

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Science de la Nature et de la Vie
Option : Microbiologie en Secteur Biomédical et Vétérinaire



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Etude de la résistance aux antibiotiques des bacilles
à Gram négatif isolés des eaux de puits

Présenté par :

AZoug NASSIMA & HOUACINE TASSADIT

Soutenu le : **13/06/2015**

Devant le jury composé de :

Mme. MOUCI K.	MCB	Président
Mme. TAFUOKT R.	MAB	Encadreur
Mme. BELHADI K.	MAA	Examineur

Année universitaire : 2014 / 2015

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier notre promotrice M^{me} Tafoukt. R pour nous avoir encadré, pour son aide, son soutien et sa bonne humeur tout au long de la réalisation de ce travail.

Nous adressons nos vifs remerciements aux membres du jury, de nous avoir honoré en acceptant d'examiner notre travail.

Nos remerciements s'adressent également à M^r Touati. A et aussi à toute son équipe.

Nous présentons nos sincères remerciements à tous nos enseignants.

En ce moment précis, toutes nos pensées vont vers nos honorables parents en reconnaissance à leur esprit de sacrifices et de dévouement ainsi qu'à leur soutien.

Un grand merci à toutes les personnes qui nous ont aidé de prêt ou de loin afin de bien mener ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

À celui qui a toujours garni mes chemins avec force et lumière, mon très cher père

À la plus belle perle du monde, ma très chère mère.

Vous êtes pour moi une source de vie car sans vos sacrifices, votre tendresse et votre affection, je ne pourrais arriver jusqu'au bout. Je me réjouis de cet amour filial. Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur

À mon cher et unique frère Khaled

À mes sœurs Khoukha, Ghania, Hayet et Sihem

À mes beaux-frères Lekheyer et Khaled

À mes adorables neveux: Raouf et Ayoub

À toute la famille Azoug et Alloui sans exception

À tous mes cousins et cousines

À mon chère binôme Sassa et sa famille

À tous mes amis (es): Yasmina, Sara, Sabrina, Nesrine, Samira, Walid, Bchir, Adel

À tous mes enseignants du primaire à ce jour en particulier M^r Kfentecche et M^r Benaiissa

À toutes personnes qui me sont cher

Nassima

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

A mon cher papa

*Qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices
Et de privations pour m'aider à avancer dans la vie.*

Merci papa

*Pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.
Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit*

A ma très chère mère

*Qui a œuvré pour ma réussite, de part son amour, son soutien, tous les sacrifices
et ses précieux conseils et Pour toute son assistance dans ma vie*

Maman

*Je ne pourrais jamais vous récompenser pour les grandes sacrifices que vous faites
et continuez de faire pour moi.*

A mes frères

Lakhdar et Salah

A qui je souhaite beaucoup de réussite et de bonheur

A mon cher futur mari

Qui ma toujours soutenu et m'encouragé pendant les moments difficiles

Que dieu réunisse nos chemins pour un long commun

Et à toute ma belle famille en particulier

Mon beau-frère Salah

A mon cher binôme et mes amies

Nassima, Sara et Yasmina

J'oublierais jamais les moments qu'on a passés ensemble

A tous mes amis

A tous ceux que j'aime et m'aiment



SISSA

Liste des figures

Figure n°1: Répartition des souches isolées par espèce.....	11
Figure n°2: Taux de résistance des souches d'entérobactéries aux β -lactamines.....	12
Figure n°3: Taux de résistance aux différents antibiotiques.....	13
Figure n°4: Résultats de DD-test	14
Figure n°5: Résultats du Carba NP test.....	15

Liste des tableaux

Tableau I: Site de prélèvements au niveau de la Wilaya de Bejaïa	5
Tableau II: Tests d'identification biochimiques	7
Tableau III: Liste des antibiotiques testés	8
Tableau IV: Nombre des souches isolées par site de prélèvement	10
Tableau V: Interprétation des résultats du Carba NP test modifié.....	15

ANNEXES

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1
Matériel et méthodes	
I - Prélèvements.....	5
II - Conditions d'échantillonnages et de transport	6
III - Enrichissement	6
IV- Isolement et purification	6
V- Identification	7
VI. Etude de la sensibilité aux antibiotiques	8
VII. Recherche des phénotypes de résistance aux β -lactamines	9
VII.1 Recherche de la production de la production de β -lactamase à spectre étendu	9
VII.2 Recherche des carbapénémases par Carba NP test modifié	9
Résultats	
I- Répartition des souches par site de prélèvement	10
II - Souches bactériennes isolées	11
III - Sensibilité des souches à Gram négatif isolées aux antibiotiques	12
III.1- Sensibilité des souches à Gram négatifs aux β -lactamines.....	12
IV- Sensibilité des souches aux autres familles d'antibiotiques	13
V- Recherche des phénotypes de résistance aux β -lactamines	14
V-1 BLSE	14
V-2 Céphalosporinase	14
V-3Carbapénémase	15
Discussion	16
Conclusion.....	20
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction

La découverte des antibiotiques par Alexander Fleming en 1929 est l'une des plus grandes avancées en science médicale. Ils présentent probablement la famille la plus réussie des médicaments développés pour traiter et empêcher les infections bactériennes humaines. En plus de leur large utilisation pour le traitement de maladies humaines, les antibiotiques sont communément utilisés dans la médecine vétérinaire. Ils ont également été utilisés pendant des années à des concentrations sub-thérapeutiques comme promoteurs de croissance dans l'élevage (Servais et *al.*, 2009), ou dans les piscicultures ainsi que pour prévenir et traiter les infections des plantes (Martinez, 2009).

La plupart des antibiotiques ne sont que partiellement métabolisés par l'homme et les animaux après leurs administrations. Ces derniers sont excrétés dans l'urine et les fèces, et évacués dans différents compartiments de l'environnement (Zuccato et *al.*, 2010). La contamination de l'environnement par les antibiotiques peut survenir de plusieurs manières, la première étant la contamination directe de l'environnement des élevages de bétails et de poissons dans lesquels les antibiotiques sont utilisés. Le deuxième mode de contamination se fait via les déchets. En effet, les antibiotiques utilisés en médecine humaine et leurs métabolites peuvent être retrouvés dans les boues et les effluents des stations d'épuration, qui peuvent eux-mêmes être utilisés pour l'arrosage ou la fertilisation des terres agricoles (Laurence et *al.*, 2014).

Les études de résistance aux antibiotiques dans le sol montrent que les bactéries de l'environnement portent des gènes de résistance aux antibiotiques de façon indépendante des activités humaines. Il y'a des bactéries qui utilisent les antibiotiques comme seule source de carbone et source d'azote telles : *Pseudomonas fluorescens* , cultivée sur la streptomycine et *P.fluorescens* cultivée sur la pénicilline (Allen et *al.* ,2010).

L'utilisation intensive des antibiotiques peut conduire à l'émergence des souches résistantes au sein des populations bactériennes (Elmanama et *al.*, 2006). Cette résistance est devenue un problème important dans la santé clinique et publique (Guardabassi et *al.*, 2000), et malheureusement dans l'environnement qui est généralement reconnu par une grande diversité des gènes de résistance aux antibiotiques (Aminov, 2009).

Dans l'environnement, la composante microbienne est diversifiée. Elle joue un rôle majeur dans le fonctionnement des écosystèmes, la dissémination des micro-organismes résistants dans l'environnement, peut avoir des conséquences non négligeables en termes de santé publique et de perturbations écologiques (Passeret et *al.*, 2009).

Le lien entre la présence d'agent antimicrobien et l'émergence des bactéries résistantes, ainsi que le transfert de la résistance à des concentrations aussi faibles que celles trouvées pour les antibiotiques dans l'environnement n'est pas encore établie. Souvent, les données utilisées pour évaluer les effets environnementaux des antibiotiques ne sont pas suffisantes pour établir comment les bactéries maintiennent longtemps la résistance aux antibiotiques en absence de pression de sélection continue (Kümmerer, 2009).

Des antibiotiques ont été détectés dans plusieurs compartiments, y compris dans l'eau de rivière (Tamtam et *al.*, 2008 ; Jiang et *al.*, 2013), eaux souterraines (Lindsey et *al.*, 2001). Ces antibiotiques résiduels peuvent également causer des effets inverses sur des organismes non-cible et poser un risque écologique (Andreozzi et *al.*, 2004). En effet, au cours des dernières années, la contamination par des antibiotiques est reconnue comme une pollution dans les milieux aquatiques, en raison de leurs effets négatifs (Kümmerer., 2009). L'eau souterraine peut également être contaminée par des bactéries, des virus, des produits chimiques et d'autres contaminants (Coleman et *al.*, 2013). Les eaux souterraines non traitées, utilisées pour la consommation pourraient être une source de propagation et de transfert de souches résistantes aux antibiotiques (Messi et *al.*, 2005). Ces bactéries pourraient représenter un réservoir de déterminants de la résistance ainsi, un moyen pour la propagation et l'évolution des gènes de résistance et de leurs vecteurs (Mckeont et *al.*, 1995).

La Circulation des bactéries résistantes aux antibiotiques se produit principalement entre quatre écosystèmes (les humains, les animaux, les sols et les milieux aquatiques) reliés entre eux par l'eau, comme suggéré par de nombreux auteurs (Baquero et *al.*, 2008 ; Taylor et *al.*, 2011). L'une des voies possibles pourrait être entraînée par des apports de bactéries fécales résistantes aux antibiotiques, sélectionnées dans les intestins des humains et des animaux sous traitement, et transférées dans l'environnement aquatique principalement par les usines de traitement des eaux usées et de ruissellement des

pâturages (Laroche et *al.*, 2010). Les bactéries aquatiques autochtones pourraient alors être un réservoir de gènes résistants aux antibiotiques (Baquero et *al.*, 2008).

La fréquence et l'ampleur des infections causées par les bacilles à Gram négatif résistants aux antibiotiques sont en véritable augmentation (Ben Hamed et *al.*, 1988). Cette résistance est due aux différents mécanismes tel que : le pompage de l'antibiotique à l'extérieur de la cellule à l'aide des pompes à efflux, modification de la cible de l'antibiotique, diminution de la perméabilité membranaire par réduction du nombre des porines (Gallini et *al.*, 1995). Plusieurs mécanismes sont à la base de la multirésistance des bacilles à Gram négatif aux β -lactamines dont l'inactivation enzymatique reste le mécanisme prépondérant et en particulier la production de β -lactamases. Ces enzymes altèrent chimiquement les β -lactamines et les rendent ainsi inactives en hydrolysant l'anneau β -lactame (Philippon et *al.*, 2002 ., Jacoby et Munoz-Price., 2005).

Peu d'études ont été effectuées dans le monde sur la contamination des compartiments hydriques par les bactéries résistantes aux antibiotiques. Des bactéries potentiellement pathogènes, qui ont montré une résistance aux antibiotiques les plus prescrits en Guinée-Bissau (Afrique de l'Ouest) ont été isolées à partir de l'eau de puits, ce qui pose un risque supplémentaire pour la santé humaine (Machado et *al.*, 2014).

Papapetropoulou et ses collaborateurs en 1994 ont constaté la présence de *Pseudomonas sp* dans les eaux de robinet et l'eau minérale non gazeuse en Grèce. L'étude de Kummerer en 2004 a rapporté la présence d'*E.coli* résistants aux antibiotiques dans les eaux souterraines en milieu rural.

En Algérie l'étude de Alouache et ses collaborateurs en 2011, s'est portée sur la description de la résistance aux antibiotiques des souches isolées d'eau de mer de 4 plages d'Algérie. ils ont rapporté la présence des gènes codant pour les β -lactamases à spectre étendu de type CTX-M-15 chez *E.coli*, ce qui peut signifier que la contamination de l'environnement hydrique par des bactéries résistantes peut entraîner la propagation des gènes de résistance. La résistance aux β -lactamines chez les entérobactéries en Algérie est dominée par la production de BLSE de type CTX-M-3 et CTX-M-15 (Baba Ahmed et *al.*,

2014). L'identification des souches d'*A.baumannii* productrices de TEM-128 à été rapportée par Bakour et *al*, en 2013.

Actuellement, peu d'études ont été effectuées sur la contamination des eaux de puits par les bactéries résistantes aux antibiotiques. C'est dans ce contexte que nous proposons d'évaluer la sensibilité aux antibiotiques des bacilles à Gram négatif isolés des eaux de puits de différentes régions de la wilaya de Bejaia.

Afin de développer ces aspects, nous avons adopté la méthodologie suivante :

- ✓ Prélèvements d'eau de puits.
- ✓ Isolement et identification des souches à partir des différents prélèvements.
- ✓ Etude de la sensibilité des souches isolées aux antibiotiques.
- ✓ Détermination phénotypique de la résistance aux β -lactamines.

I – Prélèvements

Notre étude s’est déroulée durant la période allant de Février à Mai 2015 au niveau du laboratoire de Microbiologie de l’université A .Mira de Bejaïa. 100 prélèvements d’eau de puits ont été effectués dans différentes régions de wilaya de Bejaïa (Tableau I).

Tableau I : Site de prélèvements au niveau de la Wilaya de Bejaïa.

Lieu de prélèvements	La région	Nombre de prélèvements	Lieu de prélèvements	La région	Nombre de prélèvements
Toudja	Bouhdifen	1	Tala Hemza	Aberouak	3
	Aawine	1		Merj Ouaman	2
	Ait Boujelal	1		Al Mardj	2
	Ighiten	1		Ait Smail	1
	Aberah	1		Tala hemza	1
	Ahekouk	1		Tahanout	2
	Ait messoud	1		Bejaia	Cité djama
	Bhalahom	2	Edimco		1
	Bouhdifen	1	Forage Targa		1
	Boubecha	1	Targa Ouzemour		1
	Village	2	Aamriw		2
	Ikherbane	1	Semina		2
	Tahriket	1	Sidi Ahmed		2
	Amyis	1	Sidi Ali lebher		1
Sidi Aich	Al- flay	2	Aéroport		1
	Almaadi	1	Tala merkha		3
	Tignathine	2	Madala		1
	Aderbouz	2	Taghezouth		3
	Tafrawethe	1	La zone		1
	Tighilt	1	Tala ouerienne		1
	Ouira	2	Barbacha	1	
	Izeghadh	2	Kendira	1	
Oued-Ghir	Tikherbine	1	Ighil ali	Thazayarth	1
	Serwel	1	Beni kessila	Beni kessila	2
	Mellala	9	Akbou	Azaghar	1
	Amaadane	1		Taherachet	2
	Ibachiren	3	Oued Amizour	Amizour ville	1
	Ireza	1		Ighil ilouan	2
	Al Makam	6		Tahmemet	1
	Tayma	1		El -hama	1

II - Conditions d'échantillonnage et de transport

Les prélèvements sont effectués d'une manière stérile, en introduisant le flacon à l'intérieur d'un récipient d'eau. L'ouverture et la fermeture du flacon se fait à l'intérieur pour éviter toute contamination. Les flacons sont maintenus à une température comprise entre 2 et 5°C dans une enceinte réfrigérée. Tous nos prélèvements ont été effectués dans des flacons en verre d'une capacité de 250 ml préalablement stérilisés et étiquetés (lieu et date du prélèvement).

III - Enrichissement

Nous avons ensemencé 50ml d'eau à analyser de chaque échantillon dans 100ml de bouillon nutritif auquel nous avons additionné deux solutions d'antibiotiques : Céfotaxime (CAZ), et la Vancomycine (VAN) à des concentrations finales de 1µg/ml et 8µg/ml respectivement, ensuite les flacons sont incubés à 37°C pendant 18 à 24h.

IV- Isolement et purification

A partir des bouillons d'enrichissement positifs nous avons ensemencé une gélose Mac Conkey additionnée de 2 µg/ml de Céfotaxime ensuite les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 h.

Après 24 heures d'incubation, les colonies ont fait l'objet de repiquages successifs sur le même milieu d'isolement jusqu'à l'obtention d'une souche pure.

V -Identification

Une fois la culture est pure, l'identification des bacilles à Gram négatif est réalisée sur la base :

- Des caractères cultureux (taille, aspect des colonies, forme).
- La Coloration de Gram.
- Tests biochimiques Classiques (Tableau II)

Après incubation, la révélation des résultats se fait par addition des réactifs (TDA, VPI et VP, Nitrate Réductase, EPEI, RM) pour les tests TDA, VP, Nitrate Réductase, EPEI, RM respectivement et on note les résultats spontanés pour les autres tests.

Tableau II : Tests d'identification biochimiques

Tests	Principe	Lecture
Fermentation des sucres, production de gaz et de H₂S sur milieu TSI	Ensemencement à partir d'une suspension bactérienne de la pente par stries sérés puis le culot par piqure centrale. Incubation à 37°C/24h.	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Virage au jaune du fond de tube : Fermentation de glucose (+) ➤ Virage au jaune de la pente : Fermentation de lactose (+) ➤ Apparition de bulles d'air : Production de gaz ➤ Noircissement de milieu : Production d'H₂S
Utilisation de citrate comme seule source de carbone sur milieu citrate de Simmons	Ensemencement par stries sérés de la pente. Incubation à 37°C/24h à 7 jours.	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Un virage au bleu indique un test positif.
Utilisation de mannitol comme seul source de carbone sur milieu mannitol mobilité	Une piqure centrale. Incubation à 37°C/24h.	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Virage du culot au jaune : Fermentation de mannitol (+) La mobilité ➤ Apparition de bulles d'air : Production de gaz.
Réduction des nitrates sur bouillon nitraté	Ensemencement du bouillon à partir de la suspension. Incubation à 37°C/24h.	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Après l'ajoute de NRI et NRII Coloration rouge : nitrate réductase(+) ➤ Nitrate réductase (-), ajouter poudre de zinc Coloration rouge (-), absence de coloration (+).
Production d'indole sur milieu eaux peptonée exempté d'indole	Ensemencement du milieu .Incubation à 37°C et 44°C /24h.	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Addition du réactif de Kovacs, l'apparition d'un anneau rouge (+).
Etude du type fermentaire	Ensemencement du milieu gélosé avec quelques goutte de la suspension bactérienne .Incubation à 37°/24h.	<p>On divise le contenu du tube en deux</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Ajout des réactifs VPI puis VP II dans le premier tube Virage au rouge : VP(+) ➤ Ajout de rouge de méthyle (RM) Coloration rouge : RM (+).

VI. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques est déterminée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Muller Hinton selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de Société Française de Microbiologie (CA-SFM) et EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) 2015.

➤ Préparation de l'Inoculum

A partir d'une culture pure de 18h à 24h sur milieu d'isolement, on prélève à l'aide d'une anse de platine quelques colonies (4 à 5) bien isolées qu'on dissocie dans 5ml d'eau physiologique, bien homogénéiser la suspension bactérienne, la charge de l'inoculum doit être équivalente au standard Mc Ferland (correspondant à environ 10^8 UFC/ml).

➤ Ensemencement

Les boîtes de Pétri préalablement coulées, sont ensemencées par écouvillonnage. Par la suite les disques d'antibiotiques sont déposés à l'aide d'une pince stérile.

On incube les boîtes pendant 18 à 24 h à 37°C.

➤ Lecture

Les diamètres d'inhibition sont mesurés. L'interprétation des profils de sensibilité aux antibiotiques sont effectués selon les valeurs critiques établies par le CA-SFM _EUCAST 2015. Les antibiotiques testés sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau III : Liste des antibiotiques testés (*oxoid*).

Antibiotiques	Symboles	Charges (µg)	Familles
Amoxicilline+acide clavulanique	AMC	30	Aminopicillines
Céftazidime	CAZ	30	C3G
Céfotaxime	CTX	30	
Céfoxitine	CX	30	C2G
Céfepime	FEP	30	C4G
Aztréonam	AT	30	Monobactames
Tétracycline	TE	30	Tétracyclines
Gentamycine	CN	10	Aminosides
Amikacine	AK	30	
Ciprofloxacine	CIP	30	Fluoroquinolones
Imipineme	IMP	30	Carbapénèmes
Ertapénème	ETP	10	

VII. Recherche des phénotypes de résistance aux β -lactamines

VII-1- Recherche de production de β -lactamases à spectre étendu

➤ DD-test (ou test de synergie)

La production d'une β -lactamase à spectre élargi (BLSE) est détectée par le test de synergie qui consiste à placer des disques de céphalosporines de 3^{ème} génération Céfotaxime et Céfotaxime, de 4^{ème} génération : Céfépime, à une distance de 20 mm (centre à centre) d'un disque d'augmentin (AMC : Amoxicilline /Acide clavulanique). L'augmentation de la zone d'inhibition entre le disque d'AMC et les disques de ceftazidime (CAZ), céfotaxime (CTX) indique la production d'une BLSE (Jarlier et *al.*, 1988).

VII.2 Recherche des carbapénémases par Carba NP test modifié (Bakour et *al.*, 2014)

➤ Carba NP test modifié

La production d'une carbapénémase est détectée par le Carba NP test modifié qui consiste en préparation d'une solution A (comme indicateur de pH). Cette dernière est préparée à partir d'une solution de rouge de phénol 0.5% poids /volume (0.5g de poudre dans 100 ml d'eau distillée). Mélanger 2ml de cette solution dans 16.6ml d'eau distillée puis lui ajouter 180 μ l d'une solution de ZnSO₄ (10 mM), ajuster le pH à 7. Pour la détection d'une carbapénémase on procède comme suit : dans un tube Eppendorf, mettre 200 μ l de tampon de lyse CATB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) 0,02%. Suspender une ose calibrée (10 μ l) de colonies bactériennes bien vortexer 1 à 2 min. Transférer la suspension bactérienne dans deux tubes d'Eppendorf A et B (100 μ l dans chaque tube), Bakour et *al.*, 2015.

Ajouter 100 μ l de solution A dans le tube Eppendorf (A) et 100 μ l de la solution A+imipénème 6mg /ml dans le tube Eppendorf (B), ensuite les deux tubes sont vortexés 5 sec puis incubés à 37°C pendant un maximum de 2h. La lecture visuelle est effectuée dans chaque tube Eppendorf. Les souches testées sont : AH14, AH24, AH59, AH79, AH89, AH86, AH 117.

RÉSULTATS

I-Répartition des souches par site de prélèvement

Au cours de cette étude nous avons prélevé 100 échantillons d'eau de puits au niveau de différentes régions de la wilaya de Bejaia. La recherche de BGN résistantes aux antibiotiques a permis d'isoler 120 souches.

Le nombre de prélèvements et les souches isolées par site sont représentés dans le tableau IV.

Tableau IV: Nombre des souches isolées par site de prélèvement

Lieu de prélèvements	Les régions	Nombre de souches
Toudja	Bouhdifen, Aawine, Ait Boujelal, Ighiten , Aberah,Aherkouk,Ait Massoud ,Balelhoum ,Boubecha, Village , Ikherbane, Tahriket, Amyis ,Benni kessila,Bouhdifen	23
Sidi-Aich	EL-flay , Almaadi ,Tignathine ,Aderbouz ,Tafrawethe ,Tighilt ,Ouirra , Izeghadh	10
Oued Ghir	Tikherbine, Serwel, Mellala , Amaadane, Ibachiren ,Ireza, Al Makam , Tayma , Ibourassen	30
Tala Hamza	Aberouak , Merdj ouaman , Al mardj , Tahanout Ait Smail, Tala hamza	15
Bejaia	Cité djama , Edimco, Forage Targa ouzemour , Aamriw , Semina , Sidi Ahmed , Sidi ali lebher Aeroport , Tala merkha,Madala,Taghzouthe La zone, Tala ouerienne,Barbacha ,Kendira,Targa ouzemour	29
Ighil Ali	Tha Zayarth	04
Akbou	Azaghar , Taherachet	04
Oued Amizour	Amizour Ville, Ighil Ilouane, Tahmment,El-hama	05
TOTAL		120

A noter qu'aucune souche n'a été isolée à partir des puits : Sidi Ahmed, Amyis, Tayma, El-hama, Ouirra, Aderbouz .

II - souches bactériennes isolées

L'identification des bacilles à Gram négatif par la coloration de Gram, les caractères cultureux et la galerie biochimique classique, a permis de caractériser les 120 souches.

La figure suivante illustre la répartition des 120 souches isolées par espèces

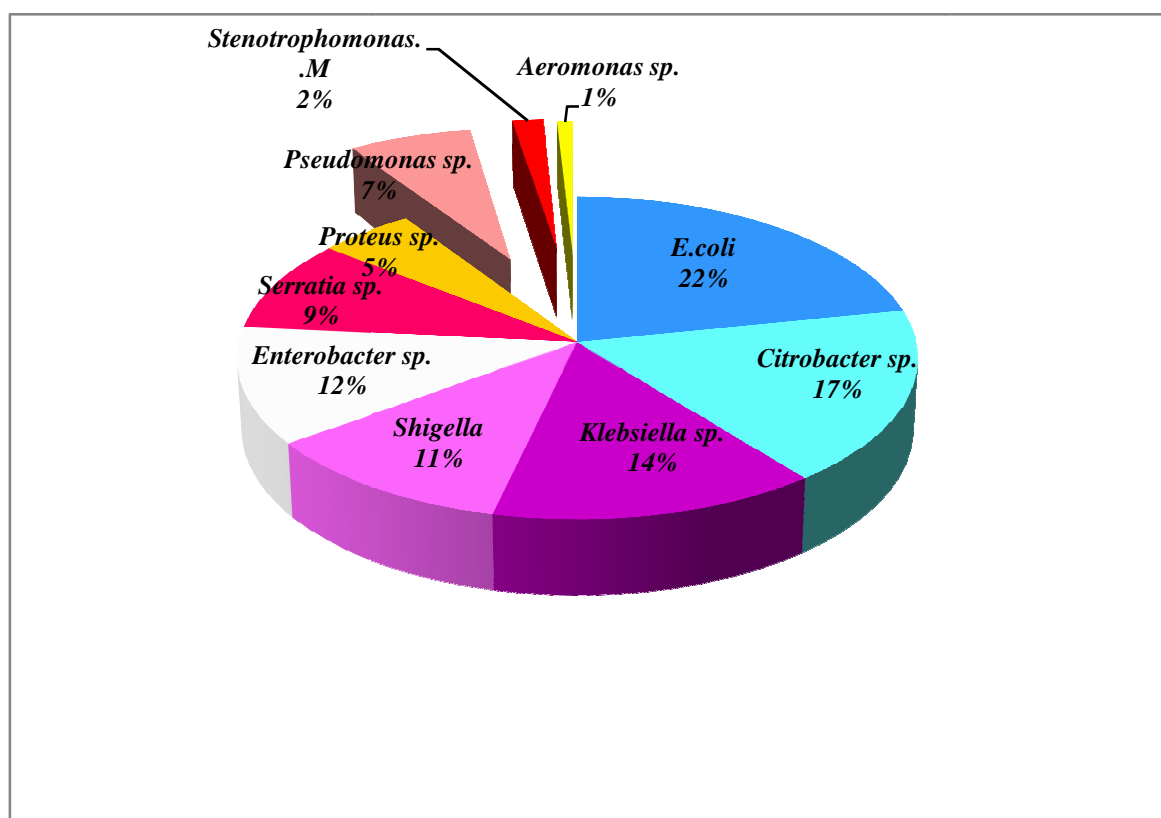


Figure n°1 : Répartition des souches isolées par espèces.

Nos résultats révèlent une prédominance des souches d'entérobactéries avec un taux de 90,83%. Cette prédominance est représentée essentiellement par les souches d'*Escherichia coli* avec un taux de 21,66% suivie des souches de *Citrobacter sp*, *Klebsiella sp*, *Shigella* et *Enterrobacter sp* avec des taux de 17,5%, 14,16%, 11,66% et 11,66% respectivement. Les souches de *Serratia sp* et *Proteus sp* sont isolées avec une moindre fréquence avec des taux de 9,16% et 5% respectivement.

9,16% des souches isolées sont des BGN autre que *Enterobacteriaceae* : 7% de *Pseudomonas sp*, 1,67% de *Stenotrophomonas maltophilia* et 0,83% pour *Aeromonas sp*.

III- Sensibilité des souches à Gram négatif isolées aux antibiotiques

III-1- Sensibilité des souches à Gram négatif aux β -lactamines

L'ensemble des 120 souches isolées de différents prélèvements ont été testées vis-à-vis de 8 β -lactamines : aztréonam, céfoxitine ,céftazidime, amoxicilline-clavulanate, céfotaxime, céfépime, imipénem, ertapénem. Les résultats sont indiqués dans l'annexe I (Profil de sensibilité aux β -lactamines).

La figure ci-dessous nous donne les taux de résistance des souches isolées vis-à-vis des huit antibiotiques testés (les β -lactamines).

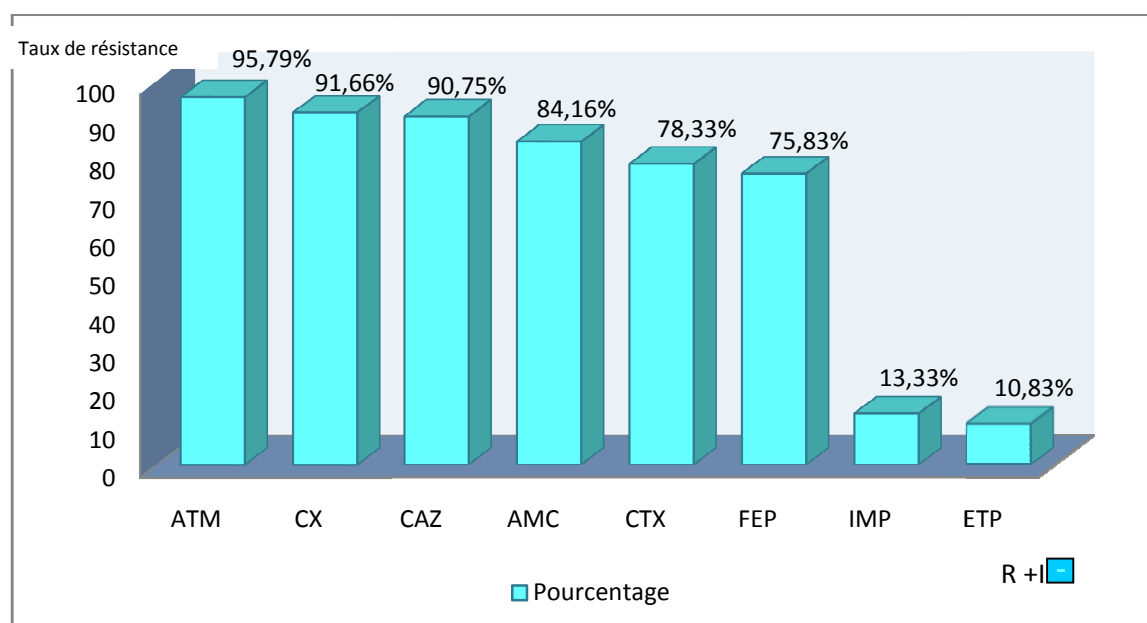


Figure n°2 : Taux de résistance des souches d'entérobactéries aux β -lactamines

D'après la figure n°2 on remarque des taux de résistance élevés au β -lactamines : 95% des souches isolées sont résistantes à l'aztréonam (ATM), 91% vis-à-vis de la céfoxitine (CX), 90% vis-à-vis de la céftazidime (CAZ), 84% vis-à-vis de l'amoxicilline-clavulanate (AMC), 78% vis-à-vis de céfotaxime (CTX), 75% vis-à-vis de céfépime (FEP), 13.33% vis-à-vis de l'imipénem (IMP) et 10.83% vis-à-vis de l'ertapénem (ETP).

IV- Sensibilité des souches aux autres familles d'antibiotiques

L'ensemble des souches à Gram négatif isolées ont été testées vis-à-vis des 4 antibiotiques autre que les β -lactamines qui sont : l'amikacine, ciprofloxacine, tétracycline et gentamycine. Les résultats des antibiogrammes effectués sur les 120 souches isolées vis-à-vis de ces antibiotiques sont donnés dans l'annexe II (Profil de sensibilité aux autres familles d'antibiotiques).

Les taux de résistance des souches isolées à ces antibiotiques sont illustrés dans la figure n°3.

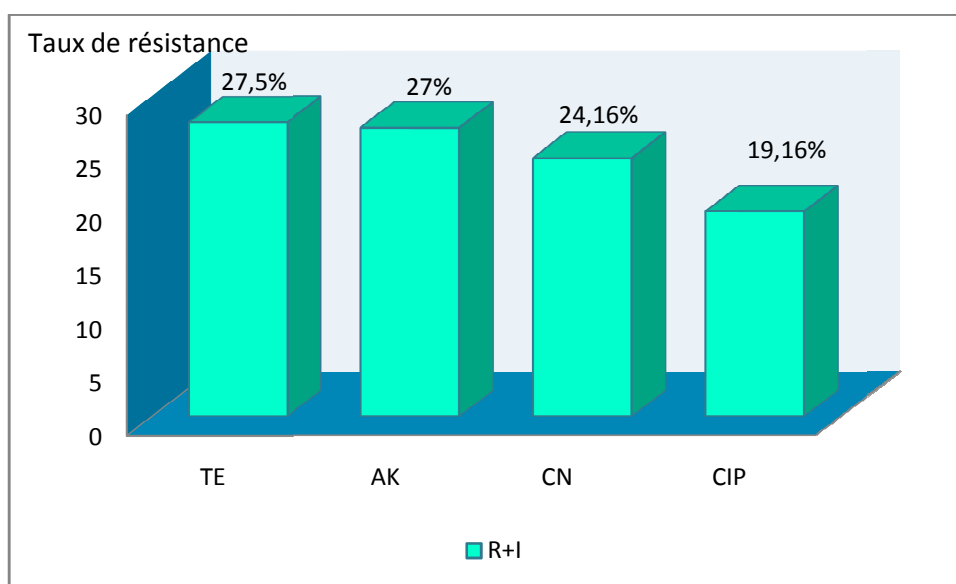


Figure n°3: Taux de résistance aux différents antibiotiques.

D'après la figure ci-dessus, on note une résistance modérée des souches isolées vis-à-vis des antibiotiques appartenant aux autres familles autre que les β -lactamines: tétracycline (TE), amikacine (AK), gentamicine (CN), et ciprofloxacine (CIP) avec des taux de : 27,5, 27, 24,16, 19,16% respectivement.

V- Recherche des phénotypes de résistance aux β -lactamines

V-1- BLSE

Les 120 souches isolées sont testées pour la production de β -lactamases à spectre étendu en utilisant la méthode de double disque. Les diamètres des zones d'inhibitions observés sont résumés en Annexe I.

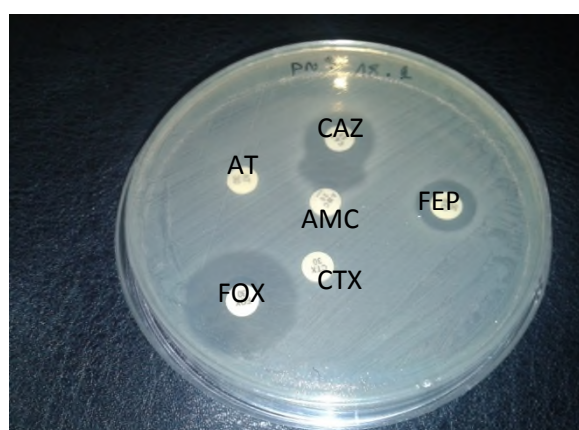
Sur les 120 souches isolées, 40 d'entre elles présentent une image de synergie soit un taux de 33%, elles sont donc probablement productrices de BLSE.

V-2- Céphalosporinase

Parmi les 120 souches isolées 97 d'entre elles sont résistantes au CX qui correspond à un marqueur phénotypique de céphalosporinase, elles sont donc probablement productrices de céphalosporinase.

On note que 39% des souches isolées sont probablement productrices de BLSE+ céphalosporinase.

La figure n°4 montre des photos d'une souche présentant une image de synergie AH18 et la photo présentant l'absence de synergie AH88.



DD-test de la souche AH 18(*K.pneumoniae*)



DD-test de la souche AH 88(*E.coli*)

Figure n°4 : Résultats de DD-test

V-3- Carbapénémase

Après incubation des souches AH14, AH24, AH59, AH79, AH89, AH86, AH 117 qui sont résistantes où intermédiaires aux carbapénèmes (ERT et /où IMP) nous avons noté un résultat négatif pour toutes ces souches (Tableau V).

Tableau V : Interprétation des résultats du Carba NP test modifié (Bakour et *al.*, 2013).

Tube A	Tube B	Interprétation
Rouge	Rouge	Pas de production de carbapénémase
Rouge	Orange/Jaune	Production carbapénémase
Jaune	Jaune	Non interprétables

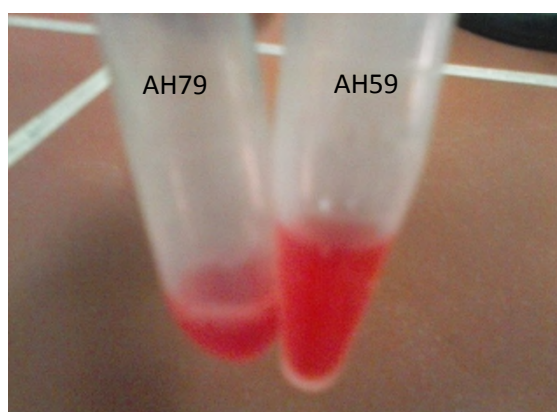


Figure n°5 : Résultats du Carba NP test pour les souches AH79, AH59

DISCUSSION

Durant cette étude nous nous sommes intéressés à la contamination de 100 échantillons d'eau de puits par des bactéries résistantes aux antibiotiques, dans différentes régions de la willaya de Bejaia.

120 souches de Bacilles à Gram négatif ont été isolées de ces eaux de puits, dont 90,8% appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* est l'espèce la plus dominante avec un taux de 21,16% suivie par *Citrobacter sp* avec un taux 17,5%. *klebsiella sp*, *Enterobacter sp*, *Shigella sp*, *Serratia sp*, *Proteus sp*, ont été isolés avec les taux suivants : 14,16, 11,66, 11,66, 9, 16 et 5% respectivement. 9,16% des souches font partie des bacilles à Gram négatif non fermentaires tel que : *Pseudomonas sp*, *Stenotrophomonas sp* et *Aeromonas sp* avec les taux 6,66, 1,66 et 0,83% respectivement.

Nos résultats ne sont pas similaires avec ceux rapportés par Machado et ses collaborateurs en 2014, ils ont montré que les eaux de puits de Guinée –Bissau contenaient 16 genres bactériens, dont 92% étaient des bacilles à Gram négatif: *Aquitalea*, *Acinetobacter*, *Ralstonia*, *Acidovorax*, *Chromobacterium*, *Chryseobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Xenophilus* avec des taux de :19,18,17,10 ,10 ,6,4,3 et3% respectivement. Les souches *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Hylemonella*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* et *Salmonella* étaient isolées avec un taux de 1%.

La résistance aux antibiotiques des souches à Gram négatif vis-à-vis de la famille des β -lactamines a révélé que : 95,5% des souches sont résistantes à l'ATM, 91,33% des souches sont résistantes à CX, 90,75% des souches sont résistantes à CAZ, 84,16% des souches sont résistantes à AMC et 78,33%, 75,83%, 13,33%, 10,83% des souches sont résistantes à CTX, FEP, ETP et IMP respectivement. La résistance des BGN aux antibiotiques autres que les β -lactamines est représentée par des taux : 27,5, 27,16%, 24,16 et 19,16% vis-à-vis, AK, TE, CN et CIP respectivement. Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par Fatih Matyar et ses collaborateurs en 2008, Parmi les isolats, un pourcentage était élevé à l'aztréonam (96,7%), l'ampicilline (94,4%) et la Céfepime (78,9%), et un faible pourcentage était résistants à l'imipénème (4,4%), méropénem (4,4%), amikacine (6,7%).

Durant cette présente étude, la souche la plus isolée est *Escherichia coli* avec un nombre de 26/120. Elles sont à 100% résistantes à l'AMC, l'ATM, CAZ, CTX et CX et présentent des taux faibles vis-à-vis des 4 antibiotiques autres que les β -lactamines. Les taux obtenus durant cette étude sont élevés comparé aux résultats obtenus par Coleman et ses collaborateurs en 2013, où ils ont montré que 10,5% de souches d'*E. coli* prévenantes des échantillons d'eau potable privés au Canada sont résistantes à une ou plusieurs classes d'antibiotiques dont 3,7% sont résistantes à moins de trois classes d'antibiotiques : Tétracycline, Ampicilline, Sulfaméthoxazole avec des taux de 76%, 9%, 8% respectivement (Coleman et al., 2013). Les souches d'*E. coli* sont naturellement sensibles à toutes les β -lactamines, malgré la présence d'une céphalosporinase chromosomique de classe C qui est exprimée à très bas niveau (Lavigne et al., 2002). La résistance acquise aux β -lactamines repose essentiellement sur la synthèse de β -lactamase plasmidique généralement sensible aux inhibiteurs de β -lactamines (Maurin et al., 1995). La résistance aux β -lactamines est conférée par les synthèses de BLSE, dans cette étude nous avons enregistré 12 souches d'*E. coli* productrices de BLSE.

Dans notre étude, 21 souches appartenant au genre *Citrobacter* ont été isolées. 8/21 (38,9%) sont probablement, productrices de BLSE, ce taux obtenu est plus élevé que celui obtenu par Korzeniewska et ses collaborateurs en 2013 qui ont isolés 45 souches de *Citrobacter* dont 25,3% d'entre elles sont productrices de BLSE. *Citrobacter sp* est naturellement résistant à l'amoxicilline, à l'amoxicilline-clavulanate et à la céfoxitine par production d'une β -lactamase chromosomique de classe C inductible AmpC (Sougaoff et trytram., 2003).

Les 8 souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées, résistent à la plupart des antibiotiques appartenant à la famille des β -lactamines testées. La β -lactamase SHV1 produite par *Klebsiella pneumoniae* est responsable d'environ 20% des résistances à l'ampicilline (Bradford, 2001). Des mutants TEM et SHV sont capables d'hydrolyser les céphalosporines à large spectre et les monobactames (Avril et al., 2000).

14 souches d'*Enterobacter* ont été isolées, dont 3 souches présentent une image de synergie, ce qui indique que la résistance aux β -lactamines de ces souches est probablement due à la production d'une BLSE associée à la production de son AmpC. Effectivement, la résistance de *Enterobacter sp.*, aux C3G est le plus souvent causée par une hyperproduction de β -lactamases de type AmpC (David et Paterson, 2006), ce qui leur permet de résister naturellement à l'amoxicilline, amoxicilline-clavulanate, céfalotine et à la Céfoxitine (Lazar et al., 2002).

Serratia sp. est naturellement résistante à l'ampicilline et à la céfalotine, par la production d'une β -lactamase chromosomique inductible de classe C et habituellement sensible aux aminosides, fluroquinolones et aux cotrimoxazoles (Engel et al., 2009). Durant cette étude, *Serratia sp.* a été isolée avec un taux de 9,16%, dont 3 sont probablement productrices de BLSE.

Dans cette étude, 7% des isolats appartiennent à la famille des *Pseudomonadaceae*, nos résultats ne s'accordent pas avec ceux obtenus par Justin Stoler et ses collaborateurs en 2015 où la prédominance des souches de *Pseudomonas* isolées est de 41%, dont 4/8 des souches de *P. aeruginosa* isolées dans notre étude sont résistantes à tous les antibiotiques testés. Dans une autre étude, l'ensemble des *Pseudomonas spp.* isolées des sources d'eau potable étaient résistantes à au moins un antibiotique. Les principales résistances vis-à-vis de : ticarcilline (TIC), ticarcilline-acide clavulanique (TIM), cefsulodine (SCF), aztréonam (AZT), fosfomycine (FF) et triméthoprime (Angela et al., 2014). Les *Pseudomonas* sont naturellement résistants à un grand nombre de β -lactamines en raison de la production d'une β -lactamase chromosomique inductible de classe C, qui n'est pas inhibée par le clavulanate et qui hydrolyse préférentiellement les C1G d'une part et d'une perméabilité membranaire d'autre par (Sougakoff et Trystram, 2003).

Deux espèces de *Stenotrophomonas maltophilia* sont isolées durant cette étude. Cette espèce présente une multirésistance naturelle vis-à-vis de divers antibiotiques dont les β -lactamines et aminoglycosides, ce qui explique leur résistance à toutes les β -lactamines. Ces

Résultats, concordent avec ceux rapportés par Fatih Matyar et ces collaborateurs en 2008, qui ont révélé une résistance à l'ampicilline, trimethoprime, imipineme ,méropenem, ceftazidime et Céfepime avec des taux de 96,7 , 94,4 , 4,4 , 6,7 et 6,7% respectivement. Des plasmides associés à la résistance aux bêta-lactamines ont été décrits chez *S.maltophilia* (Spencer, 1995).

Dans notre étude, nous avons isolé une seule souche d'*Aeromonas sp*, qui présente une résistance vis-à-vis de toutes les β - lactamines testées à l'exception d'IMP ainsi que d'autres antibiotiques tel que l'AK, CIP. Cette souche, présente un profil de résistance différent de celui rapporté par Carvalho et ses collaborateurs où toutes les souches d'*Aeromonas* isolées étaient sensible à la ceftazidime et l'aztreonam (Carvalho et *al.*, 2012). *Aeromonas sp* résiste naturellement aux β -lactamines par production de trois β -lactamases chromosomiques inductibles, dont une AmpC, oxacillinase de classe D (OXA 12) et une imipenèmase de classe B (Sougakoff et Trystram, 2013).

Les résultats du carba NP test modifié est négatif pour les 7 souches testées, elles ne sont donc probablement pas productrices de carbapénémases. La résistance à l'imipenème ainsi qu'à l'ertapénem est due à la production d'enzymes de type carbapénémases regroupées en trois classes, il s'agit des carbapénémases de type oxacillinases (classe D), de métallob β -lactamases (classe B), et des carbapénémases de (Classe A) (Kempf et Rolain, 2012., Tang et *al.*, 2014).

La résistance aux céphalosporines de troisième génération est souvent traduite par la production d'une BLSE et une AmpC. Ces deux types d'enzymes confèrent une résistance aux autres antibiotiques de la famille des β -lactamines (Blaak et *al.*, 2014). Parmi les 120 souches isolées des eaux de puits, 40 sont probablement productrices de BLSE.

CONCLUSION

Au cours de cette étude, qui s'est déroulée au laboratoire de Microbiologie à l'université A. Mira de Bejaia. Nous avons étudié la contamination des eaux de 100 puits par des bactéries à Gram négatif résistantes aux antibiotiques.

Sur les 100 prélèvements d'eau effectués, 120 souches de bacilles à Gram négatif ont été isolées et identifiées, parmi lesquelles 109 souches sont identifiées comme étant des Entérobactéries réparties comme suit : 26 souches d'*Escherichia coli*, 21 souches de *Citrobacter*, 17 souches de *klebsiella*, 14 souches de *Shigella*, 14 souches d'*Enterobacter*, 11 souches de *Serratia* et 6 souches de *Proteus*. Les 11 souches restantes sont identifiées comme étant des bacilles à Gram négatif non fermentaires répartis comme suite : 8 souches de *Pseudomonas sp*, 2 souches de *S.maltophilia* et 1 souche d'*Aeromonas*.

Le profil de résistance des souches isolées vis-à-vis des différentes classes d'antibiotiques testées, a révélé des taux de résistance élevés. 40 souches sont probablement productrices de BLSE.

Les résultats de cette étude, attirent une attention particulière sur le degré de contamination des eaux de puits par des bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques et notamment des BGN. Les eaux peuvent donc, servir de réservoir de bactéries multi-résistantes dans la nature. La présence de ces bactéries multi-résistantes dans les eaux de puits, peut constituer une menace pour l'environnement mais aussi sur la santé humaine.

Cette étude reste préliminaire, plusieurs perspectives peuvent être envisagées et élargies sur plusieurs axes. Dans une démarche complémentaire il est nécessaire de :

- Effectuer une étude à l'échelle nationale pour déterminer l'impact global des bactéries résistantes dans les milieux aquatiques ainsi que dans l'environnement.
- L'élargissement de l'étude sur toute la flore environnementale pour inclure les bactéries à Gram positif et la flore autochtone.
- Réalisation d'une relation entre la résistance aux antibiotiques dans les environnements hydriques naturels et dans les sols avoisinants les puits.
- La réalisation d'autres tests phénotypiques : DD test à la cloxacilline, Hodge test et le test à l'EDTA.

- La détermination de l'évolution de la contamination des eaux de puits dans le temps.
- Caractériser les phénotypes de résistance probables par les différentes méthodes de biologie moléculaires.

*RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES*

A

1. Allen HK, Donato j, Huimi Wang H, Karen A, Cloud-Hansen KA, Davies J et Handelsman J. (2010). Call of wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Microbiol.* **8**: 251-259.
2. Alouache S, Kada M, Messai Y, Estepa V, Torres C et Bakour R. (2011). Antibiotic Resistance and extended-spectrum β -lactamases in isolated bacteria from sea water of Algiers beaches (Algeria). *Microbes Envir.* **27**: 80-86.
3. Aminov RI. (2009). The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Envir Microbiol.* **11**: 2970–2988.
4. Andersson D, Hughes D. (2012). Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. *Drug Resist Updates.* **15**: 162– 172.
5. Angela F, Josselin B, Lise A, Sylvaine B, Marc F et Dupont J. (2014). The presence of *Pseudomonas spp* multi-resistant to antibiotics isolated from drinking water produced from hydro karst. *Inter Jrnl of Food Microbiol.* **10**.1016
6. Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil H. (2000). Bactériologie clinique, caractères généraux des *Staphylococcus aureus*. Edition ellipses Paris, p 7-28.

B

7. Baba Ahmed K, Tani Z, Arlet G. (2014). News of antibiotic resistance among Gram-negative bacilli in Algeria. *Patho Biol.* **62**: 169-178.
8. Bakour Sofiane, Olaitan Abiola Olumuyiwa, Ammari Houria, Touati Abdelaziz, Saoudi Souad, Saoudi Kenza, and Rolain Jean-Marc. (2015). Emergence of Colistin- and Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 Clinical Isolate in Algeria: First Case Report. *Microbial Drug Resistance.* 21(3): 279-285.
9. Ben Hamed S, Kanoun F, Khecharem M, Rekik N et Ellouze F. (1988). Etude de la sensibilité des bacilles à Gram negative à l'hôpital de Sfax. *Méd et Mldies Infec p* 115-117.
10. Baquero F, Martinez JL, et Canton R. (2008). Antibiotics and resistance in water environments. *Current Opnion in Biotec.* **19**: 260–265.
11. Blaak H, Angela H, Christiaan V, Arieke E, Van Leeuwen, Gretta L, Wendy M, Van O. (2014). Extended spectrum β -lactamase- and constitutively AmpC-producing

12. *Enterobacteriaceae* on fresh produce and in the agricultural environment. *Sci of Total Envir* **169**: 8-16.

C

13. Carvalho MJ, Martínez MA, Esteves AN, Correia A, Saavedra MJ. (2012). Phylogenetic diversity, antibiotic resistance and virulence traits of *Aeromonas spp.* from untreated waters for human consumption. *Inter Jnl of Food Microbiol.* **159**: 230–239.
14. Coleman BL, Louie M, Salvadori M I, McEwen SA, Neumann N, Sibley K, Irwin RJ, Jamieson FB, Daignault D, Majury A, Braithwaite S, Crago B, Mcgeer AJ. (2013). Contamination of Canadian private drinking water sources with antimicrobial resistant *Escherichia coli*. *Water rerch.* **47**: 3026 -3036.
15. Chang X, Meyer M T, LUIX, Zhao Q, Chen H, Chen J, Qui Z, Yang L, Cao J et Shu. (2010). Determination of antibiotics in sewage from hospitals, nursery and slaughter house, wastewater treatment plant and source water in chongping region of Gorge Reservoir in China. *Envir poltion.* **158**: 1444-1450.
16. (CA-SFM). (2015). Comité de L'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

D

17. Davison J. (1999). Genetic exchange between bacteria in the environnement plasmid. *Americ Jnl of Infect Contro.* **42**:7391.
18. David L et Paterson MD. (2006). Resistance in Gram negative bacteria *Enterobacteriaceae*. *Americ Jnl of Infect Contro.* **34**:20-28

E

19. Elmanama A, ELKICHAOUI Y et Mai M. (2006). Contribution of hospital wastewater to the spread of antibiotic Resistance in comparaison to non-health institution. *Jnl of al Aqsa Univer.* **10**: 108-121.

F

20. Falagas M, Karageorgopoulos D. (2009). Extend-spectrum β -lactmase producing organisms. *Jnl of Hosp Infect:* 1-10.
- 21.

22. Farkas A, Butiuc-Keul A, Ciataras D, Neamtu C, Craciunas C, Podar D. (2013). Microbiological contamination and resistance genes in biofilms occurring during the drinking water treatment process. *Sci of Total Envir.* **443** : 932–8.
23. Fatih M, Aysenur D, Loyal D. (2008). Les agents antibactériens et résistance aux métaux lourds chez les bactéries à Gram négatif isolées à partir de l'eau de mer, les Crevettes et les sédiments dans la baie d'Iskenderun, Turquie. *Sci of Total Envir.* **10**:1016 .

E

24. Elomari M, Caroler L, Izard D, Leclerc H. (1995). A numerical taxonomic study of *fluorescent Pseudomonas* strains isolated from natural mineral waters. *J Appl Bacteriol.* **5**:71–81.
25. Engel HJ, Collingnon PJ, Whiting PT et Kendy KJ. (2009). *Serratia sp.* Bacteria in Canberra, Australia: a population based study over 10 years. *Microbial and infect Dis.* **28**: 821-824.

G

26. Guardabassi L, Dalsgaard A, Raffatellu M, Olsen JE. (2000). Increase in the prevalence of oxolinic acid resistant *Acinetobacter spp*, observed in a stream receiving the effluent from a freshwater trout farm following the treatment with oxolinic acid-medicated feed. *Aquaculture. Path Biol* **188**: 205–218.
27. Galleni M, Raquet X, Lamotte-Brasseur J, Fonze E, Amicosante G, Frere JM. (1995). DD-peptidases and beta-lactamases: catalytic mechanisms and specificities. *Jrnl of antimicrob Chemotherp.* **7**: 3-7.

I

28. Isozumi R, Yoshimatsu K, Yamashiro T, Haseb F, Nguyen BM, Cuong Ngo T, Yasuda SP, Koma T, Shimizu K, et Arikaw J. (2012). BlaNDM-1 positive *Klebsiella pneumonia* from Environment, Vietnam. *Emerg Infct Dis.* **8**: 1383-1384.

J

29. Jacoby GA et Munoz-Price LS. (2005). The new béta-Lactamase. *The nw Egld Jrnl of Med.* **91**: 352 -380.
30. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, et Philoppon A. (1988). Extended- broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in
- 31.

32. *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev of infect Dis. **10**: 867-878.
33. Jiang CL, Hu X, Xu T, Zhang H, Sheng D, Yin D. (2013). Prevalence of antibiotic resistance genes and their relationship with antibiotics in the Huangpu River and the drinking water sources, Shanghai, China. Sci of the Totl Envir. 458–460: 267–272
34. Justin S, Hawa A, Lady F, Mohammed B. (2015). Presence of *Pseudomonas aeruginosa* in coliform-free sachet drinking water in Ghana. Sci of the Ttal Envir **55**: 242-247.

K

35. Kempf I et Zeitoni S. (2012). Coût biologique de la résistance aux antibiotiques:analyse et consequences. Path Biol. **60**: 9-14
36. Kümmerer K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment-A review-Part II. Jnl of Antimicrob Chemoth. **75**: 435–441.
37. Korzeniewska E et Harnisz M. (2013). Beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* in hospitals effluents. Jnl of Envir Mangem. **123**: 1-7

L

38. Laroche E, Petit F, Fournier M et Pawlak B. (2010). Transport of antibiotic resistant *Escherichia coli* in public rural water supply. Jnl of Hydro. **392**: 12-21.
39. Laurence D, Rouzeta b, Vincent J. MARS. (2014). rev fran des labos N°460.
40. Lazar V, Cernet R, Balotesco C, Coter A, Coipan E, Cojacaru C. (2002). Beta–lactam resistance in aquatic *Enterobacter cloacae* strains using phenotypic and genotypic criteria. **47**: 3-4
41. Lindsey ME, Meyer M, Thurman EM. (2001). Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials, in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. Anal Chmstry. **73**: 4640-4646.

M

42. Machado A, Bordalo AA. (2014). Prevalence of antibiotic resistance in bacteria isolated from drinking well water available in Guinea-Bissau (West Africa).Jnl of Envir Mangem **12**:1016-1022.
43. Martinez JL, (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. Envir Plution. **157**: 2893–2902.

44. Marti E, Variatza E, Balcazar JL. (2014). The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends Microbiol.* **22**: 36–41.
45. Messi P, Guerrieri E, Bondi M. (2005). Antibiotic resistance and antibacterial activity in heterotrophic bacteria of mineral water origin. *Sci of the Ttal Envir.* **346**: 213– 219
46. Mckeont D, Clabrese J, Bissoette G. (1995). Antibitic resistant Gram negative bacteria in rural ground water supplies. *Envir Sci & Tech* **1**: 1343-1354.
47. Maurin M, Musso D, Charrel R, Perez R, N’Gyen A, Dumon H, De Micco P. (1995). Résistance aux antibiotiques des bactéries hospitalières (bacilles à Gram négatif aérobies). *Méd et Mald Infect.* **41**:1738-1739.

P

48. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. (2002). Plasmid-determined AmpC-type betalactamases. *Antimicrob. Agents Chemoth.* **46**: 1–11
49. Pruden A, Pei R, Storteboom H, Carlson K.H. (2006). Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado. *Envir Sci & Tech.* **40**: 7445-7450.
50. Passerat J, Tamtam F, Le Bot B, Eurin J, Chevreuil M, et Servais P. (2010). Rejets hospitaliers d’antibiotiques et de bactéries fécales antibiorésistantes dans les rivières du bassin de la Seine. *Eur jrl water qual.* **41**:1-13.

R

51. Spencer RC. (1995). The emergence of epidemic, multiple-antibiotic resistant *Stenotrophomonas(Xanthomonas)maltophilia* and *Burkholderia pseudomonas Cepacia*. *Jrnl of Hospt Infect.* **30**: 453-464

S

52. Servais P, Passerat J. (2009). Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France). *Sci of the Ttal Envir.* **408**: 365–372.
53. Sougakoff W et Tyrstram D. (2003). Résistance aux aux β -lactamines. Université Pierre et Marie Curie. Faculté de Medcine Pierre et Marie Curie. p78.
54. Seck R. (2005). Résistances des souches d’*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* isolées d’infections urinaires .Thèse de doctorat. Université cheikh Antadiop de Dakar, faculté de médecine, de pharmacie et d’endonto-stomatologie, département de pharmacie. p 79.

T

55. Tang SS, Apisarnthanarak A, Hsu LY. (2014). Mechanisms of β -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrugresistant bacteria. *Adv Drug Deliv Rev.* **10**: 1016-1032.
56. Tamtam F, Mercier F, Le Bot B, Eurin J, Dinh QT, Clement M, Chevreuil, M. (2008). Occurrence and fate of antibiotics in the seine River in various hydrological conditions. *Sci of the Ttal Envir.* **393**: 84-95.
57. Taylor NG, Verner-Jeffreys DW, Baker-Austin C. (2011): Aquatic systems: maintaining, mixing and mobilising antimicrobial resistance. **26**: 278-284
58. Tigajdid MR, Boumhil L, Iken M, Adnaoui M, Benouda A. (2010). Etude de la résistance des souches d'*Escherichia coli* isolées dans les urines aux fluoroquilonnes et aux céphalosporines de troisième génération. *Méd et Mald Infect.* **40** :70-73.

X

59. Xu WH, Zhang G, Li XD, Zou SC, Li P, Hu ZH, Li J. (2007). Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in the Pearl River Delta (PRD), South China. *Water Reseach.* **41**: 4526-4534.

Z

60. Zuccato E, Castiglioni S, Bagnati R, Melis M, Fanelli R. (2010). Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment. *Jrnl of Hazardous Materi.* **179**:1042–1048.

ANNEXES

Annexe I

Profil de sensibilité aux β -lactamines

CODE	Espèces	AMC	CAZ	CTX	FEP	CX	ATM	IMP	ETP	BLS E
AH1	<i>Shigella</i>	S	R	R	R	R	/	S	S	+
AH2	<i>E.coli</i>	R	R	R	S	R	R	S	S	-
AH3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	-
AH4	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	-
AH5	<i>E.coli</i>	R	R	R	S	R	R	S	S	-
AH6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	S	/	R	R	S	-
AH7	<i>Shigella</i>	S	R	R	R	/	R	S	S	+
AH8	<i>Serratia sp</i>	R	R	S	R	/	R	S	S	-
AH9	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	+
AH10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	+
AH11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	/	R	S	S	-
AH12	<i>Enterobacter sp</i>	R	R	S	R	R	R	S	S	-
AH13	<i>Citrobacter sp</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	-
AH14	<i>S.maltophilia</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	+
AH15	<i>E.coli</i>	R	R	R	S	R	R	S	S	-
AH16	<i>Citrobacter sp</i>	S	S	S	S	R	R	S	R	+
AH17	<i>Proteus mirabilis</i>	R	R	R	S	R	R	S	S	+
AH18	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	S	R	R	R	R	/	S	S	+
AH19	<i>Citrobacter sp</i>	R	S	R	R	R	R	S	S	+
AH20	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	S	S	S	R	R	S	S	-
AH21	<i>Shigella</i>	S	R	R	S	R	R	S	R	+
AH22	<i>Citrobacter sp</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	-
AH23	<i>Proteus morganii</i>	S	R	S	R	R	R	S	R	-
AH24	<i>S.maltophilia</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	+
AH25	<i>Shigella</i>	R	R	S	R	R	R	S	S	-
AH26	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	R	S	R	+
AH27	<i>E.coli</i>	R	R	R	S	R	R	S	S	+
AH28	<i>Serratia marcescens</i>	R	R	R	R	R	/	S	S	+
AH29	<i>E.coli</i>	R	R	R	S	R	/	S	S	-
AH30	<i>Citrobacter sp</i>	R	S	S	R	R	R	S	S	-
AH31	<i>Pseudomona aeroginas</i>	R	R	R	S	R	/	R	S	-
AH32	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	-
AH33	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	+
AH34	<i>Citrobacter sp</i>	R	S	S	S	R	R	S	S	-
AH35	<i>Proteus sp</i>	R	R	R	S	S	S	S	S	+
AH36	<i>Pseudomonas aeroginosa</i>	R	R	R	S	R	R	S	S	-
AH37	<i>Shigella</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	-
AH38	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	-
AH39	<i>Proteus sp</i>	R	R	R	R	S	R	S	S	+
AH40	<i>Citrobacter freundii</i>	R	S	R	R	R	R	S	S	-
AH41	<i>Citrobacter freundii</i>	S	R	R	S	S	/	S	S	+
AH42	<i>Shigella</i>	R	R	S	R	R	R	S	S	+
AH43	<i>Serratia marcescens</i>	R	R	R	R	R	/	S	S	-
AH44	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	/	R	S	S	+
AH45	<i>Serratia marcescens</i>	R	R	S	R	R	/	S	S	+

AH46	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	/	R	S	S	-
AH47	<i>Citrobacter Freundi</i>	R	R	R	R	/	R	S	S	-
AH48	<i>Serratia</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	-
AH49	<i>Citrobacter Freundi</i>	/	R	/	R	R	/	S	S	+
AH50	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	/	S	S	+
AH51	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	+
AH52	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	/	S	S	+
AH53	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	S	R	R	R	R	R	S	-
AH54	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	/	S	S	+
AH55	<i>Serratia marcescens</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	-
AH56	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	/	R	S	S	-
AH57	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	S	R	/	S	S	-
AH58	<i>Aeromonas hydrophila</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	-
AH59	<i>Proteus mirabilis</i>	S	R	R	R	R	R	R	R	-
AH60	<i>Citrobacter sp</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	-
AH61	<i>Shigella</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	-
AH62	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	S	R	-
AH63	<i>Citrobacter sp</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	-
AH64	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	/	S	S	+
AH65	<i>Citrobacter sp</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	-
AH66	<i>pseudomonas</i>	R	R	R	S	R	R	R	S	-
AH67	<i>Enterobacter</i>	R	R	R	R	R	R	S	R	-
AH68	<i>Proteus sp</i>	R	R	S	S	R	R	S	S	-
AH69	<i>Shigella</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	-
AH70	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	-
AH71	<i>Enterobacter</i>	R	R	R	R	R	/	S	S	-
AH72	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	/	S	S	+
AH73	<i>Shigella</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	-
AH74	<i>Citrobacter sp</i>	S	R	S	R	R	R	S	S	-
AH75	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	-
AH76	<i>Shigella</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	-
AH77	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	+
AH78	<i>Citrobacter sp</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	-
AH79	<i>Enterobacter sp</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	-
AH80	<i>Enterobacter sp</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	-
AH81	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	R	R	R	R	R	S	S	-
AH82	<i>pseudomonas</i>	R	S	R	S	R	S	R	S	-
AH83	<i>Enterobacter sp</i>	S	S	R	R	R	/	S	S	-
AH84	<i>Enterobacter sp</i>	S	S	R	S	S	R	S	S	-
AH85	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	+
AH86	<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	-
AH87	<i>Enterobacter sp</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	-
AH88	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	/	R	S	-
AH89	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	/	R	R	-
AH90	<i>Serratia sp</i>	S	R	R	S	S	R	S	S	-
AH91	<i>Serratia sp</i>	R	R	R	S	S	S	S	S	-
AH92	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	/	S	S	+
AH93	<i>Serratia sp</i>	S	R	S	R	R	/	S	S	+
AH94	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	/	S	S	-
AH95	<i>Enterobacter sp</i>	R	R	R	R	/	R	S	S	+

AH96	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	-
AH97	<i>Shigella</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	-
AH98	<i>Enterobacter sp</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	-
AH99	<i>Citrobacter gillenii</i>	R	R	R	R	R	/	S	S	+
AH100	<i>E.coli</i>	S	R	R	R	R	/	S	S	-
AH101	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	-
AH102	<i>shigella</i>	R	R	S	R	R	R	S	S	-
AH103	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	/	/	S	S	-
AH104	<i>Citrobacter brakii</i>	R	R	S	R	R	R	S	S	-
AH105	<i>Citrobacter sp</i>	R	R	R	R	R	/	S	S	-
AH106	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	/	S	S	+
AH107	<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	R	R	R	/	S	S	-
AH108	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	/	S	S	+
AH109	<i>Enterrobacter sp</i>	S	R	S	S	R	/	S	S	+
AH110	<i>Enterobacter</i>	S	R	R	R	/	R	S	S	+
AH111	<i>Shigella</i>	S	R	R	R	/	R	S	S	+
AH112	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	/	S	S	-
AH113	<i>Serratia sp</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	-
AH114	<i>Serratia marcescens</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	-
AH115	<i>Shigella</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	-
AH116	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	R	R	R	S	/	R	S	S	+
AH 117	<i>Pseudomonas putida</i>	R	R	R	S	/	R	R	R	-
AH 118	<i>Citrobacter sp</i>	R	R	R	R	S	R	S	S	-
AH119	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	S	R	S	S	-
AH120	<i>Enterobacter sp</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	-

(-) absence de synergie

(+) présence de synergie

ANNEXE II

Profil de sensibilité aux autres familles d'antibiotiques.

Code	Souche	AK	CN	CIP	TE
AH1	<i>Shigella</i>	S	S	S	R
AH2	<i>E.coli</i>	S	S	R	R
AH3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	S	S	R
AH4	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	S	S	R	S
AH5	<i>E.coli</i>	S	S	S	S
AH6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	S	S	S
AH7	<i>Shigella</i>	S	S	R	S
AH8	<i>Serratia</i>	S	S	-	S
AH9	<i>E.coli</i>	S	S	S	S
AH10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	S	S	S
AH11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	S	S	S
AH12	<i>Enterrobacter</i>	S	S	S	S
AH13	<i>Citrobacter sp</i>	S	S	S	S
AH14	<i>S.maltophilia</i>	S	S	-	S
AH15	<i>E.coli</i>	S	S	S	R
AH16	<i>Citrobacter Sp</i>	S	S	S	R
AH17	<i>Proteus mirabilis</i>	S	S	S	S
AH18	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	S	S	R	R
AH19	<i>Citrobacter Sp</i>	S	S	R	S
AH20	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	R	S	S
AH21	<i>Shigella</i>	S	S	S	R
AH22	<i>Citrobacter gillenii</i>	S	S	-	S
AH23	<i>Proteus morgani</i>	S	S	S	R
AH24	<i>S.maltophilia</i>	S	S	S	S
AH25	<i>Shigella</i>	R	S	-	S
AH26	<i>E.coli</i>	S	S	S	R
AH27	<i>E.coli</i>	S	S	R	S
AH28	<i>Serratia marcescens</i>	S	S	R	R
AH29	<i>E.coli</i>	S	S	S	S
AH30	<i>Citrobacter sp</i>	S	R	S	S
AH31	<i>Pseudomona aeroginas</i>	R	S	-	S
AH32	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	S	S	R
AH33	<i>E.coli</i>	S	S	R	R
AH34	<i>Citrobacter sp</i>	S	R	S	S
AH35	<i>Proteus sp</i>	S	R	S	S
AH36	<i>Pseudomonas aeroginosa</i>	S	R	R	R
AH37	<i>Shigella</i>	S	R	S	R
AH38	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	R	R	S	S
AH39	<i>Proteus sp</i>	S	R	R	S
AH40	<i>Citrobacter Freundi</i>	S	R	S	S
AH41	<i>Citrobacter freundii</i>	S	R	S	R
AH42	<i>Shigella</i>	S	R	S	R
AH43	<i>Serratia marcensens</i>	S	S	S	R
AH44	<i>E.coli</i>	S	S	R	R
AH45	<i>Serratia marcensens</i>	S	S	R	S

AH46	<i>E.coli</i>	S	S	R	R
AH47	<i>Citrobacter Freundi</i>	S	S	S	S
AH48	<i>Serratia</i>	S	S	S	S
AH49	<i>Citrobacter Freundi</i>	S	S	R	R
AH50	<i>E.coli</i>	S	S	S	S
AH51	<i>E.coli</i>	S	S	S	S
AH52	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	S
AH53	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	R	S	R
AH54	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	R	S	S
AH55	<i>Serratia marcescens</i>	S	S	S	S
AH56	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	R	S	S
AH57	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	R	S	S
AH58	<i>Aeromonas Hydrophila</i>	S	R	S	R
AH59	<i>Proteus mirabilis</i>	R	S	S	R
AH60	<i>Citrobacter sp</i>	R	S	S	S
tAH61	<i>Shigella</i>	S	S	S	S
AH62	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	S	S	S	S
AH63	<i>Citrobacter sp</i>	R	R	R	S
AH64	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	S	S	S	R
AH65	<i>Citrobacter sp</i>	S	S	S	S
AH66	<i>pseudomonas</i>	S	R	S	R
AH67	<i>Enterobacter</i>	S	S	S	S
AH68	<i>Proteus sp</i>	S	S	S	S
AH69	<i>Shigella</i>	S	S	S	R
AH70	<i>E.coli</i>	S	S	S	S
AH71	<i>Enterrobacter</i>	R	R	S	S
AH72	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	R	S	S
AH73	<i>Shigella</i>	S	S	S	S
AH74	<i>Citrobacter sp</i>	S	S	S	S
AH75	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	S	S	S
AH76	<i>Shigella</i>	S	S	S	S
AH77	<i>E.coli</i>	S	S	-	S
AH78	<i>Citrobacter sp</i>	S	S	S	S
AH79	<i>Enterobacter sp</i>	S	S	S	R
AH80	<i>Enterobacter sp</i>	R	S	S	S
AH81	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	S	S	S
AH82	<i>pseudomonas</i>	S	S	S	S
AH83	<i>Enterobacter sp</i>	R	S	R	S
AH84	<i>Enterrobacter Sp</i>	S	S	S	R
AH85	<i>E.coli</i>	S	S	R	R
AH86	<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	S	R	S
AH87	<i>Enterobacter sp</i>	R	S	R	S
AH88	<i>E.coli</i>	R	R	R	S
AH89	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	S	S	S
AH90	<i>Serratia</i>	R	S	S	S
AH91	<i>Serratia</i>	R	S	S	R
AH92	<i>E.coli</i>	R	S	S	S
AH93	<i>Serratia</i>	S	S	S	S
AH94	<i>E.coli</i>	R	S	S	S
AH95	<i>Enterrobacter Sp</i>	S	S	-	R
AH96	<i>E.coli</i>	S	S	S	S
AH97	<i>Shigella</i>	R	S	S	S
AH98	<i>Enterobacter sp</i>	R	S	S	S

AH99	<i>Citrobacter gillenii</i>	S	S	S	S
AH100	<i>E.coli</i>	R	S	S	S
AH101	<i>E.coli</i>	R	R	S	R
AH102	<i>shigella</i>	R	S	S	S
AH103	<i>E.coli</i>	R	S	S	S
AH104	<i>Citrobacter brakii</i>	R	S	R	S
AH105	<i>Citrobacter sp</i>	R	S	S	R
AH106	<i>E.coli</i>	S	S	S	S
AH107	<i>Citrobacter freundii</i>	S	S	S	S
AH108	<i>E.coli</i>	S	S	S	S
AH109	<i>Enterrobacter sp</i>	S	S	S	S
AH110	<i>Enterobacter</i>	S	S	S	S
AH111	<i>Shigella</i>	S	S	-	S
AH112	<i>E.coli</i>	R	S	S	S
AH113	<i>Serratia</i>	S	R	S	S
AH114	<i>Serratia marcescens</i>	R	R	R	S
AH115	<i>Shigella</i>	S	S	S	S
AH116	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	S	S	S	S
AH 117	<i>Pseudomonas putida</i>	S	S	S	S
AH 118	<i>Citrobacter sp</i>	R	S	S	S
AH119	<i>E.coli</i>	R	S	S	S
AH120	<i>Enterobacter sp</i>	R	S	S	S

Annexe III

Composition des milieux de cultures (en g/l d'eau distillés)

Gélose Mac Conkey	pH=7, 4+/- 0,2
Peptone	20
Lactose	10
Sels biliaires	5
Rouge neutre	0, 075
Chlorure de sodium	05
Agar	12
Gélose Mueller Hinton	pH=7,3+/- 0,1
Infusion de viande de boeuf	2
Hydrolysate de caséine	17,5
Amidon	1,5
Agar	17
Gélose TSI	pH=7,4+/- 0,2
Extrait de viande de boeuf	03
Extrait de levure	03
Peptone trypsine (peptic digest of animal tissue)	20
Chlorure de sodium	05
Citrate ferrique	0,3
Lactose	10
Glucose	01
Saccharose	10
Thiosulfate de sodium, 5H ₂ O	0,3
Rouge de phénol	0,024

Agar	12
Milieu de Citrate de Simmons	pH=6,9+/-0,2
Citrate de sodium	02
Chlorure de sodium	05
Sulfate de magnésium	0,2
Phosphate monoammoniaque	01
Phosphate bipotassique	01
Bleu de bromothymol	0,08
Agar	15
Mannitol mobilité	pH=7,4+/-0,2
Peptone tryptique de viande	20
Agar	04
Mannitol	02
KNO ₃	01
Rouge de phénol à 1%	04ml
Milieu Clark-Lubs	pH=7+/-0,2
Peptone tryptique de viande	05
Phosphate bipotassique	05
Glucose	06
Bouillon nitraté	pH=7+/- 0,2
Infusion cerveau-cœur	25
Nitrate de potassium	10
Milieu Urée-Indole	pH=7+/- 0,2
l-tryptophane	03
Phosphate monopotassique	01
Phosphate bipotassique	01
Chlorure de sodium	05

Urée	20
Alcool à 90°	10ml
Rouge de phénol en solution à 1%	2,5ml

Bouillon nutritif	pH=7,5+/- 0,2
Peptone de viande	4,3
Peptone de caseine	05
Chlorure de sodium	6,4

Annexe IV

Réactifs utilisés

Réactif de Kovacs

Alcool amylique ou isoamylique	150ml
P.diméthylaminobenzaldehyde	10g
Acide chlorhydrique concentré	50ml

Réactif de TDA (tryptophane désaminase)

Soluté de perchlorure de fer $FeCl_3$	10ml
Eau distillée	20ml

Réactif de Voges-Proskauer (VPI)

α Naphthol	6g
Alcool éthylique à 90°	100ml

Réactif de Voges-Proskauer (VPII)

NaOH4N

Rouge de méthyle (RM)

Rouge de méthyle.....	0,5g
Alcool éthylique à 60°	100ml

Réactif de Griess I (NRI)

Acide parasulfanilique	8g
Acide acétique 5N	1L

Réactif de Griess II (NRII)

α Naphtylamine	6g
Acide acétique 5N	1L

Résumé

L'eau de puits peut être une source d'agents pathogènes. Ces agents représentent un réservoir de déterminants de la résistance ainsi qu'un moyen pour la propagation et l'évolution des gènes de résistance aux antibiotiques. 100 prélèvements d'eau de puits sont effectués afin de rechercher les bacilles à Gram négatif. L'identification des souches est basée sur la coloration de Gram et sur les différents tests biochimiques. La sensibilité des souches aux antibiotiques est réalisée par l'antibiogramme standard. La production de β -lactamase à spectre étendu est détectée par le test de synergie (DD test), et la production de carbapénémase par le carba NP test modifié.

Sur les 100 prélèvements effectués, 120 souches à Gram négatif sont isolées, 111 souches sont des entérobactéries, 8 du genre *Pseudomonas*, 2 souches de *S.maltophilia* une souche d'*Aeromonas*. La sensibilité de ces souches aux antibiotiques (08 β -lactamines et 4 appartenant aux autres familles d'antibiotiques), a révélé que 95,79% des BGN isolés sont résistantes à l'ATM, 91,66%, 90,75%, 84,16%, 78,33%, 75,83%, 13,33%, 10,83% sont résistants respectivement à la CX, CAZ, AMC, CTX, FEP, IMP, et à L'ETP. Les taux de résistance aux autres familles d'antibiotiques sont les suivants : 27%, 24,16%, 19,16, vis-à-vis d'AK, CN, CIP, la tétracycline est plus active sur ces souches avec un taux de résistance de 27,50%.

40 souches sont productrices de BLSE. Le résultat du carba NP test était négatif pour les 7 souches testées.

Mots clés : eau de puits, bacilles à Gram négatif, antibiotiques, résistance, DD test, carba NP test modifié.

Abstract:

Well water can be a source of pathogens. These agents represent a pool of determinants of resistance and a way for the spread and evolution of resistance genes antibiotics. 100 well water sampling are carried out to find Gram-negative bacilli. The identification of the strains is based on the Gram stain and the various biochemical tests. Sensitivity of strains to antibiotics is performed by standard antibiogram. The production of β -lactamase extended spectrum is detected by synergy test (SD test), and production of carbapenemases by modified carba NP test.

Of the 100 samples taken, 120 Gram-negative strains were isolated, 111 strains of Enterobacteriaceae, 8 *Pseudomonas*, 2 strains of *S.maltophilia* and 1 strain of *Aeromonas*. The sensitivity of these strains to antibiotics (08 β -lactams and 4 belonging to other families of antibiotics), showed that 95.79% of isolated GNB were resistant to ATM, 91,66% 90,75%, 84,16%, 78,33%, 75,83%, 13,33.2%, 10,83% are resistant to CX respectively to the CAZ, AMC, CTX, FEP, IMP, and to the ETP. The rates of resistance to others antibiotics are as follows: 27% 24.16% 19.16, with respect to AK, CN, CIP, and tetracycline is more active in these strains with a resistance rate of 27.50%.

40 strains produced ESBLs. The result of carba NP test was negative for 7 strains tested.

Keywords: well water, Gram negative bacilli, antibiotics, resistance, SD test, modified carba NP test.