

Les systèmes d'efflux sont des mécanismes de transport membranaire qui s'opposent à l'accumulation intracellulaire de divers substrats toxiques dont les antibiotiques. Ces pompes d'efflux sont composées par : un transporteur inséré dans la membrane cytoplasmique, une protéine située dans la membrane externe et une protéine de liaison périplasmique qui relie

entre les deux autres protéines. Ce mécanisme d'efflux, qui présente une large spécificité de substrat concerne des classes d'antibiotiques aussi diverses que les tétracyclines, les bêta-lactamines, les quinolones, le chloramphénicol ou les macrolides (Cavallo *et al*, 2004).



Figure(4) : Mécanismes de résistance aux antibiotiques
www.scq.ubc.ca/.../08/ResistanceMechanisms.gif

Dans notre étude nous nous intéresserons seulement à deux familles d'antibiotiques d'utilisation commune entre l'homme et l'animal. Il s'agit des bêta-lactamines et des quinolones

I.2.3. Les β -lactamines

Les bêta-lactamines constituent une grande famille d'antibiotiques, la plus importante par le nombre et la diversité des molécules utilisables et par ses indications les plus larges que l'on puisse attribuer à une famille d'antibiotiques (Bryskier, 1999). Toutes les molécules présentent un noyau bêta-lactame et en fonction du cycle adjacent, plusieurs groupes se distinguent, ce qui explique la diversité des molécules (figure 5) (Bryskier, 1999) :

Les pénames

Les pénames renferment les pénicillines, les oxa-1-pénames et les carbapénames. Ces composés sont constitués de trois parties, un noyau thiazolidine fixé sur un cycle b-lactame et une chaîne latérale sur le C₆ qui permet de les différencier (Bryskier, 1999).

Les pénèmes

Le groupe des pénèmes renferme des molécules synthétiques. Il se caractérise par la présence d'un cycle thiazolidine attaché au cycle b-lactame. Selon l'atome présent en position 1 (soufre, radical CH₂ ou oxygène), on distingue respectivement : les pénèmes, les carbapénèmes et les

oxapénèmes. Les carbapénèmes possèdent un large spectre antibactérien incluant les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Bryskier, 1999).

Les céphèmes

Les céphèmes sont constitués d'un noyau b-lactame auquel est accolé un cycle insaturé dihydrothiazine. Les céphalosporines sont traditionnellement divisées en première, deuxième, troisième et quatrième génération (Bryskier, 1999).

Les monobactames

Les monolactames se caractérisent par une structure monocyclique (noyau b-lactame). Le premier monolactame développé et utilisé en clinique est l'aztréonam qui dérive d'un monolactame naturel isolé de *Chromobacterium violaceum* (Bryskier, 1999).

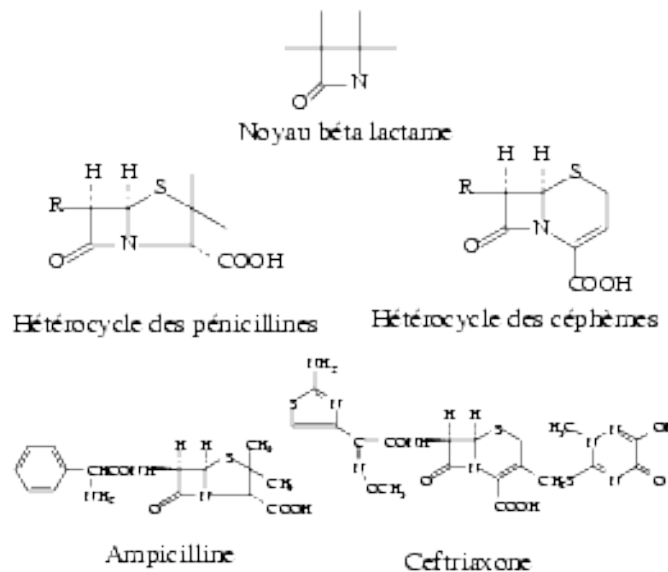


Figure (5) : Structure de base et quelques molécules de bêta-lactamines (Singleton, 1999)

I.2.3.1 Mode d'action des bêta-lactamines

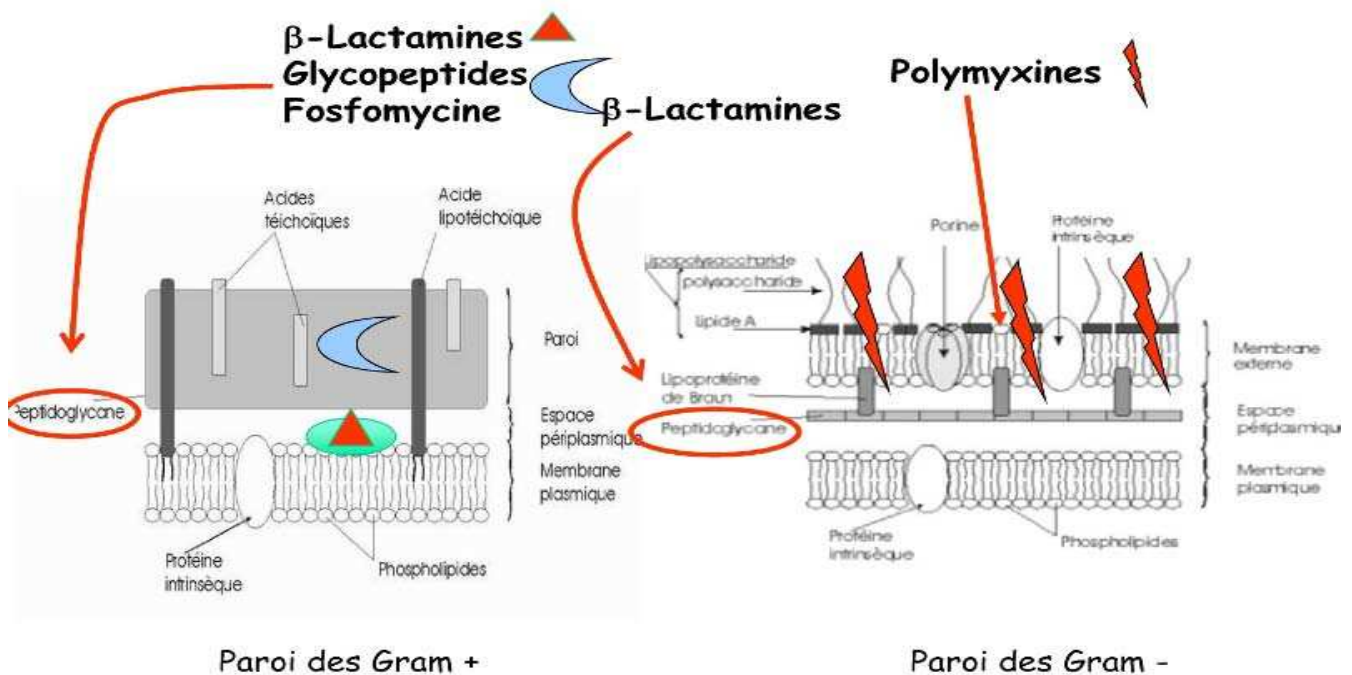
Les bêta-lactamines sont des analogues de structure du dipeptide D ala-D ala. Elles agissent en perturbant la synthèse de l'enveloppe cellulaire dans les cellules en croissance. Ils inactivent les protéines fixatrices de pénicillines PLP qui sont des transpeptidases responsable de la formation du peptidoglycane. L'accumulation des précurseurs entraîne un déséquilibre dans la paroi cellulaire qui s'accompagne d'une lyse cellulaire (Barrial et scotet, 2005).

Deux étapes importantes pour l'activité antibactérienne des bêta-lactamines :

- Pénétration des bêta-lactamines : La cible des b-lactamines (PLP) se trouve au niveau de la face externe de la membrane plasmidique. Chez les bactéries à Gram négatif, ces molécules sont obligées de traverser la membrane externe qui constitue une barrière hydrophobe. Cette pénétration se fait grâce à des porines (Omp C et Omp F).

Leur passage et la vitesse de pénétration étant fonction de la taille et de la charge de la molécule.

- Attachement aux protéines cibles : qui sont les PLP. Celle-ci ancrées dans la membrane cytoplasmique, sont des enzymes (transpeptidases, carboxypeptidases) impliqués dans la synthèse du peptidoglycane. Il existe une grande variété de PLP suivant les espèces.



Figure(6) : mode d'action des bêta-lactamines (Lavigne 2004)

I.2.3.2. Mécanismes de résistance

La résistance aux bêta-lactamines peut être due à plusieurs mécanismes à savoir la diminution de la perméabilité de la membrane externe, la modification de la cible des bêta-lactamines (PLP), ou d'une hyper-expression du système d'efflux (Piddock et Wise, 1985). Cependant, le principal mécanisme de la résistance aux bêta-lactamines reste le mécanisme enzymatique par la production de bêta-lactamases.

I.2.3.2.1. Les bêta-lactamases (Cavallo, 2004)

Les bêta-lactamases sont des enzymes bactériennes d'origine chromosomique ou plasmidique, qui catalysent de manière efficace et irréversible l'hydrolyse de la liaison amide du cycle bêta-lactame pour donner un acylenzyme qui sera ensuite dégradé en acide inactif. On peut les classer comme suit :

➤ Les pénicillinases

Le plus souvent d'origine plasmidique, leur production ne nécessite pas d'inducteurs. Ces Pénicillinases sont totalement ou partiellement inhibées par les inhibiteurs de B-lactamases (exemple : l'acide clavulanique). Elles sont exprimées à bas niveau mais elles peuvent par mutation être exprimées à haut niveau. On parle alors de pénicillinases à haut niveau qui sont alors actives sur un plus grand nombre de beta-lactamines dont certaines céphalosporines, ou de bêta-lactamase à spectre élargi qui confère la résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération et sensible à la céfoxitine et l'imipénème(Cavallo, 2004).

➤ Les céphalosporinases

Le plus souvent d'origine chromosomique, elles ne sont produites qu'en présence d'inducteurs qui sont presque toujours des B-lactamines. Les inhibiteurs de B-lactamases n'inhibent pas ces enzymes. Ces enzymes peuvent être produites à bas niveau par les souches sauvages : céphalosporinase de bas niveau ou réprimée. Une mutation sur les gènes régulateurs aboutit à une hyperproduction de ces enzymes : céphalosporinase de haut niveau ou déréprimée. De plus, des céphalosporinases plasmidiques ont été décrites chez plusieurs espèces

I.2.4. Les quinolones

Les quinolones et fluoroquinolones forment une large classe d'antibactériens de synthèse qui comprend les dérivés de l'acide nalidixique découvert en 1962 et utilisé chez l'homme dès l'année suivante. Cette famille d'antibactériens a fait l'objet de recherches très importantes aboutissant au dépôt de plus de 10000 brevets. L'ajout de l'atome de fluor dans les années 1970 a permis d'augmenter fortement la pénétration des molécules quinolones dans les cellules et fut la naissance des fluoroquinolones, qui sont capables de lutter contre une grande variété de germes chez l'homme et l'animal (**Cavallo et al, 2004**).

Les quinolones sont un groupe d'antibiotiques de synthèse (figure7) utilisés dans le traitement de diverses infections bactériennes en particulier dans l'aquaculture, Les quinolones sont particulièrement actifs contre les bactéries à Gram négatives et ils ont été recommandées pour le traitement des voies urinaires et des infections entériques chez l'homme (**Dulopot, 1989; Norrby, 1989**).

Les quinolones sont habituellement classées en première, deuxième, troisième et quatrième génération. Les molécules de la deuxième à la quatrième génération intègrent au moins un atome de fluor dans leur structure et prennent le nom de fluor quinolones. (**Cavallo et al, 2004**). Ils possèdent une meilleure pénétration sérique et tissulaire. Leur spectre d'activité, initialement limité aux bactéries à Gram négatif aérobies, s'est étendu successivement aux bactéries à Gram positif et aux anaérobies.

1ère génération

Les quinolones de la première génération incluent l'acide nalidixique et d'autres molécules apparentées. Elles sont actives contre les bactéries à Gram négatif (mais pas le genre *Pseudomonas*). Leur taux sérique et leur diffusion tissulaire sont faibles

2ème génération

La norfloxacin est la première molécule de la seconde génération. Elle dérive de l'acide nalidixique par l'introduction d'un atome de fluor en position C6 et d'un groupe pipérazine en position C7. Le fluor est caractéristique des fluoroquinolones, la pipérazine augmente l'activité antibactérienne de la molécule. La ciprofloxacine est dérivée à son tour de la norfloxacin par l'introduction d'un groupe cyclopropyl en position N1 qui améliore sa biodisponibilité.

Le spectre d'action est élargi par rapport à la première génération, il couvre désormais le genre *Pseudomonas*, les germes à Gram positif dont *Staphylococcus aureus* et certains

pathogènes responsables de pneumonies atypiques tels que *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* et *Mycoplasma pneumoniae*.

3ème génération

La troisième génération n'est pas homogène. La lévofloxacine est simplement l'énantiomère lévogyre de l'ofloxacine. La grépafloracine, la sparfloxacine et la témafloxacine ont en commun l'ajout sur le groupe pipérazine positionné en C7 d'un groupe méthyle stériquement volumineux qui a pour effet de renforcer l'activité anti-streptocoque en incluant *Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus pyogenes*. Elles sont également actives contre les pathogènes responsables de pneumonies atypiques. Elles conservent leur activité sur les Gram-négative mais ils sont moins actifs que la ciprofloxacine contre le genre *Pseudomonas*.

4ème génération

La quatrième génération conserve l'activité contre les bactéries à Gram-négative et à Gram-positive de la troisième génération tout en couvrant largement les anaérobies, en particulier *Bacteroides fragilis* exemple la gatifloxacine.

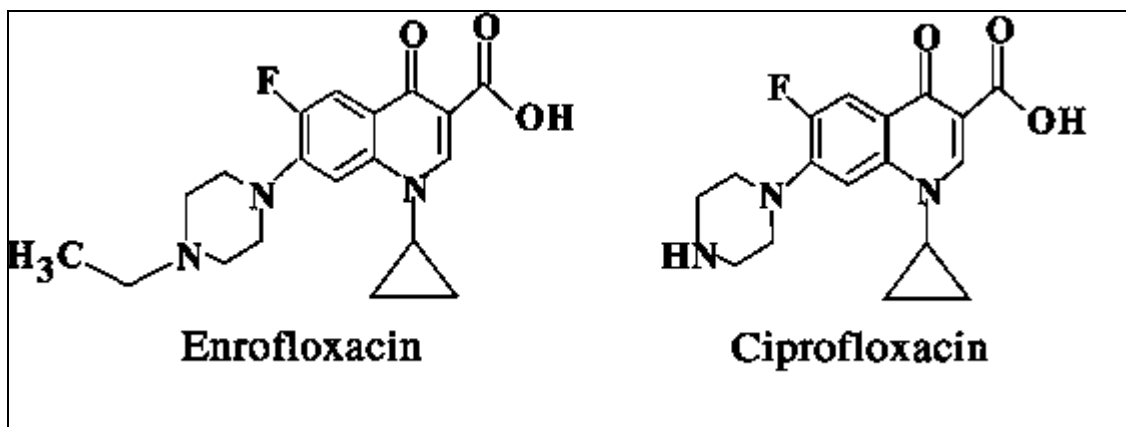


Figure (7): structure chimique de Enrofloxacin et la ciprofloxacine LAVIGNE 2004

I.2.4.1. Mode d'action des quinolones

Les quinolones ciblent l'ADN gyrase et la topoisomérase II et IV, empêchant la réplication de l'ADN bactérien. Leur mode d'action comprend un effet oxydant sur les bactéries, mais leur effet principal est dû à la fixation de la molécule quinolone sur l'ADN lors de la phase de réplication de l'ADN au cours de la mitose (figure 8).

L'activité antibactérienne des quinolones est basée sur l'inhibition de l'ADN-gyrase qui conduit à une condensation instable de la configuration de l'ADN bactérien pendant la division cellulaire. En raison de la concentrations minimales inhibitrices (CMI)relativement faible pour la plupart des agents pathogènes sensibles des poissons et de l'efficacité de la distribution systémique, lorsqu'ils sont administrés par voie orale par l'intermédiaire de l'alimentation additionnée de médicament pour animaux, l'enrofloxacin et de ciprofloxacine, sont deux types de médicaments typiques des quinolones, qui ont été largement utilisés pour traiter les infections systémiques bactériennes chez les poissons (5XU ET AL)

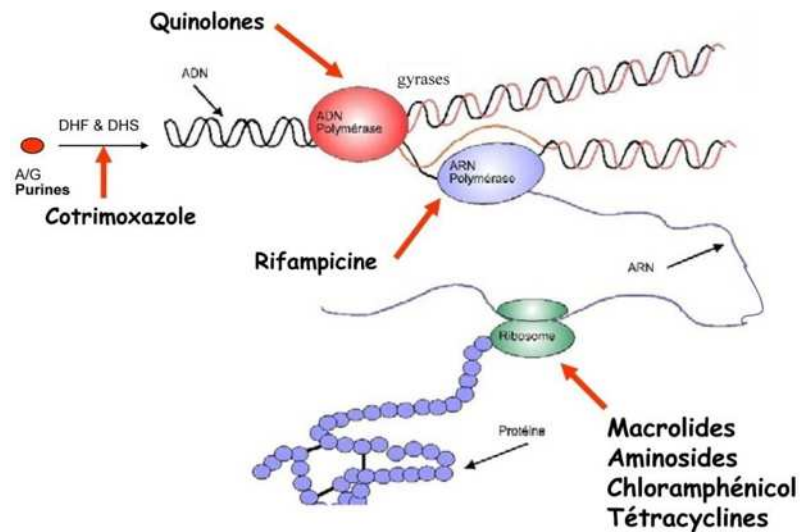


Figure (8) : Mode d'action des quinolones LAVIGNE 2004

I.2.4.2. Mécanismes de résistance aux quinolones

La résistance acquise aux quinolones est à caractère chromosomique par sélection de mutants préexistant. Les enzymes suite à une mutation deviennent moins sensibles, voir insensibles à l'activité inhibitrice des quinolones. Les principales mutations sont :

- Modification de l'ADN gyrase : ces mutations affecte principalement les gènes Gyr A et Gyr B codant les sous unités A et B de l'ADN gyrase.
- Modification de la topoisomérase IV : les mutations peuvent toucher les gènes par cet Par E codant pour les sous unité de la topoisomérase VI

En plus de ces mutations, il existe l'augmentation du système d'efflux représenté par le système AcrAB chez *E.coli*, ce mécanisme augmente la résistance aux fluoroquinolones.

Récemment, on a assisté à l'émergence de trois mécanismes de résistance plasmidique aux fluoroquinolones. Le premier, déjà répandu mondialement, consiste en une protéine Qnr protégeant l'ADN gyrase de la fixation des quinolones. Pour le second, il s'agit d'une inactivation des fluoroquinolones par un variant d'une aminoside *N*-acétyltransférase, ACC-(6')-Ib-cr décrit en Chine et aux USA. Et plus récemment, il a été découvert une pompe d'efflux plasmidique, QepA, excréant les fluoroquinolones chez deux souches d' *Escherichia coli* en Belgique et au Japon.

En plus, leur association à d'autres déterminants de résistance, essentiellement β -lactamines et aminosides, favoriserait la co-sélection de la résistance aux fluoroquinolones. Il convient donc d'insister sur l'usage rationnel des fluoroquinolones pour diminuer la pression de sélection de ces gènes (Menif et Namdari , 2008).

Matériels & Méthodes

II- 1- Présentation de la ferme

La ferme de Cap Djinet se trouve au coté Est de la centrale électrique de SONALGAZ (figure 9), de forme rectangulaire de 225 mètres de largeur côté face à la mer, et 380 mètres de longueur, pour une superficie de 6 hectares.

Le motif du choix d'un tel emplacement n'est pas arbitraire, les eaux qui servent au refroidissement des circuits secondaires des condenseurs de la centrale et qui sont rejetées à une température de 24 à 25 °C offrent une situation idéale pour l'élevage de deux espèces de poissons nobles à haute valeur commerciale à savoir le loup *Dicentrarchus labrax* et la daurade *Sparus aurata*.

Cette eau chaude pompée vers la ferme permettra la réduction du cycle d'élevage de 18 à 13 mois avec un débit de pompage de 2000 à 2500 m³/h, ce qui permet une meilleure rentabilité de l'exploitation.

Le cahier de charge de la ferme est basé sur la construction de 232 bassins d'élevage installés sur une surface de 33 000m² en dur pour atteindre un objectif de production de 1000 tonnes de loup et daurade et 600 tonnes de sole. Au moment de notre étude la ferme fonctionnait avec 26 bassins de pré grossissement conçus avec des dimensions de 20 x2x1 mètres et 18 bassins de grossissement (70x3.5x1) mètres pour une production de 30 tonnes.



Figure (9) : Vue aérienne de la ferme et de la centrale électrique (Google Maps 2010)

Les eaux subissent une première filtration à l'aide un filtre de macro déchets a turbine avant de passer dans des bassins d'oxygénation. L'apport de l'oxygène est en fonction des proportions des tailles des poissons, il est estimé à 30kg d'oxygène par heure.



Figure (10): Système de filtration de la ferme (Aber, 2010)



Figure (11): Système d'aération photo ondpa (Aber, 2010)



Figure (12): Bassins de pré grossissement (Aber, 2010)



Figure (13): Bassins de grossissement (Aber, 2010)



Figure (14): Rejets de la ferme (Aber, 2010)

II-2- Prélèvement

Le prélèvement et l'échantillonnage représentent une phase primordiale dans l'acquisition des résultats, ces derniers n'auront de significations que s'ils ne sont pas entachés d'erreurs amino et chausspiéd 1983.

Afin d'avoir une idée représentative de la résistance au niveau de la ferme, les prélèvements ont été effectués à l'entrée, et à la sortie de la ferme ainsi qu' au niveau de trois bassins d'élevage (Figure 15).

Les prélèvements d'eau ont été effectués à 20 cm de la surface dans des flacons borosilicaté de 1l stériles, excepté le prélèvement S4 fond qui a été réalisé en profondeur. Les échantillons bien étiquetés ont été transportés dans des glacières (à 10°C) et analysés dans les 24h.

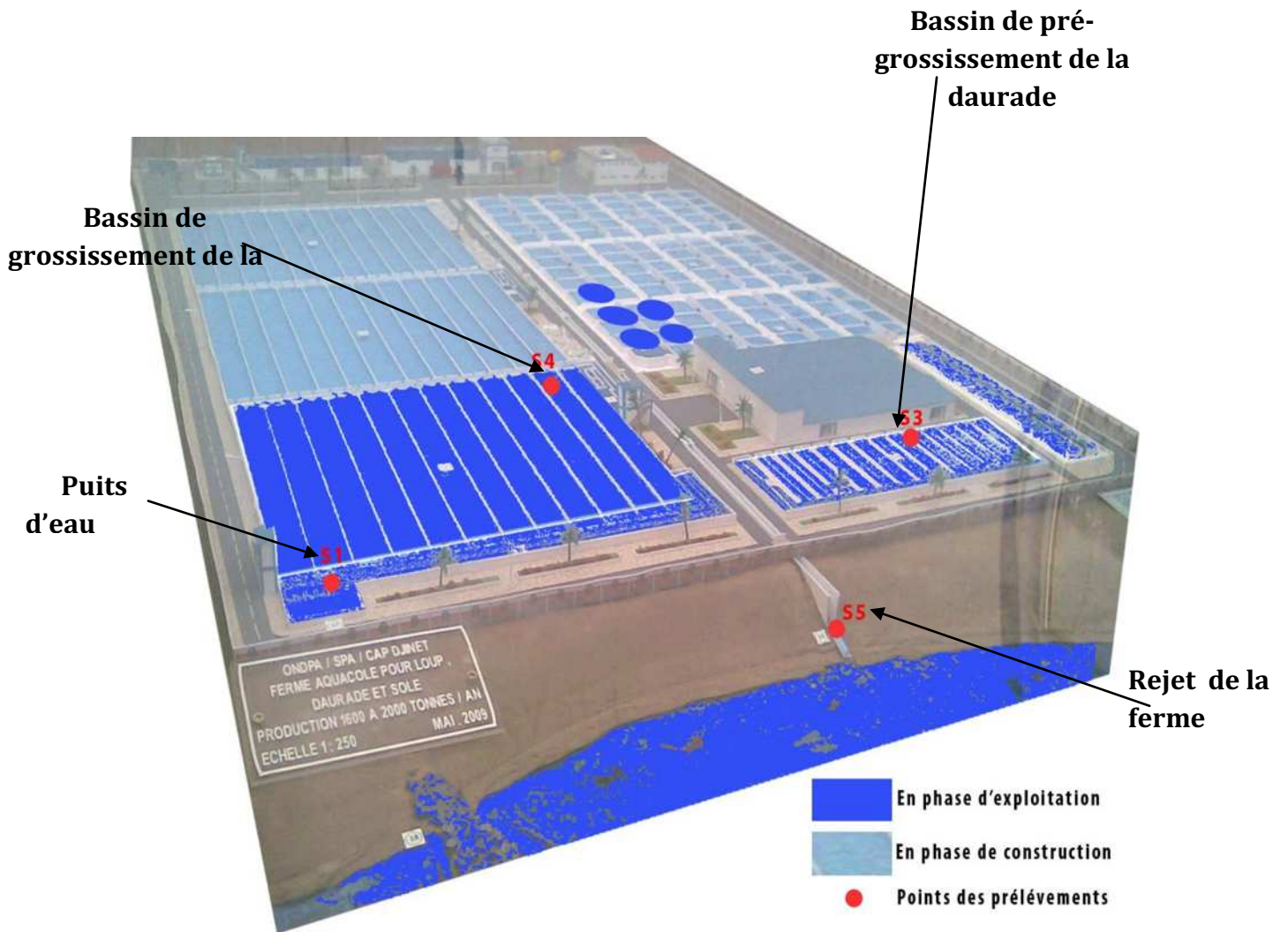


Figure (15): Localisation des points de prélèvements (ONDPA, 2004)

Tableau 1 : Dates des opérations de prélèvements.

N° de sortie	Dates	Météo
1	24 mars 2010	Temps ensoleillé, 19°C
2	16 avril 2010	Temps nuageux, 18°C
3	07 mai 2010	Temps nuageux, 16°C
4	03 juin 2010	Temps ensoleillé, 23°C

II-3- Etude des paramètres physico-chimiques et microbiologiques

Des analyses physicochimiques ont été réalisées *in situ* à l'aide des appareillages de terrain à savoir : la salinité, le pH, l'oxygène dissous et la température. La DBO₅ et la matière en suspension ont été réalisées au laboratoire.

II-3-1- Salinité

La salinité est mesurée à l'aide d'un conductimètre de terrain de marque Wissenschaftlich Technische Werkstätten « WTW ».

II-3-2-Oxygène dissous

L'oxygène dissous est mesuré *in situ* également à l'aide d'un oxymètre portable de marque Wissenschaftlich Technische Werkstätten « WTW ».

II-3-3-Potentiel hydrogène (pH)

Pour la mesure du pH, nous avons utilisé la méthode électrochimique avec électrode de verre, en utilisant un pH mètre portable de marque Wissenschaftlich Technische Werkstätten « WTW », ayant une deuxième électrode pour la mesure de la température

II-3-4- La température

La température a été mesurée en parallèle avec les trois appareillages précédents. Elle est calculée à partir des trois valeurs obtenues.

II-3-5-Demande biologique en oxygène (DBO₅) (Rodier et al., 1996)

La demande biologique en oxygène est représentée par la quantité d'oxygène nécessaire aux microorganismes pour dégrader la matière organique dans l'eau.

La mesure de la DBO₅ a été effectuée à l'aide d'un DBO mètre de marque Wissenschaftlich Technische Werkstätten « WTW ». C'est une méthode manométrique avec des manomètres de marque Oxi Top, à affichage numérique qui se fixent directement sur le flacon de la DBO₅.

Cette méthode a pour principe l'adsorption du CO₂ dégagé après la consommation de l'oxygène par les microorganismes, par un piège à soude créant ainsi une dépression enregistrée par le manomètre.

Technique

- Introduire 250 ml de l'échantillon d'eau dans un flacon brun en verre contenant un aimant d'agitation magnétique
- Mettre la capsule qui contient deux pastilles de soude (NaOH) dans la bouteille,
- fermer les bouchons
- L'agitation est ensuite enclenchée par un dispositif adéquat.
- La température est équilibrée par un thermostat réglé à 20°C
- Les échantillons sont laissés sous incubation pendant cinq (05) jours à l'obscurité,
- Les valeurs sont relevées sur des colonnes de mesure.

II. 3 .6. Matière en suspension (MES)

Un volume d'échantillon (500 ml) d'eau est filtré sur un filtre Whattman de porosité 0,45µm. le poids des matières retenues est déterminé par la pesée différentielle du filtre avant et après passage à l'étuve à 105°C pendant 2heures (Rodier et al, 1996).

$$MES = \frac{(P_2 - P_1)}{V} \times 100$$

Sachant que :

M.E.S : concentration de la matière en suspension

P₁ : poids de filtre sec avant la filtration

P₂ : poids de filtre sec après la filtration

V : volume filtré

II-3-7- Analyse microbiologique par la méthode de filtration sur membrane (Rodier et al., 1996)

La qualité microbiologique de l'eau prélevée a été déterminée en recherchant la flore totale, les coliformes totaux et les coliformes thermo tolérants. Cette méthode consiste en la filtration de 100 ml d'échantillon ou de dilutions sur une membrane en esters de cellulose, de porosité 0,45 µm placée dans une rampe de filtration en inox de six postes (figure16). La membrane est déposée sur la surface d'un milieu spécifique pour chaque recherche.



Figure (16): dispositif de filtration en inox à six poste de marque Sartorius

Technique :

- Mettre en place le dispositif de filtration stérile dans la zone stérile, tout en plaçant la membrane sur la plaque poreuse de la rampe
- Agiter soigneusement le flacon d'eau à analyser et filtrer stérilement 100ml d'échantillon ou de dilution.
- Déposer la membrane à la surface d'une gélose de Mueller Hinton pour la flore totale et à la surface d'une gélose au tergitol pour la recherche des coliformes totaux et des thermo tolérants.

La recherche de la flore totale et des coliformes totaux s'effectue à 37°C pendant 24 à 48h, alors que les coliformes thermotolérants ont été recherchés à une température de 44°C pendant 24 à 48h.

II-4- Prévalence de la résistance aux antibiotiques

L'évaluation de la résistance à 6 molécules de bêta-lactamines (Amoxicilline, Ticarcilline Céfotaxime, ceftazidime, céfoxitine, imipénème) et un fluoroquinolones (ciprofloxacine) a été réalisée chez les coliformes totaux. Après filtration de 100ml d'échantillon d'eau, les membranes ont été déposées sur la gélose au tergitol additionné de l'un des antibiotiques AMX (32µg/ml), TIC(32 µg/ml), CTX(4 µg/ml), CAZ (16µg/ml), FOX(32 µg/ml), IMP(16µg/ml) et CIP (2µg/ml).

La prévalence de la résistance chez les coliformes a été déterminée par le nombre de coliformes résistants rapportés au nombre de coliformes totaux retrouvés sur le milieu au Tergitol.

II-5- Identification des bactéries résistantes

Toutes les bactéries résistantes sur amoxicilline, ticarcilline et ciprofloxacine, ont été ré-isolées sur Mueller Hinton supplémenté de l'antibiotique approprié, afin de confirmer leur résistance. Les bactéries isolées ont été conservées et identifiées par des galeries API 20E (Biomérieux).

Principe :

La galerie API 20E est un système d'identification des entérobactéries et autres bacilles à Gram négatif. Elle comporte 20 tests biochimiques standardisés et miniaturisés. Les milieux déshydratés sont reconstitués avec une suspension bactérienne. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (Biomérieux).

Technique :

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau stérile dans les alvéoles afin de créer une atmosphère humide,
- Retirer la galerie stérile de son emballage et la déposer dans la boîte d'incubation,
- Préparer l'inoculum bactérien : mettre 1 à 3 colonies jeunes dans de l'eau distillée stérile,
- Inoculer la galerie comme suit (figure 17)
 - Remplir les tubes et cupules des tests (CIT, VP et GEL).
 - Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests.

Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, H₂S, URE, en remplissant leur cupule d'huile de vaseline.

- Incuber à 37°C pendant 24 à 48 heures.
- Le test d'oxydase est réalisé par le dépôt d'un inoculum bactérien sur le disque d'oxydase. La présence du cytochrome oxydase se traduit par l'apparition d'une coloration violette.

Lecture :

Ces galeries doivent être lues selon les recommandations du fournisseur. Après codification des réactions en un profil numérique, l'identification est obtenue on se référant à un catalogue analytique (Biomérieux).



Figure (17): photo de l'inoculation d'une galerie Api 20 E

II-6- Diffusion en milieu gélosé : Antibiogramme

L'étude de la résistance de nos souches vis-à-vis de 21 antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu solide (Courvalin, 1985 ; CA-SFM, 2010).

Principe :

Cette technique est basée sur l'observation de la croissance bactérienne en présence d'un gradient de concentration d'antibiotique, obtenu par diffusion à partir des disques d'antibiotiques dans un milieu gélosé (Muller-Hinton). Ce gradient est inversement proportionnel à la distance par rapport aux disques. La croissance s'arrête lorsque les bactéries sont en contact avec leur concentration minimale d'inhibition dessinant ainsi des halos d'inhibition autour du disque d'antibiotique.

Technique :

- A partir d'une culture jeune (18-24h), préparer dans 5ml d'eau physiologique une suspension bactérienne de 0,5 McFarland (10^8 cellules/ml).
- Ajuster l'inoculum à 10^7 cellules/ml
- Plonger un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne de 10^7 cellules/ml.
- Ensemencer la boîte en frottant l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée et en tournant la boîte trois fois de 60° afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum,

Matériels et méthodes

- Appliquer les disques d'antibiotiques (tableau 2) à l'aide d'un distributeur stérile selon le schéma de la figure 18
- Laisser diffuser pendant 15 minutes, à température ambiante,
- Incuber à 37°C pendant 18-24.

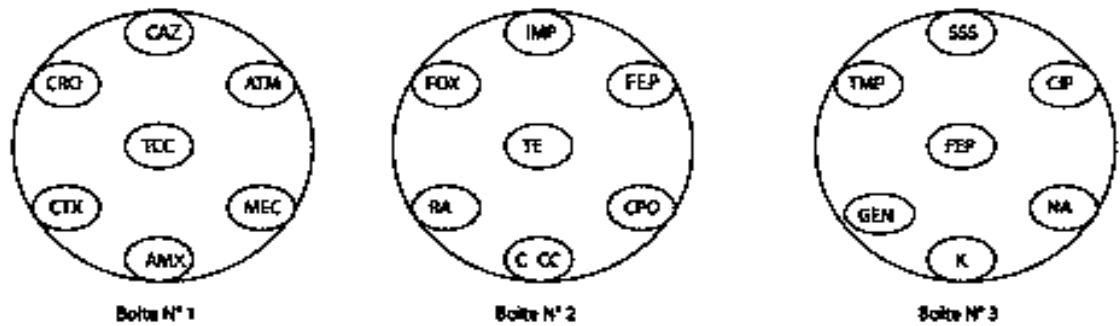


Figure (18): Disposition des antibiotiques

Lecture :

- Mesurer avec précision les diamètres d'inhibition à l'aide d'une règle graduée et classer les bactéries dans l'une des catégories : sensible (S), intermédiaire (I) ou résistant (R) selon les valeurs critiques (CA-SFM, 2010).

Tableau (2) : les différents antibiotiques en disque utilisés pour l'antibiogramme

<i>famille</i>		<i>Antibiotique</i>	<i>Abréviation</i>	<i>La charge(µg)</i>	
<i>B- lactamines</i>	<i>Pénicillines</i>	<i>Amoxicilline</i>	<i>Amx</i>	<i>25</i>	
		<i>Ticarciline</i>	<i>TIC</i>	<i>75</i>	
		<i>Ticarciline+ acide clavulanique</i>	<i>TCC</i>	<i>75/10</i>	
		<i>Mecilline</i>	<i>MEC</i>	<i>10</i>	
	<i>carbapénicilline</i>	<i>Impréme</i>	<i>IMP</i>	<i>10</i>	
	<i>Monobactame</i>	<i>Aztréonan</i>	<i>ATM</i>	<i>30</i>	
	<i>Céphalosporines</i>	<i>CG 2</i>	<i>céfotixime</i>	<i>FOX</i>	<i>30</i>
			<i>céfotxime</i>	<i>CTX</i>	<i>30</i>
		<i>CG3</i>	<i>céftiaxone</i>	<i>CRO</i>	<i>30</i>
			<i>Céftazidime</i>	<i>CAZ</i>	<i>30</i>
<i>Non B- lactamines</i>	<i>Quinolones</i>	<i>Acide nalidixique</i>	<i>NA</i>	<i>30</i>	
	<i>Fluoro-quinolones</i>	<i>ciprofloxacine</i>	<i>CIP</i>	<i>5</i>	
	<i>Aminosides</i>	<i>kanamycine</i>	<i>K</i>	<i>30UI</i>	
	<i>Phénicole</i>	<i>chloramphénicol</i>	<i>C</i>	<i>30</i>	
	<i>Tétracycline</i>	<i>tétracycline</i>	<i>TE</i>	<i>30UI</i>	
	<i>Sulfamides</i>	<i>Sulfamide</i>	<i>SSS</i>	<i>200</i>	
		<i>Triméthoprime</i>	<i>TMP</i>	<i>5</i>	
	<i>Divers</i>	<i>Rifampicine</i>	<i>RA</i>	<i>30</i>	
<i>Aminosides</i>	<i>Gentamicine</i>	<i>GEN</i>	<i>15</i>		

II-7- Transfert génétique par conjugaison bactérienne : (Courvalin et al. 1985).

Principe

Le transfert génétique permet la mise en évidence de plasmides conjugatifs portants des caractères de résistance aux antibiotiques. Il se fait par un croisement de la souche sauvage (donatrice) avec une souche réceptrice (*E.coli k12* résistante à l'azide de sodium) dépourvue de plasmide et possédant dans ce cas, un caractère de résistance obtenu par mutation chromosomique, auquel la donatrice est sensible.

Matériels et méthodes

Les bactéries réceptrices ayant acquis le(s) caractère(s) de résistance aux antibiotiques transférables, seront sélectionnées et testées par antibiogramme afin de déterminer leur profil d'antibio-résistances.

Technique

- ✓ La conjugaison a été effectuée en milieu solide
- ✓ Cultiver la donatrice et la réceptrice dans un bouillon BHIB pendant 24h à 37°C.
- ✓ Assurer un contact entre les deux souches bactériennes de la manière suivante: Mélanger 2 ml de la réceptrice avec 1 ml de la donatrices dans un tube à essai stérile.
- ✓ Déposer 04 spots du mélange de 50 µl chacun.
- ✓ Laisser sécher puis incubé à 37 °C pendant 24h.
- ✓ Récupérer un spot dans 5ml d'eau physiologique et ensemercer les boites de sélection par la suspension bactériennes et les souches parentales (figure 19)
- ✓ Après incubation de 24h à 37°C, récupérer les transconjugants sur les boîtes de sélection où seules les transconjugants ont poussé
- ✓ Les transconjugants obtenus seront analysés par antibiogramme
- ✓ Les boîtes de sélection ont été préparées comme suit :
 - 1ml d'une solution fille de l'azide de sodium pour obtenir une concentration finale de 200µg/ml.
 - 1 ml d'une solution fille d'amoxicilline ou de ciprofloxacine qui nous donne une concentration finale respectivement de 25 et 2µg/ml
 - 18ml du Mueller Hinton



Figure (19): Ensemencement des transconjugants et des souches parentales sur une boîte de sélection. Agents de sélection sont : l'azide de sodium 200µg/ml et amoxicilline 25 µg/ml.

Résultats & Discussions

III- Résultats et discussion

Les résultats de mesure des paramètres physicochimiques et bactériologiques obtenus durant ce travail sont reportés dans les graphes suivants :

III-1- les paramètres physico-chimiques et bactériologiques

III-1- 1- les paramètres physico-chimiques

III-1-1-1-La température

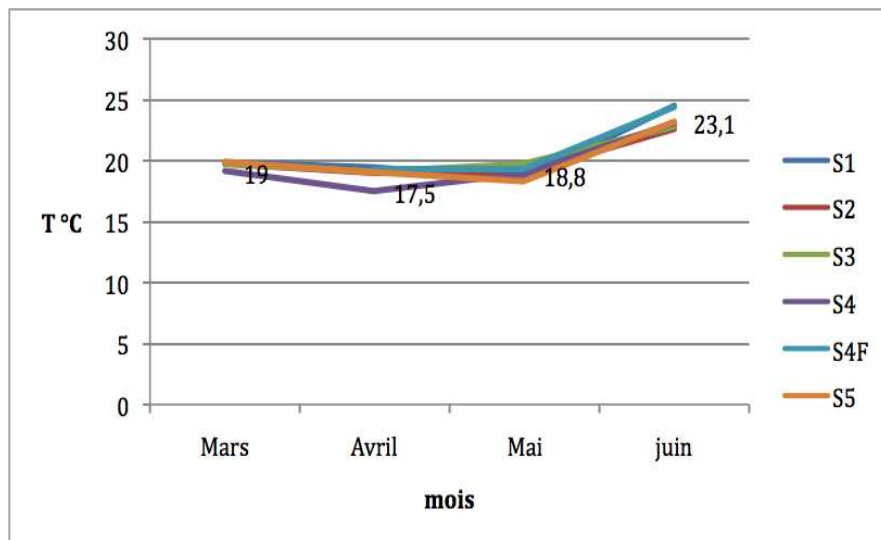


Figure 20: Variation de la température de l'eau en fonction des mois

Nous remarquons que les températures varient entre 17.5°C et 23.1°C (figure20). Ces changements sont sûrement dus aux variations des conditions météorologiques.

Les courbes montrent une légère diminution de la température de l'eau durant le mois de Mai. Ceci est peut être dû à l'heure matinale du prélèvement (9h15) et aux conditions météorologiques durant cette journée.

III-1-1-2- Oxygène dissous

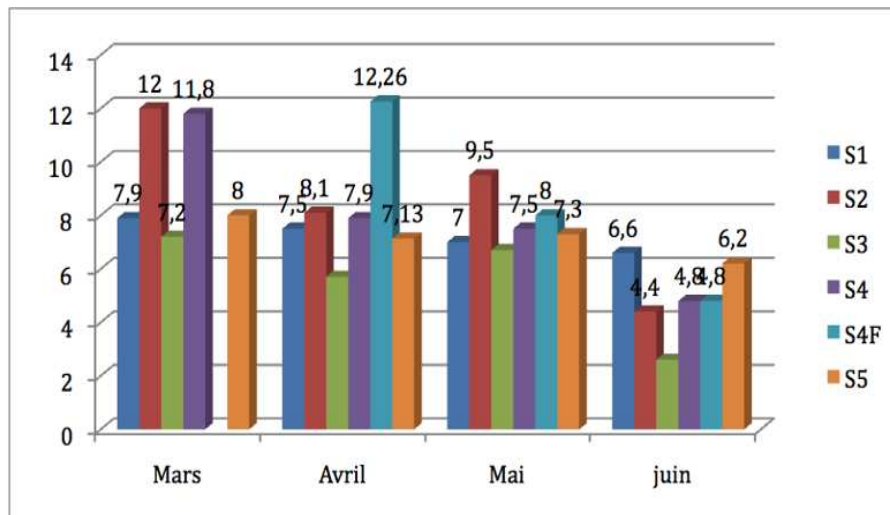


Figure 21: Variation du taux de l'oxygène en fonction des mois dans les différentes stations

D'après les résultats obtenus (figure21) on remarque que le site offre une bonne oxygénation. Les valeurs de la station S1 reflètent la quantité d'oxygène dans l'eau de mer et cela, avant le passage au bassin d'oxygénation.

Ces valeurs ont tendance à varier, d'un bassin à un autre selon l'oxygénation et la respiration des poissons. Selon **Lequenne (1984)**, en élevage, des taux d'oxygène dissous de 2 mg/l ne sont pas létaux s'ils sont de courte durée, et l'on ne constate guère de perturbation tant que cette teneur demeure supérieure à 3 mg/l.

Le loup vis en eaux agitées et donc riches en oxygène dissous : il lui en faut au minimum 4,5 mg/l (**Bénéteau et Chinzi, 1998**). Le taux d'oxygène dissous exigé par la daurade se situe entre 4 et 8 mg/l (**Lequenne, 1984**).

III-1-1-2- La salinité

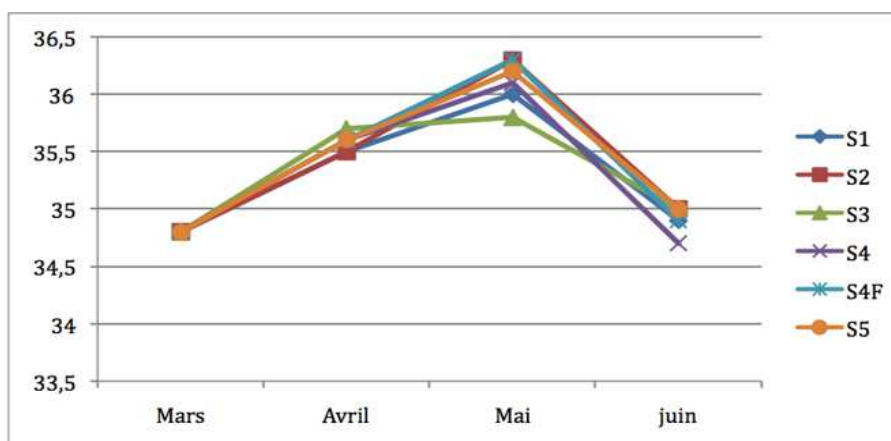


Figure22: Variation de la salinité dans les différentes stations en fonction des mois dans les différentes stations

En temps normal la salinité de l'eau de mer est un paramètre assez stable, dans notre cas on remarque que celle-ci a tendance à varier de 34,5 PSU pour sa valeur minimale à 36.5 PSU. Le loup peut vivre en eau douce, saumâtre, marine ou sursalée (jusqu'à 90 PSU). L'optimum de croissance est à 35 PSU (**Barnabé,1989**). Pour la daurade, selon **Freddi et al., (1981) In Barnabé (1989)**, la salinité optimale va de 33 à 35 PSU pour la ponte, de 30 à 50 PSU pour les œufs et de 15 à 25 PSU pour les larves.

III-1-1-3-La matière en suspension

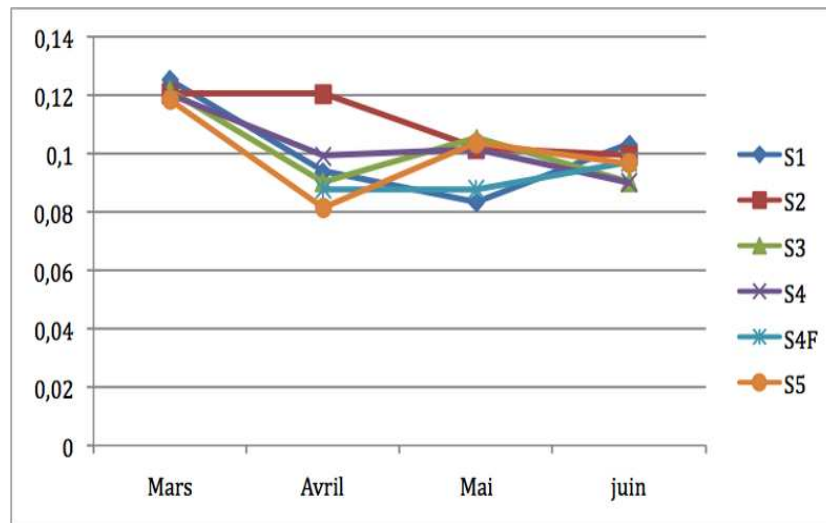


Figure 23: Variation de la teneur en MES

La même variation des MES est observée dans toutes les stations avec des valeurs assez importante dès l'entrée. Ces fortes teneurs peuvent être expliquées par la turbidité du milieu extérieur due à un apport terrigène (tel que les eaux de l'Oued Isser).

Les eaux turbides ne conviennent pas pour les écloséries mais sont plus au moins tolérées pour les animaux en grossissement (**Billard, 2005**). Selon **Bénéteau et Chinzi, 1998**, la charge en matières en suspension dans les eaux d'élevage doit être minimale et si possible de l'ordre de moins de 10 mg/l.

III-1-1-4- La DBO5

Tableau 03: variation mensuelles de la DBO en fonction des stations

Station	Mois	DBO5 mg /L
S1	Avril	00
S4	MAI	05
S5	MARS	05
	Avril	00
	Mai	05
	Juin	05

Les valeurs de la DBO5 sont toutes inférieures ou égale à 5 mg/l, et d'après la Grille multi usages des critères d'appréciation globale de la qualité de l'eau ces valeurs démontrent que l'eau d'élevage est de bonne qualité (Geoffroy, 2008 In Ferra, 2008).

III-1-5- les paramètres bactériologiques

La qualité bactériologique des eaux a été évaluée par la recherche des coliformes totaux et des coliformes fécaux (figure 24 et 25).

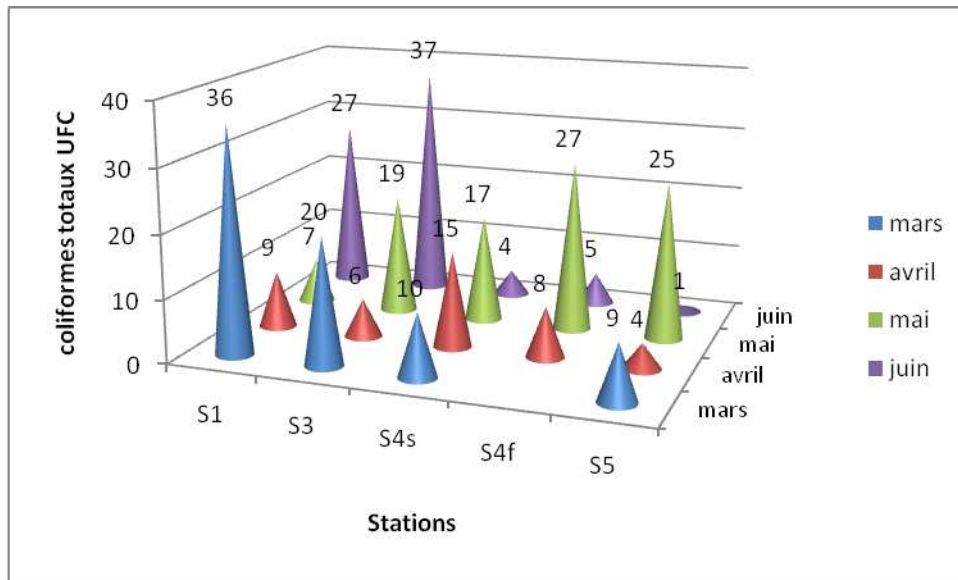


Figure 24 : Variation de la charge en coliformes totaux

La charge des eaux en coliformes totaux varie de 4 UFC/100ml à 37 UFC/100ml (figure 24). Ces faibles taux seraient d'origine exogène.

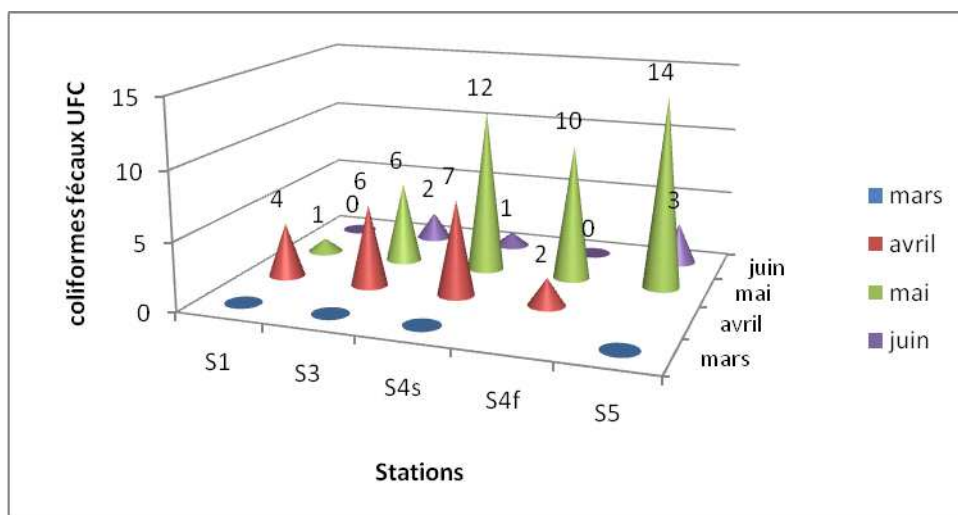


Figure 25 : variation de la charge en coliformes fécaux durant Les mois

Pour les coliformes fécaux les plus grandes valeurs ont été rencontrées en mois de Mai (figures 25). Ces bactéries qui sont présentes en très faibles concentrations proviennent des tubes digestifs des poissons. Ces valeurs restent très inférieures aux normes des eaux du littoral (100 *E.coli*/100ml). Ces valeurs sont principalement dues au faible temps de séjour dans les bassins qui est d'environ 2H.

III-2-Prévalence de la résistance aux antibiotiques chez les coliformes

L'évaluation de la résistance chez les coliformes totaux a été réalisée pour cinq molécules de bêta-lactamines (AMX, TIC, CTX, CAZ, FOX, IMP) et un fluoroquinolone (CIP). Les résultats obtenus sont montrés dans les figures

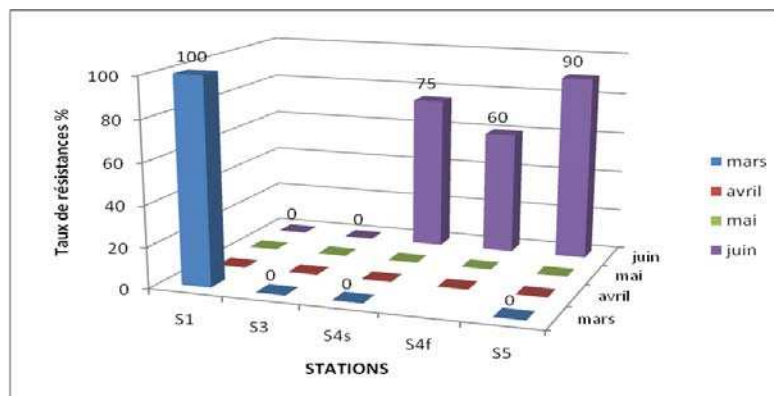


Figure 26: Taux de résistance des coliformes totaux à l'amoxicilline

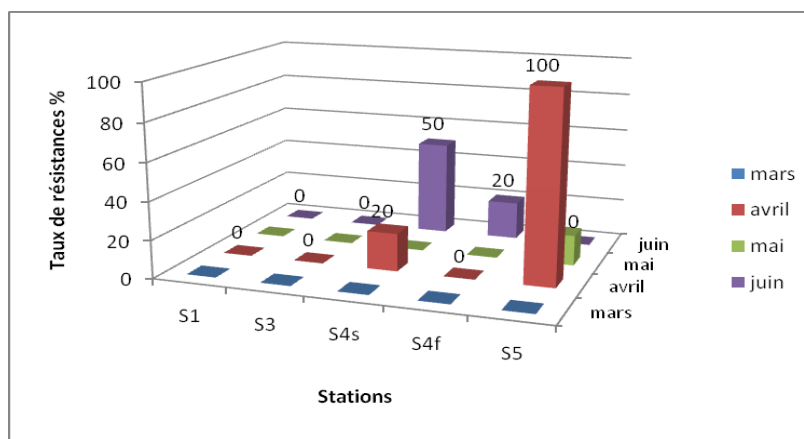


Figure 27: Taux de résistance des coliformes totaux à la ticarcilline

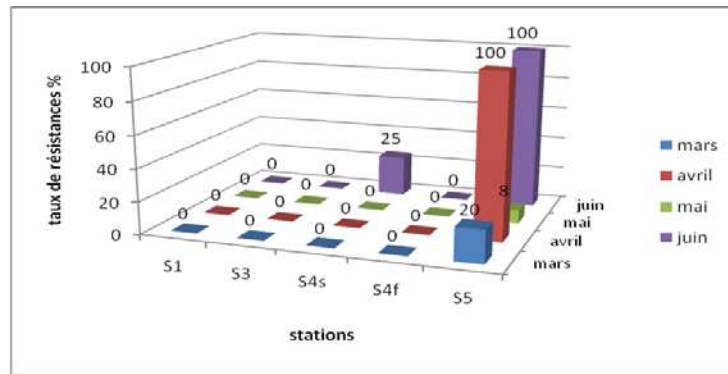


Figure 28: Taux de résistance des coliformes totaux à la céfoxitine

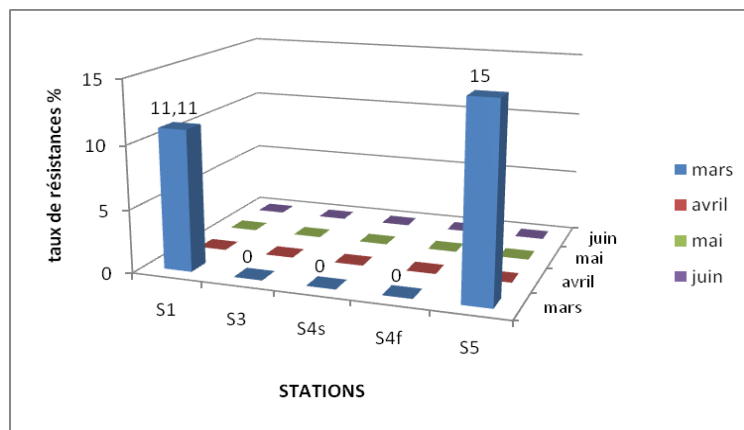


Figure 29: Taux de résistance des coliformes totaux au céfotaxime

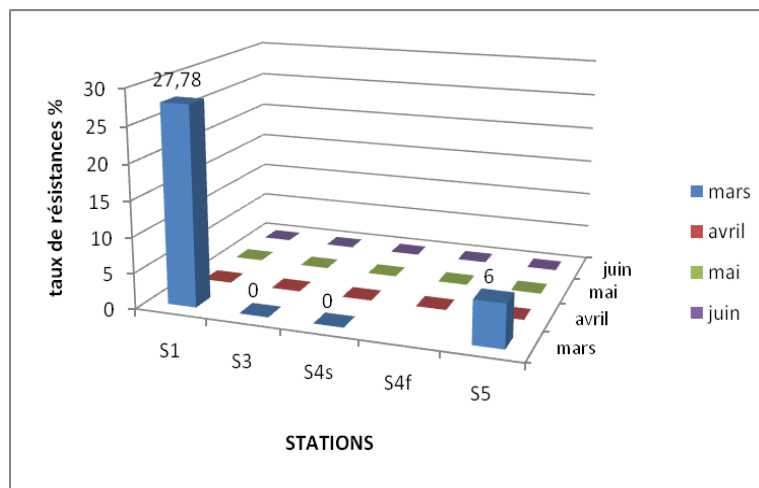


Figure30: Taux de résistance des coliformes totaux à la ceftazidime

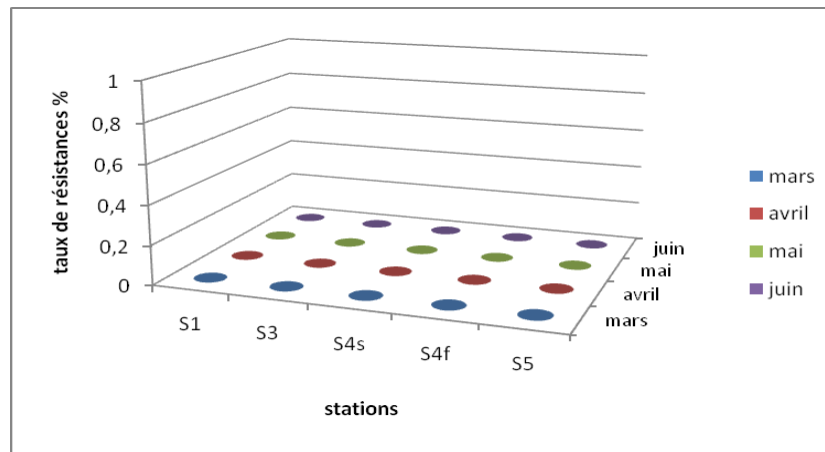


Figure 31: Taux de résistance des coliformes totaux à l'imipénème

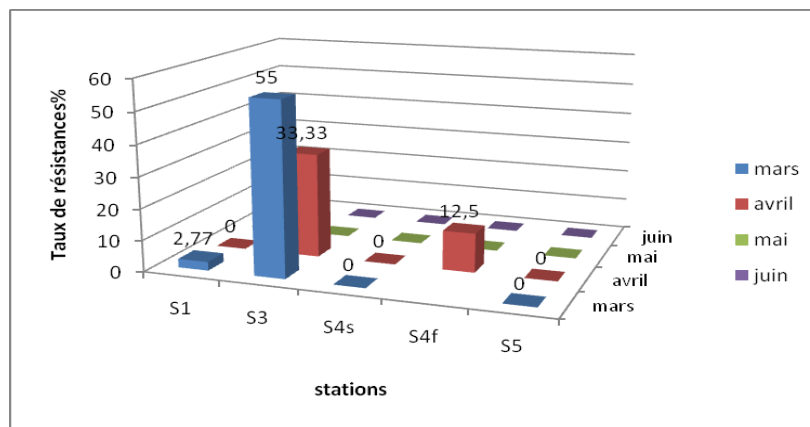


Figure 32: Taux de résistance des coliformes totaux au ciprofloxacine (quinolone)

En ce qui concerne la résistance aux bêta-lactamines, les résultats obtenus montrent une résistance marquée à l'amoxicilline (100%) dans la station S1 durant le mois de mars, suivi par des taux de 90 %, 75 %, et 60% respectivement pour S5, S4S et S4F et cela en moi de juin (Figure 26).

La résistance à la ticarcilline suit la même variation que l'amoxicilline. Un taux de résistance de 100% a été rencontré dans la station S5 durant le mois d'avril, suivi d'un taux de 50% dans la station S4S durant le mois de juin et des taux de 20% dans la station S4S et S4F durant les deux mois d'avril et de juin et en fin un taux de 16% dans la station S5 en Mai (Figure 27). Ces résistances peuvent avoir deux origines : soit une résistance naturelle par la production de pénicillinase comme chez *Klebsiella* ou une céphalosporinase comme chez *Enterobacter*, soit une résistance acquise chez les espèces sensibles comme *E.coli* (Vedel, 1997).

Pour les céphalosporines de deuxième génération FOX nous avons constaté des taux de résistance de 100% au niveau de S5 durant les mois d'avril et de juin et de 25% au niveau de la station S4S en juin, un taux de 20% a été observé en mois de Mars (figure28).

La résistance à cette molécule augure la production de céphalosporinase qui souvent naturelle chez les espèces *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* et acquise chez les autres coliformes (Vedel, 1997).

Pour les céphalosporines de troisième génération (CTX et CAZ), les taux de résistance observé ont été faibles avec les plus grand taux de 15 % pour le céfotaxime au niveau de la station S5 durant le mois de mars et un taux de 27,78 à S1 en durant le mois de Mars en fin un taux de 6% pour la ceftazidime au niveau des rejets de la ferme en mois de juin (Figure 29 et 30). Ces faibles pourcentages seraient dus à la faible présence de ces molécules dans l'environnement et spécialement dans l'aquaculture, mais ils peuvent indiquer la présence de certains mécanismes acquis (la production de bêta-lactamases à spectre élargi et les céphalosporinases plasmidiques) (Philippon et arlet, 2005).

Mêmes résultats ont été obtenus pour le carbapénème (imipénème) qui est une molécule très efficace en thérapeutique, où aucune résistance n'a été observée (figure 31). En effet, l'ensemble des coliformes sont sensibles à cette molécule. Cependant une résistance à cette molécule peut se traduire soit par le mécanisme de l'imperméabilité ou par la production de metallo-bétalactamses (Vedel, 1997).

En ce qui concerne la ciprofloxacine qui est un fluoroquinolone très utilisé en clinique humaine et même en médecine vétérinaire, des résistances ont été observées pour la station S3 durant le mois de mars avec un taux de 55% et de 33% en Avril suivi d'un taux de 12.5 durant le mois d'avril (figure 32). Cette résistance est de type acquis chez tous les coliformes (nordmann et poirel, 2005).

III-3- Identification des bactéries résistantes

L'identification par galerie API20E des bactéries résistantes aux antibiotiques a révélée les résultats suivant (tableau4):

Bactéries résistantes à amoxicilline : Le nombre des bactéries résistantes à l'amoxicilline était de 14. Leur identification nous a permis de les assigner aux espèces suivantes : *Escherichia coli* (n=3), *Klebsiella oxytoca* (n=2), *Klebsiella pneumoniae* (n=1), *Citrobacter braakii* (n=1), *Enterobacter cloacae* (n=1), *Enterobacter sakazakii* (n=2), *Enterobacter cancerogenus* (1), *Kluyvera sp* (n=2) et *Pontoae sp* (n=1).

D'après ces résultats nous constatons que la majorité des espèces présentent une résistance naturelle à l'amoxicilline en dehors des *Echerichia coli* qui présentent une résistance acquise à cette molécule (Vedel, 1997).

Bactéries résistantes à la ticarcilline : Les quatre bactéries résistantes à la ticarcilline présentent une résistance naturelle par la production d'une pénicillinase de type SHV pour *K.pneumoniae* et de type OXY pour *K oxytoca* (Vedel, 1997).

Bactéries résistante à la ciprofloxacine : Les quatre bactéries résistantes à la ciprofloxacine appartiennent à l'espèce *Escherichia coli*. Cette espèce est naturellement sensible aux quinolones et cette résistance est de type acquis (Nordmann et poirel, 2005)

Tableau 4: identité des souches résistantes aux antibiotiques

Antibiotique	Numéro	Identifiant	% d'identification	Espèce (n)
Amoxicilline (n=14)	09	5044532	99.0%	<i>Escherichia coli</i> (3)
	13	5044512	85.5%	
	15	5004552	89.9%	
	17	5144512	98.1%	
	01	3704553	99.8%	<i>Citrobacter braakii</i> (1)
	06	5255773	97.4%	<i>Klebsiella oxytoca</i> (2)
	11	5244573	52.5%	
	07	52157713	98.7%	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)
	08	3345573	97.7%	<i>Enterobacter sakazakii</i> (2)
	10		91.1%	
	03	3305573	95.1%	<i>Enterobacter cloacae</i> (1)
	16	3304133	99.5%	<i>Enterobacter cancergenus</i> (1)
	02	13441413	99.6%	<i>Kluyvera sp</i> (2)
	05	5144573	83.9%	
04	3204126	91.1%	<i>Pentoea sp</i> (1)	
Ticarcilline (n=04)	23	5254773	94.8%	<i>K oxytoca</i> (3)
	25	5255773	97.4%	
	26	5215773	97.6%	<i>K pnemmoiae</i>
	24	1344163	99.5%	<i>Kluyvera spp</i>
Ciprofloxacine (n=6)	18	5144572	99.5%	<i>Escherichia coli</i> (4)
	19	5044152	97.2%	
	20	5144552	99.9%	
	21	5044552	99.8%	

III-4- Caractérisation des phénotypes de résistance par antibiogramme

Certaines souches résistantes (n=11) ont fait l'objet d'une détermination de leur profil de résistance par antibiogramme. Les résultats obtenus ont montré (tableau 6).

Pour les souches résistantes à l'amoxicilline nous avons constaté une résistance uniquement à cette molécule chez les *E.coli* et *E. sakazakii* ce qui suggère la production d'une pénicillinase à bas niveau (Vedel, 1997). La résistance de l'*E.cloacae* est due à une résistance naturelle par la production d'une céphalosporinase chromosomique confirmée par la résistance à plusieurs molécules de bêta-lactamines spécifiquement à FOX (philippon et arlet, 2005). Pour les *K. pneumoniae* isolées sur AMX et TIC, elles présentent des phénotypes naturels dus à la production d'une pénicillinase à bas niveau (Vedel, 1997).

En plus des bêta-lactamines, ces souches ont présenté une résistance à la rifampicine et au trimethoprime. Ce dernier est utilisé en médecine vétérinaire (Sapkota et al, 2008).

Pour les souches résistantes aux quinolones, nous avons constaté qu'elles sont toutes des *E.coli* multirésistantes. Ces souches résistent à trois molécules appartenant à la famille des quinolones (NA, CIP, PEF). Cette résistance serait habituellement due chez les entérobactéries, à des mutations dans les gènes chromosomiques codants pour l'ADN gyrase et la topoisomérase IV. Cette résistance peut être augmentée par l'imperméabilité et l'augmentation du système d'efflux (Nordmann et poirel, 2005). En parallèle, ces souches présentent des résistances à d'autres familles principalement les sulfamides, trimethoprime, chloramphénicol et tétracycline voire même l'amoxicilline pour une souche (20). Toutes ces molécules sont utilisées en médecine vétérinaire ou comme facteurs de croissance (Sapkota et al, 2008).

Tableau 5: Antibiotypes des souches résistantes

SOUCHE	ANTIBIOTYPE	N° DE RESISTANCES
<i>Kluyvera sp</i> (2)	TMP	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)	AMX TMP	2
<i>Enterobacter sakazakii</i> (2)	AMX RA	2
<i>Pentoea sp</i> (1) (I)	AMX TMP	2
<i>K pneumoiae</i>	AMXTIC TMP	3
<i>Pentoea sp</i> (1) (II)	AMX RA TMP	3
<i>Enterobacter cloacae</i> (1)	AMX MEC FOX RA TMP	5
<i>Escherichia coli</i> 2	TE SSS TMP CIP PEF	5
<i>Escherichia coli</i> 3	MEC TE C SSS TMP CIP PEF	7
<i>Escherichia coli</i> 1	AMX TE C RA SSS NA CIP PEF	8
<i>Escherichia coli</i> 5	AMX MEC CTX CRO CAZ ATM TE C TMP	9
<i>Escherichia coli</i> 4	AMX MEC CTX CRO ATM FEP CPO FOX RA SSS NA CIP	12

III-5- Transfert génétique par conjugaison bactérienne

Afin de déterminer le support de la résistance, des transferts génétiques par conjugaison bactérienne ont été réalisés pour les souches résistantes à la ciprofloxacine (18, 19 et 20) et quelques souches résistantes à l'amoxicilline (7). Aucun transfert n'a été concluant ce qui suggère que la résistance à la ciprofloxacine est due à des mutations chromosomiques comme c'est décrit dans la majorité des cas (**nordmann et poirel, 2005**). De même pour les bêta-lactamines, cette résistance est due à une mutation chromosomique (**Vedel, 1997**).

Conclusion

CONCLUSION

Le but de cette étude a été l'évaluation de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif au niveau de la ferme marine ONDPA de Cap Djinet wilaya de Boumerdes.

D'après les résultats obtenus nous avons pu constater que :

- La ferme bénéficie d'une eau de bonne qualité physico-chimique et microbiologique sauf pour la charge en matière en suspension qui était élevée.

- La prévalence de la résistance aux antibiotiques a montré des résistances à l'amoxicilline, ticarcilline et céfoxitine. Ces résistances peuvent être soit de type naturel chez les entérobactéries ou de type acquis. Une sensibilité au cefotaxime, ceftazidime et imipénème a été notée ce qui augure de l'absence de bactéries productrices de mécanismes acquis (Béta-lactamases à spectre élargi ou métallobéta-lactamases). En ce qui concerne la ciprofloxacine, des résistances ont été observées durant le mois de mars dans le bassin de prégrossissement de la daurade. Cette résistance est acquise et serait dû soit aux alvins soit à l'aliment.

- La caractérisation de la résistance aux antibiotiques parmi les coliformes totaux isolés a révélé que :

- La majorité des espèces présentent une résistance naturelle à l'amoxicilline par la production de pénicillinase (*Klebsiella*) ou de céphalosporinase (*E.collocaea*), en dehors des *Escherichia coli* qui présentent une résistance acquise à cette molécule.

- Les bactéries résistantes à la ticarcilline présentent toutes une résistance de type naturelle par production de pénicillinase.

- Les bactéries résistantes à la ciprofloxacine appartiennent à l'espèce *Escherichia coli*. Cette espèce est naturellement sensible aux quinolones et cette résistance est de type acquis due à une mutation chromosomique. De plus, ces souches sont multirésistantes à plusieurs familles d'antibiotiques.

A la lumière de ces résultats, il est important de signaler que les taux de résistance aux antibiotiques obtenus restent faibles vu le nombre de coliformes présents et le phénomène de dilution observé. Cependant, la présence de souches d'*E.coli* résistantes aux quinolones ainsi qu'à d'autres familles montre le rôle de l'aquaculture dans l'apparition et la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez le poisson et dans l'environnement et en fin de chaîne, chez l'homme.

En perspective à ce travail, il serait intéressant de :

- caractériser les mécanismes de résistance retrouvés chez les souches résistantes afin de comprendre leur dissémination.

- faire un réseau de surveillance de l'état de la résistance aux antibiotiques dans les zones aquacoles tels que c'est fait pour d'autres animaux d'élevage: volaille, bétail, porc...etc .

- réglementer l'utilisation des antibiotiques afin d'éviter la pression de sélection
- rechercher l'origine de cette résistance en contrôlant l'aliment, le poisson, et le milieu extérieur.

Références Bibliographiques

Aminot A. et Chaussepied M., 1983. Manuel des analyses chimique en milieu marin .Ed CNEOX, 396p.

Arib S. et Boubekeur S., 2005. Etude de faisabilité techno-économique d'une ferme aquacole marine du loup et de la daurade (cas d'étude : Ferme Mlata) Wilaya. Tizi Ouzou. *Mém. Ing. Aqua.*, ISMAL. 45p

Barnabé G et Billard R., 1984 : L'aquaculture du bar et des sparidés. Ed INRA, 542p.

Barnabé G., 1991 : Bases biologiques et écologiques de l'aquaculture. Ed Lavoisier Tec & Doc, Paris, 489p.

Barnabé. G., 1989 : Élevage du loup et de la daurade. In Aquaculture volume II. Ed Lavoisier Tec & Doc Paris : 675-716p.

Bénéteau. C, Chinzi D., 1998 : Référence aquaculture. Ed ENETA de Bordeaux, 307p.

Billard R., 2005 : Introduction à l'aquaculture. Ed Lavoisier Tec & Doc, Paris. 235p

Bryskier A., 1999 : Antibiotiques agent antibactérien et antifongiques.1216p

Cavallo J-D.;Fabre R.; JelhlF. ; RappC. Et Garrabé E .,2004 : B-lactamines : B-lactam antibiotics.EMC-maladies infectieuses 1 :129-202.

Colmen K.,Athalye M., Clancey A., Davision M.,Payne D.J.,Perry C.R.,Chopra L.

1994: Bactérial resistance mechanisms as therapeutic targets. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 33.p.1094-1116

Colwell R.R., 1987 : Jornal d'application bactériologiques.63,1p.

Doublet, B.; 2004 : Caractérisation des éléments génétiques du gène de résistance au florofénicol flor chez *Salmonella enterica et Escherichia coli*. Thèse de doctorat . université de Tours.

FAO : FOOD ALIMENTATION ORGANISATION

Gaujous D.,1995 : La pollution des milieux aquatiques Aide-mémoire. Ed Lavoisier Tec & Doc Paris, 220 p.

Géoffroy V., 2008 : Bases biologiques et techniques de l'aquaculture. L'évaluationde la qualité d'une eau en aquaculture. In **Ferra C., 2008.** Aquaculture. Ed. Vuibert Paris : 131-156p.

Innovagro consultants : Valorisation des rejets thermiques industriels et aquaculture.

MENIF B., NAMDARI F., Sous la direction de Mr Marc GALIMAND 2007 : RESISTANCE PLASMIDIQUE AUX QUINOLONONES Master 2

Nordmann, P., et L. Poirel 2005: Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. J Antimicrob. Chemother. 56: 463-469.

Pathak S.P.,Gopal K.,2005: Occurrence of antibiotic and metal resistance in bacteria from organs of river sifh. Environmental Research.98.p.100-103

Perry JJ., Staley JT et Lory S., 2004 : Microbiologie : cours et questions de révision. Ed. DUNOD, Paris, 891p

Philippon A et Arlet G, 2005 Les béta-lactamases chez les bacilles à Gram –négatif :que de nouveautés en 15 ans. Revue Française des laboratoires7 :247-259.

Rodier J., Bzin C., Broutin J.P., Chmbon P.,Champsaur H., et Rodi L., 2005 : L'analyse de l'eau. eau naturelle, eaux résiduelles, eau de mer. *Ed. DUNOD*, 1383p.

Rodier J., Bzin C., Broutin J.P., Chmbon P.,Champsaur H., et Rodi L., 2005 L'analyse de l'eau. eau naturelle, eaux résiduelles, eau de mer. *Ed. DUNOD*, 1383p.

Sapkota a, Margaret Kucharski b, Janelle Burke c, Shawn McKenzie b,Polly Walker b, Robert Lawrence Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities

Singleton P., 1984 Bactériologie. *Ed. Masson, Paris*. 158p

Vedel, 1997 La lecture interprétative facteur de maitrise de l'antibiogramme spectro biologie 16 : 31-38 .

Annexes

Annexes

Les milieux de culture

❖ **Gélose Muller-Hinton :**

Macération de viande de bœuf	300g
Hydrolysate de caséine.....	17,5g
Amidon	1,5g
Eau distillée.....	1L

pH :7,4

❖ **Gélose Tergitol :**

Peptone	10g
Extrait de viande	5g
Extrait de levure	6g
Lactose	20g
Tergitol 7	10 mg
Bleu de bromothymol	50mg
Agar	13g

pH : 7 .2

Bouillon cerveau-cœur :

Protéose peptone.....	10g
Infusion de cervelle de bœuf.....	5g
Chlorure de sodium	5g
Phosphate disodique	2.5g
Glucose	2g
Eau distillée	1L

ph :7,4

Bouillon nutritif :

Pepton	10g
Extrait de levure	5g
Chlorure de sodium	5g
Eau distillée	1L

pH : 7,3

Eau physiologique :

Chlorure de sodium	9g
Eau distillée	1L

Répartir en tubes à essais à raison de 5 ml par tube et stérilisé à 120 °C pendant 20 minutes

Annexe

Tableau 1: l'antibiogramme des souches sélectionnées

	BOITE 1						BOITE 2							BOITE 3						
Anti biotique	AMX	MEC	CTX	CRO	CAZ	ATM	FEP	CPO	FOX	IMP	TE	C	RA	SSS	TMP	GEN	K	NA	CIP	PEF
<i>E coli</i> 1	0 <i>R</i>	17 <i>R</i>	40 <i>S</i>	38 <i>S</i>	36 <i>S</i>	42 <i>S</i>	42 <i>S</i>	28 <i>S</i>	28 <i>S</i>	42 <i>S</i>	0 <i>R</i>	0 <i>R</i>	20 <i>S</i>	0 <i>R</i>	0 <i>R</i>	36 <i>S</i>	0 <i>S</i>	0 <i>R</i>	0 <i>R</i>	0 <i>R</i>
<i>E coli</i> 2	0 <i>R</i>	25 <i>S</i>	42 <i>S</i>	40 <i>S</i>	36 <i>S</i>	42 <i>S</i>	40 <i>S</i>	36 <i>S</i>	28 <i>S</i>	30 <i>S</i>	0 <i>R</i>	22 <i>I</i>	20 <i>S</i>	0 <i>R</i>	0 <i>R</i>	35 <i>S</i>	0 <i>S</i>	16 <i>I</i>	0 <i>R</i>	0 <i>R</i>
<i>E coli</i> 3	30 <i>R</i>	44 <i>S</i>	44 <i>S</i>	30 <i>S</i>	38 <i>S</i>	46 <i>S</i>	44 <i>S</i>	39 <i>S</i>	36 <i>S</i>	44 <i>S</i>	0 <i>R</i>	0 <i>R</i>	22 <i>S</i>	24 <i>S</i>	<i>R</i>	36 <i>S</i>	36 <i>S</i>	0 <i>R</i>	19 <i>R</i>	0 <i>R</i>
<i>Enterobacter</i> <i>cloacae</i>	6,6 <i>R</i>	26 <i>R</i>	47 <i>S</i>	36 <i>S</i>	36 <i>S</i>	36 <i>S</i>	34 <i>S</i>	28 <i>S</i>	21 <i>R</i>	36 <i>S</i>	36 <i>S</i>	34 <i>S</i>	18 <i>R</i>	26 <i>S</i>	36 <i>R</i>	38 <i>S</i>	26 <i>S</i>	30 <i>S</i>	36 <i>S</i>	26 <i>S</i>
<i>E coli</i> 4	16 <i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	15 <i>R</i>	24 <i>I</i>	17 <i>R</i>	0 <i>R</i>	0 <i>R</i>	15 <i>R</i>	30 <i>S</i>		20 <i>I</i>	12 <i>R</i>	<i>R</i>	0 <i>R</i>	30 <i>S</i>	26 <i>S</i>	0 <i>R</i>	15 <i>R</i>	23 <i>S</i>
<i>pentoea sp</i> <i>II</i>	<i>S</i>	20 <i>R</i>	36 <i>S</i>	<i>S</i>	42 <i>S</i>	36 <i>S</i>	36 <i>S</i>	30 <i>S</i>	09 <i>R</i>	30 <i>S</i>	23 <i>S</i>	26 <i>S</i>	12 <i>R</i>	20 <i>S</i>	28 <i>R</i>	28 <i>S</i>	30 <i>S</i>	26 <i>S</i>	36 <i>S</i>	28 <i>S</i>
<i>pentoea sp</i> <i>I</i>	<i>R</i>	26 <i>I</i>	36 <i>S</i>	36 <i>S</i>	26 <i>S</i>	38 <i>S</i>	36 <i>S</i>	30 <i>S</i>	30 <i>S</i>	36 <i>S</i>	44 <i>S</i>	34 <i>S</i>	20 <i>S</i>	22 <i>S</i>	36 <i>R</i>	36 <i>S</i>	26 <i>S</i>	30 <i>S</i>	34 <i>S</i>	32 <i>S</i>
<i>Kluyvera sp</i>	30 <i>S</i>	34 <i>S</i>	36 <i>S</i>	<i>S</i>	34 <i>S</i>	42 <i>S</i>	40 <i>S</i>	28 <i>S</i>	36 <i>S</i>	36 <i>S</i>	36 <i>S</i>	34 <i>S</i>	20 <i>S</i>	20 <i>S</i>	26 <i>R</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	30 <i>S</i>	40 <i>S</i>	<i>S</i>
<i>K pnemmoniae</i>	<i>R</i>	30 <i>S</i>	36 <i>S</i>	32 <i>S</i>	28 <i>S</i>	40 <i>S</i>	36 <i>S</i>	26 <i>S</i>	26 <i>S</i>	34 <i>S</i>	28 <i>S</i>	31 <i>S</i>	14 <i>I</i>	28 <i>S</i>	30 <i>R</i>	40 <i>S</i>	34 <i>S</i>	24 <i>S</i>	36 <i>S</i>	38 <i>S</i>
<i>K pnemmoniae</i>	<i>R</i>	25 <i>S</i>	22 <i>I</i>	-	35 <i>S</i>	36 <i>S</i>	38 <i>S</i>	26 <i>S</i>	26 <i>S</i>	36 <i>S</i>	-	28 <i>S</i>	36 <i>S</i>	28 <i>S</i>	32 <i>R</i>	22 <i>S</i>	42 <i>S</i>	42 <i>S</i>	36 <i>S</i>	30 <i>S</i>
<i>E sakazaki</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	-	-	-	-	36 <i>S</i>	26 <i>S</i>	18 <i>I</i>	46 <i>S</i>	-	28 <i>S</i>	<i>R</i>	28 <i>S</i>	<i>S</i>	<i>s</i>	<i>S</i>	28 <i>S</i>	-	<i>S</i>
<i>E sakazaki</i>	<i>R</i>	26 <i>S</i>	35 <i>S</i>	-	36 <i>S</i>	35 <i>S</i>	36 <i>S</i>	-	28 <i>S</i>	36 <i>S</i>	-	26 <i>I</i>	<i>R</i>	26 <i>S</i>	36 <i>R</i>	30 <i>S</i>	30 <i>S</i>	26 <i>S</i>	-	30 <i>S</i>
<i>E coli</i> 5	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	42	30	30	36	<i>R</i>	<i>R</i>	20	26	<i>R</i>	30	38	0	14	0