

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 : ENVIRONNEMENT

Sujet :

# *Prévalence et caractérisation de la résistance aux béta-lactamines chez des bactéries de l'environnement marin*

**Présenté par :**

M<sup>elle</sup> BENALLAOUA Siham

**Soutenu le 06 Juillet 2009 devant la commission de jury suivante:**

Mme CHAOU N.

Maître assistante (ENSSMAL)

**Président**

Mme AMAR I.

Maître assistante (ENSSMAL)

**Examineur**

Dr. IABADENE H.

Chargé de cours (USTHB)

**Examineur**

M<sup>elle</sup> ALOUACHE S.

Maître assistante de classe A(ENSSMAL)

**Promoteur**

**-Promotion 2009-**

## Remerciements

Ce travail a été réalisé en collaboration entre l'ENSSAML et le laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de la faculté des Sciences Biologiques de l'USTHB. Il n'aurait pu être effectué sans l'accord, le soutien et l'aide de plusieurs personnes auxquelles je tiens à exprimer ici ma gratitude et ma reconnaissance.

Tout d'abord mes remerciements vont au Professeur BAKOUR R., directeur de l'ENSSAML et responsable de l'équipe de génétique à la faculté des sciences biologiques, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et d'avoir proposé ce thème qui est d'actualité.

J'exprime également ma gratitude à ma promotrice, Mademoiselle ALOUACHE Souhila, maître assistante de classe A à l'ENSSMAL et membre du laboratoire de génétique (USTHB), pour son bon encadrement, son enthousiasme pour la recherche, son savoir faire et surtout sa gentillesse et sa simplicité.

Ce travail rentre dans le cadre du Magister de Mr KADA Mohamed sous la direction du Pr R. BAKOUR que je remercie pour sa collaboration et son soutien moral.

Ma reconnaissance s'adresse également à :

-Madame CHAOU N., maître assistante à l'ENSSMAL,

-Madame BOUAZIZ AMARI., maître assistante à l'ENSSMAL et

-Docteur YABADENE H., chargé de cours à la faculté des sciences biologiques (USTHB);

D'avoir bien voulu examiner et corriger ce travail malgré leurs nombreuses préoccupations .

Mes remerciements vont également aux membres du laboratoire de génétique spécialement au Dr. MESSAI Y., pour sa disponibilité et son aide.

Je remercie aussi madame REFES Ingénieur au laboratoire de microbiologie à l'ENSSMAL pour sa serviabilité et sa gentillesse.

Ma gratitude et reconnaissance s'exprime à toutes les personnes ayant contribué, chacune à sa manière, pour le bon déroulement de notre formation, ainsi qu'à la réalisation de ce modeste travail.

***Je dédie ce modeste travail :***

*A mes parents Rachid et Louiza : Vos prières et vos conseils m'ont suivi et m'ont permis d'atteindre le bout du chemin ; voyez à travers ce travail mon amour sincère et ma gratitude profonde.*

*In memoriam: à mon très cher grand père Moussa et mon très cher oncle Khoudir, que le Bon DIEU vous accorde la vie éternelle dans son vaste paradis. Amen !*

*A mes sœurs : Nacéra, Fatma, Kahina, Lamia, Lydia et ma petite sœur adorable Sarah et*

*A mes chers frères Farid et Nabyl : J'ai beaucoup apprécié l'estime et l'amour fraternel que vous me portez, et surtout votre soutien malgré la distance.*

*A ma tante Dida et tonton Khoudir et mes cousins : Karima, Zahia, Hamou et Sofiane : ce travail vous est dédié spécialement à vous car sans vous il ne sera rien*

*A mes belles sœurs Sadika et Hassina et mes beaux frères Rachid et Fayçal et*

*A mes oncles et tantes paternels(es) et maternels(es) sans exception : ce travail vous est dédié en signe d'affection.*

*A mes cousins et cousines, neveux et nièces ; Que Dieu fasse que vous suiviez mes traces et que vous fassiez plus que moi. Je vous aime tant.*

*En souvenirs de nos efforts en communs :*

*A tous mes amis(es), chacun se reconnaît sans que je cite des noms : je ne pourrai vous oublier un jour.*

*A vous Melle Alouache, ma promotrice : je vous garderai l'image de l'enseignante toujours soucieuse de transmettre à l'étudiant le sens de la rigueur et du travail bien fait.*

## SOMMAIRE

INTRODUCTION .....	1
I. GENERALITES.....	3
I.1. LES $\beta$ -LACTAMINES .....	3
I.1.1. Définition .....	3
I.1.2. Structure et Classification .....	3
I.1.2.1. Les pénames .....	4
I.1.2.2. Les pénèmes .....	4
I.1.2.3. Les céphèmes .....	4
I.1.2.4. Les monobactames .....	4
I.1. 3. Mécanismes d'action des $\beta$ -lactamines.....	6
I.1.4. Mécanismes de résistance .....	7
I.1.5.1. Mécanismes non enzymatiques.....	8
I.1.5.2. Mécanismes enzymatiques.....	10
I.2. LES $\beta$ -LACTAMASES .....	10
I.2.1. Définition .....	10
I.2.2. Mécanismes d'action des $\beta$ -lactamases .....	10
I.2.2.1. Hydrolyse enzymatique.....	10
I.2.2.2. Séquestration .....	11
I.2.3. Classification des $\beta$ -lactamases.....	11
I.2.3.1. Classification d'Ambler .....	12
I.2.4.1. Classe A .....	14
I.2.4.2. Classe B.....	15
I.2.4.3. Classe C.....	16
I.2.4.4. Classe D .....	17

I.3. RESISTANCE BACTERIENNE DANS L'ENVIRONNEMENT : .....	18
II. MATERIELS ET METHODES .....	20
II.1. PRESENTATION DE LA ZONE D'ETUDE .....	20
II.2. METHODES .....	22
II.2.1. Prélèvement .....	22
II.2.2. Etude paramétrique et microbiologique.....	22
II.2.2.1. Salinité .....	22
II.2.2.2. Oxygène dissous .....	22
II.2.2.3. Potentiel hydrogène (pH).....	22
II.2.2.4. La température .....	23
II.2.2.5 Demande biologique en oxygène (DBO <sub>5</sub> ) (Rodier et <i>al.</i> , 1996).....	23
II.2.2.6. Matière en suspension (MES).....	23
II.2.2.7. Analyse microbiologique par la méthode de filtration sur membrane (Rodier et <i>al.</i> , 1996) .....	24
II.2.3. Prévalence de la résistance aux antibiotiques .....	24
II.2.4. Caractérisation de la résistance aux antibiotiques (CTX ou IMP).....	25
II.2.4.1. Isolement et Identification bactérienne.....	25
II.2.4.2. Diffusion en milieu gélosé : Antibiogramme .....	26
II.2.4.3. Détection des $\beta$ -lactamases inductibles : test d'antagonisme :.....	27
II.2.4.4. Détection des $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE) : test de synergie....	28
II.2.4.5. Transfert génétique par conjugaison bactérienne .....	28
II.2.4.6. Recherche de gènes BLSE par PCR (Polymerase Chain Reaction) .....	29
II.2.4.7. Electrophorèse sur gel d'agarose .....	31
III. RESULTATS ET DISCUSSIONS .....	32
III.1. ETUDE PARAMETRIQUE ET MICROBIOLOGIQUE .....	32
III.2. PREVALENCE DE LA RESISTANCE AUX BETA-LACTAMINES .....	34

III.2.1. Prévalence de la résistance aux bêta-lactamines de la flore totale .....	34
III.2.2. Prévalence de la résistance aux antibiotiques chez les coliformes totaux....	35
III.3. Caractérisation de la résistance de souches sélectionnées.....	36
III.3.1. Résistance à l'imipénème .....	36
III.3.1.1. Identification bactérienne .....	36
III.3.1.2. Résistance aux antibiotiques.....	37
III.3.2. Résistance au cefotaxime .....	40
III.3.2.1. Identification bactérienne .....	40
III.3.2.2. Résistance aux antibiotiques : .....	41
III.3.3. Production de céphalosporinases inductibles .....	45
III.5.2. Production de $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE) .....	48
III.6. Transfert génétique par conjugaison bactérienne .....	48
III.7. Recherche de gènes BLSE par PCR.....	50
CONCLUSION .....	52
BIBLIOGRAPHIE .....	54

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Structure du cycle commun $\beta$ -lactame (cavallo et <i>al.</i> , 2004).....	3
<b>Figure 2</b> : Structure des $\beta$ -lactamines (gaillot, 2007).....	5
<b>Figure 3</b> : Structure de l'acide clavulanique (cavallo et <i>al.</i> , 2004) .....	5
<b>Figure 4</b> : Mecanismes de resistances a l'antibiotique .....	7
<b>Figure 5</b> : Systeme d'efflux chez <i>pseudomonas aeruginosa</i> ( <a href="http://www.medscape.com">http://www.medscape.com</a> ). .....	9
<b>Figure 6</b> : Mode d'action des $\beta$ -lactamases a serine (livermore, 1995).....	11
<b>Figure 7</b> : Parcours de la transmission des bacteries resistantes aux antibiotiques et des genes resistantes. ....	19
<b>Figure 8</b> : Les points de prelevement sur la carte geographique de la baie d'alger.....	20
<b>Figure 9</b> : Schema de la disposition des $\beta$ -lactamines.....	27
<b>Figure 10</b> : Prevalence de la resistance des coliformes totaux aux betalactamines.....	35
<b>Figure 11</b> : Identification bacterienne des souches selectionnees sur l'imp. ....	36
<b>Figure 12</b> : Resultats de la resistance aux $\beta$ -lactamines des souches selectionnees sur imp .....	38
<b>Figure 13</b> : Resultats de la resistance aux antibiotiques non- $\beta$ -lactames des souches selectionnees sur imp. ....	38
<b>Figure 14</b> : Identification bacterienne des souches selectionnees sur ctx.....	40
<b>Figure 15</b> : Resultats de la sensibilite des souches selectionnees sur ctx aux $\beta$ -lactamines.....	41
<b>Figure 16</b> : Resultats de la sensibilite des souches selectionnees sur ctx aux non $\beta$ -lactames.....	41
<b>Figure 17</b> : Image d'antagonisme chez <i>pseudomonas aeruginosa</i> ( $f_3^{ctx}$ ). .....	46
<b>Figure 18</b> : image de synergie chez <i>stentrophomonas maltophilia</i> ( $r_1^{imp}$ a gauche et $s_1^{imp}$ a droite) isolee sur imp.....	49
<b>Figure 19</b> : Image de synergie chez <i>e.coli</i> sur deux boites contenant des disques de beta-lactamines.....	49
<b>Figure 20</b> : Resultat de l'amplification des genes blactx-m blatem. ....	51

## Liste des tableaux

<b>TABLEAU I:</b> hyper expression des systemes d'efflux chez <i>p. aeruginosa</i> et resistance croisee .....	9
<b>TABLEAU II:</b> correspondance entre les classifications moleculaire et fonctionnelle des $\beta$ -lactamases .....	13
<b>TABLEAU III :</b> les sequences des amorces des genes recherches par pcr (kim et <i>al</i> , 2004).....	30
<b>TABLEAU IV :</b> Resultats de mesure des parametres physicochimiques et microbiologiques.....	32
<b>TABLEAU V :</b> Antibiotypes des souches selectionnees sur imp. ....	39
<b>TABLEAU VI:</b> Antibiotypes des souches selectionnees sur ctx.....	44
<b>TABLEAU VII :</b> Resultat positifs du test de l'antagonisme. ....	45
<b>TABLEAU VIII :</b> Resultat du test de synergie .....	48



## **INTRODUCTION**

L'utilisation massive et parfois abusive des antibiotiques, et des  $\beta$ -lactamines en particulier, en ville comme à l'hôpital, a modifié considérablement l'écologie bactérienne.

En réponse à la pression de sélection par les antibiotiques, les bactéries ont développé, tant sur le plan biochimique que génétique, de nombreux mécanismes lui conférant une résistance aux conditions hostile ainsi qu'une évolution génétique par le biais des transferts horizontaux. Ces bactéries combinent notamment des mécanismes qui leur permettent de résister simultanément à divers polluants (plusieurs classes d'antibiotiques, métaux lourds désinfectants...etc) et de devenir ainsi multirésistantes.

Dans l'environnement marin, la présence de bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques appartenant à la famille des Entérobactériaceae est particulièrement inquiétante.

Cette résistance est due à une pollution microbiologique d'une part et à la présence d'antibiotiques dans l'écosystème aquatique d'une autre part. En effet, les résidus d'antibiotiques peuvent persister dans le sédiment ou dans le milieu aquatique pour plusieurs mois après leur administration et peuvent affecter la flore bactérienne du sédiment et entraîner le phénomène d'antibiorésistance chez ces bactéries de l'environnement.

Les bêta-lactamines sont la famille la plus largement utilisée, ceci s'explique par leur diversité, leur efficacité et leur faible toxicité. Les mécanismes de résistances à ces antibiotiques se sont énormément développés au cours des années :

En Algérie, plusieurs études épidémiologiques ont été menées sur les bactéries cliniques résistantes aux antibiotiques. Cependant, il y a peu de données sur la résistance chez des bactéries isolées de l'environnement. Ce phénomène de résistance est une réalité écologique dont les conséquences sur la santé publique commencent à être perçues à travers l'implication directe des bactéries de l'environnement dans les infections et indirectement en tant que réservoir de gènes grâce aux éléments génétiques mobiles.

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche sur la prévalence de la résistance des bactéries de l'environnement marin aux antibiotiques. Il a pour objectifs de faire le point sur la résistance aux antibiotiques des bactéries isolées de l'eau de mer dans

différentes stations et de contribuer à la caractérisation des mécanismes de résistance aux bêtalactamines. Pour se faire nous avons adopté le plan suivant :

- ✚ Caractérisation physico-chimique et microbiologique des eaux prélevées.
- ✚ Prévalence de la résistance à AMX, CTX et IMP
- ✚ Caractérisation phénotypique et génotypique de la résistance à CTX et IMP

# *I. GENERALITES*

## I. GENERALITES

### I.1. LES $\beta$ -LACTAMINES

#### I.1.1. Définition

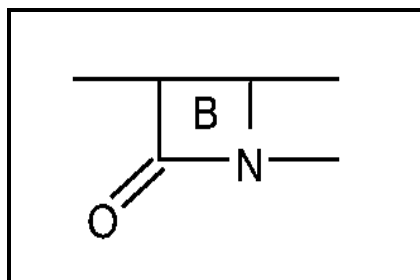
Les béta-lactamines constituent une grande famille d'antibiotiques, la plus importante par le nombre et la diversité des molécules utilisables et par ses indications les plus larges que l'on puisse attribuer à une famille d'antibiotiques. Ce sont des molécules d'origine naturelle (ex : pénicilline G) ou synthétique (ex : Céphalosporines), agissant spécifiquement sur une étape essentielle du métabolisme des bactéries soit par inhibition de leurs croissance (pouvoir bactériostatique) ou, en causant directement leur mort (pouvoir bactéricide) (**Bryskier, 1999**).

Toutes ses molécules sont caractérisées par la présence constante du cycle  $\beta$ -lactame indispensable à l'activité antibiotique, associé ou pas à des cycles et chaînes latérales.

Ces antibiotiques ont une faible toxicité associée à un fort mode d'action sur des protéines membranaires dénommées protéines liant la pénicilline (PLP) (**Cavallo et al., 2004**).

#### I.1.2. Structure et Classification

Les  $\beta$ -lactamines se composent de quatre groupes de molécules : pénames, pénèmes, céphèmes et monolactames. A ces quatre groupes, il faut ajouter les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases dont certaines structures sont incluses dans ces groupes. Sur le plan structural, toutes les molécules de cette famille possèdent un cycle  $\beta$ -lactame, responsable de l'activité antibactérienne (fig 1). (**Le Minor, 1989 ; Bryskier, 1999**).



**Figure 1** : Structure du cycle commun  $\beta$ -lactame (**Cavallo et al., 2004**).

### I.1.2.1. 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  $\beta$ -lactame et une chaîne latérale sur le C6 qui permet de les différencier. On distingue 7 groupes dont les aminopénicillines (ampicilline), les ureidopénicillines (pipéracilline) et les carboxypénicillines (ticarcilline) (**Bryskier, 1999**).

### I.1.2.2. Les pénèmes

Le groupe des pénèmes renferme des molécules synthétiques. Il se caractérise par la présence d'un cycle thiazolidine attaché au cycle  $\beta$ -lactame. Selon l'atome présent en position 1 (soufre, radical  $\text{CH}_2$  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**).

### I.1.2.3. Les céphèmes

Les céphèmes sont constitués d'un noyau  $\beta$ -lactame auquel est accolé un hexa-cycle insaturé (dihydrothiazine). Il existe plusieurs classifications des céphèmes : chimique, microbiologique et pharmacologique. Chimiquement, les céphèmes peuvent être divisés en trois groupes en fonction de l'atome en position 1 du cycle hexa-atomique : soufre (céphalosporines), méthylène (carbacéphèmes) ou oxygène (oxa-1-céphèmes). Chaque groupe peut être subdivisé en fonction de la présence ou non en 7-a d'un groupement méthoxy : les céphamycines (céfoxitine) et les céphalosporines vraies. Les céphalosporines sont traditionnellement divisées en première, deuxième, troisième et quatrième génération (**Bryskier, 1999**).

### I.1.2.4. Les monobactames

Les monolactames se caractérisent par une structure monocyclique (noyau  $\beta$ -lactame). Les monobactames naturels sont de faibles agents antibactériens mais ils se caractérisent par une très bonne stabilité à l'action des  $\beta$ -lactamases. Le premier monolactame développé et utilisé en clinique est l'aztréonam qui dérive d'un monolactame naturel isolé de *Chromobacterium violaceum* et possède une activité primaire sur les bactéries à Gram négatif (**Bryskier, 1999**).

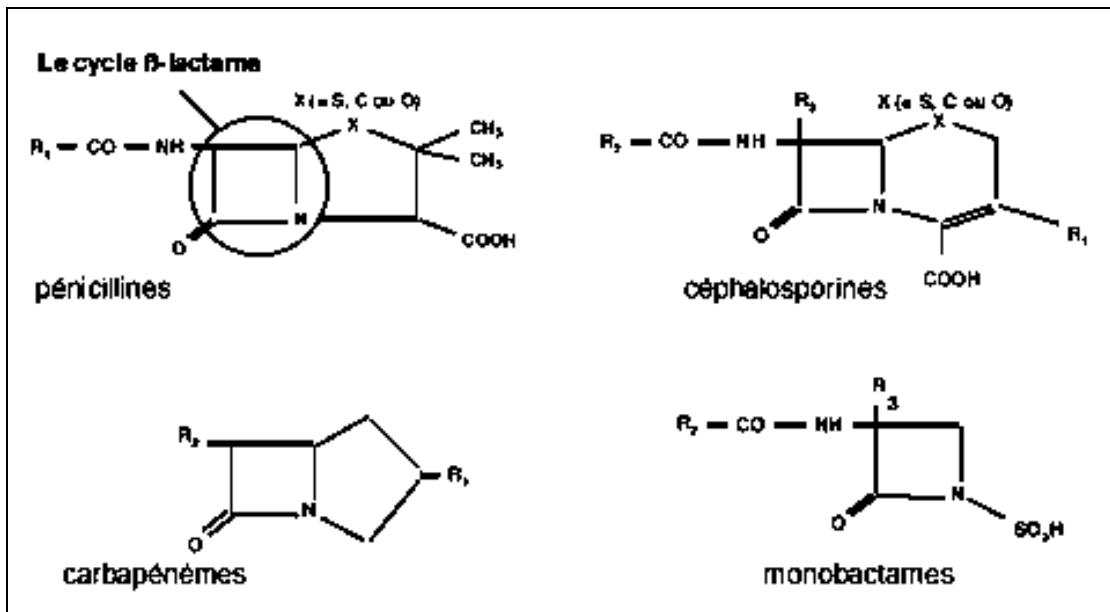


Figure 2: Structure des  $\beta$ -lactamines (Gaillet, 2007).

\*Les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases sont des  $\beta$ -lactamines ayant en commun un noyau pénème où l'atome de soufre est remplacé par un atome d'oxygène pour l'acide clavulanique (fig 3), et par un sulfure pour le sulbactam et tazobactam. Ces derniers ont une faible activité bactérienne, mais ils sont intéressants par leur effet neutralisant des  $\beta$ -lactamases (Bryskier, 1999).

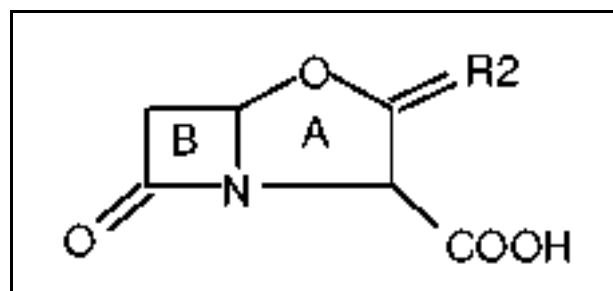


Figure 3: Structure de l'acide clavulanique (Cavallo et al., 2004)

### **I.1. 3. Mécanismes d'action des $\beta$ -lactamines**

Les bêta-lactamines sont des antibiotiques qui interfèrent avec la formation de la paroi bactérienne. En effet, leur structure chimique présentant des ressemblances avec le D-alanyl-D-alanine, leurs permet de se fixer aux protéines liant les pénicillines (PLP) (les transpeptidases et les carboxypeptidases), indispensables à la formation du peptidoglycane. L'inhibition de ces enzymes fait accumuler des précurseurs du peptidoglycane qui activent le système autolytique de la bactérie (la muréine-hydrolase), entraînant ainsi sa lyse. Les bêta-lactamines n'agissent donc que sur les bactéries en croissance. **(Cavallo, 2004 ; Zomahoun, 2004).**

Deux étapes importantes pour l'activité antibactérienne des  $\beta$ -lactamines :

- Pénétration des  $\beta$ -lactamines : La cible des  $\beta$ -lactamines 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 **(Nikaido, 1992).**
- 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.

L'effet bactériostatique par inhibition de la synthèse du peptidoglycane précède la bactéricidie qui résulterait de l'activation des enzymes autolytiques de la bactérie **(Bryskier, 1999)**

### I.1.4. Mécanismes de résistance

Pour agir, les  $\beta$ -lactamines doivent atteindre leurs cibles, qui sont les PLP. Dans un premier temps, elles doivent pénétrer à travers la membrane externe qui est une barrière de perméabilité présente chez les bactéries à Gram négatif, puis traverser le peptidoglycane bactérien et l'espace périplasmique pour se lier avec une certaine affinité aux PLP présentes sur la membrane cytoplasmique et indispensables à la synthèse de la paroi bactérienne. À chacune de ces étapes, la bactérie peut opposer un ou plusieurs moyens de défense. Ces mécanismes peuvent être exprimés soit chez toutes les bactéries d'une même espèce et on parlera d'une résistance naturelle, soit uniquement chez certaines bactéries de l'espèce et on parlera alors d'une résistance acquise. Ces mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines peuvent être de nature enzymatique ou non enzymatique (fig 4) (Cavallo *et al.*, 2004).

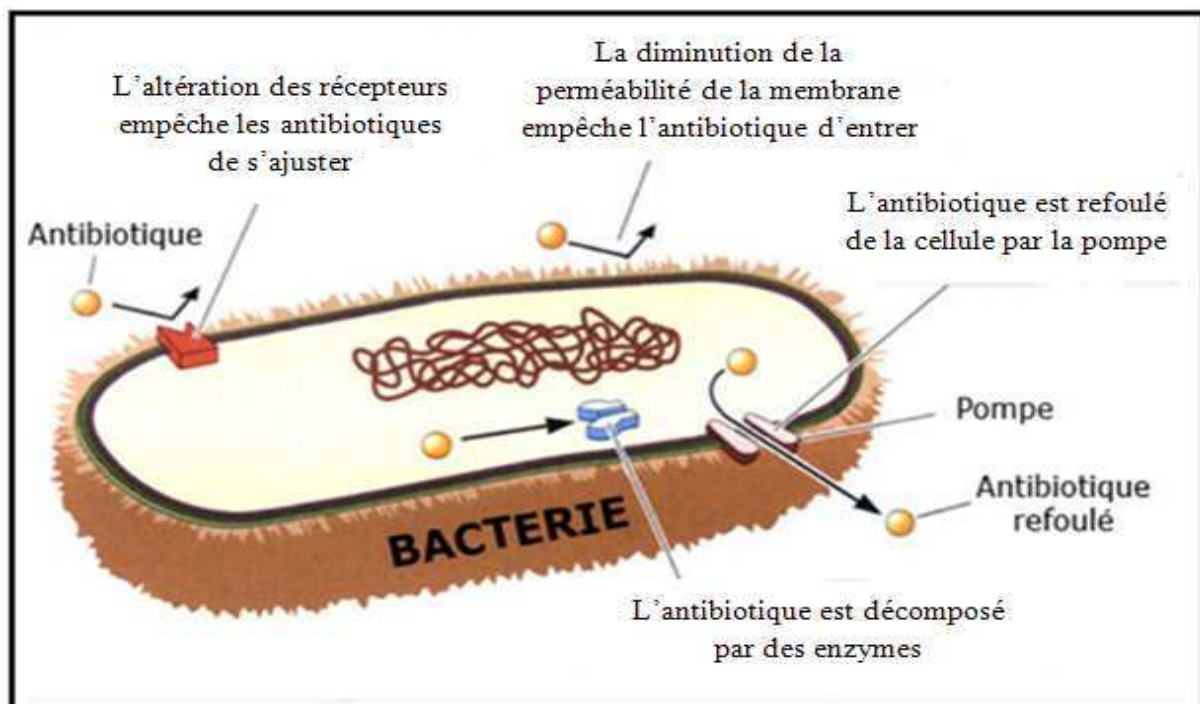


Figure 4 : Mécanismes de résistances à l'antibiotique (<http://reflexions.ulg.ac.be>)

### **I.1.5.1. Mécanismes non enzymatiques**

#### **I.1.5.1.1. Imperméabilité de la membrane externe**

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau. La sensibilité aux  $\beta$ -lactamines dépend du nombre de porines fonctionnelles. L'altération des porines par mutation est à l'origine de résistances acquises aux  $\beta$ -lactamines, soit par une modification structurale d'une des porines essentielles, ce qui a été décrit chez *E. coli*, soit par une diminution quantitative des porines, qui est la situation la plus fréquente.

#### **I.1.5.1.2. Systèmes d'efflux**

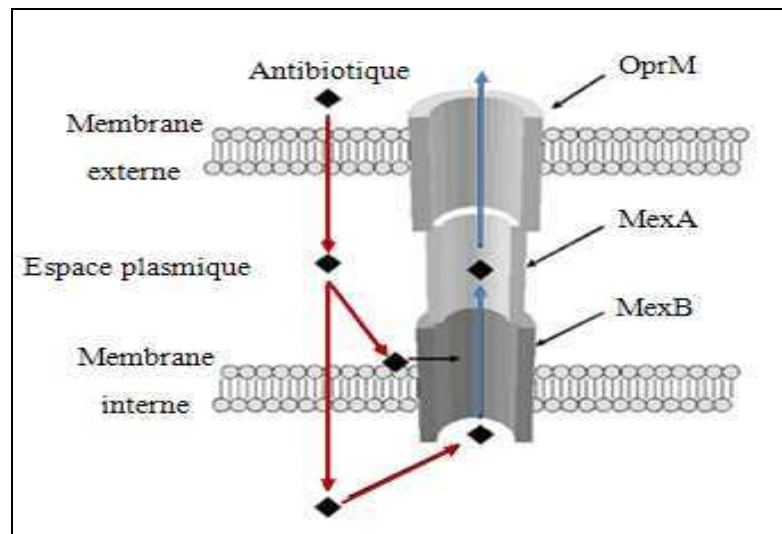
Ces systèmes agissent de la même manière qu'une pompe rejetant les antibiotiques dans le milieu extérieur. L'antibiotique n'arrivant pas atteindre une concentration intracellulaire suffisante, ne peut inhiber totalement sa cible. Le système d'efflux constitutif de type (MexAB-oprM) chez le bacille pyocyanique est constitué d'un ensemble de trois protéines (fig 5) :

- Une protéine d'efflux qui joue un rôle de transporteur située au niveau de la membrane cytoplasmique : MexB ;
- Un canal protéique au niveau de la membrane externe : OprM ;
- Une protéine périplasmique de fusion qui assure la liaison entre les deux membranes : MexA.

Une mutation dans les régions régulatrices (par exemple du gène MexR pour la pompe MexA-MexB-oprM) conduit à une hyperexpression de l'efflux (tableau 1) et augmente l'expulsion des antibiotiques avant qu'ils ne puissent atteindre leur cible. Les résistances ainsi acquises sont croisées entre plusieurs classes d'antibiotiques et varient selon la nature du système impliqué (**Cavallo, 2000**).

**Tableau I:** hyper expression des systèmes d'efflux chez *P. aeruginosa* et résistance croisée (Cavallo, 2000 ; Vedel, 2005).

Systèmes d'efflux	Antibiotiques touchés
MexA-MexB-oprM	Béta-lactamines, fluoroquinolones, triméthoprime, chloramphénicol, cyclines, novobiocine.
MexC-MexD-oprJ	Céfépime, cefpirome, fluoroquinolones, triméthoprime, erythromycines chloramphcol, cyclines.
MexE-MexF-oprN souvent associé à OprD	fluoroquinolones, triméthoprime, chloramphénicol, cyclines, imipénème.



**Figure 5 :** Système d'efflux chez *Pseudomonas aeruginosa* (<http://www.medscape.com>).

#### I.1.5.1.3. Modification des protéines liant la pénicilline

C'est un mécanisme de résistance acquis très largement répandu chez les bactéries à Gram positif, comme *S. aureus*, *S. pneumoniae*, certains *Streptocoques viridans* ou *E. faecium*, et que l'on retrouve également chez certaines bactéries à Gram négatif, comme *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* ou *H. influenzae*. Ces résistances font suite à des mutations dans les gènes chromosomiques qui codent pour les PLP normales ou à l'acquisition de gènes étrangers codant pour des PLP ayant peu d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. On peut ainsi aboutir à des altérations quantitatives et qualitatives des PLP, avec diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines, ou à une substitution dans leurs fonctions des PLP cibles par une autre PLP de moindre affinité (Cavallo *et al.*, 2004).

### **I.1.5.2. Mécanismes enzymatiques**

La production d'enzymes hydrolysant l'antibiotique ( $\beta$ -lactamases), constitue le mécanisme de résistance enzymatique le plus courant chez les bactéries à Gram négatif. Les  $\beta$ -lactamases sont de plus en plus nombreuses et plus variées (**Philippon et al., 1989**). Elles forment un groupe hétérogène d'enzymes d'origine bactérienne capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines par ouverture du cycle  $\beta$ -lactame, structure de base commune à toutes les  $\beta$ -lactamines. Elles constituent de loin le mécanisme le plus répandu de résistance des bactéries aux  $\beta$ -lactamines et ont été à l'origine des premières résistances acquises dès l'apparition des antibiotiques au début des années 1940 (**Cavallo et al., 2004**).

## **I.2. LES $\beta$ -LACTAMASES**

### **I.2.1. Définition**

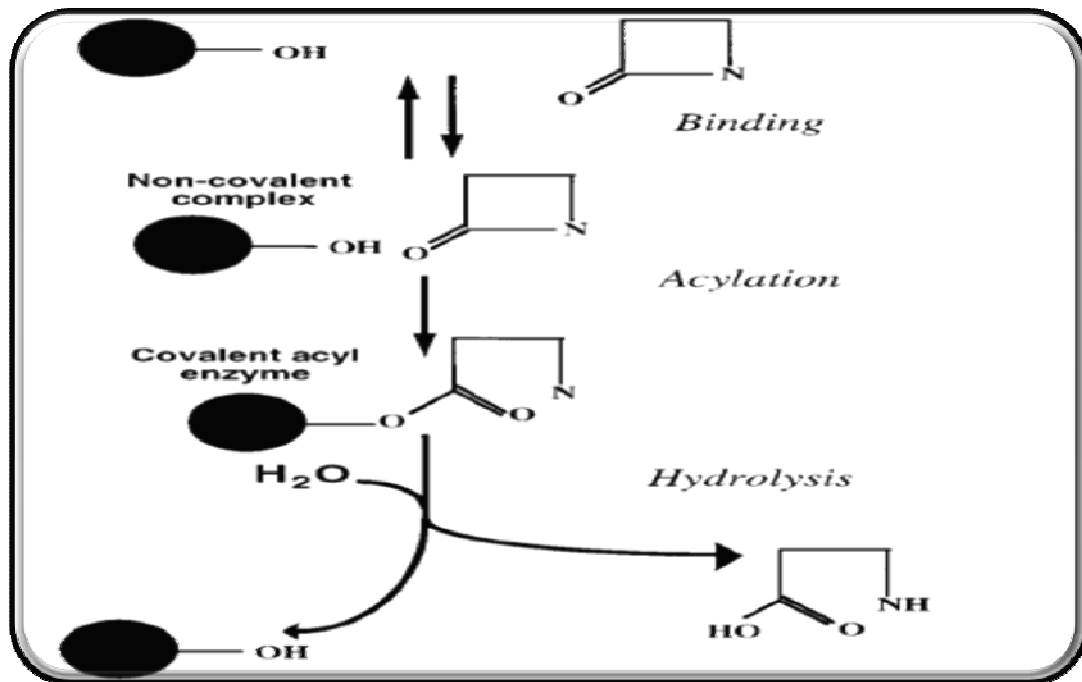
Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes capables d'hydrolyser les antibiotiques en ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame. Ceci va conduire à la production de dérivés inactifs (les pénicillines sont dégradées en acide pénicilloïque et les céphalosporines en acide céphalosporoïque). Ces enzymes sont localisées au niveau de l'espace périplasmique chez les bactéries gram négatif.

Le support génétique des  $\beta$ -lactamases peut être chromosomique ou plasmidique avec une expression inductible ou constitutive (**Livermore, 1995; Charlier et al., 1998**).

### **I.2.2. Mécanismes d'action des $\beta$ -lactamases**

#### **I.2.2.1. Hydrolyse enzymatique**

Dans le cas des  $\beta$ -lactamases à sérine, le cycle  $\beta$ -lactame est hydrolysé selon une réaction d'acylation entre le groupement hydroxyl de la Sérine du site actif des  $\beta$ -lactamases (Fig 6).



**Figure 6:** Mode d'action des  $\beta$ -lactamases à serine (Livermore, 1995).

La réaction conduit à la formation d'un complexe acyl-enzyme transitoire qui est rapidement désacylé permettant la libération de la  $\beta$ -lactamine inactive ainsi que l'enzyme intacte qui va agir en boucle en hydrolysant d'autres molécules de  $\beta$ -lactamine (Frère, 1995).

### I.2.2.2. Séquestration

Dans le cas où la  $\beta$ -lactamase a une très faible affinité pour l'antibiotique, les bactéries grâce à l'hyperproduction de ces enzymes, peuvent être inactivées en le séquestrant sans hydrolyse, l'empêchant ainsi d'atteindre sa cible (Weidman, 1986).

### I.2.3. Classification des $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases, sont différenciées et classées selon les caractéristiques suivantes:

- Poids moléculaire
- Point isoélectrique,
- Profil de substrat,
- Profil d'inhibiteurs,
- Structure tridimensionnelle,
- La nature du site actif,
- La séquence en acides aminés (Ambler, 1980; Bush, 1989)

Elles sont nommées selon leur substrat préféré (IMP, OXA), leur propriété biochimique (SHV), gènes (AmpC), bactéries (PSE), patients (TEM), hôpital (MIR), région (OHIO) et selon leurs auteurs (HMS). Chaque enzymes présente la même désignation en lettre, mais possèdent un chiffre différent, qui est affecté selon l'ordre de leur description (TEM-1, 2, 3, .....etc.) (**Heritage et al., 1999 ; Handal et Olsen, 2000**).

Plusieurs classifications ont été proposée pour les  $\beta$ -lactamases mais actuellement les deux classifications qui sont adoptées sont : la classification fonctionnelle de Bush et *al.* et la classification structurale d'Amblar (**Bush et al., 1995 ; Livermore, 1995**).

### **I.2.3.1. Classification d'Amblar**

C'est une classification qui reflète la structure fondamentale de l'enzyme. Elle est basée sur la séquence peptidique du site enzymatique ou sur la séquence totale du gène codant la béta-lactamase ; elle propose quatre classes A B C D (**Cavallo et al., 2004**) :

- Les classes (A, C et D) sont dites des  $\beta$ -lactamases à sérine, utilisant un site actif à sérine pour hydrolyser le cycle  $\beta$ -lactame.
- La classe B appelée classe des métallob- $\beta$ -lactamases car elle nécessite des ions  $Zn^{2+}$  pour leur activité.

### **I.2.3.2. Classification de Bush, Jacoby et Medeiro (tableau 2) :**

La classification fonctionnelle de Bush-Jacoby-Medeiros, plus complète et plus récente, reflète le spectre d'activité de l'enzyme et répartit les  $\beta$ -lactamases en quatre groupes en fonction de leur profil de substrat (pénicilline, oxacilline, carbénicilline, céphaloridine, céphalosporines de troisième génération et imipénème) et d'inhibition (acide clavulanique et EDTA) (**Cavallo et al., 2004**).

**Tableau II : Correspondance entre les classifications moléculaire et fonctionnelle des  $\beta$ -lactamases (Barrial et Scotet, 2005).**

Groupes selon Bush-Jacoby-Medeiros	Classes d'Ambler	Enzymes (exemples)	Substrats préférentiels	Inhibées par		Organismes	Localisation
				Ac. clavulanique	EDTA		
1	C	AmpC	Céphalosporines	-	-	Bacilles GRAM négatif	Chromosomique Plasmidique
2a	A	PC1	Pénicillines	+	-	Bactéries GRAM positif	Plasmidique
2b	A	TEM-1, 2 SHV-1	Pénicillines céphalosporines	+	-	Bacilles GRAM négatif Cocci GRAM négatif	Plasmidique Chromosomique
2be	A	TEM-derivés SHV-derivés CTX-M-1-26	Pénicillines, céphalosporines à large spectre et à spectre étendu	+	-	Bacilles GRAM négatif	Plasmidique
	D	PER GES-1 OXY-1/2 (K1) OXA11,14,16,17		±	-	<i>P.aeruginosa</i> <i>P.aeruginosa</i> <i>K.oxytoca</i>	Chromosomique
					-	-	<i>Acinetobacter spp</i> <i>P.aeruginosa</i>
2br	A	TEM-30-36, TRC-1, SHV-49	Pénicillines	±	-	<i>E.coli</i> , <i>K.pneumoniae</i> (résistant aux inhibiteurs)	Plasmidique
2c	A	PSE-1,3 4 BRO-1-3	Pénicillines, carbénicilline	+	-	<i>P.aeruginosa</i> <i>A.baumannii</i> <i>M.catarrhalis</i>	Variable
2d	D	OXA-1-10 PSE-2	Pénicillines cloxacilline	±	-	Enterobacteriaceae <i>P.aeruginosa</i>	Variable
2e	A	CepA FPM-1 L2	Céphalosporines	+	-	<i>Bacteroides sp</i> <i>Proteus sp</i> <i>S.maltophilia</i> (inducible)	Variable
2f	A	NMC-A Sme-1-3 Imi-1-3	Pénicillines céphalosporines carbapénèmes	+		<i>E.cloacae</i> <i>S.marcescens</i>	Chromosomique
	D	KPC-1,2 GES-2 OXA-24-26,40, 51, 58,7		±		<i>K.pneumoniae</i> <i>P.aeruginosa</i> <i>A.baumannii</i>	Plasmidique Plasmidique Chromosomique
3	B	VIM, IMP, SPM, GIM L1 CcrA	Pénicillines céphalosporines carbapénèmes	-	+	<i>P.aeruginosa</i> <i>A.species</i> Enterobacteriaceae <i>S.maltophilia</i> <i>Bacteroides sp</i>	Variable

## I.2.4. Types de $\beta$ -lactamases selon Ambler

### I.2.4.1. Classe A

Les enzymes de ce groupe sont des  $\beta$ -lactamases à serine de type pénicillinase et céphalosporinase (AmpA), inhibées par l'acide clavulanique. Les enzymes formant la base de la classe A sont décrites comme hydrolysant l'ampicilline, la ticarcilline et de manière moindre la céfalotine. Elles sont sans action sur les C3G, l'aztréonam, la cefoxitine et les carbapénèmes. Elles peuvent être chromosomiques (SHV-1) ou plasmidiques (TEM-1). Ces enzymes ont une tendance importante à évoluer en élargissant leur spectre d'inhibition pour donner des  $\beta$ -lactamases à large spectre et des BLSE qui hydrolysent les céphalosporines à large spectre. Il existe également d'autres enzymes appartenant à la classe A mais dont la parenté génétique est plus éloignée aux précédentes (**Mainardi et al., 1999 ; Livermore, 2001**)

Au sein de cette classe, sont apparues de nouvelles  $\beta$ -lactamases dont celles dites BLSE sensibles au inhibiteur et celles qui sont résistantes. C'est un groupe d'enzyme hétérogène qui comprend les BLSE qui dérivent de TEM ou SHV et les BLSE dites non TEM non SHV (**Arlet et Philippon, 2003**).

#### I.2.4.1.1. $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE)

Par définition, les BLSE (enzymes de classe A) sont inhibées, in vitro, par l'acide clavulanique. Il y a donc une activité intermédiaire pour l'association de  $\beta$ -lactamines avec des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases. Elles hydrolysent la majorité des  $\beta$ -lactamines y compris les céphalosporines à large spectre. Par contre, les BLSE sont sensibles aux céphamycines (céfotétan et cefoxitine) ainsi qu'aux carbapénèmes. Une co-résistance avec les aminosides, les tétracyclines et les fluoroquinolones est fréquente. Les bactéries possédant des BLSE sont dites multirésistantes (**Arlet et Philippon, 2003**).

La plus part des BLSE dérivent d'enzymes TEM ou SHV (**Busch et al., 1995**). Elles sont le plus souvent retrouvées chez *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*, cependant

elles ont été trouvées chez *Proteus sp.*, *Providencia sp.*, et autres genre d'entérobactéries (Bradford, 2001). Leur apparition s'explique par la survenue d'une à quartes mutations ponctuelle dans les gènes de structure plasmidique codants pour TEM et SHV, ce qui influence la fixation et la catalyse des antibiotiques (Jacoby et Medeiros, 1991). Les gènes codants pour ces mutants sont présents dans des éléments génétiques mobiles, facilitant ainsi leur propagations dans les pathogènes nosocomiaux (Livermore, 1991).

Depuis 1989, il y a eu l'apparition de nouvelles enzymes plasmidiques dites non-SHV et non-TEM avec un phénotype BLSE. Ces  $\beta$ -lactamases ont une capacité de diffusion et d'évolution importante. Elles sont subdivisées en deux groupes : les ceftazidimases comprenant les types PER, VEB, GES et les céfotaximases comprenant SFO, BES et CTX-M. Cette dernière est la plus répandue dans le monde et en Algérie (Poirel et al., 1999, Touati et al, 2006 ; Messai et al, 2008).

#### \*Les CTX-M

C'est des cefotaximases qui confèrent un niveau élevé de résistance au céfotaxime et l'aztréonam et une sensibilité conservée à la ceftazidime. Certaines variantes de ces enzymes (CTX-M15,19,16), hydrolysent également le ceftazidime efficacement, ce qui peut compliquer leur identification phénotypique (Padmini, 2007). C'est BLSE sont inhibées de façon plus importante par le tazobactam que par l'acide clavulanique. (Barrial et Scotet, 2006).

Elles semblent issues de la mobilisation d'une béta-lactamase chromosomique de certaines bactéries de l'environnement à savoir *Kluyvera ascorbata* et *Kluyvera georgiana*. Elles ont été décrites chez plusieurs souches d'entérobactéries comme *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Serovar typhimurium*,...etc. (Bradford, 2001, Poirel et al., 2002).

#### I.2.4.2. Classe B

Les enzymes de cette classe (IMP, VIM, SPM et GIM) ont pour particularité d'utiliser un ion métallique qui est le zinc ( $ZN^{2+}$ ) dans leur site actif d'où leur appellation de metallo-béta-lactamases. L'acide clavulanique n'est pas efficace sur ces enzymes. Cependant, elles sont inhibées par les chélateurs d'ions principalement l'EDTA. Ces enzymes ont une action

dirigée contre les pénicillines, les céphalosporines (C3G) et l'imipénème d'où leur nom de « carbapénèmases ». Seul l'aztréonam reste insensible à l'action de ces enzymes.

Les métallo-béta-lactamses ont été trouvées chromosomiques chez certaines souches de l'environnement dont les phénotypes de résistance sont complexes exemple *Stenotrophomonas maltophilia* (L1), *Burkholdria cepacea* BlaB. Depuis une dizaine d'années, une localisation plasmidique de ces enzymes a été rapportée spécialement chez *P. aeruginosa* et *A. baumani* (Barrial et Scotet, 2005).

#### **I.2.4.3. Classe C**

Les enzymes de cette classe hydrolysent préférentiellement les céphalosporines mais aussi les pénicillines et sont insensibles à l'acide clavulanique (Le Minor, 1989). Ce sont des enzymes retrouvées uniquement chez les bactéries à Gram négatif (Berche et al., 1988). Elles sont codées par le gène chromosomique *AmpC* présent chez certaines espèces. L'expression de ce gène peut être constitutive (*E.coli* ou *Shigella*) ou inductible (*Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Ochromobacter...etc*) (Mainardi et al., 1996 ; Jacoby, 2009).

Le caractère inductible est défini par le fait que la synthèse des  $\beta$ -lactamses est augmentée temporairement en présence de  $\beta$ -lactamines inductrices (Céfoxitine ou Imipénème) et disparaît avec l'arrêt de l'exposition (Cavallo et al., 2004).

Ces béta-lactamses à bas niveau hydrolysent surtout les céphalosporines (C1G, céphamycines), les aminopénicillines seules ou associées à l'acide clavulanique et restent insensibles aux carboxy et uréidopénicillines, les C3G, l'aztréonam et l'IMP (Vedel, 1997 ;Cavallo, 2004).

Depuis une vingtaine d'années, on a décrit la production de céphalosporinases plasmidiques chez *Klebsiella pneumoniae* (CMY-1 en corée et MIR-1 en Amérique). On note actuellement 43 allèle de CMY, 7 variétés de FOX, 4 variétés de ACC, LAT et MIR, 3 variétés de ACT et MOX et 2 variétés de DHA (Jacoby, 2009).

Cette émergence d'un mécanisme de résistance tout à fait inédit et important allait s'amplifier et être démontrée chez diverses espèces d'entérobactéries : *Salmonella enterica*,

*Proteus mirabilis*, *E. coli*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *Shigella* et dans divers pays ou continents.

Le phénotype de résistance observé est similaire à celui d'une céphalosporinase chromosomique hyperproduite avec, généralement, une résistance aux C3G, une sensibilité au mécillinaam, aux C4G (céfépime, cefpirome) et à l'imipénème, et enfin une résistance aux associations avec l'acide clavulanique. La majorité des souches productrices sont résistante à la céfoxitine, à l'exception de celles productrices de l'enzyme ACC-1. Si ces enzymes en position chromosomique sont inductibles, caractère aisément détecté dans l'antibiogramme par un antagonisme entre une  $\beta$ -lactamine inductrice (imipénème) et une C3G, les enzymes plasmidiques sont, le plus souvent constitutives, à l'exception d'ACT-1, de DHA-1 (**Jacoby, 2009**).

#### **I.2.4.4. Classe D**

C'est la classe possédant le moins d'enzymes et certainement la plus éloignée phylogéniquement des 3 autres classes. Elle est assez hétérogène avec environ 54 enzymes qui ont moins de 50% d'homologies entre elles. Cette classe regroupe les  $\beta$ -lactamases appelées « oxacillinases » ou OXA pour « Oxacillinhydrolysing abilities ». En effet, elles sont caractérisées par l'hydrolyse préférentielle de la cloxacilline et l'oxacilline.

Ces  $\beta$ -lactamases sont peu inhibées par l'acide clavulanique ou le tazobactam. La majorité des OXA n'hydrolysent pas les céphalosporines à large spectre, leur action est différente de celle des BLSE. Certaines sont inhibées, in vitro, par les ions Cl<sup>-</sup>.

### **I.3. RESISTANCE BACTERIENNE DANS L'ENVIRONNEMENT :**

Dans l'environnement, la présence et la persistance de la résistance bactérienne aux antibiotiques est un phénomène en perpétuelle croissance qui concerne de façon directe la santé publique (**Kim et al., 2008**).

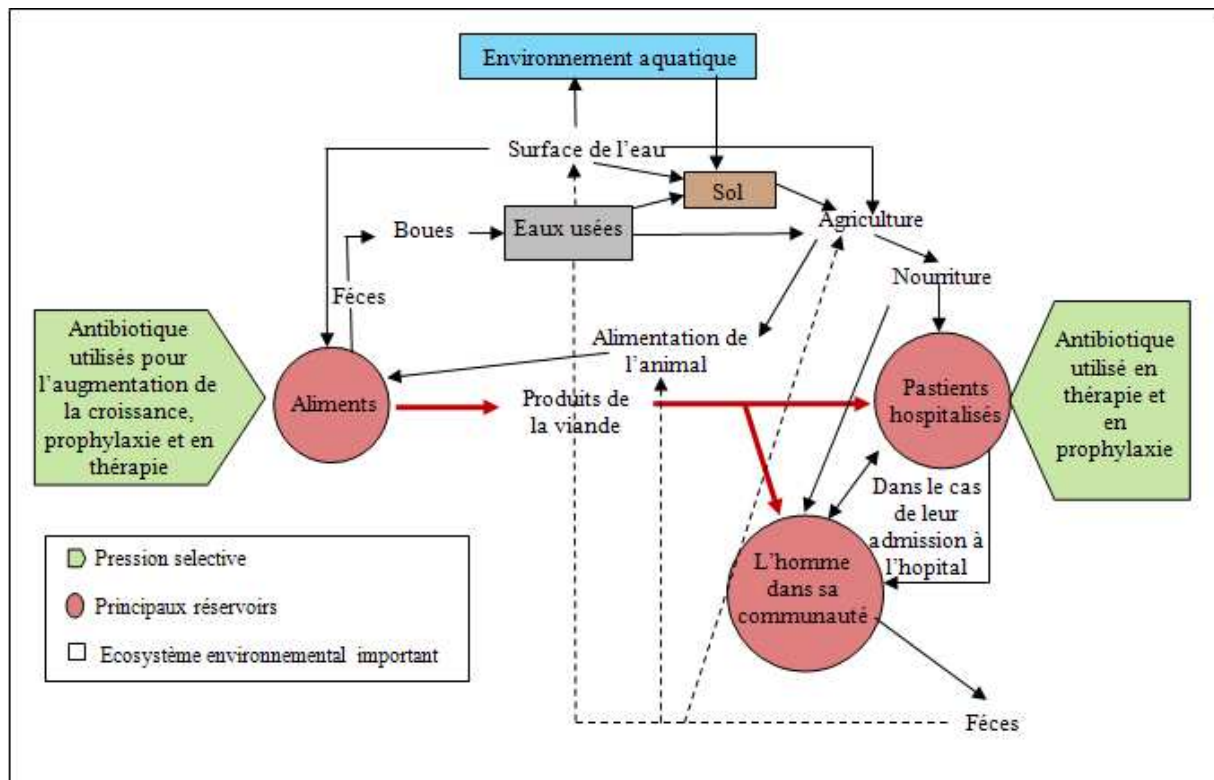
Les bactéries hétérotrophes jouent un rôle principal dans la dégradation de la matière organique dans le milieu marin (**Deming and Baross, 1993 in Chelossi et al., 2002**) et la structure des assemblages de microorganismes est très sensible aux changements des conditions environnementales ainsi que les niveaux de la chaîne trophique (**Danovaro et al., 2000 in Chelossi et al., 2002**). Cette influence apparaît spécialement lorsque les microorganismes de l'environnement sont soumis aux activités anthropiques (**Jensen et al., 1990; Hansen and Blackburn, 1992 in Chelossi et al., 2002**).

Une large application d'antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire, en outre des pratiques agricoles engendrent une pression de sélection qui conduit sur une grande échelle à l'évolution et la dissémination de l'antibiorésistance. (**Kümmerer, 2003 ; Kümmerer, 2004**).

Des études récentes démontrent clairement que la dissémination de gènes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries de l'environnement, est une conséquence directe de l'agriculture animale (**Rysz et Alvarez, 2004**). L'utilisation des agents antibactériens dans l'agriculture en plus des déversements des eaux usées brutes et sans traitement a conduit à une augmentation significative de bactéries résistantes aux antibiotiques dans l'environnement marin. En effet, de nombreuses études ont montré que les entérobactéries et *Pseudomonas* sont souvent isolées des eaux de rivières, des eaux usées et même d'eau potable, et présentent généralement des taux inquiétants de résistance aux antibiotiques (**Goni-Urriza et al., 2000 ; Messi et al., 2005 ; Kim et al., 2008**).

Ces bactéries commensales pour la majorité, peuvent représenter un réservoir de gènes de résistance similaire à ceux retrouvés chez les pathogènes de l'homme (**Perreten, 1997**). Il y a en fait, une évidente accumulation de transfert par conjugaison et transformation génétique de gènes de résistance de la flore allochtones à la flore autochtone aquatique, ce qui contribue significativement à l'évolution de la bactérie ainsi qu'à son adaptation dans des

écosystèmes hostiles (Witte, 2000 ; McArthur et Tuckefield, 2000). Ces bactéries résistantes peuvent passer chez l'homme par le biais de la chaîne alimentaire et par le contact avec l'environnement (Lateef, 2005). Par conséquent, la résistance aux antibiotiques peut être considérée comme un sérieux problème de pollution environnementale où les gènes vecteurs de la résistance sont les polluants cibles (Rysz et Alvarez, 2004).



**Figure 7:** Parcours de la transmission des bactéries résistantes aux antibiotiques et des gènes résistants (Witte, 2000, modifié).

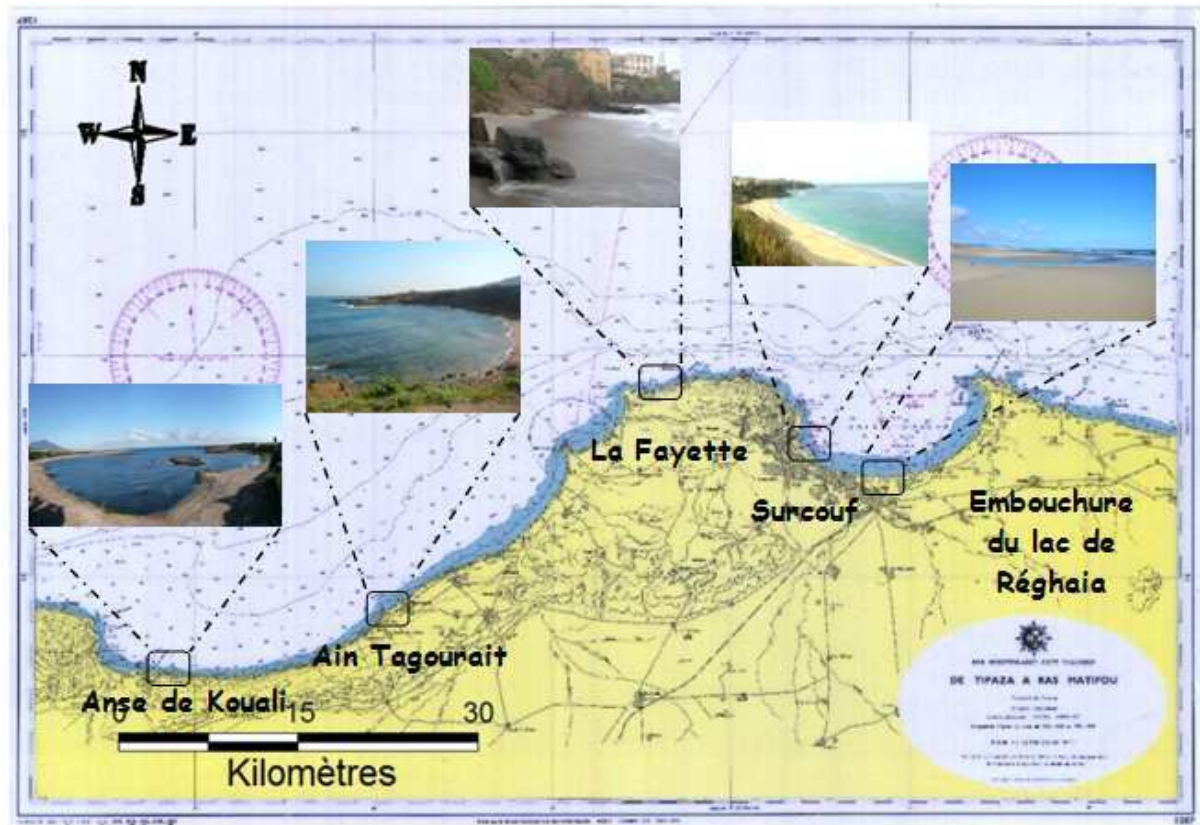




## II. MATERIELS ET METHODES

### II.1. PRESENTATION DE LA ZONE D'ETUDE

L'objectif principal de notre étude a été l'évaluation et la caractérisation de la résistance aux antibiotiques chez des bactéries isolées de l'environnement marin. Notre choix a été porté sur cinq stations (fig 8) : deux dans des zones qui reçoivent des apports anthropiques (la plage de la Fayette : plage classée polluée et le point de l'embouchure du lac de Réghaia), ainsi que trois stations dans des zones considérées jusque là non polluées (plage Surcouf, Ain Tagourait et l'Anse de Kouali). Les prélèvements ont été effectués entre le 05 et 12 mars 2009 aux alentours de 9h du matin.



**Figure 8:** Les points de prélèvement sur la carte géographique de la baie d'Alger.

La plage de la Fayette se localise au niveau de la commune de Ain Beniane dans la baie d'Alger. C'est une plage interdite à la baignade et déclarée polluée par le ministère de l'environnement et de la santé publique. Cette plage reçoit principalement l'effluent hospitalier de Baynème. Une station d'épuration est conçue au niveau de cet hôpital, mais selon nos dernières informations, elle n'est pas fonctionnelle.

Le deuxième site est l'embouchure du lac de Réghaia. Ce lac est une réserve naturelle qui a bénéficié du statut d'un site **RAMASAR** en 2002. Il correspond à l'estuaire de l'oued de Réghaia. Ce lac est alimenté par diverses sources : les eaux de ruissellement, les eaux souterraines des nappes en plus des grandes quantités d'effluents transportées par l'oued et ceux issus de la station d'épuration voisine qui reçoit les eaux usées de la zone industrielle de Rouiba-Réghaia. A notre connaissance, la station n'effectuait qu'un traitement physique.

Nos prélèvements au niveau de la station de ex-Surcouf (Ain Chrob) qui est une plage autorisée à la baignade, ont été fait au niveau de la plage. Il est à signaler que c'est une agglomération abritant une société conchylicole off-shore.

L'anse de Kouali, se situe au niveau de la baie de Bou-Ismaïl-wilaya de Tipaza, elle est considérée comme étant l'une des plus importantes de la région. Elle se localise à environ 70km à l'Ouest d'Alger. L'anse de Kouali est classée réserve naturelle.

Le site de Ain Tagourait (ex-Bérard), se localise dans la baie de Bou-Ismaïl. C'est une plage située à environ 2km de la ville de Bouharoun et 50km à l'Ouest d'Alger. C'est une zone qui se caractérise par une activité agricole traditionnelle sans engrais chimiques (communications des agriculteurs de la région) et une activité conchylicole. Des rejets urbains issue des quelques maisons du douar Mehieddine se déversent directement en mer.

Les deux dernières stations (Ain Tagourait et Anse de Kouali) sont utilisées comme étant des stations de référence.

## **II.2. METHODES**

### **II.2.1. Prélèvement**

Les prélèvements d'eau ont été effectués dans des flacons stériles, à 20cm de la surface et à une distance d'environ 1m. Des mesures 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.

Les prélèvements ont été transportés au laboratoire dans une glacière (10°C) et les analyses ont été effectuées dans les 24h.

### **II.2.2. Etude paramétrique et microbiologique**

#### **II.2.2.1. Salinité**

La salinité représente la proportion des sels minéraux dissous dans l'eau de mer, elle n'est pas accessible par la méthode de mesure, mais elle est déduite de la chlorinité ou de la conductimétrie (Aminot et Chausspiéd, 1983). C'est cette dernière qui fut utilisée lors du dosage.

L'appareil utilisé est un conductimètre de marque Wissenschaftlich Technische Werkstätten « WTW ».

#### **II.2.2.2. Oxygène dissous**

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

#### **II.2.2.3. Potentiel hydrogène (pH)**

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

#### II.2.2.4. La température

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

#### II.2.2.5 Demande biologique en oxygène (DBO<sub>5</sub>) (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 (Aminot et Chaussepied, 1983).

La mesure de la DBO<sub>5</sub> a été effectuée à l'aide d'un DBOmètre 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 DBO<sub>5</sub>. Cette méthode a pour principe l'adsorption du CO<sub>2</sub> 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 250ml de l'échantillon 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,
- Les bouchons doivent être fermés à moitié, pendant 15mn, puis fermés complètement,
- 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.2.2.6. Matière en suspension (MES)

Un volume d'échantillon (100ml) est filtré sur un filtre Whatman 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).

### II.2.2.7. 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 thermotolérants. Cette méthode consiste en la filtration de 100 ml d'échantillon ou de dilution sur une membrane en esters de cellulose, de porosité 0,45 µm placée dans une rampe de filtration en inox de six postes. La membrane est déposée sur la surface d'un milieu spécifique pour chaque recherche.

#### Technique :

- Mettre en place le dispositif de filtration 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.
- 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 thermotolérants.
- La recherche de la flore totale et des coliformes totaux s'effectue à 35°C pendant 24-48h, alors que les coliformes thermotolérants ont été recherchés à une température de 44°C pendant 24-48h.

### II.2.3. Prévalence de la résistance aux antibiotiques

L'évaluation de la résistance à trois molécules de bêta-lactamines (AMX, CTX et IMP) a été réalisée chez la flore totale et les coliformes totaux. Après filtration de 100ml d'échantillon, les membranes ont été déposées sur le Mueller Hinton (flore totale) ou le tergitol (coliformes) additionné de l'un des antibiotiques : AMX, CTX, IMP à des concentrations de 32, 64 et 16µg/ml respectivement.

La prévalence de la résistance est déterminée pour la flore totale par le nombre de bactéries résistantes obtenues sur Mueller Hinton rapporté au nombre de la flore totale obtenue sur MH sans antibiotique. De même, la prévalence de la résistance chez les bactéries coliformes a été déterminé par le nombre de coliformes résistants rapportés au nombre de coliformes totaux retrouvés sur le milieu Tergitol.

## II.2.4. Caractérisation de la résistance aux antibiotiques (CTX ou IMP)

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de la résistance chez des bactéries isolées sur l'une des deux bêta-lactamines très actives et plus au moins utilisées en clinique à savoir le cefotaxime et l'imipénème.

### II.2.4.1. Isolement et Identification bactérienne

Les souches ayant présentées une résistance à IMP ou au CTX, ont fait l'objet d'un réisolement sur le Mueller Hinton supplémenté avec 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 physiologique stérile,
- Inoculer la galerie comme suit :
  - 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, H<sub>2</sub>S, URE, en remplissant leur cupule d'huile de vaseline.
- Incuber à 33°C pendant 24-48heures.
- 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**).

### II.2.4.2. Diffusion en milieu gélosé : Antibiogramme

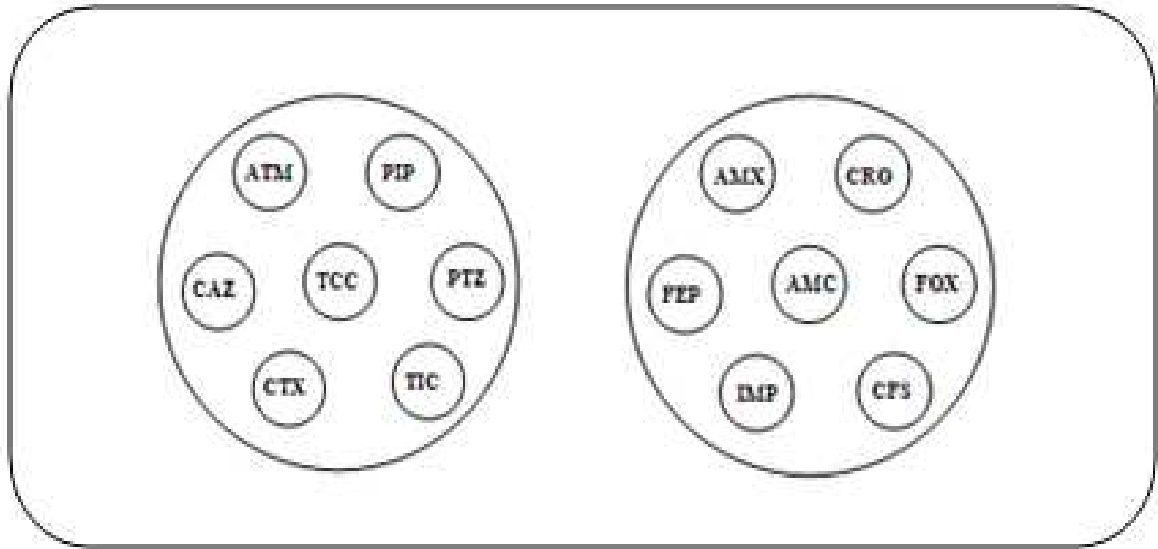
L'étude de la résistance de nos souches vis-à-vis de 25 antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu solide (**Courvalin, 1985 ; CA-SFM, 2008**).

## Principe

Cette technique est basée sur l'observation de la croissance bactérienne en présence d'un gradient de concentration d'antibiotiques, 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 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 0,5McFarland ( $10^8$  cellules/ml).
- Ajuster l'inoculum à  $10^7$  cellules/ml
- Plonger un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne de  $10^7$  cellules/ml par une dilution au 1/10,
- Ensemencer la boîte en frottant l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée et en tournant la boîte trois fois de  $60^\circ$  afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum,
- Appliquer les disques d'antibiotiques (tableau en annexes) à l'aide d'un distributeur stérile selon le schéma de la (fig 8),
- Laisser diffuser pendant 15 minutes, à température ambiante,
- Incuber à  $35^\circ\text{C}$  pendant 18-24.



**Figure 9:** Schéma de la disposition des  $\beta$ -lactamines (Vedel, 2005).

### 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, 2008*).

#### II.2.4.3. Détection des $\beta$ -lactamases inductibles : test d'antagonisme :

La disposition de Vedel (2005), nous permet d'avoir à la fois la résistance aux antibiotiques ainsi que la production de certaines enzymes tels les céphalosporinases inductibles. Ces dernières sont mises en évidence par l'apparition d'une image d'antagonisme entre un antibiotique inducteur (Cefoxitine ou Imipénème) et un antibiotique actif (Céfépime, Cefsulodine). Cet antagonisme se traduit par la diminution de l'activité de la  $\beta$ -lactamine initialement active grâce à la production d'une céphalosporinase inductible (**Nadal et Vongraeventiz, 1993 ; Vedel, 2005**).

#### II.2.4.4. Détection des $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE) : test de synergie

La détection d'une BLSE a été réalisée en parallèle avec l'antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu solide. Ce test est basé sur la mise à profit d'une image de synergie entre au moins une céphalosporine 3<sup>ème</sup> génération (C3G) et/ou l'aztréonam et un inhibiteur de  $\beta$ -lactamases tel que l'acide clavulanique. Cette synergie se traduit par une augmentation nette de l'activité des C3G et/ou l'aztréonam du côté de l'inhibiteur (acide clavulanique) (Jarlier et al., 1988 ; Vedel, 2005).

#### II.2.4.5. Transfert génétique par conjugaison bactérienne

##### 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 (ex : *E. coli* J53 RA<sup>R</sup>, ou *E. coli* k12 NA<sup>R</sup>) dépourvue de plasmide et possédant dans ce cas, un caractère de résistance obtenu par mutation chromosomique (Rifampicine ou alors l'acide nalidixique), auquel la donatrice est sensible.

Les bactéries réceptrices ayant acquis le(s) caractère(s) de résistance aux antibiotiques transférables sont sélectionnées et testées par l'antibiogramme pour déterminer leur profil d'antibiorésistance (Courvalin et al., 1985).

##### Technique

La conjugaison a été effectuée en milieu solide (Courvalin et al., 1985),

- Cultiver les souches donatrice et réceptrice dans un bouillon B.H.I.B pendant 18 heures à 37°C,
- Centrifuger 1,5ml de chaque souche à 12000 tr/mn pendant 2mn,
- Récupérer le culot, puis le resuspendre dans 100 $\mu$ l d'eau physiologique,
- Agiter au vortex afin de bien homogénéiser,
- Mélanger 100 $\mu$ l de la réceptrice avec 50 $\mu$ l de la donatrice,
- Spoter 50 $\mu$ l du mélange dans une boîte de gélose M.H,
- Laisser sécher puis incuber à 37°C pendant 18h,

- Racler la culture mixte et la mettre en suspension dans 5ml d'eau physiologique stérile,
- Ensemencer les boîtes de sélection par la suspension bactérienne contenue dans l'eau physiologique ainsi que les souches parentales,
- Après une incubation pendant 20h à 35°C, Vérifier les boites de sélection où seules les transconjugants doivent pousser,
- Les transconjugants obtenus seront analysés par antibiogramme.

Les boites de sélection ont été préparées de la sorte :

- 1ml de CTX (avec une concentration finale de 4µg/ml),
- 1ml de RA (avec une concentration finale de 250µg/ml) ou acide nalidixique NA (concentration finale de 50µg/ml)
- 18ml de gélose M.H.

#### **II.2.4.6. Recherche de gènes BLSE par PCR (Polymerase Chain Reaction)**

##### **Principe**

La PCR est une technique basée sur l'hybridation spécifique des amorces avec le gène recherché. Elle permet l'amplification du fragment cible balisé par ces deux amorces. Le processus nécessite la succession d'un certain nombre de cycles (20-40), chaque cycle comporte les étapes suivantes :

- La dénaturation de l'ADN à 94°C,
- L'amorçage : hybridation des amorces de part et d'autre du fragment à amplifier (40-60°C),
- L'élongation : la synthèse du brin d'ADN est réalisée par la taq polymérase à 72°C, en respectant la complémentarité des bases,

**Technique**

- Préparer l'inoculum bactérien : 3 à 4 colonies dans 50µl d'eau distillée stérile.
- Mettre l'inoculum à 100°C pendant 10mn pour la lyse.
- Centrifuger à 12000trs/min pendant 2mn.
- Récupérer le surnageant.
- Mettre dans des microtubes 2.5µl du lysat (le surnageant) + 10µl du Mix.
- Mettre dans l'appareil à PCR pour l'amplification en appliquant le programme correspondant.

**PCR Master Mix (promega) pour un volume de réaction de 12,5µl :**

PCR master Mix (2X).....	6,25µL
Amorce sens.....	25µM
Amorce antisens.....	25µM
H <sub>2</sub> O.....	3,25µl
ADN.....	2,5µl

Deux gènes de bêta-lactamases (TEM et CTX-M) ont été recherchés par le programme suivant (Kim et al, 2004): 94°C pendant 10min, 30 cycles de 94°C pendant 40sec, 55°C pendant 30sec, et 72°C pendant 40sec et une élongation finale de 10min à 72°C.

La taille des produits d'amplification (tableau 3) a été déterminée en utilisant un marqueur de taille : 100pb DNA ladder (Proméga).

**Tableau III** : Les séquences des amorces des gènes recherchés par PCR (Kim et al, 2004)

Gène	Amorces	Taille du fragment	Température d'hybridation
TEM	<b>Up</b> : ATGAGTATTCAACATTTCCG <b>Low</b> : CCAATGCTTAATCAGTGAGG	858pb	55
CTX-M	<b>Up</b> : GGTAAAAAATCACTGCGTC <b>Low</b> : TTGGTGACGATTTTAGCCGC	550pb	55

#### II.2.4.7. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les produits d'amplification sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 1%, sous une tension de 50V pendant 1heure. La visualisation se fait sous UV en utilisant le bromure d'éthidium (0,5µg/ml).

Cette méthode a pour principe la séparation, l'identification et la purification de l'ADN chargé négativement. La migration de l'ADN dans le gel d'agarose, soumis à un champ électrique dépend des paramètres suivants (**Sambrook et al., 1989**): le poids moléculaire, la concentration d'agarose dans le gel, la conformation de l'ADN, le voltage appliqué et la composition du tampon d'électrophorèse.

#### Technique

- préparation d'un gel d'agarose 1% dans du tampon TBE 1X, additionné de bromure d'éthidium (0.5µg/ml),
- Déposer l'échantillon à analyser additionné de bleu de dépôt à raison de 1µl pour 5µl d'ADN,
- Appliquer un champ électrique à un voltage de 25V/cm,
- Visualiser l'ADN sous UV à 254nm.

#### Solution employée

**Tampon TBE 10X** (pH 8,3, autoclavé et conservé à température ambiante) :

- 890mM de tris base.
- 890mM d'acide borique.
- 19 mM d'EDTA.

#### Bleu de dépôts :

- glycérol 50%
- EDTA-NA<sub>2</sub> 100mM pH : 8
- Bleu de bromophénol 0.2%
- Sodium dodécyl sulfate (SDS) 3%.



### III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

#### III.1. ETUDE PARAMETRIQUE ET MICROBIOLOGIQUE

L'étude paramétrique et microbiologique de nos stations, a permis la mise en évidence d'une éventuelle corrélation entre l'état physique des lieux et leur charge bactérienne. Les résultats de cette étude sont donnés dans le **tableau 4** :

**Tableau IV** : Résultats de mesure des paramètres physicochimiques et microbiologiques.

Paramètres	Stations				
	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>
<b>S (psu)</b>	35,1	32,2	36,8	36,8	36,7
<b>pH</b>	8,21	8,13	8,3	8,34	8,52
<b>T (°C)</b>	13,35	13,63	14,3	14,53	14,36
<b>OD (mg/l)</b>	7,4	7,1(76%)	7,2(76%)	8,34(81%)	10,6(104%)
<b>DBO<sub>5</sub> (mg/l)</b>	15	5	5	0	0
<b>MES (g/l)</b>	0,3274	0,1579	0,2161	0,1744	0,1536
<b>FT /100ML</b>	-	18000	2040	860	3510
<b>CT/100ML</b>	-	8700	240	37	44
<b>CF/100ML</b>	-	400	1	25	19

S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub>, S<sub>5</sub> : Station de : la Fayette, l'embouchure du lac de Réghaia, la plage de Surcouf, la plage de Ain Tagourait et l'anse de Kouali respectivement.

L'étude des paramètres physicochimiques et microbiologiques de nos stations montrent que :

Le taux de salinité varie de 35,1 à 36,8 psu pour les stations de la Fayette, Surcouf, Ain Tagourait et l'Anse de Kouali, ces valeurs sont caractéristiques des eaux de la méditerranée. Une valeur plus faible 32,2psu a été enregistrée pour l'embouchure du lac de Réghaia traduisant le mélange d'eau douce avec l'eau de mer.

Pour le potentiel d'hydrogène, les valeurs obtenues sont caractéristiques des eaux de la Méditerranée et varie de 8,13 à l'embouchure du lac et 8.52 à l'Anse de Kouali.

Nos prélèvements ont été effectués en mois de mars ce qui expliquerait les valeurs de la température comprises entre 13,35 et 14,53°C et la valeur de l'oxygène dissous (entre 76 et 104%) qui s'expliquerait par un brassage des eaux et donc une bonne oxygénation.

Pour les deux paramètres DBO<sub>5</sub> et MES, on peut déduire que le site de la Fayette est pollué avec une valeur de 15 pour la DBO<sub>5</sub> et 327,4mg/l pour les MES tandis que dans les sites des Ain Tagourait et Anse de Kouali, les eaux sont plutôt claires et aucune activité biologique n'a été enregistrée. Une faible activité biologique est observée au niveau des sites de l'embouchure du lac et la plage de Surcouf.

Dans l'ensemble, on peut dire que nos stations présentent des valeurs de température, pH, salinité et oxygène dissous qui sont dans les normes et caractéristiques de la saison. La DBO<sub>5</sub> et les MES confirment que le site de la Fayette est pollué, alors que les autres sont conformes à la norme.

Pour les paramètres microbiologiques, les eaux des stations de : Surcouf, Ain Tagourait et anse de Kouali, sont de bonne qualité car les valeurs obtenues ont été inférieures aux valeurs guides (500/ml pour les CT et 100/ml pour les CF). Pour ce qui est de l'embouchure du Lac de Réghaia, les valeurs ont été supérieures à la valeur guide mais sans dépasser la valeur limite (CT=8700 et CF=400) sachant que la valeur limite est de 10000 pour les CT et 2000 pour les CF.

Il est à signaler, que l'analyse microbiologique de la station la Fayette n'a pas été concluante à cause du phénomène de confluence observé lors de la filtration de 100ml d'échantillon, ce qui confirme la surcharge microbienne (flore totale, coliformes totaux et coliformes fécaux)

### III.2. PREVALENCE DE LA RESISTANCE AUX BETA-LACTAMINES

Une étude de prévalence de la résistance de la flore totale et des coliformes pour trois antibiotiques (AMX, CTX et IMP) a été réalisée durant le mois de Mars 2009 au niveau de quatre stations : embouchure du Lac de Réghaia, plage de Surcouf, plage de Ain Tagourait et l'Anse de Kouali.

#### III.2.1. Prévalence de la résistance aux bêta-lactamines de la flore totale

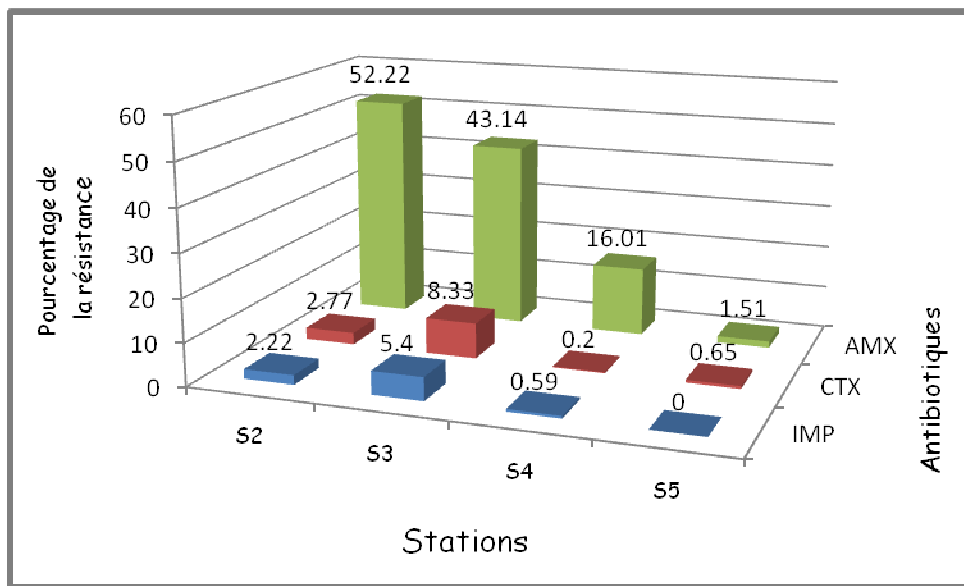


Figure 10 : Prévalence de la résistance de la flore totale aux bêta-lactamines.

Les résultats de la résistance de la flore totale (fig 7) ont montré que le taux le plus élevé est obtenu pour l'AMX au niveau des quatre stations (52.2%, 43.2%, 9.4%, 1.5%, pour le site de Réghaia, Surcouf, Ain Tagourait et l'Anse de Kouali respectivement).

Pour l'ensemble des stations, on remarque que ce sont l'embouchure du lac et la plage de Surcouf qui présentent de loin les taux de résistance les plus élevés pour CTX (2,77% et 8,33%) et IMP (2,22% et 5,4%) respectivement. Ces résultats peuvent être expliqués par l'influence des apports anthropiques. Cependant, les deux autres stations (Ain Tagourait et Anse de Kouali) présentent des taux de résistance presque nuls (0,2% et 0,65%) pour CTX alors que le taux de résistance à l'IMP est de 0,59% pour Ain Tagourait et nul pour Anse de Kouali.

III.2.2. Prévalence de la résistance aux antibiotiques chez les coliformes totaux

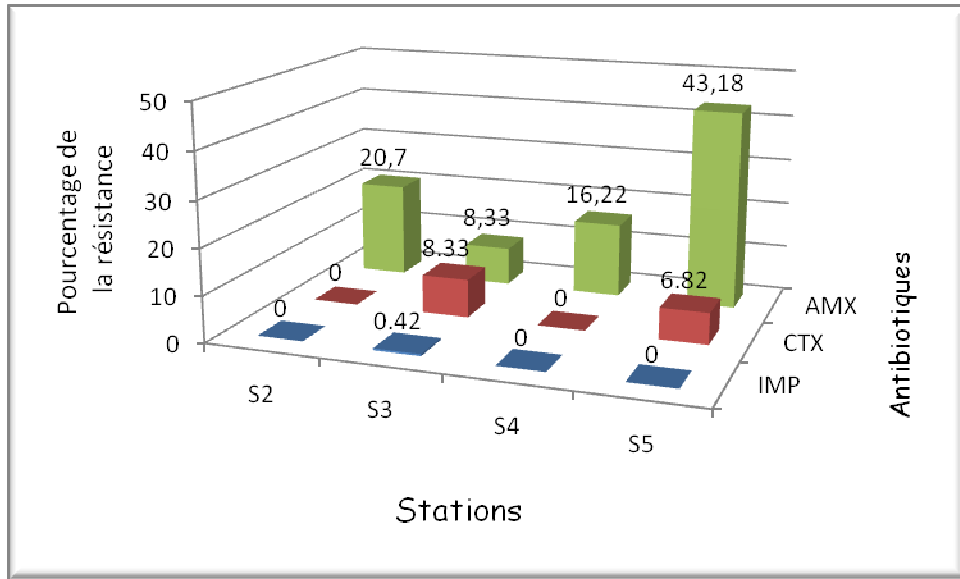


Figure 10 : Prévalence de la résistance des coliformes totaux aux bêta-lactamines.

Dans le même sens que la prévalence de la résistance chez la flore totale (fig8), les taux les plus élevés de résistance chez les coliformes ont été observés pour l’amoxicilline avec des taux de 20,7%, 8,33%, 16,22%, 43,18% pour les stations de Réghaia, Surcouf, Ain Tagourait et Anse de Kouali, respectivement. Cette résistance peut être expliquée soit par une résistance acquise soit par une résistance naturelle de certaines espèces (ex *Klebsiella*, *Enterobacter* ....) (Vedel, 1997).

En ce qui concerne la résistance au céfotaxime, des faibles taux ont été observés au niveau de Surcouf (8.33%) et l’Anse de Kouali (6.82%). Alors qu’aucune résistance n’a été observée pour les deux autres stations. Il est à signaler que le céfotaxime est une céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération très active sur les entérobactéries et très utilisée en clinique; de ce fait, la résistance à cet antibiotique est due à un mécanisme acquis le plus souvent enzymatique (cavallo, 2001)..

Aucune station n’a présenté une résistance vis-à-vis de l’IMP. Cet antibiotique est très efficace mais pas trop utilisé en clinique afin d’éviter la sélection de mutants résistants.

Il est à signaler que la prévalence de la résistance n’a pas pu être effectuée dans le cas de la station la Fayette et ceci à cause du phénomène de confluence observé sur les boîtes après filtration membranaire ; Cependant, des bactéries résistantes ont pu être isolées.

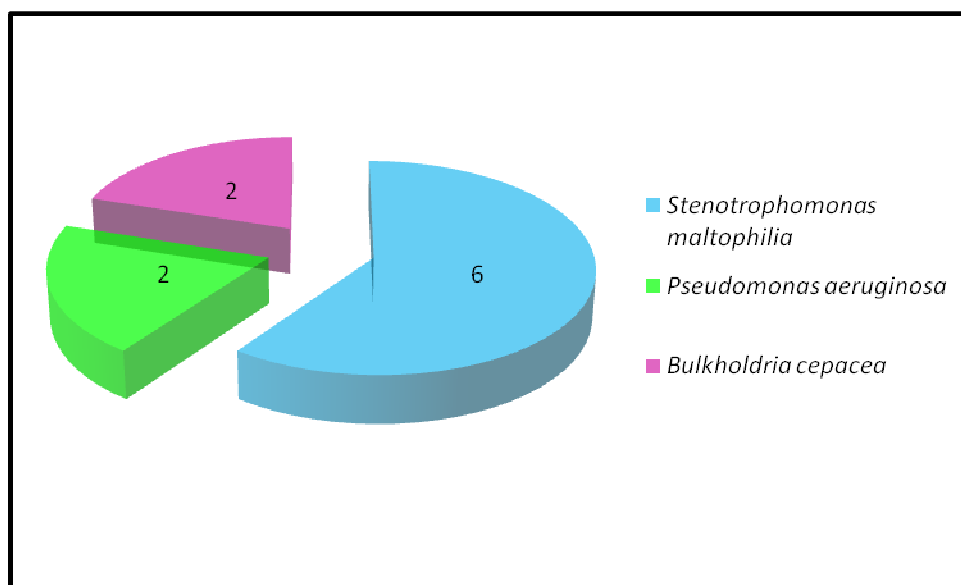
### III.3. Caractérisation de la résistance de souches sélectionnées

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à la caractérisation des mécanismes de résistance chez les bactéries isolées soit sur le cefotaxime soit sur l'imipénème.

#### III.3.1. Résistance à l'imipénème

##### III.3.1.1. Identification bactérienne

Dix souches parmi la flore totale ayant présentées une résistance à l'imipénème ont fait l'objet d'une identification biochimique par les galeries API20E. Les résultats de



l'identification sont illustrés dans la (fig 9) :

**Figure11:** Identification bactérienne des souches sélectionnées sur l'IMP.

Sur les dix souches, l'identification a révélé l'appartenance de six d'entre elles à l'espèce *Stenotrophomonas maltophilia*, deux à *Burkholderia cepacea* et deux *Pseudomonas aeruginosa*. Ces bactéries sont des bacilles à Gram négatif non fermentaire, ubiquitaires retrouvées dans l'environnement (sols, eaux...) mais elles peuvent aussi être responsables d'infections nosocomiales (Berthelot et al., 2004). Un bon nombre d'entre elles est récupéré au niveau de la station de la Fayette ; cette plage qui reçoit le rejet hospitalier de « Baynème » les autres, elles sont issues des stations où déversent des rejets urbains (Réghaia et Surcouf).

### III.3.1.2. Résistance aux antibiotiques

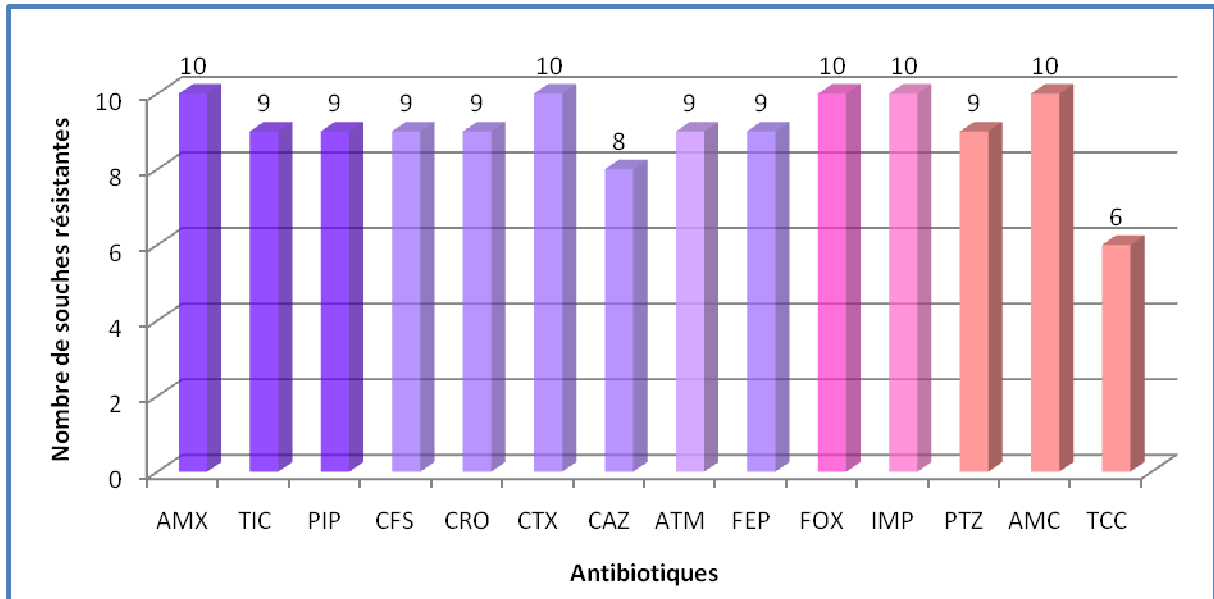
Le test de l'antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu gélosé, a permis l'évaluation quantitative de la résistance de nos souches vis-à-vis de 24 antibiotiques dont 14  $\beta$ -lactamines (tableau VI et V -annexes-).

Les résultats (fig 10 et 11) montrent une résistance marquée aux pénicillines, aux céphalosporines de 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> génération, à l'aztréonam et à l'imipénème. Les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases ne restaurent pas l'activité des antibiotiques (PTZ et AMC), alors que l'acide clavulanique restaure l'activité de la ticarcilline chez quatre souches seulement.

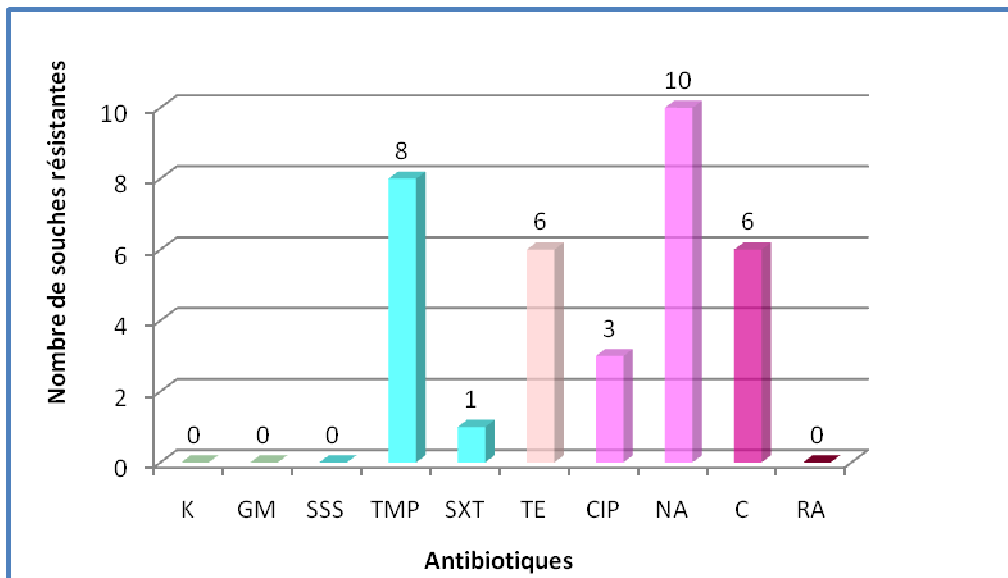
L'identification biochimique a révélé que la plupart des souches ont été assignées à l'espèce *Stenotrophomonas maltophilia*, un germe appartenant à la famille des Pseudomonadaceae, c'est à dire au groupe important des bactéries ne fermentant pas le glucose, c'est un bacille à Gram-négatif, opportuniste très répandu dans l'environnement (**Sougakoff, 2003**). C'est une bactérie naturellement résistante à la plupart des bêta-lactamines, par la production de deux types de bêta-lactamases L1 et L2. L1 est une métallo- $\beta$ -lactamase de classe B, capable d'hydrolyser l'imipénème et la plupart des bêta-lactamines sauf l'aztréonam, mais elle est insensible à l'effet de l'acide clavulanique. L2 est une bêta-lactamase à sérine de classe A hydrolysant les pénicillines et les céphalosporines, en particulier l'aztréonam, elle est inductible et inhibée par l'acide clavulanique (**Sougakoff, 2003 ; Lavigne et al., 2008**).

Pour les molécules non  $\beta$ -lactames, on observe une sensibilité des souches aux aminosides (GM et K), sulfamides ainsi qu'à la rifampicine. Un faible taux de résistance a été observé vis-à-vis des fluoroquinolone (CIP) (n=3) et l'association sulfamide+triméthoprime. Une résistance marquée a été observée vis-à-vis de l'acide nalidixique (10souches) suivi du triméthoprime (8souches), la tétracycline (6souches) et le chloramphénicol (6 souches).

En ce qui concerne le taux élevé de la résistance à certains antibiotiques non  $\beta$ -lactames, des études récentes ont rapporté que la membrane externe chez les *Stenotrophomonas* est peu perméable et de plus ils ont montré l'existence d'un système d'efflux efficace susceptible de participer à cette multirésistance aux fluoroquinolones et aux aminoglycosides (**Zhang et al., 2000 in Krueger et al., 2001 ; Lavigne et al., 2008**).



**Figure12:** Résultats de la résistance aux  $\beta$ -lactamines des souches sélectionnées sur IMP



**Figure13:** Résultats de la résistance aux antibiotiques non- $\beta$ -lactames des souches sélectionnées sur IMP.

L'étude de la sensibilité aux différents antibiotiques, montre que nos souches présentent un haut niveau de multirésistances aux antibiotiques, qui va de 5 à 14  $\beta$ -lactamines et de 2 jusqu'à 5 pour les non  $\beta$ -lactamines.

En effet le nombre le plus faible de résistance à l'ensemble des antibiotiques était de 10 alors que le nombre le plus élevé était de 19, ce qui nous a permis de définir 9 antibiotypes pour l'ensemble des antibiotiques (Tableau 5) :

**Tableau V** : Antibiotypes des souches sélectionnées sur IMP.

Souches	Antibiotype	N° de R
<b>S<sub>5</sub><sup>IMP</sup></b>	AMX, CTX, FOX, IMP, AMC, TMP, SXT, TE, NA, C	<b>10</b>
<b>S<sub>1</sub><sup>IMP</sup></b>	AMX, TIC, PIP, PTZ, CFS, CRO, CTX, ATM, FEP, FOX, IMP, AMC, CIP, NA	<b>14</b>
<b>S<sub>8</sub><sup>IMP</sup></b>	AMX, TIC, PIP, PTZ, CFS, CRO, CTX, CAZ, ATM, FEP, FOX, IMP, AMC, TMP, NA	<b>15</b>
<b>R<sub>1</sub><sup>IMP</sup></b>	AMX, TIC, PIP, PTZ, CFS, CRO, CTX, CAZ, ATM, FEP, FOX, IMP, AMC, TCC, TMP, NA	<b>16</b>
<b>F<sub>1</sub><sup>IMP</sup></b>	AMX, TIC, PIP, PTZ, CFS, CRO, CTX, CAZ, ATM, FEP, FOX, IMP, AMC, TCC, TE, NA	<b>16</b>
<b>S<sub>6</sub><sup>IMP</sup></b>	AMX, TIC, PIP, PTZ, CFS, CRO, CTX, CAZ, ATM, FEP, FOX, IMP, AMC, TMP, TE, NA, C	<b>17</b>
<b>F<sub>3</sub><sup>IMP</sup></b>	AMX, TIC, PIP, PTZ, CFS, CRO, CTX, CAZ, ATM, FEP, FOX, IMP, AMC, TCC, TMP, NA, C	<b>17</b>
<b>S<sub>2</sub><sup>IMP</sup></b>	AMX, TIC, PIP, PTZ, CFS, CRO, CTX, CAZ, ATM, FEP, FOX, IMP, AMC, TCC, TMP, TE, NA, C	<b>18</b>
<b>T<sub>2</sub><sup>IMP</sup>, F<sub>4</sub><sup>IMP</sup></b>	AMX, TIC, PIP, PTZ, CFS, CRO, CTX, CAZ, ATM, FEP, FOX, IMP, AMC, TCC, TMP, TE, CIP, NA, C	<b>19</b>

### III.3.2. Résistance au céfotaxime

#### III.3.2.1. Identification bactérienne

L'identification biochimique des 24 souches sélectionnées sur le céfotaxime a montré que treize souches appartenaient à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*, cinq à *Pseudomonas fluorescens*, trois à *Bordetella sp*, une à *Acinetobacter baumannii*, une à *E.coli* et une à *Ochrobacter antropique* (fig 12).

En dehors de *E.coli* qui est un indicateur de contamination fécale, les autres souches appartiennent à la famille des Pseudomonadaceae. Ce sont des bacilles à Gram négatif ne fermentant pas le glucose, largement présent dans l'environnement (eau, sol, végétaux) (Sougakoff, 2003). Leur résistance au céfotaxime peut être de type naturel ou acquis selon les espèces identifiées. En effet, les genres *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et *Ochrobacter antropique* produisent une bêta-lactamase chromosomique qui peut hydrolyser le céfotaxime. Cependant, la résistance de la *E.coli* au céfotaxime ne peut être dû qu'à un mécanisme acquis (Vedel, 1997 ; CA-SFM, 2008)

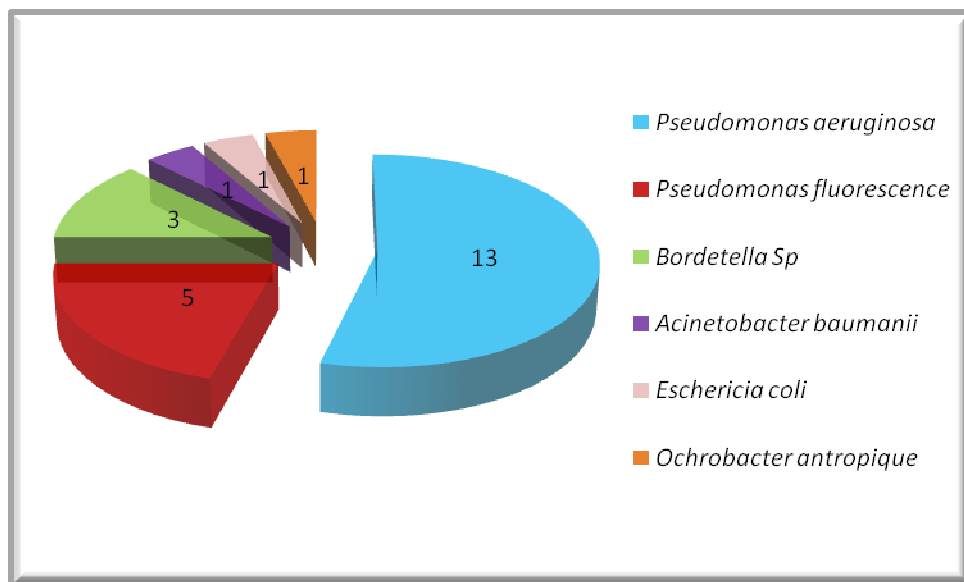
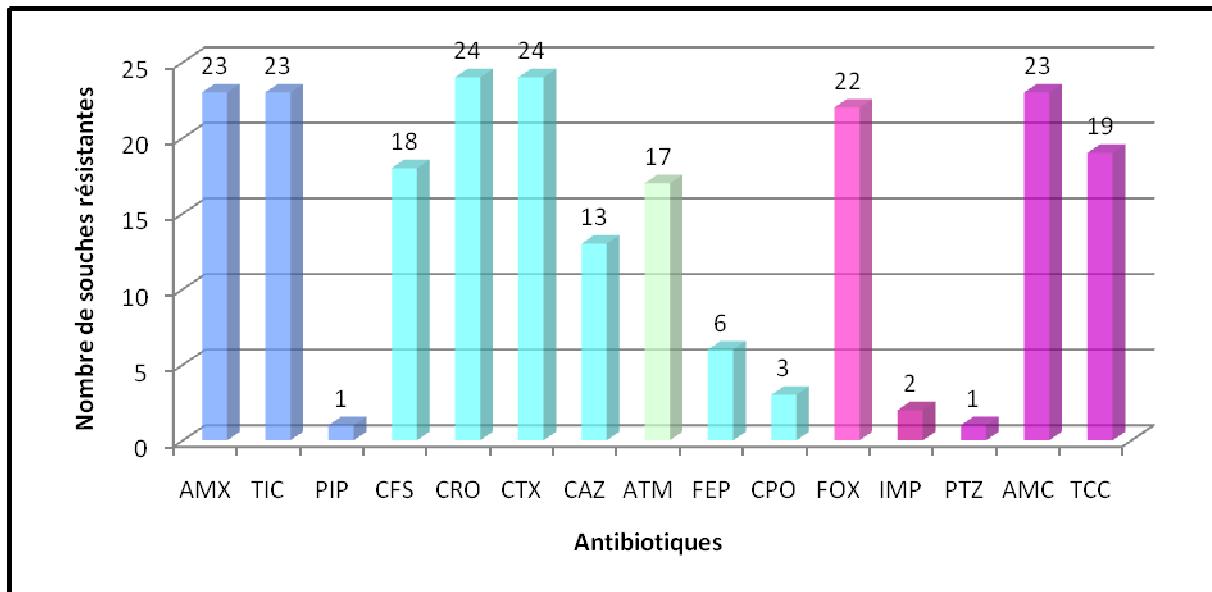


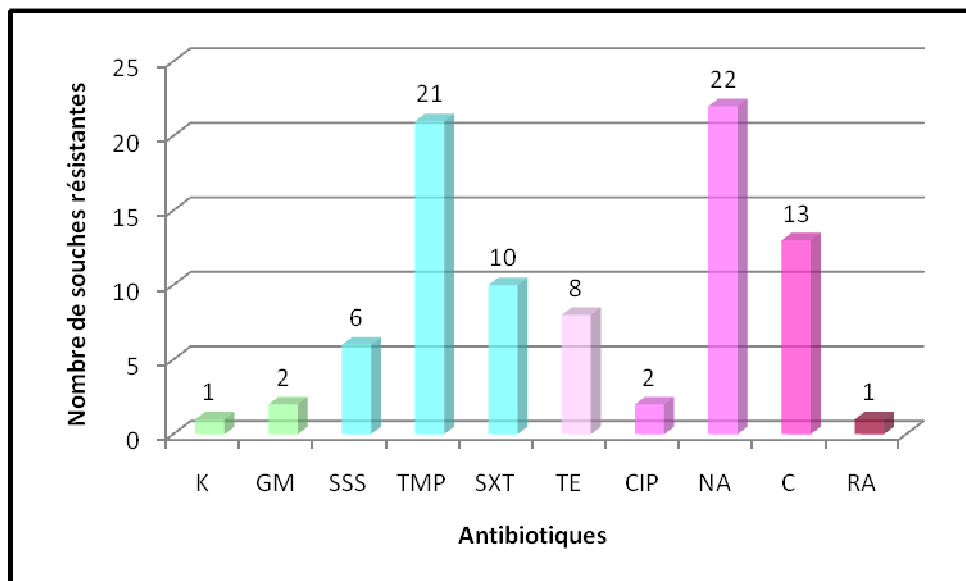
Figure 14 : Identification bactérienne des souches sélectionnées sur CTX.

**III.3.2.2. Résistance aux antibiotiques :**

L'évaluation de la sensibilité de nos souches aux antibiotiques est obtenue par le test de l'antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu gélosé (fig 16 et 17) :



**Figure 15:** Résultats de la sensibilité des souches sélectionnées sur CTX aux  $\beta$ -lactamines.



**Figure 16:** Résultats de la sensibilité des souches sélectionnées sur CTX aux non  $\beta$ -lactames.

Avec un pourcentage de 54,16%, c'est l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* qui domine dans notre sélection. Cette espèce possède la particularité d'associer un niveau élevé de résistance naturelle aux antibiotiques, en particulier les  $\beta$ -lactamines (aminopénicillines, les céphalosporines de première, deuxième et troisième génération) ainsi qu'aux non  $\beta$ -lactamines tel que les tétracyclines, le chloramphénicol, et l'acide nalidixique (**Cavallo et Mérens, 2008**), mais elle ne touche pas les uréidopénicillines (PIP, PTZ), la carbénicilline (TIC), les aminosides et les fluoroquinolones (**Meideros, 1997 ; Vedel, 2005**). Toutefois, différents mécanismes de résistance aux antibiotiques s'additionnent parfois au sein de la même souche (**Poirel, 2006**).

*Pseudomonas aeruginosa* a développé un bon nombre de mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines tel que le système d'efflux, les mutations au niveau des porines, les  $\beta$ -lactamases inductibles AmpC, les BLSE (PER et OXA), les métallo- $\beta$ -lactamases (IMP et VIM) et enfin la production d'un biofilm (**Thomson and Bonomo, 2005**).

L'IMP conserve son activité sur presque la totalité des souches (excepté *Pseudomonas aeruginosa* isolé de Surcouf et *Bordetella sp.* isolé de la Fayette). La résistance à cet antibiotique serait due à la production d'une carbapénémase ou le plus souvent à l'impéabilité membranaire (**Livermore et Woodford, 2006**).

La souche d'*Acinetobacter baumannii*, a montré une multirésistance vis-à-vis des antibiotiques testé sauf, à PIP, PTZ, IMP et TCC ce qui pourrait être dû à la présence simultanée de plusieurs enzymes (**Sougakoff, 2003**). En effet, il a été rapporté la présence d'une  $\beta$ -lactamase de type céphalosporinase : AmpC et une Oxacillinase : OXA-69 qui a une action d'une carbapénémase (**Mansour et al., 2005**).

En ce qui concerne *E. coli*, c'est une souche habituellement sensible à toutes les  $\beta$ -lactamines malgré la présence d'une céphalosporinase chromosomique de classe C qui est exprimée à très bas niveau (présente mais non détectable) (**Sougakoff, 2003**). La souche isolée dans notre étude présente une multirésistance aux  $\beta$ -lactamines touchant les céphalosporines de troisième génération, une sensibilité à l'imipénème, à la céfoxitine et à

l'inhibiteur de bêta-lactamase (acide clavulanique). Ces résistances suggéreraient la production d'une bêta-lactamase à spectre élargi (**Vedel, 1997**).

Concernant les non  $\beta$ -lactames testées pour les souches sélectionnées sur CTX, nous observons que les aminosides constituent un groupe d'antibiotiques réputé actif sur le *P.aeruginosa* où la kanamycine et la gentamycine ont une activité presque absolue sur nos souches, ce qui corrobore les résultats rapportés par Cavallo et *al.* (2001) chez des souches cliniques. Cette résistance pourrait être expliquée soit par la production d'enzymes, soit par un défaut de perméabilité (**Cavallo et al., 2001**).

De ce qui est des quinolones, un taux de résistance très élevé est observé pour l'acide nalidixique (NA) spécialement chez *Pseudomonas* et *Acinetobacter* où la résistance à cet antibiotique est naturelle et pourrait être due soit à l'expression de divers systèmes d'efflux, soit à l'imperméabilité en relation avec les porines (**Cavallo et al., 1997**). Cependant, les nouvelles quinolones telles que la ciprofloxacine, conservent leur activité sur nos souches.

Nos souches présentent des niveaux de résistance variables aux TMP, SXT et SSS avec un taux de 87,5%, 41,66% et 24% respectivement. Des taux moyens ont été observés pour la tétracycline (TE : 33,33%) et le chloramphenicol (C : 54,16%). Ces résistances seraient dues à une mutation chromosomique ou à l'acquisition d'un plasmide de résistance ou d'un transposon (**Jerboui et al., 1998**).

Les résultats obtenus montrent que les souches sélectionnées sur CTX sont multirésistantes. Cette multirésistance va de 7 à 13 pour les  $\beta$ -lactamines et de 1 à 8 molécules non- $\beta$ -lactames. Ce qui nous a permis de définir 22 antibiotypes allant de 10 à 18 molécules d'antibiotiques (tableau 6).

Tableau VI : Antibiotypes des souches sélectionnées sur CTX.

Souches	Antibiotype	N° de R
$R_{13}^{CTX}$	AMX, TIC, CFS, CRO, CTX, ATM, FOX, AMC, TCC, NA	10
$R_3^{CTX}$	AMX, TIC, CRO, CTX, ATM, FOX, AMC, TCC, TMP, NA, C	11
$R_2^{CTX}$	AMX, TIC, CFS, CRO, CTX, CAZ, ATM, FOX, AMC, TCC, NA	11
$S_2^{CTX}, R_{12}^{CTX}$	AMX, TIC, CFS, CRO, CTX, ATM, FOX, AMC, TCC, TMP, NA	11
$R_{10}^{CTX}, R_7^{CTX}$	AMX, TIC, CFS, CRO, CTX, ATM, FOX, AMC, TCC, TMP, NA, C	12
$R_{11}^{CTX}$	AMX, TIC, CFS, CRO, CTX, CAZ, ATM, FOX, AMC, TCC, TMP, NA	12
$F_3^{CTX}$	AMX, TIC, CRO, CTX, CAZ, FOX, AMC, TCC, TMP, SXT, TE, NA	12
$F_7^{CTX}$	CFS, CRO, CTX, CAZ, ATM, FEP, SSS, TMP, SXT, TE, NA, C	12
$R_1^{CTX}$	AMX, TIC, CFS, CRO, CTX, CAZ, ATM, FOX, AMC, TCC, NA, C	12
$R_{15}^{CTX}$	AMX, TIC, CFS, CRO, CTX, ATM, FOX, AMC, TCC, TMP, NA, C	12
$S_4^{CTX}$	AMX, TIC, CFS, CRO, CTX, ATM, FOX, IMP, AMC, TCC, TMP, NA	12
$S_1^{CTX}$	AMX, TIC, CRO, CTX, AMC, MZ, MEC, CF, SSS, TMP, SXT, C	12
$R_9^{CTX}$	AMX, TIC, CFS, CRO, CTX, CAZ, FEP, FOX, AMC, TCC, TMP, SXT, NA	13
$F_6^{CTX}$	AMX, TIC, CRO, CTX, CAZ, FOX, AMC, TCC, TMP, SXT, TE, NA, RA	13
$R_4^{CTX}$	AMX, TIC, CFS, CRO, CTX, ATM, FOX, AMC, TCC, TMP, TE, NA, C	13
$R_8^{CTX}$	AMX, TIC, CFS, CRO, CTX, CAZ, ATM, FOX, AMC, TCC, TMP, NA, C	13
$F_1^{CTX}$	AMX, TIC, CRO, CTX, CAZ, FOX, AMC, GM, SSS, TMP, SXT, TE, CIP, NA	14
$F_4^{CTX}$	AMX, TIC, CRO, CTX, FOX, AMC, GM, SSS, TMP, SXT, TE, CIP, NA, CPO	14
$S_5^{CTX}$	AMX, TIC, PIP, PTZ, CFS, CRO, CTX, CAZ, ATM, FEP, FOX, AMC, TCC, TMP, NA, C	16
$R_{16}^{CTX}$	AMX, TIC, CFS, CRO, CTX, CAZ, ATM, FEP, FOX, AMC, TCC, TMP, SXT, TE, NA, C	16
$F_5^{CTX}$	AMX, TIC, CFS, CRO, CTX, CAZ, FEP, FOX, IMP, AMC, TCC, SSS, TMP, SXT, NA, C, CPO	17
$S_3^{CTX}$	AMX, TIC, CFS, CRO, CTX, CAZ, ATM, FEP, FOX, AMC, K, SSS, TMP, SXT, TE, NA, C, CPO	18

### III.3.3. Production de céphalosporinases inducibles

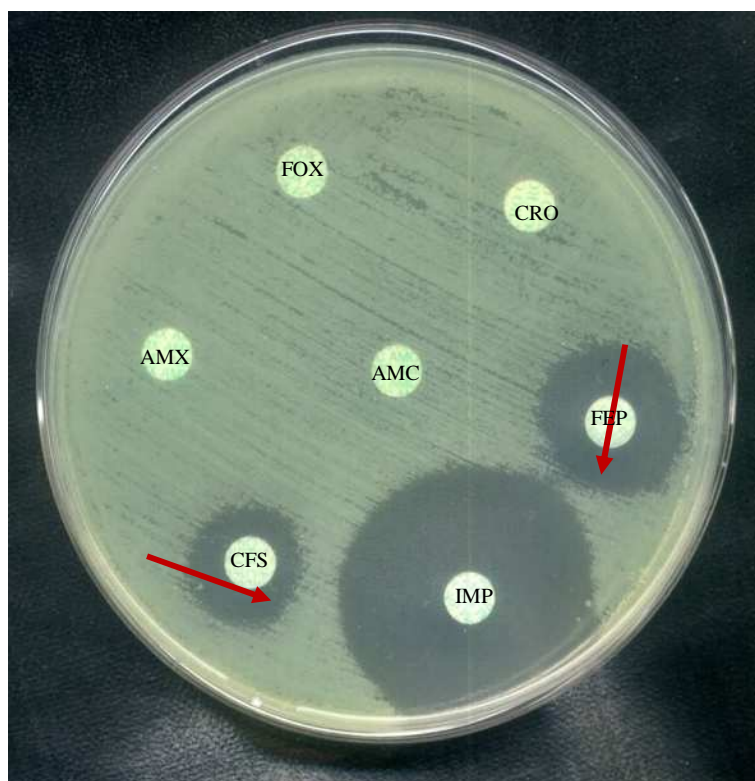
La production d'une céphalosporinase AmpC à caractère inducible a été mise en évidence par l'utilisation lors de l'antibiogramme de l'imipénème comme inducteur placé à 3 cm des céphalosporines (FEP, CFS).

Aucune souche sélectionnée sur l'IMP n'a présenté d'image d'antagonisme. Par contre dix souches sur les 24 isolées sur CTX l'ont présenté (fig 13); il s'agit de 2 *Pseudomonas aeruginosa* isolés de la plage de la Fayette, 3 *P.aeruginosa* et 3 *P. fluorescens* isolées au niveau de l'embouchure du lac de Réghaia et 1 *P. aeruginosa* et une *Bordetella sp* qui ont été isolés de la plage de Surcouf. Cette image d'antagonisme traduit la production d'une céphalosporinase inducible ce qui corrobore les données de la littérature qui rapportent la production naturelle d'une céphalosporinase chromosomique inducible chez le genre *Pseudomonas* (tableau 7) (Avril, 2000 ; Vedel, 2005).

Une absence de l'image de l'induction peut s'expliquer soit par l'absence d'une céphalosporinase soit par à l'hyperexpression de celle-ci (Vedel, 2005).

**Tableau VII** :Résultat positifs du test de l'antagonisme.

Souches	identification	Image d'antagonisme avec
F <sub>3</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CFS, FEP
F <sub>6</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CFS, FEP
R <sub>3</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP, CFS
R <sub>7</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Pseudomonas fluorescece</i>	IMP, FEP
R <sub>9</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP, FEP
R <sub>10</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Pseudomonas fluorescece</i>	FEP
R <sub>13</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Pseudomonas fluorescece</i>	FEP
R <sub>16</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP, FEP
S <sub>2</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Bordetella sp.</i>	IMP, FEP
S <sub>4</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP, FEP



**Figure17:** Image d'antagonisme chez *Pseudomonas aeruginosa* (F<sub>3</sub><sup>CTX</sup>).

Noter la réduction du diamètre d'inhibition de FEP et CFS du côté de l'inducteur IMP.



### III.5.2. Production de $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE)

Le test DDS (double disk synergy), a permis la mise en évidence de la production de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi, qui se traduit par l'augmentation du diamètre d'inhibition de la céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération et/ou l'aztréonam du côté de l'inhibiteur (acide clavulanique) (Jarlier et al., 1988).

Trois de nos souches ont présenté une image de synergie positive (tableau 8), caractéristique de la production d'une BLSE: 2 *Stenotrophomonas maltophilia* sur IMP (une isolée de l'embouchure du lac de Réghaia et l'autre de la plage de Surcouf : fig 14) et une *E. coli* sur céfotaxime (plage de Surcouf :fig 15).

Cette image démontre la production d'une BLSE chez *E. coli*. Cependant, l'image observée chez *Stenotrophomonas maltophilia* est souvent due à l'inhibition de la bêta-lactamase chromosomique L2 qui présente principalement une image de synergie avec l'aztréonam, ce qui rend la détection du phénotype BLSE très difficile chez cette bactérie (Lavigne et al., 2008)

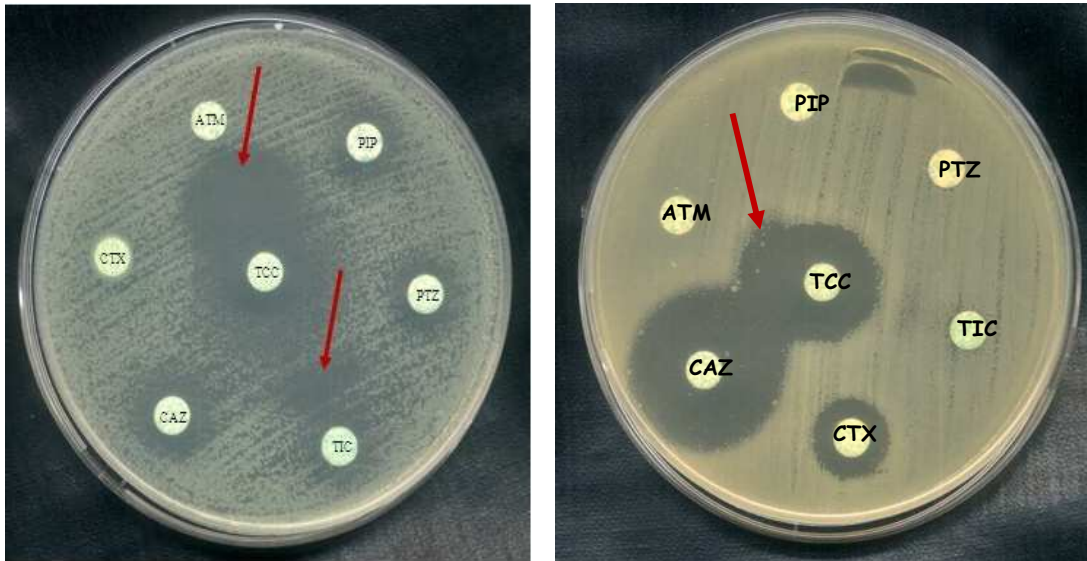
Tableau VIII : Résultat du test de synergie

Souches	Noms des souches	Synergie	Synergie
R <sub>1</sub> <sup>IMP</sup>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	ATM, TIC
S <sub>1</sub> <sup>IMP</sup>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	ATM
S <sub>1</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Escherichia coli</i>	+	ATM, FEP, CRO, CAZ, CTX

### III.6. Transfert génétique par conjugaison bactérienne

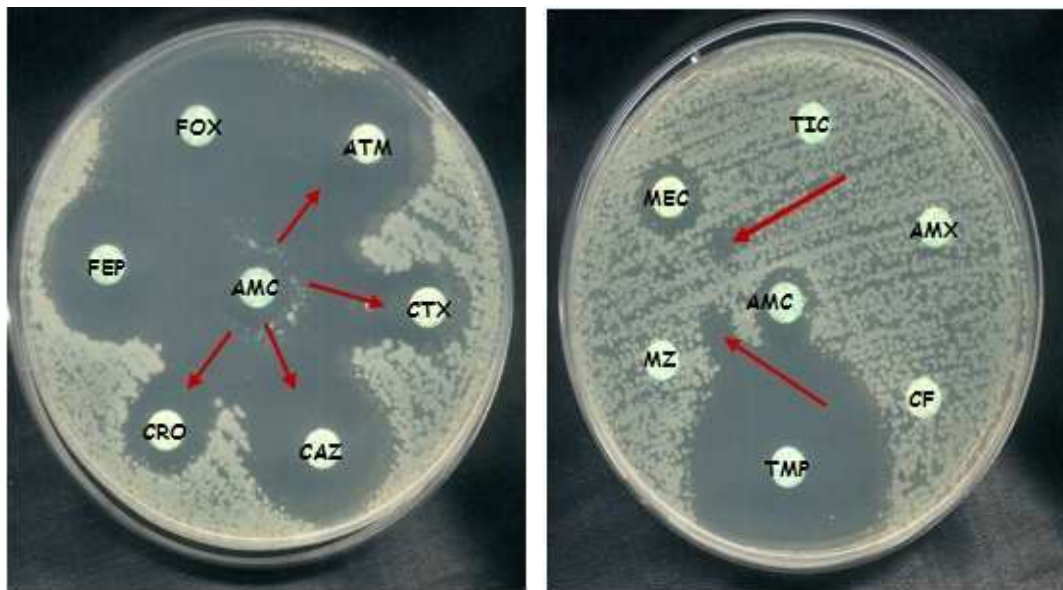
Les souches productrices d'image de synergie (deux *Stenotrophomonas maltophilia* (R<sub>1</sub><sup>IMP</sup>, S<sub>1</sub><sup>CTX</sup>) et une *Escherichia coli* (R<sub>1</sub><sup>CTX</sup>) ont fait l'objet d'un transfert génétique par conjugaison vers deux souches de référence (une *E.coli* K12 NA<sup>R</sup> et une *E.coli* J53 RA<sup>R</sup>) ; et ceci afin de déterminer le caractère transférable de la résistance.

Les résultats du transfert n'ont pas été concluants, ce qui suggérerait soit une résistance plasmidique non transférable soit une résistance chromosomique (Courvalin, 1985).



**Figure18:** Image de synergie chez *Stenotrophomonas maltophilia* ( $R_1^{IMP}$  à gauche et  $S_1^{IMP}$  à droite) isolée sur IMP.

A noter l'image de synergie entre l'ATM et l'inhibiteur (TCC) caractéristique de l'enzyme chromosomique L1.



**Figure19 :** Image de synergie chez *E.coli* sur deux boîtes contenant des disques de bêta-lactamines.

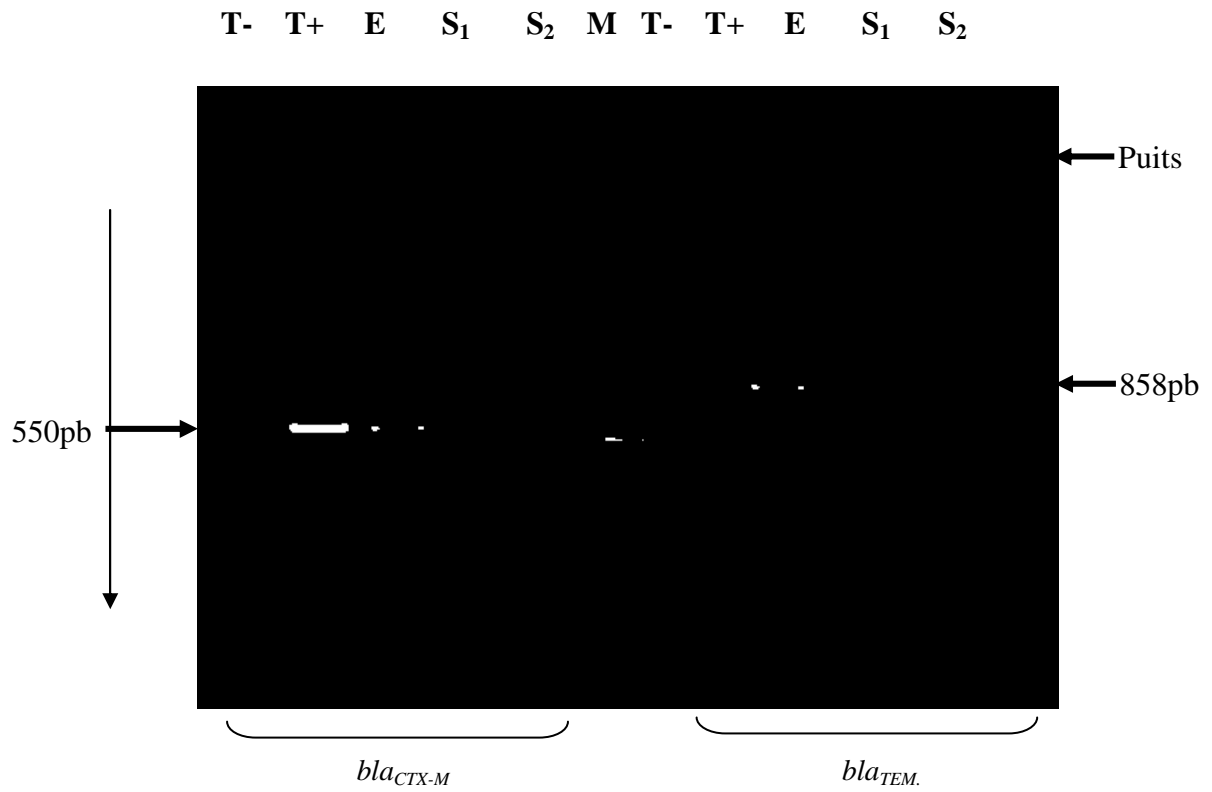
Noter l'augmentation du diamètre de CTX CRO CAZ et ATM du côté de l'inhibiteur, une sensibilité à FOX et IMP et une résistance aux pénicillines (TIC, AMX, MEZ,...) et les céphalosporines de première génération.

### III.7. Recherche de gènes BLSE par PCR

L'analyse des profils électrophorétiques de l'amplification du gène *bla<sub>CTX-M</sub>* des trois souches précédentes a révélé la présence du gène CTX-M codant pour la BLSE chez la *E. coli* seulement. L'absence d'amplification chez les souches de *S.maltophilia* confirme l'absence d'une BLSE cachée sous la BLSE naturelle. En effet, la présence du gène CTX-M chez *S.maltophilia* clinique a été signalée en France (Lavigne et al, 2008). Le gène TEM n'a été détecté chez aucune souche, bien qu'il ait été décrit souvent en association avec les BLSE de type CTX-M (fig 16) (Messai et al., 2008).

Des travaux récents ont signalé l'existence d'un gène *bla<sub>CTX-M</sub>* chez *E.coli* chez des souches cliniques (Jouini et al., 2007), ainsi qu'au niveau des eaux de rivières (Kim et al., 2008), *E. coli* avait présenté une multirésistantes aux antibiotiques où la production de nouvelles BLSE CTX-M-14, TEM-52, ou CMY-1 ont été à l'origine de cette résistance. Cette même source mentionne que ces mécanismes de résistance retrouvés chez *E.coli* sont les même que ceux rencontrés chez des souches responsables de maladies nosocomiales, aviaires (volaille) et porcines en Corée.

D'après le résultat obtenu, nous constatons que le phénotype de résistance BLSE retrouvé est similaire à celui retrouvé en clinique chez les souches d'entérobactéries en Algérie à l'image des observations faites par Nass et al. (2005) pour la région de Constantine ; Messai et al. (2006), Ramdani-Bouguessa et al. (2006), Messai et al. (2008) et Iabadene et al. (2008) ; pour la région d'Alger et Touati et al. (2006) pour la région de Bejaïa.



**Figure20:** Résultat de l'amplification des gènes *bla<sub>CTX-M</sub>* et *bla<sub>TEM</sub>*.

T- : témoin négatif, T+ : témoin positif, E : *E. coli* ; S<sub>1</sub><sup>CTX</sup>, S<sub>1</sub> : *S. maltophilia* S<sub>1</sub><sup>IMP</sup>, S<sub>2</sub> : *S. maltophilia* R<sub>1</sub><sup>CTX</sup>, M : marqueur 100pb DNA Ladder avec une bande fluorescente de 500pb.

## CONCLUSION

L'objectif de ce travail a été l'étude de la prévalence de la résistance des bactéries de l'environnement marin aux bêta-lactamines et la caractérisation des mécanismes de résistance des souches résistantes aux cefotaxime ou à l'imipénème. A la lumière de nos résultats nous avons constaté que :

- ✦ Le taux de résistance aux bêta-lactamines a été moyen pour AMX et faible pour les deux autres molécules actives (CTX, IMP) dans toutes les stations.
- ✦ L'essai de la caractérisation des souches résistantes à l'IMP a révélé la grande sélection d'une bactérie de l'environnement naturellement résistante à cette molécule (*S. maltophilia*), dont l'implication dans des infections cliniques a été souvent rapportée. Suivie de *B. cepacea* et *P. aeruginosa* dont la résistance à l'IMP est due soit à l'imperméabilité ou à la production d'une métalloβérolactamase.
- ✦ La caractérisation des souches résistantes à CTX a montré la prédominance des Pseudomonadaceae où la multi-résistance serait le fruit non seulement de la céphalosporinase chromosomique mais aussi de la production d'un autre mécanisme acquis. Une *E.coli* productrice d'une BLSE non transférable de type CTX-M a été détectée au niveau de la plage de Surcouf.

Bien que la qualité des eaux soit bonne à acceptable pour tous les sites analysés en dehors de la plage La Fayette classée polluée par le ministère de l'environnement, la résistance aux antibiotiques est présente dans presque tous les sites, traduisant une résistance naturelle pour la majorité des cas. Cependant, la forte sélection de ces germes naturellement multi-résistants qui sont en contact permanent avec l'homme augmenterait le risque d'infection. De plus, la présence d'*E.coli* avec un mécanisme des plus redoutables démontre l'influence des rejets urbains sur la plage de Surcouf. Ce mécanisme pourrait se propager vers d'autres souches pathogènes de l'environnement par le biais des transferts horizontaux.

Nous concluons que l'utilisation des antibiotiques et spécialement des bêta-lactamines dans les hôpitaux ainsi que la grande quantité de résidus de ces derniers acheminés par les rejets urbains non traités directement ou indirectement dans le milieu aquatique constitue un réel problème pour la santé publique en premier lieu et l'écologie bactérienne dans l'environnement marin en deuxième lieu. Les bactéries constituent un réservoir pour les

déterminants de la résistance aux antibiotiques jouant un rôle principal pour la dissémination et surtout l'évolution des ces gènes résistants.

En perspective, nous constatons que la régression de la résistance bactérienne aux antibiotiques est un phénomène beaucoup plus lent que son apparition. Une consommation raisonnée des antibiotiques et un traitement adéquat des rejets hospitaliers et urbains seraient nécessaires pour espérer interrompre ce problème.

## BIBLIOGRAPHIE

## A

**Ambler R.P., 1980.** The structure of  $\beta$ -lactamases. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **289**:321-331.

**Aminaut A. et Chaussepied M., 1983.** Manuel des analyses chimiques en milieu marin. *Centre National pour l'Exploitation des Océans*.

**Arlet G. and A. Philippon (2003).** "Les nouvelles beta-lactamases à l'aube du troisième millénaire." *revue française des laboratoires* **352**: 41-55

**Avril J.L., Dabernat H., Denis F. and Monteil H., 2000.** Bactériologie clinique. *Ellipses 3<sup>ième</sup> édition ESKA*, Paris. 298-310.

## B

**Barrial k. et Scotet J., 2005.** Classification raisonnée des  $\beta$ -lactamases chez les bacilles Gram négatif. Perspectives d'évolution. *DES bactériologie Université de Lyon 1*.

**Berche P., Gaillard L. et Simonet M., 1988.** Bactériologie, Les bactéries des infections humaines, *1<sup>ière</sup> édition. Ed. Flammarion*, 230-590.

**Berthelot P., Grattard F., Mallaval F.O., Ros A., Lucht F., Pozzetto B., 2004.** Épidémiologie des infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* et *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pathologie Biologie* **53** (2005) 341–348.

**Bradford A.P., 2001.** Extended-Spectrum B-lactamases in the 21<sup>st</sup> Century : Characterisation, Epidemiology, and Detection of this important Resistance Threat. *Clin Microbiol Rev.* **14** : 9333-51.

**Bryskier A., 1999.** Antibiotique agent antibactérien et antifongique. *Ellipses ED*: 436-440.

**Busch K., 1989.** Classification of b-lactamases : groups 1, 2a, 2b, and 2b' *In Palzkill T. 1992. Identification of amino Acid Substitution That Alter the Substrate Specificity of TEM-1 b-lactamases. Journal of Bacteriology.* **174** : 5237-52-43.

**Busch K, Jachoby G.A and Medeiros A.A., 1995.** A fonctional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agent Chemother.* **39** : 1211-1233.

**Busch K., 1998.** Metallo-b-lactamases : a class A part. *In Cavallo J.D., 2004.*

## C

**Charlier P., Coyette J., Dehareng D., Dive G., Duez C., Dusart J., Fonzé É., Fraipont C., Frère J. M., Galleni M., Goffin C., Joris B., Lamotte-Brasseur J., et Nguyen-Distèche M., 1998.** Résistance bactérienne aux  $\beta$ -lactamines. *Médecine/Sciences.* **14** : 544-55

**CA-SFM, 2008.** Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, recommandation 2008.

**Cavallo J.-D., Leblanc F., Fabre R., Fourticq-Esqueöute A. and the GERPB, 2001.** Surveillance de la sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques en France et distribution de mécanismes de résistance aux béta-lactamines. *Pathol. Biol.* **49** : 534-9.

**Cavallo J.-D., Fabre R., Jelhi F., Rapp C. and Garrabé E., 2004.** Bêta-lactamines (beta-lactam antibiotics). *EMC-Maladies infectieuses 1* :129-202

**Cavallo J.-D., Mérens A., 2008.** *Pseudomonas aeruginosa* et bêta-lactamines à l'heure de l'Europe *Pseudomonas aeruginosa* and beta-lactam antibiotics at the time of Europe. *Pathologie Biologie* 56 (2008) 435–438.

**Chelossi E., Vezzulli L., Milano A., Branzoni M., Fabiano M., Riccardi G., Banat I.M., 2003.** Antibiotic resistance of benthic bacteria in fish-farm and control sediments of the Western Mediterranean. *Aquaculture* 219 83 –97

**Courvalin P., Goldstein F., Filippon A. et Sirot J., 1985.** L'antibiogramme, 1<sup>ière</sup> édition. *MCP édition*, Paris.

**Courvalin P., Drugeon H., Flandrois J.P., Goldsteine F., 1991.** Bactériologie. Edition *MALOINE. P* , 13-21.

**F**

**Frère J.M., 1995.** Bêta-lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Molecular microbiology*. **16** : 385-395.

**G**

**Gaillot.O, 2007.** Caractéristiques et mode d'action des antibiotiques,

**Goni-Urriza M., Capdepuy M., Arpin C., Raymond N., Caumette P. et Quentin C., 2000.** Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine Enterobacteriaceae and Aeromonas spp. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 125-32.

**H**

**Hancock R.E.W. et Speert D.P. 2000.** Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Harcourt Publishers Ltd Drug Resistance Updates* (2000) 3, 247–255.

**Hata, M., Fujii Y., Tanaka Y., Ishikawa H., Ishii M., Neya S., Tsuda M. et Hoshino T., 2006.** Substrate Deacylation Mechanisms of Serine-b-lactamases. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 2151-2159

**Heritage J., M'zali F.H., Gascoyne-Binzi D. et Hawkey M.P. , 1999.** Evolution and spread of SHV extended-Spectrum b-lactamses in Gram-negative bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **44** : 309-318.

**I**

**Iabadene H, Messai Y, Ammari H, Ramdani-Bouguessa N, Lounes S, Bakour R, Arlet G., 2008.** Dissemination of ESBL and Qnr determinants in Enterobacter cloacae in Algeria. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Jul;62(1):133-6. Epub 2008 Apr 1.

**J**

**Jacoby, G. A., et A. A. Medeiros (1991).** More extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **35**: 1697-1704

**Jacoby G.A. et Medeiros A.A., 1999.** More extended-spectrum b-lactamses. *In Heritage J., 1999.*

**Jacoby G.A., 2009.** AmpC B-Lactamases. *Clinical Microbiology .Revue .JANVIER* 2009, Pages 161-182.

**Jarlier.V., 1997.** Mécanismes de résistance aux antibiotiques. *Médecine Thérapeutique*, Hors série n°1. 46-58.

**Jarlier V., Nicolas M.H., Fournier G. and Philippon A., 1988.** Extended broad-spectrum Béta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents enterobacteriaceae : hospital prevalence and susceptibility patterns. *Review of infection decreases*. **10** ; 867-878.

**Jerboui Z., Boudabouz A., Zouhdi M. and BenRejeb S., 1998.** Sensibilité aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées en milieu hospitalier à Tunis. *Biologie infectiologie*. 1998-tome IV-N°1

**Jouini A., Vinue L., Ben Slama K., Saenz Y., Klibi N., Hammami S, Boudabous1 A and Torres K. 2007.** Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum b-lactamases and associated resistance genes in *Escherichia coli* strains of food samples in Tunisia . *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2007) 60, 1137–1141.

### K

**Karray H., Hammami A., Mahjoubi F., Bouaziz M., Damak J. and Jeddi H.M., 1993,** In vitro study of the sensitivity to antibiotics of 213 *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in an intensive care unit of the Sfax Hospital (Tunisia). *Pathol.Biol.(Paris)*. **41** :307-12.

**Kim J., Park Y.J, Kim S.I, Kang M.W, Lee S.O. et Lee K.Y, 2004.** Nosocomial outbreak by *Proteus mirabilis* producing extended-spectrum b-lactamases VEB-1 in Korean university hospital, *Journal of antimicrobial Chemotherapy*. 54(6) : 1144-1147.

**Kim S.H. et Wei C., 2006.** Antibiotic resistance and Caco-2 cell invasion of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from farm environments and retail products. *International Journal of Food Microbiology* 115 (2007) 356–363.

**Kim J., Kang H.Y. and Lee Y., 2008.** The identification of CTX-M-14, and CMY-1 enzymes in *Escherichia coli* isolated from the Han River in Korea. *The Journal of Microbiology*, October 2008, p. 478-481

**Krueger T.S., Clark E.A., Nix D.E., 2001,** In vitro susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* to various antimicrobial combinations, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 41 (2001) 71–78.

**Kümmerer K., 2003.** The significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52: 5-7.

**Kümmerer K., 2004.** Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54: 311- 320.

### L

**Lateef A., Oloke J.F., Gueguin kana e B. 2005.** The prevalence of bacterial resistance in clinical food, water and some environmental samples in southwest Nigeria. *Environmental Monitoring and assessment* **100**. p. 59-69.

**Lavigne J.-P., Gaillard J.-B., Bourg G., Tichit C., Lecaillon E., Sotto A., (2008).** Étude de souches de *Stenotrophomonas maltophilia* sécrétrices de BLSE : détection de CTX-M et étude de la virulence § Extended-spectrum b-lactamases-producing *Stenotrophomonas maltophilia* strains: CTX-M enzymes detection and virulence study. *Pathologie Biologie* 56 447–453

**Ledent P., Raquet X., Joris B., Vanbeeumen J., et Frere J. M., 1993.** A comparative study of class-D b-lactamases. *Biochem. J.* 292: 555-562

**Le Minor R. et Veron M, .1989.** Bactériologie médicale 2<sup>ème</sup> édition. *Médecine-science, Flammarion*, Paris.

**Livermore D.M., 1995.** B-lactamses in laboratory and clinical resistance. *In : Heritage J., 1999.*

**Livermore D.M., Winstanley T.J. et Shannon K.P., 2001.** Interpretative reading : recognising the universal and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.**48** : 87-102.

**Livermore D.M. and Woodford N., 2006.** The beta-lactamases threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. Elsevier. *Trends in Microbiology*.**14,9** :416

**M**

**McArthur J.V et Tuckefield, R.C 2000.** Spatial pattern in antibiotic resistance among stream bacteria: Effect of industrial pollution. *Applied and environmental microbiology* 66:3722-3726.

**Mainardi J.L., Goldsein F.W. et Gutamann L., 1996.** Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques. *Maladies infectieuses*. 8-006-N-10, 1-8

**Mansour W., Boulague O., Dahmane S et Boujaafar N., 2005.** Caractérisation des mécanismes enzymatiques de résistance aux b-lactamines chez des souches de *Acinetobacter baumannii* isolées à l'hôpital universitaire Sahloul, Sousse en Tunisie.. *Pathologie Biologie* 56 (2008) 116–120.

**Matyar F., Kaya A., Dinçer S.k., 2008.** Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. *Science oh the total environment* 407 (2008) 279 – 285.

**Meideros A.A., 1997.** Recent increases in resistance : mecanismes and organisme. Evolution and dissemination of béta-lactamsaes accelerated by generation of b-lactam antibiotics. *Clinical Infection Diseases*. **24** :19-45

Messi P., Guerrieri E., Bondi M., 2005. Antibiotic resistance and antibacterial activity in heterotrophic bacteria of mineral water origin. *Science of the Total Environment* 346 213–219.

**Messai Y., Benhassine T., Naim M, Paul G, Bakour R.2006.** Prevalance of beta-lactamases resistance among *Eschericia coli* clinical isolates from hospital in Algiers. *Revista Chemotherapy*.P ;144-51

**N**

**Nadal D. and Von-Graeventiz A., 1993,** Routine detection of inductible beta-lactamases in Gram négative bacilli by means of disk susceptibility testing, *Journal of microbiology method*. 1993 ; 17 : 283-01.

**Nikaido H., 1992.** Porins and specific channels of bacterial outer membranes, *Mol. Microbial*, 6(4) : 435-442.

**P**

**Perreten F., Schwarz L., Cresta M., Boeglin G., Dasen M., Teuber, 1997.** Antibiotic resistance spread in food. *Nature*. 389 801-802

**Philippon A., Paul G. et Nevot P., 1989.** Classification des beta-lactamases. *In* : Hammani A., 1991. Les inhibiteurs des beta-lactamases. *Medecines du Maghreb*, n°30, 21-22

**Philippon, A., Ariet G. et Schlemmer B., 1993.** Bétalactamines (I). *Encycl.Med. Chir. (Paris-France), Maladies infectueuses*, 8-004-C 10 ; 25p .

**Philippon A., 2004.** Nouvelles β-lactamses nouveaux défis en 2004. Service de bactériologie, *UFR Cochin Paris*.

**Poirel L., Cerome P., DeChamps C., Stephannazzi J., Nass T. and Nordman P., 2002.** Integron located OXA an extended spectrum variant of OXA-2  $\beta$ -lactamases from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.46(2) : 566-569.

**Poirel L., Decousser J-W., and Nordman P., 2003.** Insertion Sequence ISEcp1B Is Involved In Expression and Mobilisation of a *bla<sub>ctx-m</sub>* B-lactamase. *Gene Antimicrobial. Agent chemotherapy*.

**Poirel L., 2006.** Nouveaux mécanismes de résistance chez *Pseudomonas aeruginosa* : quelques perspectives. XVIIe Congrès national de SFHH-Nantes-1<sup>er</sup> et 3 juin 2006.

#### R

**Ramdani-Bougessa N., Mendonca N., et al., 2006.** CTX-M-3 and CTX-M-15 Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases in isolates of *Escherichia coli* from a hospital in Algiers, Algeria. *Journal of clinical microbiology* : 4585-4586

**Rodier J., Bazin C., Broutin J.-P., Chambon P., Champsaur H., Rodi L., 1996.** L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer : chimie, physico-chimie, microbiologie, biologie, interprétation des résultats. 8<sup>e</sup> édition DUNOD

**Rysz M., Alvarez P.J.J., 2004.** Amplification and attenuation of tetracycline resistance in soil bacteria: aquifer column experiments. *Water Research* 38 3705–3712

#### S

**Sambrook J., Fritsh E.F. and Maniatis.T., 1989 .** *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.N.Y ; 11

**Sougakoff W., 2003.** Aspects génétiques, moléculaires et épidémiologiques de la résistance aux  $\beta$ -lactamines. GH.Pitié-Salpêtrière

**Sougakoff W. et David.T.2003.** Aspects, génétiques, moléculaires et épidémiologiques de la résistance aux résistances aux  $\beta$ -lactamines. GH Pitié-Salpêtrière. Université Paris-VI.

#### T

**Thomson J.M. and Bonomo R.A., 2005.** The threat of antibiotic resistance in Gram negative pathogenic bacteria:  $\beta$ -lactams in peril!, *Current Opinion in Microbiology*, 8:518–524

**Touati A., Benallaoua S., Frith E. F. and Maniatis T., 2006.** First report of CTX-M-15 and CTX-M-3  $\beta$ -lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Béjaia, Algérie. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 1-.6

#### V

**Vedel G., Picard B., Philippon A., Gilly L., Krishna Moorthy R. and Nevoot P., 1997.** The analysis of live carbapenimicillin-hydrolysing enzymes by electrophoresis methods. *Mes-Mic Robiol*. 140 : 579-590.

**Vedel G., 2005.** Simple method to determine  $\beta$ -lactam resistance phenotype in *Pseudomonas aeruginosa* using the disc agar diffusion test. *Journal of Antimicrobial*

#### W

**Weidman B., 1986.** Genetic and biochemical basis of Enterobacteriaceae to  $\beta$ -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother*. 18 supplB : 31-38.

**Witte W., 2000.** Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora : environment. *International Journal of Antimicrobial Agents* 14 (2000) 321–325.

**Z**

**Zeba b., 2005.** Overview of  $\beta$ -lactamase incidence on bacterial drug resistance. *African Journal of Biotechnology* Vol. 4 (13), pp. 1559-1562,

**Zomahoun C., 2004.** Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées des infections urinaires au laboratoire de microbiologie du centre national hospitalier universitaire-Hubert Koutoukou Maga (C.N.H.U.-H.K.M.) de Cotonou. Thèse, Université du Mali, Faculté de médecine de pharmacie et d'odonto-stomatologie.

*REFERENCES ELECTRONIQUES*

(<http://reflexions.ulg.ac.be>)

(<http://www.medscape.com>).

# *ANNEXES*

**Tableau I:** Nom des souches sélectionnées sur IMP

Station	abréviation	Nom de la souche
La Fayette	F <sub>1</sub> <sup>IMP</sup>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
	F <sub>3</sub> <sup>IMP</sup>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
	F <sub>4</sub> <sup>IMP</sup>	<i>Bulkholdrea cepacea</i>
Embouchure du lac de Réghaia	R <sub>1</sub> <sup>IMP</sup>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Surcouf	S <sub>1</sub> <sup>IMP</sup>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
	S <sub>2</sub> <sup>IMP</sup>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
	S <sub>5</sub> <sup>IMP</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	S <sub>6</sub> <sup>IMP</sup>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Ain Tagourait	S <sub>8</sub> <sup>IMP</sup>	<i>Bulkholdrea cepacea</i>
	T <sub>2</sub> <sup>IMP</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

**Tableau II:** Nom des souches sélectionnées sur CTX.

Station	abréviation	Nom de la souche
La Fayette	F <sub>1</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	F <sub>3</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	F <sub>4</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	F <sub>5</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Bordetella sp.</i>
	F <sub>6</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	F <sub>7</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Bordetella sp.</i>
Embouchure du lac de Réghaia	R <sub>1</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Pseudomonas fluorescece</i>
	R <sub>2</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Pseudomonas fluorescece</i>
	R <sub>3</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	R <sub>4</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	R <sub>7</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Pseudomonas fluorescece</i>
	R <sub>8</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	R <sub>9</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	R <sub>10</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Pseudomonas fluorescece</i>
	R <sub>11</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	R <sub>12</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	R <sub>13</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Pseudomonas fluorescece</i>
Station de Surcouf	R <sub>15</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	R <sub>16</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	S <sub>1</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Escherichia coli</i>
	S <sub>2</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Bordetella sp.</i>
	S <sub>3</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Acinitobacter baumannii</i>
	S <sub>4</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	S <sub>5</sub> <sup>CTX</sup>	<i>Ochrobacter antropique</i>

Les disques imprégnés d'antibiotiques (Biorad) utilisés dans les tests d'antibiogramme, de synergie et d'antagonisme, sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau III** : Antibiotiques utilisés : leurs familles, charges et abréviations.

Famille	<b>β-Lactamines</b>		
	Antibiotique	Charge (µg)	Abréviation
<b>Pénicillines</b>	Ticarcilline	75	<b>TIC</b>
	Pipéracilline	75	<b>PIP</b>
	Amoxicilline	25	<b>AMX</b>
<b>Céphalosporines</b>	Céfalotine	30	<b>CF</b>
	Mecillinam	10	<b>MEC</b>
	Mezlocilline	10	<b>MZ</b>
	Cefsulodine	30	<b>CFS</b>
	Cefpirome		<b>CPO</b>
	Cefotaxime	30	<b>CTX</b>
	Ceftazidime	30	<b>CAZ</b>
	Céftriaxone	30	<b>CRO</b>
	Céfépime	30	<b>FEP</b>
<b>Céphamicynes</b>	Céfoxitine	30	<b>FOX</b>
<b>Carbapénème</b>	Imipénème	10	<b>IMP</b>
<b>Inhibiteur de β-lactamases</b>	Pipéracilline-Tazobactam	75/10	<b>PTZ</b>
	Ticarcilline + acide clavulanique	75/10	<b>TCC</b>
	Amoxicilline + Clavulanate	20/10	<b>AMC</b>
<b>Monobactame</b>	Aztréonam	30	<b>ATM</b>
<b>Aminosides</b>			
	Kanamycine	30 UI	<b>K</b>
	Gentamycine	10 UI	<b>GM</b>
<b>Tétracyclines</b>			
	Tétracycline	30 UI	<b>TE</b>
<b>Phénicol</b>			
	Chloramphénicol	30	<b>C</b>
<b>Sulfamides</b>			
	Sulfamide	200	<b>SSS</b>
	Triméthoprim	5	<b>TMP</b>
	Triméthoprim/Sulfaméthazol	1.25/23.75	<b>SXT</b>
<b>Quinolones</b>			
	Acide nalidixique	30	<b>NA</b>
	Ciprofloxacine	5	<b>CIP</b>
<b>Rifampicines</b>			
	Rifampicine	30	<b>RA</b>