

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر و تهيئة الساحل

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



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

OPTION : ENVIRONNEMENT

Thème :

**Evaluation et caractérisation génétique de la résistance aux
quinolones chez des entérobactéries isolées de la station
d'épuration des eaux usées urbaines de Boumerdes .**

Présenté par:

- Mr LAMZAOUI Abbas
- Mr HELALI Zakaria

Soutenu le 12 /06 /2011 devant le jury suivant :

Mme CHAOU N. Maitre assistante	Présidente (ENSSMAL)
Mme AMAR I. Maitre assistante	Examinatrice (ENSSMAL)
Mme BOUFROUCHE F. Maitre assistante	Examinatrice (USTHB)
Melle ALOUACHE S. Maitre assistante	Promotrice (ENSSMAL)

Promotion : (2010/2011)

Remerciements

C'est avec l'aide de Dieu qu'a vu le jour ce présent travail. Ensuite, il n'aurait pas pu être achevé sans le soutien, les conseils et les encouragements de certaines personnes auxquelles nous tenons ici à exprimer nos sincères remerciements.

En premier lieu, nous exprimons toute notre gratitude pour notre Promotrice, **Melle ALOUACHE S** pour ses précieux conseils, sa disponibilité, sa confiance qu'elle a toujours témoigné et la sollicitude dont elle nous a entouré, et ce tout au long de l'élaboration du présent travail.

Notre reconnaissance s'adresse également à :

-Madame **CHAOU N.**, maître assistante à l'ENSSMAL d'avoir accepté de présider ce jury,

- madame **AMAR I.**, maître assistante à l'ENSSMAL et madame **BOUFROUCHE F.**, maître assistante à l'USTHB d'avoir bien voulu examiner et corriger ce travail malgré leurs nombreuses préoccupations.

Nos remerciements vont également aux membres du laboratoire de génétique **USTHB** spécialement le **Pr R. BAKOUR**, qui nous a autorisé à réaliser nos PCR au sein du laboratoire sous la direction de Melle **ALOUACHE S**, membre du laboratoire.

Nous remercions aussi madame **REFES** Ingénieur du laboratoire de microbiologie à l'ENSSMAL pour sa serviabilité et sa gentillesse.

Nous n'oublions pas non plus nos Enseignants, qui tout au long du cycle d'études à l'École Nationale Supérieure de Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral, nous ont transmis leur savoir.

Nous exprimons aussi notre profonde reconnaissance au personnel de la bibliothèque de l'ENSSMAL.

Nous adressons une pensée particulièrement affective à nos amis de l'ENSSMAL ont rendu agréables nos longues années d'études.

Nous tenons enfin à remercier tous ceux qui ont collaborés de près ou de loin à l'élaboration de ce travail, qu'ils acceptent nos humbles remerciements.

Dédicace **zaki**

Je dédie ce modeste travail,

A ceux qui ont fait tout

*pour moi : ma mère **MALIKA** et mon père **ABD EL KADER***

*Mes grands pères **HADJ LARBI** et **SI CHRIF**.*

*Mes grandes mère **HAFSIA** et **FATIMA**.*

*mes chères sœurs **khaoula** et son mari (**Mohamed**), **Fatima**.*

*et mes chères frères **kamel** et sa famille (**Nasima** et **Hafsa**)*

***Ghano** et sa famille (**Rafika** et **Malak**), **Boubakeur**, **Larbi**.*

*A mon oncle **Sidi mohamed** et sa famille*

*(**Nora**, **Salah**, **Asma**, **Houda**, **Mido**),*

et à l'ensemble de ma famille.

*tous mes amis, spécialement de **UGEL** sur tout :*

Mr. BEN BRAHIM Ben ziane** et **Dr. KABIR Issam

Dédicace **ADÈÈ**

À mes très, très chers parents, source d'amour et d'affection ;

que Allah les protèges.

À mes frères et mes sœurs qui m'ont encouragé aussi, pour

arriver jusqu' au là, que ALLAH les protèges ;

CHAKER ; YAAKOUB ; MOUNA ; SANA ; CHAFIA.

À tous mes amis, et à tous qui m'aiment.

À tous qui aime l'étude.

Liste des figures

Figure 1 : Principe du traitement secondaire par les boues activées.....	5
Figure 2 : Représentation schématique des différents mécanismes de transfert de gène.....	9
Figure 3 : Mécanisme de conjugaison bactérienne.....	11
Figure 4 : Structure de Chloroquine, 7-chloroquinoline et acide nalidixique.....	12
Figure 5: Structure de l'acide nalidixique et quelques dérivés.....	13
Figure 6: Structure de base des fluoroquinolones.....	14
Figure 7 : Modèle d'interaction entre les quinolones et le complexe ADN-ADN gyrase.....	16
Figure 8 : Mécanisme de résistance aux quinolones.....	17
Figure 9 : Schéma générale de la station de BOUMERDES.....	20
Figure 10: Schéma générale de la station de BOUMERDES.....	20
Figure 11: Schéma de la disposition des antibiotiques.....	23
Figure 12: Répartition des souches selon leur identité bactérienne.....	29
Figure 13: Identification des 21 souches isolées à partir des eaux usées.....	29
Figure 14: Identification des 21 souches isolées à partir des eaux traitées.....	29
Figure 15: Taux de résistance des 42 souches vis-à-vis des quinolones et autres famille d'antibiotiques.....	30
Figure 16: Taux de résistance des 42 souches vis-à-vis des antibiotiques non-quinolones.....	30
Figure 17: Pourcentage de la résistance selon les familles d'antibiotiques.....	31
Figure 18: Taux de résistance des 42 souches vis-à-vis des quinolones et autres familles d'antibiotiques par apport à l'eau traité et l'eau usée.....	32
Figure 19: Taux de résistance des 42 souches vis-à-vis des antibiotiques non-quinolones Par apport à l'eau traité et l'eau usée.....	32
Figure 20: Résultat de la recherche des gènes Qnr (A,B,S) par PCR- multiplexe.....	35
Figure 21: Résultat de la recherche des gènes Qnr (A, B, S) par PCR- multiplexe.....	35
Figure 22 : Résultat de la recherche des gènes Qnr (A, B, S) par PCR- multiplexe.....	36
Figure 23 : Illustration de la recherche du gène QepA par PCR.....	36
Figure 24: Illustrations de la production de BLSE par une souche résistante à la Ciprofloxacine.....	38

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les valeurs limites des paramètres de rejet dans un milieu récepteur.....	7
Tableau 2 : Caractéristiques physicochimiques et microbiologiques des eaux prélevées.	21
Tableau 3 : Les différents antibiotiques en disque utilisés pour l'antibiogramme.....	23
Tableau 4 : Les séquences des amorces utilisées	26
Tableau 5 : Profils d'antibiorésistance des 42 souches résistantes au ciprofloxacine.....	34
Tableau 6 : Souches productrices des protéines Qnr.....	37
Tableau 7 : Les souches positives pour le test de synergie "DDS ».....	38

Sommaire

INTRODUCTION	1
I. GENERALITES	3
I.1. Les eaux usées	3
I.1.1. L'épuration des rejets urbains.....	3
I.1.2. Les étapes et procédés de traitement des eaux usées.....	3
I.1.2.1. Le prétraitement.....	3
I.1.2.2. Le traitement primaire.....	4
I.1.2.3. Traitement secondaire (Biologique).....	4
I.1.2.4. Traitement tertiaire.....	5
I.1.3. Caractérisation des eaux usées.....	6
I.1.3.1. Le potentiel d'Hydrogène (pH).....	6
I.1.3.2. La température (°C).....	6
I.1.3.4. La demande biologique en oxygène (DBO5).....	6
I.1.3.5. La demande chimique en oxygène (DCO).....	6
I.1.3.6. Les coliformes totaux.....	6
I.1.3.7. Les coliformes fécaux.....	7
I.1.4. Les normes algériennes de rejet d'effluents.....	7
I.2. Les eaux usées et la résistance aux antibiotiques	8
I.3. Supports mobiles de la résistance et transferts horizontaux	8
I.3.1. Transferts des gènes.....	8
I.3.1.1. La transformation bactérienne.....	9
I.3.1.2. La transduction.....	10
I.3.1.3. La conjugaison.....	10
I.3.2. Les supports mobiles de la résistance.....	11
I.3.2.1. Les plasmides.....	11
I.3.2.2. Transposons et intégrons.....	11
I.4. Les Quinolones	12
I.4.1. Définition.....	12
I.4.2. Le mode d'action des quinolones.....	15
I.4.3. Les mécanismes de résistances aux quinolones.....	16
I.4.3.1. Mauvaise affinité de la cible.....	17
I.4.2.2. Protection de la cible.....	17
I.4.3.3. Acétylation.....	17
I.4.3.4. L'imperméabilité.....	18
I.4.3.5. Le système d'efflux.....	18
II. MATERIEL ET METHODES	19
II.1. Description de la zone d'étude	19
II.2. Caractéristiques physico-chimique et microbiologique des prélèvements	21
II.3. Méthodes	21
II.3.1. Identification bactérienne des souches résistantes.....	21
II.3.2. Diffusion en milieu gélose : Antibiogramme.....	22
II.3.3. Détection des bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE).....	24
II.3.4. Transfert génétique par conjugaison bactérienne.....	24
II.3.5. Recherche des gènes de résistance aux quinolones par PCR.....	25
II.3.6. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	27
III. RESULTATS	28
III.1. Identification bactérienne	28

III.2. Résistance aux antibiotiques	30
III.3. Caractérisation génétique de la résistance aux quinolones	35
III.4. La production d'une béta-lactamases à spectre élargi	37
III.5. Transfert génétique par conjugaison bactérienne	39
IV. DISCUSSION	40
V. CONCLUSION	43
VI. BIBLIOGRAPHIES	45
ANNEXE	

INTRODUCTION

Les antibiotiques ont montré leur efficacité dans le traitement des infections humaines, dans la médecine vétérinaire et dans l'élevage où ils sont également utilisés comme facteurs de croissance dans certains pays.

L'utilisation massive des antibiotiques depuis les années 50 , a généré et continue de générer une libération importante de ces molécules dans l'environnement. Ces résidus actifs exercent une pression de sélection qui a entraîné l'apparition de bactéries résistantes. De plus, la présence des gènes de résistance sur des supports génétiques mobiles (plasmides, intégrons et transposons) facilite la dissémination de la résistance via les transferts horizontaux.

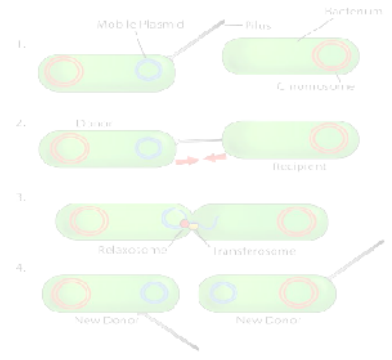
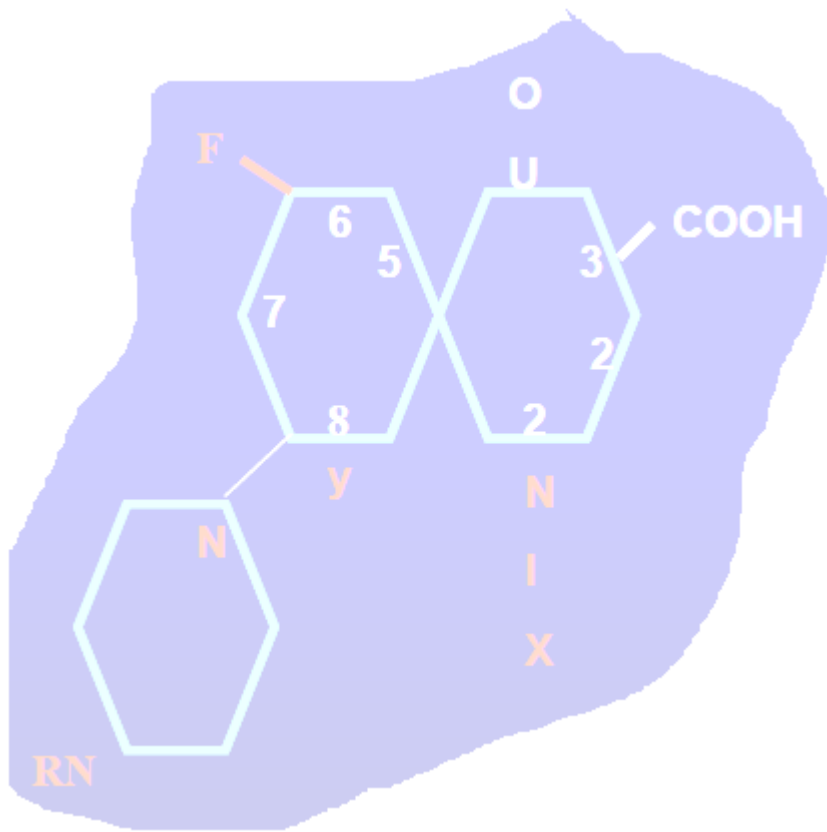
Les antibiotiques et bactéries résistantes sont excrétés dans les eaux usées via les fèces où ils peuvent atteindre les stations d'épurations (STEP) avant d'être finalement rejetés dans l'environnement. De part sa place stratégique à l'interface entre les activités humaines et l'environnement, la STEP est le dernier rempart avant le rejet des antibiotiques et des bactéries antibiorésistantes dans l'environnement. Elle est capable de supporter une forte densité cellulaire, et elle combine microorganismes résistants et antibiotiques, ce qui permet de la considérer comme un point chaud propice au transfert de gènes de résistance et à l'émergence de l'antibiorésistance.

L'évaluation de la résistance aux antibiotiques dans les eaux usées et les eaux traitées nous permet d'avoir des données importantes pour comprendre l'écologie et l'épidémiologie des bactéries résistantes.

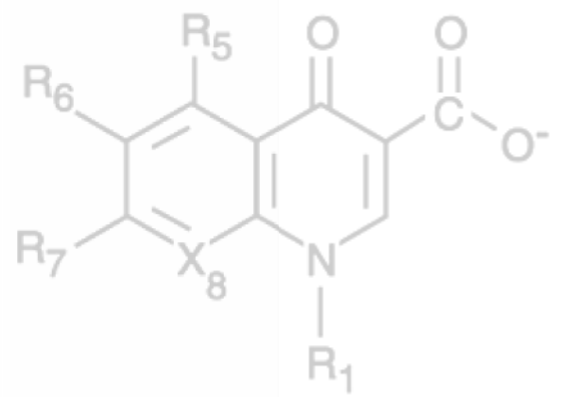
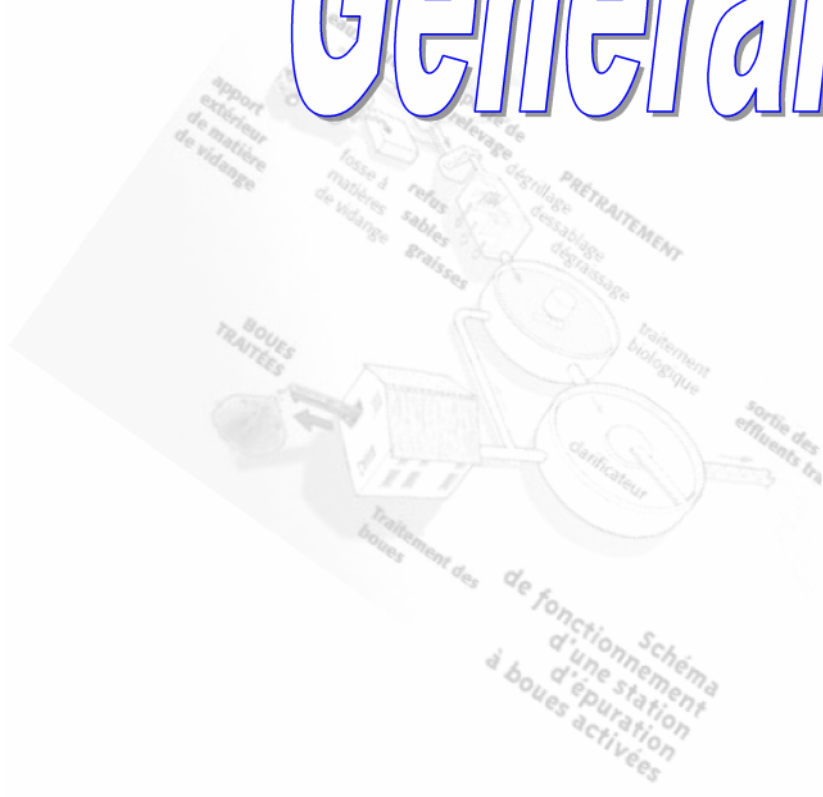
Ce travail s'inscrit dans le cadre de projet de recherche sur l'évaluation et la caractérisation moléculaire de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement aquatique. Il complète une étude entamée en 2010 sur l'impact du traitement biologique sur l'émergence de l'antibiorésistance. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la caractérisation génétique de la résistance aux quinolones chez les entérobactéries isolées au niveau de la station d'épuration des eaux usées urbaines de Bouverdes.

Pour ce faire nous avons adopté le plan suivant :

- Confirmation de la résistance à la ciprofloxacine
- Identification des bactéries résistantes.
- Evaluation de la résistance des souches aux antibiotiques par antibiogramme.
- Caractérisation des gènes codant pour la résistance aux quinolones
- Recherche d'une association entre la résistance aux quinolones et la production de bêta-lactamases à spectre élargi.
- détermination de la mobilité des gènes de résistance par conjugaison bactérienne.



Généralités



I.GENERALITES

I.1. Les eaux usées

I.1.1. L'épuration des rejets urbains

La réduction de la pollution urbaine commence habituellement par un bon système d'assainissement qui amène les effluents collectés à un système d'épuration. Le traitement le plus fréquent des effluents urbains est basé sur le processus à boues activées. Ce processus est devancé par des traitements physiques comme le dégrillage, la décantation et la flottation. Le cœur du traitement est la décomposition biologique des matières organiques par des bactéries recyclées (boues secondaires). Le principe de cette épuration biologique des eaux usées est d'alimenter en permanence une communauté de micro-organismes par des matières organiques polluantes et par l'oxygène. Les micro-organismes consomment la matière organique et la transforment au moyen de leur métabolisme aérobie en partie en une nouvelle biomasse microbienne et en partie en dioxyde de carbone CO₂, en eau et en matières minérales puis les bactéries sont séparées de l'eau épurée par une décantation finale. Le traitement peut être complété par la déphosphoration biologique ou chimique, par une dénitrification biologique, par une filtration, ou une décontamination terminale (**Cardot, 1999**).

I.1.2. Les étapes et procédés de traitement des eaux usées

Le traitement des eaux usées passe par quatre étapes essentielles :

I.1.2.1. Le prétraitement :

Le prétraitement consiste en un ensemble d'opération physique et mécanique dont la mise en œuvre et largement dépendante de la nature et des caractéristiques des rejets industriels à traiter et aussi de la ligne de traitement prévue en aval. Toutes les stations d'épuration ne sont pas forcément équipées des trois étapes : dégrillage, dessablage et déshuilage. Seul le dégrillage est généralisé (**Cardot, 1999**).

-Le dégrillage

Il permet de séparer les matières volumineuses par un simple passage de l'eau brute avec une vitesse moyenne de 0.6 à 1m/s à travers des grilles composées de barreaux espacés de 10 à 100 mm , placés verticalement ou inclinée de 60 à 80 sur l'horizontal (**Cardot, 1999**).

-Le dessablage

Il a pour but d'extraire des rejets industriels, le gravier, le sable, et autres matières minérales denses de façon à éviter leurs dépôts dans les canaux et à protéger les pompes contre l'abrasion. (**Cardot, 1999**).

-Le dégraissage-déshuilage

Le dégraissage est une opération de séparation liquide-solide réalisant un compromis entre une rétention maximale de graisses et un dépôt minimal de boues. On peut noter qu'une injection d'air au fond de la bêche de séparation permet de récupérer les graisses par flottation. Cette préparation des effluents facilite l'épuration des effluents en aval, en réduisant le colmatage et en évitant une certaine inhibition des processus biologiques. **(Cardot, 1999).**

I.1.2.2. Le traitement primaire

L'opération consiste en élimination des matières en suspension et des matières colloïdales par décantation. On distingue la décantation simple et la décantation physico-chimique qui consiste en l'injection des coagulants et des flocculants permettant de faire décanter ou flotter les particules solides **(Gaujous, 1995).**

Cette étape de traitement comprend :

-La décantation

C'est un procédé utilisé pratiquement dans toutes les usines d'épurations et de traitement des eaux. Elle a pour but d'éliminer les particules en suspensions dont la densité est supérieure à celle de l'eau. Ces particules s'accumulent au fond du bassin de décantation d'où on les extrait périodiquement **(Gaujous, 1995).**

-Coagulation et floculation

La turbidité et la couleur d'une eau sont principalement causées par des particules très petites, dites particules colloïdales. Ces molécules peuvent rester en suspension dans l'eau durant de très longues périodes et peuvent mêmes traverser un filtre très fin. Pour les éliminer on utilise les procédés de coagulation et floculation. **(Vilagines, 2003).**

À la fin de ce traitement, la décantation de l'eau permet de supprimer environ 60% des matières en suspension, environ 30% de la demande biologique en oxygène (DBO) et 30% de la demande chimique en oxygène (DCO). Les matières supprimées forment au fond du décanteur un lit de boues appelé boues primaires.

I.1.2.3. Le traitement secondaire (Biologique)

Le traitement biologique le plus simple consiste à éliminer les composés organiques qui sont nocifs pour l'environnement puisque leur dégradation implique la consommation d'O₂ dissous dans l'eau nécessaire à la survie des animaux aquatiques.

Cette étape, le plus souvent basée sur la technique des « boues activées », permet essentiellement l'élimination de la pollution carbonée dissoute mais aussi l'azote et le phosphore. Le principe du traitement à boues activées est basé sur le fait que les effluents prétraités séjournent dans un bassin aéré artificiellement appelé « bassin d'aération » et que les microorganismes présents se développent en dégradant les divers composés présents dans l'effluent ce qui entraîne la formation de floccs appelés « boues activées » (Figure 1). Ces boues sont décantées dans un décanteur secondaire ou clarificateur. Une partie des boues est réinjectée en amont, dans les bassin d'aération, pour renforcer les processus bactériologique, alors que l'excès de boue est collecté puis traité et recyclé en agriculture (Cardot, 1999).

Cette étape de traitement permet d'éliminer la charge organique mesurée communément par

La DBO₅ et la DCO. De plus si le temps de contact est suffisant nous observons une étape de **nitrification** : c'est l'oxydation de l'ammoniaque en nitrite, puis en nitrate par des bactéries nitrifiantes et la **dénitrification** qui consiste en la réduction des nitrates en azote moléculaire en absence de l'oxygène. Généralement, la nitrification et la dénitrification se font dans le même bassin par syncopage (alternance des phases d'aération et d'arrêt d'aération) (Cardot, 1999).

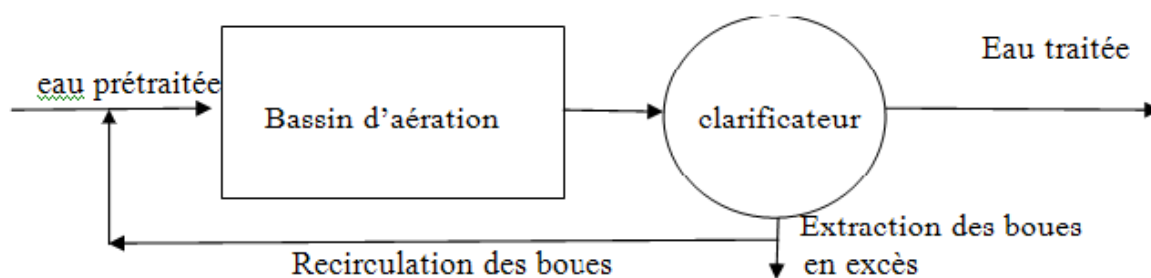


Figure 1 : principe du traitement secondaire par les boues activées (Cardot, 1999).

I.1.2.4. Le traitement tertiaire

Ces traitements complémentaires constituent un complément d'épuration des eaux usées dans le but de la réutilisation de ces eaux dans les différents domaines principalement l'irrigation.

Les différents types de traitements sont :

- les traitements physiques : décantation, filtration, tamisage ou microfiltration ;
- les traitements chimiques : à base de chaux, la floculation ou l'extraction de l'azote et du phosphore ;

- les traitements biologiques : lagunage, boues activées, rejet dans le sol, etc ;
- les traitements bactériologiques : à base de chlore ou d’ozone, par adsorption au moyen de charbon actif ou par rayonnement ultraviolet. **(Degremont, 1978)**.

I.1.3.Caractérisation des eaux usées

La composition des eaux usées s’analyse par le biais de diverses mesures physique, chimique et biologique. Les analyses les plus fréquentes Comportent : de la demande biochimique en oxygène (DBO5), de la demande chimique en oxygène (DCO), de la température ; du pH.

I.1.3.1.Le potentiel d’Hydrogène (pH)

Le pH est un paramètre qui permet de mesurer l’acidité, l’alcalinité ou la basicité d’une eau **(Gomella et Gueree, 1978)**. En milieu côtier et estuarien, certains rejets industriels ou les apports d’eaux de ruissellement sont la cause de variation du pH qui s’avère être, dans ce cas, un indice de pollution **(Aminot et Chaussepied, 1983)**.

I.1.3.2.La température (°C)

La température est un facteur important qui joue un rôle dans l’efficacité du traitement appliqué d’une part (la décantation est plus efficace a des températures élevées), et d’autre part, elle joue un rôle dans les différent phénomènes aquatiques comme la solubilité des gaz et des sels. **(Cardot, 1999)**.

I.1.3.3.La demande biologique en oxygène (DBO5)

La DBO5 est définie comme étant la consommation d’oxygène nécessaire aux micro-organismes pour décomposer la matière organique biodégradable contenue dans les eaux usées. Cette mesure se fait pendant un temps 5 jours et une température d’incubation de 20°C. Le résultat est exprimé en mg/l d’oxygène consommé durant cette période **(Rodier et al, 2005)**.

I.1.3.4.La demande chimique en oxygène (DCO)

La DCO représente la quantité d’oxygène nécessaire à l’oxydation des composés non biodégradables .Cette mesure est exprimée en mg/l d’oxygène consommé par ces matières. **(Rodier et al, 2005)**.

I.1.3.5.Les coliformes totaux

Les coliformes sont utilisées depuis très longtemps comme indicateurs de la qualité microbienne parce qu’ils peuvent être indirectement associés à une pollution d’origine fécale.

Les coliformes totaux sont définis par l’organisation internationale de standardisation (ISO), comme étant des bactéries en forme de bâtonnet, non sporogènes, Gram négatifs, oxydase négatifs, facultativement anaérobies, capable de croitre en présence de sels biliaries

ou d'autres agent de surface possédant des activités inhibitrices similaires, et capable de fermenter le lactose (et le mannitol) avec production d'acide et d'aldéhyde en 48heurs, à des températures de 35-37°C. Les principaux genres inclus dans le groupe sont :*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Esherichia*, *Klebsiella*, et *Serratia*, (Rodier et al,2005) .

I.1.3.6.les coliformes fécaux

Les coliformes fécaux, ou coliformes thermotolérants, sont un sous-groupe des coliformes totaux possédant les mêmes caractères cités précédemment et sont capables de fermenter le lactose à une température de 44,5°C (Rodier et al, 2005). L'espèce la plus fréquemment associée à ce groupe bactérien est *Esherichia coli* (80-90% des thermotolérants détectés), et dans une moindre mesure, certaines espèces des genres *Citrobacter*, *Enterobacter*, et *Klebsiella*. Bien que la présence de coliformes fécaux témoigne habituellement d'une contamination fécale, mais plusieurs coliformes fécaux proviennent des matières organiques tels que les effluents industriels du secteur des pâtes et papiers ou de transformation alimentaire (Barthe et al, 1994 ; OMS, 2000).

I.1.4.Les normes algériennes de rejet d'effluents

Les eaux usées urbaines ou industriels, ne doivent être rejetées dans un milieu récepteur naturel (rivière, lac, littoral marin, ou terrain d'épandage) que lorsqu'elles correspondent a des normes fixées par voie réglementaire.

Les valeurs limites de rejet d'effluent sont présentés dans le **Décret Exécutif n° 06-141 du 20 Rabie El Aouel 1427 correspondant au 19 Avril 2006** (Tableau 1).

Tableau 1 : Les valeurs limites des paramètres de rejet dans un milieu récepteur (Journal Officiel de la République Algérienne, décret exécutif n°06-14119 avril 2006)

Paramètres	Unité	Valeurs limites
Température	°C	30
PH	-	6.5 à 8.5
DBO5	mg/l	35
DCO	mg/l	120

I.2. Les eaux usées et la résistance aux antibiotiques

Après leur excrétion de l'organisme, les antibiotiques et les bactéries résistantes rejoignent les réseaux d'eaux usées urbaines, et leurs flux varient selon la ville (structure des réseaux; présence d'un hôpital ; ...), la saison avec une augmentation marquée en hiver (**Göbel et al, 2005 ; Ferech et al., 2006**). Une fraction des antibiotiques est adsorbée à la surface des biofilms/agrégats biologiques et ou dégradée au cours de son passage dans le réseau.

Au niveau de la STEP, les antibiotiques subissent simultanément des phénomènes de solubilisation, d'adsorption et de dégradation biologique et/ou physico-chimique (**Joss et al., 2005**). À la sortie du bassin biologique et en sortie de clarificateur, les concentrations d'antibiotiques dissous dans l'effluent varient de quelques dizaines de nanogrammes par litre au microgramme par litre (**Hirsch et al., 1999 ; Kümmerer et al., 2000 ; Ternes et al., 2004**).

Ces concentrations sont toujours très largement inférieures aux CMI (Concentrations minimales inhibitrices) connues mais peuvent être encore biologiquement activé ce qui engendre une pression de sélection.

L'apport des eaux usées en antibiotiques et bactéries résistantes ne peut justifier à lui seul le niveau de résistance aux antibiotiques dans la station d'épuration. En effet la station d'épuration est considérée comme un point chaud pour la sélection des bactéries résistantes dû à la pression de sélection exercée par les résidus d'antibiotiques et les échanges horizontaux des éléments génétiques mobiles (plasmide, transposons et intégrons).

Il est admis que durant le processus de traitement des eaux usées, des changements qualitatifs et quantitatifs se produisent dans la distribution de la population bactérienne. Le traitement engendre une réduction importante dans le nombre de bactéries incluant celui des bactéries résistantes. Cependant, des études ont suggéré que les populations de bactéries résistantes et des bactéries sensibles ne sont pas affectées de la même façon (**Guardabassi et al, 2002**).

I.3. Supports mobiles de la résistance et transferts horizontaux

I.3.1. Transferts des gènes

Les premiers phénomènes de transferts de gènes horizontaux ont été découverts par Griffith (1928) qui démontra expérimentalement qu'en co-injectant à des souris deux souches de pneumocoques (*Streptococcus pneumoniae*), des pneumocoques non virulents avaient acquis la virulence de l'autre souche de pneumocoques (initialement virulents). Le phénomène de transformation fut ensuite clairement identifié par Oswald (1944) comme responsable de ce transfert de gènes.

Suivirent ensuite l'identification des transferts médiés par les virus (transduction), d'éléments transposables (transposition) et les plasmides (conjugaison) (Figure 2) (Bonot, 2010).

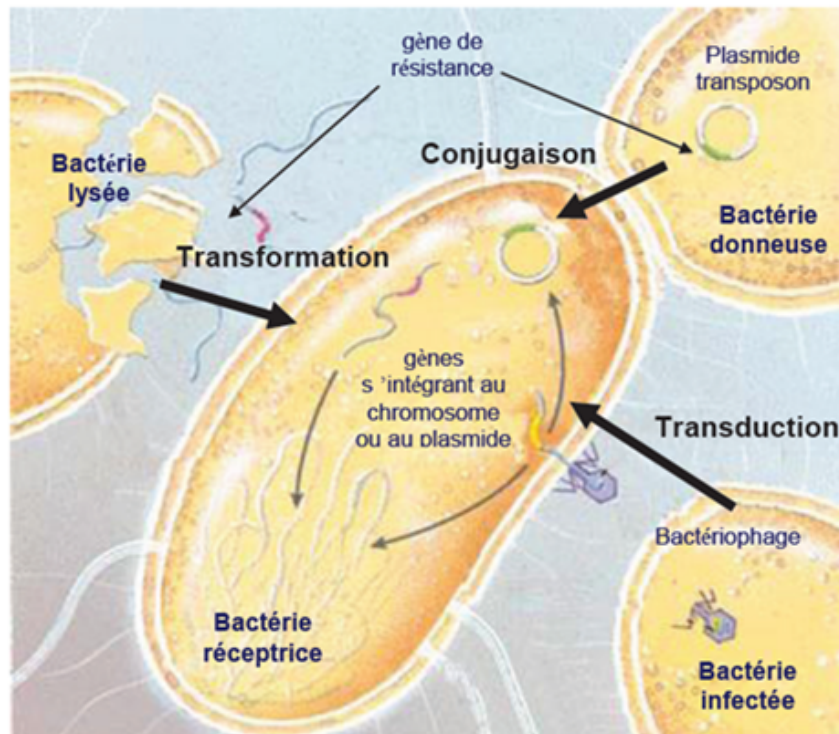


Figure 2 : Représentation schématique des différents mécanismes de transfert de gène (in Stéphanie, 2009).

I.3.1.1. La transformation bactérienne

La transformation correspond à l'incorporation d'un ADN extracellulaire, linéaire ou circulaire, que la bactérie compétente a acquis dans son environnement proche (Dubnau, 1999). Ces ADN extracellulaires ont été soit libérés par la lyse cellulaire soit de particules virales. L'état de compétence est limité dans le temps et il est induit en réponse à des conditions environnementales spécifiques (stress nutritif, altération des conditions de croissance, densité cellulaire, présence d'antibiotique, ...) variables selon l'espèce et la souche bactérienne considérée (Bonot, 2010).

Les mécanismes d'acquisition d'ADN par transformation, connus à ce jour peuvent être résumés ainsi (Bonot, 2010):

- les ADN extracellulaires se fixent à la surface de la cellule sur des récepteurs spécifiques dont le nombre peut varier de 30 à 80 par cellule ;
- L'ADN double brin fixé est transloqué au niveau de la membrane interne, clivé, puis converti en ADN simple brin pendant la translocation ;
- Si l'ADN transformant est maintenu sous une forme stable dans la cellule, il peut être intégré

au chromosome bactérien, à un plasmide ou à de l'ADN phagique par recombinaison homologue.

I.3.1.2. La transduction

La transduction est un phénomène qui a été mis en évidence par Zinder et Lederberg (1952) chez *Salmonella typhimurium*. Elle consiste en l'acquisition de séquences d'ADN par la bactérie suite à une infection par un bactériophage. On distingue la transduction généralisée : c'est l'encapsulation d'un fragment d'ADN lors de la lyse cellulaire et la transduction spécialisée qui concerne les phages tempérés qui en se désintégrant du génome bactérien prennent quelques gènes (**Zaneveld et al., 2008**).

I.3.1.3. La conjugaison

Parmi tous les mécanismes intervenant dans les transferts horizontaux de gènes entre bactéries, la conjugaison est considérée comme étant le plus important et le plus efficace. La conjugaison implique le transfert d'ADN entre deux cellules par l'intermédiaire d'un pont cytoplasmique initié par des pilis conjugatifs (Figure 3).

Différents éléments peuvent être transférés par la conjugaison : des plasmides, des éléments de type ICEs (integrative and conjugative éléments) mais aussi des régions de chromosomes bactériens

Dans le cas des plasmides, le transfert peut être résumé comme tel :

- un pont cytoplasmique établi par la bactérie donatrice rentre en contact avec la bactérie réceptrice,
- les deux brins complémentaires d'ADN plasmidique sont séparés par une relaxase qui se fixe en cis sur l'origine de transfert (*oriT*) ce qui engendre le clivage de l'un des deux brins d'ADN.
- La réplication du brin matrice circulaire est initiée dans la bactérie donatrice, et en même temps un complexe protéique (transférosome) va interagir avec la relaxase afin de transférer un brin vers la cellule réceptrice.
- Dans la cellule réceptrice, l'ADN simple brin est converti en ADN double brin par synthèse d'un brin complémentaire.
- A la fin de la synthèse des brins complémentaires dans les deux cellules, les deux plasmides sont liés entre eux par la région *oriT*. C'est à ce niveau qu'intervient la séparation des deux plasmides.

Le pont cytoplasmique se résorbe et les deux cellules sont libérées, possédant chacune une copie du plasmide et devenant toutes les deux des donneuses potentielles (**Bonot, 2010**).

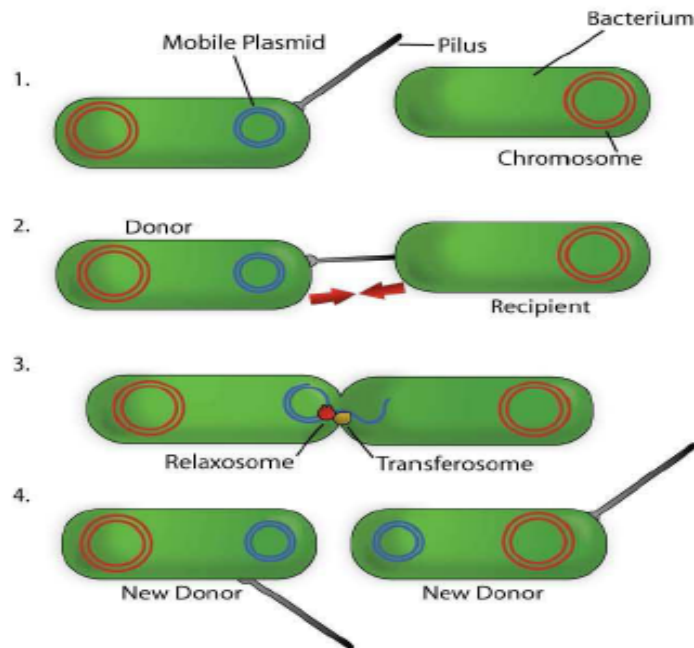


Figure 3 : Mécanisme de conjugaison bactérienne (Griffith *et al.*, 1999).

I.3.2. Les supports mobiles de la résistance

I.3.2.1. Les plasmides

Les plasmides sont des molécules d'ADN bicaténaire, circulaires et cytoplasmiques, de petite taille (5 à 4000 fois plus petit que le chromosome), se répliquant d'une manière autonome et non indispensables au métabolisme normal de la cellule-hôte. Leur transmission d'une cellule bactérienne à une autre peut s'effectuer par conjugaison (Tra⁺) ou transduction ou transformation.

Le terme de plasmide a été créé en 1952 par Lederberg pour désigner tout élément génétique cytoplasmique, comme le facteur F. Les plasmides de résistance aux antibiotiques ont été découverts en 1956 au Japon à l'occasion d'une épidémie de dysenterie bacillaire (*Shigella dysenteriae*) à bacilles résistant (Prescott *et al.*, 2002).

I.3.2.2. Transposons et intégrons

Les intégrons ont été identifiés par Stokes et Hall (1989) et rapidement définis comme étant le support de nombreux gènes de résistance aux antibiotiques (Zaneveld *et al.*, 2008). Ils ont été identifiés sur des chromosomes bactériens et des plasmides. Ils consistent essentiellement en un système de 3 éléments : le gène *intI* codant pour une intégrase, un promoteur, et un site de recombinaison *attI* (Fluit et Schmitz, 2004 ; Mazel, 2006).

Les intégrons ne sont pas mobiles mais ils facilitent la capture, le transfert et l'expression de cassettes de gènes. Comme les intégrons sont parfois portés par des plasmides

transférables, ils peuvent avoir un rôle important dans les transferts des gènes de résistance aux antibiotiques et l'émergence de bactéries antibiorésistantes (**Zaneveld et al., 2008**).

Les transposons sont des éléments qui sont capables de se déplacer d'un réplicon à un autre. Cependant, pour être transférés d'une cellule à une autre, ces éléments doivent être associés à des éléments génétiques mobile (plasmides, les phages, ou les transposons conjugatifs).

Les éléments transposables se composent à minima d'un gène codant pour une transposase (enzyme assurant la transposition de l'élément mobile) et de séquences inversées répétées bordant l'élément. La transposase reconnaît les régions inversées répétées et catalyse la transposition des extrémités du transposon vers un site cible. Outre les séquences impliquées dans la transposition, les transposons peuvent porter des gènes accessoires comme des gènes de résistance aux antibiotiques par exemple (**Galimand et al., 2005**).

I.4. Les quinolones

I.4.1. définition

Les quinolones sont des antibiotiques de synthèse chimique. En effet, en 1958, les chercheurs s'étaient aperçus de l'activité bactéricide d'un produit secondaire obtenu lors de la synthèse de la chloroquine: **la 7-chloroquinoline**. En 1962, la première quinolone cliniquement significative, directement dérivée de la 7-chloroquinoline vit le jour : **l'acide nalidixique**, indiqué pour le traitement des infections du tractus urinaire par certains bacilles à Gram⁻. Le but des chercheurs a été l'augmentation du spectre et de l'activité antibactérienne, ce qui a été obtenu avec l'acide oxolinique (Figure 4). (**Rodriguez-Martinez et al, 2010**).

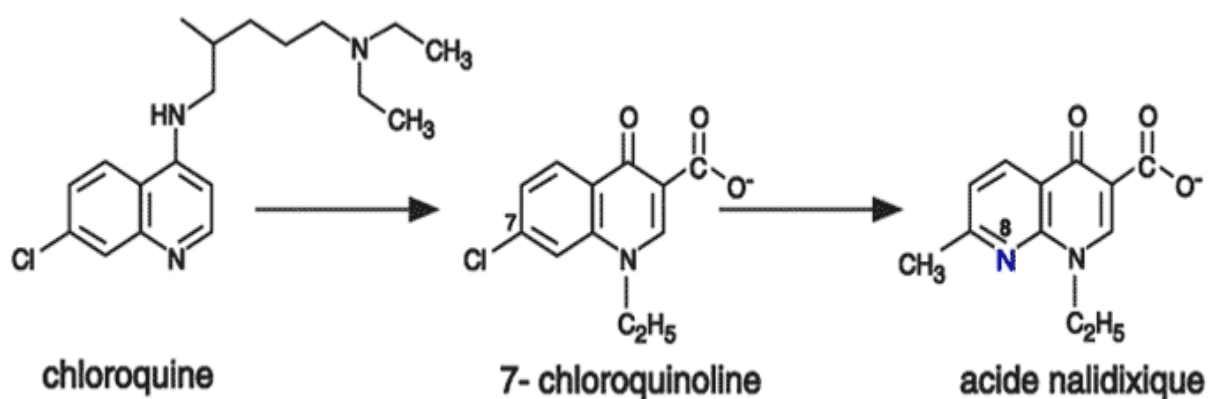


Figure 4 : Structure de Chloroquine, 7-chloroquinoline et acide nalidixique (**Tillotson, 1996**)

L'acide nalidixique présente une substitution de l'atome de carbone en position 8 dans le noyau quinoléine par un atome d'azote, ce qui donne un noyau naphtyridine.

Rapidement, d'autres dérivés furent synthétisés à partir du noyau naphtyridine de l'acide nalidixique : ainsi, une substitution en position 7 par la piperazine aboutit à des composés (Figure 5), tel l'acide pipémidique (Pipram®), montrant une demi-vie augmentée, et actifs notamment contre *Pseudomonas aeruginosa*.

Ce n'est que dans les années 80 que virent le jour les fluoroquinolones, après incorporation d'un atome de fluor en position 6 et un retour au noyau de type quinoléine. Ces composés ont montré une activité accrue envers les germes Gram(+).

De nombreux dérivés ont ainsi été développés : la norfloxacine (1986), la ciprofloxacine (1987), l'ofloxacine (1991), l'enoxacine (1992), la lomefloxacine (1992), la levofloxacine (1997), la sparfloxacine (1997), la trovafloxacine (1997), la gatifloxacine (1999), la moxifloxacine (1999), la gemifloxacine (2000)... (Tillotson, 1996).

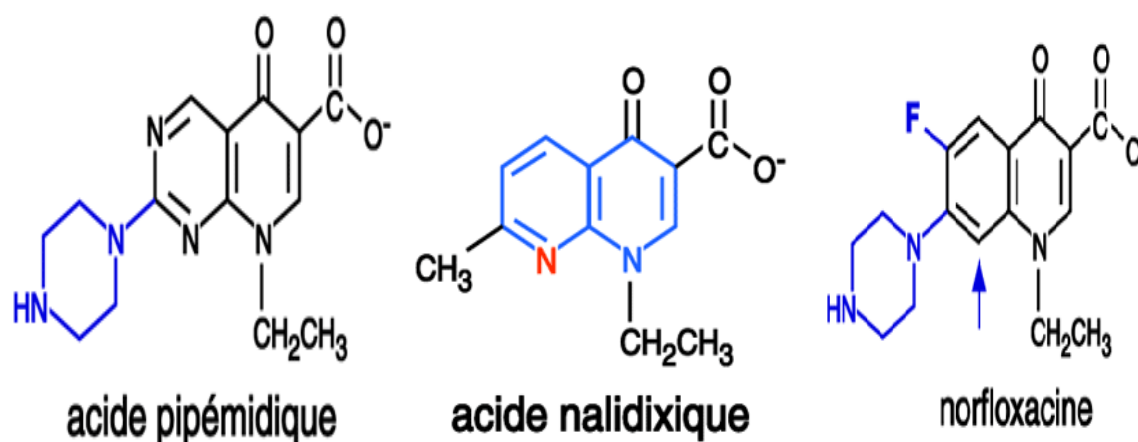


Figure 5: structure de l'acide nalidixique et quelques dérivés.

La présence d'un atome d'azote au lieu d'un atome de carbone en position 8 (en rouge) transforme le noyau quinoléine en noyau naphtyridine (en bleu).

Les fluoroquinolones se sont diversifiés tout en conservant une structure de base qui est soit le noyau quinolone ou le noyau naphtyridine (figure 6):

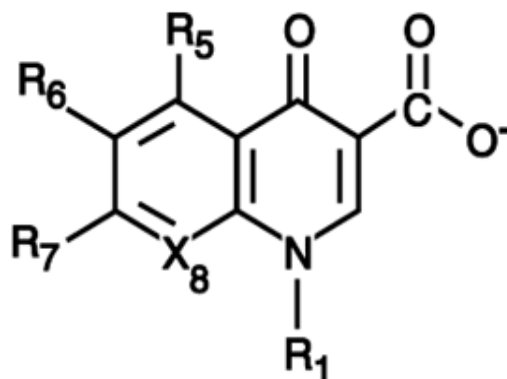


Figure 6: structure de base des fluoroquinolones (Tillotson, 1996).

La présence d'une fonction acide carboxylique en position 3, ainsi que d'un atome d'oxygène exocyclique en position 4 sont nécessaires à l'activité de l'antibiotique et ces groupement ne sont jamais modifiés, tandis que l'addition d'un fluor en position 6 et d'un cycle diaminé en position 7 accroît très significativement l'activité par rapport aux dérivés originaux (Figure 6) (acide nalidixique).

Position 1

La nature de la chaîne latérale en position 1 affecte grandement l'efficacité antibiotique. Ainsi, un groupement cyclopropyl confère une bonne activité envers les germes Gram (-). Un cycle reliant les positions 1 et 8 est observé dans la levofloxacin et l'ofloxacin.

Position 5

La plupart des fluoroquinolones ne présentent qu'un atome d'hydrogène à cette position. En effet, un substituant de grande taille en position 5 entraîne souvent une diminution d'activité. Certains substituants (-CH₃, -NH₂) confèrent une bonne activité envers les germes Gram (+).

Position 6

L'addition d'un fluor en 6 accroît très significativement l'activité par rapport aux dérivés originaux (acide nalidixique).

Position 7

La nature de la chaîne latérale en position 7 affecte grandement l'efficacité antibiotique. Des hétérocycles de type piperazine et amino-pyrrolidine, provoquent une augmentation d'activité. Des noyaux bicycliques (second noyau fusionné à un noyau pyrrolidine par exemple) en position 7, confèrent une bonne activité envers les germes Gram⁺.

Position 8

De nombreuses fluoroquinolones ne présentent qu'un atome d'hydrogène à cette position. Un substituant de type méthoxy confère une bonne activité envers les germes anaérobies. (Tillotson, 1996).

Les modifications en position 6 donnent les quinolones de deuxième génération ex: norofloxacin, ciprofloxacine et levofloxacine, qui ont un spectre d'action plus large et sont actives sur les Gram+ et les pathogènes atypiques. Les modifications chimiques en position 1, 7, et 8 élargissent l'activité des molécules de 3^{ème} génération (ex moxifloxacine), aux anaérobies et améliorent leur activité contre les Gram+ (Rodriguez-Martinez al, 2010).

I.4.2.Le mode d'action des quinolones

Du fait de leur bonne diffusion tissulaire, ces antibiotiques sont largement utilisés en médecine humaine et vétérinaire, notamment dans le cas d'infections urinaires et respiratoires.

Dans les années 80, la fluoration de ces molécules en position 6 a permis d'étendre leur spectre d'activité selon la génération de la molécule à *Pseudomonas aeruginosa*, aux coques à gram positif, aux bactéries intracellulaires et aux anaérobies. Parmi ces quinolones, nous citons la ciprofloxacine, la levofloxacine et la moxifloxacine.

Ces antibiotiques inhibent spécifiquement la synthèse d'ADN bactérien en agissant sur les topoisomérases de type II et IV. Les topoisomérases sont des enzymes dont la fonction est de réguler la topologie de l'hélice de l'ADN. La topoisomérase II, ou ADN gyrase est une protéine formée de deux sous unités: GyrA et GyrB. Le site catalytique de la gyrase (coupure et ressoudure de l'ADN) est centré sur la tyrosine en position 122 de GyrA.

La topoisomérase IV est responsable de la séparation des copies de l'ADN circulaire double brins. Elle est formée des sous-unités ParC et ParE (Cambau, 1997). Ces enzymes découpent les deux brins d'ADN, passent un autre segment d'ADN à travers la coupure, puis elles le referment (Figure 7) (Cambau, 1997 ; Rodriguez-Martinez et al, 2010).

Les quinolones ont des effets différents en fonction de leur concentration. A faible concentration, on assiste à un effet bactériostatique par l'inhibition des phénomènes de réplication et de transcription. A haute concentration, on observe un effet bactéricide dû à l'irréversibilité du complexe ADN-topoisomérase-quinolone formé (Figure 7), ce qui conduit à la fragmentation du chromosome bactérien et à l'induction du système de réparation SOS (Cambau, 1997).

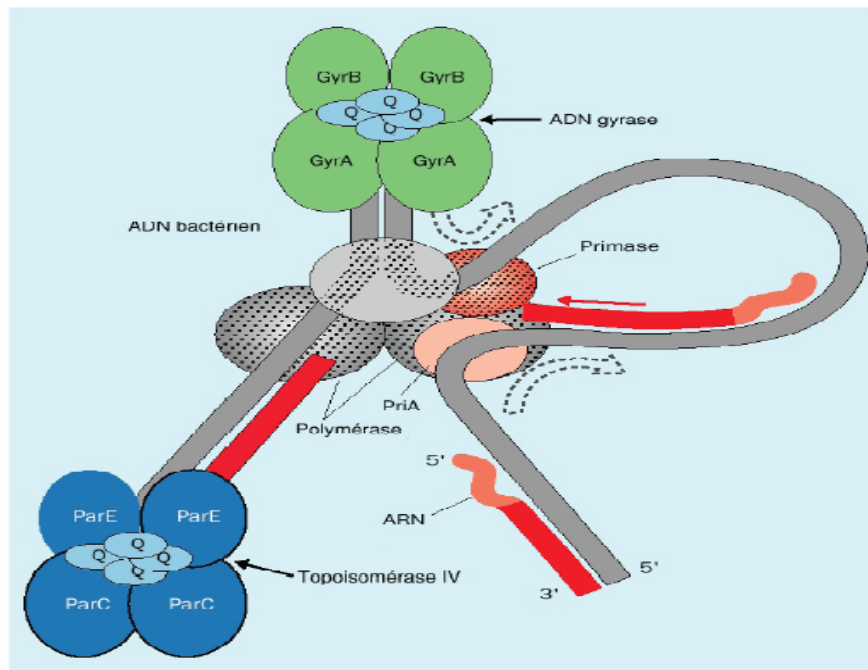


Figure 7 : modèle d'interaction entre les quinolones et le complexe ADN-ADN gyrase
(d'après Hooper ,2002.in Raphaël D ,2003)

I.4.3. Les mécanismes de résistances aux quinolones

Une souche bactérienne est dite résistante lorsqu'elle supporte une concentration d'antibiotique nettement supérieure à celle qui inhibe la majorité des autres bactéries de la même espèce. Elle apparaît suite à une mutation génétique aléatoire ou à un échange de gènes de résistances entre des bactéries (transformation génétique, transduction et conjugaison). Comme n'importe quel autre antibiotique, les bactéries ont développé des mécanismes de résistance (Figure 8) (Cambau, 1997):

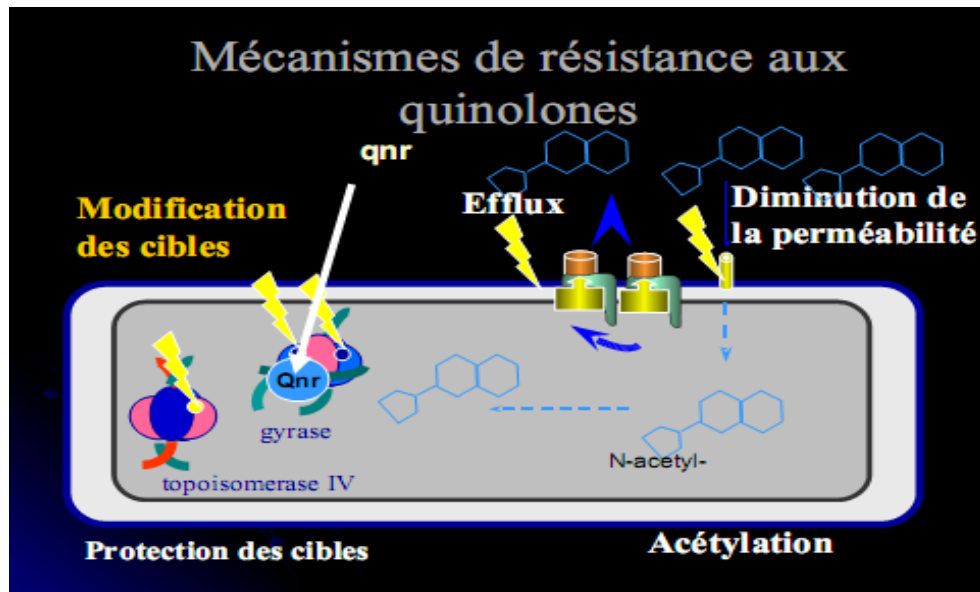


Figure 8 : mécanisme de résistance aux quinolones (Cambau, 2005).

I.4.3.1. Mauvaise affinité de la cible

Chez les bactéries résistantes aux quinolones, l'ADN Gyrase est mutée et présente une faible affinité pour les quinolones. Ces mutations ne semblent pas perturber l'activité de l'ADN gyrase :

- Les mutations au niveau de GyrA, conférant la résistance aux quinolones sont situés dans un domaine de 40 acides aminés (entre acide aminé 67 et 106) appelé QRDR (quinolone résistance determining region), à proximité de la tyrosine 122 site d'attachement de GyrA à l'ADN.
- Dans la sous unité GyrB, les mutations dans deux acides aminés ont été impliquées dans la résistance aux quinolones : 426 et 447 chez E.coli .Ils existent également les mutations dans la région 23-177de la sous unité ParC et 420-467 dans la sous unité ParE (Cambau, 1997).

I.4.3.2. Protection de la cible

C'est un mécanisme plasmidique très répandu mondialement. Il consiste en la production de protéine **Qnr** (A, B, S, C et D), protégeant l'ADN gyrase de la fixation des quinolones. (Cambau, 1997).

I.4.3.3. Acétylation

Il s'agit de AAC(6)-Ib-cr, un variant d'une aminoglycoside acetyltransférase qui confère en plus de la résistance à la tobramycine, amikacine et kanamycine, la résistance à la ciprofloxacine. Cet allèle diffère des autres AAC(6')Ib-cr par le changement de deux acides

aminés (Trp102Arg et Asp179Tyr). Cette enzyme est capable d'acétyler la ciprofloxacine au niveau de l'azote du noyau piperazine.

L'augmentation de la CMI conférée par AAC(6')Ib-cr est moindre par rapport à celle conférée par les protéines Qnr et elle est spécifique pour la ciprofloxacine et la norofloxacine. Cette enzyme est souvent associée aux autres déterminants génétiques de la résistance aux quinolones (QnrA, QnrB, and QnrS, QepA), aux beta-lactamases (CTX-M-1, CTX-M-14, DHA-1, SHV-12,...etc)...ect **Rodriguez-Martinez et al., 2010**).

I.4.3.4. L'imperméabilité

Plusieurs mécanismes impliquent les éléments de la membrane externe afin d'éliminer la concentration intracellulaire en antibiotiques. Chez *E.coli*, la porine OmpF est déterminante dans la pénétration des quinolones (**Cambau, 1997**).

I.4.3.5. Le système d'efflux

Les systèmes d'efflux sont des mécanismes de transport membranaire qui s'opposent à l'accumulation intracellulaire de divers substrats toxiques dont les antibiotiques. Ces pompes d'efflux sont composées par : un transporteur inséré dans la membrane cytoplasmique, une protéine située dans la membrane externe et une protéine de liaison périplasmique qui relie entre les deux autres protéines. Ce mécanisme d'efflux, qui présente une large spécificité de substrat concerne des classes d'antibiotiques aussi diverses que les tétracyclines, les bêta-lactamines, les quinolones, le chloromphénicol ou les macrolides (**Cavallo et al., 2004**). Chez *K.pneumoniae* un gène chromosomique OqxAB codant pour une pompe d'efflux est responsable de la résistance aux quinolones. Récemment, ce gène a été retrouvé sur un plasmide chez une souche clinique d'*E.coli* dans la Koré du sud (**Rodriguez-Martinez et al, 2010**).

En l'an 2002, il a été découvert une pompe d'efflux plasmidique, **QepA**, excréant les fluoroquinolones chez deux souches d'*E. Coli* en Belgique et au Japon (**Rodriguez-Martinez et al, 2010**).

Ces mécanismes **plasmidiques** (Qnr, QepA, AAC (6')Ib-cr) confèrent un bas niveau de résistance aux fluoroquinolones, mais leur présence pourrait potentiellement favoriser l'évolution vers un plus haut niveau de résistance par la sélection de mutation dans les topoisomérases de type II. En plus, leur association à d'autres déterminants de résistance, essentiellement β -lactamines et aminosides, favoriserait la co-sélection de la résistance aux fluoroquinolones (**Cambau, 1997**).

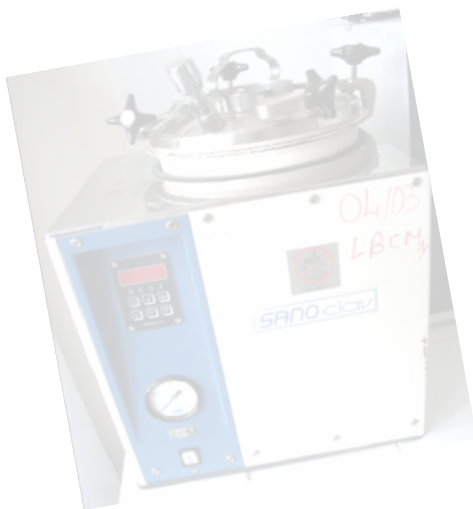


Matériels



Et

Méthodes



II. MATERIEL ET METHODES

Ce travail est la suite d'une étude entamée en 2010 (BERKANE et ZIANE, 2010) au niveau de la station d'épuration des eaux usées urbaines de Boumerdes, afin de déterminer l'impact du traitement des eaux usées sur la résistance aux antibiotiques.

Dans ce mémoire nous nous sommes intéressés à la caractérisation des mécanismes de résistance aux quinolones chez 42 coliformes résistants à la ciprofloxacine isolées en 2010 à partir des eaux usées avant traitement (n=21) et à partir de l'eau traitée (n=21).

II.1. Description de la zone d'étude

L'étude a été réalisée au niveau de la station d'épuration des eaux usées urbaines située dans la wilaya de Boumerdes, elle est délimitée par oued tatareg au nord, la route nationale à l'ouest, une zone d'activité à l'est et des terrains agricoles au sud. Cette station a été réalisée en 1996, et mise en service en janvier 2001. Elle permet de traiter les eaux de la commune de Boumerdes, de corso, et de Tidjelabine (Figure 9.10).

La station a une capacité d'épuration de 75000 équivalents habitant (EQH), avec un volume journalier de 15000 m³/j. Le débit de pointe en temps sec et en temps de pluie est respectivement de 1063 m³/j, 1944 m³/j. La DBO₅ et les MES journalier sont de 4050Kg/j et 5250Kg/j respectivement.

La station d'épuration fonctionne selon un procédé à boues activées qui consiste en une série de trois bassins d'aération qui fonctionnent par alternance. La séparation entre l'eau traitée et les boues est effectuée dans un clarificateur avec un recyclage d'une partie des boues dans le bassin d'aération. L'excès en boues activées est séché et stocké avant d'être envoyé à la décharge. L'eau traitée est évacuée directement sans aucun traitement supplémentaire dans le milieu naturel (Oued Tatarag). Exceptionnellement, l'eau traitée peut être réutilisée après traitement dans l'irrigation.

Les normes de rejets à la sortie de la station sont les suivantes :

NKT.....	40mg/l
DCO.....	90mg/l
DBO ₅	30mg/l
MES.....	30mg/l

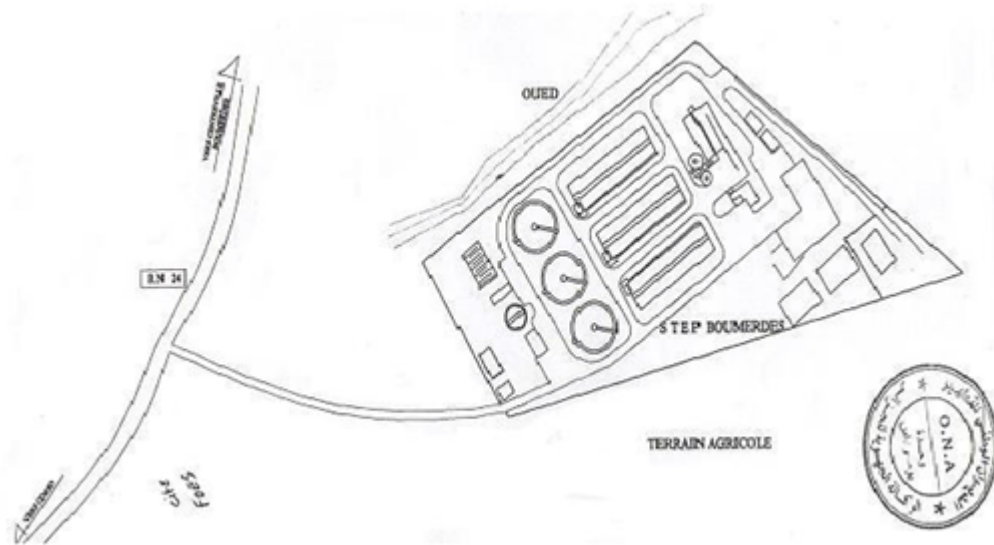


Figure 9: schéma générale de la station de BOUMERDES (ONA, modifie).



Figure 10: schéma générale de la station de BOUMERDES (Google Earth 2011).

II.2. Caractéristiques physico-chimique et microbiologique des prélèvements

Les bactéries ont été isolées à partir de prélèvement effectué en 2010 et leur caractéristiques physicochimiques et microbiologiques sont résumés dans le Tableau 2.

Tableau 2: caractéristiques physicochimiques et microbiologiques des eaux prélevées
(Berkane et Zian, 2010).

Paramètres	Sorties					
	Sortie I (14/03/2010)		Sortie II (28/03/2010)		Sortie III (04/04/2010)	
	ET	EF	ET	EF	ET	EF
pH	6,86	6,86	7,17	7,28	NF	NF
T (°c)	13,8	15,1	17,7	17,4	NF	NF
DBO ₅ (mg/l)	4	210	02	240	02	300
FT/ 100ml	3,8*10 ⁴	3,1*10 ⁷	3,82*10 ⁴	1,64*10 ⁷	1,63*10 ⁵	2,4*10 ⁸
CT/100ml	9,2*10 ³	2,08*10 ⁶	1,19*10 ⁴	2,84*10 ⁶	1,98*10 ⁴	1*10 ⁷
CF/100ml	5,0*10 ³	1,19*10 ⁵	8,9*10 ²	1,54*10 ⁴	1,06*10 ³	5,6*10 ⁴

II.3. METHODES

II.3.1. Identification bactérienne des souches résistantes

Après une confirmation de la résistance des souches à la ciprofloxacine (2µg/ml), une identification par galerie API 20 E a été entreprise.

Principe

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

Technique

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

- Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests.
- Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, H₂S, URE, en remplissant leur cupule d'huile de vaseline;
- incuber à 37°C pendant 24-48heures;
- le test d'oxydase est réalisé par le dépôt d'un inoculum bactérien sur le disque d'oxydase contenant l'oxalate de diméthyle-paraphénylène-diamine. La présence du cytochrome oxydase se traduit par l'apparition d'une coloration violette.

Lecture

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

II.3.2. Diffusion en milieu gélose : Antibiogramme

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

Principe

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

Technique

- A partir d'une culture jeune (18-24h), préparer dans 5ml d'eau physiologique une suspension bactérienne de 0,5McFarland (10⁸ cellules/ml).
- ajuster l'inoculum à 10⁷ cellules/ml.
- plonger un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne de 10⁷ cellules/ml;
- ensemercer la boîte en frottant l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée et en tournant la boîte trois fois de 60° afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum;
- appliquer les disques d'antibiotiques (tableau 3) à l'aide d'un distributeur stérile selon le schéma de la (figure 11);
- laisser diffuser pendant 15 minutes, à température ambiante;
- Incuber à 37°C pendant 18-24h.

Lecture

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

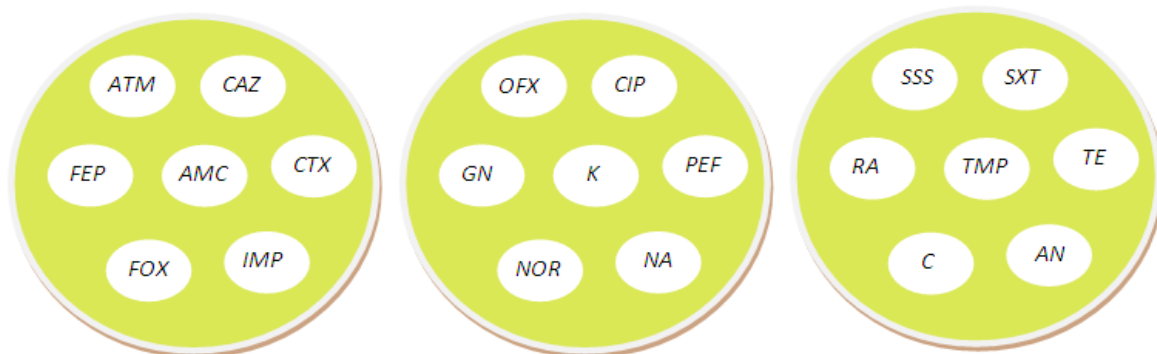


Figure 11: Schéma de la disposition des antibiotiques

Tableau 3: Les différents antibiotiques en disque utilisés pour l'antibiogramme.

Famille d'antibiotique utilisée		Antibiotique	Abréviation	Charge(µg)
Quinolones		Ofloxacine	OFX	5
		Acide nalidixique	NA	30
		Ciprofloxacine	CIP	05
		Norfloxacine	NOR	5
		Péfloxacine	PEF	5
β-lactamines	Monobactame	Aztréonam	ATM	30
	Carbapénèmes	Imipenème	IMP	10
	Céphalosporines de 2 ^{ème} génération	Céfoxitine	FOX	30
		Céfalosporines de 3 ^{ème} génération	Céfotaxime	CTX
		Ceftazidime	CAZ	30
	Céphalosporines de 4 ^{ème} génération	Céfépime	FEP	30
	Péncilline-association	amoxicilline + acide clavulanique	AMC	20/10
Aminosides		Kanamicine	K	30
		Amikacine	AN	30
		Gentamicine	GN	15 (10 UI)
Sulfamides-Trimethoprime		triméthoprime	TMP	5
		Sulfamethoxazole + Trimethoprime	SXT	1,25/23,75
Tétracyclines		Tétracycline	TE	30
Phénols		Chloramphénicol	C	30
Sulfamide		Sulfamide	SSS	200
Divers		Rifampicine	RA	30

II.3.3. Détection des bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) : test de synergie

La détection d'une BLSE a été réalisée en parallèle avec l'antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu solide. Ce test est basé sur la mise à profit d'une image de synergie entre au moins une céphalosporine de 3^{ème} génération (C3G) et/ou l'aztreonam et un inhibiteur de β -lactamines tel que l'acide clavulanique. Cette synergie se traduit par une augmentation nette de l'activité des C3G et/ou l'aztreonam du côté de l'inhibiteur (acide clavulanique) (**Jarlier et al., 1988 ; Vedel., 1997**).

II.3.4. Transfert génétique par conjugaison bactérienne

Principe

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

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

Technique

- La conjugaison a été effectuée en milieu solide (**Courvalin et al., 1985**);
- cultiver les souches donatrice et réceptrice dans un bouillon B.H.I.B pendant 24 heures à 37°C,
- centrifuger 1ml de chaque souche donatrice, et 1ml de la souche réceptrice à 12000trs/min pendant 3mn;
- re suspendre le culot dans 100 μ l d'eau distillée stérile ;
- mélanger 50 μ l de la donatrice avec 100 μ l de la réceptrice ;
- spoter 50 μ l du mélange dans une boîte de gélose Mueller Hinton;
- laisser sécher puis incubé à 37°C pendant 24h;
- racler la culture mixte et la mettre en suspension dans 5ml d'eau physiologique stérile;
- ensemercer les boîtes de sélection par la suspension bactérienne contenue dans l'eau physiologique ainsi que les souches parentales;
- après une incubation de 24h à 37°C, Vérifier les boîtes de sélection où seules les transconjugants doivent pousser;

- les transconjugants obtenus seront analysés par antibiogramme;
- les boîtes de sélection ont été préparées de la sorte :
 - 1ml d'une solution fille de Ciprofloxacine ou Céfotaxcime pour avoir une concentration finale de 2µg/ml ou 4 µg/l respectivement.
 - 1ml d'une solution de l'azide de sodium de telle façon à avoir une concentration finale de 400µg/ml.
 - 18ml de gélose Mueller Hinton.

II.3.5. Recherche des gènes de résistance aux quinolones par PCR

- Principe de la PCR classique et la PCR multiplexe

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

- La dénaturation de l'ADN entre 90 – 97 C°.
 - L'hybridation : fixation des amorces de part et d'autre du fragment à amplifier (40 -60°C).
 - L'élongation : la synthèse du brin d'ADN est assurée par la Taq polymérase à 72°C, en respectant la complémentarité des bases.
- **La PCR multiplexe** est une variante de la PCR qui, permet l'amplification de plusieurs régions à la fois en utilisant plusieurs couples d'amorces.

Technique

- Extraction de l'ADN total

- Préparer l'inoculum bactérien : 3 à 4 colonies dans 50µl d'eau distillée stérile;
- mettre l'inoculum a 100°C pendant 10mn pour la lyse;
- centrifuger à 12000trs/min pendant 3mn;
- récupérer le surnageant;

- Recherche de la présence des gènes Qnr (A,B,S) par PCR multiplexe

Mettre dans des micro tubes 5µl d'ADN additionné de 20µl du mélange réactionnel. Placer les microtubes dans l'appareil à PCR pour l'amplification en appliquant le programme Correspondant : 10min à 95°C, 35cycles de 95°C pendant 1min, 54°C pendant 1min et 72°C pendant 1min. une élongation finale à 72°C pendant 10min.

Le mélange réactionnel dans un volume de (25µl)

PCR master Mix coloré (2X) (promega).....	12.5µl
Amorce QnrAm F 25µM	0.4 µl
Amorce QnrAm R 25µM	0.4 µl
Amorce QnrBm F. 25µM.....	0.4 µl
Amorce QnrBm R 25µM.....	0.4 µl
Amorce QnrSm F 25µM.....	0.4 µl
Amorce QnrSm R 25µM.....	0.4 µl
H ₂ O.....	5.1µl
ADN.....	0.05µl

- Recherche du gène QepA par PCR Simplexe

La recherche du gène QepA a été effectuée dans un volume réactionnel de 12,5µl :

PCR master Mix coloré (2X) (promega).....	6.25µl
Amorce QepA F 25µM.....	0.25 µl
Amorce QepA R 25µM	0.25µl
H ₂ O.....	3.25µl
ADN.....	2.5µl

Le programme utilisé est : 96°C pendant 1 min, 30 cycles de 96°C pendant 1 min, 60°C pendant 1 min, et 72°C pendant 1 min. une élongation finale à 72°C pendant 5 min.

Tableau 4 : Les séquences des amorces utilisées (Cattoir et al., 2007 ; Yamane et al., 2008).

Primers	Sequence 5'-3'	Taille de l'amplifiat (pb)
QnrAm-F	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	580pb
QnrAm-R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC	
QnrBm-F	GGMATHGAAATTCGCCACTG	264pb
QnrBm-R	TTTGCYGYCYGCCAGTCGAA	
QnrSm-F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	428pb
QnrSm-R	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	
QepA-F	GCA GGT CCA GCAGCG GGT AG	199pb
QepA-R	CTT CCT GCC CGAGTA TCG TG	

II.3.6. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les produits d'amplification sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose (10X8cm) de 2% pour les Qnr et 1% pour le gène QepA, sous une tension de 50V pendant 20minutes. La visualisation se fait sous UV en utilisant le bromure d'ethidium (0,5µg/ml).

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

Technique

- préparation d'un gel d'agarose(1 ou 2%) dans du tampon TBE 1X, additionné de bromure d'ethidium (0.5µg/ml);
- déposer l'échantillon à analyser dans le gel
- appliquer un champ électrique à un voltage de 5V/cm;
- visualiser l'ADN sous UV à 254nm.

Solution employée :

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

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

Résultats

III. RESULTATS

Nous nous sommes intéressés aux bactéries résistantes au Ciprofloxacine (CIP), un antibiotique puissant et un indicateur de la production de mécanisme de résistance acquis. Quarante deux souches lactose positif et résistantes au Ciprofloxacine récupérées lors d'une étude réalisée en 2010 (**Berkane et Zian, 2010**) ont fait l'objet d'une caractérisation de leur mécanisme de résistance vis-à-vis des quinolones.

III.1. Identification Bactérienne

Les résultats de l'identification biochimique par galeries API20E des 42 souches isolées, ont révélé (Figure 12) la présence de 34 souches de *E. coli* (80.95%), 4 souches de *K.pneumoniae* (9.52%), 3 souches de *K.oxytoca* (7.14%) et une souche de *Aeromonas hydrophila* (2.38%),

Ces résultats montrent la prédominance du genre *E.coli* par rapport aux autres coliformes.

Ces bactéries sont connues pour développer des résistances acquises aux quinolones (**Cambau, 1997**). La présence du genre *Klebsiella* a été observée dans l'eau traitée. Il est à noter que la présence d'un faux coliformes : *Aeromonas hydrophila* peut s'expliquer par sa résistance naturelle aux quinolones (**Cambau, 1997**).

La répartition des espèces en fonction de la nature de l'eau révèle :

- **Dans l'eau usée :** la majorité des bactéries sont des *E. coli* ($n=19$; 90,47%), suivi par une souche de *K.pneumoniae* ($n=1$; 4,76%) et une souche de *K.oxytoca* ($n=1$; 4,76%) (Figure 13).
- **Dans l'eau traitée :** de la même façon que les eaux usées, nous observons la prédominance de l'espèce *E. coli* ($n=15$, 71,42%), suivi par *K. pneumoniae* ($n=3$; 14,28%) et une souche de *K.oxytoca* ($n=2$; 9,52%) et en fin une souche d'*Aeromonas hydrophila* ($n=1$; 4,76%)(Figure 14).

D'après les résultats obtenus nous constatons une répartition uniforme des genres bactériens résistants à la ciprofloxacine retrouvés à l'entrée et à la sortie de la station d'épuration.

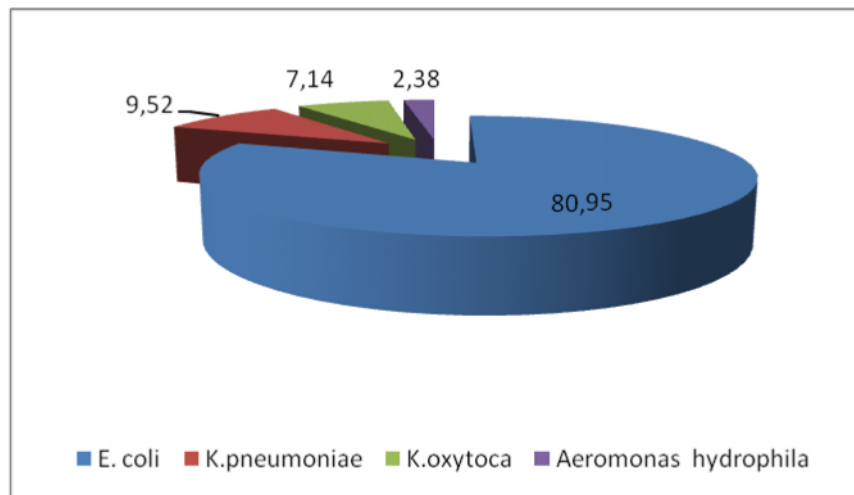


Figure 12: Répartition des 42 souches selon leur identité bactérienne

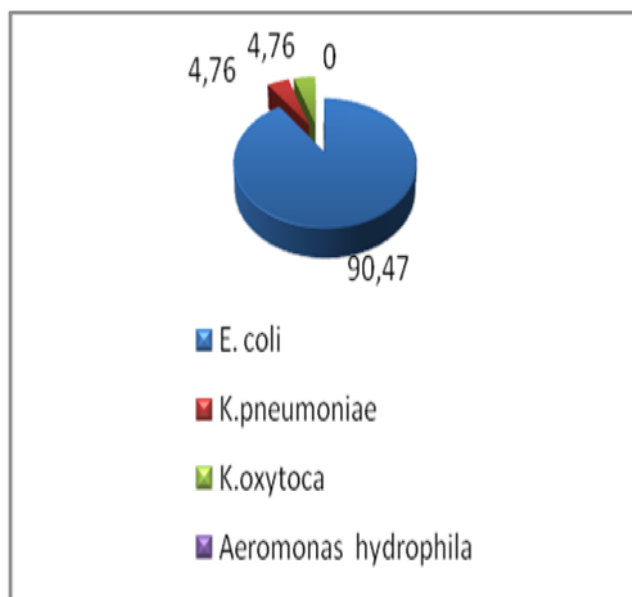


Figure 13 : Identification des 21 souches isolées à partir des eaux usées

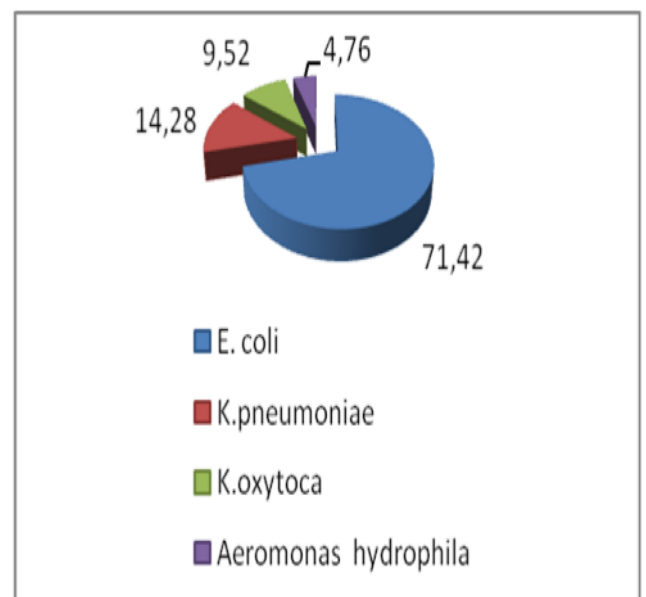


Figure 14 : Identification des 21 souches isolées à partir des eaux traitées

III.2. Résistance aux antibiotiques

La résistance de nos souches vis-à-vis de 21 antibiotiques dont 5 quinolones a été étudiée par la méthode de diffusion en milieu gélosé (*CA-SFM, 2010*). Les résultats sont illustrés dans les figures (15, 16,17).

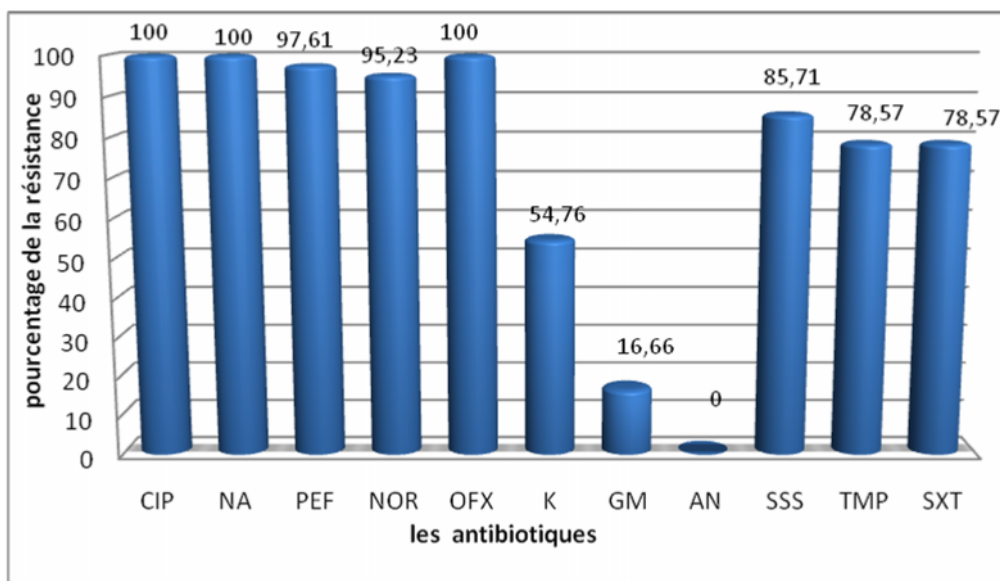


Figure 15 : Taux de résistance des 42 souches vis-à-vis des quinolones et autres familles d'antibiotiques.

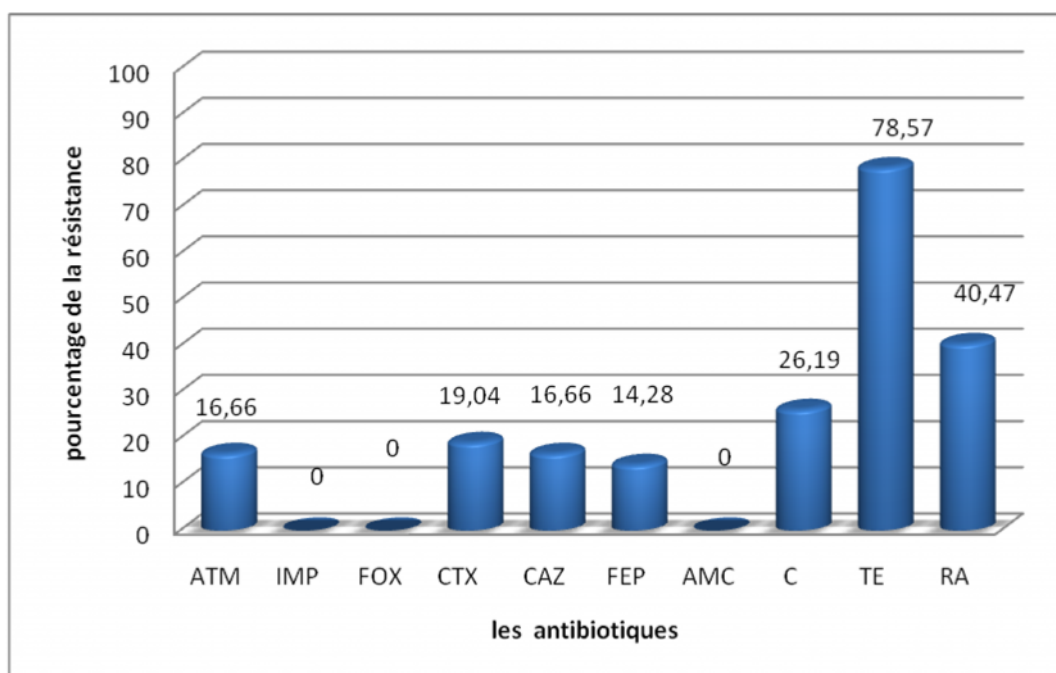


Figure 16 : Taux de résistance des 42 souches vis-à-vis autre des antibiotiques non-quinolones.

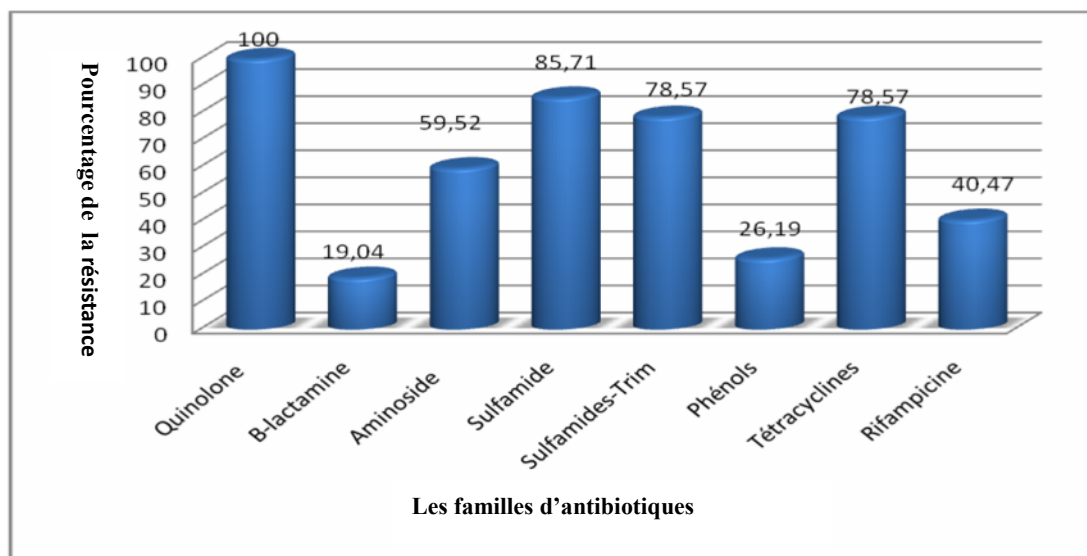


Figure 17 : pourcentage de la résistance selon les familles d'antibiotiques.

En ce qui concerne les quinolones un taux de résistance de 100% a été observé pour l'acide nalidixique, la ciprofloxacine et l'ofloxacine suivi d'un taux de résistance marqué pour la péfloxacine (97.61%) et la norfloxacine (95.23%). Ces résistances sont principalement de type acquis, qui apparait chez des bactéries jusqu'alors sensibles à cette famille d'antibiotique (**Cambau, 1997**). Cette résistance serait principalement due à des modifications représentées principalement par des mutations ou par acquisition de gènes de résistance (**RICE et BONOMO, 1996 ; Rodriguez-Martinez et al, 2010**).

En ce qui concerne les autres familles, nous observons une résistance associée au sulfamide (SSS : 85.71%), suivi du triméthoprim (TMP : 78.57 %), l'association sulfamide-Triméthoprim (SXT : 78.57 %) et les tétracyclines (TE : 78.75%). Le taux de résistance aux aminosides est moyen (59.52%), avec une résistance moyenne pour la kanamicine (K :54.76%), faible pour la gentamicine (GM :16.66%) et nulle pour l'amikacine (AN :0 %), qui reste la molécule la plus efficace dans cette famille. des taux de résistance de 40.47% et 26.19% ont été observé respectivement pour la rifampicine et le chloramphénicol.

Pour la famille des bêta-lactamines, nous avons noté un faible taux de résistance (19,04%). Cette résistance est représentée par 16,66 % pour CAZ, et de 16,66 % pour les monobactame ATM, et de 19,04%, 14,28% pour les céphalosporine 3^{eme} et 4^{eme} génération CTX, FEP, respectivement. Une sensibilité totale a été observée pour IMP, FOX et AMC. Ces résultats expliquent l'efficacité de cette famille d'antibiotique et montrent une résistance associée entre la résistance aux quinolones et certaines bêta-lactamines chez certaines souches, ce qui corrobore les données de la littérature (**Cambau, 1997**).

La comparaison des taux de résistance obtenus chez les souches isolées avant et après traitement nous permet de tirer les observations suivantes (Figure 18,19) :

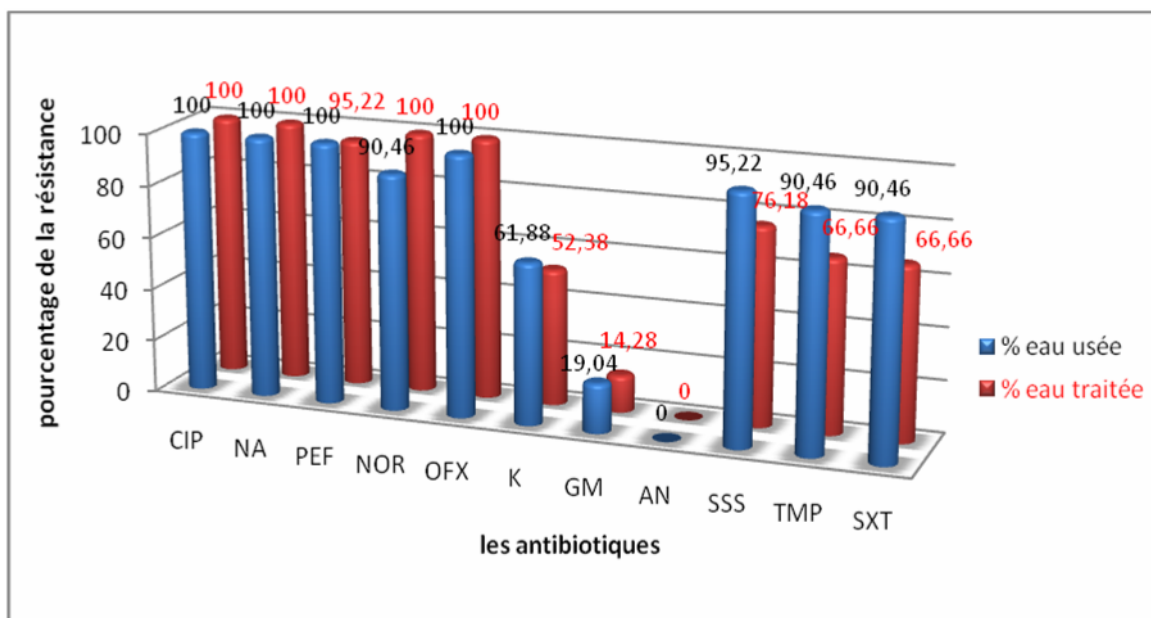


Figure 18 : Comparaison des taux de résistance aux quinolones et autres familles d'antibiotiques retrouvés dans l'eau usée et l'eau traitée.

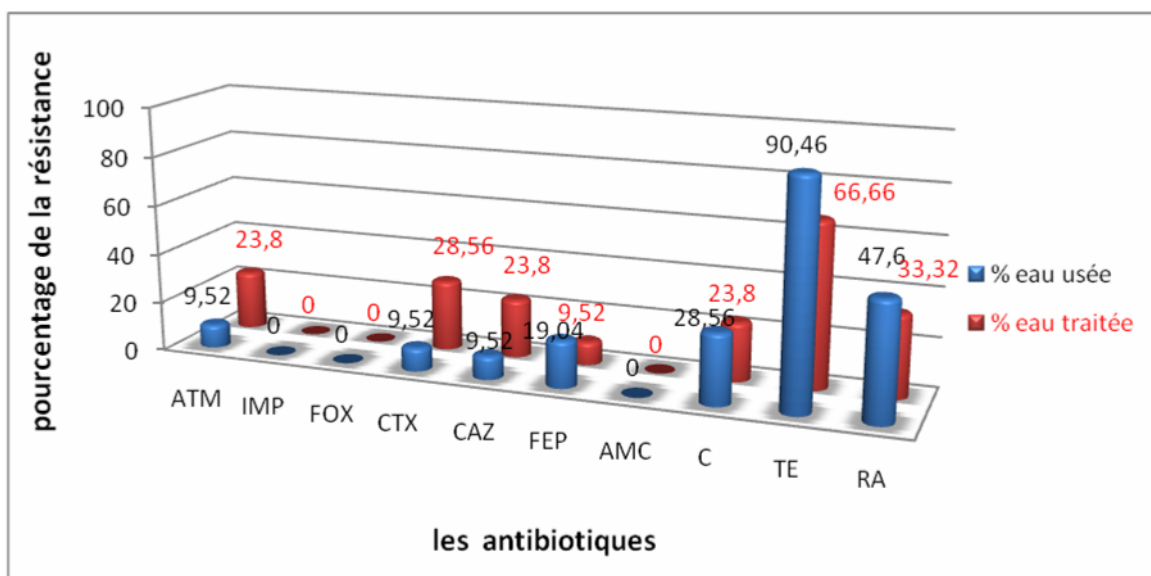


Figure 18 : Comparaison des taux de résistance aux antibiotiques non-quinolones retrouvés dans l'eau usée et l'eau traitée.

Pour l'eau usée

Un taux de résistance très élevé a été observé pour les cinq molécules de quinolone (CIP : 100%, NA : 100 %, OFX : 100%, PEF : 100%, NOR : 90,46%), suivi des sulfamides (SSS : 95,22%), trimethoprim (TMP : 90,46%), l'association trimethoprim- sulfamide (SXT :90.46%) et les tétracycline (TE : 90.46%). Un taux de résistance moyen est observé pour les aminosides (K : 61,88%, faible pour GM : 19.04%et nulle à AN: 0%), rifampicine (RA : 47.6%) et chloramphénicol (C : 28.56%).

Très faible taux de résistance a été observé pour l'ensemble des molécule de B-lactamines (ATM :9.52%,CTX :9.52%,CAZ :9.52%,FEP :19.04%) et nulle pour IMP ,FOX et AMC.

Pour l'eau traitée

Par comparaison aux résultats des eaux usées, nous observons des taux de résistance similaires pour les quinolones (CIP :100%,NA :100 %,OFX :100%, NOR : 100% et PEF : 95.22%), une légère baisse dans les taux de résistance aux aminosides (K :52.38%, GM :14.28%), chloramphénicol (C :23.8%) et rifampicine (RA :33.32%). Une baisse assez importante a été notée pour les sulfamides (76.18%), trimethprime (TMP : 66.66%), trimethoprim-sulfamides (SXT : 66.66%) et tétracycline (66.66%). Cependant, une augmentation des taux de résistance a été observée pour la famille des bêta-lactamines (ATM : 23,80%, CTX : 28,57%, CAZ : 23,80%) excepté pour la céfepime (FEP :9.52%).

L'analyse des profils de résistance révèle que les souches sont multi-résistantes allant de 3 à 5 quinolones et de 5 à 17 molécules d'antibiotiques repartit dans 22 antibiotypes différents. Ces profils se répartissent comme suit : 12 profils dans les eaux usées dont 4 qui se retrouvent dans l'eau traitée plus 10 nouveaux profils (Tableau 5).

Tableau 5: Profils d'antibioresistance des 42 souches résistantes au ciprofloxacine.

Souches		Antibiotype	N de		
			R	EF	ET
ET210	<i>K.oxytoca</i>	CIP NA PEF OFX NOR.	5	0	3
ET315 ET322	<i>E.coli</i>				
ET320	<i>Aeromonas hydrophila</i>	CIP OFX NOR SSS TE.	5	0	1
EF37	<i>E.coli</i>	CIP NA PEF OFX NOR RA.	6	1	0
ET38	<i>E.coli</i>	CIP NA PEF OFX NOR TE RA .	7	0	1
B39	<i>E.coli</i>	CIP NA PEF OFX NOR SSS TE RA	8	1	0
ET310	<i>E.coli</i>	CIP NA PEF OFX NOR SSS CTX TE.	8	0	1
EF31 B320 ET312 ET318	<i>E.coli</i>	CIP NA PEF OFX NOR SSS TMP SXT TE.	9	2	2
ET313	<i>E.coli</i>	CIP NA PEF OFX NOR K TMP SXT TE.	9	0	1
ET26A	<i>E.coli</i>	CIP NA PEF OFX NOR K SSS TE RA.	9	0	1
EF26	<i>E.coli</i>	CIP NA PEF OFX GM SSS TMP SXT C TE.	10	1	0
B314B	<i>E.coli</i>	CIP NA PEF OFX GM K SSS TMP SXT TE.	10	1	0
B314A B314C B316 B35 ET28	<i>E.coli</i>	CIP NA PEF OFX NOR K SSS TMP SXT TE.	10	4	1
B31 B36 B317	<i>E.coli</i>	CIP NA PEF OFX NOR SSS TMP SXT TE RA.	10	3	0
ET39 ET24	<i>E.coli</i>	CIP NA PEF OFX NOR SSS TMP SXT C TE.	10	0	2
EF33 B21 EF39 ET321 ET21	<i>E.coli</i>	CIP NA PEF OFX NOR K SSS TMP SXT C TE.	11	3	2
B321 B312 ET26	<i>E.coli</i>	CIP NA PEF OFX NOR K SSS TMP SXT TE RA.	11	2	1
B315	<i>E.coli</i>	CIP NA PEF OFX NOR K SSS TMP SXT C TE RA.	12	1	0
ET27	<i>K.pneumoniae</i>	CIP NA PEF OFX NOR K SSS TMP SXT ATM CTX CAZ TE.	13	0	1
EF21	<i>K.pneumoniae</i>	CIP NA PEF OFX NOR GM K SSS TMP SXT ATM CTX CAZ FEP RA.	15	1	0
ET34	<i>E.coli</i>	CIP NA PEF OFX NOR K SSS TMP SXT ATM CTX CAZ FEP C TE.	15	0	1
ET29 ET32 ET317	<i>K.oxytoca</i> <i>K.pneumoniae</i> <i>K.pneumoniae</i>	CIP NA PEF OFX NOR GM K SSS TMP SXT ATM CTX CAZ FEP RA.	15	0	3
B34	<i>K.oxytoca</i>	CIP NA PEF OFX NOR GM K SSS TMP SXT ATM CTX CAZ FEP C TE RA.	17	1	0

ET = eau traitée , EF= eau usée, N de R= nombre de résistance.

III.3.Caractérisation génétique de la résistance aux quinolones

Afin de déterminer les mécanismes responsables de la résistance aux quinolones, nous nous sommes intéressés dans cette étude à la recherche de deux mécanismes plasmidiques, il s'agit de la production des protéines Qnr (A, B, S) qui ont pour rôle de protéger la cible des quinolones « ADN gyrase » et d'un système d'efflux plasmidique nommé : QepA.

Les résultats ont révélé la présence du gène QnrB chez trois souches de *K.pneumoniae* (EF21, ET317, ET32) et le gène QnrS chez deux souches d'*E.coli* (B314B, B314C) (Figure 20, 21,22). En ce qui concerne la recherche du gène QepA, aucune souche n'a été positive (Figure 23).

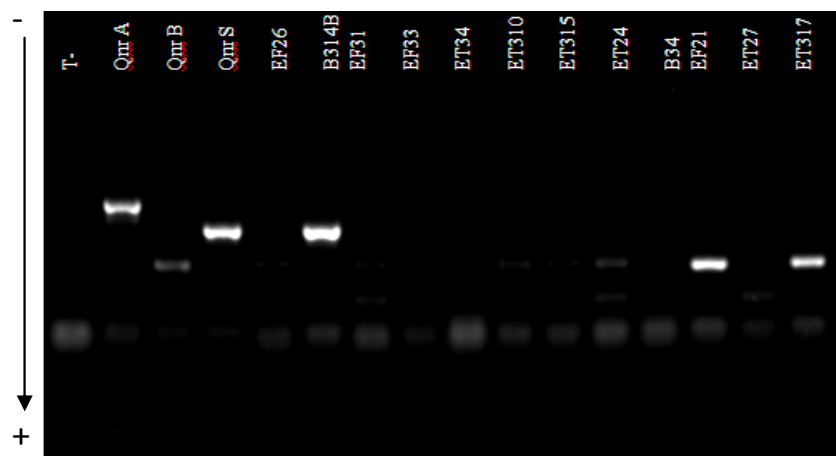


Figure 20: résultat de la recherche des gènes Qnr (A,B,S) par PCR- multiplexe.

T- : témoin négatif, Qnr A, B, S : témoin positif pour les gènes Qnr (A,B,S) avec des tailles respectives de 580, 264 et 428pb.

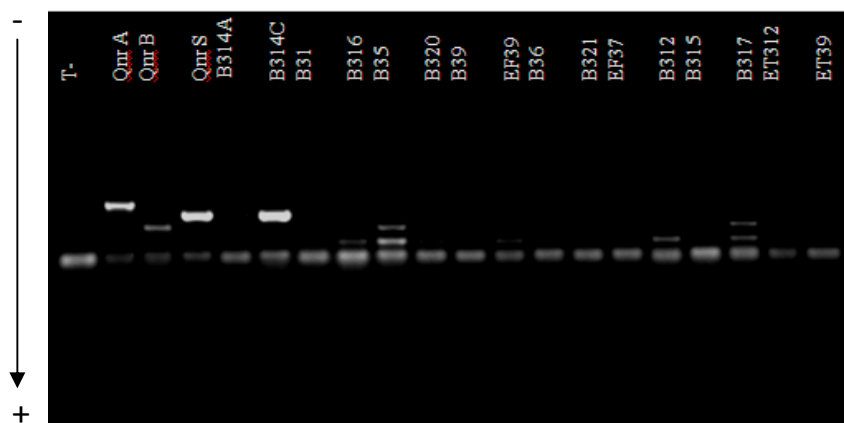


Figure 21 : résultat de la recherche des gènes Qnr (A, B, S) par PCR- multiplexe.

T- : témoin négatif, Qnr A, B, S : témoin positif pour les gènes Qnr (A, B, S) avec des tailles respectives de 580, 264 et 428pb.

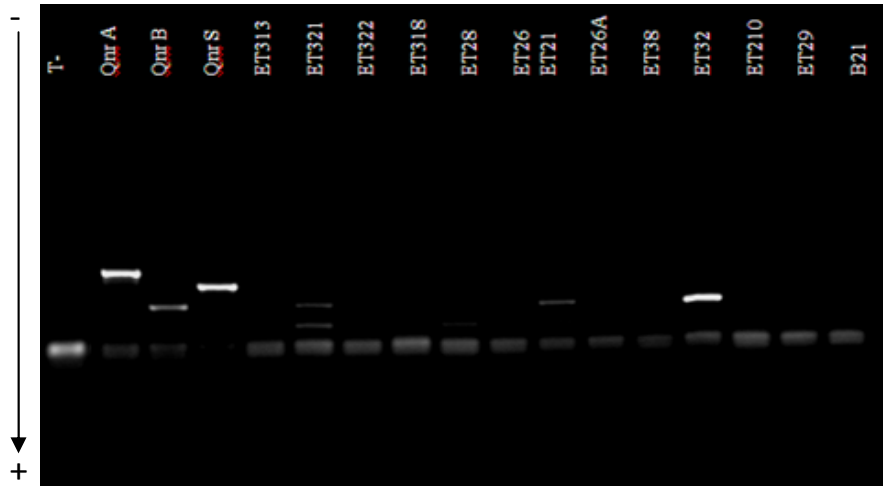


Figure 22 : résultat de la recherche des gènes Qnr (A, B, S) par PCR- multiplexe.

T- : témoin négatif, Qnr A, B, S : témoin positif pour les gène Qnr (A, B, S) avec des tailles respectives de 580, 264 et 428pb.

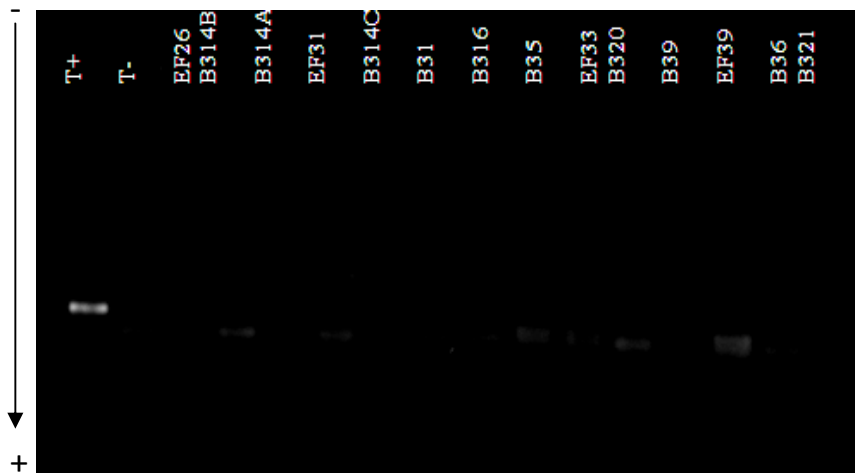


Figure 23 : illustration de la recherche du gène QepA par PCR.

T- : Témoin négatif, T+ : témoin positif (199pb).

Tableau 6 : Souches productrices des protéines Qnr.

Souches	identification	Résultat de PCR	Antibiotypes
EF21	<i>K.pneumoniae</i>	QnrB	CIP NA PEF OFX NOR GM K SSS TMP SXT ATM CTX CAZ FEP RA.
ET317	<i>K.pneumoniae</i>	QnrB	CIP NA PEF OFX NOR GM K SSS TMP SXT ATM CTX CAZ FEP RA.
ET32	<i>K.pneumoniae</i>	QnrB	CIP NA PEF OFX NOR GM K SSS TMP SXT ATM CTX CAZ FEP RA.
B314B	<i>E.coli</i>	QnrS	CIP NA PEF OFX GM K SSS TMP SXT TE.
B314C	<i>E.coli</i>	QnrS	CIP NA PEF OFX NOR K SSS TMP SXT TE.

III.4. la production d'une bêta-lactamases à spectre élargi

La recherche d'une association entre la résistance aux quinolones et la résistance aux bêta-lactamines par la production d'une bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE) a été effectuée par le test de synergie (DDS). Ce test a été positif pour huit souches parmi les 42 souches testées soit un taux de 19.04% (tableau 6, figure 24). Les souches productrices de BLSE ont été trouvées principalement dans l'eau traitée (2 *E. coli*, 3 *K.pneumoniae* et 1 *K.oxytoca*) alors que seulement deux BLSE+ ont été retrouvées dans l'eau usée (1 *K.pneumoniae*, 1 *K.oxytoca*). Ce résultat corrobore les données de la littérature qui rapportent que la production des BLSE est associée à la résistance aux quinolones principalement chez *K. pneumoniae* (**Iabadene et al, 2008, Berkane et Ziane, 2010**). De plus, les déterminants génétiques des Qnr B sont souvent portés par le même plasmide que celui qui code pour la BLSE (**Nordmann et Poirel, 2005, Iabadene et al, 2008**). Ce cas est vérifié chez trois souches de *K.pneumoniae* (EF21, ET317 et ET32).

Il est signalé que l'image de synergie observée chez *K. oxytoca* peut traduire la production de BLSE ou bien une hyperproduction d'une enzyme chromosomique OXY (Ca-SFM, 2010). Une caractérisation génétique de la BLSE peut clarifier la situation.

Tableau7: Les souches positives pour le test de synergie "DDS »

Souches	identification	Origine	Synergie
ET34	<i>E.coli</i>	Eau traitée	(CTX ,CAZ,FEP,ATM)
ET29	<i>K.oxytoca</i>	Eau traitée	(CTX ,CAZ,FEP,ATM)
ET27	<i>K.pneumoniae</i>	Eau traitée	(CTX ,CAZ,FEP,ATM)
ET32	<i>K.pneumoniae</i>	Eau traitée	(CTX ,CAZ,FEP,ATM)
ET317	<i>K.pneumoniae</i>	Eau traitée	(CTX ,CAZ,FEP,ATM)
ET310	<i>E.coli</i>	Eau traitée	(CTX ,CAZ,FEP,ATM)
B34	<i>K.oxytoca</i>	Eau use	(CTX ,CAZ,FEP,ATM)
EF21	<i>K.pneumoniae</i>	Eau use	(CTX ,CAZ,FEP,ATM)

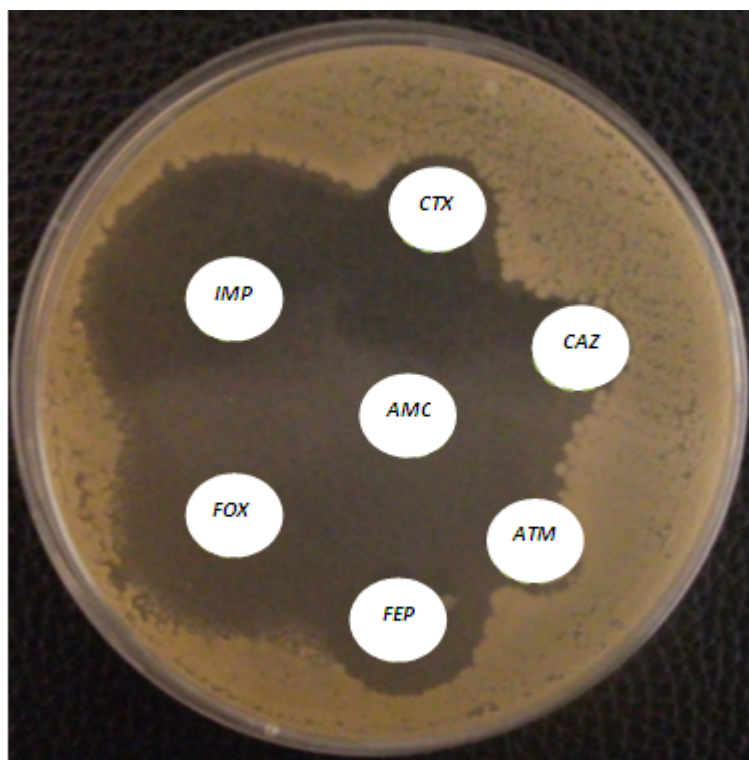


Figure 24: Illustrations de la production de BLSE par une souche résistante à la ciprofloxacine.

Noter l'augmentation du diamètre d'inhibition des antibiotiques CTX, CAZ, FEP, et ATM du côté de l'inhibiteur AMC.

III.5. Transfert génétique par conjugaison bactérienne

La détermination du support génétique et de la mobilité des gènes codants pour la résistance aux quinolones et ceux qui codent pour les BLSE a été réalisé par conjugaison bactérienne. Ce test n'a pas été concluant pour toutes les souches, ce qui pourrait s'expliquer par (Nordmann et Poirel,2005) :

- Les gènes QnrB, QnrS et celui qui code pour la BLSE sont portés par des plasmides non autotransférables, vue que leur origine plasmidique a largement été décrite
- La résistance aux quinolones est d'origine chromosomique.

Discussion

IV.DISCUSSION

La multi résistance bactérienne est un grand problème de santé publique, son apparition est commune dans les régions où les antibiotiques sont utilisés d'une manière abusive. Les bactéries résistantes peuvent être excrétées dans l'environnement et sont capables de disséminer leurs gènes de résistance. De plus, ces bactéries peuvent contaminer par la suite l'homme et l'animal *via* différents écosystèmes notamment l'eau, et la chaîne alimentaire (**Witte, 2000, Kummerer, 2004**). La station d'épuration des eaux usées est un intermédiaire entre l'environnement et le milieu aquatique. C'est un compartiment favorable à la dissémination des gènes de résistance et de virulence car les échanges génétiques à l'intérieur d'un biofilm étant favorisés (10 à 600 fois plus de transfert), le biofilm deviendrait propice à l'émergence de nouveaux pathogènes par l'acquisition des gènes de résistances, de facteurs de virulence et de capacités à la survie environnementale (**Watnick et al., 2000**). Plusieurs études ont été réalisées afin d'évaluer et de caractériser la nature de la résistance bactérienne aux différentes familles d'antibiotiques pendant la période de traitements de l'eau. (**Guardabassi et al, 2002 ; Zhang et al, 2009, Lastours et Fantin 2010**).

Le but de cette étude a été d'évaluer et de caractériser les mécanismes génétiques de la résistance aux quinolones retrouvés chez 42 coliformes isolées à partir des eaux usées avant et après traitement au niveau de la station d'épuration de Boumerdes. L'identification bactérienne a révélé la prédominance de l'espèce *E.coli* suivi de *K.pneumoniae* et *K.oxytoca*. Cette résistance de type acquis serait principalement due à (**Rodriguez-Martinez et al,2010**) :

- des mutations dans les gènes de la topoisomérase.
- la production des protéines protectrices Qnr.
- la présence de l'acétylase particulière : AAC (6')Ib-cr.
- l'imperméabilité ou le système d'efflux.

L'évaluation de la résistance aux antibiotiques montre une résistance associée au sulfamides, trimethoprime, sulfamide-trimethoprime et tétracycline. Cette association a été décrite dans plusieurs travaux (**Cambau, 1997**). Une résistance moyenne à faible a été observée pour les aminosides et les bêta-lactamines.

Durant le processus du traitement des eaux résiduaires, les changements qualitatifs et quantitatifs se produisent dans la distribution de la population bactérienne.

Généralement, le traitement entraîne une réduction marquée du nombre des bactéries, y compris les bactéries résistantes (**Guardabassi et al., 2002**).

Cependant, quelques études suggèrent que les populations résistantes et les populations Sensibles ne sont pas affectées de la même manière. Bell et al, (1983) *in* **Guardabassi et al., 2002** a constaté que le pourcentage des coliformes et des coliformes fécaux portant les gènes de résistances transmissibles était plus élevé dans les eaux d'égout traitées comparé aux eaux d'égout brutes. De même, plusieurs travaux ont rapporté une augmentation du pourcentage des coliformes multi- résistants après un traitement mécanique et biologique des eaux usées (**Guardabassi., 2002, Zhang et al., 2009**). Dans notre étude, les taux de résistance retrouvés dans l'eau traitée restent globalement les même ou légèrement plus faibles pour les quinolones, aminosides, chloramphénicol et rifampicine. Une diminution des taux de résistance pour les sulfamides, trimethoprime, association trimethoprime-sulfamides et tétracyclines. Cependant, une augmentation des taux des résistances aux bêta-lactamines a été observée. Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Guardabassi et al, (2002)** mais contradictoire avec les travaux de **Zhang et al (2009)** et ceux de **Berkane et Ziane (2010)**.

Ces résultats nous amènent à la conclusion que le traitement influe différemment sur la résistance aux antibiotique selon le type des bactéries et la nature de la molécule d'antibiotique (**Novo et Manaia, 2010**).

La caractérisation moléculaire de la résistance aux quinolones a révélé la présence du gène QnrB chez trois *Klebsiella* et du gène QnrS chez deux *E.coli* avec absence du gène QepA. Des résultats similaires ont été retrouvés chez des souches cliniques isolées des hôpitaux d'Alger, il s'agit de Qnr S1, QnrB1 et Qnr B4 (**Iabadene, 2008**).

En ce qui concerne QepA, sa présence a été détectée seulement en Belgique et au Japon (**Rodriguez-Martinez et al, 2010**). Pour les souches restantes le mécanisme suspecté est les mutations au niveau des topoisomérases et/ou la présence de l'enzyme AAC (6')Ib-cr, car c'est le mécanisme le plus fréquent chez *E.coli* (**Cambau, 1997**).

Il est à noter que les protéines Qnr ne confèrent pas un niveau très important de résistance aux quinolones mais permettent la sélection des souches résistantes. Ces protéines sont généralement associées à des mutations chromosomiques dans les topoisomérases afin de conférer un taux de résistance important (**Cambau, 1997**).

La recherche d'une association entre la résistance aux quinolones et la production de bêta-lactamases à spectre élargi a été mise en évidence par un test de synergie. Ce dernier a été positif pour huit souches dont six retrouvées dans l'eau traitée. Cette association a déjà été décrites (**Ibadene et al, 2008**). De la même façon, nous avons recherché l'association de la production de BLSE et les gènes Qnr. Cette association a été retrouvée chez trois souches de *K.pneumoniae* et elle a déjà été décrite dans d'autre étude (**Nordmann et Poirel,2005, Ibadene et al, 2008**).

En fin, la détermination du support génétique de la résistance aux quinolones ainsi que la mobilité des gènes Qnr et BLSE a été effectuée par conjugaison bactérienne. Ce test n'a pas été concluant pour toutes les souches ce qui pourrait s'expliquer par (**Rodriguez-Martinez et al, 2010**) :

- un support chromosomique pour la résistance aux quinolones par mutation des gènes de la topoisomérase
- la présence des gènes Qnr et BLSE sur des plasmides non autotransférables.

D'après cette étude nous avons constaté que la station d'épuration joue un rôle dans la dissémination de la résistance et il existe trois facteurs qui contribuent à la dissémination de la résistance aux antibiotiques par la station d'épuration (**Novo et Maniaia, 2010**) :

- la présence des bactéries résistantes dans les eaux usées
- l'efficacité du procédé de traitement dans l'élimination des bactéries résistantes
- l'augmentation ou la diminution des taux de résistance après traitement qui dépendent du type bactérien et des groupes d'antibiotiques.

Conclusion

IV. Conclusion

Le but de cette étude a été d'évaluer et de caractériser les mécanismes génétiques de la résistance aux quinolones retrouvés chez 42 coliformes isolés à partir des eaux usées avant et après traitement au niveau de la station d'épuration de Boumerdes. Les principaux résultats obtenus lors de cette étude sont :

- La résistance aux quinolones est associée à la résistance aux sulfamides, triméthoprime, sulfamide-triméthoprime et tétracycline. Chez certaines souches nous avons observé une résistance associée aux aminosides et aux bêta-lactamines.
- Le traitement biologique ne favorise pas l'augmentation de la résistance aux antibiotiques chez les souches ciprofloxacine-résistantes, sauf pour les molécules de bêta-lactamines spécialement : Aztréonam ATM : 23,80%, Céfotaxime CTX : 28,57%, Ceftazidime CAZ : 23,80%.
- La caractérisation génétique de la résistance a montré la présence du gène QnrB chez trois *K.pneumoniae* et du gène QnrS chez deux *E.coli*, probablement associés à des mutations chromosomiques. Ces gènes sont similaires à ceux retrouvés en clinique.
- l'association de la production de BLSE avec la résistance aux quinolones a été mise en évidence chez huit souches dont trois possédants en plus le gène QnrB.
- Les gènes Qnr et BLSE ont été trouvés non autotransférables.

D'après les résultats obtenus nous avons constaté que la résistance aux quinolones est présente dans les eaux usées, mais elle n'est pas accentuée par le traitement, contrairement à ce qui a été trouvé pour les bêta-lactamines (Berkane et Ziane, 2010).

Donc, le traitement biologique appliqué au niveau de la station influe différemment sur la résistance aux antibiotiques selon le type des bactéries et la nature de la molécule d'antibiotique.

Ces résultats soulignent la nécessité de maintenir la surveillance de la résistance aux antibiotiques et suivre l'émergence des souches multi-résistantes qui pourraient éventuellement passer dans la chaîne alimentaire. Cependant, afin d'éviter cette émergence, il faudrait tendre vers une utilisation raisonnée des antibiotiques.

En perspective, il serait intéressant de :

- compléter la caractérisation de ces résistances par la détermination des mutations dans les topoisomérases et de rechercher les autres gènes de résistance.
- déterminer le support génétique de cette résistance afin de comprendre la dissémination de la résistance.
- Faire un suivi de l'évaluation de la résistance au niveau de la station d'épuration afin de proposer d'autres traitements complémentaires et réglementer la réutilisation de ces eaux traitées spécialement en agriculture.
 - étudier en aval l'impact de ces rejets sur l'écosystème aquatique
 - Evaluer la résistance au niveau d'autres stations d'épuration.

Bibliographies

Bibliographies

A

Aminot A., Chaussepied M., 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu marin. Centre National pour l'Exploitation des Océans (CNEXO).

B

Badia-Gondard F., 2003. L'assainissement des eaux usées, Edition Techni-Cites, Voiron, 2003

Barthe C., Perron J., 1994. Guide d'interprétation des paramètres microbiologiques d'intérêt dans le domaine de l'eau potable. Document de travail (version préliminaire), ministère de l'Environnement du Québec, 155 p.

Berkane D., Zian B., 2010. Effet du traitement sur la résistance aux antibiotiques au niveau d'une station d'épuration de Boumerdes. Mémoire. Ingéniorat en environnement, ENSSMAL.

Bonot S., 2010. Persistance et dissémination du plasmide, vecteur de gènes de résistance aux antibiotiques, dans des biomasses issues de stations d'épuration d'eaux usées urbaines. these.doctorat. Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement). p225

C

Cambau E., 1997. Résistance bactérienne aux quinolones *in* Antibiotiques. Médecine Thérapeutique. Hors série n°1 : 98-107.

Cardot c., 1999. Génie de l'environnement : les traitements de l'eau Ellipses Edition Marketing S.A. Paris. ISBN 2-7298-5981-0. p 345.

CA-SFM, 2010. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, recommandation 2010. <http://www.sfm.asso.fr>

Cattoir V., Poir L., Rotimt V., Soussy C.J., Nordmann P., 2007. Multiplex PCR for detection of plasmid mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL producing enterobacterial isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **60** (2), 394-397.

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

Courvalin P., Goldstein F., Filippon A et Sirot J., 1985. L'antibiogramme, 1^{ère} édition. MCP édition, Paris.

D

Degremont., 1989. Memento technique de l'eau : vol. 1, 9^{ème} édition. Edition Technique et Documentation Lavoisier. p 592.

Direction de l'office national d'assainissement(ONA). Localisation géographique de la station d'épurations en Algérie.

Dubnau D., 1999. DNA uptake in bacteria, *Annual Revue of Microbiology*, 53:217-244.

F

Ferech M., Coenen S., Malhotra-Kumar S., Dvorakova K., Hendrickx E., Suetens C., 2006. European surveillance of antimicrobial consumption outpatient antibiotic use in Europe, *Antimicrobial Chemotherapy*, 10:1093.

Fluit A.C., Schmitz F.J., 2004, Resistance integrons and superintegrons, *Clinical Microbiology and Infection*, 10:272-288.

G

Galimand M., Sabtcheva S., Courvalin P., Lambert T., 2005, Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 49:2949-2953.

Gaujous D., 1995. La pollution des milieux aquatiques : aide-mémoire. Edition Technique et Documentation Lavoisier. 220p.

Göbel A., Thomsen A., McArdell C., Joss A., Giger W., 2005, Occurrence and sorption behaviour of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in activated sludge treatment, *Environmental Science and Technology*, 39:3981- 3989.

Google Earth 2011, Site officiel (<http://earth.google.com/>) .

Guardabassi L, Danilo M.A. Lo Fo Wong, Dalsgaard A., 2002. The effects of tertiary wastewater treatment on the prevalence of antimicrobial resistant bacteria. *Water Research*, 36: 1955–1964.

Griffiths, Miller, Suzuki, Lewontin, Gelbart., 1997, Introduction à l'analyse génétique, DeBoeck Université, Torino, 298-304.

H

Hirsch R., Ternes T., Haberer K., Kratz K.L., 1999, Occurrence of antibiotics in the aquatic environment, *The Science of the Total Environment*, 225:109-118.

Hooper, D., 2002. Fluoroquinolone résistance among gram-positive cocci. *Lancet Infect Dis* 2 (9), 530-538.

J

Jarlier, V., Nicolas M, Fournier G et Philippon A., 1988. Extended broad- spectrum β -lactamases conferring transférable résistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Revue. Infection. Des.* 4: 143-149.

Joss A., Keller E., Alder A.C., Göbel A., McArdell C.S., Ternes T., Siegrist H., 2005, Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment, *Water Research*, 39:3139-3152.

Journal Officiel de la République Algérienne (JORA). N°26, Avril 2006.

K

Kümmerer K., Al-Ahmad A., Mersch-Sander mann V., 2000. Biodegradability of some antibiotics, elimination of the neotoxicity, and affection of wastewater bacteria in simple test, *Chemosphere*, 40:701-710.

Kummerer K., 2004. Pharmaceuticals in the environment. Sources, fate, effects and risks. (2Ed.), Springer-Verlag, Berlin, 567 p.

L

Iabadene H., Messai Y., Ammari H., Ramdani-Bouguessa N, Lounes S., Bakour R and Arlet G., 2008. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2008) 62, 133–136.

Lastours V., Fantin B., 2010. Résistance aux fluoroquinolones en 2010 .*Elsevier Masson SAS.* (2010) 19, 347—353.

M

Menif B, Namdari F., 2007. resistance plasmidique aux quinolones master 2.

Mazel D., 2006, Intégrons: agents of bacterial évolution, *Nature Reviews Microbiology*, 4:608-620.

N

Novo A., Manaia C. M., 2010. Factors influencing antibiotic resistance burden in municipal wastewater treatment plants *Appl Microbiol Biotechnol* (2010) 87:1157–1166.

O

OMS., 2000. Bureau régional de l’OMS pour l’Europe.

P

Poirel L., Nordmann P .,2005. Further identification of plasmidmediated quinolone resistance determinant in Enterobacteriaceae, in Turkey. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2146-7.

Prescott L.M.,Harly J.P.,kelin D.A.,2002. *Microbiologie .2^{eme} Edition française* 1164p.

Payot S., Cloeckaert A., Chaslus-Dancla E., 2002. *Microb. Drug Resist.*, 4, sous presse.
Webber M., Piddock L.J.V., 2001, *Vet. Res.*, 32, 275-284.

R

Raphael D.,2003. Devenir dans l'environnement dulcaquicole de l'oxytetracycline, l'acide oxolinique et la umequine, antibiotiques utilises en therapeutique piscicole. these .doctorat. Universite de Nantes.(Faculte des Sciences et Techniques).

RezigA.,Oueld-amarY.,2010. contrôler des paramètres chimiques et physico-chimiques des eaux usées avant et après traitement au niveau de la STEP de Boumerdes .Mémoire. D.E.U.A., ENSSMAL. P4.

Rice L.B., Bonomo R.A., 1996. Genetic and biochemical mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. In: *Antibiotics in laboratory medicine* (Ed.: V. Lorian). Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md. pp. 453-501 (1996).

Rodier J., Bazin C., Chambon P., Broutin J.-P., Champsaud H., Rodi L., 1995. Analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer. Edition DUNOD, 1983p.

Rodriguez-Martinez J.M., Eliecer Cano M., Velasco C., Martinez-Martinez L., Pascual A., 2010. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update 2010 *J Infect Chemother* .DOI 10.1007/s10156-010-0120-2.

S

Sambrook J., Fritsh E.F. and Maniatis.T., 1989. Moleculas cloning : a laboratery manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.N.Y.11p.

Stéphanie F., 2009. Transfert d'un gène de résistance aux β -lactamines *bla*CTX-M-9 entre *Salmonella* et les entérobactéries de la flore intestinale humaine : impact d'une antibiothérapie thèse .doctorat. Docteur de l'université de rennes 1.(Science de la vie et de l'environnement).

T

Ternes T.A., Janex-Habibi M-L., Knacker T., Kreuzinger N., Siegrist H., 2004, Assessment of technologies for the removal of pharmaceuticals and personal care products in sewage and drinking water facilities to improve the indirect potable water reuse, POSEIDON, 58pp, en ligne: <http://www.euposeidon.com>.

TILLOTSON G S.,1996. Quinolones: structure-activity relationships and future prédictions. *J. Med. Microbiol.* - Vol. 44 (1996), 320-324.

V

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

Vilagines R., 2003. Eau, environnement et santé publique. 2ème édition. Edition Technique et Documentation Lavoisier. 190p.

Y

Yamane K., Wachino J., Suzuki S., Arakawa Y., 2008. Plasmidmediated *qepA* gène among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52** (4), 1564-1566.

W

Watnick P., Kolter R.,2000. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* 182: 2675-9.

Witte, W. (2000). Selective pressure by antibiotic use in livestock. *Int. J. Antimicrob. Agents* **16**: S19-S24.

Z

Zaneveld J.R., Nemergut D.R., Knight R., 2008, Are all horizontal gène transfers createdequal Prospects for mécanisme-based studies of HGT patterns, *Microbiology*,154:115.

Zhang Y., Carl F.M., Carl S et Chuanwu Xi., 2009. Wastewater treatment contributes to selective increase of antibiotic resistance among *Acinetobacter spp.* (Science of the Total Environment).**407**:3702–3706.

Annexe

Tableau 1 : lecture de galerie Api 20E

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
ONPG	2-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0,223	β-galactosidase (Ortho NitroPhényl-βD-Galactopyranosidase)	incolore	jaune (1)
<u>ADH</u>	L-arginine	1,9	Arginine DiHydrolase	jaune	rouge / orangé (2)
<u>LDC</u>	L-lysine	1,9	Lysine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé (2)
<u>ODC</u>	L-ornithine	1,9	Ornithine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé (2)
<u>CIT</u>	trisodium citrate	0,756	utilisation du CITrate	vert pâle / jaune	bleu-vert / bleu (3)
<u>H₂S</u>	sodium thiosulfate	0,075	production d'H ₂ S	incolore / grisâtre	dépôt noir / fin liseré
<u>URE</u>	urée	0,76	UREase	jaune	rouge / orangé (2)
TDA	L-tryptophane	0,38	Tryptophane DésAminase	<u>TDA / immédiat</u>	
				jaune	marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane	0,19	production d'INDole	<u>JAMES / immédiat</u>	
				incolore vert pâle / jaune	rose
<u>VP</u>	sodium pyruvate	1,9	production d'acétoïne (Voges Proskauer)	<u>VP 1 + VP 2 / 10 min</u>	
				incolore	rose / rouge (5)
<u>GEL</u>	gélatine (origine bovine)	0,6	Gélatinase (GELatine)	non diffusion	diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	1,9	fermentation / oxydation (GLUcose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune / jaune gris
MAN	D-mannitol	1,9	fermentation / oxydation (MANnitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
INO	inositol	1,9	fermentation / oxydation (INOsitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
SOR	D-sorbitol	1,9	fermentation / oxydation (SORbitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
RHA	L-rhamnose	1,9	fermentation / oxydation (RHAmnose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
SAC	D-saccharose	1,9	fermentation / oxydation (SACcharose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
MEL	D-melibiose	1,9	fermentation / oxydation (MELibiose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
AMY	amygdaline	0,57	fermentation / oxydation (AMYgdaline) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
ARA	L-arabinose	1,9	fermentation / oxydation (ARABinose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
OX	(voir notice du test oxydase)		cytochrome-OXYdase	(voir notice du test oxydase)	

Tableau 2: résultats de l'identification bactérienne selon les échantillons

Les souches	Eau traitée	Eau use	Nombre totale	(%) n total	%(ET)/21	%(EF)/21
<u>E. coli</u>	15	19	34	80,95	71,42	90,47
<u>K.pneumoniae</u>	3	1	4	9,52	14,28	4,76
<u>K.oxytoca</u>	2	1	3	7,14	9,52	4,76
<u>Aeromonas hydrophila</u>	1	0	1	2,38	4,76	0
<u>Le nombre totale</u>	21	21	42	100	100	100

Tableau 3: les taux de la résistance des souches bactériennes

antibiotique	nombre des souches	%R
CIP	42	100
NA	42	100
PEF	41	97,61
NOR	40	95,23
OFX	42	100
K	24	54,76
GM	7	16,66
AN	0	0
SSS	36	85,71
TMP	33	78,57
SXT	33	78,57
ATM	7	16,66
IMP	0	0
FOX	0	0
CTX	8	19,04
CAZ	7	16,66
FEP	6	14,28
AMC	0	0
C	11	26,19
TE	33	78,57
RA	17	40,47

Tableau 4: les taux de la résistance des souches bactériennes par apport à l'eau traitée et l'eau usée

antibiotique	Eau traitée (%/21)		Eau usée (%/21)	
CIP	21	(100%)	21	(100%)
NA	21	(100%)	21	(100%)
PEF	20	(95,22%)	21	(100%)
NOR	21	(100%)	19	(90,46%)
OFX	21	(100%)	21	(100%)
K	11	(52,38%)	13	(61,88%)
GM	3	(14,28%)	4	(19,04%)
AN	0	(0%)	0	(0%)
SSS	16	(76,18%)	20	(95,22%)
TMP	14	(66,66%)	19	(90,46%)
SXT	14	(66,66%)	19	(90,46%)
ATM	5	(23,80%)	2	(9,52%)
IMP	0	(0%)	0	(0%)
FOX	0	(0%)	0	(0%)
CTX	6	(28,57%)	2	(9,52%)
CAZ	5	(23,8%)	2	(9,52%)
FEP	2	(9,52%)	4	(19,04%)
AMC	0	(0%)	0	(0%)
C	5	(23,8%)	6	(28,56%)
TE	14	(66,66%)	19	(90,46%)
RA	7	(33,32%)	10	(47,6%)

Tableau 5 : antibiogramme des souches selectionnés

Nom de souche	identification	Antibiogramme																				
		CTX [23,26]	CAZ [19,26]	ATM [21,27]	FEP [17,24]	FOX [15,22]	IMP [17,24]	AMC [16,19]	NA [15,20]	CIP [22,25]	PEF [16,22]	OFX [22,25]	NOR [22,25]	GM [16,18]	K [15,17]	AN [15,17]	SSS [12,17]	SXT [13,16]	TMP [13,16]	TE [17,19]	RA [14,19]	C [23,23]
EF26	<i>E.coli</i>	S	36 S	40 S	S	S	S	S	0 R	16 R	13 R	7 R	27 S	0 R	27 S	27 S	0 R	0 R	0 R	0 R	23 S	8 R
B314B	<i>E.coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	0 R	14 R	11 R	11 R	25 I	0 R	0 R	25 S	0 R	0 R	0 R	8 R	16 I	28 S
ET34	<i>E.coli</i>	0 R	16 R	15 R	16 R	22 I	>40 S	S	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	25 S	0 R	22 S	0 R	0 R	0 R	0 R	15 I	11 R
B314A	<i>E.coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	0 R	13 R	11 R	12 R	10 R	27 S	0 R	26 S	0 R	0 R	0 R	7 R	15 I	25 S
EF31	<i>E.coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	0 R	0 R	0 R	8 R	0 R	26 S	23 S	25 S	0 R	0 R	0 R	9 R	18 I	29 S
B314C	<i>E.coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	0 R	12 R	8 R	8 R	8 R	26 S	0 R	25 S	0 R	0 R	0 R	9 R	15 I	29 S
B31	<i>E.coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	0 R	0 R	0 R	8 R	0 R	25 S	25 S	24 S	0 R	0 R	0 R	8 R	12 R	30 S
ET29	<i>K.oxytoca</i>	0 R	0 R	0 R	14 R	28 S	36 S	38 S	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	16 I	0 R	0 R	0 R	26 S	0 R	24 S
B316	<i>E.coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	0 R	0 R	0 R	8 R	0 R	27 S	0 R	27 S	0 R	0 R	0 R	9 R	18 I	30 S
ET27	<i>K.pneumoniae</i>	11 R	14 R	16 R	19 I	30 S	36 S	S	0 R	0 R	0 R	12 R	0 R	22 S	0 R	17 I	0 R	0 R	0 R	0 R	17 I	28 S
ET32	<i>K.pneumoniae</i>	0 R	0 R	0 R	14 R	26 S	35 S	S	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	17 I	0 R	0 R	0 R	26 S	0 R	28 S
B35	<i>E.coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	0 R	12 R	0 R	10 R	0 R	23 S	0 R	22 S	0 R	0 R	0 R	0 R	19 I	29 S
EF33	<i>E.coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	0 R	0 R	0 R	8 R	0 R	25 S	0 R	25 S	0 R	0 R	0 R	0 R	15 I	22 R

B320	<i>E.coli</i>	34 S	32 S	37 S	35 S	27 S	>30 S		0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	26 S	24 S	25 S	0 R	0 R	0 R	0 R	16 I	26 S
ET312	<i>E.coli</i>					33 S			0 R	0 R	0 R	8 R	0 R	25 S	24 S	24 S	0 R	0 R	0 R	9 R	20 S	30 S
ET315	<i>E.coli</i>				39 S	33 S			0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	28 S	25 S	26 S	25 S	32 S		31 S	18 I	26 S
ET39	<i>E.coli</i>		34 S	40 S	36 S	32 S			0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	26 S	22 S	25 S	0 R	0 R	0 R	0 R	15 I	0 R
ET313	<i>E.coli</i>								0 R	12 R	0 R	11 R	0 R	27 S	0 R	28 S	23 S	0 R	0 R	8 R	19 I	30 S
ET317	<i>K.pneumoniae</i>	0 R	0 R	0 R	15 R	31 S	35 S		0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	19 S	0 R	0 R	0 R	26 S	0 R	29 S
ET321	<i>E.coli</i>	40 S	33 S	40 S	37 S	30 S	36 S		0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	25 S	0 R	25 S	0 R	0 R	0 R	0 R	17 I	0 R
ET320	<i>Aeromonas hydrophila</i>	37 S	29 S	37 S	33 S				0 R	16 R	18 I	19 R	0 R	25 S	25 S	25 S	0 R	14 I	16 I	8 I	20 S	30 S
B39	<i>E.coli</i>		25 S			32 S	38 S		0 R	12 R	0 R	12 R	0 R	23 S	20 S	22 S	0 R	18 S	29 S	9 R	14 R	27 S
B21	<i>E.coli</i>								0 R	13 R	0 R	10 R	0 R	24 S	0 R	26 S	0 R	0 R	0 R	0 R	15 I	0 R
EF39	<i>E.coli</i>								0 R	15 R	0 R	13 R	0 R	26 S	0 R	25 S	0 R	0 R	0 R	8 R	17 I	11 R
ET24	<i>E.coli</i>								0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	26 S	24 S	24 S	0 R	0 R	0 R	0 R	15 I	0 R
ET322	<i>E.coli</i>					>30 S			0 R	0 R	0 R	8 R	0 R	24 S	24 S	24 S	30 S	32 S		29 S	19 I	30 S
ET318	<i>E.coli</i>								0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	25 S	22 S	25 S	0 R	0 R	0 R	7 R	18 I	30 S
ET310	<i>E.coli</i>	18 R	27 S	26 S	25 S	31 S	37 S		0 R	0 R	0 R	8 R	0 R	24 S	23 S	26 S	0 R	22 S	30 S	7 R	16 I	27 S
ET28	<i>E.coli</i>								0 R	11 R	0 R	11 R	0 R	24 S	0 R	24 S	0 R	0 R	0 R	8 R	20 S	32 S

ET210	<i>K.oxytica</i>	40 S	30 S	35 S	S	32 S	38 S	S	0 R	20 R	15 R	20 R	11 R	27 S	25 S	28 S	23 S	33 S	S	30 S	17 I	33 S
ET26	<i>E.coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	24 S	0 R	25 S	0 R	0 R	0 R	0 R	14 R	25 S
ET21	<i>E.coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	0 R	12 R	0 R	10 R	0 R	25 S	0 R	25 S	0 R	0 R	0 R	0 R	16 I	0 R
ET26A	<i>E.coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	0 R	11 R	0 R	10 R	0 R	25 S	0 R	26 S	0 R	22 S	30 S	0 R	10 R	30 S
B36	<i>E.coli</i>	38 S	33 S	38 S	40 S	30 S	37 S	S	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	25 S	23 S	25 S	0 R	0 R	0 R	8 R	10 R	30 S
B321	<i>E.coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	0 R	12 R	0 R	9 R	0 R	25 S	0 R	24 S	0 R	0 R	0 R	7 R	9 R	30 S
B34	<i>K.oxytica</i>	0 R	0 R	0 R	14 R	28 S	35 S	S	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	17 I	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R
EF21	<i>K.pneumoniae</i>	0 R	0 R	0 R	14 R	26 S	33 S	S	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	16 I	0 R	0 R	0 R	25 S	0 R	27 S
ET38	<i>E.coli</i>	35 S	28 S	35 S	35 S	30 S	37 S	S	0 R	12 R	0 R	8 R	0 R	24 S	21 S	24 S	28 S	30 S	30 S	7 R	0 R	26 S
EF37	<i>E.coli</i>	39 S	32 S	36 S	>40 S	30 S	37 S	S	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	24 S	23 S	22 S	29 S	34 S	S	30 S	11 R	31 S
B312	<i>E.coli</i>	>40 S	33 S	S	S	S	S	S	0 R	12 R	0 R	10 R	0 R	26 S	0 R	26 S	0 R	0 R	0 R	8 R	9 R	30 S
B315	<i>E.coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	27 S	0 R	26 S	0 R	0 R	0 R	0 R	9 R	0 R
B317	<i>E.coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	28 S	24 S	25 S	0 R	0 R	0 R	9 R	8 R	33 S

Tableau 6: tableau d'identification des souches sélectionnés

REF	Tests																			Ident	Nom de la souche	
	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VIP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY			ARA
ET 3 9	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	1044572	<i>E.coli</i> id acceptable 86.2%
ET3 18	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	5144572	<i>E.coli</i> très bonne id 99.5%
EF2 1	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5215773	<i>K.pneumoniae</i> bonne id 97.6%
ET2 4	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	1044572	<i>E.coli</i> id acceptable 86.2%
B31 6	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	5104552	<i>E.coli</i> bonne id 93.7%
ET3 12	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	5144572	<i>E.coli</i> très bonne id 99.5%
B3 5	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	1044572	<i>E.coli</i> id acceptable 86.2%
ET2 9	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1255773	<i>K.oxytoca</i> bonne id 99%
B3 21	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	5144572	<i>E.coli</i> très bonne id 99.5%
EF3 7	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	5044572	<i>E.coli</i> Excellente id 99.9%
B34	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1254773	<i>K.oxytoca</i> bonne id 97.9%
B3 1	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	5144512	<i>E.coli</i> bonne id 98.1%
ET26A	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	5044572	<i>E.coli</i> Excellente id 99.9%
EF2 6	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	5144572	<i>E.coli</i> très bonne id 99.5%

B3 12	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	5144572	<i>E.coli</i> très bonne id 99.5%
B3 9	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	5044142	<i>E.coli</i> très bonne id 99.8%
ET3 21	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	5144572	<i>E.coli</i> très bonne id 99.5%
EF3 3	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	5044552	<i>E.coli</i> très bonne id 99.8%
ET2 1	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	5044152	<i>E.coli</i> bonne id 97.2%
ET3 17	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5215773	<i>K.pneumoniae</i> bonne id 97.6%
B3 15	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	5044552	<i>E.coli</i> 99.8% très bonne id genre
ET3 15	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	1044572	<i>E.coli</i> id acceptable 86.2%
ET3 20	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	3246127	<i>Aeromonas hydrophila</i> bonne id 97%
B3 20	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	5144572	<i>E.coli</i> très bonne id 99.5%
ET3 22	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	5044572	<i>E.coli</i> Excellente id 99.9%
ET2 6	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	1044572	<i>E.coli</i> id acceptable 86.2%
ET27	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5215773	<i>K.pneumoniae</i> bonne id 97.6%
B314A	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	5044552	<i>E.coli</i> très bonne id 99.8%
ET3 10	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	5044552	<i>E.coli</i> très bonne id 99.8%
B3 14c	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	5044552	<i>E.coli</i> très bonne id 99.8%
B314B	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	5044553	<i>E.coli</i> bonne id 94.7%

ET3 13	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	5144572	<i>E.coli</i> très bonne id 99.5%	
B3 17	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	5144572	<i>E.coli</i> très bonne id 99.5%	
EF3 1	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	5144512	<i>E.coli</i> bonne id 98.1%
EF3 9	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	5144572	<i>E.coli</i> très bonne id 99.5%	
B3 6	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	5144553	<i>E.coli</i> FD 66.9%
ET3 4	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	5144572	<i>E.coli</i> très bonne id 99.5%	
ET2 8	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	5044152	<i>E.coli</i> bonne id 97.2%
ET3 2	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5215773	<i>K.pneumoniae</i> bonne id 97.6%
B21	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	5044553	<i>E.coli</i> bonne id 94.7%
ET2 10	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	125577	<i>K.oxytoca</i> très bonne id 99%