

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
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

***Caractérisation des mécanismes de résistance aux
béta-lactamines chez des bactéries à Gram négatif
isolées des eaux usées et eaux traitées de la STEP de
BOUMERDES***

Présenté par :

- BELKAID Hamza
- KECIR Massinissa

Soutenu le 06 /07 /2013 devant le jury suivant :

M^{me} CHAOU N.	Maitre assistante A	Présidente (ENSSMAL)
M^{elle} ALOUACHE S.	Maitre de conférences B	Promotrice (ENSSMAL)
M^{me} AMAR I.	Maitre assistante A	Examinatrice (ENSSMAL)
M^{me} BOUFROUCHE F.	Maître assistante A	Examinatrice (USTHB)

Promotion : 2012/2013

Remerciements

Nous tenons en premier lieu à remercier « Allah » de nous avoir donné la force et le courage jusqu'à l'aboutissement de nos études, et l'accomplissement de ce modeste travail.

Nous tenons, tout particulièrement, à remercier notre promotrice M^{elle} ALOUACHE.S, Maitre de conférences B à l'ENSSMAL et membre du laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire (équipe de génétique) à USTHB, d'avoir accepté de nous encadrer, pour sa gentillesse, sa patience, son aide et ses suggestions qui ont été pour nous d'un grand apport.

Nos sincères remerciements s'adressent à M^{eme} CHAOU.N d'avoir fait l'honneur de présider le jury.

Un grand merci à M^{eme} AMAR I. Maître assistante de classe A à l'ENSSMAL et M^{eme} BOUFROUCHE F., maître assistante de classe A à l'USTHB d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous adressons aussi nos plus vifs remerciements à M^{eme} REFES N. et M^r MATOUK Y. qui nous ont apporté beaucoup d'aide durant notre stage pratique.

Nous n'oublions pas de remercier toutes les personnes au niveau de laboratoire de génétique à l'USTHB, qui nous ont tous si bien accueilli et aimablement aidé.

Nous remercions également A :

Nos parents, nos frères et sœurs pour leur soutien durant toutes ces années d'études.

A tous nos ami(e)s passés et présent, qui nous ont donné toute leur amitié et leur soutien et à tous nos enseignants que nous avons eus durant les années des études.

Merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste mémoire.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A mes chers parents de m'avoir donné l'aide et la confiance

A mes frères

A mes sœurs

A mes nièces et mes neveux

A mon binôme et sa famille

A tous mes amis

A tous les personnes qui m'ont soutenu et encouragé tout au long de cette année

Hamza

Dédicace

Je dédie ce travail :

A mes très, très chers parents

A mon frère

A tous mes proches sans oublier personne exclusivement mes grands parents

A mes chers amis, la liste est longue !!

A mon binôme qui m'a bien supporter

Ainsi qu'à toute personne qui s'intéresse au bien être de l'environnement.

Massinissa

Liste des figures

Figure 1: Représentation des quatre principales classes de β -lactamines obtenues par substitution ou fixation d'hétérocycles à partir du noyau β -lactame	10
Figure 2: mécanisme d'action des bêta-lactamines	11
Figure 3: Imperméabilité par : nombre de porines- altération des porines	12
Figure 4: Interférence avec le mécanisme de transport de type efflux	13
Figure 5: Modification d'affinité de la cible	14
Figure 6: Inactivation enzymatique des β -lactamines	14
Figure 7: Hydrolyse enzymatique de la β -lactamines	15
Figure 8: Photo satellitaire de la station d'épuration de BOUMERDES... ..	21
Figure 9: Schéma générale de la station d'épuration de BOUMERDES.....	21
Figure 10 : Schéma de la disposition des antibiotiques.....	24
Figure 11 : répartition des 23 souches résistantes à l'imipénème selon leur identité bactérienne.....	28
Figure 12: Répartition des 14 souches résistantes à l'imipénème isolées à partir des eaux usées de la STEP selon leur identification.....	29
Figure 13: Répartition des 9 souches résistantes à l'imipénème isolées à partir des eaux traitées de la STEP selon leur identification.....	29
Figure 14: Répartition des 22 souches résistantes au céfoxitine selon leur identité bactérienne.....	30
Figure 15:: Identification des 10 souches résistantes à la céfoxitine isolées à partir des eaux usées de la STEP.	30
Figure 16: Identification des 12 souches résistantes à la céfoxitine isolées à partir des eaux traitée de la STEP.	31
Figure 17: Taux de résistance des 23 souches bactériennes résistantes à l'imipénème.....	32
Figure 18: Taux de résistance des 23 souches résistantes à l'imipénème aux différentes familles d'antibiotique.....	32
Figure 19:: Résistance aux bêta-lactamines des 14 souches résistantes à l'imipénème isolées à partir des eaux usées de la STEP.....	33
Figure 20: Résistance aux antibiotiques non bêta-lactames des 14 souches résistantes à l'imipénème isolées à partir des eaux usées de la STEP.....	34

Figure 21: Résistance aux bêta-lactamines des 9 souches résistantes à l'imipénème isolées à partir des eaux traitées de la STEP	35
Figure 22: Résistance aux non bêta-lactamines des 9 souches résistantes à l'imipénème isolées à partir des eaux traitées de la STEP.....	35
Figure 23: Taux de résistance aux antibiotiques des 22 souches résistantes à la céfoxitine isolées à partir des eaux usées et des eaux traitées de la STEP de Boumerdes.....	37
Figure 24: Taux de résistance des 22 souches résistantes à la céfoxitine pour les différentes familles d'antibiotiques.....	38
Figure 25 : résistance aux Bêta-lactamines des 10 souches résistantes à la céfoxitine isolées a partir des eaux usées de la STEP.	39
Figure 26: résistance aux Bêta-lactamines des 12 souches résistantes à la céfoxitine isolées à partir des eaux traitées de la STEP.....	39
Figure 27: résistance aux non Bêta-lactamines des 10 souches résistantes à la céfoxitine isolées à partir des eaux usées de la STEP.	39
Figure 28 : résistance aux antibiotiques non bêta-lactames des 12 souches résistantes à la céfoxitine isolées a partir des eaux traitées de la STEP.	40
Figure 29 : Illustration d'une image de synergie chez <i>S.maltophilia</i> (F ₂).	41
Figure 30: illustration d'une image d'antagonisme.	42
Figure 31: Recherche du gène <i>bla</i> _{CTX-M} par PCR chez des souches de <i>S.maltophilia</i> DDST+.....	44

Liste des tableaux

Tableau 1: Correspondance entre les classifications moléculaire et fonctionnelle des Beta-lactamases et résistances aux antibiotiques	17
Tableau 2: Caractéristiques physicochimiques et microbiologiques des eaux prélevées.....	22
Tableau 3: Les différents antibiotiques en disque utilisés pour l'antibiogramme.....	25
Tableau 4: Les séquences des amorces utilisées pour la recherche des gènes CTX-M et TEM	27
Tableau 5: Profils d'antibiorésistance des 23 souches résistantes à l'imipénème.....	36
Tableau 6: Profils d'antibiorésistance des 22 souches résistantes au céfoxitine	40
Tableau 7: Les souches positives pour le test de synergie.....	42
Tableau 8 : Les souches positives pour le test d'antagonisme.....	43

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
I-GENERALITE	2
I-1-LES EAUX USEES	2
I-1.1. L'épuration des rejets urbains.....	2
I-1.2. Les étapes et procédés de traitement des eaux usées.....	2
I-1.2.1. Le prétraitement.....	2
I-1.2.1.1 .Dégrillage.....	2
I-1.2.1.2. Dessablage.....	3
I-1.2.1.3. Dégraissage –désuilage	3
I-1.2.2. Le traitement primaire.....	3
I-1.2.3. Traitement secondaire (Biologique).....	4
I-1.2.4. Traitement tertiaire.....	5
I-1.3. Caractérisation des eaux usées.....	5
I-1.3.1. Le potentiel d'Hydrogène (pH).....	5
I-1.3.2. La température (°C).....	5
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.....	6
I.2. LA RESISTANCE AUX ANTIBOTIQUES	7
I.2.1. La résistance bactérienne dans l'environnement.....	7
I.2.2. Définition de la résistance aux antibiotiques	8
I.3. LES BETA-LACTAMINES	8
I.3.1.Définition.....	8
I.3.2. Structure et classification des bêta-lactamines	8

I.3.3. Mode d'action des bêta-lactamines	10
I.3.4. Mécanismes de résistance aux bêta-lactamines	12
I.3.4.1. Mécanismes non enzymatiques	12
I.3.4.1.1. Imperméabilité.....	12
I.3.4.1.2. Système d'efflux	13
I.3.4.1.3. Modification de la cible.....	13
I.3.4.2. Mécanismes enzymatiques par la production des bêta-lactamases...	14
I.3.4.2.3. Mode d'action des bêta-lactamases.....	15
I.3.4.2.4. Classification des bêta-lactamases	15
I.3.4.2.4. 1. Les carbapénémases	18
I.3.4.2.4. 2. Les céphalosporinases	19
I.3.4.2.4. 3. Les bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE).....	19
II. MATERIEL ET METHODES	20
II.1. Description de la zone d'étude	20
II.2. Caractéristiques physico-chimique et microbiologique des prélèvements.....	22
II.3. METHODES.....	22
II.3.1. Caractérisation de la résistance à l'imipénème et à la céfoxitine	22
II.3.1.1. Confirmation de la résistance des souches.....	22
II.3.1.2. Identification bactérienne des souches résistantes.....	22
II.3.1.3. Diffusion en milieu gélose : Antibiogramme.....	23
II.3.1.4. Test de synergie.....	25
II.3.1.5. Test d'antagonisme.....	25
II.3.1.6. Recherche du gène <i>bla</i> _{CTX-M} par PCR.....	26
II.3.1.7. Electrophorèse sur gel d'agarose	27
III- RESULTAT ET DISCUSSION	28
III.1. Identification bactérienne.....	28

III.1.1. Identification des souches résistantes à l'imipénème.....	28
III.1.2. Identification des souches résistantes à la céfoxitine.....	29
III.2. Résistance aux antibiotiques.....	31
III.2.1. Profils d'antibiorésistance des souches résistantes à l'imipénème....	31
III.2.2. Profils d'antibiorésistance des souches résistantes à la céfoxitine.....	37
III. 3.La production d'une béta-lactamases à spectre élargi BLSE.....	41
III.4. la production d'une céphalosporinase inductible.....	42
III.5. Recherche du gène <i>bla</i>_{CTX-M}	44
DISCUSSION	45
CONCLUSION.....	48
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	49
ANNEXES	

Introduction

INTRODUCTION

L'histoire de la résistance aux antibiotiques devrait commencer à partir de la découverte de ces molécules, l'année 1929, date de la découverte de la pénicilline ou l'année 1940, date où l'on a cru aux vertus thérapeutiques de la pénicilline, alors qu'Edward Abraham décrivait pour la première fois l'inactivation de la pénicilline par une pénicillinase (Yvon, 2009).

Depuis quelques années, la présence de substances pharmaceutiques a été observée dans les milieux aquatiques y compris dans l'eau potable. Les principales sources incriminées dans la dissémination de ces composés dans l'environnement seront les stations d'épuration des eaux usées (STEP).

Dans le contexte actuel, les niveaux de pollution des rejets augmentent d'une façon inquiétante sur le plan quantitatif et qualitatif. Ces eaux résiduaires sont collectées et acheminées, en général, vers les stations d'épuration urbaines pour les traiter avant leur rejet final dans l'environnement. De nos jours, la réglementation définit des seuils de pollution des eaux, de flux de pollution après épuration afin de prévenir toute contamination du milieu en aval du rejet. Plusieurs travaux ont étudié l'efficacité du traitement dans l'élimination des résidus d'antibiotiques et des bactéries résistantes dans les eaux traitées ainsi que leurs concentrations dans les boues activées.

En fonction de la sensibilité du milieu récepteur et de la concentration des substances présentes dans l'effluent, un rejet ponctuel peut engendrer des impacts sur le milieu aquatique. La connaissance d'une partie de la composition chimique des effluents, de l'écotoxicité des substances pour l'écosystème aquatique et des caractéristiques du milieu récepteur dans lequel ces effluents sont déversés permet de réaliser une évaluation des risques potentiels (HCSP, 2010)

Après un important rappel bibliographique nécessaire à la bonne compréhension de ce sujet, l'objectif de ce mémoire a été la caractérisation des mécanismes de résistance aux céphalosporines à large spectre chez des bactéries à Gram négatif isolées à partir des eaux usées et des eaux traitées de la station d'épuration urbaine de Boumerdes.

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un 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.

Pour réaliser ce travail nous avons adopté le plan suivant :

- Confirmation de la résistance à l'imipénème et à la céfoxitine.
- Identification des bactéries résistantes.
- Evaluation de la résistance des souches aux antibiotiques par antibiogramme.
- Détection de la production de Béta-lactamases à spectre élargi.
- Détection de la production de céphalosporinases inductibles
- Recherche du gène *bla_{CTX-M}* par PCR.

Généralités

I. GENERALITE

I.1. Les eaux usées

Les eaux usées comprennent les eaux domestiques (eaux ménagères et sanitaires) et souvent des quantités variables d'effluents agricoles et ou industriels. Elles contiennent des substances en suspension, en solution et sous forme colloïdale (**Singleton, 2004**).

I.1.1. L'épuration des rejets urbains

Les rejets urbains menacent les populations et entraînent des nuisances sur les écosystèmes qui sont incapables de les prendre en charge par autoépuration. Le rôle des systèmes d'assainissement mis en place est (**Renou, 2006**) :

- d'éviter rapidement sans stagnation et sans risque pour l'habitation, les effluents urbains contenant les substances susceptibles de générer des odeurs, des putréfactions ou des microorganismes pathogènes nuisibles pour la santé des habitants. Par nécessité, ces eaux sont évacuées dans le milieu naturel.
- d'évacuer vers le milieu naturel les eaux de ruissèlement pour éviter les inondations et la dégradation des biens dans des limites compatibles avec les possibilités économiques.
- de protéger le milieu naturel en évitant que les produits évacués puissent dégrader ce milieu dans des conditions dangereuses ou simplement désagréables non seulement pour les habitants de l'agglomération mais également pour les usagers de l'eau en aval des rejets

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

I.1.2.1. Le prétraitement

Il s'agit de l'ensemble d'opération physiques et mécanique destinée à extraire de l'eau brute la plus grande quantité possible d'éléments dont la nature ou la dimension constituerait une gêne pour les traitements ultérieurs (**Badia-Gandard, 2003**).

I.1.2.1.1 .Dégrillage

L'élimination des matières flottantes grossières et des animaux aquatiques s'obtient par l'utilisation de grille fixes (nettoyées ou non mécaniquement) suivi de tamis à maille grossière, qui dans les grandes stations sont mobiles et à nettoyage automatique (**Gomella et Guerree,1978**)

I.1.2.1.2. Dessablage

Le dessablage a pour but d'extraire des rejets industriels, les graviers, les sables et autres matières minérales denses de façon à éviter les dépôts dans les conduites et canaux, et à protéger les pompes contre l'abrasion (**Cardot, 2001**).

Il peut devenir indispensable lorsque les usines sont desservies par un réseau unitaire, et notamment pour les industries métallurgiques ou mécaniques.

I.1.2.1.3. Dégraissage –désuilage

Ces opérations concernent bon nombre d'eaux résiduaires issues des industries alimentaires (charcuteries, fabriques de conserves de viande, abattoirs, margarineries huileries, etc.), mais aussi des raffineries de pétrole et les industries mécaniques.

On peut considérer que le désuilage-dégraissage se rapporte à l'extraction de toutes matières flottantes d'une densité inférieure à celle de l'eau. Ces matières sont de nature très diverse et leur quantité s'estime par la mesure des « matières extractibles par solvants ». La teneur de certains rejets industriels (abattoirs, laiteries, etc.) peut atteindre des valeurs de 300 à 500 mg/L ; par ailleurs ces matières peuvent former une émulsion stable entretenue par le brassage de l'eau ou constituer une phase indépendante non émulsionnée (**Boeglin,2000 ; Zhang et al., 2009**).

I.1.2.2. Le traitement primaire

Ce sont des techniques physiques de séparation par décantation gravitaire de matière solide encore contenue dans le liquide. La décantation primaire assure l'élimination par sédimentation des matières en suspension (MES) décantable, de taille égale ou supérieure à 50 µm, au moindre coût. Cette étape de traitement comprend (**Badia-Gandard, 2003**):

-La décantation :

La décantation permet de retirer des eaux usées, les matières décantables qu'elles contiennent encore. Dans ce cas, la séparation qui s'effectue par gravité ne concerne que les particules de diamètre supérieur à 100µm. Celles de diamètre inférieure à 100µm seront entraînées vers les unités ultérieures de traitement (**Altmeyer et al., 1990**).

-La coagulation :

La coagulation (naturelle ou forcée) est utilisée pour agglomérer les particules (solides) de très petite taille (en particulier les colloïdes de taille inférieure à 1µm).

Les MES, souvent de trop petites dimension, sédimentent difficilement, ce qui rend leur élimination impossible. Pour faciliter leur reprise en masse, on utilise des agents chimiques, appelés les coagulants (**Crini et Badot, 2007**).

-La floculation :

La floculation permet l'agrégation ou l'agglomération (précipitation réversible) des particules de colloïdes granulaires « décharger » sous forme de flocons (floc) formés lors des étapes de coagulation et/ou neutralisation. C'est un processus qui favorise les contacts entre les particules colloïdales déstabilisées et leur agglomération (**Crini et Badot, 2007**).

I.1.2.3. 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. (**Cardot, 2001**)

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 flocons appelés « boues activées ». 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, 2001**).

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, 2001**).

I.1.2.4. Traitement tertiaire

Il s'agit d'un ou plusieurs traitements complémentaires qui améliorent un paramètre spécifique de la qualité de l'eau rejetée en vue de protéger le milieu récepteur dans une zone localement plus vulnérable. Parmi les traitements existants, nous pouvons citer :

- La désinfection : elle est nécessaire lorsque les eaux usées traitées sont rejetées dans un milieu aquatique à usage balnéaire (plage, zones d'activité nautiques ou touristiques ...).
- Les traitements de finition : pour certains usages, il est conseillé d'atteindre des concentrations très basse en MES, en DBO, en DCO, en azote ou en phosphore, plusieurs procédés peuvent alors être utilisés comme traitement d'affinage.
- Le traitement sur charbon actif : il peut être intéressant pour l'élimination de certaines molécules résistantes au traitement biologique, bien souvent lorsque la STEP accueille des eaux industrielles. Il permet par exemple d'enlever la couleur de l'effluent (Renou, 2006 ; Koller, 2004).

I.1.3. Caractérisation des eaux usées

Les eaux usées sont toutes les eaux qui parviennent dans les canalisations d'eaux usées dont les propriétés naturelles sont transformées par les utilisations domestiques, les entreprises industrielles, agricoles et autres. On englobe, aussi les eaux de pluie qui coulent dans ces canalisations (Bliefert et Perraud, 2001)

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

I.1.3.1. Le potentiel d'Hydrogène (pH)

Le pH est essentiel dans le domaine de la qualité physique et la teneur des ouvrages (agressivité, corrosivité, entartrage) et traitements de correction, il permet de mesurer l'acidité, l'alcalinité ou la basicité d'une eau (Gomella et Guerree, 1978).

I.1.3.2. La température

La température est un facteur important qui joue un rôle dans l'efficacité du traitement appliqué d'une part (la décantation est plus efficace à des températures élevées), et d'autre

part, elle joue un rôle dans les différents phénomènes aquatiques comme la solubilité des gaz et des sels (Cardot, 2001 ; Rodier et al., 1996).

I.1.3.4. La demande biologique en oxygène (DBO5)

La demande biochimique en oxygène (DBO5) est la quantité d'oxygène consommée (exprimée en mgO₂/L) dans les conditions d'essai (incubation à 20 °C et à l'obscurité après un laps de temps de 5 jours) pour assurer par voie bactérienne l'oxydation biologique des matières organiques dites biodégradables (Boeglin, 2000).

I.1.3.5. La demande chimique en oxygène (DCO)

La demande chimique en oxygène, notée DCO, représente la quantité d'O₂ consommée par toutes les matières réductrices. L'oxygène est fourni par un oxydant très puissant (dichromate de potassium) en condition acide et à ébullition pendant 2 heures. La quasi totalité des matières sont oxydées (Cardot, 2005).

I.1.3.6. Les coliformes totaux

Les coliformes sont utilisés depuis très longtemps comme indicateurs de la qualité microbienne parce qu'ils peuvent être 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 croître en présence de sels biliaires ou d'autres agents de surface possédant des activités inhibitrices similaires, et capable de fermenter le lactose (et le mannitol) avec production d'acide et d'aldéhyde en 48 heures, à des températures de 35-37°C. Les principaux genres inclus dans le groupe sont : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, et *Serratia*, (Rodier et al, 2005) .

I.1.3.7. 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 *Escherichia 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**).

I.2. LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

I.2.1. La résistance bactérienne dans l'environnement

L'utilisation des antibiotiques, a la fois en médecine humaine et vétérinaire, exerce une pression de sélection parmi les bactéries commensales ou pathogènes de l'homme ou de l'animal qui peuvent rejoindre l'environnement naturel par exemple dans les eaux continentales, côtières ou le sol, via les effluents d'élevages ou les eaux usées provenant d'activité humaines ou animales. Cela pourrait conduire à l'émergence et à la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques dans les communautés microbiennes de l'environnement. (**Delery, 1999**)

Les résidus des antibiotiques dans l'environnement sont soupçonnés d'être l'agent causal du développement des formes de résistances dans les populations bactériennes. Ainsi, ces substances posent de sérieuses menaces à la santé publique pour le traitement et pour le contrôle de certaines maladies infectieuses (**Emmanuel, 2004**).

La station d'épuration des eaux usées est un intermédiaire entre les activités humaines et l'environnement. Durant le processus du traitement des eaux usées, des changements qualitatifs et quantitatifs dans la distribution des populations bactériennes sont observés. Ces modifications ont pour conséquence la réduction de la charge microbienne dont la population résistante et pathogène. Cependant, plusieurs études ont rapporté la présence de bactéries résistantes dans les eaux usées traitées (**Guardabassi et al., 2002 ; Chitnis et al., 2004**). La station d'épuration est un compartiment favorable pour le maintien et la dissémination de la résistance par la pression de sélection exercée par les différentes molécules (antibiotiques, métaux lourds, désinfectants...etc) ainsi que les échanges génétiques favorisés à l'intérieur des biofilms (10 à 600 fois plus de transfert). Ces derniers deviendraient propices 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 Kolter ; 2000). Les systèmes d'épuration des eaux usées rejettent à des concentrations variables des bactéries d'origine entérique dans l'environnement.

Le devenir de ces rejets dans le milieu récepteur peut revêtir une importance sanitaire dans le cas du milieu littoral, puisque les activités de baignade, et surtout de conchyliculture sont menacées par une contamination bactérienne d'origine fécale (Dupray et Derrien, 1994)

I.2.2. Définition de la résistance aux antibiotiques

On peut définir la résistance aux antibiotiques comme la capacité des micro-organismes d'une certaines espèces à résister ou même à se développer en présence d'antibiotiques. La résistance d'une souche bactérienne à un antibiotique peut être :

Intrinsèque : l'espèce est caractérisée par sa sensibilité naturelle à un antibiotique particulier. Cela peut résulter de l'incapacité de l'antibiotique à pénétrer dans la cellule (paroi bactérienne imperméable) et à atteindre sa cible, d'un manque d'affinité entre l'antibiotique et son site d'action ou de l'absence de cible cellulaire ou de l'hydrolyse enzymatique de l'antibiotique.

Acquise : l'espèce est normalement sensible à un antibiotique mais certaines souches expriment une résistance à un ou plusieurs antibiotique(s) donné(s) grâce à plusieurs mécanismes biochimiques. Elles sont donc capables de supporter une concentration d'antibiotique(s) qui normalement est suffisante pour inhiber ou tuer des bactéries de la même espèce (Delery, 1999).

I.3. Les bêta-lactamines

I.3.1. Définition

Les β -lactamines constituent une famille majeure d'antibiotiques très largement utilisés en clinique (Cattoir, 2008). Dans le cas des bacilles à Gram négatif, la résistance bactérienne aux β -lactamines est due principalement à la production d'enzymes (β -lactamases) capables d'hydrolyser le noyau β -lactame commun à cette classe d'antibiotiques (pénicillines, céphalosporines, monobactames, carbapénèmes). (Rodriguez et Struelens, 2006).

I.3.2. Structure et classification des bêta-lactamines

Les bêta-lactamines se caractérisent par la présence d'un élément structural commun, noyau β -lactamines. La structure de base des **pénicillines**, l'acide 6-aminopénicillanique, est constituée d'un cycle thiazolidine lié au cycle β -lactame. Le noyau β -lactame peut être substitué par acylation sur la fonction aminée pour donner naissance à des dérivés qui se différencient par leur stabilité, leur pharmacocinétique, leur spectre d'activité et leur résistance aux β -lactamases. Par ailleurs, la fonction carboxylique peut être transformée en carboxylate et rendre la molécule plus soluble ou permettre l'obtention d'esters comme les prodrogues. Cette fonction acide est toutefois essentielle à l'activité antibactérienne. **(Faures, 2009)**.

La majorité des bêta-lactamines, dont le représentant le plus ancien est la pénicilline G, sont maintenant obtenues par héli-synthèse. Les β -lactamines, qu'elles soient naturelles ou produites par hémisynthèse, sont classées en fonction de la nature du noyau entrant dans leur structure de base **(Cavallo et al, 2004)**. Les bêta-lactamines regroupent (Figure) :

- **Les pénames**

Renferment les pénicillines, ces composés sont constitués de trois parties : un noyau thiazolidine fixé sur un cycle β -lactame et une chaîne latérale sur le C₆ qui permet de les différencier.

On distingue 7 groupes dont les aminopénicillines (ampicilline), les ureidopénicillines (pépéracilline) et les carboxypénécillines (ticarcilline) **(Bryskier, 1999)**.

- **Les pénèmes**

Le groupe des pénèmes renferme des molécules synthétiques. Ils se caractérisent par la présence d'un cycle thiazolidine attaché au cycle β -lactame. Selon l'atome présent en position 1 (soufre, radical CH₂ ou oxygène), on distingue respectivement : les pénèmes, les carbapénèmes et les oxapénèmes. Les carbapénèmes possèdent un large spectre antibactérien incluant les bactéries à Gram positif et à Gram négatif **(Bryskier, 1999)**.

- **Les céphèmes**

Les céphèmes sont constituées d'un noyau β -lactame auquel est accolé un hexa-cycle insaturé (dihydrothiazine). Il existe plusieurs classifications des céphèmes : chimique,

microbiologique et pharmacologique. Chimiquement les céphèmes peuvent être divisé en trois groupes en fonction de l'atome en position 1 du cycle hexa-atomique : soufre (céphalosporines), méthylène (carbapénèmes) ou oxygène (oxa-1-céphèmes). Chaque groupe peut être subdivisé en fonction de la présence ou non en 7- α d'un groupement méthoxy : les céphamycines (céfoxitine) et les céphalosporines vraies.

Les céphalosporines sont traditionnellement divisées en première, deuxième, troisième et quatrième génération (**Bryskier, 1999**).

• Les monobactames

Les monobactames se caractérisent par une structure monocyclique (noyau β -lactame). Les monobactames naturels sont de faibles agents antibactériens mais ils se caractérisent par une très bonne stabilité à l'action des β -lactamases. Le premier monobactame développé est utilisé en clinique est l'aztréonam qui dérive d'un monobactame naturel isolé de *Chromobacterium violaceum*. (**Bryskier, 1999**).

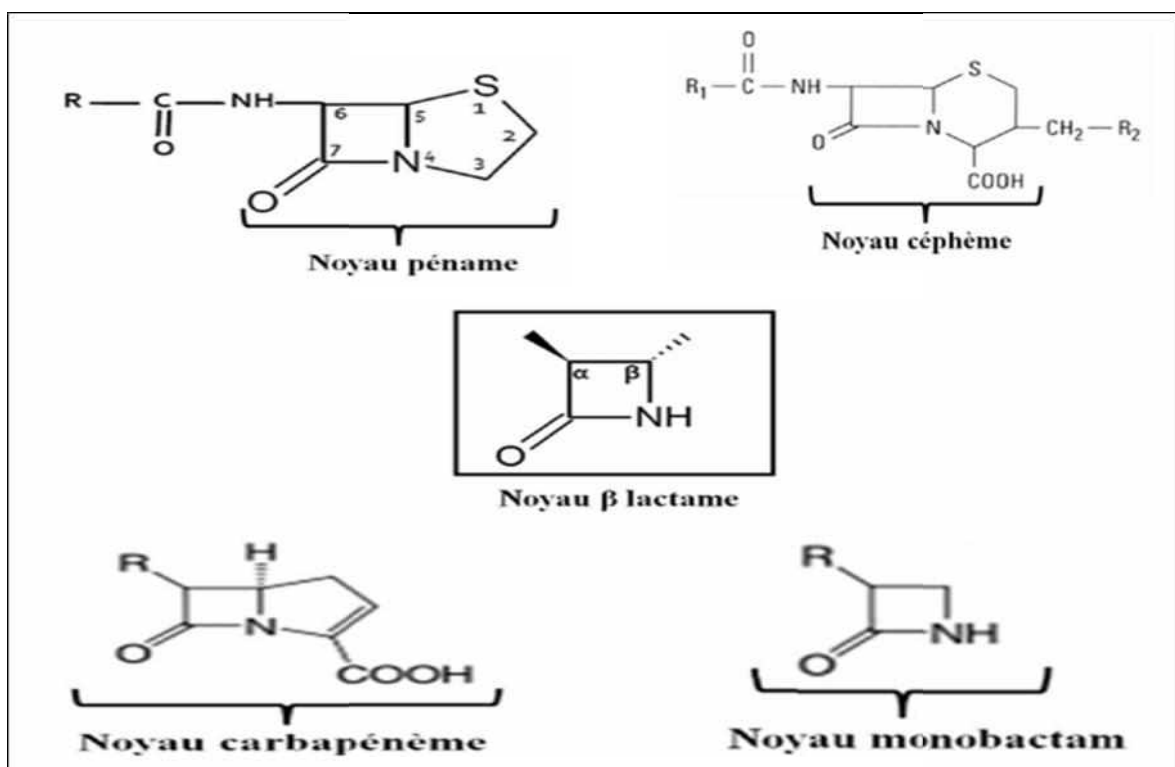


Figure 1 : Représentation des quatre principales classes de β -lactamines obtenues par substitution ou fixation d'hétérocycles à partir du noyau β -lactame (au centre) (**Figueiredo, 2011**).

I.3.3. Mode d'action des bêta-lactamines

Les β -lactamines agissent au niveau de la paroi bactérienne en inhibant la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane entraînant une lyse bactérienne (Yala et al, 2001).

Les bactéries possèdent à l'extérieur de leur membrane plasmique un polymère réticulé, le peptidoglycane ou muréine. Cette structure totalement absente chez les eucaryotes, participe au maintien de la forme de la cellule bactérienne et protège la membrane cytoplasmique de la variation de la pression osmotique. Le peptidoglycane est une structure vitale pour la bactérie et rares sont celles qui n'en possèdent pas. De ce fait, la synthèse et l'assemblage du peptidoglycane, apparaissent comme des cibles privilégiées des antibiotiques (Faure, 2009).

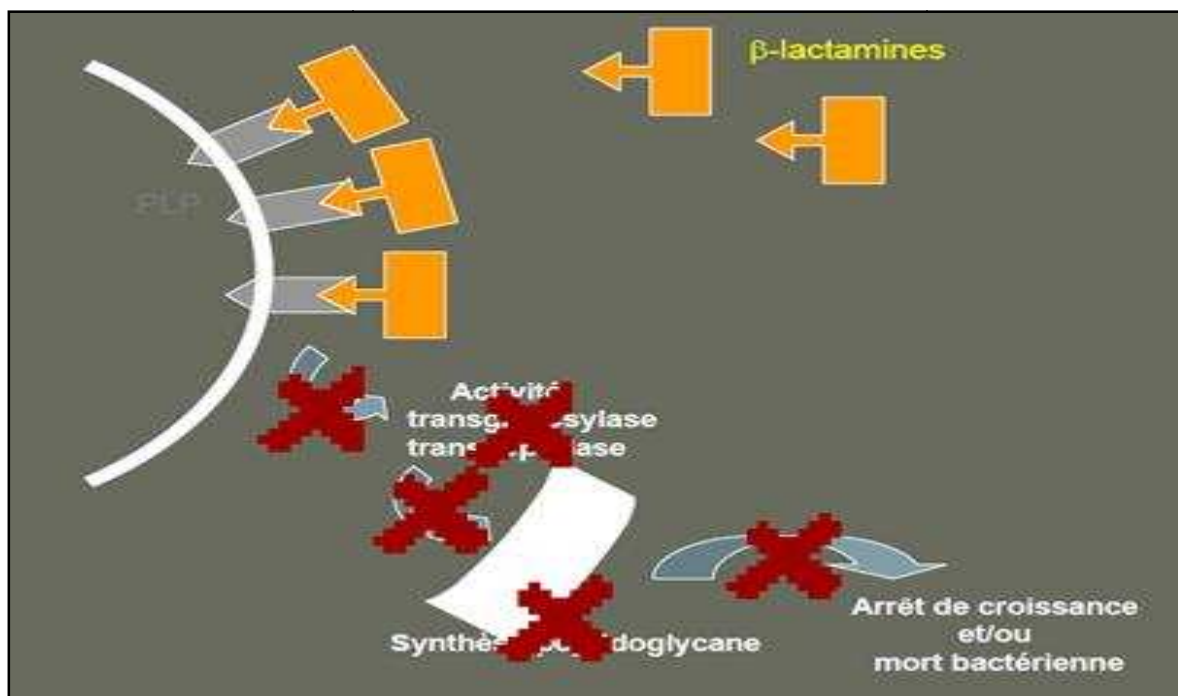


Figure 2: mécanisme d'action des bêta-lactamines (Laurent, 2009).

Le peptidoglycane est un polymère formé de molécules de N-acétyl-D-glucosamine et d'acide N-acétyl-muramique sur lesquelles se fixe une chaîne peptidique comportant cinq acides aminés qui sont la L-alanine, l'acide D-glutamique, la L-lysine et deux D-alanine.

Sur la lysine se fixe la pentaglycine. La synthèse du peptidoglycane est complexe et nécessite l'activité d'environ trente enzymes différentes dont les plus importantes sont les

transpeptidases, les transglycosidases et les carboxipeptidases. Elle comporte trois étapes principales (Faure, 2009)

Une étape intracytoplasmique aboutissant à la synthèse d'UDPacétylmuramyl-pentapeptide, terminé par un dipeptide, le D-alanyl-D-alanine.

Une deuxième étape membranaire aboutissant à la formation d'un polymère acétylglucosamine et de l'UDP-acétylmuramyl-dipeptide. Ce polymère sort du cytoplasme à travers la membrane cytoplasmique.

Enfin, **une troisième étape extracytoplasmique** comportant une polymérisation par transpeptidation (liaison peptidique entre acides aminés) sous l'effet d'une transpeptidase fixée à la partie externe de la membrane cytoplasmique et par transglycosylation (liaison glucidique).

I.3.4. Mécanismes de résistance aux bêta-lactamines

Les bactéries se défendent contre l'action des antibiotiques (Lavigne, 2007) :

- en se rendant imperméables à leur pénétration.
- en produisant des enzymes capables de les inactiver.
- en modifiant la structure de leurs cibles.
- Interférence avec le mécanisme de transport de type efflux.

I.3.4.1. Mécanismes non enzymatiques

I.3.4.1.1. Imperméabilité

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des bêta-lactamines à travers la membrane externe constituée de phospholipides s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau. La sensibilité aux β -lactamines dépend du nombre de porines fonctionnelles. L'altération des porines par mutation est à l'origine des résistances acquises aux β -lactamines, soit par une modification structurale d'une des porines essentielles, ce qui a été décrit chez *E. coli*, soit par une diminution quantitative des porines, qui est la situation la plus fréquente (Figure 3)(Cavallo et al, 2004).

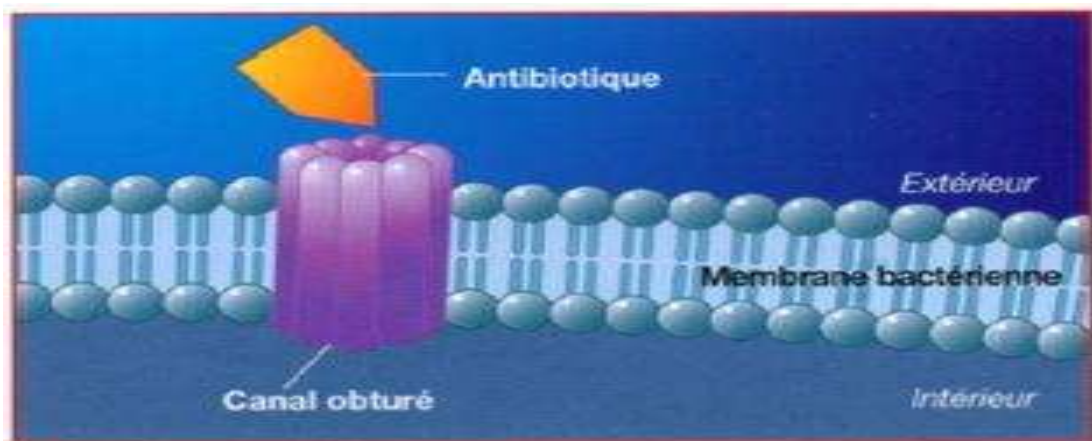


Figure 3: Imperméabilité par : nombre de porines- altération des porines (Archambaud, 2009).

I.3.4.1.2. Système d'efflux

L'hyperexpression des systèmes d'efflux représente un mécanisme de résistance aux antibiotiques très répandu. Il a été décrit chez de nombreuses espèces bactériennes à Gram positif ou à Gram négatif d'intérêt médical comme les Staphylocoques, les Streptocoques, les entérobactéries ou *P. aeruginosa*. Cependant, les résistances acquises aux β -lactamines liées à l'hyperexpression de ces systèmes d'efflux n'ont été décrites que chez des bactéries à Gram négatif comme *E. coli*, *P. aeruginosa* ou *N. gonorrhoeae* (Cavallo et al, 1998).

Ces systèmes d'efflux sont surtout actifs sur les β -lactamines les plus hydrophobes qui ne passent pas la barrière de la membrane cytoplasmique et s'accumulent dans l'espace périplasmique (Figure 4) (Cavallo et al, 2004).

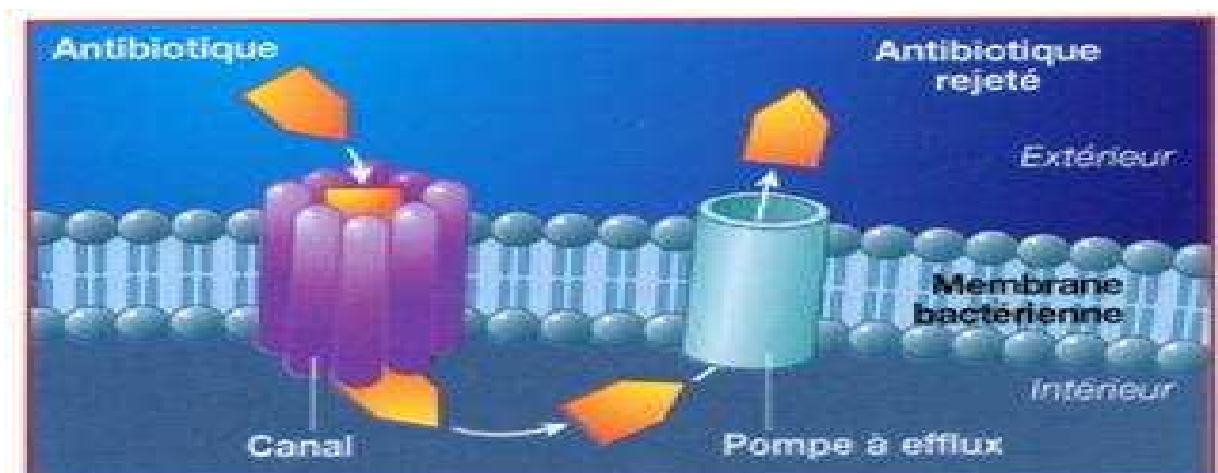


Figure 4: Interférence avec le mécanisme de transport de type efflux (Archambaud, 2009)

I.3.4.1.3. Modification de la cible

C'est un mécanisme de résistance acquis très largement répandu chez les bactéries à Gram positif, comme *S. aureus*, *S. pneumoniae*, certains *S. viridans* ou *E. faecium*, et que l'on retrouve également chez certaines bactéries à Gram négatif, comme *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* ou *H. influenzae*. Ces résistances font suite à des mutations dans les gènes chromosomiques qui codent pour les PLP normales ou à l'acquisition de gènes étrangers codant pour des PLP ayant peu d'affinité pour les β -lactamines (Figure 5) (Cavallo et al, 2004).

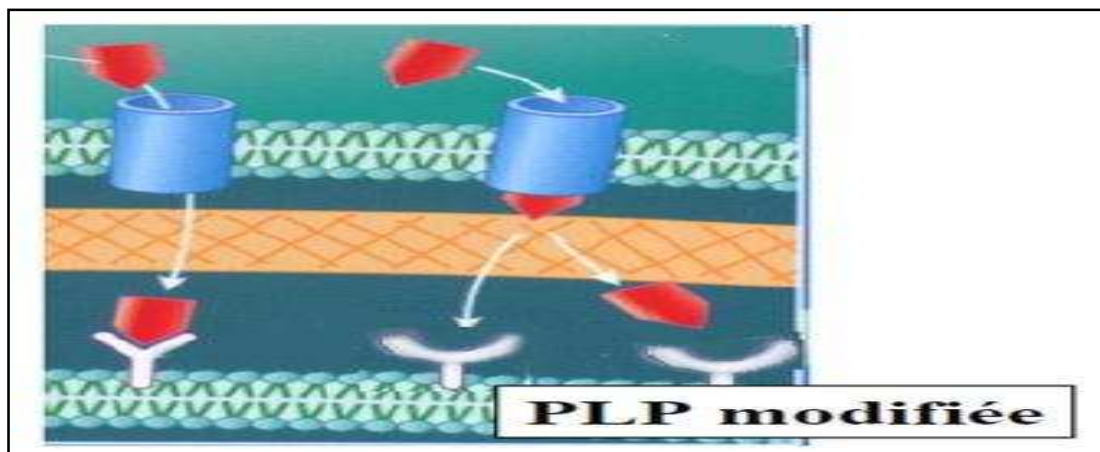


Figure 5: Modification d'affinité de la cible (Archambaud, 2009).

I.3.4.2. Mécanismes enzymatiques par la production des bêta-lactamases

Les bêta-lactamases sont un groupe hétérogène d'enzymes d'origine bactérienne capables d'inactiver les bêta-lactamines par ouverture du cycle β -lactame, structure de base commune à toutes les bêta-lactamines. Elles constituent de loin le mécanisme le plus répandu de résistance des bactéries aux bêta-lactamines. (Cavallo et al., 2004). En effet, depuis l'introduction dans les années 80 de bêta-lactamines très stables à l'inactivation enzymatique (céphalosporines de 3^{ème} génération ou C3G, aztréonam et carbapénèmes), une émergence continue et universelle de nouvelles enzymes a pu être observée. Ces enzymes sont le plus souvent plasmidiques ou transférables à des bacilles gram négatif comme *Klebsiella pneumoniae* essentiellement, *Pseudomonas aeruginosa* et maintenant aux *Acinetobacter spp.* Les gènes codant pour les β -lactamases ou ceux impliqués dans la régulation de leur expression peuvent être impliqués dans ce mécanisme de résistance enzymatique (Figure 6) (Barrial et Scotet, 2006).

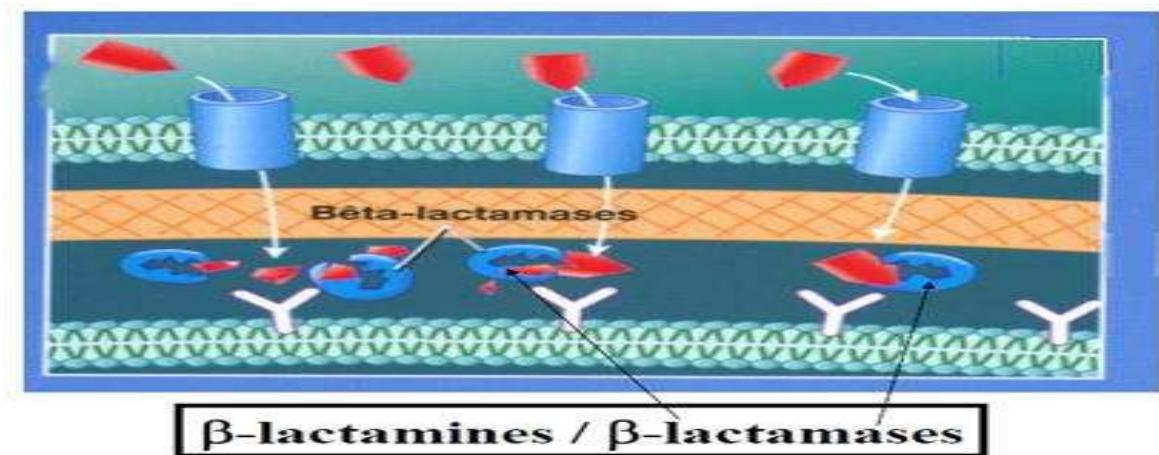


Figure 6: Inactivation enzymatique des β -lactamines (Archambaud, 2009).

I.3.4.2.3. Mode d'action des bêta-lactamases

Les bêta-lactamases sont des enzymes d'inactivation hydrolysant le pont amide du cycle β -lactame (correspondant à la structure de base des β -lactamines) pour donner un acyl-enzyme qui sera ensuite dégradé en acide inactif. Ainsi, les pénicillines sont dégradées en acide pénicilloïque et les céphalosporines en acide céphalosporoïque. Ces enzymes sont localisées au niveau de l'espace périplasmique chez les bactéries gram négatif (Figure 7).

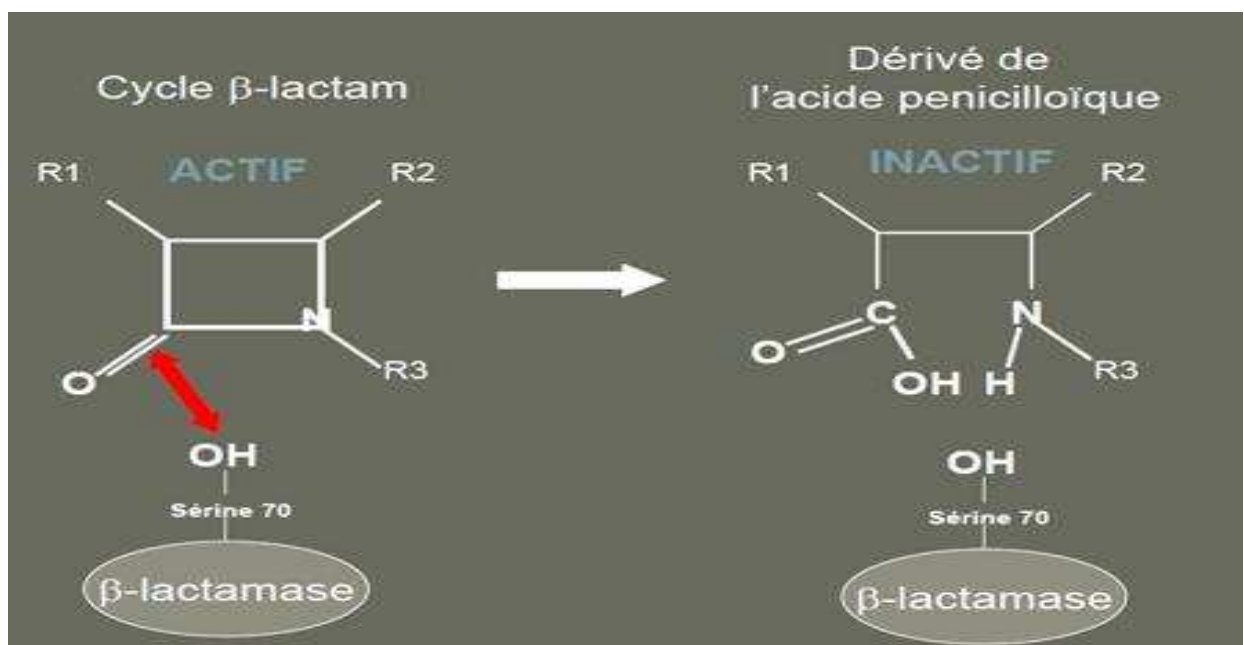


Figure 7: Hydrolyse enzymatique de la β -lactamines (Laurent, 2009).

I.3.4.2.4. Classification des bêta-lactamases

De nombreuses classifications existent, prenant en compte comme critères :

- Les caractéristiques physiques
- Le phénotype : pénicillinases, céphalosporinases...
- La nature du site actif
- La séquence d'acides aminés
- L'origine (plasmidique ou chromosomique)
- La situation constitutive ou inductible.

Aujourd'hui, les classifications d'Ambler et de Bush-Jacoby-Medeiros sont considérées comme étant les plus pertinentes. **(Barrial et Scotet, 2006)**

-Classification d'Ambler

La première classification basée sur des critères scientifiques a été proposée en 1980 par Ambler. A cette époque fut décrite une classe de sérine-enzymes (classe A) et une classe de métallos-enzymes (classe B). La classe C de céphalosporinases (sérine-enzymes) fut décrite en 1981 par Jaurin et Grunstrom, et la classe D, regroupant les « oxacillinases », fut dissociée des autres classes de sérine enzymes à la fin des années 80. Cette classification, en tenant compte des analogies de séquence peptidique, en particulier celles du site enzymatique, est la plus utilisée en pratique médicale. **(Barrial et Scotet, 2006)**

-Classification de Bush-Jacobi-Medeiros

Cette classification, plus fonctionnelle, a été proposée en 1989 et remise à jour en 2010. Elle reflète mieux le spectre exact des enzymes, prenant en compte le profil de substrat ainsi que le profil d'inhibition. Elle reste malgré tout peu utilisée en pratique médicale.

-Le groupe 1 : correspond à des céphalosporinases chromosomiques peu inhibées par l'acide clavulanique.

-Le groupe 2 : est composé de pénicillinases, oxacillinases, et carbapénèmases chromosomiques ou codées par des plasmides et en général inhibées par l'acide clavulanique.

-Le groupe 3 : correspond à des métallos-enzymes en général retrouvés chez les *Pseudomonas* spp. *Bacteroides* spp. et *Serratia marcescens*, peu inhibés par l'acide clavulanique mais par l'EDTA in vitro. **(Barrial et Scotet, 2006)**

Tableau 1: Correspondance entre les classifications moléculaire et fonctionnelle des Beta-lactamases et résistances aux antibiotiques. (Cavallo, 2004)

Classification moléculaire (Ambler)	Classification fonctionnelle (Bush)	Type de B-lactamase	Bactéries impliquées	Inhibition Par l'acide Clavulanique	B-lactamines hydrolysées	B-lactamines stables
Sérine b-lactamases	2a	Pénicillinasés	Bactéries à Gram positif (dont staphylocoques et entérocoques)	++	Pénicillines sauf pénicillines M	Pénicillines M, C1G, carbapénèmes
Classe A	2b	b-lactamases à large spectre	Bactéries à Gram négatif	++	Amino-, carboxy et uréidopénicillines, C1G, C2G	Céphamycines, C3G, moxalactam, carbapénèmes, aztréonam
	2be	b-lactamases à spectre élargi aux C3G et à l'aztréonam	Entérobactéries <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	Idem 2b + C3G et aztréonam	Céphamycines, moxalactam, carbapénèmes
	2br	b-lactamases à large spectre résistant à l'acide clavulanique	Entérobactéries	-	Idem 2b + associations aux inhibiteurs de b-lase	Idem 2b
	2c	Carbénicillinasés	Bactéries à Gram négatif	+	Idem 2b	Idem 2b
	2e	Céphalosporinasés inhibés par l'acide clavulanique	Bactéries à Gram négatif (surtout entérobactéries)	++	Amino-, carboxy-et uréidopénicillines, C1G, C2G, Certaines C3G	Ceftazidime, céphamycines, aztréonam, carbapénèmes
	2f	Carbapénémases à site actif sérine et inhibés par l'acide clavulanique	Entérobactéries	+	Idem 2b + aztréonam, carbapénèmes et certaines C3G	Certaines C3G
Classe C	1	Enzymes AmpC chromosomiques et plasmidiques	Bactéries à Gram négatif	-	Toutes les b-lactamines 1 sauf les carbapénèmes	Carbapénèmes
Classe D	2d	Oxacillinasés	Bacilles à Gram négatif	+/-	Idem 2b (+ parfois C3G, aztréonam ou carbapénèmes)	Variable
Pas de classe attribuée	4	Enzymes indéterminées n'entrant pas dans une autre catégorie	Espèces variées	-	Variable	Variable
Zinc b-lactamases	3	Métallo-b-lactamases	Bactéries à Gram négatif	-	Large profil de substrats dont les carbapénèmes	Variable
Classe B				<i>Bacillus cereus</i>		(surtout aztréonam chez les enzymes de type IMP ou VIM)

I.3.4.2.4. 1. Les carbapénémases

Elles appartiennent aux quatre groupes des bêta-lactamases (A, B, C et D).

- **Les carbapénémases de classe A**

La plus connue est KPC (pour *K. pneumoniae* carbapénémase), elle a une faible affinité pour la céfoxitine et la ceftazidime et est partiellement inhibée par l'acide clavulanique. Une autre bêta-lactamase à spectre élargi de type GES a également trouvée à activité carbapénémase (R2F)

- **Les carbapénémases de classe B : Métallo bêta-lactamase**

Les métallobêta-lactamases (ou classe B) exigent un ou deux ions zinc pour catalyser l'hydrolyse de bêta-lactamines. Ils n'ont pas de séquence ou d'homologies structurale avec les bêta-lactamases à sérine. Ils hydrolysent: pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes. La première métallo-bêta-lactamase découverte a été produit par une souche inoffensive de *Bacillus cereus*, mais au cours des 20 dernières années, les MBL sont apparus dans plusieurs souches pathogènes et sont rapidement propagés par transfert horizontal, impliquant à la fois plasmide et integron. Ces enzymes hydrolysent fortement toutes les bêta-lactamines à l'exception de l'aztreonam. Leur activité n'est inhibée ni par l'acide clavulanique ni par le tazobactam. Les niveaux de résistance aux carbapénèmes sont assez variables(Nordmann et Carrer, 2010). Les MBL peuvent être divisés en trois sous-classes, B1, B2 et B3, en fonction de leurs séquences d'acides aminés, le profil du substrat, et l'exigence d'ions métalliques ; la sous-classe B1 est la plus large et contient : BcII par *Bacillus cereus*, CcrA par *Bacteroides fragilis*, IMP-1 par *Pseudomonas aeruginosa*, et blaB par *Cryseobacterium meningosepticum*. (Cuzon et al., 2010)

- **Les carbapénémases de classe D**

Se sont des enzymes de type OXA qui confèrent une faible résistance aux céphalosporines à large spectre, elles confèrent un faible niveau de résistance à l'imipénème et elles sont inhibées par le NaCl. Pour exemple OXA-51/69 chez *Acinetobacter baumannii* (Barrial et Scotet, 2006)

I.3.4.2.4. 2. Les céphalosporinases

Elles font partie de la classe C, on retrouve les céphalosporinases qui sont des enzymes résistantes à l'action de l'acide clavulanique et le sulbactame ; toutefois certaines sont faiblement inhibées par le tazobactame. Leur hyperproduction est associée au phénotype de multirésistance observé chez certains bacilles à Gram négatif. Au départ à médiation chromosomique, les β -lactamases de la classe C sont aussi aujourd'hui à médiation plasmidique (**Philippon et al, 2002**). Les représentants de ce groupe sont les enzymes du type, AmpC, FOX, ACT, CMY

I.3.4.2.4. 3. Les béta-lactamases à spectre élargi (BLSE)

Les BLSE (classe A) sont inhibées par l'acide clavulanique. Elles hydrolysent la majorité des béta-lactamines y compris les céphalosporines à large spectre. Elles sont inhibées par les céphamycines (céfoxitine) et l'imipénème (**Arlet et Philippon, 2003**).

Les première BLSE décrites dérivait de pénicillinase chromosomique « TEM ou SHV » (Arlet et Philippon, 2003). Elles sont le plus souvent retrouvées chez *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* (Bradford, 2001). Leur apparition s'explique par la survenue de mutations ponctuelles dans les gènes de structure codants pour TEM et SHV (**Jacoby et Medeiros, 1991**).

Dans les années 1990, il ya eu l'émergence de nouveaux types de BLSE dont le plus important est le type CTX-M qui confèrent un niveau élevé de résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération particulièrement le céfotaxime. C'est BLSE sont inhibées de façon plus importante par le tazobactam que par l'acide clavulanique (**Barrial et Scotet, 2006**).

Matériels

Et

Méthodes

II. MATERIEL ET METHODES

Ce travail est la continuité d'une étude entamée en 2010 (**Berkane et Ziâne, 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 bêta-lactamines chez 45 coliformes résistants à l'imipénème (IMP) et au céfoxitine (FOX) isolées en 2010, dont 24 souches sont issues à partir des eaux usées avant traitement et 21 souches sont issues à partir de l'eau traitée.

II.1. Description de la zone d'étude

Localisation géographique :

Notre étude a été réalisée au niveau de la station d'épuration des eaux usées urbaines située dans la wilaya de Boumerdes, délimitée par oued tatareg au nord, des terrains agricoles au sud, une zone d'activité à l'est et la route nationale à l'ouest (coordonnées : 36°44'51"N 3°28'4"E).

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 8).

Capacité de traitement :

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 1063m³/j, 1944m³/j. La DBO₅ et les MES journalier sont de 4050Kg/j et 5250Kg/j respectivement.

Caractéristiques de la station :

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 :

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



Figure 8: Photo satellitaire de la station d'épuration de BOUMERDES (Google Earth 2013).

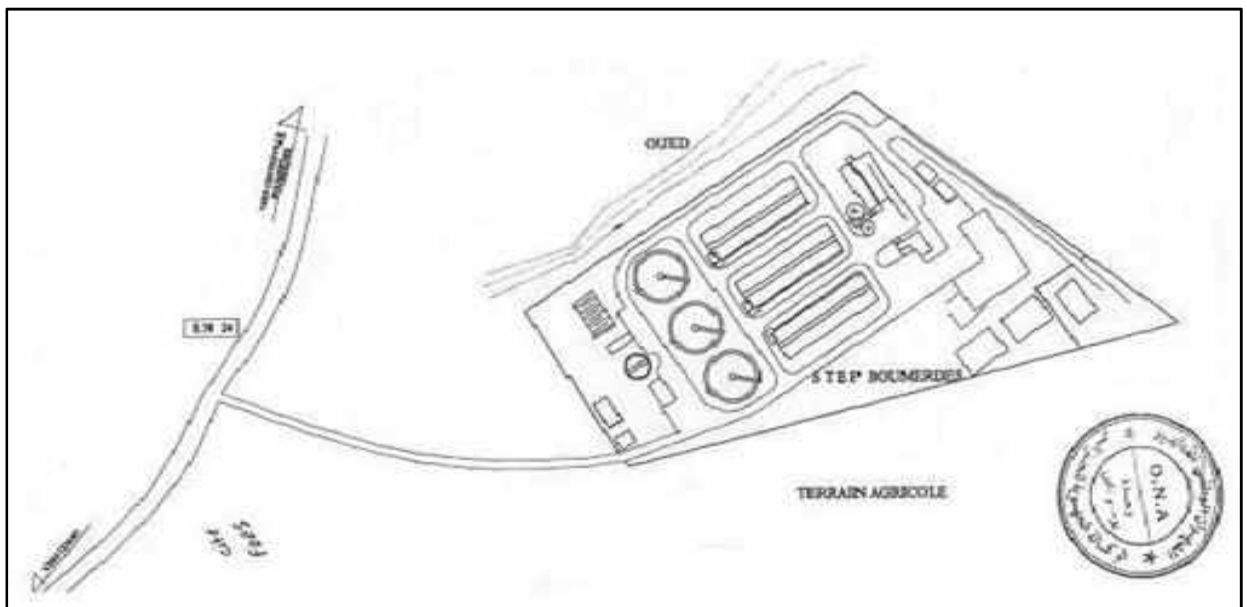


Figure 9: Schéma générale de la station d'épuration de BOUMERDES (ONA, modifie).

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
DBO₅ (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. Caractérisation de la résistance à l'imipénème et à la céfoxitine

Nous nous sommes intéressés à la résistance des bactéries isolées sur l'imipénème (IMP) et céfoxitine (FOX) qui sont deux marqueurs intéressants pour la détermination des mécanismes de résistance aux bêta-lactamines redoutables.

II.3.1.1. Confirmation de la résistance des souches.

Toutes les souches ont été cultivées sur une gélose de Muller Hinton additionnée d'imipénème ou de céfoxitine à des concentrations critiques de 8µg/ml et 32µg/ml, respectivement, selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM, 2010)

II.3.1.2. Identification bactérienne des souches résistantes

Principe

L'identification bactérienne a été effectuée par galerie API 20 E. Il s'agit d'un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, qui comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme

déshydratée. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification. **(Biomerieux)**.

Technique

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et repartir 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 à un catalogue analytique **(Biomérieux)**.

II.3.1.3. Diffusion en milieu gélose : Antibiogramme

L'étude de la résistance de nos souches vis-à-vis de 17 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 (10^8 cellules/ml).
- ajuster l’inoculum à 10^7 cellules/ml.
- plonger un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne de 10^7 cellules/ml;
- 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 10);
- laisser diffusé 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 ou pied à coulisse et classer les bactéries dans l’une des catégories : sensible (S), intermédiaire (I) ou résistant (R) selon les valeurs critiques (CA-SFM., 2010).

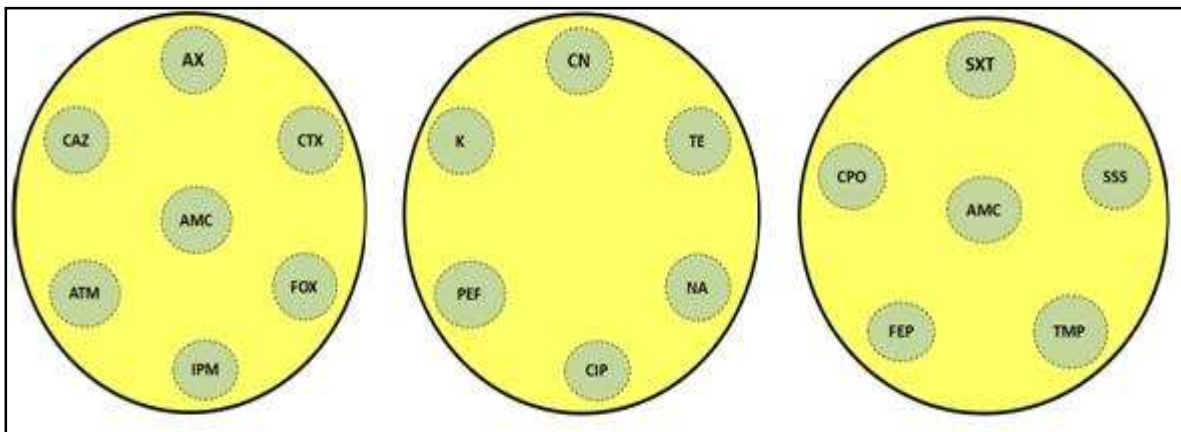


Figure 10 : Schéma de la disposition des antibiotiques

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

Familled'antibiotiqueutilisé		Antibiotique	Abbréviation	Charge (µg)
β-lactamines	Pénicilline	Amoxicilline	AX	25
	Monobactames	Aztréonam	ATM	30
	Carbapénème	Imipénème	IMP	10
	Céphalosporines de 2 ^{ème} génération	Céfoxitine	FOX	30
	Céphalosporines de 3 ^{ème} generation	Céfotaxime	CTX	30
		Céftazidime	CAZ	30
	Céphalosporines de 4 ^{ème} génération	Céfépime	FEP	30
		Céfpirome	CPO	30
	Péncilline-association	Amoxicilline +Ac.clavulanique	AMC	20/10
Pépiracilline + Tazobactame		TZP	10/75	
Quinolones	Acide nalidixique	NA	30	
	Ciprofloxacine	CIP	5	
	perfloxacine	PEF	5	
Tétracyclines	Tétracycline	TE	30(UI)	
Aminosides	Kanamycine	K	30	
	Gentamicine	CN	15	
Sulfamides-Trimethoprime	Sulfamethoxazole + Trimethoprime)	SXT	1.25/23.75	
	Triméthoprime	TMP	5	
	Sulfamide	SSS	200	

II.3.1.4. Test de synergie

La détection d'une bêta-lactamase à spectre élargi a été réalisée en parallèle avec l'antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Ce test est basé sur la mise à profit d'une image de synergie entre au moins une céphalosporine de 3^{ème} génération (C3G) ou 4^{ème} générationet/ou l'aztreonam et uninhibiteur de β-lactamines tel que l'acide clavulanique. Cette synergie se traduit par uneaugmentation nette de l'activité des C3G et/ou l'aztreonam de la cote de l'inhibiteur (acideclavulanique) (**Jarlier et al., 1988**).

II.3.1.5. Test d'antagonisme

Ce test est effectué en parallèle à l'antibiogramme. Il permet de mettre en évidence la production de céphalosporinases inductibles. Ces dernières se manifestent par la diminution de l'activité de la β-lactamine initialement actives du côté d'un inducteur de la céphalosporinase (cefcoxitine, imipénème) placé à 3cm centre à centre ; c'est l'antagonisme (**Vedel, 1997**).

II.3.1.6. Recherche du gène *bla*_{CTX-M} par PCR

Principe de la PCR

La PCR est une réaction qui permet l'amplification de fragments d'ADN de manière exponentielle. C'est une réaction cyclique qui repose sur le principe de la réplication de l'ADN par une ADN polymérase. Mais, dans ce cas, la réplication ne se fait pas entre deux origines de réplication, mais entre deux amorces se fixant chacune sur un brin de l'ADN matrice (Branger et al, 2007). 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.

Technique

- **Extraction de l'ADN total**

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

- **Recherche de gènes CTX-M par PCR**

Mettre dans des microtubes 2.5µl d'ADN et 10µl du mélange réactionnel. Placer les microtubes dans l'appareil à PCR pour l'amplification en appliquant le programme correspondant qui est de : 94°C pendant 10mn, 30 cycles de 94°C pendant 40sec, 55°C pendant 30sec, 72°C pendant 40sec et une élongation finale de 10mn à 72°C.

Le mélange réactionnel dans un volume de 12.5 µl

PCR master Mix (2X)	6,25µl
Amorce sences 25 µM	0,25µl
Amorce antisences 25 µM	0,25µl
H ₂ O	3,25µl
ADN.....	2,5µl

Tableau 4 : Les séquences des amorces utilisées pour la recherche du gène CTX-M et TEM (Kim et al., 2004).

Gènes	Amorces	Taille du fragment (pb)	Température d'hybridation
CTX-M	Up : GGTTAAAAAATCACTGCGTC Low: TTGGTGACGATTTTAGCCGC	550	55°C

II.3.1.7. Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose 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: 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. (Sambrook et al., 1989).

Technique

- préparation d'un gel d'agarose (1,2%) 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.
- 19mM d'EDTA.

Bleu de dépôt :

- Glycérol 50%
- EDTA-NA2 100mM pH : 8
- Sodium dodecyl sulfate (SDS) 3%

Résultats

Et

Discussion

III. RESULTATS ET DISCUSSION

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à la résistance bactérienne à deux molécules de Béta-lactamines, l'imipénème (IMP) et le céfoxitine (FOX), qui sont des antibiotiques puissants et sont des indicateurs de la production de mécanisme de résistance acquis. Quarante cinq souches lactose positif et résistantes à l'imipénème ou à la céfoxitine 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 Béta-lactamines.

III.1. Identification bactérienne

III.1.1. Identification des souches résistantes à l'imipénème

Les résultats de l'identification biochimique par galeries API20E de 23 souches résistantes à l'imipénème, ont révélé la présence de (Figure 11) : seize souches de *Stenotrophomonas maltophilia* (69,57%), quatre souches de *Pseudomonas oryzihabitans* (17,39%), une souche de *Pseudomonas luteola* (4,35%), une souche de *Vibrio fluvialis* (4,35%), et une souche de *Non fermenter sp* (4,35%).

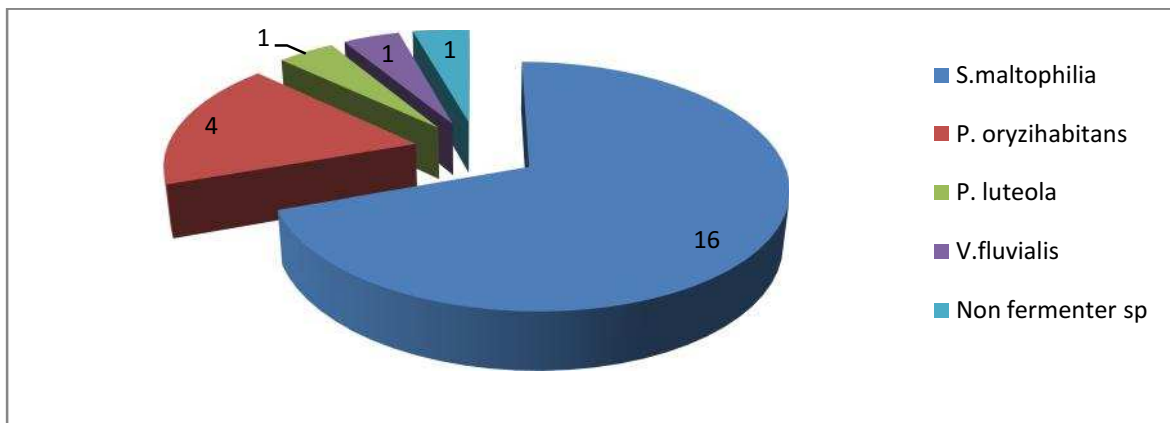


Figure 11: répartition des 23 souches résistantes à l'imipénème selon leur identité bactérienne.

Selon la nature des eaux, les espèces résistantes à l'imipénème sont réparties comme suit :

Dans l'eau usée: on a retrouvé des *S. maltophilia* (n=9), *P. Oryzihabitans* (n=3), *P. Luteola* (n=1), et *Non fermenter sp* (n=1) (Figure 12).

Dans l'eau traitée : on a observé la présence des *S.maltophilia* (n=7), *P.oryzihabitans* (n=1), et *V.fluvialis* (n=1) (Figure 13).

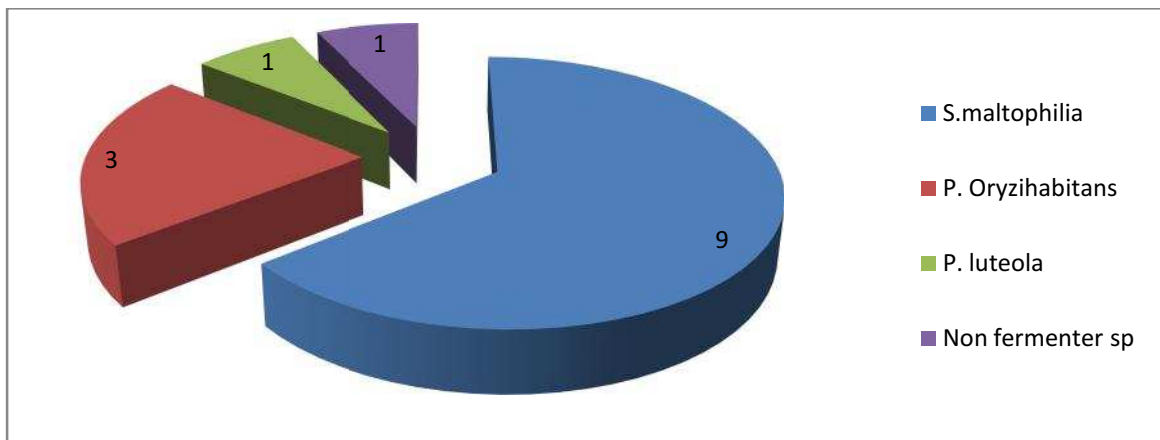


Figure 12: Répartition des 14 souches résistantes à l'imipénème isolées à partir des eaux usées de la STEP selon leur identification.

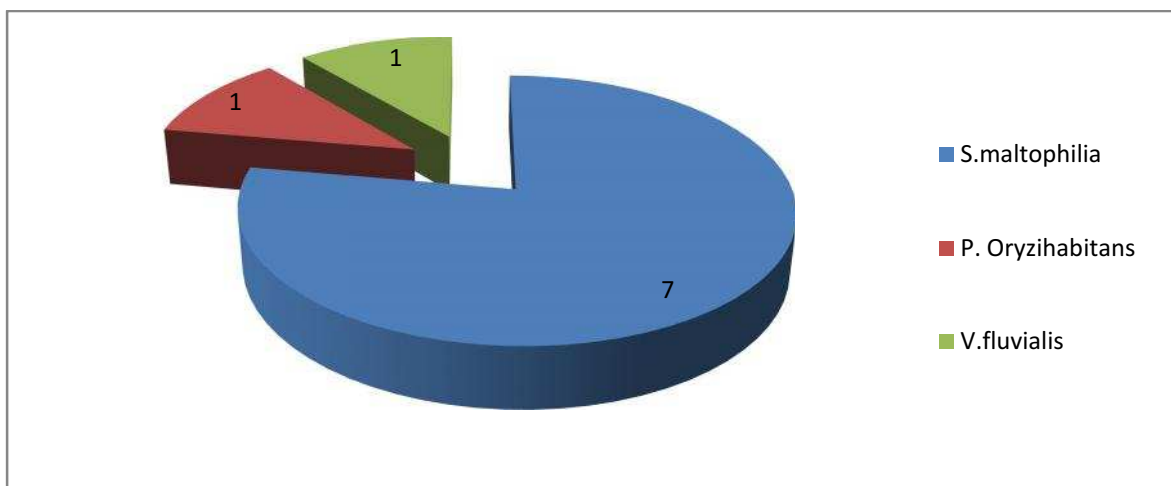


Figure 13: Répartition des 9 souches résistantes à l'imipénème isolées à partir des eaux traitées de la STEP selon leur identification.

III.1.2. Identification des souches résistantes à la céfoxitine

De la même façon que dans la collection imipénème, les résultats de l'identification biochimique par galeries API 20E des 22 souches isolées, ont révélé la présence de (Figure 14) : 15 souches d' *Enterobacter cloacae* (68,18%), 2 souche d' *Enterobacter asburiae* (9,09%), une souche d'*Enterobacter concerogenus* (4,55%), une souche de *Serratia liquifactia* (4,55%), une souche de *Serratia fonticola* (4,55%), une souche de *Pantoea spp2* (4,55%) et une souche d'*Aeromonas hydrophilia* (4,55%).

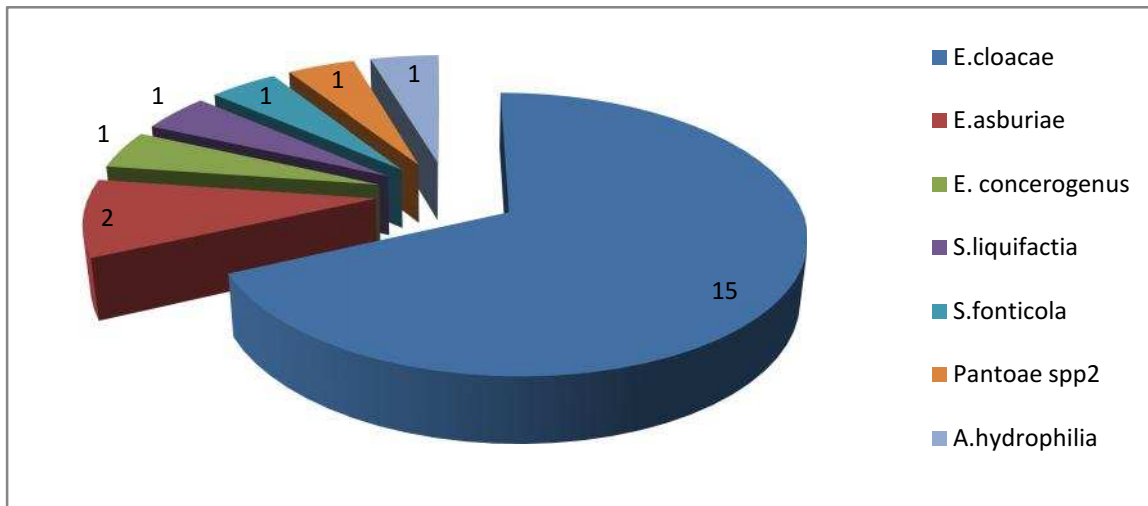


Figure 14: Répartition des 22 souches résistantes au céfoxitine selon leur identité bactérienne.

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

Dans l'eau usée : la prédominance de l'espèce *E. cloacae* (n=7), suivi par *E. asburiae* (n=2) et *S. Liquifactia* (n=1) (Figure 15).

Dans l'eau traitée : la prédominance de l'espèce *E. cloacae* (n=8), suivi par *E. concenterogenus* (n=1), *S. fonticola* (n=1), *Pantoae spp2* (n=1%) et *A. hydrophilia* (n=1) (Figure 16).

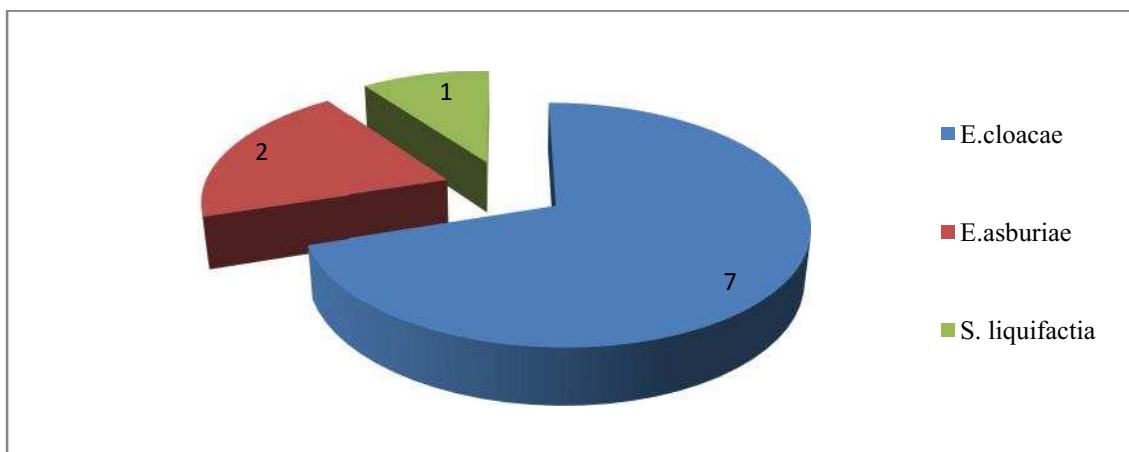


Figure 15: Identification des 10 souches résistantes à la céfoxitine isolées à partir des eaux usées de la STEP.

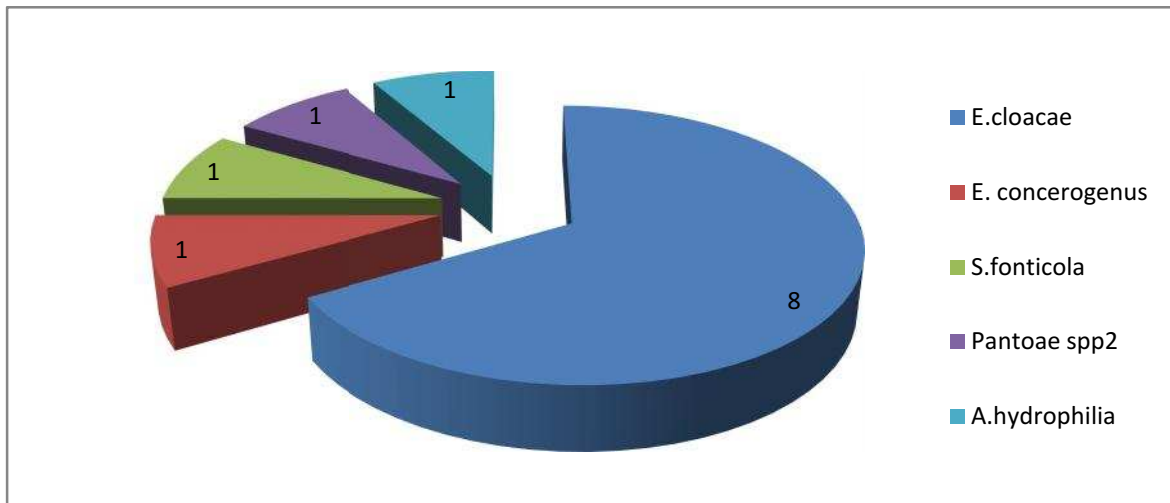


Figure 16: Identification des 12 souches résistantes à la céfoxitine isolées à partir des eaux traitée de la STEP.

III.2. Résistance aux antibiotiques

L'évaluation de la résistance de nos souches vis-à-vis de 17 antibiotiques dont 8 bêta - lactamines a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé.

III.2.1. Profils d'antibiorésistance des souches résistantes à l'imipénème

Les souches résistantes à l'imipénème au nombre de **23** ont présenté en plus de la résistance à l'imipénème, des résistances à l'amoxiciline (100%), céfoxitine (95,65), céfotaxime (95,65), aztréonam (82,61%), céftazidime (69,23%), céfépime (69,57%) et céfpirome (71,43%) (Figure 17).

En ce qui concerne les molécules non bêta-lactames, les souches ont présenté une résistance marquée à la kanamycine (91,30%), triméthprime (80%), tétracycline (73,91%), sulfamides (60,87%) et l'association sulfamethoxazole-triméthoprim (56,52%). Une résistance moyenne a été observée vis-à-vis de la gentamicine (33,33%), ciprofloxacine (17,39%), acide nalidixique (13,04%), et pefloxacine (13,04%) (Figure 17).

Les souches étudiées ont présenté un taux de résistance très élevé à la famille des bêta-lactamines (100%), suivi par les sulfamides-triméthoprim (95,65%), les aminosides (91,30%) et les tétracyclines (73,91%). Des faibles taux de résistance aux quinolones ont été observés (26,09%) (Figure 18).

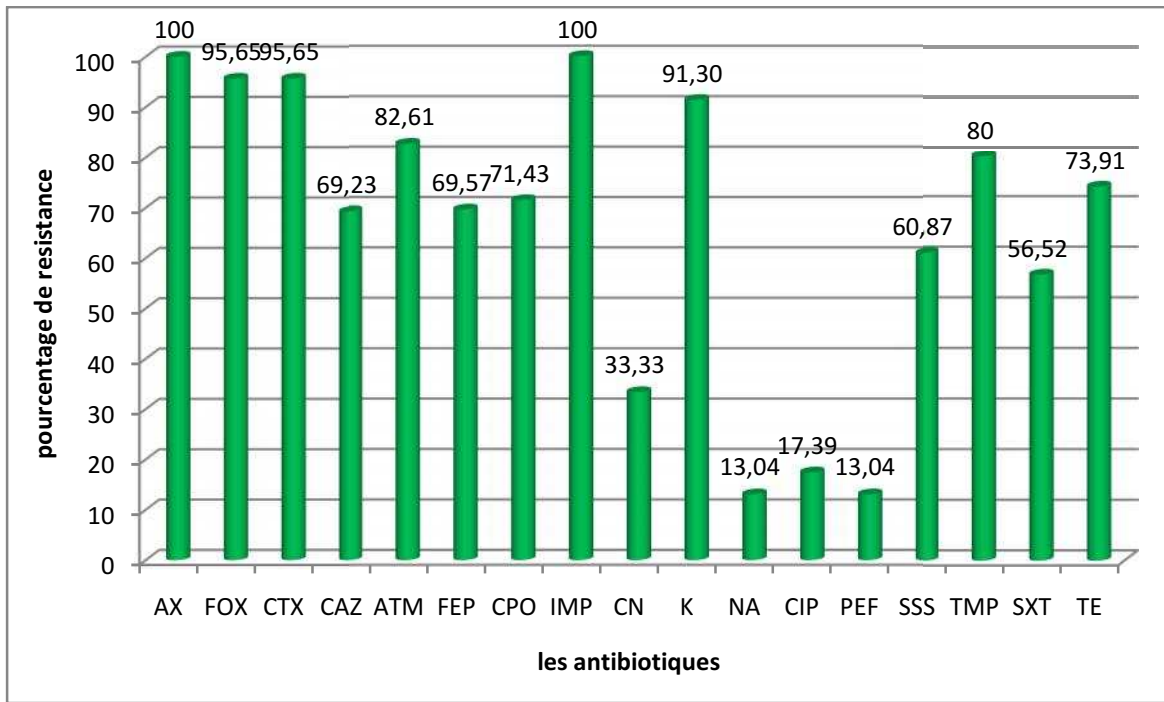


Figure 17: Taux de résistance des 23 souches bactériennes résistantes à l'imipénème.

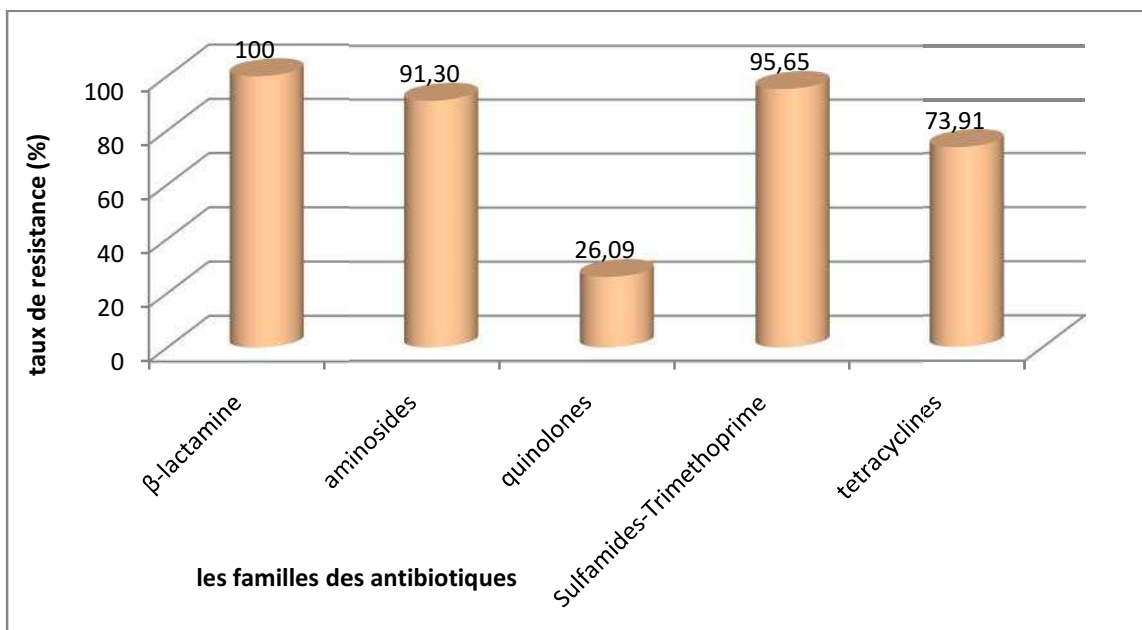


Figure 18: Taux de résistance des 23 souches résistantes à l'imipénème aux différentes familles d'antibiotique.

Toutes les souches bactériennes résistantes à l'imipénème isolées à partir des eaux usées (n=14) ont été trouvées résistantes à l'amoxicilline, la céfoxitine, l'aztréonam, le céfotaxime et la ceftazidime (6/6). La résistance aux céphalosporines de 4^{ème} génération a été marquée pour le céfépime (n= 11) et le céfpirome (n=5/6) (Figure 19)

En ce qui concerne les molécules non bêta-lactamines, une résistance marquée a été observée vis-à-vis de la kanamycine (n=14), tétracyclines (n=12), sulfamides (n=11) et de l'association sulfaméthoxazole-triméthoprim (n=10) et triméthoprim (n=3/4), un taux moyen pour la gentamicine (n=2/5). Toutes les souches ont été sensibles aux quinolones (acide nalidixique et perfloxacin) à l'exception de la ciprofloxacine (n=1/6) (Figure 20).

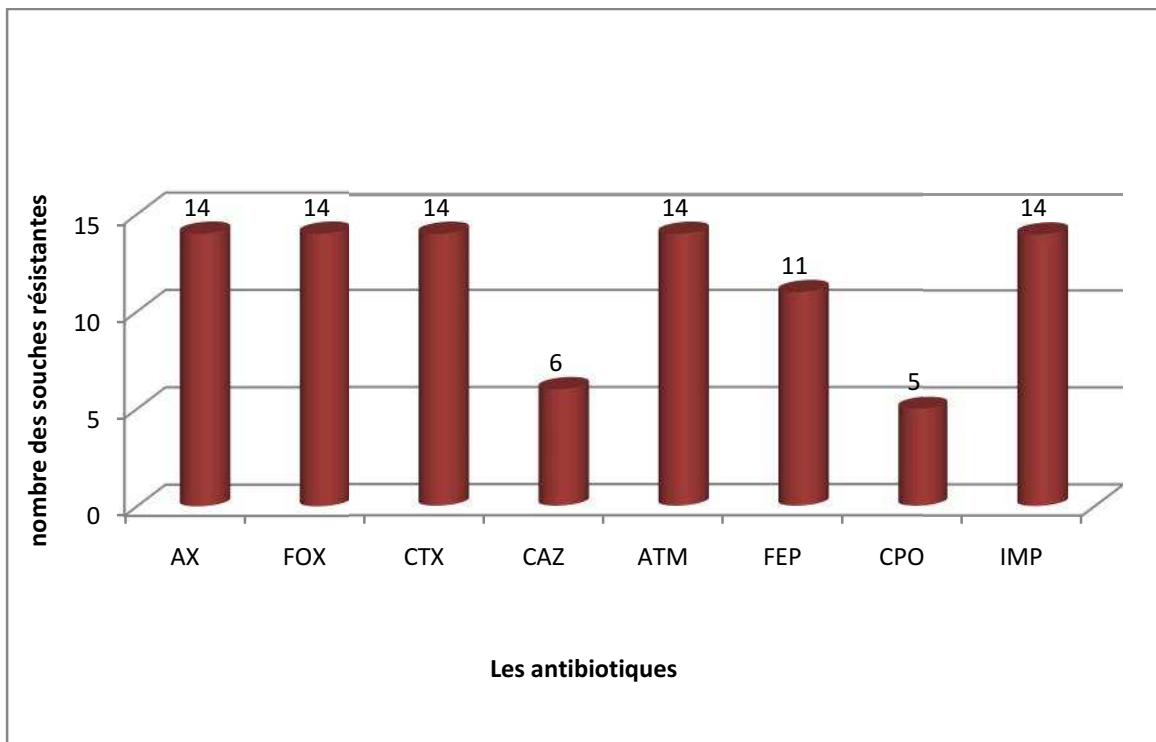


Figure 19: Résistance aux bêta-lactamines des 14 souches résistantes à l'imipénème isolées à partir des eaux usées de la STEP.

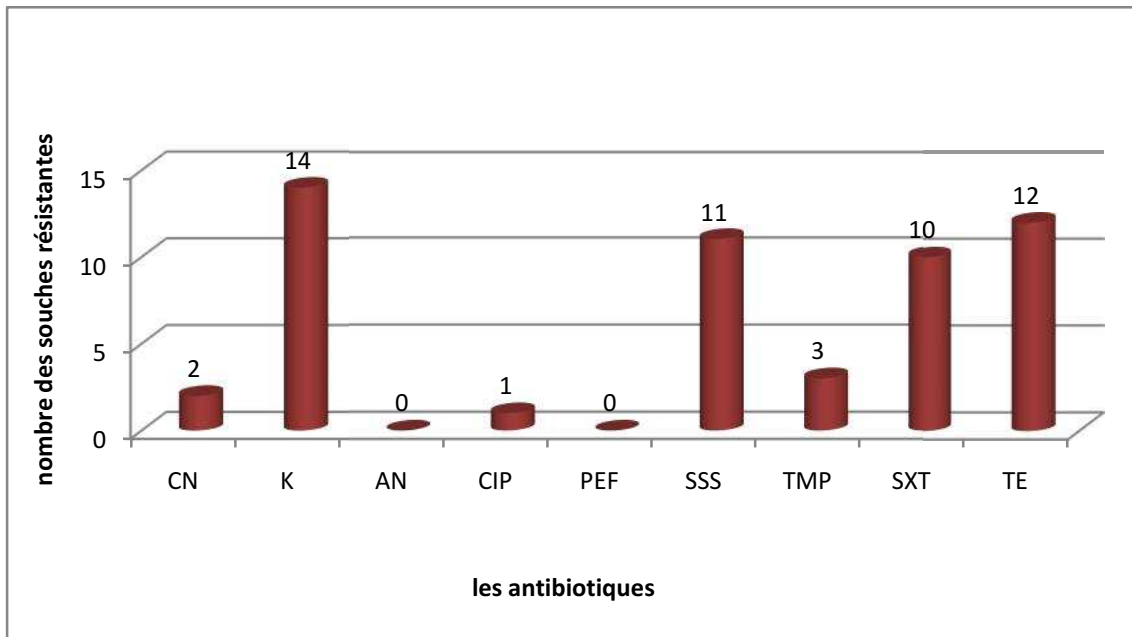


Figure 20: Résistance aux antibiotiques non bêta-lactames des 14 souches résistantes à l'imipénème isolées à partir des eaux usées de la STEP

Par comparaison aux résultats obtenus pour les eaux usées, nous avons constaté que les souches résistantes à l'imipénème isolées à partir des eaux traitées, ont présenté une résistance marquée à l'amoxicilline (n=9), le céfotaxime (n=8) et la céfoxitine (n=8) suivi de la résistance au céfpirome (n=5/7), à l'aztréonam (n=5), le céfépime (n=5) et la ceftazidime (n=3/7) (Figure 21).

En ce qui concerne les molécules non bêta-lactamines, nous avons observé une résistance importante au triméthoprim (n=5), à la kanamycine (n=7) et aux tétracyclines (n=5). Une résistance moyenne a été notée vis-à-vis des quinolones (acide nalidixique, ciprofloxacine et pefloxacine), des sulfamides et de l'association sulfaméthoxazole-triméthoprim avec un nombre de souche de 3 pour chacune de ces molécules et un nombre de souche de 2/7 ont été résistantes pour la gentamicine (Figure 22).

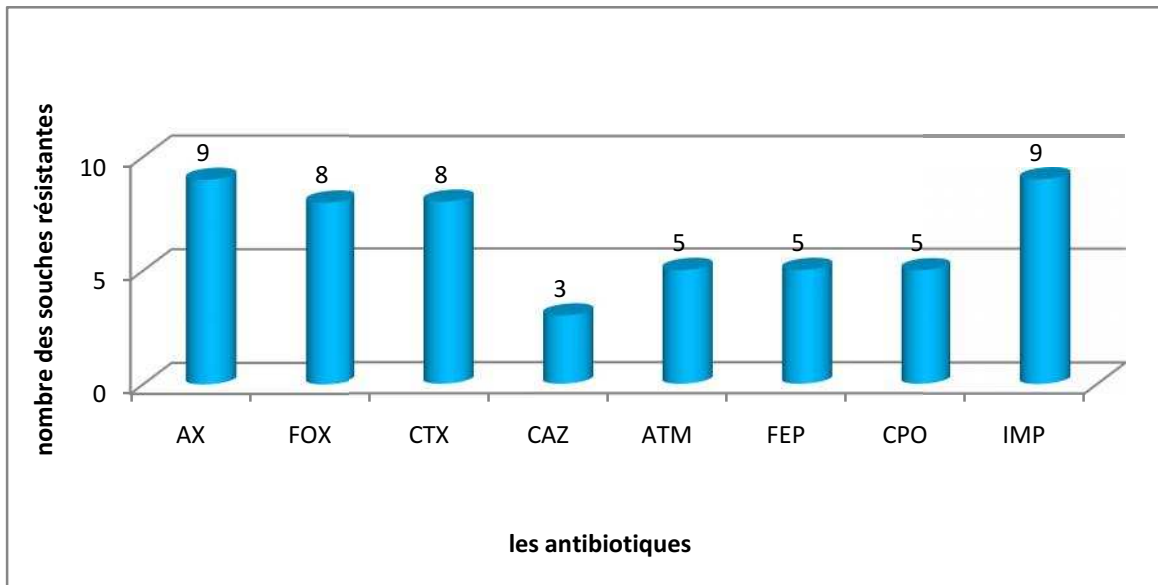


Figure 21: Résistance aux bêta-lactamines des 9 souches résistantes à l'imipénème isolées à partir des eaux traitées de la STEP

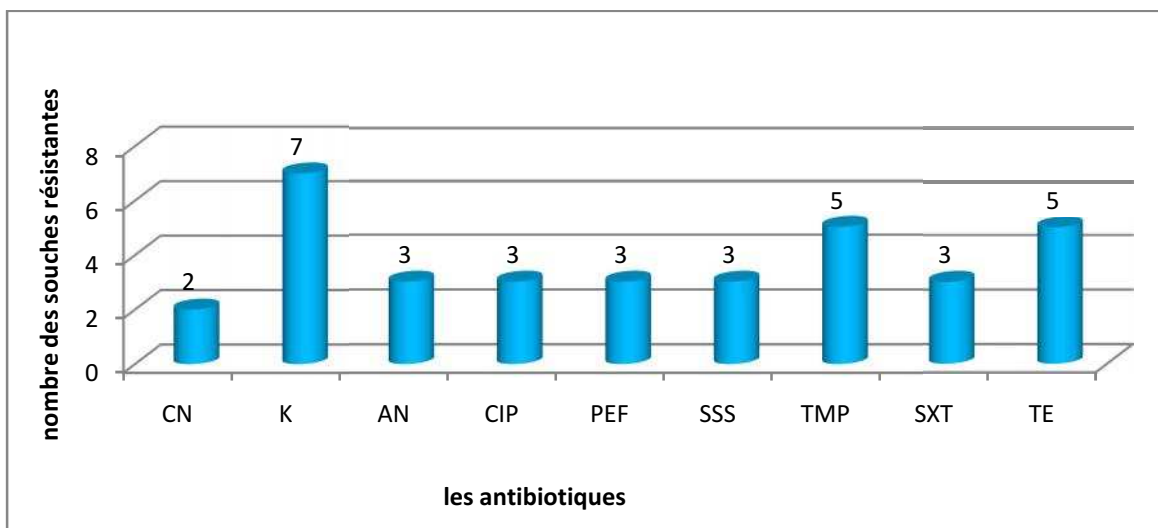


Figure 22: Résistance aux non bêta-lactamines des 9 souches résistantes à l'imipénème isolées à partir des eaux traitées de la STEP.

Les résultats obtenus ont montré une augmentation des taux de résistance dans les eaux traitées pour les quinolones (AN, CIP, PEF) et le triméthoprime. Alors que nous avons observé une diminution des taux de résistance pour les aminosides, tétracyclines, sulfamides et l'association sulfamides/sulfaméthoxazole.

Les 23 souches résistantes à l'imipénème ont été trouvées multirésistantes allant de 2 à 14 molécules (Tableau 5).

RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau 5: Profils d'antibiorésistance des 23 souches résistantes à l'imipénème

La souche		Antibiotype	N de R	EF	ET
T ₉	<i>V.fluvialus</i>	AX IMP	2	0	1
T ₁	<i>S.maltophilia</i>	AX IMP FOX CTX CIP TMP	6	0	1
F ₂₃	<i>S.maltophilia</i>	AX IMP ATM FOX CTX CAZ TMP K	8	1	0
F ₆	<i>P.oryzihabitans</i>	AX IMP ATM FOX CTX SXT TE K SSS	9	1	0
T ₁₁	<i>S.maltophilia</i>	AX IMP FOX CTX NA TMP TE PEF K	9	0	1
T ₁₉	<i>S.maltophilia</i>	AX IMP FOX CTX CPO CN TMP PEF K	9	0	1
F ₉	<i>P.luteola</i>	AX IMP ATM FOX CTX FEP SXT TE K SSS	10	4	0
F ₁₁	<i>S.maltophilia</i>				
F ₁₄	<i>P.oryzihabitans</i>				
F ₁₅	<i>Non fermenter sp</i>				
F ₂₄	<i>S.maltophilia</i>	AX IMP ATM FOX CTX FEP SXT TE K SSS	10	1	0
F ₂	<i>S.maltophilia</i>	AX IMP ATM FOX CTX CAZ FEP CPO K SSS	10	1	0
F ₄	<i>S.maltophilia</i>	AX IMP ATM FOX CTX FEP SXT TE K SSS	10	1	0
F ₇	<i>S.maltophilia</i>	AX IMP ATM FOX CTX FEP CIP SXT TE K SSS	11	1	0
T ₂	<i>S.maltophilia</i>	AX IMP ATM FOX CTX CAZ FEP CPO TMP K	10	0	1
T ₆	<i>S.maltophilia</i>	AX IMP ATM FOX CTX FEP NA SXT TE K SSS	11	0	1
F ₁	<i>S.maltophilia</i>	AX IMP ATM FOX CTX CAZ FEP CPO SXT TE K SSS	11	1	0
F ₂₇	<i>P.oryzihabitans</i>	AX IMP ATM FOX CTX CAZ CPO CN TMP TE K	11	1	0
B ₁	<i>S.maltophilia</i>	AX IMP ATM FOX CTX CAZ FEP CPO TMP TE K	11	1	1
T ₁₂	<i>S.maltophilia</i>				
F ₃	<i>S.maltophilia</i>	AX IMP ATM FOX CTX CAZ FEP CPO CN SXT TE K SSS	13	1	0
T ₈	<i>P.oryzihabitans</i>	AX IMP ATM FOX CTX CAZ FEP CPO CN CIP SXT TE K SSS	14	0	1
T ₁₃	<i>S.maltophilia</i>	AX IMP ATM FOX CTX FEP CPO NA CIP SXT TE PEF K SSS	14	0	1

EF : eaux usées ET : eaux traitées

III.2.2. Profils d'antibiorésistance des souches résistantes à la céfoxitine

Les souches résistantes à la céfoxitine ont présenté de faibles taux de résistance pour les autres molécules de bêta-lactamines à savoir le céfotaxime (n= 2, 9,09 %), le l'aztréonam (n=1 ,4,55 %), le céfépime (n=1 ,4,55 %), le ceftazidime (n=1 , 4,55%) et l'imipénème (n=1, 4,55%) avec une sensibilité au cefpirome.

Pour les autres molécules non bêta-lactames, nous avons noté une résistance marquée aux sulfamides (n=13 , 59,09%), de faibles taux de résistance pour l'acide nalidixique (n= , 13,64%), la pefloxacine (n=1 , 4,55%) et l'association sulfaméthoxazole-triméthoprime (n=1 , 4,55%). Toutes les souches ont été sensibles à la gentamicine, la kanamycine, la ciprofloxacine, le triméthoprime et les tétracyclines (Figure 23)

Les souches résistantes à la céfoxitine ont présenté un taux de résistance très élevé aux antibiotiques de la famille des Bêta-lactamines (100%) et de l'association sulfamides-triméthoprimes (59,09%). Un faible taux de résistance aux quinolones (9,09%) a été observé ainsi qu'une sensibilité aux tétracyclines et aux aminosides (Figure 24).

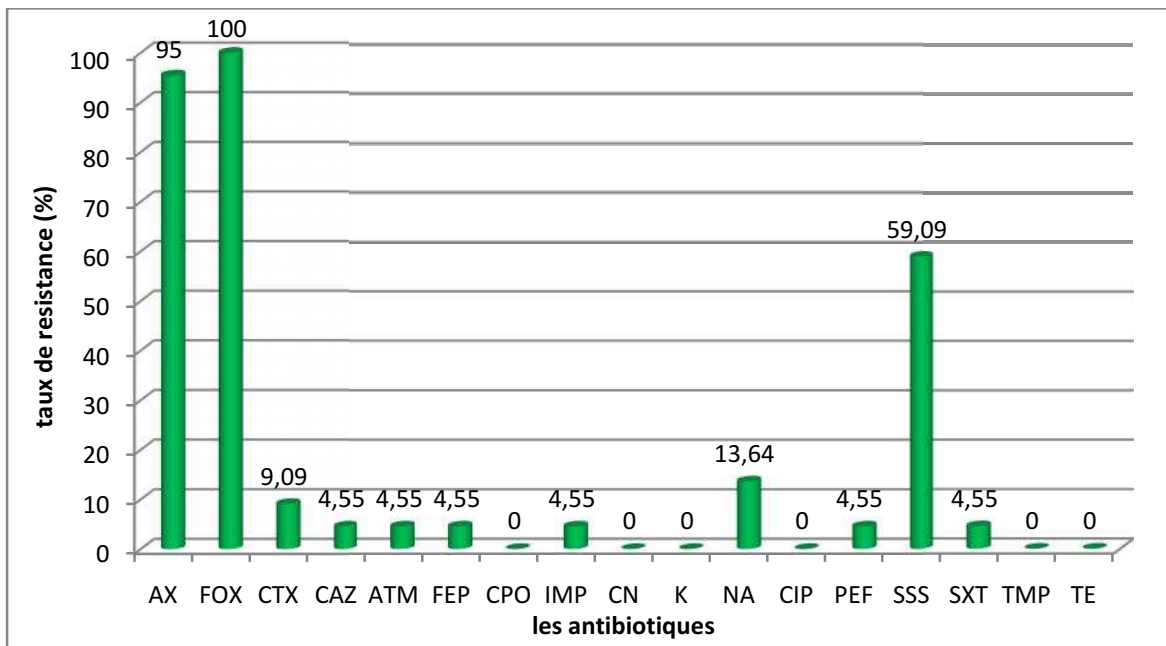


Figure 23: Taux de résistance aux antibiotiques des 22 souches résistantes à la céfoxitine isolées à partir des eaux usées et des eaux traitées de la STEP de Boumerdes.

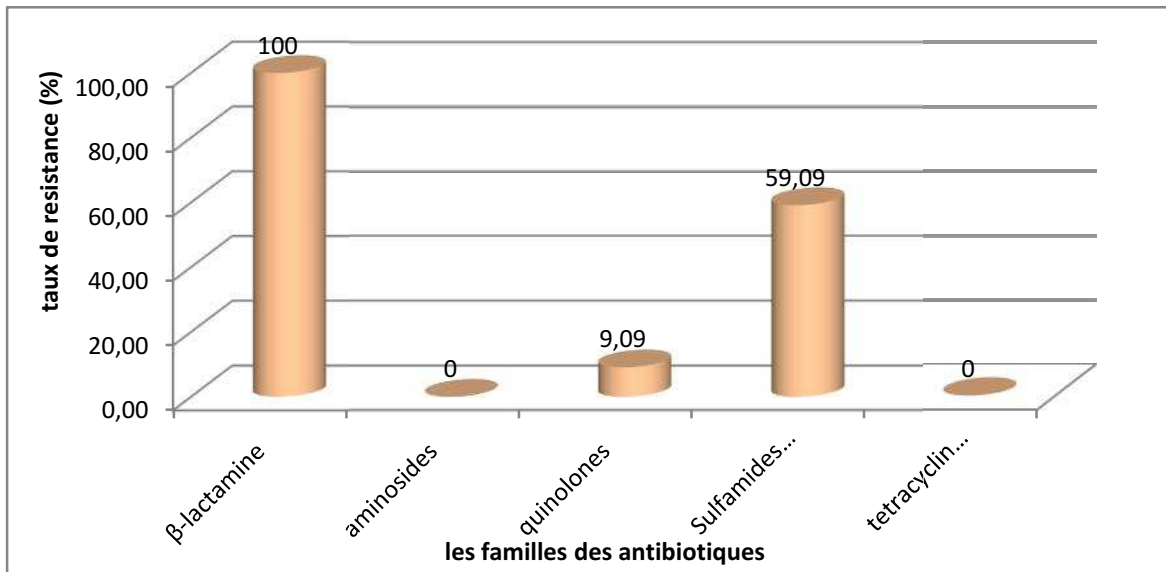


Figure 24: Taux de résistance des 22 souches résistantes à la céfoxitine pour les différentes familles d'antibiotiques

Concernant les bêta-lactamines, les souches retrouvées dans les eaux usées ont présenté en plus de la résistance à la céfoxitine, une résistance marquée à l'amoxicilline (n=10) et une sensibilité pour les autres bêta-lactamines (Figure 25). Alors que les souches retrouvées dans les eaux traitées, ont été trouvées résistantes à l'amoxicilline, et présentent un faible taux de résistance pour le céfotaxime (n=2), aztréonam (n=1), céftazidime (n=1), céfépime (n=1) et imipénème (n=1). Une sensibilité au céfpirome a été notée (Figure 26).

Concernant les molécules non bêta-lactames, les souches résistantes à la céfoxitine retrouvées dans les eaux usées ont présenté une sensibilité à toutes les molécules à l'exception des sulfamides (n=3) et l'acide nalidixique (n=2) (Figure 27).

De la même façon que dans l'eau usée, les souches retrouvées dans l'eau traitée ont présenté un taux de résistance très élevé pour les sulfamides (n=10). De faibles taux ont été observés pour l'acide nalidixique (n=1), la sulfamide-triméthoprim (n=1/2), pefloxacine (n=1). Une sensibilité des souches a été notée vis-à-vis du ciprofloxacine, la triméthoprim, la tétracycline et kanamycine (Figure 28).

Les souches résistantes au céfoxitine isolées à partir des eaux usées et des eaux traitées ont été résistantes à plus d'une molécule avec 6 profils différents allant de 1 à 7 molécules d'antibiotiques (Tableau 6).

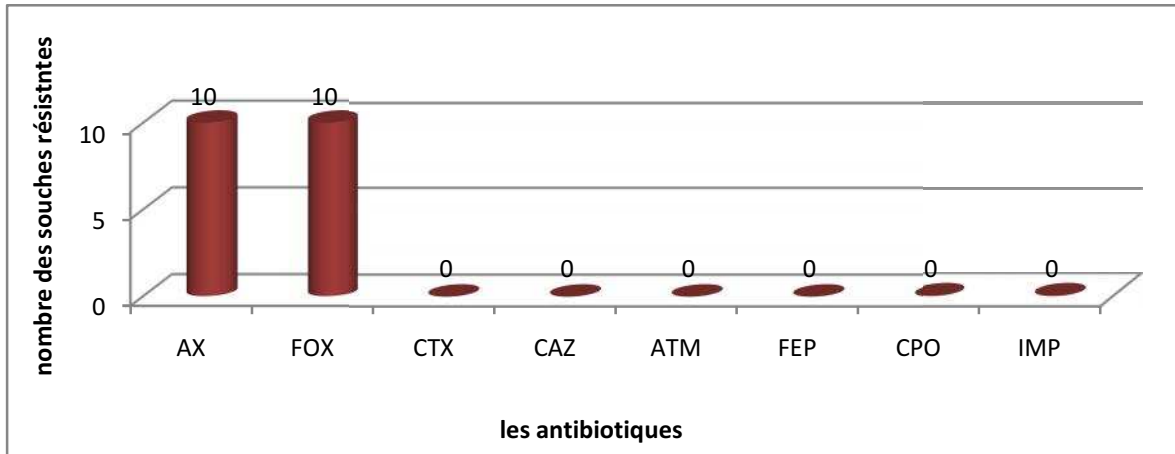


Figure 25: résistance aux Béta-lactamines des 10 souches résistantes à la céfoxitine isolées a partir des eaux usées de la STEP.

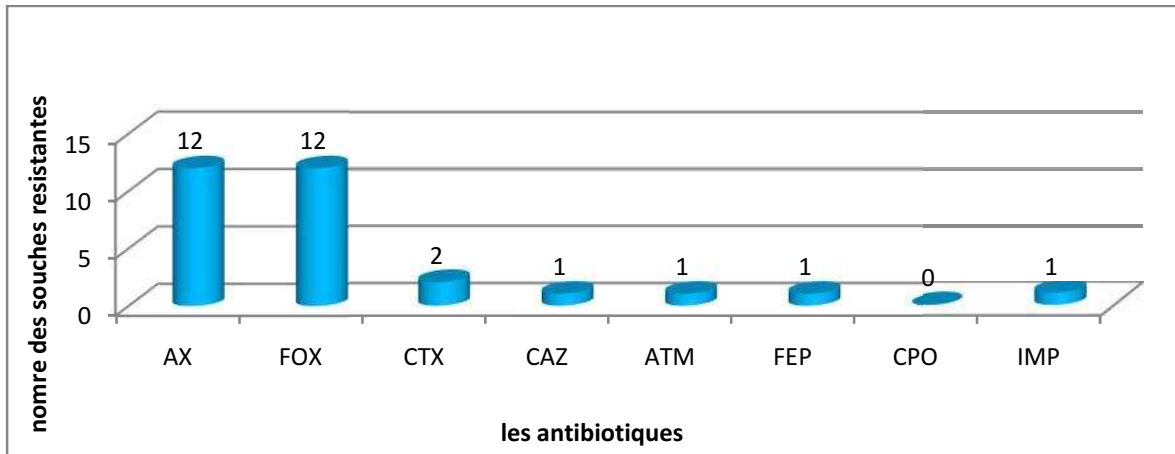


Figure 26 : résistance aux Béta-lactamines des 12 souches résistantes à la céfoxitine isolées à partir des eaux traitées de la STEP.

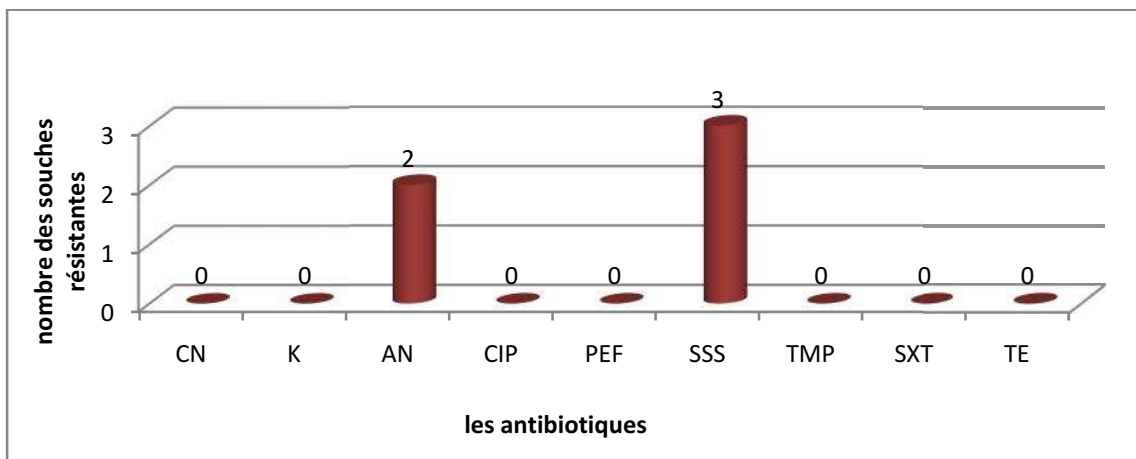


Figure 27: résistance aux non Béta-lactamines des 10 souches résistantes à la céfoxitine isolées à partir des eaux usées de la STEP.

RESULTATS ET DISCUSSION

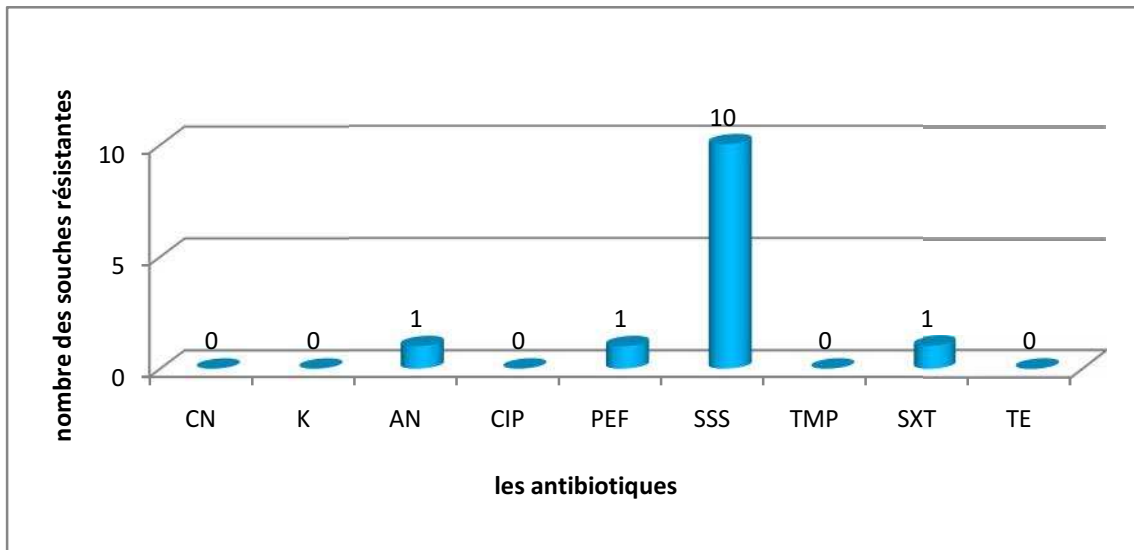


Figure 28: résistance aux antibiotiques non bêta-lactames des 12 souches résistantes à la céfoxitine isolées à partir des eaux traitées de la STEP.

Tableau 6: Profils d'antibiorésistance des 22 souches résistantes au céfoxitine

La souche		Antibiotype	N de R	EF	ET
DF ₃	<i>E.cloacae</i>	FOX	1	1	0
DF ₁	<i>E.cloacae</i>	FOX AX	2	6	2
DF ₂	<i>E.cloacae</i>				
DF ₅	<i>E.cloacae</i>				
DF ₁₁	<i>E.cloacae</i>				
DF ₁₃	<i>E.cloacae</i>				
DF ₁₆	<i>S. liquifaciens</i>				
DT ₁₂	<i>Serratia.Fonticola</i>				
DT ₁₆	<i>E.cloacae</i>	FOX AX NA SSS	4	2	0
DF ₉	<i>E.asburiae</i>				
DF ₁₉	<i>E.asburiae</i>	FOX AX SSS	3	1	8
DF ₁₂	<i>E.cloacae</i>				
DT ₃	<i>E.cloacae</i>				
DT ₆	<i>E.cloacae</i>				
DT ₁₃	<i>Pantoea Spp</i>				
DT ₁₉	<i>A.hydrophilia</i>				
DT ₂₁	<i>E.cocergenus</i>				
DT ₂₂	<i>E.cloacae</i>				
DT ₂₃	<i>E.cloacae</i>				
DT ₂₄	<i>E.cloacae</i>	IMP FOX CTX AX NA PEF SSS	7	0	1
DT ₈	<i>E.cloacae</i>				
DT ₁₁	<i>E.cloacae</i>	ATM FOX CTX CAZ AX SXT SSS	7	0	1

III. 3. La production d'une bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE)

La recherche de BLSE a été réalisée par le test de synergie entre un disque central d'amoxicilline + acide clavulanique distant de 30 mm de disques de céphalosporines de 3^{ème} (céfotaxime, ou ceftazidime) ou 4^{ème} génération (FEP, CPO) et/ou l'aztréonam. La présence de BLSE est suspectée devant un aspect en bâtonnet, ovale ou en bouchon de champagne (Jarlier, 1988 ; Vedel, 1997) (Figure 29).

Le test DDS a été positif pour 8 souches résistantes à l'imipénème parmi 45 souches testées, soit un taux de 17,77 %, avec une prédominance de *S.maltophilia* (n=8) dont trois retrouvées dans les eaux usées et cinq dans les eaux traitées (Tableau7).

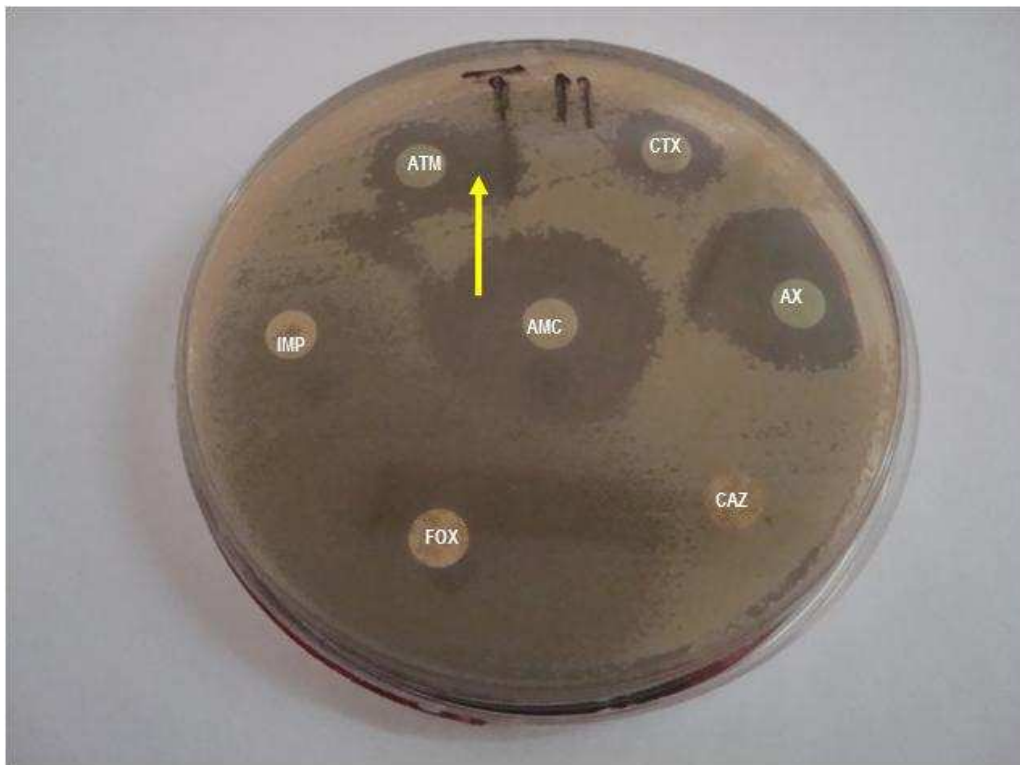


Figure 29: Illustration d'une image de synergie chez *S.maltophilia*.

Tableau 7: Les souches positives pour le test de synergie

Souche	Identification	origine	Isolée sur	synergie
F ₂	<i>S.maltophilia</i>	Eau usée	IMP	CPO FEP
F ₂₃	<i>S.maltophilia</i>	Eau usée	IMP	FEP
B ₁	<i>S.maltophilia</i>	Eau usée	IMP	FEP
T ₁	<i>S.maltophilia</i>	Eau traitée	IMP	CPO FEP
T ₂	<i>S.maltophilia</i>	Eau traitée	IMP	CPO
T ₁₁	<i>S.maltophilia</i>	Eau traitée	IMP	CPO
T ₁₂	<i>S.maltophilia</i>	Eau traitée	IMP	FEP
T ₁₉	<i>S.maltophilia</i>	Eau traitée	IMP	CPO FEP

III.4. la production d'une céphalosporinase inductible

La recherche d'une céphalosporinase inductible a été recherchée par le test d'antagonisme. Ce test a été positif pour 20 de souches résistantes à la céfoxitine dont 13 *E. cloacae*, 2 *E.cocergenus*, 2 *E.asburiae*, 1 *S. liquifactia*, 1 *Pantoea sp*, 1 *A. hydrophila* et deux souches de résistante à l'imipénème, une *V.fluvialis* et une *P.oryzihabitans* (figure 30, tableau 8).

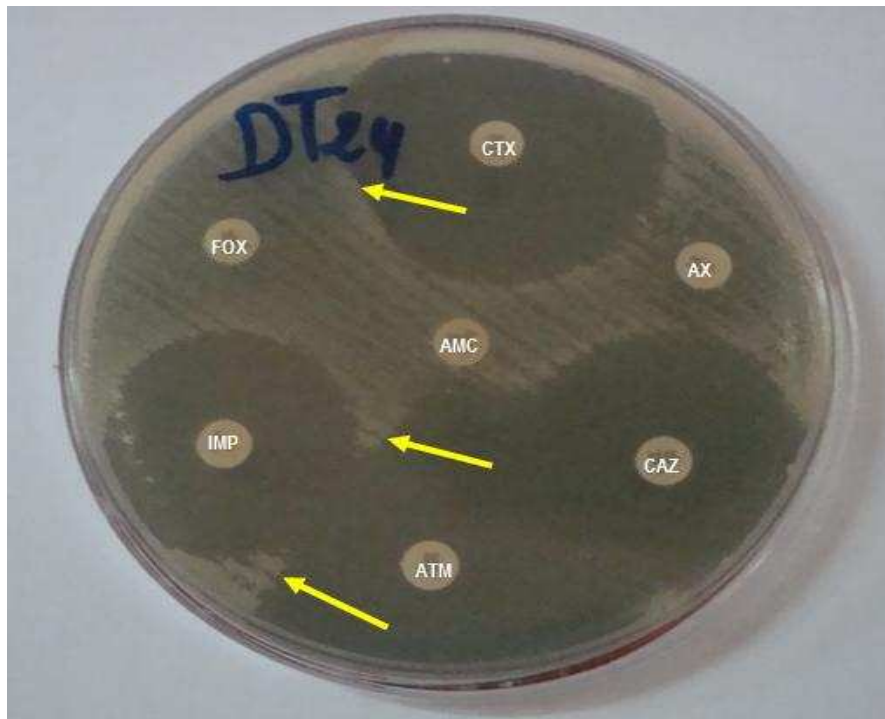


Figure 30: illustration d'une image d'antagonisme entre CTX et FOX et entre ATM et IPM.

Tableau 8: Les souches positives pour le test d'antagonisme.

Souche	Identification	origine	Isolée sur	antagonisme
F ₂₇	<i>P.oryzihabitans</i>	Eau usée	IMP	FEP
T9	<i>V.fluivialus</i>	Eau traitée	IMP	FOX IMP
DF1	<i>E.cloacae</i>	Eau usée	FOX	CTX ATM
DF2	<i>E.cloacae</i>	Eau usée	FOX	ATM-IMP CTX-FOX
DF5	<i>E.cloacae</i>	Eau usée	FOX	ATM-IMP FOX -CTX
DF ₉	<i>E.asburiae</i>	Eau usée	FOX	ATM-AMC
DF13	<i>E.cloacae</i>	Eau usée	FOX	FOX -CTX IMP -ATM
DF16	<i>S.liquifaciens</i>	Eau usée	FOX	ATM-IMP
DF19	<i>E.asburiae</i>	Eau usée	FOX	ATM-IMP CTX-FOX
DF11	<i>E.cloacae</i>	Eau usée	FOX	ATM-IMP CTX-FOX
DF12	<i>E.cloacae</i>	Eau usée	FOX	ATM-IMP CTX-CAZ
DT3	<i>E.cloacae</i>	Eau traitée	FOX	CTX-FOX ATM-IMP
DT6	<i>E.cloacae</i>	Eau traitée	FOX	ATM-IMP
DT ₁₁	<i>E.cloacae</i>	Eau traitée	FOX	ATM-AMC
DT ₁₂	<i>S.Fonticola</i>	Eau traitée	FOX	ATM-AMC
DT13	<i>Pantoea Spp</i>	Eau traitée	FOX	CTX-FOX ATM-IMP
DT16	<i>E.cloacae</i>	Eau traitée	FOX	ATM-IMP
DT19	<i>A.hydrophilia</i>	Eau traitée	FOX	CTX-FOX
DT21	<i>E.cocergenus</i>	Eau traitée	FOX	ATM-IMP CTX-FOX
DT22	<i>E.cocergenus</i>	Eau traitée	FOX	ATM-IMP
DT23	<i>E.cloacae</i>	Eau traitée	FOX	ATM-IMP FOX-CTX
DT24	<i>E.cloacae</i>	Eau traitée	FOX	CTX-FOX ATM-AMC

III.3. Recherche du gène *bla*_{CTX-M}

Les souches de *S.maltophilia* résistantes au céfotaxime peuvent contenir le gène *bla*_{CTX-M}. La recherche par PCR a montré l'absence de ce gène chez **8** *S.maltophilia* testées (Figure 31).



Figure 31: Recherche du gène *bla*_{CTX-M} par PCR chez des souches de *S.maltophilia* DDST+.

C- : contrôle négatif, C+ : contrôle positif avec une taille de 550pb, M : marqueur de taille 100pb DNA ladder. Sens de migration : du haut (-) vers le bas (+).

Discussion

Cette étude a été effectuée sur un collectif de 45 souches résistantes à l'imipénème ou à la céfoxitine isolées en 2010 à partir des eaux usées et des eaux traitées de la station d'épuration urbaine de Boumerdès. L'objectif de cette étude a été la caractérisation chez des mécanismes de résistance aux bêta-lactamines chez ces souches.

Les souches résistantes à l'imipénème sont représentées majoritairement par des bacilles à Gram négatif non fermentaires autochtones au milieu aquatique et ils sont connus pour être des pathogènes opportunistes responsable d'infections nosocomiales (**Bertholet et al., 2005**). En plus de la résistance à l'imipénème, ces souches ont été résistantes à la majorité des bêta-lactamines testées. Ces résultats corroborent les données de la littérature qui rapportent que les bactéries à Gram négatif sont responsables de la dissémination de la résistance dans l'environnement (**Matyar et al., 2008, Alouache et al., 2012 ; Kada, 2012**).

La lecture interprétative des profils de résistance des souches de *S. maltophilia* montre que la résistance de cette espèce très prédominante est la résultante d'une résistance intrinsèque de la souche par la production de deux bêta-lactamases chromosomiques inductibles L1 et L2 ; la première est une métallo-bêta-lactamase qui confère la résistance aux bêta-lactamines dont l'imipénème excepté l'aztréonam, alors que la deuxième est une bêta-lactamase à spectre élargi qui confère la résistance à l'aztréonam et est inhibée par l'acide clavulanique (**Lavigne et al., 2008 ; Bush et Jacoby, 2010**). Pour les autres souches, la résistance à l'imipénème serait due soit à l'imperméabilité ou à la perte de porines.

Comme nos souches ont été sélectionnées sur l'imipénème, ces résistance observées pour les autres familles serait le produit d'une co-sélection de plusieurs familles d'antibiotiques, ce qui a été rapporté dans plusieurs études (**Neela et al., 2007, Alouache et al., 2012**). En effet, il a été observé des taux de résistance marqués pour la kanamycine, triméthoprime, sulfamides, triméthoprimes-sulfaméthoxazole et les tétracyclines, qui sont des molécules utilisées pour la majorité dans l'agriculture et l'aquaculture afin de promouvoir la croissance ainsi qu'en médecine humaine et vétérinaire (**Kummerer, 2004**). Cette multirésistance peut être expliquée chez *S. maltophilia* par une diminution de la

perméabilité de la souche, ce qui lui confère une résistance simultanée à plusieurs familles exemple les aminosides, tétracyclines et bêta-lactamines (**Lavigne et al., 2008**).

En ce qui concerne les souches résistantes à la céfoxitine, elles font partie pour la majorité, de la famille des entérobactéries (*Enterobacter*, *Serratia*) et une seule souche d'*A.hydrophila*. La résistance de ces souches est assurée par une résistance intrinsèque assurée par la production d'une céphalosporinase chromosomique de type AmpC (**Vedel, 1997 ; Martin, 2008**).

La recherche de ces céphalosporinases inductibles par le test d'antagonisme a été concluante pour la majorité des souches (44,44 %), ce qui confirme la présence de cette enzyme chez nos souches (**Vedel, 1997**). Certaines souches ont été négatives pour le test d'antagonisme, ceci serait due soit à l'absence de la céphalosporinase ou à son hyperexpression (**Vedel, 1997**).

Les souches résistantes à la céfoxitine ne sont pas très multirésistantes avec 6 profils différents allant de 2 à 7 molécules seulement. Une résistance associée a été observée avec les sulfamides.

Le test de synergie utilisé pour la mise en évidence de la production de BLSE a été positif chez 8 souches de *S. maltophilia* isolés sur l'imipénème. Cette image de synergie est le produit de l'expression de la BLSE chromosomique de type L2 chez *S.maltophilia* (**Lavigne et al., 2008**).

Le phénotype multi-résistant de la souche de *S.maltophilia* peut cacher la présence d'une BLSE plasmidique (**Lavigne et al., 2008**). A cet effet, une recherche par amplification du gène *bla_{CTX-M}* a été effectuée chez les souches de *S.maltophilia* DDST+ mais elle n'a pas été concluante.

Les antibiotiques ainsi que les bactéries résistantes excrétés dans les eaux usées via les fèces passent par les stations d'épurations. Les conditions d'épuration créeraient une sorte de vivier favorable aux échanges de séquences génétiques responsables de la résistance aux antibiotiques. En effet, les bassins mettent en contact des bactéries normalement présentes dans le corps humain avec des bactéries déjà adaptées au milieu environnemental à des densités favorisant les échanges de séquences mobiles (**Caboche et al., 1998**)

D'après les résultats obtenus nous avons constaté que le traitement réalisé au niveau de la station favorise la survie et l'augmentation de la résistance aux antibiotiques pour certaines familles d'antibiotiques exemple les bêta-lactamines (**Gardabassi et al., 2002**). De plus, les résultats indiquent que la résistance n'est ni dépendante d'un plasmide ni transférable par un procédé de conjugaison. Mais plus une sélection de micro-organismes naturellement multi-résistants (**BREUIL, 1990**).

Conclusion

CONCLUSION

Le but de cette étude a été la caractérisation des mécanismes de résistance aux céphalosporines à large spectre (imipénème et céfoxitine) chez 45 souches isolées à partir des eaux usées avant et après traitement au niveau de la station d'épuration des eaux usées urbaines de la wilaya de Boumerdès.

Selon les résultats obtenus dans ce travail nous avons pu constater que :

- La station d'épuration a permis la sélection et le maintien de souches naturellement résistantes à l'imipénème ex *S.maltophilia* qui est une bactérie pathogène opportuniste multirésistante. De même pour la céfoxitine, les bactéries isolées font partie majoritairement du genre *E.cloacae* qui présente une céphalosporinase inductible.
- Le traitement biologique par boues activées ne favorise pas une augmentation significative de la résistance aux antibiotiques chez les souches imipénème-résistantes et les souches céfoxitine-résistantes.
- Le test de synergie a révélé que 8 *S.maltophilia* sur les 45 souches étudiées ont été productrices de BLSE. Cette dernière est chromosomique chez cette espèce. La recherche d'une éventuelle BLSE plasmidique de type CTX-M, présente chez *S.maltophilia* synergie positif a été non concluante.

En perspective, il est intéressant de :

- Recommander le traitement tertiaire par désinfections des eaux traitées.
- Inciter les industriels (abattoirs, ...etc) et particulièrement les hôpitaux à se doter d'un système interne d'épuration des eaux usées.
- Assurer un suivi régulier de la qualité des eaux aux des STEP
- Contrôle de la qualité des eaux traitées avant leur réutilisation pour l'irrigation.

Bibliographies

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Alouache S., Kada M., Messai Y., Estepa V., Tres C., et Bakour R., 2012. Antibiotic Resistance and Extended-Spectrum β -Lactamases in Isolated Bacteria from Seawater of Algiers Beaches (Algeria). *Microbes Environ.* 27: 80–86.

Altmeyer N., Abadia G., Schmitt S. et Leprince A., 1990. Risques microbiologiques et travail dans les stations d'épurations des eaux usées. ISSN 0339-6517 – ISBN 2-7389-0042-9.

Arlet G., Philippon A., 2003. β -Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel. *Annales de biologie clinique.* 64 (1): 37-51.

Archambaud.M. 2009. Action des antibiotiques. Laboratoire Bactériologie-Hygiène. Ranguel Toulouse.

B

Badia-gondard. F. Février 2003. L'assainissement des eaux usées.229p

Barrial. K et Scotet. J. 2006. Classification raisonnée des Beta-lactamases chez les bacilles Gram négatif, perspectives d'évolution

Berkane jamai et Zian bekhta. 2009. Effet du traitement des eaux sur la résistance aux antibiotiques au niveau de la STEP de Boumerdes. Mémoire d'ingénieur l'ENSSMAL

Boeglin. J –C. 2000. L'eau et l'industrie. 355p.

Barthelot P., Grattard F., Mallaval F.O., Ros A., Lucht F., et Pozzetto B., 2005. Épidémiologie des infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* et *Stenotrophomonas maltophilia*. *Pathol. Biol. (Paris).* 53: 341–348

Branger A., Richer M., et Roustel.S. 2007. Alimentation, sécurité et contrôle microbiologique. Edition martin poillot. Dijon. ISBN: 978-2-84444-616-9. 115p.

Breuil J., Podglajen I., Collatz E., Salmon V., et Dublanchet A., 1990. sélection *in vitro* de *bacteroides fragilis* résistant a l'imipénème (imp-r). résistance a haut niveau par production de b ta-lactamase

Bryskier. 1999. Antibiotiques agent antibactérien et antifongique. Ellipses ED : 436-440.

C

CA-SFM, 2010. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, recommandation 2010. <http://www.sfm.asso.fr>. 50p.

Cardot C. 2005. Génie de l'environnement ; les traitements de l'eau pour l'ingénieur. Cold Spring Harbor Laboratory Press.N.Y. ISBN 2-7298-5981-0

Cattoir V., 2008. Les nouvelles B-lactamases à spectre étendu (BLSE). 209p.

Cavallo J.D., FABRE R., JEHL F., Rapp C., et Garrabe E., 2004. Bêtalactamines, Bêtalactam antibiotics. 74p.

Cardot C., 2001. Génie de l'environnement : techniques appliquées au traitement de l'eau

Crini G. et Badot P.M., 2007. Traitement et épuration des eaux industrielles polluées. ISBN 978-2-84867-197-0. 352p

Caboch M., Chupeau Y., Dumas C., Ehrlich S.D., Gruss A., Hudebine L.M. et Maguin E., 1998. Organismes génétiquement modifiés

Cavallo J.D., De Mouy D., Fabre R., Garrabe E., Armengaud M., 1998. *Pseudomonas aeruginosa* en pratique de ville : étude AFORCOPIBIO 1995-1996. *Méd mal infect.* 28: 258-259.

Cuzon G., Naas T., Nordmann P., 2010. Carbapénémases de type KPC : quel enjeu en microbiologie clinique ? KPC carbapenemases: What issue in clinical microbiology?

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

D

Delery L., 1999. Antibiorésistance bactérienne dans l'eau : problématique de la transmission de l'animal à l'homme. Mémoire de fin d'étude de formation des ingénieurs du génie sanitaire

Dupray E. et Derrien A., 1994. Influence du passage de *Salmonella spp.* Et *E.coli* en eaux usées sur leur survie ultérieure en eau de mer. Ifremer, centre de Brest, laboratoire microbiologie del, b.p. 70, 29280 Plouzané 6, France

E

Emmanuel E., 2004. Evaluation des risques sanitaires et écotoxicologiques liés aux effluents hospitaliers. Thèse de doctorat.

F

Faure S., 2009. Transfert d'un gène de résistance aux B-lactamines *bla_{CTX-M-9}* entre *Salmonella* et les enterobactéries de la flore intestinale humaine : impact d'une antibiothérapie. Thèse doctorat.

Figueiredo S., 2011. *Acinetobacter* spp. et réservoir de gènes de carbapénèmases. Thèse doctorat. tel-00743039, version 1 - 18 Oct 2012. 206p.

G

Gomella C., et Guerree H., 1978. Le traitement des eaux publiques industrielles et privées, Extended spectrum β -lactamases mediated bacterial resistance: Implications for the intensivist. ISBN 2-87080-024-X. 205p.

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.

H

Haut Conseil de la santé publique (HCSP). Novembre 2010. Maîtrise de la diffusion des bactéries multirésistantes aux antibiotiques importées en France.

J

Jarlier V., Nicolas M., Fournier G., Philippon A., 1988. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agent in *antirobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Revue. Infection. Des.* 4 :143-149.

Jacoby G.A., Medeiros A., 1991. extended-spectrum β -lactamases and other enzyme providing resistance to oxyimino- β -lactams. *Infect. Dis. Clin. North america.* 11 :875-887.

Joly et Raymond, 2003. Novel carbenicillin-hydrolyzing β -lactamase(CARB-5) from *Acinetobacter calcoaceticus* var.*anitratus*.

K

KADA M., 2012. Détections de la résistance bactérienne aux antibiotiques dans l'environnement marin, influence des apports anthropiques. Thèse de magistère.

Kim Y.K., Pai H., Lee H.J., Park S.E., Choi E.H., et Kim E.C. 2002. Bloodstream infection by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. *A.A. Chemother.*46:1481-1491.

Koller E., 2004. Traitement des pollutions industrielles : Eau, Air, Déchets, Sols, Boues. Edition DUNOD.

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

L

Laurent F., 2009. Principales β -lactamines : Pénicillines G, A, M, inhibiteurs de β lactamases, Uréidopénicillines, Carboxypénicillines C1G, C2G, C3G, Monobactames Carbapénèmes. Laboratoire de Microbiologie Groupement Hospitalier Nord. 77p.

Lavigne J.P., 2007. Effet des antibiotiques et mécanismes de résistances.

Lavigne J.P., Gaillard J.B., Bourg G., Tichit C., Lecaillon E., and Sotto A. 2008. Étude de souches de *Stenotrophomonas maltophilia* sécrétrices de BLSE : détection de CTX-M et étude de la virulence. Pathol. Biol. (Paris). 56: 447–453.

M

Martin C., 2008. Urgence et infection. Édition ARNETTE. ISBN 978-2- 7184-1181-1

Matyar F., Kaya A., et Dincer S. 2008. Antibacterial agents and heavy metal resistance in gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay. Turkey. Sci. Total Environ. 407: 279–285.

N

Nourmand et carrer, 2010. infections nosocomiales a *alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxidans* :sensibilite de 41 souches a 38 antibiotiques

Neela F.A., Nonaka L., et Suzuki S., 2007. The diversity of multi-drug resistance profiles in tetracycline-resistant *Vibrio* species isolated from coastal sediments and seawater. J. Microbiol. 45:64–68.

P

Philippon A., Mensah K., Richard C., et Grimont P.A.D., 2002. Infections nosocomiales a *alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxidans* : sensibilité de 41 souches a 38 antibiotiques. Médecine et maladies infectieuses.

R

Rodier J., Bazine C., Broutin J.P., Chambon P., Champsaur K., et Rodi L., 1996. L'analyse de l'eau : l'eau narturelle, l'eau residuaires, eau de mer. 8^{eme} édition Paris ISBN 2 100024167.

Rodier J., Formenty P., Roth C., Gonzalez-Martin F., Grein T., Ryan M., Drury P., Kindhauser M.K., 2005. Les pathogènes émergents, la ville internationale et le reglement sanitaire international

Rodriguez-Villalobos H., et Struelens M.J., 2006. Résistance bactérienne par β -lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimateur

Renou S., 2006. Analyse de cycle de vie appliquée aux systèmes de traitement des eaux usées. Thèse de doctorat. 259p

S

Saliez J.Y., Cors M., Bronchart S., Vlaminc A.D., Soete F., Vallée J.F., Métadesign B., 2007. Techniques extensives d'épuration des eaux usées domestiques. 34p.

Sambrook J., Fritsh E.F., et Maniatis T., 1989. Molecules cloning: a laboratory manual.

Singleton., 2004. Enterobacteriaceae and beta-lactams : Wild susceptibility patterns

V

Vaubourdolle M., 2007. Infectiologie. 3^{ème} édition. ISBN: 978-2-915585-40-7.

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

W

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

Y

Yala D.,Merad A.S., Mohamedi D., Ouar korich M.N., 2001. classification et mode d'action des antibiotiques.

Yvon M.B., 2009. Une histoire de la résistance aux antibiotiques. L'HARMATTAN, 2009. ISBN :978-2-296-10677-2. EAN :978229609106772.

Z

Zhang Y., Marrs C.F., Simon C., et Xi C., 2009. Wastewater treatment contributes to selective increase of antibiotic resistance among Acinetobacter spp.

Annexes

Tableau 1: résultats de l'identification bactérienne selon les échantillons pour la collection imipénème

Les souches	eau usée	Eau traitée	Nombre totale	(%) n total	%(EF)/14	%(ET)/9
S.maltophilia	9	7	16	69,57	64,29	77,78
P. Oryzihabitans	3	1	4	17,39	21,43	11,11
P. Luteola	1	0	1	4,35	7,14	0,00
V.fluvialis	0	1	1	4,35	0,00	11,11
Non fermenter sp	1	0	1	4,35	7,14	0,00
Total	14	9	23	100	100	100

Tableau 2: résultats de l'identification bactérienne selon les échantillons pour la collection céfotaxime

Les souches	eau usée	Eau traitée	Nombre totale	(%) n total	%(EF)/10	%(ET)/12
E.cloacae	7	8	15	68,18	70	66,67
E.asburiae	2	0	2	9,09	20	0
E. concerogenus	0	1	1	4,55	0	8,33
S. Liquifactia	1	0	1	4,55	10	0
S. fonticola	0	1	1	4,55	0	8,33
Pantoeae spp2	0	1	1	4,55	0	8,33
A. hydrophilia	0	1	1	4,55	0	8,33
total	10	12	22	100	100	100

Tableau 3 : les taux de la résistance des 23 souches bactériennes résistantes a l'imipénème par famille

la fammille d'ATB	nombre des souches	% de R
β-lactamine	23	100
aminosides	21	91,30
quinolones	6	26,09
Sulfamides-Trimethoprime	22	95,65
tetracyclines	17	73,91

Tableau 4 : les taux de la résistance des 22 souches bactériennes résistantes au céfoxitine par famille

la famille d'ATB	nombre des souches	% de R
β -lactamine	22	100
aminosides	0	0
quinolones	2	9,09
Sulfamides-Trimethoprime	13	59,09
tetracyclines	0	0

Tableau 5 : Comparaison de résistance des 23 souches à l'imipénème aux antibiotiques de la famille beta-lactamine entre les eaux usées et les eaux traitées

antibiotique	eaux usées	% eaux usées	eaux traitées	% eaux traitées
AX	7	100	8	88,89
FOX	14	100	8	88,89
CTX	14	100	8	88,89
CAZ	6	100	3	42,86
ATM	14	100	5	55,56
FEP	11	78,57	5	55,56
CPO	5	35,71	5	62,5
IMP	14	100	9	100

Tableau 6: comparaison de résistance des 23 souches résistantes au imipénème aux antibiotiques non beta-lactamines entre les eaux usées et les eaux traitées

antibiotique	eaux usées	% eaux usées	eaux traitées	% eaux traitées
CN	2	40	2	28,57
K	14	100	7	77,78
AN	0	0	3	33,33
CIP	1	7,14	3	33,33
PEF	0	0	3	33,33
SSS	11	78,57	3	33,33
TMP	3	75	5	83,33
SXT	10	71,43	3	33,33
TE	12	85,71	5	55,56

Tableau 7 : comparaison de résistance des 22 souches résistantes au céfoxitine aux antibiotiques de la famille beta-lactamines entre les eaux usées et les eaux traitées.

antibiotique	eaux usées	% eaux usées	eaux traitées	% eaux traitées
AX	9	90	12	100
FOX	10	100	12	100
CTX	0	0	2	16,67
CAZ	0	0	1	8,33
ATM	0	0	1	8,33
FEP	0	0	1	8,33
CPO	0	0	0	0
IMP	0	0	1	8,33

Tableau 8: Comparaison de résistance des 22 souches résistantes au céfoxitine aux antibiotiques non beta-lactamines entre les eaux usées et les eaux traitées

antibiotique	eaux usées	% eaux usées	eaux traitées	% eaux traitées
CN	0	0	0	0
K	0	0	0	0
AN	2	20	1	8,33
CIP	0	0	0	0
PEF	0	0	1	8,33
SSS	3	30	10	83,33
TMP	0	0	0	0
SXT	0	0	1	8,33
TE	0	0	0	0

Tableau 9: antibiogramme de souches sélectionnées

Nom de souche	Identification	Béta-lactamines								Quinolones			Tétracyclines	aminosides		Sulfamides-triméthoprimes		
		AX [16,21]	ATM [21,27]	IMP [17,24]	FOX [15,22]	CTX [23,26]	CAZ [19,26]	FEP [17,24]	CPO [17,24]	NA [15,20]	CIP [22,25]	PEF [16,22]	TE [17,19]	K [15,17]	CN [16,18]	SXT [13,16]	TMP [16,21]	SSS [12,17]
F ₁	S. maltophilia	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	20 I	26 S	26 S	0 R	0 R	/	0 R	/	0 R
F ₂	S.maltophilia	0 R	0 R	0 R	0 R	10 R	17 R	17 R	0 R	28 S	S	28 S	20 S	0 R	32 S	40 S	20 I	0 R
F ₃	S.maltophilia	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	20 I	26 S	26 S	0 R	0 R	0 R	0 R	/	0 R
F ₄	S.maltophilia	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	/	0 R	/	22 S	26 S	22 I	0 R	0 R	/	0 R	/	0 R
F ₆	P.oryzihabitans	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	/	20 I	/	22 S	28 S	30 S	0 R	0 R	/	0 R	/	0 R
F ₇	S.maltophilia	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	/	8 R	/	22 S	20 R	22 I	0 R	0 R	/	0 R	/	0 R
F ₉	P.luteola	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	/	14 R	/	22 S	30 S	27 S	0 R	0 R	/	0 R	/	0 R
F ₁₁	S.maltophilia	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	/	16 R	/	22 S	34 S	24 S	0 R	0 R	/	0 R	/	0 R
F ₁₄	P.oryzihabitans	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	/	14 R	/	22 S	30 S	26 S	0 R	0 R	/	0 R	/	0 R

Nom de souche	Identification	Béta-lactamines								Quinolones			Tétracyclines	aminosides		Sulfamides-triméthoprimes		
		AX [16,21]	ATM [21,27]	IMP [17,24]	FOX [15,22]	CTX [23,26]	CAZ [19,26]	FEP [17,24]	CPO [17,24]	NA [15,20]	CIP [22,25]	PEF [16,22]	TE [17,19]	K [15,17]	CN [16,18]	SXT [13,16]	TMP [16,21]	SSS [12,17]
F15	Non fermenté sp	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	/	10 R	/	16 I	>40 S	22 I	8 R	0 R	/	0 R	/	0 R
F23	S.maltophilia	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	20 I	19 I	46 S	S	36 S	34 S	0 R	21 S	34 S	10 R	S
F24	S.maltophilia	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	/	0 R	/	20 I	26 S	26 S	0 R	0 R	/	0 R	/	0 R
F27	P.oryzihabitans	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	22 I	15 R	26 S	28 S	28 S	13 R	11 R	0 R	S	0 R	S
B1	S.maltophilia	0 R	18 R	0 R	0 R	0 R	0 R	12 R	0 R	25 S	35 S	25 S	8 R	0 R	26 S	S	14 R	S
T1	S.maltophilia	0 R	25 S	0 R	0 R	22 R	20 I	22 I	22 I	31 S	16 R	22 I	28 S	25 S	20 S	S	0 R	S
T2	S.maltophilia	0 R	18 R	0 R	0 R	0 R	17 R	16 R	14 R	30 S	28 S	30 S	35 S	10 R	21 S	S	13 R	S
T6	S.maltophilia	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	/	8 R	/	10 R	26 S	22 I	0 R	0 R	/	12 R	/	0 R
T8	P.oryzihabitans	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	14 R	7 R	16 I	20 R	22 I	0 R	0 R	14 R	0 R	/	0 R
T9	V.fluvialus	0 R	S	17 R	22 I	40 S	20 I	S	S	S	46 S	S	S	22 S	27 S	S	S	S
T11	S.maltophilia	0 R	26 I	0 R	0 R	15 R	24 I	25 S	18 I	14 R	24 I	15 R	9 R	0 R	20 S	S	0 R	S
T12	S.maltophilia	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	15 R	0 R	29 S	36 S	26 S	12 R	0 R	22 S	S	12 R	S

Nom de souche	Identification	Béta-lactamines								Quinolones			Tétracyclines	aminosides		Sulfamides-triméthoprimes		
		AX [16,21]	ATM [21,27]	IMP [17,24]	FOX [15,22]	CTX [23,26]	CAZ [19,26]	FEP [17,24]	CPO [17,24]	NA [15,20]	CIP [22,25]	PEF [16,22]	TE [17,19]	K [15,17]	CN [16,18]	SXT [13,16]	TMP [16,21]	SSS [12,17]
T13	S.maltophilia	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	/	0 R	0 R	0 R	18 R	0 R	0 R	0 R	/	0 R	/	0 R
T19	S.maltophilia	0 R	27 I	0 R	0 R	14 R	20 I	18 I	12 R	21 S	26 S	14 R	25 S	0 R	14 R	28 S	0 R	S
DF ₁	E.cloacae	0 R	42 S	28 S	0 R	36 S	28 S	40 S	40 S	27 S	38 S	36 S	20 S	25 S	24 S	38 S	38 S	36 S
DF ₂	E.cloacae	0 R	28 S	30 S	0 R	36 S	21 I	38 S	38 S	26 S	46 S	36 S	25 S	25 S	27 S	35 S	34 S	40 S
DF ₃	E.cloacae	S	S	S	0 R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
DF ₅	E.cloacae	0 R	40 S	30 S	0 R	36 S	29 S	40 S	42 S	28 S	>40 S	42 S	26 S	26 S	28 S	35 S	40 S	40 S
DF ₉	E.asburiae	0 R	40 S	30 S	0 R	32 S	26 I	34 S	36 S	14 R	38 S	28 S	24 S	24 S	26 S	32 S	/	0 R
DF ₁₁	E.cloacae	0 R	40 S	30 S	0 R	34 S	30 S	36 S	38 S	34 S	46 S	38 S	30 S	26 S	26 S	28 S	32 S	22 S
DF ₁₂	E.cloacae	0 R	32 S	28 S	0 R	36 S	30 I	36 S	28 S	26 S	42 S	36 S	25 S	22 S	23 S	28 S	/	0 R
DF ₁₃	E.cloacae	10 R	46 S	36 S	8 R	38 S	36 S	38 S	>40 S	32 S	40 S	35 S	26 S	27 S	26 S	31 S	35 S	29 S
DF ₁₆	S. liquifaciens	0 R	28 S	26 S	0 R	36 S	28 S	40 S	38 S	28 S	40 S	38 S	26 S	24 S	26 S	25 S	30 S	20 S

Nom de souche	Identification	Béta-lactamines								Quinolones			Tétracyclines	aminosides		Sulfamides-triméthoprimes		
		AX [16,21]	ATM [21,27]	IMP [17,24]	FOX [15,22]	CTX [23,26]	CAZ [19,26]	FEP [17,24]	CPO [17,24]	NA [15,20]	CIP [22,25]	PEF [16,22]	TE [17,19]	K [15,17]	CN [16,18]	SXT [13,16]	TMP [16,21]	SSS [12,17]
DF ₁₉	E.asburiae	0 R	38 S	28 S	0 R	36 S	26 I	36 S	40 S	0 R	32 S	22 I	26 S	27 S	26 S	30 S	S	0 R
DT ₃	E.cloacae	0 R	28 S	28 S	0 R	30 S	30 S	38 S	40 S	30 S	38 S	36 S	24 S	26 S	26 S	28 S	/	0 R
DT ₆	E.cloacae	0 R	32 S	32 S	0 R	34 S	30 S	38 S	38 S	30 S	>40 S	34 S	22 S	24 S	26 S	26 S	/	10 R
DT ₈	E.cloacae	0 R	26 I	0 R	0 R	0 R	22 I	36 S	40 S	0 R	28 S	10 R	26 S	22 S	26 S	26 S	/	0 R
DT ₁₁	E.cloacae	0 R	20 R	26 S	0 R	20 R	16 R	32 S	34 S	28 S	36 S	32 S	24 S	26 S	24 S	0 R	/	0 R
DT ₁₂	S.fonticola	0 R	40 S	28 S	0 R	36 S	26 I	38 S	38 S	28 S	38 S	32 S	20 I	24 S	26 S	28 S	/	14 I
DT ₁₃	Pantoae Spp	0 R	30 S	30 S	0 R	36 S	26 I	S	38 S	26 S	>40 S	32 S	26 S	22 S	24 S	26 S	/	12 R
DT ₁₆	E.cloacae	0 R	32 S	28 S	0 R	32 S	26 I	34 S	34 S	30 S	>40 S	30 S	26 S	20 S	26 S	26 S	26 S	20 S
DT ₁₉	A.hydrophilia	0 R	38 S	34 S	0 R	30 S	26 I	36 S	36 S	36 S	S	38 S	30 S	26 S	26 S	20 S	/	0 R
DT ₂₁	E.cocergenus	0 R	40 S	30 S	0 R	36 S	26 I	36 S	38 S	26 S	38 S	34 S	23 S	24 S	26 S	28 S	/	0 R
DT ₂₂	E.cloacae	0 R	S	32 S	8 R	36 S	32 S	40 S	40 S	28 S	40 S	36 S	26 S	26 S	26 S	26 S	/	0 R
DT ₂₃	E.cloacae	0 R	36 S	28 S	8 R	30 S	26 I	36 S	38 S	28 S	46 S	36 S	27 S	24 S	26 S	28 S	32 S	8 R
DT ₂₄	E.cloacae	0 R	30 S	30 S	0 R	38 S	32 S	38 S	42 S	26 S	42 S	32 S	24 S	26 S	24 S	30 S	/	10 R

F : effluent collection imipénème

T : eau traitée collection imipénème

DF : effluent collection céfoxitine

DT : eau traitée collection céfoxitine

Tableau 10 : Identification des souches bactériennes

souche	TESTS																					Identi- fication	Nom de souche
	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VIP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX		
F ₁	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0202000	<i>S.maltophilia</i>
F ₂	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0202000	<i>S.maltophilia</i>
F ₃	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4202000	<i>S.maltophilia</i>
F ₄	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0202000	<i>S. maltophilia</i>
F ₆	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0202000	<i>P.oryzyhabitans</i>
F ₇	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5202000	<i>S.maltophilia</i>
F ₉	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3202000	<i>P.luteola</i>
F ₁₁	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1200000	<i>S.maltophilia</i>
F ₁₄	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0202000	<i>P.oryzyhabitans</i>
F ₁₅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0000004	<i>Non fermenter sp</i>

F ₂₃	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5202000	<i>S. maltophilia</i>
F ₂₄	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4202000	<i>S. maltophilia</i>
F ₂₇	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0202000	<i>P. oryzyhabitans</i>
B ₁	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0202000	<i>S. maltophilia</i>
T ₁	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4202000	<i>S. maltophilia</i>
T ₂	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5202000	<i>S. maltophilia</i>
T ₆	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1202000	<i>S. maltophilia</i>
T ₈	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0202000	<i>P. oryzyhabitans</i>
T ₉	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	2046125	<i>V. fluvialis</i>
T ₁₁	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4202000	<i>S. maltophilia</i>
T ₁₂	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4202000	<i>S. maltophilia</i>
T ₁₃	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0202000	<i>S. maltophilia</i>
T ₁₉	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0202000	<i>S. maltophilia</i>
DF ₁	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	3304573	<i>E. cloacae</i>

DF ₂	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	3305573	<i>E. cloacae</i>
DF ₃	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	3305573	<i>E. cloacae</i>
DF ₅	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	3305573	<i>E. cloacae</i>
DF ₉	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	3305523	<i>E. asburiae</i>
DF ₁₁	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	3315563	<i>E. cloacae</i>
DF ₁₂	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	3305563	<i>E. cloacae</i>
DF ₁₃	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	1305573	<i>E. cloacae</i>
DF ₁₆	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	1304763	<i>Serratia .liqui</i>
DF ₁₉	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	3304523	<i>E. asburiae</i>
DT ₃	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	3305573	<i>E. cloacae</i>
DT ₆	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	3305573	<i>E. cloacae</i>
DT ₈	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	3305573	<i>E. cloacae</i>
DT ₁₁	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	3204563	<i>E. cloacae</i>
DT ₁₂	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	5304573	<i>S. fonticola</i>

DT ₁₃	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	1205173	<i>Pantoea.spp2</i>
DT ₁₆	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	3305573	<i>E.cloacae</i>
DT ₁₉	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	3046527	<i>A.hydrophila</i>
DT ₂₁	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	3305133	<i>E.cocero-genus</i>
DT ₂₂	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	3305573	<i>E.cloacae</i>
DT ₂₃	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	3305573	<i>E.cloacae</i>
DT ₂₄	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	3305573	<i>E.cloacae</i>

F : effluent collection imipénème

T : eau traitée collection imipénème

DF : effluent collection céfoxitine

DT : eau traitée collection céfoxitine