

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر وتهيئة الساحل
Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



**Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master et
d'Ingénieur**

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Hydrobiologie Marine et Continentale

Spécialité : Biotechnologie marine

Thème :

**Caractérisation et évaluation de la résistance aux antibiotiques
chez les entérocoques *sp* isolés dans le milieu marin**

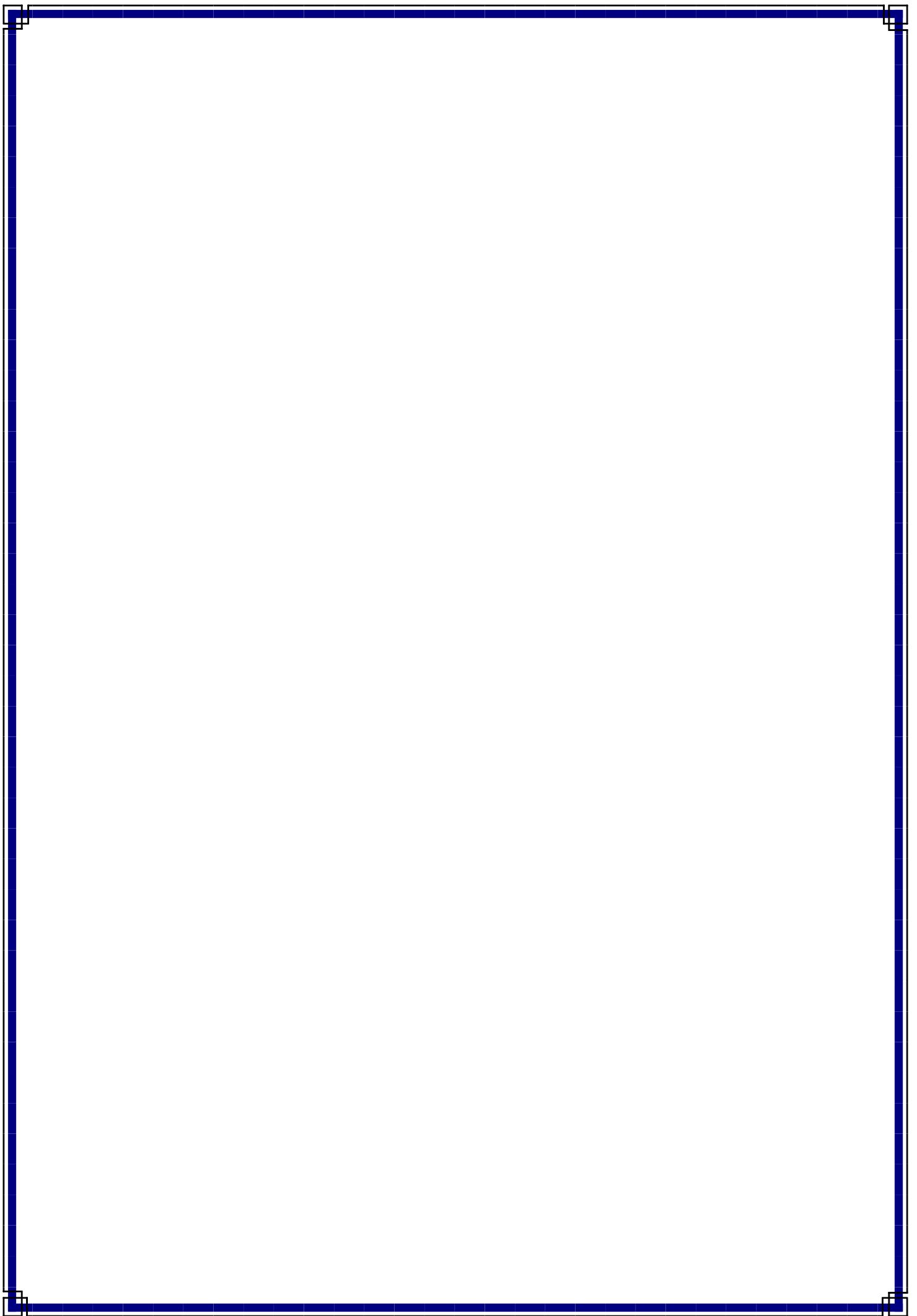
Présenté par :

CHAACHOUA ALAEDDINE

Soutenu le 28/10/2021, devant le jury composé de :

Mme MAHDID S.	Grade Maitre Assistante A	Présidente
Mme CHAOU N.	Grade Maitre Assistante A	Promotrice
Mme ALOUACHE S.	Grade Maitre de Conférences A	Co-Promotrice
M. KADA M.	Grade Maitre-Assistant A	Examineur
Mme AMAR I.	Grade Maitre Assistante A	Examinatrice

Année universitaire : 2020- 2021



DEDICACE

*Je dédie ce modeste travail qui s'est achevé grâce à l'aide de Dieu, le TOUT
PUISSANT :*

A mon père YAHIA

A ma mère Naima KELLACI

Mes spéciales dédicaces :

*A la mémoire de mon grand-père ABDELKADER que Dieu lui fasse miséricorde,
tu seras toujours dans nos cœurs*

A mon frère ABDERRAOUF

Ainsi qu'à tous mes frères et sœurs

Sans oublier mon deuxième père RICHARD DAVID ALAN CRUZ

REMERCIEMENTS

Avant tout je remercie le Dieu, le TOUT PUISSANT qui m'a donné le courage, la volonté, la force et surtout la santé pour accomplir ce modeste travail.

Mes plus vifs remerciements s'adressent particulièrement :

A ma directrice de mémoire Mme CHAOU Nadia pour avoir dirigé ce travail avec patience et rigueur, vous m'avez accordé votre précieux temps malgré vos multiples occupations.

Un grand merci pour ma Co-promotrice Dr ALOUACHE.S pour sa disponibilité et Sa rigueur scientifique.

Je souhaite exprimer ma très grande gratitude aux membres de mon jury, les Professeurs S.MAHDID, M.KADA ainsi que Mme I.AMAR qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et pour leur investissement dans l'évaluation de ce manuscrit.

Je tiens tout particulièrement à remercier toute l'équipe des ingénieurs de laboratoire pour leur aide précieuse particulièrement Mme REFES, Mr YUCEF ainsi que Mme Houda.

Je voudrais également remercier vivement l'ingénieur DJERAI NOUREDDINE pour ses nombreux conseils et idées qui ont apporté différentes avenues à mon projet. Ses conseils furent grandement appréciés.

Un merci à ceux sans qui je ne serais pas là. Maman, papa. Merci pour tout ce que vous avez fait car je vous dois tout. Une très forte pensée à mes frères et sœurs qui ont dû subir pendant des années mon stress et ma mauvaise humeur, je vous aime tous. Malgré les sales coups de la vie, nous sommes unis et nous le resterons à jamais. Ad usque fidelis.

Maintenant, il est temps de dire un gros merci à tous mes amis : Yahia, Fahima, Abdelhakim, Djihad, Zahra, les inséparables Rania et Imène, Naouel, Lana, Djihène et Ikrame qui m'ont suivi de près durant toutes mes études. Je ne vous dirai jamais assez merci d'avoir été là pour moi durant les grosses épreuves que j'ai vécu et d'avoir cru en moi. Votre amour et votre amitié furent d'une grande aide durant toutes ces années. Je vous dis également merci pour votre patience et votre soutien. Un gros merci à mon oncle Belkacem, ma tante Hafida et Yamina de leur présence et encouragement. Je suis également reconnaissant du soutien que j'ai reçu de Richard CRUZ, mon deuxième père

Mes remerciements reviennent à tous ceux qui étaient là pour leurs encouragements et leur compréhension.

Finalement, je remercie tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.

Liste des abréviations

ARG : Antibiotic résistance genes.
ADH: décarboxylation de l'acide aminé arginine par l'arginine dihydrolase.
AMY: fermentation de l'amygdaline (glycoside).
ARA: fermentation de l'arabinose (sucre pentose).
BLBVB : Bouillon lactosé bilié au vert brillant.
CIT: utilisation du citrate comme seule source de carbone.
TDA : (Tryptophane désaminase): détection de l'enzyme tryptophane désaminase: réactif à mettre - Chlorure ferrique.
Esp : Extracellular surface protein.
GEL: test de production de l'enzyme gélatinase qui liquéfie la gélatine.
GLU: fermentation du glucose (sucre hexose).
GeI : la gélatinase.
HGT: Horizontal gene transfer.
H₂S: production de sulfure d'hydrogène.
HLGR: High-level gentamicin resistance.
INO: fermentation de l'inositol (polyalcool cyclique).
IND: Test Indole - production d'indole à partir de tryptophane par l'enzyme tryptophanase.
Réactif - L'indole est détecté par l'ajout du réactif de Kovac.
Kb : Kilo base unité de mesure en biologie moléculaire.
KDa : kilo dalton est une unité de masse moléculaire.
LPS : Lipopolysaccharide.
LDC: décarboxylations de l'acide aminé lysine par la lysine décarboxylase.
MGE : Mobile genetic elements.
MRSA : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.
MAN: fermentation du mannose (sucre hexose).
MEL: fermentation du mélibiose (disaccharide).
ONPG : test de l'enzyme β -galactosidase par hydrolyse du substrat o-nitrophényl-bD-galactopyranoside.
ODC: décarboxylations de l'acide aminé ornithine par l'ornithine décarboxylase.
PBP : Penicillin-binding protein.
RAM : Résistance aux antimicrobiens.
RHA: fermentation du rhamnose (sucre de méthyl pentose).
SA : Substance d'agrégation.
SOR: fermentation du sorbitol (sucre d'alcool).
SAC: fermentation du saccharose (disaccharide).
Tn : Transposon.
URE: test de l'enzyme uréase.
VP : le test de Voges-Proskauer pour la détection de l'acétoïne (acétylméthylcarbinol) produite par fermentation du glucose par des bactéries utilisant la voie du butylène glycol.
VRE : Vancomycin-resistant enterococci.

Liste des tableaux

Tableau 1: les différentes classes d'antibiotiques et leurs modes d'actions (compoundchem.com, 2014).....	7
Tableau 2: Coordonnées géographiques de la plage de Ain Taya (coordonnés GPS).....	19
Tableau 3: Coordonnées géographiques de la plage bateau cassé (coordonnés GPS).....	19
Tableau 4: Coordonnés géographiques de la plage sirène 2(coordonnées GPS).	19
Tableau 5: Coordonnées géographiques de la plage Sidi Fredj (coordonnées GPS).	20
Tableau 6: Coordonnées géographiques de la plage Kheloufi 1(coordonnées GPS).....	20
Tableau 7: Coordonnées géographiques de la plage Colonel Abbes (coordonnées GPS).	21
Tableau 8 : Liste des antibiotiques en disques utilisés.	30
Tableau 9: Résultats des coliformes des différentes plages analysées.	32
Tableau 10 : Identification des espèces par la galerie API 20E.	38
Tableau 11: Un tableau récapitulatif des résultats d'identification par les tests classiques.....	46

Liste des figures

Figure 1 : Dendrogramme ARNr 16S de la position phylogénétique d' <i>Enterococcus</i> (adapté de Klein, 2003).	3
Figure 2 : <i>Enterococcus faecalis</i> au microscope électronique. United States Department of Agriculture (2019).	4
Figure 3: Les modes d'action des antibiotiques Inserm/Koulikoff, Frédérique (2017).	8
Figure 4: Schéma illustrant les différents mécanismes de résistance aux antibiotiques (Springernature.com, 2004).	9
Figure 5 : Mécanismes génétiques de dissémination de la résistance aux antibiotiques (Springernature.com, 2004).	11
Figure 6 : Situation géographique des sites de prélèvement (ArcGis).	18
Figure 7 : Galerie Api 20E (ephytia.inra.fr/2016).	28
Figure 8 : Schéma de la disposition des disques d'antibiotiques.	31
Figure 9 : Résultat du dénombrement des coliformes.	32
Figure 10 : Résultats du dénombrement des coliformes totaux dans le sédiment.	34
Figure 11 : Résultats de présence d' <i>E.coli</i> dans le sédiment d'Ain Taya à gauche et celui de Sidi Fredj et bateau cassé à droite.	35
Figure 12 : Résultats de croissance sur la gélose Slanetz et Bartley.	36
Figure 13 : Résultats de croissance sur la gélose BEA.	36
Figure 14 : Evolution des entérocoques dans les six plages au mois de Mai et de Juin.	37
Figure 15 : Variation des concentrations d'entérocoques fécaux dans les sédiments étudiés.	38
Figure 16 : Résultats d'identification des souches isolées pour la galerie API 20E.	39
Figure 17 : Taux de résistance aux antibiotiques dans les six plages pour le prélèvement du mois de Mai.	40
Figure 18 : Taux de résistance aux antibiotiques dans les six plages pour le prélèvement du mois de Juin.	41
Figure 19 : Résultats de croissance d'entérocoques isolés du sédiment.	42
Figure 20 : Taux de résistance aux antibiotiques dans les six plages par rapport aux sédiments.	43
Figure 21 : Aspect microscopique des souches entérocoques isolées après coloration de Gram (Gr *100).	44
Figure 22 : Résultats des différents tests classiques.	46
Figure 23 : Prévalence de la résistance aux antibiotiques de 28 souches isolées.	47
Figure 24 : Illustration des résultats de l'antibiogramme pour la souche S1.	48

Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction générale.....	1
Chapitre I : Revue bibliographique	
I. Description générale des entérocoques	2
I.1. Perspective historique	2
I.2-Taxonomie et caractères bactériologiques	2
a. Taxonomie	2
b. Caractères bactériologiques.....	3
I.3. Habitat	4
I.2. Pathogénicité des entérocoques.....	4
I.2.1. Facteurs de virulence.....	5
- Les facteurs d'adhésion.....	5
- Les enzymes lytiques	6
- Facteurs anti-phagocytaires.....	6
- Formation de biofilm.....	6
I.2.2. Antibiotiques et antibiorésistance	6
I.2.2.1. Les antibiotiques et leurs mécanismes d'action	6
I.2.2.2. Résistance aux antibiotiques	8
I.2.2.3. Histoire de l'antibiorésistance.....	9
I.2.2.4. Les types de résistance	10
I.2.2.5. Résistance et sensibilité des entérocoques	13
I.3. Application à la biotechnologie	16
Chapitre II : Matériel et méthodes	
II- Matériel et méthodes	18
II.1. Présentation de la zone d'étude	18
II.2. Prélèvement et transport des échantillons.....	21
II .2. Méthodes	21
II.2.1. Analyse microbiologique des échantillons	21
II 2.1.1 Dénombrement des coliformes totaux et fécaux dans l'eau par la méthode de filtration sur membrane	21
II.2.1.2. Dénombrement des Entérocoques dans l'eau par méthode de filtration sur membrane	22

II.2.1.3. Recherche des coliformes totaux, fécaux et <i>E.coli</i> dans le sédiment par la méthode du nombre le plus probable (N.P.P)	22
Dénombrement de coliformes thermotolérants et <i>E.coli</i>	23
II.2.1.4. Dénombrement des Entérocoques dans le sédiment par la méthode du nombre le plus probable (N.P.P)	24
II.2.2. Prévalence de la résistance aux antibiotiques des Entérocoques	24
II.2.3. Techniques d'identification des entérocoques	25
II .2.3.1. Coloration de Gram	25
II.2.3.2. Test de la catalase	26
II.2.3.3. Test de l'oxydase	26
II .2.3.4. Test Mannitol- mobilité	26
II .2.3.5. Test de résistance à la chaleur	27
II .2.3.6. Test de résistance au tellurite de potassium	27
II.2.3.7. Test de résistance à la salinité	27
II .3. Identification des coliformes par la Galerie API 20E	27
II.4. Étude de la résistance aux antibiotiques par Antibiogramme	28
Chapitre III : Résultats et discussion	
III- Résultats et discussion	32
III. 1. Qualité microbiologique des échantillons :	32
III. 2. Identification des coliformes	38
III. 3. Prévalence de la résistance aux antibiotiques chez les entérocoques	39
III .4. Identification des entérocoques	43
• Coloration de Gram	44
• Test à la catalase	44
• Test de l'oxydase	44
• Test mannitol mobilité	44
• Test de résistance à la chaleur	45
• Test de résistance au tellurite de potassium	45
• Test de résistance à la salinité	45
III .4. Antibiogramme	47
Discussion	49
Conclusion	51
Bibliographie	
Annexes	

Introduction générale



Introduction générale

Pendant de nombreuses années, les espèces d'entérocoques ont été considérées comme inoffensives pour l'homme et considérées comme sans importance médicale. Parce qu'elles produisent des bactériocines, les espèces d'entérocoques ont été largement utilisées au cours de la dernière décennie dans l'industrie alimentaire comme probiotiques ou comme cultures de démarrage (Foulquie Moreno *et al.* 2006). Les entérocoques sont devenus l'un des agents pathogènes nosocomiaux les plus courants, avec un taux de mortalité élevé pouvant atteindre 61 % chez les patients (De Fátima Silva Lopes *et al.* 2005), (Fisher et Phillips, 2009).

Face à cette situation alarmante à l'échelle mondiale, plusieurs travaux de recherche se font dans les différents laboratoires dans le but d'isoler et d'évaluer la résistance de ces microorganismes aux agents antimicrobiens.

Ces résistances ont été bien étudiées chez la grande majorité des souches cliniques d'origine humaine ou animale, mais nous n'avons pas beaucoup de données sur leur devenir une fois les bactéries sont émises dans le milieu marin.

Cependant, les entérocoques ont été adoptés comme indicateurs de la pollution fécale humaine dans l'eau de mer en plus des coliformes en raison de leur ubiquité dans les matières fécales humaines et de leur persistance dans l'environnement. La mer est enfin l'exutoire de la majorité des résidus de l'activité humaine ; elle est considérée comme une boîte aux ordures ou plus précisément un dépotoir.

Au cours de la réalisation de ce modeste travail, notre premier but était d'évaluer l'état de la résistance aux antibiotiques de souches d'entérocoques isolés à partir de l'eau et des sédiments de six plages algéroises exposées à différents niveaux d'apport anthropique. En deuxième lieu, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de la résistance aux antibiotiques d'une collection d'entérocoques réalisée en exclusivité dans le milieu marin en Algérie.

Chapitre I
Revue bibliographique

I. Description générale des entérocoques

I.1. Perspective historique

Le terme « entérocoque » trouve son origine à la fin du 19^e siècle lorsque Thiercelin a décrit une coque saprophyte, d'origine intestinale, capable de provoquer une infection.

Il décrit ce microbe comme un diplocoque à Gram positif et proposa le nom « Entérocoque » pour souligner sa morphologie et son origine intestinale (Thiercelin et Jouhaud, 1899).

Depuis, de nombreuses tentatives ont été faites pour distinguer les espèces *Enterococcus* des espèces *Streptococcus*.

En 1937, Sherman a classé les espèces de *Streptococcus* en quatre sous-groupes : streptocoques fécaux (entérocoques), streptocoques laitiers, viridis et les streptocoques pyogènes (Klein, 2003).

Il a fallu près de 80 ans avant que le genre *Enterococcus* a finalement pu être établi et accepté, avec l'avènement des techniques moléculaires raffinées et épreuves génétiques (Schleifer et Kilpper-Bälz 1984).

I.2-Taxonomie et caractères bactériologiques

a. Taxonomie

La taxonomie des entérocoques est soumise à un nombre continu de changements au fur et à mesure que la méthodologie d'identification et de différenciation évolue en combinaison avec un intérêt grandissant pour le genre.

L'identification des espèces est actuellement et principalement basée sur les puces à ADN, séquençage du gène de l'ARNr 16S et l'analyse du profilage des protéines cellulaires entières (Euzéby, 1997).

Le genre *Enterococcus* est placé dans le domaine des Bacteria, le phylum des Firmicutes, classe des Bacilli, ordre des Lactobacillales, famille des Enterococcaceae, branche des *Clostridium*. Monstein *et al.* (1998) ont proposé de subdiviser le genre *Enterococcus* en groupes d'espèces.

À ce jour, le genre est considéré comme comprenant 49 espèces dont *E. faecalis* et *E. faecium* sont les deux espèces les plus isolées.

La construction d'un dendrogramme avec ces Séquences des ARNr 16S permet de visualiser la position de l'espèce *Enterococcus* parmi les autres espèces de bactéries Gram positives.

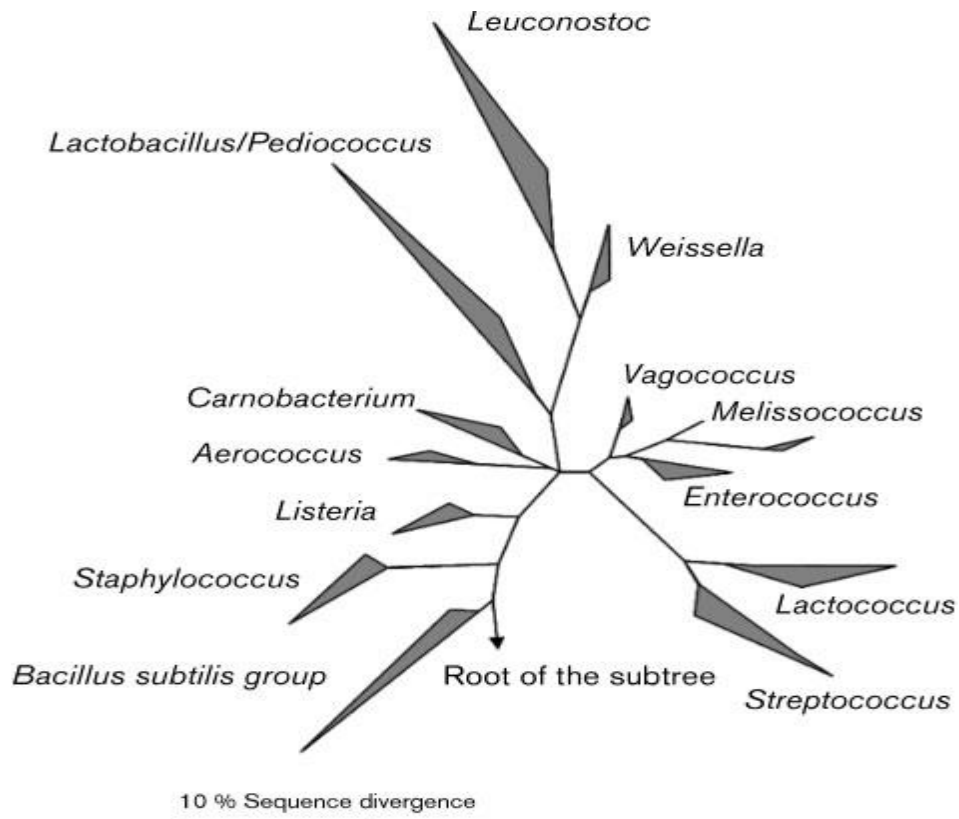


Figure 1 : Dendrogramme ARNr 16S de la position phylogénétique d'*Enterococcus* (adapté de Klein, 2003).

b. Caractères bactériologiques

Le genre *Enterococcus* se compose de bactéries anaérobies facultatives à Gram positif, oxydase négative et catalase négative, bien que certaines souches produisent de la pseudo-catalase lorsqu'elles sont cultivées sur des milieux contenant du sang (Sherman, 1937).

Elles sont des bactéries non sporulées qui peuvent se présenter à la fois sous forme de Cocci simples, par paire ou encore sous forme de chaînette (Schleifer *et al.* 1984).

Généralement, les entérocoques produisent des colonies de couleur blanche. Toutefois, quelques-unes sont de couleur jaune comme *E.mundtii*, *E.casseliflavus* et *E.sulfureus* (Higashide *et al.* 2005).



Figure 2 : *Enterococcus faecalis* au microscope électronique. United States Department of Agriculture (2019).

I.3. Habitat

Les entérocoques sont rencontrés dans presque tout ce avec quoi nous sommes en contact. L'omniprésence est attribuée à la nature robuste en combinaison avec une capacité d'adaptation exceptionnelle, puisque le micro-organisme est spécialisé pour prospérer dans l'environnement hostile du tractus gastro-intestinal des humains avec d'autres mammifères, oiseaux, reptiles et insectes (Mundt 1963, Martin et Mundt 1972).

Les entérocoques sont donc présents en tant que contaminants fécaux dans les eaux douces et marines, les sédiments, le sol, les plantes aquatiques et terrestres ainsi que les produits artificiels, y compris les produits laitiers et les aliments fermentés.

Les espèces d'entérocoques largement répandues qui ont été impliquées dans des infections humaines sont principalement *E. faecalis* et *E. faecium* mais aussi *E. casseliflavus*, *E. gallinarium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. avium*, *E. pseudoavium*, *E. malodoratus* et *E. raffinosus* (Mundy *et al.* 2000).

I.2. Pathogénicité des entérocoques

Malgré leur potentiel limité de provoquer des maladies ou aux toxines impuissantes, les entérocoques peuvent provoquer des infections chez les patients affaiblis et hospitalisés qui ont souvent été traités avec des antibiotiques à large spectre.

Une explication de leur implication dans la maladie peut donc être une combinaison de facteurs de virulence qui améliorent leur capacité à coloniser, adhérer et induire des lésions tissulaires (Gilmore *et al.* 2002).

I.2.1. Facteurs de virulence

Les facteurs de virulence des entérocoques sont sujets à davantage d'études étant donné leur présence de plus en plus inquiétante lors d'infections nosocomiales et à leur résistance accrue aux antibiotiques (Franz *et al.*, 2004).

Les facteurs de virulence retrouvés jusqu'ici chez les entérocoques sont répartis en 5 grandes fonctions : les facteurs permettant l'adhésion, les facteurs participants à la formation de biofilm, les facteurs sécrétés, les enzymes lytiques et les facteurs anti-phagocytaires (Willems et Bonten 2007).

- Les facteurs d'adhésion

Les entérocoques, comme d'autres organismes Gram-positifs apparentés, décorent leur Peptidoglycane et leur membrane cellulaire avec une variété de polysaccharides et de protéines et qui jouent un rôle important dans la virulence.

- **Substance agrégative**

La substance d'agrégation (SA) est une glycoprotéine dont la présence peut conduire à une augmentation de la capacité de colonisation (Eaton *et al.* 2001).

- **Protéines de surface extracellulaire**

La protéine de surface extracellulaire Esp est associée à la paroi cellulaire. Elle a été décrite pour la première fois chez les entérocoques par Shankar *et al.* (1999). On pense qu'elle favorise l'adhésion, la colonisation et l'évasion du système immunitaire avec un certain rôle dans la résistance aux antibiotiques (Foulquie Moreno *et al.* 2006).

- **Acide lipotéichoïque**

Une adhésine ou un ligand amphiphile qui est associée à la membrane cytoplasmique. C'est un facteur de virulence potentiel et partage plusieurs propriétés pathophysiologiques du lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram négatif (Sriskandan et Cohen, 1999).

- Les facteurs sécrétés

- **Les entérocoques** (bactériocines des entérocoques)

Les entérocoques produisent une grande variété de bactériocines, dénommées entérocoques. Ce sont des peptides de faible poids moléculaire. Cependant, le spectre d'activité, le mode d'action, la structure, la thermostabilité et le pH d'activité varient d'un type de bactériocine à l'autre (Van Belkum *et al.* 2000 ; Chen *et al.* 2003 ; Dortu *et al.* 2009).

- **La cytolysine (β -hémolysine)**

Le facteur de virulence le plus étudié. Cette toxine peptidique lyse les cellules animales en générant des pores dans la membrane cellulaire (LeBlanc, 2006).

-Les enzymes lytiques

- **Hyaluronidases**

L'hyaluronidase est une enzyme dégradante associée à des lésions tissulaires. Elle dépolymérise le mucopolysaccharide du tissu conjonctif, facilitant ainsi la propagation des entérocoques ainsi que leurs toxines à travers les tissus de l'hôte (Kayaoglu et Orstavik, 2004).

- **Gélatinase et sérine protéase**

Le rôle principal de la gélatinase et de la sérine protéase est censée fournir les nutriments aux bactéries en dégradant les tissus de l'hôte, bien qu'ils aient également une certaine fonction dans la formation de biofilm (Gilmore, 2002 ; Mohamed et Huang, 2007). La gélatinase (GelE) est une métallo-endopeptidase de zinc extracellulaire sécrétée par *E. faecalis*. Elle est capable d'hydrolyser la gélatine, la caséine, l'hémoglobine et d'autres peptides bioactifs. (Koch et al, 2004).

- Facteurs anti-phagocytaires (Capsule et paroi cellulaire polysaccharidique)

Les composantes de la paroi cellulaire qui sont nécessaires aux interactions complexes entre la bactérie et le système immunitaire de l'hôte, sont considérées comme étant des facteurs de virulence (Thakker, M., et al. 1998).

- Formation de biofilm

Le biofilm est une population de cellules enfermées dans une matrice hydratée de substances exopolymères, de protéines, de polysaccharides et d'acides nucléiques (Costerton, 2001).

Un biofilm mature peut tolérer les antibiotiques à des concentrations 10 à 1000 fois supérieures à celles nécessaires pour éliminer les bactéries planctoniques. Les bactéries présentes dans les biofilms sont résistantes à la phagocytose, ce qui rend les biofilms extrêmement difficiles à éradiquer des hôtes vivants (Lewis, 2001).

I.2.2. Antibiotiques et antibiorésistance

I.2.2.1. Les antibiotiques et leurs mécanismes d'action

La notion d'antibiotiques a été mise en lumière par Sir Alexander Flemming en 1929 lorsque ce dernier démontra l'inhibition de la croissance d'une souche de *Staphylococcus aureus* en

présence d'une colonie de *Penicillium* dans le milieu de culture. A partir de cette découverte, la forme chimique, utilisable *in vivo* et produite industriellement de la pénicilline verra le jour en 1942 afin d'être utilisée sur le front de la seconde guerre mondiale (Skvara, 2004).

Un antibiotique est une substance d'origine microbienne qui a un effet bactériostatique ou bactéricide envers les autres microorganismes. Les antibiotiques altèrent donc le fonctionnement normal des bactéries en exerçant une action spécifique, c'est-à-dire qu'ils dérèglent le métabolisme de certains microorganismes sans affecter les cellules humaines ou animales. Ils peuvent être naturels, semi-synthétiques ou synthétiques (Skvara, 2004).

Les interactions qui se produisent entre les différents antibiotiques et les bactéries se nomment mécanismes d'action des antibiotiques. Ceux-ci peuvent se diviser en cinq classes : inhibition de la biosynthèse de la paroi bactérienne, inhibition de la synthèse ou du fonctionnement de la membrane plasmique, inhibition des fonctions de l'acide nucléique (transcription et réplication), inhibition des analogues métaboliques de l'acide nucléique, et inhibition de la synthèse protéique par interférence au niveau des ribosomes (Colmen *et al.* 1994).

Tableau 1: les différentes classes d'antibiotiques et leurs modes d'actions (compoundchem.com, 2014).

Famille d'antibiotiques	Exemple	Mode d'action
Les bêta-lactamines (céphalosporines, pénicillines)	Amoxicilline Céfaléxine	Inhibition de la biosynthèse de la paroi bactérienne
Glycopeptides	Vancomycine Teicoplanine	
Aminoglycosides	Streptomycine	Inhibition de la synthèse protéique
Phénicoles	Chloramphénicol	
Oxazolidinones	Linézolide	
Tétracyclines	Lymécycline	
Macrolides	Erythromycine	
Streptogramines	Virginiamycine	
Quinolones	Ciprofloxacine	Inhibition des fonctions de l'acide nucléique (ADN, ARN)
Ansamycines	Rifamycine	
Sulfonamides	Sulfadiazine	Inhibition des analogues métaboliques de l'acide nucléique
Lipopeptides	Daptomycine	Inhibition de la synthèse ou du fonctionnement de la membrane plasmique

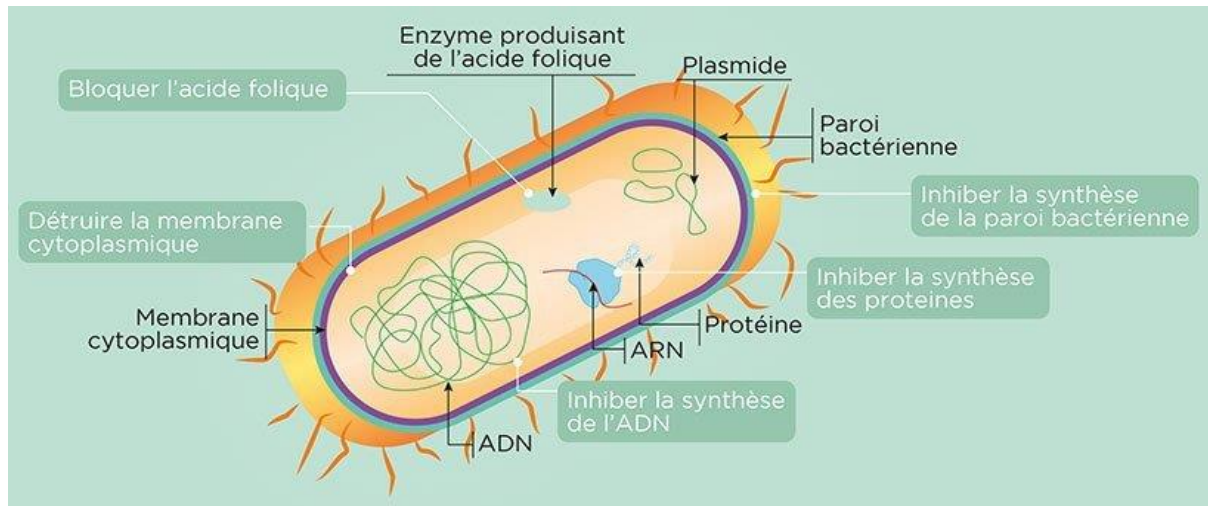


Figure 3: Les modes d'action des antibiotiques Inserm/Koulikoff, Frédérique (2017).

I.2.2.2. Résistance aux antibiotiques

Dès le début de l'utilisation clinique des antibiotiques, des souches bactériennes résistantes à ces molécules sont apparues. En effet, Fleming lançait déjà un avertissement face à une utilisation excessive de la pénicilline dès 1945 lors de son discours d'acceptation du prix Nobel. La résistance aux antibiotiques est la capacité d'un microorganisme d'inactiver ou d'exclure les antibiotiques. Elle se développe via la sélection naturelle par des mutations aléatoires ou des échanges de gènes de résistance (transfert horizontal) entre les bactéries.

La résistance bactérienne est médiée par trois mécanismes principaux : (Figure 4)

- La diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique par imperméabilité membranaire et/ou efflux actif où l'antibiotique est activement pompé hors la bactérie afin qu'il ne puisse lui nuire.
- La diminution d'affinité de l'antibiotique pour sa cible due à une modification ou une protection de celle-ci.
- La modification ou l'inactivation de l'antibiotique lui-même par un processus enzymatique (Cattoir et Leclercq, 1997).

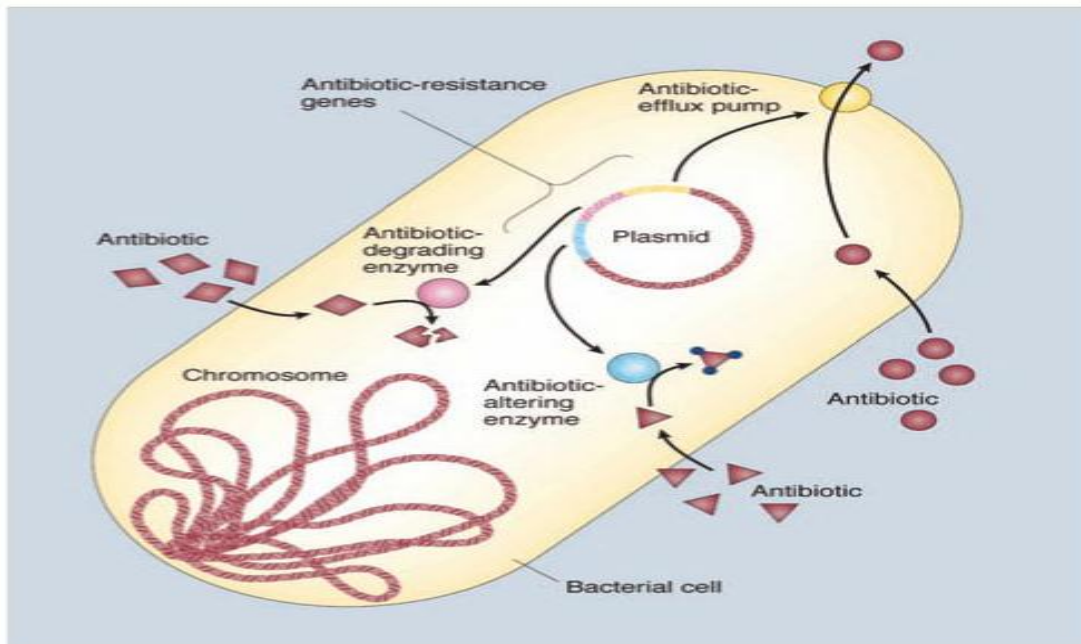


Figure 4: Schéma illustrant les différents mécanismes de résistance aux antibiotiques (Springernature.com, 2004).

I.2.2.3. Histoire de l'antibiorésistance

L'ampleur sans cesse croissante de la résistance aux antimicrobiens (RAM) rencontrée chez les agents pathogènes humains est une préoccupation majeure pour la santé publique dans le monde, limitant les options de traitement pour les infections bactériennes et réduisant ainsi l'efficacité clinique tout en augmentant les coûts de traitement et la mortalité. Avec un manque de développement de nouveaux antibiotiques et une résistance croissante même aux antibiotiques de dernier recours, il est nécessaire de conserver ceux disponibles. (Nordmann *et al.* 2012). Les antibiotiques naturels existent depuis plusieurs années (Barlow et Hall, 2002 ; Hall et Barlow, 2004 ; Bhullar *et al.* 2012 ; Wright et Poinar, 2012), offrant un avantage sélectif pour les souches productrices en inhibant ou en éliminant d'autres bactéries en compétition pour les ressources (Martinez, 2008 ; Aminov, 2009). De plus, leur fonction en tant que molécules de signalisation cellule-cellule a été décrite (Davies, 2006 ; Linares *et al.* 2006). Tout comme les antibiotiques sont anciens, les gènes de résistance aux antibiotiques (ARG) le sont aussi, comme en témoignent les études identifiant divers ARG dans d'anciens échantillons de pergélisol (D'Costa *et al.* 2011 ; Perron *et al.* 2015) et des microbiomes de grottes isolées (Bhullar *et al.* 2012). La résistance aux antibiotiques peut se produire soit par des mutations, soit par l'acquisition de gènes conférant une résistance par transfert horizontal de gènes (HGT), dont ce dernier est considéré comme le facteur le plus important dans la future pandémie de RAM. (Barlow et Hall, 2002), (von Wintersdorff CJH *et al.* 2016).

I.2.2.4. Les types de résistance

Les bactéries peuvent posséder deux types de résistance à un antibiotique :

I.2.2.4.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle, dont le support génétique est le chromosome bactérien, est une caractéristique qui est présente de façon intrinsèque chez toutes les souches d'une même espèce à un antibiotique. Elle est stable, transmise à la descendance. Elle permet de définir le spectre d'activité des antibiotiques. À titre d'exemples, les entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa* sont naturellement résistants aux macrolides car ceux-ci ne peuvent pas traverser la membrane externe de la paroi de ces bactéries à Gram négatif. *Klebsiella pneumoniae* est naturellement résistante à l'amoxicilline, ampicilline et à la ticarcilline, grâce à une bêta-lactamase chromosomique naturelle (Touahir, 2017).

I.2.2.4.2. Résistance acquise (transfert horizontal de gènes)

Acquisition au cours du temps de nouveaux mécanismes de résistance aux antibiotiques par une souche peut se faire par mutation ou acquisition de nouveau matériel génétique mobile (plasmide, transposon) via des mécanismes de transfert génétiques : conjugaison, transformation ou transduction (Norman et al. 2009) (Figure 5).

✓ Conjugaison

La conjugaison est le transfert d'ADN par un processus en plusieurs étapes nécessitant un contact de cellule à cellule via des pili de surface cellulaire ou des adhésines. Elle est facilitée par la machinerie conjugative qui est codée soit par des gènes sur des plasmides à réplication autonome, soit par des éléments conjugatifs intégratifs dans le chromosome (Smillie *et al.* 2010 ; Wozniak et Waldor, 2010).

✓ Transformation

En 1928, Griffith est devenu le premier à démontrer un échange génétique direct entre différentes souches de *Streptococcus pneumoniae* (Griffith, 1928). Certaines bactéries sont capables de l'incorporation d'ADN nu du milieu externe. C'est une acquisition permanente pouvant entraîner une modification héréditaire de la bactérie réceptrice. Il est vite devenu évident que les bactéries pouvaient utiliser la transformation pour échapper aux antibiotiques, en échangeant des ARG. En 1951, Hotchkiss a induit une résistance à la pénicilline et à la streptomycine chez des souches auparavant sensibles de *S. pneumoniae* en les exposant à l'ADN de souches résistantes (Hotchkiss, 1951). Alexandre *et al.* Approfondirent ce travail en

démontrant le transfert intra- et inter- espèces de résistance à la streptomycine entre *H. influenzae*, *H. parainfluenzae* et *H. suis* (Alexander et Leidy, 1953 ; Alexander et al. 1956).

Pour que la transformation ait lieu, plusieurs conditions doivent être remplies. Il doit y avoir de l'ADN présent dans l'environnement extracellulaire ; la bactérie receveuse doit être en état de compétence ; et l'ADN transloqué doit être stabilisé, soit par intégration dans le génome receveur, soit par recircularisation (dans le cas de l'ADN plasmidique) (Thomas et Nielsen, 2005).

✓ Transduction

Les bactériophages jouent un rôle important dans la formation du microbiome bactérien dans n'importe quel environnement. Grâce à une transduction spécialisée ou généralisée, les bactériophages peuvent transférer des gènes avantageux pour leurs hôtes microbiens, favorisant ainsi leur propre survie et dissémination (Modi *et al.* 2013).

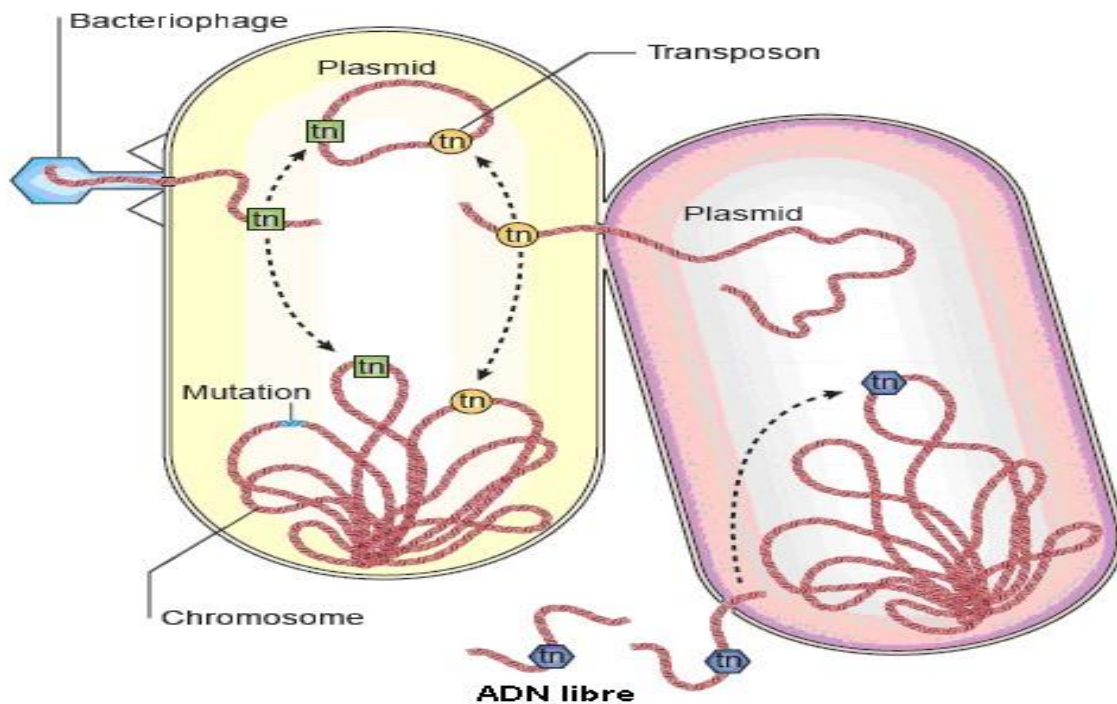


Figure 5 : Mécanismes génétiques de dissémination de la résistance aux antibiotiques (Springernature.com, 2004).

I.2.2.4.3. Supports génétiques mobiles de la résistance

Le transfert d'éléments mobiles contribue à l'évolution bactérienne par la propagation rapide de nouveaux phénotypes complexes (Jackson *et al.* 2011 ; Hao, 2012).

➤ **Les plasmides**

Les plasmides sont des molécules d'ADN extra-chromosomique bi-caténaire et généralement circulaires, d'une taille pouvant varier de moins de 2 kb à plus de 100 kb. Ce sont des structures stables, capables de répllication autonome, constituées de quatre modules génétiques. Ils ont une fonction essentielle dans le transfert horizontal car ils peuvent former des coïntégrats avec d'autres plasmides, être intégrés, en totalité ou partiellement, au chromosome bactérien mais surtout peuvent servir de vecteurs de mobilité pour les transposons et les intégrons. Ce type de résistance est le plus fréquent et il est de plus en plus répandu. Il concerne tous les types d'antibiotiques et peut même se transmettre entre bactéries d'espèces ou de genres différents. Une bactérie peut acquérir plusieurs plasmides portant chacun un ou plusieurs gènes de résistance à différents types d'antibiotiques. Les plasmides porteurs de résistance multiples sont ainsi transférés à de nombreuses populations (Touahir, 2017).

➤ **Les transposons**

Le transposon (Tn) est un élément mobile de l'ADN capable de transfert intracellulaire. C'est la transposase qui permet son déplacement. Afin d'aiguiller correctement leur transposase dans sa fonction, les transposons sont généralement bordés par des séquences inversées répétées qui sont reconnues par l'enzyme. Certains de ces éléments mobiles portent aussi d'autres gènes codant pour la régulation de la transposition. Les transposons peuvent changer d'emplacement sur l'ADN par plusieurs mécanismes, comme la transposition conservative et la transposition répllicative (Snyder et Champness, 2007).

En plus de leurs gènes caractéristiques, certains transposons portent aussi des gènes accessoires, tels que des gènes de résistance aux antibiotiques. (Snyder et Champness, 2007).

➤ **Les intégrons**

Les intégrons sont des éléments génétiques complexes. Ils forment un système de recombinaison spécifique de site pouvant capturer des gènes et les réorganiser sous forme de cassettes. Ils sont généralement portés par les plasmides et les chromosomes bactériens. Ils peuvent aussi être véhiculés par les transposons puisqu'ils sont incapables de s'auto-répliquer. Les intégrons possèdent deux segments conservés, séparés par une région variable, capable d'inclure des gènes de résistance ou d'autres gènes cassettes. Les trois constituants fondamentaux de l'intégron sont le gène *intI* codant pour une intégrase, le site de recombinaison *attI* et un promoteur P permettant la transcription des gènes capturés ou cassettes (Touahir, 2017).

Les intégrons jouent donc probablement un rôle important dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques au sein du monde bactérien (Skurnik, 2009 ; N. Touahir, 2017).

I.2.2.5. Résistance et sensibilité des entérocoques

Les entérocoques possèdent de nombreuses résistances naturelles aux antibiotiques comme les aminosides (à bas niveau), les fluoroquinolones, les céphalosporines ou encore la clindamycine chez toutes les espèces sauf *E. faecium*, *E. hirae* et *E. durans*. Ces nombreuses résistances naturelles expliquent en partie l'émergence de certaines espèces comme germes opportunistes nosocomiaux. En plus de ces résistances dites naturelles, de nombreuses résistances acquises aux principales classes d'antibiotiques utilisées dans le traitement des infections à entérocoques telle que les pénicillines, les glycopeptides et les aminosides lorsque ces derniers sont utilisés en association (haut niveau de résistance) (C. Isnard, 2017).

▪ Résistance aux bêta-lactamines

Les bêta-lactamines agissent en inhibant la synthèse de la paroi cellulaire. Les protéines de liaison à la pénicilline (PBPs) qui sont impliquées dans la synthèse et l'assemblage de la couche de peptidoglycane dans la paroi cellulaire sont les cibles des bêta-lactamines (Kak *et al.* 2002).

La résistance intrinsèque aux bêta-lactamines est due à la faible affinité des PBPs pour les bêta-lactamines. Cette résistance diffère entre les différents bêta-lactamines, les pénicillines ayant le plus d'activité contre les entérocoques, les carbapénèmes ayant un peu moins d'activité et les céphalosporines ayant le moins d'activité. La résistance élevée aux pénicillines est principalement due à une surproduction d'une PBP (les entérocoques ont au moins 5 PBPs différentes) avec une faible affinité naturelle pour les pénicillines ou à des mutations qui rendent la PBP de faible affinité encore moins sensible à l'inhibition par les pénicillines (Fontana *et al.* 1996).

▪ Résistance aux glycopeptides

Les glycopeptides sont de grosses molécules qui inhibent la synthèse de la paroi cellulaire en se liant à l'extrémité peptidyl-D-Alanyl-D-Alanine du précurseur du peptidoglycane et forment ainsi un obstacle stérique qui inhibe davantage la synthèse de la paroi cellulaire. La résistance aux glycopeptides est médiée par la synthèse de précurseurs de peptidoglycane modifiés auxquels les glycopeptides ne peuvent pas se lier (Kak *et al.* 2002).

En 1986, certains *E. faecium* ont montré des résistances à des antibiotiques de type glycopeptides (vancomycine et la teicoplanine) (Le Blanc, 2006). L'apparition de souches

potentielles à la vancomycine est d'autant plus inquiétante que cet antibiotique est considéré comme étant le dernier recours dans le cadre du traitement d'infections par entérocoques. De plus, il est souvent utilisé comme une alternative à l'ampicilline, la pénicilline et aux aminoglycosides chez les personnes allergiques (Franz *et al.* 2004). Par ailleurs, les entérocoques vancomycine-résistants sont habituellement multirésistants et dès lors un réel problème de santé publique (Inoue *et al.* 2006).

La vancomycine est un antibiotique glycopeptidique cationique dérivé de l'organisme *Amycolatopsis orientalis* (anciennement connu sous le nom de *Streptomyces orientalis* ou *Nocardia orientalis*). La vancomycine a été découverte pour la première fois par Edmund Kornfield (travaillant chez Eli Lilly) en 1953 et approuvée par la Food and Drug Administration des États-Unis en 1958 en raison du développement rapide de la résistance à la pénicilline par les staphylocoques (Levine, 2006). Cliniquement, la vancomycine est utilisée pour les infections à *S. aureus* et pour les infections causées par *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium difficile* et les entérocoques. La charge croissante du MRSA (*S.aureus* résistant à la méticilline) et d'autres infections bactériennes à Gram positif dans les hôpitaux a conduit à l'utilisation croissante de la vancomycine dans le monde entier depuis les années 1980 (Levine, 2006).

Il existe 6 types de résistance à la vancomycine : VanA, VanB, VanC, VanD, VanE et VanG. Seule la résistance de type VanC est intrinsèque (chromosomique) et non transférable. Les autres types de résistance sont dites acquis. Pour les types VanA, VanB, VanD, VanE et VanG, la résistance est inducible et transférable (Leclercq, 1988).

▪ **Résistance aux tétracyclines**

Les tétracyclines inhibent la synthèse protéique en interférant de façon réversible avec la sous-unité 30S du ribosome et plus précisément avec l'ARNr 16S et la protéine ribosomale S7. Cette interaction empêche l'ancrage du site accepteur des ARNt (aminoacyl-ARNt) sur le ribosome et bloque ainsi l'étape d'élongation peptidique (Schnappinger et Hillen 1996 ; Chopra et Roberts 2001).

La résistance aux tétracyclines est causée par de très nombreux déterminants génétiques mais repose sur 2 principaux mécanismes, efflux actif de l'antibiotique et la protection ribosomale (Miller *et al.* 2014).

Contrairement aux systèmes de conjugaison à Gram négatif, la conjugaison des espèces *Enterococcus* ne nécessite pas de pili, et implique un système induit par les phéromones (Andrup et Andersen, 1999).

▪ **Résistance aux aminoglycosides**

Les aminosides agissent en se liant à l'ARNr 16S de la sous-unité ribosomique 30S et en interférant avec la synthèse des protéines. Les entérocoques présentent généralement un niveau modéré de résistance intrinsèque aux aminosides ce qui a été attribué à une mauvaise absorption des antibiotiques. Par exemple, l'analyse de mutants sélectionnés qui présentaient une résistance accrue à la gentamicine in vitro a suggéré qu'une absorption réduite de la gentamicine peut contribuer directement à une résistance accrue (Aslangul, *et al.* 2006), bien que les mutations ou les gènes responsables de l'altération de l'absorption ne fussent pas sans ambiguïté identifiées. Cependant, certaines preuves suggèrent que d'autres mécanismes peuvent contribuer, voire être principalement responsables, de la résistance intrinsèque de certains entérocoques aux aminosides. La résistance intrinsèque modérée spécifique à l'espèce aux aminosides chez *E. faecium* est renforcée par une ARNr méthyltransférase codée dans le chromosome, EfmM (Galloway-Peña, Roh, Latorre, Qin et Murray, 2012)

La résistance de haut niveau aux aminosides (HLGR) est conférée par un mécanisme distinct de ceux décrits ci-dessus, et surtout, abolit l'activité bactéricide synergique des aminosides en association avec des agents actifs sur la paroi cellulaire qui sont importants dans le traitement des infections à entérocoques sévères, comme l'endocardite. (Kak, Donabedian, Zervos, Kariyama, Kumon et Chow, 2000 ; M. Gilmore *et al.*, 2014).

▪ **Résistance aux quinolones**

Les quinolones ne présentent généralement qu'une activité modérée contre les entérocoques. Les quinolones inhibent la croissance des bactéries en interférant avec la réplication de l'ADN, en particulier en se liant aux topoisomérases de type II qui contrôlent le superenroulement de l'ADN (ADN gyrase et ADN topoisomérase IV) et en inhibant leur fonction, entraînant des cassures double brin létales de l'ADN. La résistance aux quinolones chez de nombreuses espèces de bactéries se produit via des mutations dans les « régions déterminant la résistance aux quinolones » des gènes qui codent pour la gyrase et la topoisomérase IV. Ces mutations empêchent une liaison efficace de l'antibiotique à l'enzyme, ce qui permet la poursuite de la réplication de l'ADN malgré la présence de l'antibiotique. De telles mutations ont été observées dans des isolats cliniques d'entérocoques résistants aux quinolones et dérivés (M. Gilmore *et al.*, 2014).

▪ **Résistance aux oxazolidinones**

Le linézolide, qui est une classe d'antibiotiques importante et entièrement synthétique, est utilisé pour le traitement des entérocoques résistants à la vancomycine (VRE). Bien que la résistance au linézolide chez *E. faecalis* ait été documentée, elle reste encore rare.

Les oxazolidinones exercent un effet bactériostatique en interférant avec le complexe d'initiation de la traduction et en empêchant le placement de l'aminoacyl-ARNt au site A du ribosome, inhibant ainsi la synthèse des protéines (Wilson et al. 2008). Le mécanisme de résistance le plus courant chez les entérocoques implique des mutations ponctuelles dans les gènes codant pour le domaine V de l'ARNr 23S, résultant en un site cible déformé pour l'oxazolidinone (Leach et al. 2007 ; M. Gilmore et al, 2014).

I.3. Application à la biotechnologie

Des études de la microflore des produits traditionnels ont montré que les entérocoques jouent un rôle important dans la fermentation et la maturation de certains produits en contribuant au développement des caractéristiques organoleptiques telles que le goût et l'arôme, entre autres. En plus de la contribution sensorielle, les entérocoques ont la capacité de produire des substances antimicrobiennes, y compris les bactériocines. Ils peuvent aussi avoir des propriétés probiotiques.

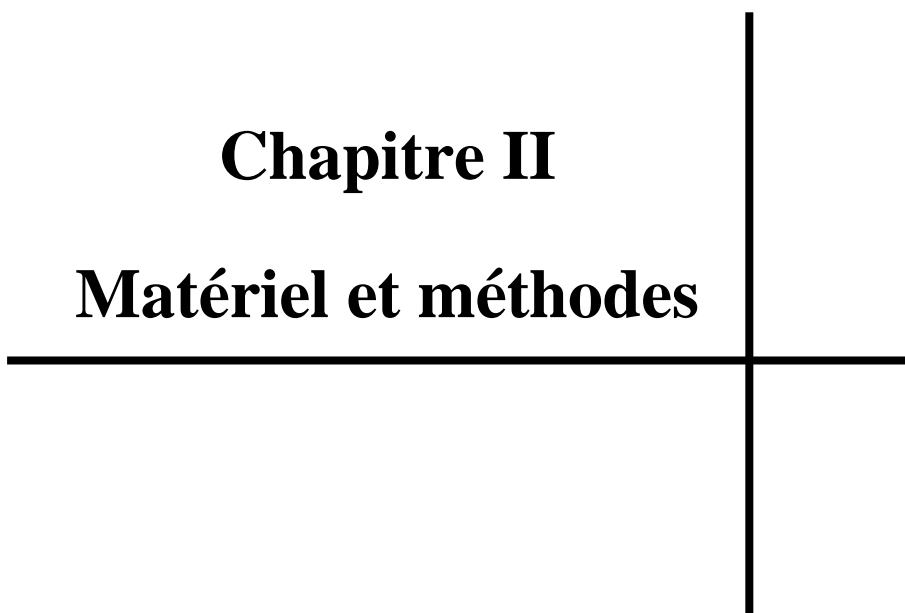
- Utilisation des entérocoques comme probiotiques

Les probiotiques sont définis comme des préparations de micro-organismes viables en quantités suffisantes qui peuvent moduler la flore de l'organisme hôte, exerçant ainsi des effets bénéfiques pour la santé (FAO/WHO, 2006).

L'emploi des entérocoques comme probiotiques est potentiellement possible puisqu'ils appartiennent aux bactéries lactiques et font partie intégrante de la flore commensale de l'homme et des animaux. En Suisse, l'efficacité clinique d'*E. faecium* SF68 a été démontrée dans la prévention de diarrhées associées aux antibiotiques chez l'adulte et dans le traitement de diarrhées chez l'enfant (Bellomo et al. 1980). Cette souche a été également testée pour traiter des diarrhées aiguës, et lors d'essais cliniques en Belgique, un raccourcissement de ces diarrhées de 1 à 3 jours a été observé (Buydens et al. 1996). D'autre part, une préparation probiotique, appelée Causido®, composée d'un mélange de *S. thermophilus* et d'*E. faecium*, montre un effet hypocholestérolémiant à court terme (Bertolami et al. 2008).

Chapitre II

Matériel et méthodes



II- Matériel et méthodes

Ce travail a pour objectif d'évaluer la résistance aux antibiotiques des entérocoques isolés à partir de plusieurs plages ainsi qu'un essai de caractérisation des profils de résistance chez quelques souches isolées. Deux sorties ont été réalisées le 30 mai et le 25 juin 2021.

II.1. Présentation de la zone d'étude

Pour réaliser ce travail, l'échantillonnage a été fait dans 6 plages dont 2 sont localisées sur le côté Est de la baie d'Alger et 3 sur le côté Est de la baie de Bou-Ismaïl et la plage de Ain Taya. La baie d'Alger est située au centre de la côte algérienne, de forme semi-circulaire, elle s'inscrit en creux dans la plaine de la Mitidja. Sa superficie est approximativement de l'ordre de 180 Km² (Leclaire, 1972).

La baie de Bou-Ismaïl anciennement appelé Castiglione, est l'une des plus importantes de la côte Algérienne. Elle est située dans la partie centrale du littoral Algérien, à 50km à l'Ouest d'Alger dans la wilaya de Tipaza. Cette baie couvre une surface de l'ordre de 350km² (Braik, 1989, *in* Haddouche, 2003). La baie est le réceptacle d'oueds à régime irrégulier : Mazafran, Nador et Béni-Messous (Khaoui, 2003).

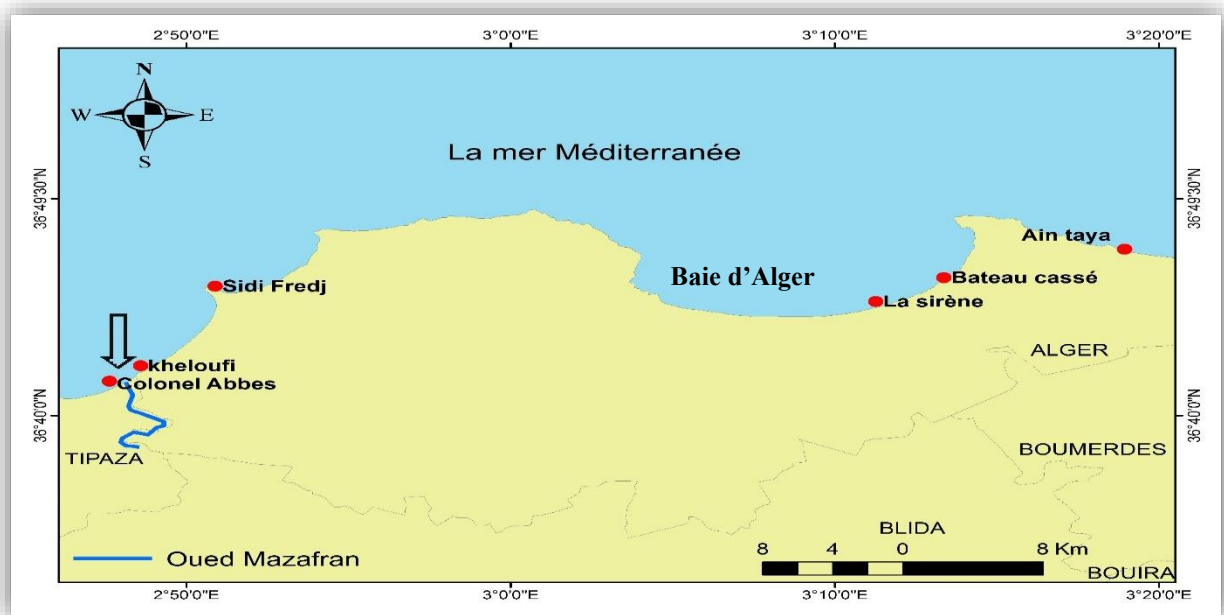


Figure 6 : Situation géographique des sites de prélèvement (ArcGis).

- **Plage Ain Taya :**

Matériel et méthodes

Cette plage est située à Ain chrob dans la commune d'Ain Taya à 25 Km à l'est d'Alger centre. Elle est de type sableux et s'étale sur une longueur de 600 mètres et une largeur de 10 mètres. La baignade y est autorisée. On y trouve une ferme aquacole (Orca marine) spécialisée dans l'élevage de moules juste à côté (Bensam et Behloul, 2009).

Tableau 2: Coordonnées géographiques de la plage de Ain Taya (coordonnés GPS).

Coordonnées	DMS
Latitude	36 ° 47' 17.054''
Longitude	3 ° 18 ' 56.183''
Altitude	17m

- **Plage Bateau cassé :**

La plage Bateau Cassé est située à Ford de l'eau, Bordj El Kiffan, à l'Est de la wilaya d'Alger. La plage est de type sableux et rocheux. Elle s'étale sur une longueur de 1119m, une largeur de 72 mètres et une superficie de 38228m², c'est une plage ouverte avec des agglomérations urbaines à proximité. La baignade est autorisée (Bouich et Radja, 2012).

Tableau 3: Coordonnées géographiques de la plage bateau cassé (coordonnés GPS).

Coordonnées	DMS
Latitude	36 ° 46' 2.147''
Longitude	3 ° 13 ' 25.504''
Altitude	2m

- **Plage la sirène II :**

Cette plage se trouve à Bordj El Kiffan, Elle est de 134 de longueur et 45 m de largeur. C'est une plage autorisée à la baignade, Elle se trouve à proximité d'agglomération.

Tableau 4: Coordonnés géographiques de la plage sirène 2(coordonnées GPS).

Coordonnées	DMS
Latitude	36 ° 44' 59.66''
Longitude	3 ° 11 ' 15.751''
Altitude	14m

- **Plage Sidi Fredj :**

La Plage se trouve à vingt-six kilomètres à l'ouest du centre-ville d'Alger. Elle est distante de 750 mètres de sa jumelle "Sidi Fredj Ouest " qui se trouve de l'autre côté de la presqu'île. Elle est se trouve entre la digue secondaire du port et le premier ouvrage de protection (épi) et qui s'étend sur 400m (Messaoudi, 2002).

Tableau 5: Coordonnées géographiques de la plage Sidi Fredj (coordonnées GPS).

Coordonnées	DMS
Latitude	36 ° 45' 40.038''
Longitude	2 ° 50 ' 53.051''
Altitude	0m

- **Plage Kheloufi I :**

Cette plage se trouve à Zéralda, Elle est de 1660 m de longueur et 60 m de largeur. C'est une plage autorisée à la baignade. L'oued Mazafran se trouve à l'ouest de cette plage. (Ghezali, 2016).

Tableau 6: Coordonnées géographiques de la plage Kheloufi 1(coordonnées GPS).

Coordonnées	DMS
Latitude	36 ° 42' 11.069''
Longitude	2 ° 48 ' 35.266''
Altitude	21m

- **Plage Colonel Abbas :**

La plage de Colonel Abbas s'étend sur 3 Km. Elle couvre pratiquement tout le littoral de la ville marine qu'on appelle Douaouda marine. La granulométrie de cette plage est constituée de sable fin, moyen et des galets. Cette plage se trouve à côté de l'embouchure de l'oued Mazafran (Labdaoui et Belabbas, 2020).

Tableau 7: Coordonnées géographiques de la plage Colonel Abbes (coordonnées GPS).

Coordonnées	DMS
Latitude	36 ° 41' 30.748''
Longitude	2 ° 47 ' 37.64''
Altitude	21m

II.2. Prélèvement et transport des échantillons

Les échantillons d'eau de mer ont été collectée dans des flacons stériles de 500ml à 20cm de profondeur et à une distance de 1m du bord de mer.

Les flacons sont tenus à la main près des points de prélèvement puis plongés dans l'eau et refermé sous l'eau, après le remplissage, afin d'éviter toute contamination.

Alors que les sédiments ont été prélevés manuellement dans des sachets stériles.

Un étiquetage précis a été élaboré pour la reconnaissance des stations de prélèvements une fois au laboratoire.

Les échantillons ont été transportés au laboratoire dans une glacière et les analyses ont été effectuées dans les 6 heures qui ont suivi le prélèvement.

II .2. Méthodes

II.2.1. Analyse microbiologique des échantillons

II 2.1.1 Dénombrement des coliformes totaux et fécaux dans l'eau par la méthode de filtration sur membrane

Cette méthode consiste à la filtration de 100 ml de l'échantillon ou de ses dilutions sur une membrane stérile en ester de cellulose, de porosité 0,45 µm, placée dans une rampe de filtration en inox de six postes dans des conditions stériles (Rodier *et al.* 2009). La membrane est déposée à la surface d'un milieu de culture choisi selon la recherche.

Technique

Dans des conditions stériles, la membrane est déposée en utilisant des pinces stériles sur la plaque poreuse nettoyée avec de l'alcool stérile. Un volume de 100 ml d'échantillon agité soigneusement est filtré. Après filtration, la membrane est déposée à la surface d'une gélose au Tergitol pour la recherche des coliformes totaux et thermotolérants. L'incubation du milieu est

effectuée à $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 24-48h pour les coliformes totaux, alors que pour les coliformes thermotolérants, elle est effectuée à 44°C .

II.2.1.2. Dénombrement des Entérocoques dans l'eau par méthode de filtration sur membrane

La recherche des entérocoques s'effectue en deux étapes, la première est présomptive alors que la deuxième est confirmative.

- **Test présomptif**

Cette méthode consiste à la filtration de 100 ml de l'échantillon ou de ses dilutions sur une membrane stérile, de porosité $0,45\ \mu\text{m}$, placée dans une rampe de filtration dans des conditions stériles (Rodier et al. 2009). La membrane est déposée à la surface du milieu solide Slanetz et Bartley et incubée à 37°C pendant 24h. Après 24 heures d'incubation, les streptocoques fécaux apparaissent sous forme de petites colonies rouges ou roses, lisses, légèrement bombées.

- **Test confirmatif**

Pour la confirmation on prend la même membrane et on la dépose sur le milieu BEA (gélose Bile Esculine Azide) à 37°C pendant 2h.

Si les colonies deviennent noires : on est en présence d'entérocoques.

II.2.1.3. Recherche des coliformes totaux, fécaux et *E.coli* dans le sédiment par la méthode du nombre le plus probable (N.P.P) :

Cette méthode de dénombrement est une estimation statistique du nombre de microorganismes supposés distribués de manière parfaitement aléatoire (loi de poisson : probabilité d'apparition aléatoire des événements « rares »). Dans ce type de méthodes, les bactéries se multiplient librement dans le milieu liquide (par suite de l'utilisation de milieux sélectifs) et sont présentes par l'apparition d'un trouble ou virage de couleur du bouillon et dégagement de gaz (Hebbar, 2005).

Les coliformes fécaux sont des bactéries Gram négatives, aérobie et anaérobies facultatifs, en forme de bâtonnets, ne sporulant pas et fermentant le lactose en produisant du gaz en 24 heures lors de leur croissance à $44,5^{\circ}\text{C}$ (APHA et al, 1997). Ils produisent de l'indole en eau peptonée sans tryptophane en culture à $44,5^{\circ}\text{C}$ (OMS/PNUE, 1995).

Ce groupe comprend *Escherichia coli* et, à un degré moindre les genres : *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* et *C.diversus*.

Technique

Les solutions mères des échantillons sont préparées par la pesée de 1g de sédiment de chaque plage, puis dans des conditions stériles on l'ajoute à un tube contenant 9ml d'eau distillée stérile avec agitation pendant quelques secondes à l'aide d'un vortex.

Préparer 3 séries de 3 tubes (BLBVB).

Prélever 1mL de la suspension mère à l'aide d'une micropipette avec cônes stériles et transférer à chaque fois dans un tube contenant 10 ml de bouillon de culture, mélanger et s'assurer de l'absence d'air dans la cloche de Durham pour le bouillon lactosé bilié au vert brillant.

La dilution suivante s'effectue en répétant les opérations décrites ci-dessus mais en partant du tube de la dilution précédente.

La recherche des coliformes fécaux s'effectue en deux étapes :

Test présumptif

Il s'agit d'ensemencer une série de tubes contenant le milieu de BLBVB à partir des échantillons de sédiment à analyser.

Tous les microorganismes autres que les coliformes sont partiellement ou totalement inhibés par l'association de la bile et de vert brillant.

L'incubation se fait à 37 °C pendant 48 heures, les tubes présentant un trouble et un dégagement gazeux (1/3 du volume total de la cloche) sont présumptifs de la présence de coliformes. La confirmation peut se faire avec un deuxième passage sur ce milieu à 37°C. Le nombre caractéristique formé lors de la lecture est lue sur une table de NPP et les résultats sont exprimés par NPP coliforme/g de sédiment.

Dénombrement de coliformes thermotolérants et *E.coli*

A partir d'un milieu présumptif positif, prélever à l'aide d'une micropipette ou d'une pipette Pasteur préalablement stérilisée à la flamme et inoculer dans le bouillon Schubert

L'incubation s'effectue pendant 48 heures à 44 °C. Les tubes présentant un trouble accompagné d'un dégagement gazeux confirment la présence des coliformes fécaux. Les résultats sont exprimés en nombre de bactéries par 1g de sédiment à analyser en se référant à la table NPP (Rodier *et al.* 2005).

Afin de rechercher *E. Coli* il suffit d'ajouter quelques gouttes de réactif de Kovacs aux tubes positifs. L'apparition d'un anneau rouge est synonyme de présence d'*E.coli*.

II.2.1.4. Dénombrement des Entérocoques dans le sédiment par la méthode du nombre le plus probable (N.P.P)

La recherche des entérocoques fécaux s'effectue en deux étapes :

Test présomptif

Il s'agit d'ensemencer une série de tubes contenant le milieu de Rothe à partir des échantillons de sédiment à analyser. Le milieu de Rothe contient de l'azide de sodium qui est considéré comme agent sélectif pour la recherche des streptocoques (Delarras 2003).

La solution mère est préparée en diluant 1g du sédiment dans un tube contenant 9ml d'eau distillée stérile,

On a ensemencé 4 séries de 3 tubes contenant bouillon Rothe avec 1ml de la solution mère et de ces dilutions (10^{-2} à 10^{-4}) incubé à 37°C pendant 24h.

Test confirmatif

On prend 1ml de chaque tube positif et on l'ensemence dans 5ml de bouillon Litsky ; l'incubation se fait à 37°C pendant 24H. Les résultats positifs se traduisent par l'apparition d'un trouble et une pastille violette ou blanche au fond du tube.

Les résultats sont exprimés en nombre d'entérocoques par 1g de sédiment à analyser en se référant à la table NPP (Delarras, 2003 ; Rodier et al, 2005).

II.2.2. Prévalence de la résistance aux antibiotiques des Entérocoques

2.2.1. Dans l'eau :

L'évaluation des taux de résistance aux antibiotiques des entérocoques a été effectuée par la filtration de 100ml d'échantillon ou de dilution et l'incubation des membranes sur milieu Slanetz et Bartley additionné ou non des antibiotiques suivants à une concentration critique : la vancomycine ($10^5\mu\text{g/ml}$), la gentamicine ($4.10^4\mu\text{g/ml}$), l'ampicilline ($50\mu\text{g/ml}$), la tétracycline ($5\mu\text{g/ml}$), la ciprofloxacine ($80\mu\text{g/ml}$) et l'azithromycine ($0,01\text{g/ml}$).

L'incubation du milieu est effectuée à $35\pm 2^\circ\text{C}$ pendant 24-48h pour les entérocoques.

Après 24 heures d'incubation à $35\pm 2^\circ\text{C}$, les streptocoques fécaux apparaissent sous forme de petites colonies rouges ou roses, lisses, légèrement bombées. La confirmation de ces colonies se fait sur gélose BEA pendant 2h. Les entérocoques apparaissent noirs.

2.2.2. Dans le sédiment

Matériel et méthodes

Des aliquotes de 0,1 ml de la solution mère et des dilutions ont été étalés à la surface de la gélose Slanetz et Bartley additionnée de l'un des antibiotiques cités précédemment.

Calcul du taux de résistance

Le taux de bactéries entérocoques résistantes a été déterminé à la fin par le rapport du nombre de bactéries obtenues sur gélose BEA additionnée d'antibiotique sur le nombre de bactéries obtenus sur milieu sans antibiotique.

$$\text{Prévalence résistance (\%)} = \left(\frac{\text{Nombre de bactéries sur milieu avec antibiotique}}{\text{Nombre de bactéries sur milieu sans antibiotique}} \right) \times 100$$

II.2.3. Techniques d'identification des entérocoques

II .2.3.1. Coloration de Gram

C'est une double coloration qui nous permet de connaître la forme, l'arrangement (mode d'assemblage), la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées. Cette coloration permet de classer les bactéries selon leur capacité à fixer le cristal violet. Celles qui possèdent une enveloppe externe sont décolorées lors du lavage à l'éthanol (Gram négatif), alors que celles qui n'en possèdent pas vont retenir le colorant (Gram positif). La consistance et la valeur de la coloration de Gram correspond à des différences biochimiques entre la paroi des bactéries Gram positif et les bactéries Gram négatif (Franz et Holzapfel, 2004).

Technique

- Préparer et fixer un frottis bactérien à la chaleur du bec Bunsen.
- Recouvrir au violet de Gentiane (cristal violet) pendant 1min. Eliminer l'excès par l'eau courante ;
- Ajouter du Lugol (mordant) et appliquer pendant 1min, jeter l'excès par l'eau courante ;
- Traiter à l'alcool 95° pendant quelques secondes (10-15 secondes), puis rinçage à l'eau ;
- Recolorer à la Fuschine (safranine) pendant 60 à 75 secondes, rinçage à l'eau puis séchage.

Observation

L'observation se fait en ajoutant de l'huile à immersion au plus fort grossissement

(Grossissement : objectif x 100) en lumière blanche (lumière maximale).

Les bactéries Gram positif se colorent en violet alors que les Gram négatif se colorent en rose.

II.2.3.2. Test de la catalase

L'enzyme catalase a pour effet de catalyser la dismutation du peroxyde d'hydrogène (l'eau oxygénée) en eau et oxygène, selon la réaction suivante :



Technique :

La technique consiste à prélever une partie de la colonie et de l'émulsionner dans une goutte d'eau oxygénée. S'il y a dégagement des bulles de gaz ; catalase positive. En absence de bulles ; catalase négatif (Prescott *et al*, 2003).

II.2.3.3. Test de l'oxydase

Le test de l'oxydase est basé sur une éventuelle production bactérienne d'une enzyme de la chaîne respiratoire : oxydase intracellulaire en présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C (Vezina et Lacroix, 2000).

Technique

Placer un disque d'oxydase sur une lame propre et stérile.

Déposer à l'aide d'une pipette Pasteur une goutte de suspension bactérienne pure sur un disque oxydase", celui-ci contient de l'oxalate de diméthylparaphénylène diamine. Le développement d'une couleur violette signifie que le test est positif et que l'isolat possède l'enzyme oxydase (Kovacs *et al*, 1995).

II .2.3.4. Test Mannitol- mobilité

Le milieu Mannitol Mobilité permet l'étude de la fermentation du mannitol (caractère biochimique) et la mobilité de la souche (caractère morphologique). Ce milieu est utilisable uniquement pour les bactéries fermentatives. La présence d'une faible teneur d'agar (gélose molle) rend possible le déplacement des bactéries mobiles autour de la piqûre centrale (le milieu estensemencé à l'aide d'une pipette Pasteur à bout fermée et incubé à 37°C pendant 18-24 heures). La lecture de l'utilisation du mannitol se fait grâce à la présence d'un indicateur de pH, le rouge de phénol. L'utilisation du mannitol acidifie le milieu qui peut ainsi être révélé par le virage de l'indicateur de pH à sa teinte acide (jaune).

Matériel et méthodes

Les bactéries mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement, créant un trouble dans le milieu alors que les bactéries immobiles poussent uniquement le long de la strie d'ensemencement (Marchal et Bourdon, 1982).

II .2.3.5. Test de résistance à la chaleur

La plupart des entérocoques sont résistants et capables de pousser à des températures allant de 10 à 45°C et peuvent survivent à une température de 60°C pendant 30min.

Pour réaliser ce test nous avons ensemencé de 2 à 3 colonies ayant poussées sur gélose Slanetz et Bartley dans des tubes qui contiennent 5ml de BHIB puis placées 30 min au bain marie à 60°C. Par la suite, les tubes sont incubés à 37°C pendant 24 à 48 h. Les cultures positives ont été considérées comme des souches thermorésistantes après la formation de trouble (Stiles et Holzapfel, 1997 ; Teuber et Geis, 2006).

II .2.3.6. Test de résistance au tellurite de potassium

Enterococcus faecalis se différencie de la plupart des espèces d'entérocoques par la réduction du tellurite de potassium (J.Grosjean *et al.* 2017).C'est le test de reconnaissance d'*E.faecalis*.

Pour réaliser ce test nous avons ensemencé de 2 à 3 colonies ayant poussées sur gélose Slanetz et Bartley dans des tubes qui contiennent 4,5 ml de BHIB est additionné de 0,5 ml de tellurite de potassium préalablement dilué au 1/250. Par la suite, les tubes sont incubés à 37°C pendant 24 à 48 h. Les cultures positives ont été considérées comme des souches d'*E.faecalis*.

II.2.3.7. Test de résistance à la salinité

Une eau peptonée (100ml) additionnée de 6.5g de NaCl est utilisée pour déterminer les souches d'Entérocoques. Des tubes de bouillon hyper salé sont inoculés en ensemencant 2 à 3 colonies, puis incubés à 37°C pendant 24 à 48 h. Les cultures positives ont été considérées comme des souches halotolérantes lorsqu'il y a formation de trouble (Belaid et Hocine, 2017).

II .3. Identification des coliformes par la Galerie API 20E

Les galeries API (Analytical profile index) sont de réalisation facile et de haute performance (résultat fiable). Elles se présentent sous la forme d'une série de petits tubes, nommés tubules, correspondant chacun à un test biochimique spécifique. Chaque tubule est ouvert à son extrémité supérieure par une cupule pouvant être remplie, ou non, de liquide afin de placer le tube dans des conditions particulières. Chaque tube contient un substrat défini (ONPG, ADH, GEL...) et avec lequel les micro-organismes réagissent différemment(ephytia.inra.fr/ 2016).

Matériel et méthodes

Lorsqu'une suspension bactérienne de densité convenable est répartie dans les différentes alvéoles qui composent la microgalerie (contenant de substrats déshydratés), les métabolites produits durant la période d'incubation se traduisent par des changements de couleur spontanés ou révélés par addition de réactifs. Elle comprend 20 tests biochimiques.

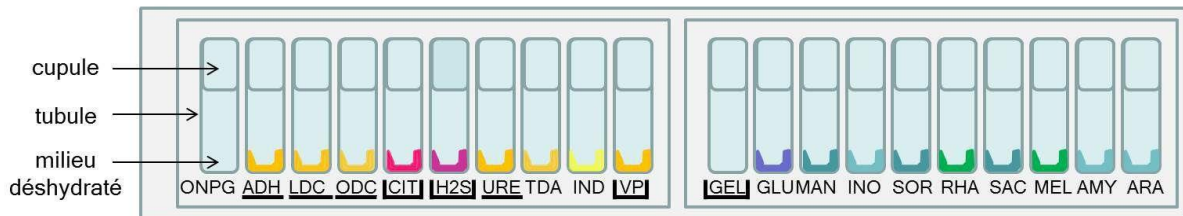


Figure 7 : Galerie Api 20E (ephytia.inra.fr/2016).

Mode opératoire

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Sortir la galerie de son emballage et placer la galerie dans la boîte d'incubation.
- Préparer la suspension bactérienne en introduisant 2 à 3 colonies par une anse de platine dans 5 ml d'eau distillée puis agiter avec un vortex.
- Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide d'une pipette Pasteur ou d'une micropipette (pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la micropipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant) :
- Pour les tests CIT, VP et GEL, remplir tube et cupule,
- Pour les autres tests, remplir uniquement les tubes.
- Pour les tests ADH, LDC, ODC, H₂S, URE créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Refermer la boîte et incuber à 36°C ± 2°C pendant 18-24 heures.

II.4. Étude de la résistance aux antibiotiques par Antibiogramme

L'étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé (CASFM, 2021).

Matériel et méthodes

L'antibiogramme a pour but de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) d'une souche bactérienne vis-à-vis de divers antibiotiques qui sont choisis selon la souche testée en tenant compte des résistances naturelles. Ces antibiotiques sont sous forme de disques de papier imprégnés avec une concentration déterminée d'agent antimicrobien. Ils sont clairement identifiés par un sigle, comportant 1 à 3 lettres, imprimé de chaque côté du disque.

Répartir le milieu Mueller Hinton dans des boîtes de Pétri stériles de façon à obtenir une épaisseur de $4 \text{ mm} \pm 0.5 \text{ mm}$ (soit environ 25 ml par boîte de Pétri de 90 mm de diamètre).

La croissance des bactéries dessine des halos d'inhibition au tour du disque d'antibiotique. La croissance bactérienne s'arrête en présence de la concentration minimale d'inhibition autour du disque d'antibiotique.

Mode opératoire

-Préparation de l'inoculum

-L'inoculum bactérien est préparé en ensemençant dans 5 ml d'eau physiologique stérile à raison de 0.9% au moins trois à cinq colonies bien isolées de même type morphologique d'une culture jeune sur milieu gélosé.

- Prélever à l'aide d'une pipette Pasteur ou de l'anse de platine. Décharger bien l'anse afin de préparer une solution bactérienne de 0,5 Mc Farland (10^8 cellules /ml).
- L'inoculum bactérien doit idéalement être employé dans les 15minutes qui suivent sa préparation.

-Ensemencement des boîtes :

Plonger un écouvillon en coton stérile dans la suspension bactérienne et éliminer l'excès de liquide en tournant l'écouvillon sur les parois du tube.

Ensemencer en stries sur toute la surface de la boîte, pour écouvillonner la totalité de la surface de la gélose, l'opération se répète encore deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois (trois directions) sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même et de passer l'écouvillon sur la périphérie de la gélose (pourtour de la gélose).

- Déposer les disques d'antibiotiques à la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile selon la figure 8.
- Les disques une fois déposés ne peuvent être déplacés car la diffusion des antibiotiques est très rapide.
- Laisser les antibiotiques pré-diffuser environs 15mi avant de les incuber à 37°C pendant 18-24h.

Matériel et méthodes

Les disques imprégnés d'antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme sont représentés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Liste des antibiotiques en disques utilisés.

Famille	Nom de l'antibiotique	Abréviation	Charge (µg)
Béta-lactamines	Amoxicilline + acide clavulanique	AMC	30
	Céfoxitine	FOX	30
	Céfotaxime	CTX	30
	Céftazidime	CAZ	30
	Aztréoname	ATM	30
	Ampicilline	AM	10
Sulfamides	Triméthoprim	TMP	5
	Triméthoprim-Sulfaméthoxazole	SXT	25
Aminosides	Amikacine	AK	30
	Gentamicine	CN	10
Quinolones	Acide nalidixique	NA	30
Tétracyclines	Tétracycline	TE	30
Lincosamides	Clindamycine	CD	2
Glycopeptides	Vancomycine	VA	30

-Interprétation des résultats

La croissance se traduira par l'apparition d'une nappe à la surface de la gélose avec formation d'halos d'inhibition autour des antibiotiques. Le diamètre de ce halo est mesuré à l'aide d'une règle et permet de classer la souche dans l'une des catégories sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R) selon les valeurs critiques.

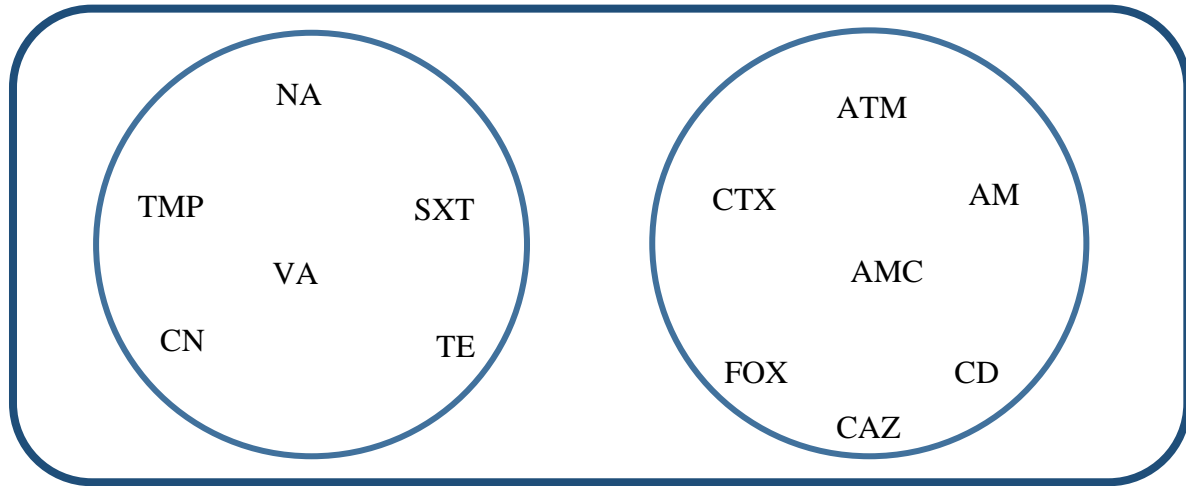


Figure 8 : Schéma de la disposition des disques d'antibiotiques.

Chapitre III

Résultats et discussion

III- Résultats et discussion

Au cours de notre étude, deux sorties ont été réalisées (mois de mai et mois de juin). Des échantillons d'eau de mer et de sédiments ont été prélevés et analysés. Les résultats obtenus des différentes analyses sont cités ci-dessous.

III. 1. Qualité microbiologique des échantillons :

La qualité microbiologique des sites étudiés (eau et sédiment) a été estimée par la recherche des indicateurs de contamination à savoir les coliformes totaux, fécaux et *E.coli* ainsi que les streptocoques fécaux.

III. 1.1. Dénombrement des coliformes totaux, fécaux et *E.coli* dans l'eau

Le résultat du dénombrement des coliformes sur la gélose Tergitol est présenté dans la figure 9 et le tableau 9.



Figure 9 : Résultat du dénombrement des coliformes.

Tableau 9: Résultats des coliformes des différentes plages analysées.

Période	Mois de Mai		Mois de Juin	
	Coliformes totaux (UFC/100ml)	Coliformes fécaux (UFC/100ml)	Coliformes totaux (UFC/100ml)	Coliformes fécaux (UFC/100ml)
Ain Taya	920	892	290	240
Bateau cassé	108	30	220	90
La Sirène	130	28	60	10
Sidi Fredj	1200	4	90	0

Résultats et discussion

Kheloufi I	480	52	ID	1190
Colonel Abbes	ID	ID	89000	69000
Norme Algérienne : <u>JORA N°46,</u> <u>14/07/1993</u>	<500 comme valeur guide pour les coliformes totaux et <10000 comme valeur limite. <100 comme valeur guide pour les coliformes thermotolérants et <2000 comme valeur limite.			

Les concentrations observées en coliformes thermotolérants sont nettement inférieures à celles des coliformes totaux. Les valeurs les plus faibles ont été observées dans la plage de Sidi Fredj, la Sirène et Bateau cassé, ces concentrations pourraient s'expliquer par le fait de l'emplacement de ces plages loin de rejets des eaux usées ainsi que l'absence d'industries aux alentours.

On note la présence importante de coliformes fécaux et de coliformes totaux dans les plages Colonel Abbes et Kheloufi I principalement, dénotant une forte charge bactérienne car elles sont exposées à la pollution due au déversement des eaux usées domestiques d'oued Mazafran. Ce dernier se déverse directement en mer sans aucun prétraitement au niveau de la plage Colonel Abbes.

Les concentrations de coliformes totaux et fécaux dans la plage Bateau cassé et la Sirène que ce soit en mai ou en juin ne dépassent pas les valeurs guides de la norme Algérienne, ce qui permet de dire qu'elles ont une eau de baignade de bonne qualité.

Pour la plage Ain Taya, les concentrations ne dépassent pas les valeurs limites de la norme. On observe la même chose pour la plage Sidi Fredj et Kheloufi I ce qui indique que ces plages ont une eau de qualité acceptable selon la norme Algérienne. Ceci est probablement dû aux mauvaises conditions météorologiques justes avant la sortie. Ces résultats pourraient être expliqués par la remise en suspension des particules et des bactéries en raison de mauvais temps.

Cependant, les concentrations au niveau de la plage Colonel Abbes sont beaucoup plus importantes que celles des valeurs limites de la norme Algérienne, ce qui permet de conclure que l'eau de cette plage est de mauvaise qualité. Ceci peut s'expliquer par la présence d'oued Mazafran qui se déverse directement dans cette plage, sa proximité de la plage de Kheloufi I explique aussi les résultats trouvés dans cette dernière.

La contamination par les matières fécales est récente et les indicateurs de contamination sont détruits dans les heures qui suivent (OMS/PNUE, 1995). Cependant, les analyses

Résultats et discussion

bactériologiques seules ne sont pas suffisantes pour le contrôle de l'eau de baignade car il faut effectuer en parallèle les analyses physico-chimiques qui jouent un rôle efficace dans l'orientation.

- **Dénombrement des coliformes totaux et fécaux dans le sédiment**

Les coliformes totaux ont été recherchés dans le sédiment, les résultats sont illustrés dans l'histogramme de la figure 10.

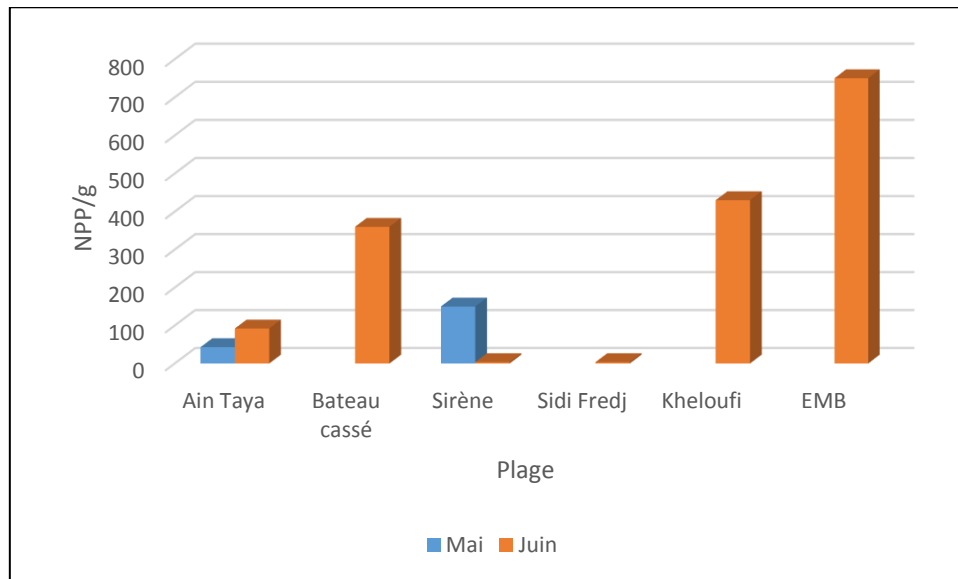


Figure 10 : Résultats du dénombrement des coliformes totaux dans le sédiment.

On observe une variation de concentrations en fonction de la plage et de la période, la plage Colonel Abbes enregistre toujours la concentration la plus élevée avec (750 CT/g) suivi par la plage Kheloufi I (430 CT/g) et Bateau cassé (360 CT/g), on note la différence de concentrations de coliformes totaux dans la plage la Sirène (150 CT/g) en Mai par rapport à (3,6 CT/g) en Juin, la même chose peut se dire pour Ain Taya (92 CT/g) en Juin par rapport à (43 CT/g) en Mai.

La plage Sidi Fredj enregistre les valeurs les plus faibles toujours avec (3,6 CT/g) en Juin et moins d'un microorganisme dans 1 g en Mai. Ce fait pourrait s'expliquer par l'absence d'apports récents en sable ou d'eau usée urbaine que ce soit domestique ou industrielle ou qui se trouve bien traitée avant d'y atteindre.

En ce qui concerne la présence de coliformes fécaux, ça a été signalé dans les sédiments de la plage d'Ain Taya et Colonel Abbes en Mai, et dans toutes les plages à l'exception de la Sirène en Juin. Pour ce qui est de l'espèce *E. coli*, il y avait présence dans la plage d'Ain Taya seulement en Mai et la plage bateau cassé et Sidi Fredj en Juin.

Résultats et discussion

La présence d'*E. coli* est mise en évidence par l'apparition d'un halo rouge immédiatement après l'ajout de réactif de Kovacs, les résultats sont présentés dans la figure 11.

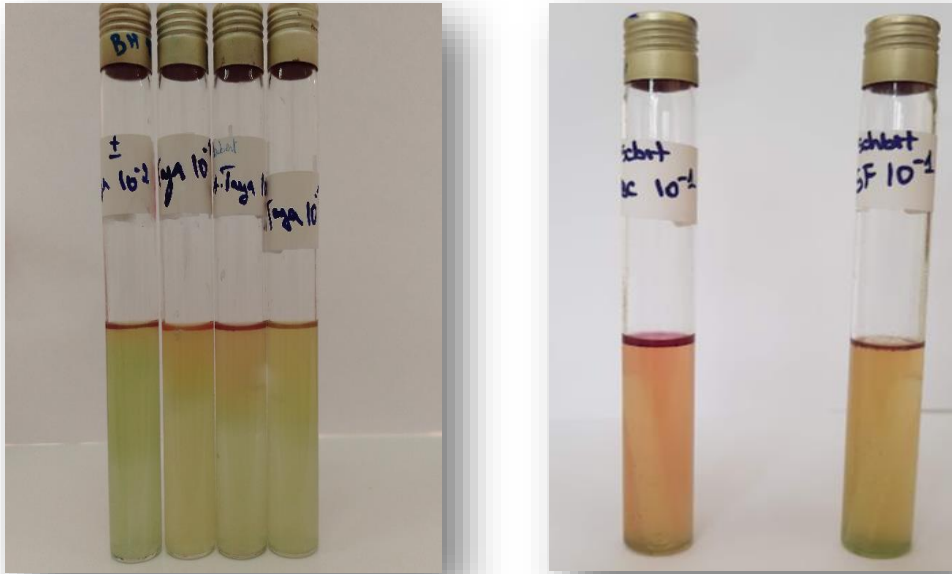


Figure 11 : Résultats de présence d'*E. coli* dans le sédiment d'Ain Taya à gauche et celui de Sidi Fredj et bateau cassé à droite.

En résumé, on remarque bien que la concentration des bactéries dans le sédiment est beaucoup plus importante en comparaison avec l'eau de mer, ça s'explique par le fait que l'interaction des micro-organismes avec les sédiments peut améliorer leur survie en réduisant l'exposition aux facteurs de stress, tels que la lumière du soleil et la prédation, ou en augmentant la disponibilité des nutriments (Dale 1974 ; Davies et al. 1995). De cette manière, les sédiments côtiers peuvent agir comme réservoirs de micro-organismes pathogènes. L'évaluation de la qualité des eaux récréatives côtières est principalement entreprise par le dénombrement des coliformes fécaux et *Escherichia coli* dans la colonne d'eau (NHMRC 1990). Des études ont toutefois indiqué que le nombre de coliformes fécaux dans les sédiments côtiers peut être 10 à 10 000 fois supérieur à celui de la colonne d'eau sus-jacente (Shiaris *et al.* 1987).

- **Dénombrement des entérocoques fécaux dans l'eau**

Résultats et discussion

La méthode de filtration sur membrane a été utilisée pour rechercher les entérocoques. Les entérocoques apparaissent sous forme de petites colonies entourées d'un halo noir sur BEA, ceci est dû à leur capacité à hydrolyser l'esculine (figure 12 et 13).

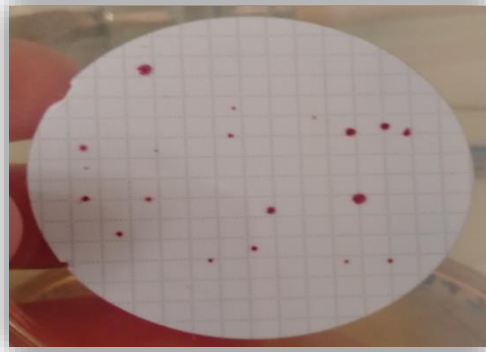


Figure 12 : Résultats de croissance sur la gélose Slanetz et Bartley.

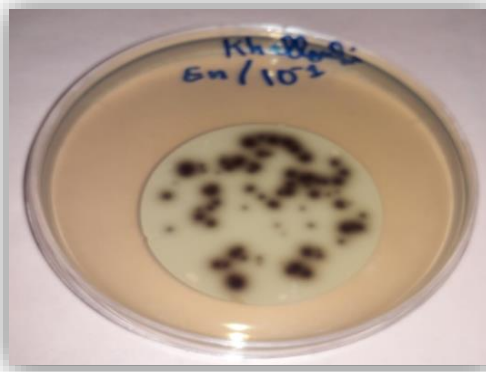


Figure 13 : Résultats de croissance sur la gélose BEA.

La croissance des souches sur le milieu BEA nous indique que ces bactéries sont résistantes à la fois vis-à-vis des sels biliaires et l'azide de sodium. Cependant, l'apparition de la couleur noire est due à l'hydrolyse du polyside complexe "esculine" en libérant de l'aglucone qui est décelée par une réaction chimique en présence de sels de fer (Chuard et Reller, 1998).

Les résultats du dénombrement des entérocoques dans l'eau des six plages au mois de Mai et au mois de Juin sont illustrés sur l'histogramme de la figure 14.

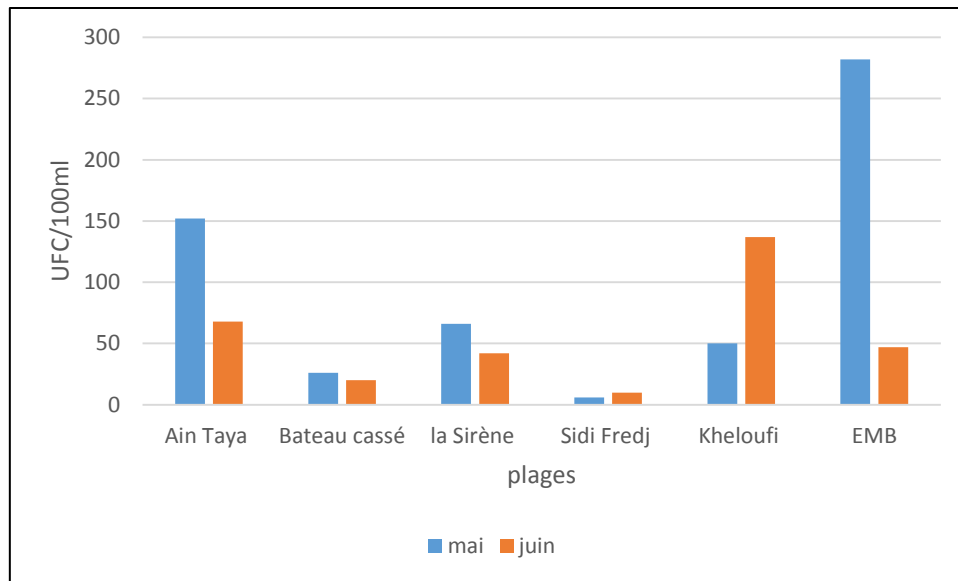


Figure 14 : Evolution des entérocoques dans les six plages au mois de Mai et de Juin.

Les concentrations observées en entérocoques dans la plage de bateau cassé, la sirène et Sidi Fredj aussi bien en Mai qu'en Juin sont nettement inférieures à la valeur guide <100UFC/100ml de la norme Algérienne ce qui indique une eau de bonne qualité de ces plages.

On note la présence importante d'entérocoques dans la plage de Ain Taya (152UFC/100ml) en Mai et dans la plage de Kheloufi I en Juin qui dépassent la valeur guide indiquant une qualité dégradée de l'eau de ces plages dans ces périodes.

En ce qui concerne la plage Colonel Abbes on observe des concentrations bien plus élevées que la valeur guide de la norme Algérienne, ce qui permet de dire que la qualité de l'eau est à surveiller.

Ces résultats pourraient s'expliquer par le même constat que les coliformes totaux et fécaux.

Les entérocoques fécaux sont responsables de gastro-entérites et sont indicateurs spécifiques de pollution humaine fécale ancienne (OMS/PNUE, 1995) ; ils sont plus résistants et présentent une longue persistance dans l'eau de mer (à l'opposition d'*E. coli*) vu leur résistance à une concentration de 6,5 % de NaCl et à une température de 10 à 45 °c (Prescott *et al*, 1995).

- **Dénombrement des entérocoques fécaux dans le sédiment**

Seulement les sédiments de quatre plages ont été utilisés pour dénombrer les entérocoques fécaux et les résultats sont illustrés dans la figure 15.

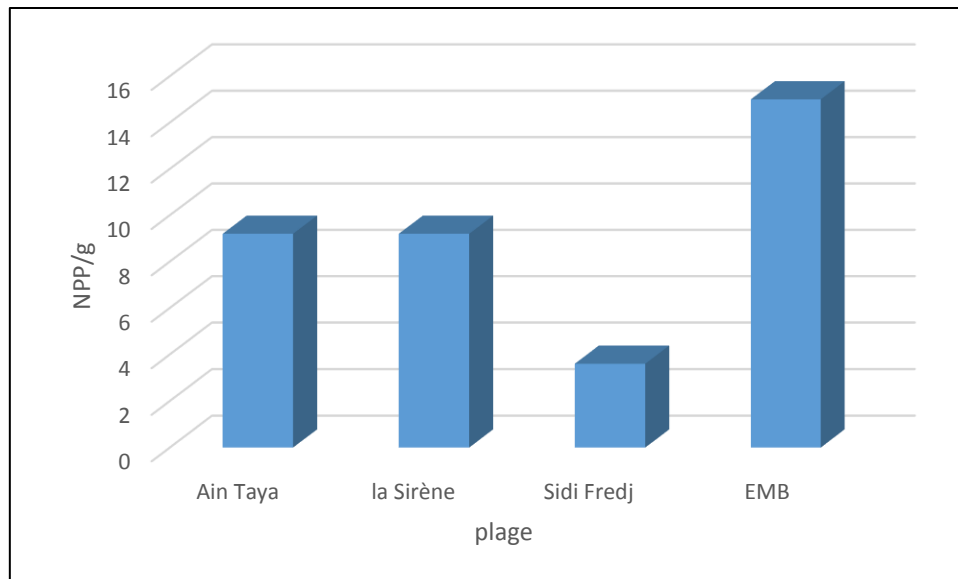


Figure 15 : Variation des concentrations d'entérocoques fécaux dans les sédiments étudiés.

On remarque que la plage Colonel Abbes enregistre la concentration la plus importante (15 C/g) et que Sidi Fredj enregistre la plus faible (3.6C/g) par rapport à la plage d'Ain Taya et la Sirène qui enregistrent la même concentration (9.2C/g). Ces résultats pourraient s'expliquer par les apports anthropiques ou par la granulométrie du sédiment car on sait que les sédiments boueux contiennent plus de bactéries que les sédiments sableux.

III. 2. Identification des coliformes

On a pu identifier quelques souches de coliformes fécaux par le test de catalase qui se révèle positif pour ses souches et le test d'oxydase qui se révèle négatif en plus des galeries API 20E.

Les résultats d'identification par galerie sont présentés dans la figure 16 et résumés dans le tableau 10 suivant le même ordre.

Tableau 10 : Identification des espèces par la galerie API 20E.

Code de la souche	L'espèce
Emb 10 ⁻³ II	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Emb 10 ⁻³ III	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
BC 10 ⁻² I	<i>Escherichia coli</i>
Emb 10 ⁻³ VI	<i>Escherichia coli</i>
Emb 10 ⁻³ VII	<i>Escherichia coli</i>

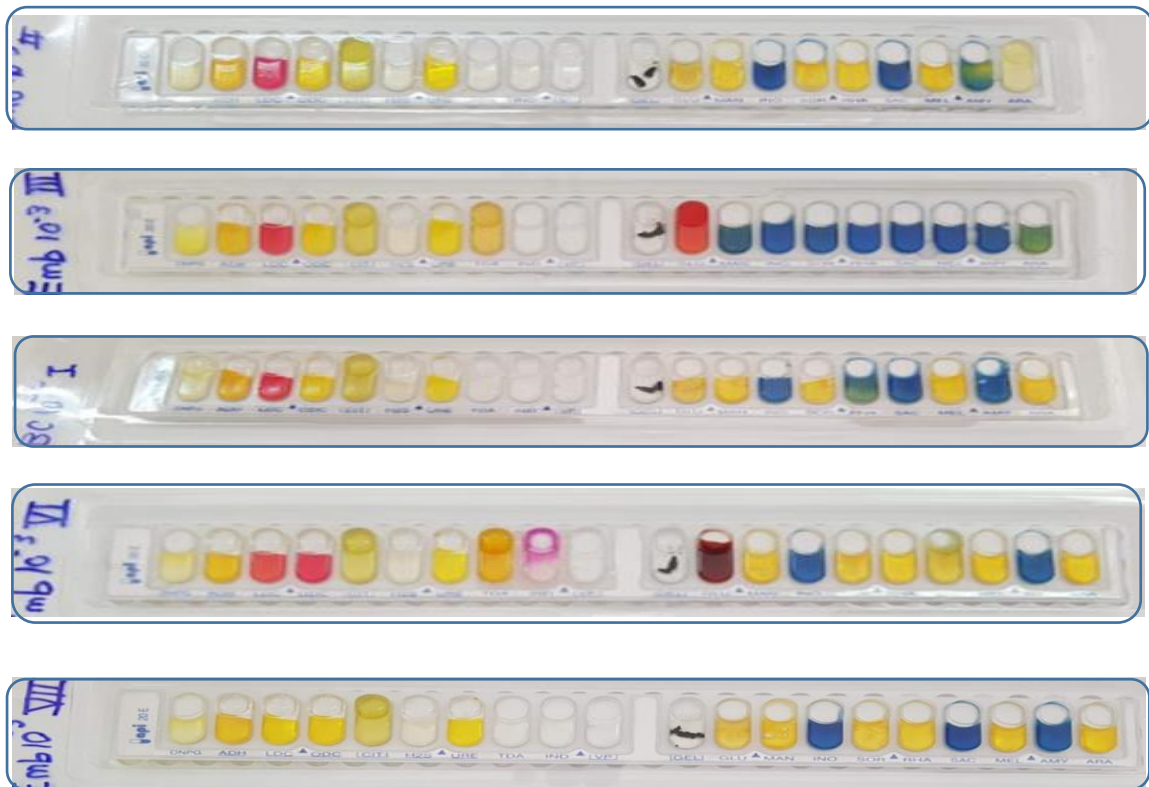


Figure 16 : Résultats d'identification des souches isolées pour la galerie API 20E.

L'inoculation de la galerie API 20E a permis d'identifier l'espèce : *Klebsiella pneumoniae* qui est pathogène pour l'homme ainsi que les espèces : *Escherichia coli* et *Stenotrophomonas maltophilia* qui sont des bactéries opportunistes.

III. 3. Prévalence de la résistance aux antibiotiques chez les entérocoques

L'évaluation de la résistance aux antibiotiques a été effectuée sur les entérocoques isolés des plages analysées. Les résultats sont représentés dans les figures qui suivent.

- **Dans l'eau**
 - **Mois de Mai** : Les résultats de taux de résistance du mois de Mai sont illustrés dans l'histogramme de la figure 17.

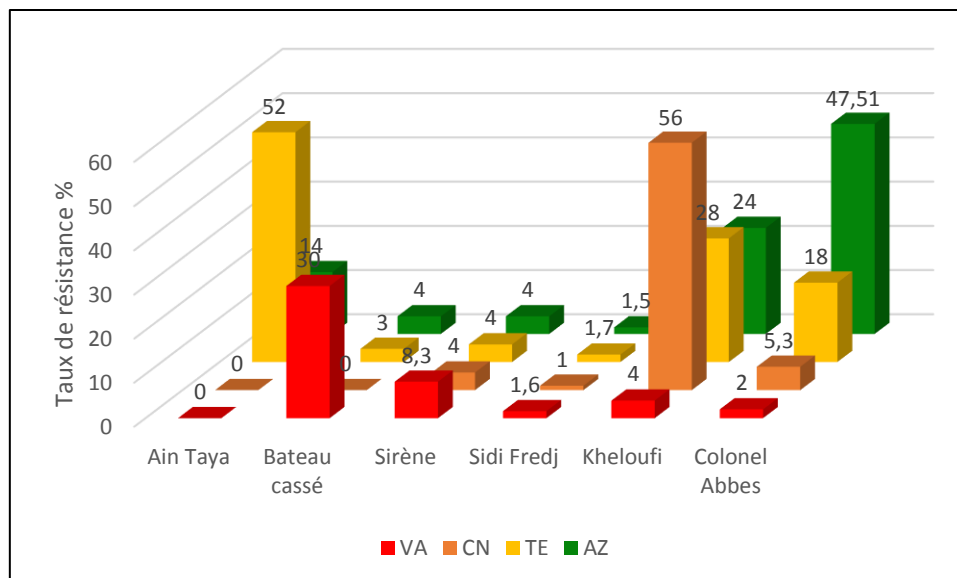


Figure 17 : Taux de résistance aux antibiotiques dans les six plages pour le prélèvement du mois de Mai.

VA : vancomycine ; CN : gentamicine ; TE : tétracycline ; AZ : azithromycine

L'histogramme montre un taux de résistance élevé à la gentamicine (56%) pour la plage Kheloufi par rapport aux autres plages. On observe la même chose pour la tétracycline dans la plage Ain Taya avec un taux de (52%) et l'azithromycine (47,51%) dans la plage Colonel Abbas. En ce qui concerne la vancomycine c'est la plage Bateau cassé qui enregistre le taux le plus élevé (30%). La plage Sidi Fredj et la Sirène enregistrent des taux faibles pour tous les antibiotiques testés, on observe (8,3%) de résistance à la vancomycine et (4%) à la gentamicine. On observe (1,6%), (1%), (1,7%) et (1,5%) de résistance à la vancomycine, la gentamicine, la tétracycline et l'azithromycine respectivement dans la plage Sidi Fredj.

Le taux de résistance à l'azithromycine dans la plage Ain Taya est (14%) tandis que la résistance est nulle à la vancomycine et la gentamicine. La résistance à la gentamicine se trouve nulle aussi dans la plage Bateau cassé, par rapport à la tétracycline il y a un taux de résistance de (3%) à la tétracycline et (4%) à l'azithromycine. Dans la plage Kheloufi I on observe des taux moyens de résistance à la tétracycline (28%) et l'azithromycine (24%) et un taux faible de résistance à la vancomycine (4%), il y a eu (18%) de résistance à la tétracycline dans la plage Colonel Abbas, (2%) de résistance à la vancomycine et (5,3%) à la gentamicine.

- **Mois de Juin** : Les résultats de taux de résistance du mois de Juin sont illustrés dans l'histogramme de la figure 18.

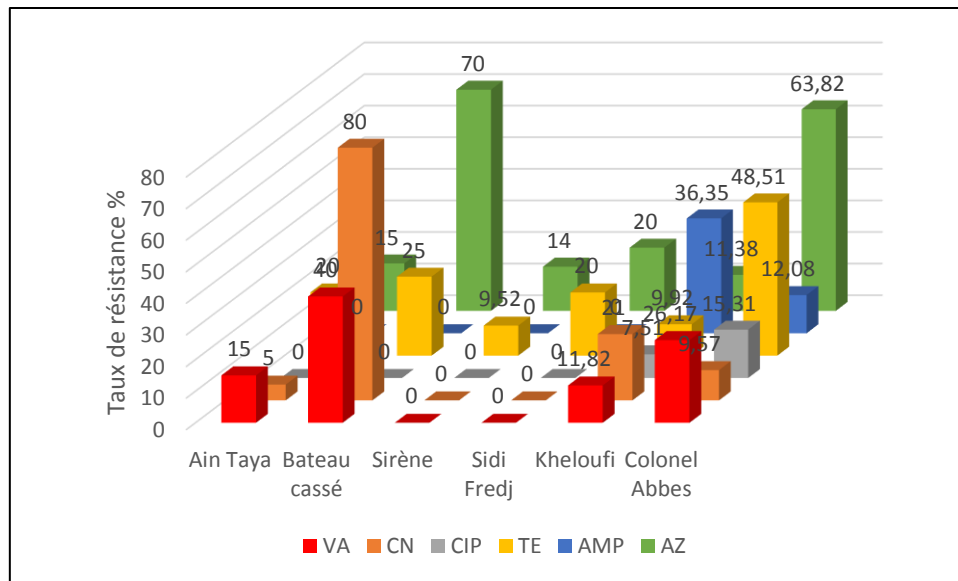


Figure 18 : Taux de résistance aux antibiotiques dans les six plages pour le prélèvement du mois de Juin.

VA : vancomycine ; CN : gentamicine ; TE : tétracycline ; AZ : azithromycine ; CIP : ciprofloxacine ; AMP : ampicilline

On observe un taux de résistance important (80%) à la gentamicine dans la plage Bateau cassé suivi de (21%) dans la plage Kheloufi et des taux faibles dans la plage Colonel Abbès (9,57%) et Ain Taya (5%) avec des taux nuls dans les plages Sidi Fredj et la Sirène.

Pour la vancomycine il y avait un taux moyen de résistance (40%) dans la plage Bateau cassé, des taux moyens à faibles dans Ain Taya (15%), Colonel Abbès (26,17%), (11,82%) dans Kheloufi et absence de résistance dans les plages Sidi Fredj et la Sirène. La plage Bateau cassé enregistre aussi un taux élevé de résistance à l'azithromycine (70%) suivi de (63,82%) dans la plage Colonel Abbès et des taux faibles pour le reste des plages, (20%) dans Sidi Fredj, (15%) dans Ain Taya, (14%) dans la Sirène et (11,38%) dans la plage Kheloufi.

On observe l'absence de résistance à la ciprofloxacine à l'exception de la plage Colonel Abbès (15,31%) et Kheloufi (7,51%), on peut dire la même chose pour l'ampicilline sauf qu'il y a un taux de résistance moyen dans la plage Kheloufi et un taux faible (12,08%) dans la plage Colonel Abbès. Cependant, on observe des taux moyens à faible de résistance à la tétracycline dans toutes les plages, (20%), (25%), (9,52%), (20%), (9,92%), (48,51%) respectivement comme le montre la figure.

En résumé, l'évaluation de la résistance aux antibiotiques pour les entérocoques a révélé que cette dernière évolue tout en fonction de la plage et la période de prélèvement, on remarque la

Résultats et discussion

présence de taux de résistances assez importants pour l'azithromycine, suivi de la tétracycline, la gentamicine et enfin la vancomycine. De faibles taux ont été observés pour la ciprofloxacine, pour l'ampicilline il y avait une résistance moyenne.

La résistance à la tétracycline dans la présente étude a suggéré la sélection à l'antibiotique. Cette résistance peut être due à l'acquisition de gènes de résistance à la tétracycline suite à une pression de sélection d'utilisation (Pesavento *et al.* 2014).

Le faible taux de résistance à la ciprofloxacine dans cette étude a suggéré une faible sélection contre l'antibiotique. Ce qui suggère que les isolats peuvent avoir acquis des gènes codant pour la résistance aux fluoroquinolones dans une faible proportion (Werner, 2012).

Des fluctuations des taux de résistances selon les périodes d'échantillonnage ont été observées, cela est probablement dues aux conditions météorologiques qui redistribuent la répartition des microorganismes par les effets de décantation et de remise en suspension (Miranda et Zemelman, 2001 ; Matyar *et al.* 2004 ; Ghosh et Mandal, 2010).

La pression de sélection et les échanges génétiques horizontaux in-situ sous l'influence de facteurs biotiques et abiotiques, favorisent la dissémination de la résistance aux antibiotiques (Bushman, 2002 ; Agersø et Guardabassi, 2005 et Casas *et al.*, 2005).

- **Dans le sédiment**

Le résultat de croissance d'entérocoques isolés à partir du sédiment est présenté dans la figure 19, les taux de résistance sont illustrés dans la figure 20.

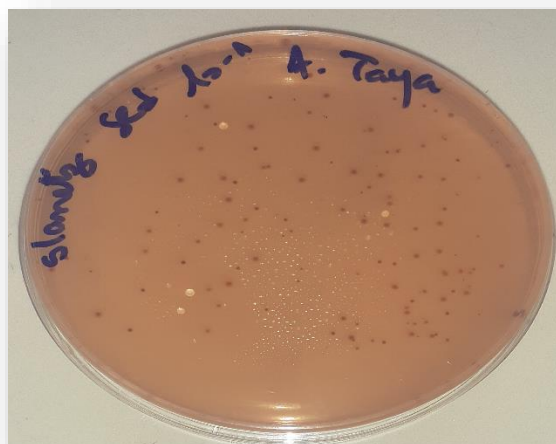


Figure 19 : Résultats de croissance d'entérocoques isolés du sédiment.

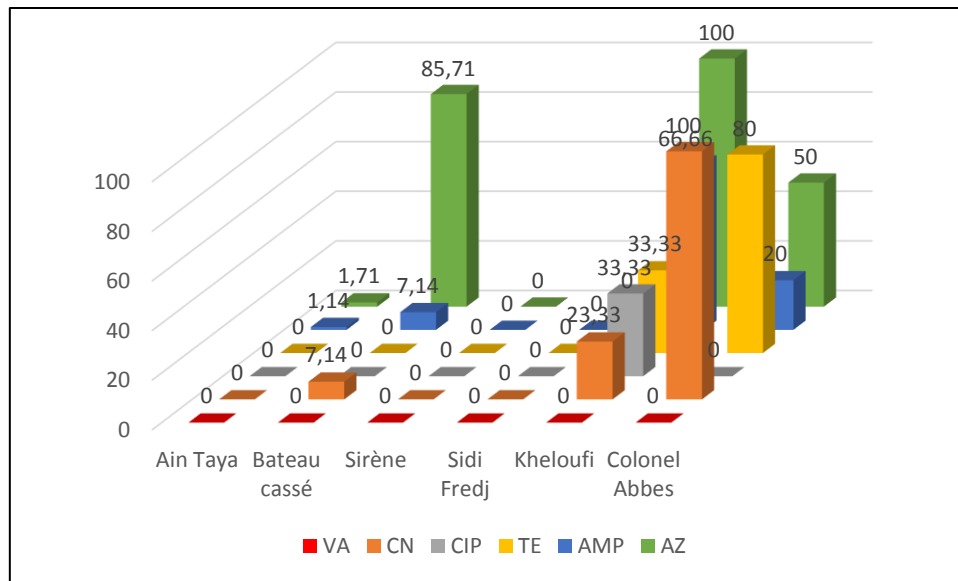


Figure 20 : Taux de résistance aux antibiotiques dans les six plages par rapport aux sédiments.

VA : vancomycine ; CN : gentamicine ; TE : tétracycline ; AZ : azithromycine ; AMP : ampicilline ; CIP : ciprofloxacine

Il est intéressant de noter tout d’abord, l’absence totale de résistance à la vancomycine de toutes les souches isolées à partir des sédiments, la même chose est observée pour la ciprofloxacine à l’exception de la plage Kheloufi I qui enregistre un taux de résistance moyen (33,33%).

La Sirène et Sidi Fredj ont enregistré des taux de résistance nuls pour tous les antibiotiques testés, c’est le cas pour la plage Ain Taya sauf que de très faible taux de résistance à l’ampicilline (1,14%) et l’azithromycine (1,72%) sont observés. Cependant, la résistance la plus élevée est observée pour la plage Colonel Abbas et la plage Kheloufi par rapport à la gentamicine et l’azithromycine respectivement avec un taux de (100%), suivi de (85.71%). On observe des taux moyens de résistance dans la plage Kheloufi pour le reste d’antibiotiques avec (66.66%) à l’ampicilline, (33,33%) à la tétracycline et (23.33%) à la gentamicine. Il y avait (50%) de résistance à l’azithromycine et (20%) à l’ampicilline dans la plage Colonel Abbas, (7,14%) de résistance à la gentamicine et (7,17%) à l’ampicilline dans la plage Bateau cassé.

III .4. Identification des entérocoques

Résultats et discussion

On a réalisé une série de tests classiques pour essayer d'identifier les souches d'entérocoques isolées à partir des plages analysées que ce soit du sédiment ou de l'eau de mer et les résultats sont présentés ci-dessous.

- **Coloration de Gram**

L'aspect microscopique des souches isolées (figure 21) après la coloration de Gram a révélée des formes cellulaires en Cocci, disposées en paire (diplocoques) ou en courtes chainettes de couleur Violettes. Par conséquent, ces souches sont confirmées comme des bactéries à Gram positif répondant au type de Gram des Entérocoques et les Streptocoques (Franz et Holzapfel, 2004).



Figure 21 : Aspect microscopique des souches entérocoques isolées après coloration de Gram (Gr *100).

- **Test à la catalase**

Le test à la catalase s'est révélé négatif pour les souches d'entérocoques isolées, Ceci indique que toutes les souches sont dépourvues d'une activité catalase, permettant de les classer parmi les entérocoques.

- **Test de l'oxydase**

Le test de l'oxydase s'est révélé négatif pour toutes les souches d'entérocoques isolées.

- **Test mannitol mobilité**

Résultats et discussion

Sur les 67 souches isolées, 37 fermentent le mannitol en acidifiant le milieu, ce qui provoque le virage de couleur du rouge au jaune tout en observant un trouble diffus dans la gélose molle et ce qui indique une mobilité : bactéries flagellées. Ce test Permet de différencier les entérocoques mobiles (*E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens*) des autres entérocoques immobiles.

- **Test de résistance à la chaleur**

Les entérocoques et les streptocoques partagent les mêmes critères macroscopiques (types de colonies) et microscopiques (coques, Gram+ en diplocoques ou en petites chaînettes).

Donc, pour différencier entre ces deux genres (*Streptocoques* et *Entérocoques*) les tests de résistance à la chaleur et de croissance sur un milieu hyper salé sont toujours utilisés pour distinguer entre ces deux genres (Schleifer et Kilpper-Bälz, 1987).

Les résultats obtenus montrent que 53 souches parmi toutes les souches testées sont capables de résister au traitement thermique de 60°C pendant 30 minutes.

Ainsi, nous avons la possibilité de dire que ces souches sont des *Entérocoques* (Schleifer et Kilpper-Bälz, 1987).

- **Test de résistance au tellurite de potassium**

La croissance en présence de tellurite de potassium est une caractéristique des Entérocoques notamment l'espèce *Enterococcus faecalis*. En effet plus de 90 % des souches de cette espèce peuvent se multiplier en présence de 0,04 % de tellurite de potassium en donnant des colonies noires (Bouvet et Couvry, 1994).

Par conséquent, nous avons ajouté ce test pour trancher que les souches étudiées appartiennent belle et bien au genre *Enterococcus faecalis* Pour cela, un bouillon additionné de tellurite de potassium a été utilisé. Les résultats de notre étude montrent que l'ensemble de souches isolées (40/67) peuvent croître dans ce bouillon en donnant des colonies noires.

- **Test de résistance à la salinité**

Pour le test de résistance à la salinité il a été observé que presque la moitié des souches isolées (48/67) pouvaient croître dans un milieu hyper salé.



Test mannitol mobilité



Test de réduction de tellurite de potassium



Test de résistance à la chaleur



Test de résistance à la salinité

Figure 22 : Résultats des différents tests classiques.

Tableau 11: Un tableau récapitulatif des résultats d'identification par les tests classiques.

Test	Mannitol mobilité	Test de résistance à la chaleur et le test de résistance à la salinité	Réduction du tellurite de potassium
Résultats de souches identifiées	13 Qui sont soit <i>E.gallinarum</i> , <i>E.casseliflavus</i> ou <i>E.flavescens</i>	53 D'Entérocoques	40 D' <i>E.faecalis</i>

III .4. Antibiogramme

Une collection de 28 entérocoques isolés à partir de l'eau et du sédiment, a été mise en place pour l'évaluation de l'état de la résistance aux antibiotiques dans ces plages. La sensibilité aux antibiotiques a été étudiée par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Les résultats sont représentés dans les figures 23 et 24.

Le plus grand nombre d'isolats d'Enterococcus a été observé à partir d'échantillon de l'embouchure (plage Colonel Abbes) (11/28 isolats ; 39 %).

Parmi les souches isolées des échantillons, la résistance la plus élevée était à l'amikacine (68%), suivie de la gentamicine (50%). La résistance de ces isolats à l'amoxicilline + l'acide clavulanique et au Triméthoprime-Sulfaméthoxazole était la même (36%). Aucun des isolats n'a montré de résistance à la vancomycine, environ (93%) des souches étaient sensibles à cet antibiotique.

Six souches se sont révélées résistantes à la tétracycline et la clindamycine (21%). La résistance à l'ampicilline était de (18%) et la plus basse était de (14%) pour la céfoxitine. Pour l'aztréonam et la ceftazidime aucune résistance n'a été enregistrée.

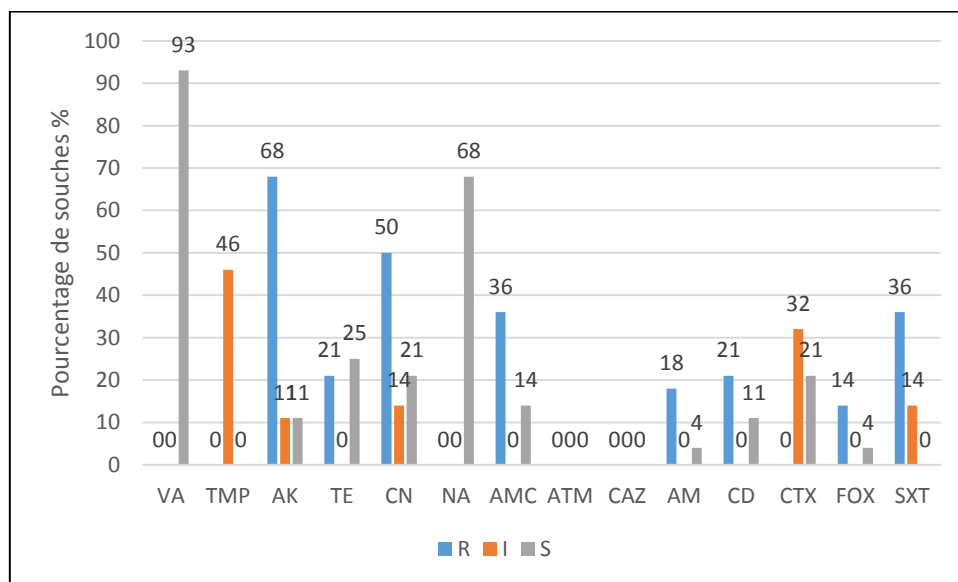


Figure 23 : Prévalence de la résistance aux antibiotiques de 28 souches isolées.

VA : vancomycine ; **TMP** : triméthoprime ; **AK** : amikacine ; **TE** : tétracycline ; **CN** : gentamicine ; **NA** : acide nalidixique ; **AMC** : amoxicilline + acide clavulanique ; **ATM** : aztréonam ; **CAZ** : ceftazidime ; **AM** : ampicilline ; **CD** : clindamycine ; **CTX** : céfotaxime ; **FOX** : céfoxitine ; **SXT** : Triméthoprime-Sulfaméthoxazole.

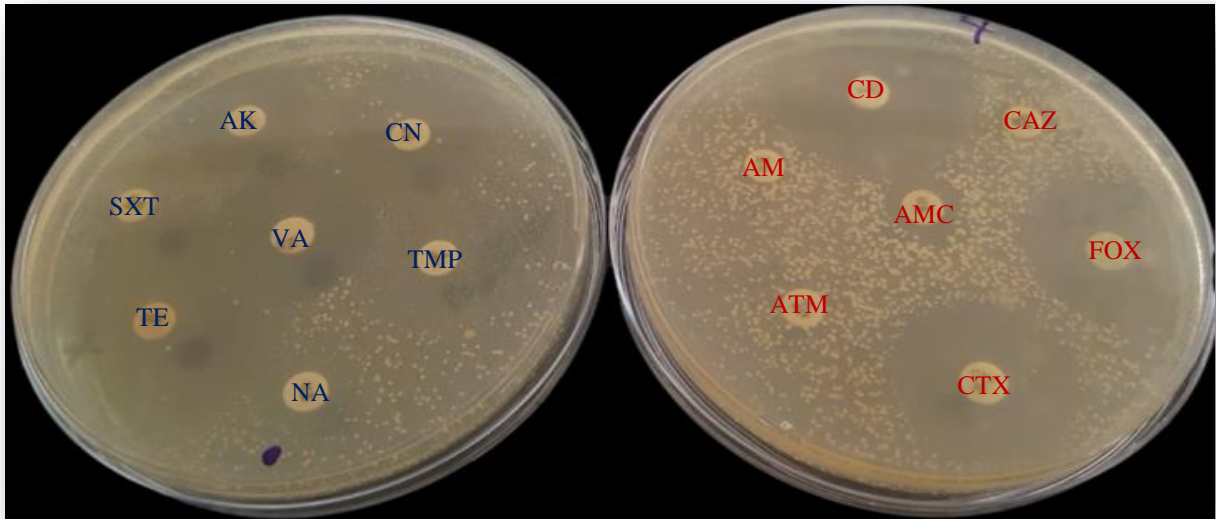


Figure 24 : Illustration des résultats de l'antibiogramme pour la souche S1.

VA : vancomycine ; **TMP** : triméthoprim ; **AK** : amikacine ; **TE** : tétracycline ; **CN** : gentamicine ; **NA** : acide nalidixique ; **AMC** : amoxicilline + acide clavulanique ; **ATM** : aztréonam ; **CAZ** : ceftazidime ; **AM** : ampicilline ; **CD** : clindamycine ; **CTX** : céfotaxime ; **FOX** : céfoxitine ; **SXT** : Triméthoprim-Sulfaméthoxazole.

- **Test de synergie et d'antagonisme :**

La recherche de la production de céphalosporinases et de bêta-lactamases à spectre élargi chez les vingt-huit souches étudiées a montré qu'aucune image d'antagonisme ou de synergie n'a été constatée.

Discussion

Les entérocoques sont intrinsèquement résistants à une large gamme d'antibiotiques, par conséquent, cela a toujours limité le choix des antibiotiques utilisés contre ces organismes ; *Enterococcus faecalis* vient en première position suivi d'*E.faecium* dans les infections à entérocoques chez les humains (Sujatha R. *et al.* 2007).

En ce qui concerne le profil de résistance des souches d'entérocoques les résultats d'antibiogrammes indiquent que les isolats, étaient 21% résistants à la clindamycine, nos résultats sont bien inférieurs à ceux trouvés par Rekik (2020) (94%) et par l'étude de Rice (2001) qui rapporte un taux de 95% de résistance à la clindamycine.

Nos résultats concordent avec ceux de Rekik (2020), en ce qui concerne la vancomycine. Les résultats obtenus montrent que presque toutes les souches isolées ont montré une sensibilité à la Vancomycine. De point de vue clinique, le faible taux de résistance à l'Ampicilline et à la Vancomycine semble être favorable, parce que la résistance à ces molécules réduit considérablement les traitements thérapeutiques dans les infections à entérocoques (Klare *et al.* 2003). La résistance à la vancomycine est due à l'acquisition de la souche de l'opéron Van, codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse de précurseurs du peptidoglycane de faible affinité pour la vancomycine (Cattoir et Leclercq, 2010).

Nos résultats montrent des taux de résistances un peu faible à la tétracycline 21% par rapport à 44 % l'année passée (Rekik, 2020), ces résultats sont bien loin de l'étude faite en Inde qui a rapporté un pourcentage de résistances moyennes de 60 à 80% (Henning et Brown, 1995 ; Wei Jia *et al.* 2014). En revanche d'autres études en Algérie ont rapporté un taux de (82,4%) de résistance à la tétracycline (Djami *et al.* 2012). L'acquisition de la résistance à la tétracycline peut s'effectuer par différents mécanismes, parmi eux le mécanisme d'efflux codés par les gènes tet K et tet L, protection de la sous unité du ribosome codée par les gènes tet M, tet O ou tet S, ainsi qu'un mécanisme inconnu codé par le gène tet U (Chopra et Roberts, 2001).

Les pourcentages de résistance par rapport aux β -lactamines étaient : (18%) à l'ampicilline, (14%) à la céfoxitine et (36%) à l'amoxicilline/acide clavulanique par rapport à 44%, 83% et 67% respectivement retrouvé par Rekik en 2020.

La résistance aux β -lactames est liée à la production de β -lactamase plasmidique (Murray, 1992) ou bien par hyperproduction de la PLP5, fréquente chez *E. faecium* et responsable d'une faible affinité aux β - lactamines (Bonin *et al.* 1996).

Résultats et discussion

La résistance des entérocoques aux aminosides, en particulier à la gentamicine et à la streptomycine, est essentielle en raison de leur utilisation (en association avec l'ampicilline) dans le traitement empirique des infections à entérocoques (Klein *et al.* 1998 ; Arias *et al.* 2010 ; Kristich *et al.* 2011 ; Werner, 2012). Dans la présente étude, un taux élevé (68 %) de résistance à l'amikacine et un taux de (50%) à la gentamicine. Ces taux de résistance sont légèrement inférieurs à ceux de l'année passée (78%) (Rekik, 2020).

Ces valeurs suggèrent la présence d'une pression de sélection pour les aminosides principalement l'amikacine. Cette découverte suggère que les isolats peuvent avoir acquis des gènes codant pour la résistance aux aminosides (Thal *et al.* 2000 ; Werner, 2012). La résistance de (36%) au triméthoprim-sulfaméthoxazole dans cette étude est inférieure à 56 % trouvé en 2020 par Rekik et à 100 % de résistance au triméthoprim-sulfaméthoxazole parmi les isolats d'entérocoques provenant d'animaux destinés à l'alimentation signalés en Tunisie (Klibi *et al.* 2014).

Conclusion

Conclusion

L'objectif essentiel de ce travail a été la recherche et l'évaluation de la prévalence de la résistance aux antibiotiques chez des entérocoques isolés du milieu marin à partir de différentes plages dont certaines sont exposées à des apports anthropiques.

Les résultats obtenus permettent de constater que le contrôle microbiologique de ces plages a montré une qualité satisfaisante en général à l'exception de la plage Colonel Abbès.

L'étude de la résistance montre que les bactéries résistantes ont été retrouvées essentiellement au niveau de la plage Colonel Abbès. Il existe une corrélation entre le niveau de résistance et l'état du milieu en rapport avec les apports anthropiques.

L'évaluation globale de leur résistance a révélé une résistance aux aminoglycosides (la gentamicine et l'amikacine), aux bêta-lactamines (amoxicilline/acide clavulanique, l'ampicilline, et la céfoxitine) ainsi qu'à la clindamycine, la tétracycline et le sulfaméthoxazole-triméthoprimine, une sensibilité à la vancomycine et l'acide nalidixique.

L'acquisition de gènes par les bactéries leur permet de persister dans un milieu aquatique hostile. Le contact permanent avec l'homme permet de propager de nombreuses maladies pour lesquelles la résistance peut conduire à l'échec du traitement.

En perspective, il est important de caractériser génotypiquement les mécanismes de résistance chez ces souches afin de comprendre leur mécanisme de dissémination ; ce qui fait par plusieurs techniques de génotypage qui visent à déterminer l'identité des variations génétiques à une position spécifique ou sur tout le génome, ces techniques rendent accessible une grande quantité d'information génétique mais elles requièrent des équipements spécialisés et font appel à des méthodes complexes (O'Rawe *et al*, 2015).

Il serait également intéressant de prolonger les analyses durant la période estivale ainsi que d'effectuer les analyses physico-chimiques afin de constater l'impact de l'activité récréative sur l'environnement en général et sur la résistance aux agents antimicrobiens en particulier.

Références bibliographiques

- ABDELALI S., (2016).** Résistance des entérocoques aux antibiotiques. Microbiologie appliquée. *Mémoire de Master., Univ.de Tlemcen : p.65.*
- AGUILAR-CALVEZ A et al., (2012).** Les entérocoques : avantages et inconvénients en biotechnologie (Synthèse bibliographique). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement, volume 16, p.p. 67-76.*
- BARBARA E. MURRAY., (1990).** The Life and Times of the Enterococcus. *Clinical Microbiology Reviews, volume 3, No 1, p.p. 46-65.*
- BEKADA Dj.E., (2019).** Intérêt des tests microbiologiques dans le cas de la gastrite B, maladie de Crohn et rectocolite hémorragique. Microbiologie. *Thèse de Doctorat. Université Oran 1 Es-Senia : p.176.*
- BELARBI F., (2011).** Isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antibactériennes. Microbiologie alimentaire et industrielle. *Mémoire de Magister : Université d'Oran/ ES-SENIA : p.129.*
- BELHOCINE Y et MANKOUR L., (2016).** Contribution à l'étude de la qualité physico-chimique et bactériologique des eaux des forages de Boukhalfa. Agronomie. *Mémoire de Master, Université MOULOUD MAMMARI de Tizi-Ouzou : p. 103.*
- BENSAM H ET BEHLOUL M., (2009).** Etude physicochimique et biologique d'un site conchylicole : Cas de la ferme Orca marine Ain Taya avec essai de reproduction artificielle des espèces en élevage. *Mémoire d'Ingénieur, Ecole nationale supérieure des sciences de la mer et de l'aménagement du littoral.*
- BERKANI A., (2011).** Contribution à l'étude de la croissance du *Pagellus ascarne* (Risso, 1826) dans la baie de Bou-Ismaïl. *Mémoire d'Ingénieur., école national supérieure des sciences de la mer et de l'aménagement du littoral, Alger.*
- BOUICHI D ET RADJA M., (2012).** Contrôle de la qualité microbiologique et toxicologique de la moule *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) de Bordj El Kiffan bateau cassé, et de la ferme Orca marine (Ain chrob), *Mémoire d'Ingénieur, Ecole nationale supérieure des sciences de la mer et de l'aménagement du littoral.*
- BOUMELIT A, CHENTALIA M., (2014).** Contribution à l'étude de l'effet des produits cosmétiques sur la flore cutanée. Microbiologie de l'environnement. *Mémoire de Master, Université 8 Mai 1945 Guelma : p.72.*
- TREMBLAY C., (2012).** Étude de la résistance aux antibiotiques des entérocoques d'origine animale du Québec. Médecine vétérinaire. *Thèse de Doctorat. Université de Montréal : p.326.*
- CHIKH Y., (2008).** Détection des souches résistantes aux antibiotiques chez la moule d'élevage *Mytilus galloprovincialis*. *Mémoire d'Ingénieur, Institut national des sciences de la mer et de l'aménagement du littoral Alger : p.66.*
- D.L. CRAIG, H.J. et al., (2002).** Enumeration of faecal coliforms from recreational coastal sites: evaluation of techniques for the separation of bacteria from sediments. *Journal of Applied Microbiology. Volume 93, p.p.557–565.*

DOUIDA Y, ABDELHAKEM S., (2017). Isolement et caractérisation des souches d'entérocoques multirésistants en clinique au niveau d'EPH Mohamed Chaabani. *Mémoire de Master en microbiologie moléculaire et médicale, Bejaia, Université Abderrahmane MIRA : p.55.*

GHEZALI A., (2016). Evolution du trait de côte au niveau de la baie de Bou-Ismaïl recours à l'image satellite et système d'information géographique. *Mémoire d'Ingénieur, Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral, Alger : p.67.*

GUESSOUM F, MOKEDDEM H., (2019). Effet inhibiteur de certaines huiles essentielles vis-à-vis des Entérocoques responsables des infections dentaire. Microbiologie appliquée. *Mémoire de Master, Université Mohamed Khider. Biskra : p.59.*

HEBBAR C., (2005). Surveillance de la qualité bactériologique des eaux de baignade – cas des plages d'Ain-franin et de Kristel. Pollution bactériologique. *Mémoire de Magister, Université ES-SENIA., Oran : p.218.*

HAMCHACHE Z, OUGHLICI B., (2015). Isolement, identification et caractérisation des entérocoques multirésistants isolés au CHU de Bejaia. Pharmacologie moléculaire. *Mémoire de Master, Université Abderrahmane MIRA. Bejaia : p.48.*

ISNARD C., (2017). « *Enterococcus spp* : entre pathogènes opportunistes et probiotiques ». Aspects moléculaire et cellulaire de la biologie. *Thèse de Doctorat, Université de Caen Normandie : p.299.*

IVERSEN A., (2005). Population structure and antibiotic resistance of the genus *Enterococcus* in humans, animals and the environment. *Mémoire de Master, Karolinska Institutet : p.56.*

JEAN-LUC MAINRADI. (11/07/2017). Résistance aux antibiotiques un phénomène massif et préoccupant. Inserm. [Online]. [Consulté le 02/10/2021]. Disponible sur le web : <https://www.inserm.fr/dossier/resistance-antibiotiques/>.

J.L. SCHLIDT, J. LENOIR., (1972). Contribution à l'étude des entérocoques et de leurs aptitudes technologiques. *Le Lait, INRA Editions, 52 (518), p.p.536-557.*

KATHERINE TANAKA., (2018). Impact des éléments mobiles de l'ADN sur l'adaptabilité et le transfert horizontal chez *Aeromonas salmonicida ssp. Salmonicida*. Microbiologie. *Thèse de Doctorat, Université Laval: p.172.*

KATIE FISHER, CAROL PHILLIPS., (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology, volume 155, p.p. 1749-1757.*

KADA M., (2012). Détection de la résistance bactérienne aux antibiotiques dans l'environnement marin, influence des apports anthropiques. *Mémoire de Magister, Ecole national supérieure des sciences de la mer et de l'aménagement du littoral, Alger : p.111.*

KACIMI A et OUAZZI T., (2018). Caractérisation phénotypique des souches d'entérocoques isolées à partir des produits alimentaires. *Mémoire de Master en microbiologie appliquée, Université Mouloud Mammeri. Tizi-Ouzou : p.88.*

KERN J., (2019). Infections nosocomiales : comment les entérocoques résistent aux antibiotiques. [Online]. [Consulté le 05/10/2021]. Disponible sur le web : <https://fr.news.yahoo.com/infections-nosomiales-entérocoques-résistent-antibiotiques-162753865.html>.

LABDAOUI K, BELABBAS N., (2020). Evaluation de la pollution marine par les HAP dans la baie de Bou-Ismaïl par l'utilisation de la moule *Mytilus galloprovincialis*. Biodiversité et environnement. *Mémoire de Master, Université Akli Mohand Oulhadj, Bouira* : p.69.

ABBAS A et al., (2012). Carbapénémases : implications cliniques et épidémiologiques pour la Suisse. *Revue Médicale Suisse, Volume 8, p.p.882-889.*

MADUBUIKE U et al., (2015). Prevalence and Antibiogram of Generic Enterococci in Ready-to-Slaughter Beef Cattle. *Notulae Scientia Biologicae. Volume 7, numéro 4. p.p. 390-399.*

MANTION B., (2015). Entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) : De grandes épidémies vers une gestion de routine. Pharmacie. *Thèse de Doctorat : Université Toulouse III – Paul Sabatier faculté des sciences pharmaceutiques* : p.104.

MERAH A., (2019). Etude de la qualité physico-chimique et microbiologique de l'eau des puits de la région EL Hassiane (W. Mostaganem). Microbiologie fondamentale. *Mémoire de Master, Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem* : p.71.

MESSAOUDI S., (2002). Evolution du trait de côte dans la plage Est Sidi Fredj. *Mémoire DEUA, I.S.M.A.L, Alger.*

MICHAEL S G et al., (2014). Enterococci from Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. *Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston* : p.674.

MEKDOUR Z, HARAOUÏ S., (2017). Isolement et identification de certaines bactéries productrices de protéase provenant de plumes de poulet. Génétique moléculaire et génomique des microorganismes. *Mémoire de Master de master, Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem* : p.77.

FERREIRA DA SILVA M., (2005). Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology, volume 55, numéro 2006, p.p. 322–329.*

MULLER A., (2017). Bon usage des antibiotiques : Résultats d'actions dans différents types d'établissements de santé. SNV. *Thèse de Doctorat, Université de Bourgogne Franche-Comté* : p.193.

KEREM ÇALGIN M, YELİZ ÇETNKOL., (2019). Antimicrobial Resistance of Enterococcus Species Isolated from Urine Cultures. *Middle Black Sea Journal of Health Science. Volume 5, numéro 2. P.133-137.*

OUBRIM N et al., (2012). Détection des Entérocoques Fécaux et Escherichia Coli Résistant Aux Antibiotiques Isolés à Partir des Eaux Brutes Épurées et Cultures. *European Journal of Scientific Research, volume 68, numéro 3, p.p. 453-461.*

OLFA BEN BRAIEK, SLIM SMAOUI., (2019). Enterococci: between emerging pathogens and potential probiotics. *BioMed Research International, volume 2019, p.13.*

PETRA F. G. WOLFFS., (2016). « Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal gene Transfer». *Frontiers in Microbiology, volume 7, p.p. 1-10.*

ANDRE LACOUX P., (1993). A study of the typing of the genus Enterococcus. Medicine. *Thèse de Doctorat, the University of London*: p.170.

QIWEN HU et al., (2016). Molecular events for promotion of vancomycin resistance in vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in microbiology, volume 7, p.p. 1-18.*

REKIK M., (2020). Caractérisation et évaluation de la résistance aux antibiotiques chez les entérocoques isolés dans le milieu marin. *Mémoire de Master : Ecole nationale supérieure des sciences de la mer et de l'aménagement du littoral.*

LECLERCQ R., (2001). Faut-il identifier les entérocoques, et comment. *La lettre de l'Infectiologue, Volume 16, numéro 7, p.p. 217-222.*

JEBRI S, RAHMANI f, HMAIED F., (2020). Bacteriophages as antibiotic resistance genes carriers in agro-food systems. *Journal of Applied microbiology, volume 130, p.p. 688-698.*

TOUAHIR N., (2017). Evaluation et caractérisation de la résistance aux antibiotiques chez des bactéries à Gram négatif isolées à partir de milieux et d'animaux aquatiques. *Mémoire de magister, Ecole nationale supérieure des sciences de la mer et de l'aménagement du littoral. Alger : p.107.*

VIDANA R., (2015). Origin of intraradicular infection with *Enterococcus faecalis* in endodontically treated teeth. Dental medicine. *Thèse de Doctorat, Karolinska Institutet: p.88.*

Annexes

Annexe 1 :

Lecture des résultats de l'antibiogramme :

	VA	SXT	TMP	AK	TE	CN	NA	AMC	ATM	CAZ	AM	CD	CTX	FOX
Kh6T	21 S	18 R	26 I	11 R	8 R	10 R	0	15 R	0	0	7 R	28 S	20 I	0
E8G	23 S	0	0	10 R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E3T	19 S	16 R	21 I	16 I	0	17 S	0	15 R	0	0	6 R	0	19 I	6 R
KhS3A	22 S	0	0	11 R	0	11 R	0	0	0	0	0	0	0	0
BCS1	22 S	0	0	10 R	0	12 R	0	0	0	0	0	0	0	0
E11G	22 S	0	0	10 R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A1T	19 S	0	0	0	0	9 R	0	16 R	0	0	0	0	21 I	0
E5V	0	20 R	26 I	0	20 S	0	0	0	0	0	0	10 R	0	0
A1G	19 S	22 I	24 I	10 R	25 S	10 R	0	18 S	0	0	0	6 R	20 I	0
S2A	25 S	0	0	20 S	31 S	22 S	0	0	0	0	0	0	25 S	0
E13G	0	0	0	21 S	0	22 S	19 S	19 S	0	0	0	0	25 S	0
E3C	20 S	28 I	0	10 R	0	12 R	0	16 R	0	0	0	0	22 I	0
Kh10AMP	20 S	18 R	22 I	10 R	7 R	10 R	0	0	0	0	0	0	0	0
Kh14AMP	22 S	19 R	25 I	8 R	0	9 R	0	0	0	0	0	0	0	0
A3	22 S	13 R	25 I	13 R	23 S	13 I	0	14 R	0	0	10 R	7 R	19 I	10 R
E7G	22 S	0	25 I	11 R	0	13 I	0	15 R	0	0	8 R	10 R	20 I	0
Kh4AMP	20 S	22 I	0	12 R	0	12 R	0	0	0	0	0	0	0	0
A4	19 S	0	0	6 R	0	10 R	0	20 S	0	0	0	0	25 S	0
Kh8T	21 S	8 R	22 I	12 R	0	15 S	0	15 R	0	0	0	0	16 I	5 R
Kh6AMP	20 S	20 R	21 I	10 R	6 R	12 R	0	0	0	0	0	9 R	0	0
S2T	23	18	27	13	27	12	0	21	0	0	11	10	22	8

	S	R	I	R	S	R		S			R	R	I	R
KH2	20 S	20 R	25 I	11 R	25 S	13 I	0	0	0	0	0	0	0	0
E4C	24 S	0	0	15 I	0	13 I	0	0	0	0	0	0	0	0
S1	26 S	0	0	16 I	30 S	18 S	0	12 R	0	0	0	30 S	27 S	26 S
KH10C	23 S	0	0	0	6 R	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ES4G	23 S	0	0	11 R	0	10 R	0	0	0	0	0	0	0	0
E3T	18 S	0	0	7 R	7 R	10 R	0	16 R	0	0	0	0	27 S	0
E1C	20 S	28 I	21 I	26 S	6 R	26 S	0	15 R	0	0	20 S	20 S	25 S	0

Annexe 2 :

Le tableau des diamètres critiques utilisés pour la lecture : (CLSI-2020 et casfm 2020 ont été utilisés)

Antibiotique	Code	Charge (µg)	Diamètres critiques (mm)		
Vancomycine	VA	30	R ≤14	I 15-16	S ≥17
Triméthoprim- Sulfaméthoxazole	SXT	25	R <21 ≥50		S
Triméthoprim	TMP	5	R <21 ≥50		S
Amikacine	AK	30	R <14	I 15-16	S >17
Tétracycline	TE	30	R ≤14	I 15-18	S ≥19
Gentamicine	CN	10	R ≤12 ≥15	I 13-14	S
Acide Nalidixique	NA	30	R ≤13 ≥19	I 14-18	S
Amoxicilline + Acide clavulanique	AMC	30	R <8 ≥10		S
Aztréonam	ATM	30	R	I	S

			≤15 16-21 ≥22
Ceftazidime	CAZ	30	R I S ≤14 15-17 ≥18
Ampicilline	AM	10	R S <8 ≥10
Clindamycine	CD	2	R I S ≤14 15-16 ≥17
Céfotaxime	CTX	30	R I S ≤14 15-22 ≥23
Céfoxitine	FOX	30	R I S ≤14 15-17 ≥18

$$R(\%) = (NSR/NT) \times 100$$

NSR : Nombre des souches résistantes

R : Taux de résistance

NT : Nombre totale de souches

Annexe 3 :

Décret exécutif n °93-164 du 10 juillet 1993 définissant la qualité requise des eaux de baignade (BENAMAR, 2006).

Paramètres microbiologiques	Unités	Valeurs guides	Valeurs limites
Coliformes totaux	/100ml	500	10.000
Coliformes fécaux	/100ml	100	2.000
Entérocoques fécaux	/100ml	100	/

Résumé

Ce travail a pour objectif l'évaluation et la caractérisation de la prévalence de la résistance chez des souches d'entérocoques aux antibiotiques et l'influence des apports anthropiques dans six plages du littoral Algérois.

Les taux de résistance dans l'eau et le sédiment ont été significatifs pour l'azithromycine, la tétracycline et la gentamicine, alors qu'ils sont relativement bas pour la ciprofloxacine et l'ampicilline, la résistance à la vancomycine, antibiotique le plus important est moyenne dans l'eau mais nulle dans le sédiment. Le niveau de résistance est remarquable dans les plages recevant des apports anthropiques que dans les plages non polluées.

Une batterie de tests classiques permet d'identifier 40 souches d'*E.faecalis* et 13 souches qui appartiennent soit à *E.gallinarum*, *E.casseliflavus* ou *E.flavescens* parmi 67 souches isolées.

L'étude de l'antibiorésistance sur une collection de 28 Entérocoques montre une résistance marquée aux aminoglycosides (la gentamicine, 68% et l'amikacine, 50%). La résistance au sulfaméthoxazole-triméthoprime est moyenne (36%), alors que celle vis-à-vis la clindamycine et la tétracycline est moins importante (21%). Concernant les bêta-lactamines, une résistance moyenne est observée vis-à-vis de l'amoxicilline/acide clavulanique (36%) suivis de l'ampicilline (18%) et la céfoxitine (14%).

Ces résultats montrent bien le risque sanitaire associé à la contamination des plages par les entérocoques. Pour cela, l'installation de stations d'épuration ainsi qu'un système de surveillance périodique s'avèrent nécessaire pour réduire le risque microbien et protéger la santé publique.

Mots clés : Algérois, antibiorésistance, entérocoques, eau de mer, sédiment.

Abstract

The objective of this work is to assess and characterize the prevalence of resistance in strains of enterococci to antibiotics and the influence of anthropogenic inputs in six beaches on the Algerian coast.

Resistance rates in water and sediment were significant for azithromycin, tetracycline and gentamicin, while they were relatively low for ciprofloxacin and ampicillin, resistance to vancomycin, the antibiotic the most important is average in water but zero in sediment. The level of resistance is remarkable in beaches receiving anthropogenic inputs than in unpolluted beaches.

A battery of standard tests makes it possible to identify 40 strains of *E.faecalis* and 13 strains which belong either to *E. gallinarum*, *E.casseliflavus* or *E.flavescens* among 67 strains isolated.

The antibiotic resistance study on a collection of 28 Enterococci shows marked resistance to aminoglycosides (gentamicin, 68% and amikacin, 50%). Resistance to sulfamethoxazole-trimethoprim is moderate (36%), while resistance to clindamycin and tetracycline is lower (21%). Regarding beta-lactams, moderate resistance is observed to amoxicillin / clavulanic acid (36%) followed by ampicillin (18%) and cefoxitin (14%).

These results clearly show the health risk associated with the contamination of beaches by enterococci. For this, the installation of wastewater treatment plants as well as a periodic monitoring system are necessary to reduce the microbial risk and protect public health.

Keywords : Algerian, antibiotic resistance, enterococci, sea water, sediment.

المخلص

الهدف من هذا العمل هو تقييم وتوصيف انتشار المقاومة في سلالات المكورات المعوية للمضادات الحيوية وتأثير المدخلات البشرية في ستة شواطئ على الساحل الجزائري.

معدلات المقاومة في الماء والرواسب عالية للأزيتروميسين والتتراسيكلين والجنتاميسين، بينما هي منخفضة نسبياً للسيبروفلوكساسين والأمبيسيلين، معدلات المقاومة للفانكوميسين، المضاد الحيوي الأكثر أهمية متوسطة في الماء ولكن منعدمة في الرواسب. إن مستوى المقاومة ملحوظ في الشواطئ التي تتلقى مدخلات بشرية المنشأ مقارنة بالشواطئ غير الملوثة.

تتيح مجموعة من الاختبارات الكلاسيكية التعرف على عدة سلالات كما يلي:

E.casseliflavus (13) أو *E.gallinarum*, *E.flavescens* (40)، *E.faecalis*

أظهرت دراسة مقاومة المضادات الحيوية على مجموعة من 28 من المكورات المعوية مقاومة ملحوظة للامينو غليكوزيدات (الجنتاميسين، 68% والأميكاسين، 50%). تكون مقاومة السلفاميثوكسازول-تريمثوبريم معتدلة (36%)، بينما تكون مقاومة الكلينداميسين والتتراسيكلين أقل (21%). فيما (14%) يتعلق بالبيتا لاكتام، لوحظ وجود مقاومة معتدلة للأموكسيسيلين / حمض الكلافولانيك (36%) يليه الأمبيسيلين (18%) والسيفوكسيتين

تظهر هذه النتائج بوضوح المخاطر الصحية المرتبطة بتلوث الشواطئ بالمكورات المعوية. لهذا، فإن تركيب محطات معالجة مياه الصرف الصحي بالإضافة إلى نظام مراقبة دوري ضروري للحد من المخاطر الميكروبية وحماية الصحة العامة.

الكلمات المفتاحية: جزائري، مقاومة المضادات الحيوية، المكورات المعوية، مياه البحر، الرواسب.