

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur Et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane Mira de Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Microbiologie



Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Option : Microbiologie Moléculaire et Médicale

Etude de la résistance aux
antibiotiques des bacilles à Gram
négatif isolés d'Oued Soummam :
Béjaia

Présenté par :

M^{elle} Bentizi Ndjima épouse Zeboudj

Soutenu le 09 Juin 2014 devant le jury composé de :

Président : Mr F. Djoudi	MAA	Université A.M Béjaia
Promotrice : Mlle R. Tafoukt	MAB	Université A.M Béjaia
Examineur I : Mme K. Belhadi	MAA	Université A.M Béjaia
Examineur II : Mlle B. Yanat	MAA	Université A.M Béjaia

Année : 2013 -2014

Remerciements

Tout d'abord nous rendrons grâce à dieu qui est à la base de toute chose.

Mes remerciement vont à l'endroit du :

Ma promotrice M^e Tafoukt Rima, qu'elle ma fait l'honneur de diriger ce travail, pour sa grande disponibilité et son sacrifice consenti à mon égard, ainsi que pour la qualité de son encadrement et ses précieuses conseils.

Je remercie vivement, Mr F. Djoudi, Mlle B. Fanat et Mme N. Belhadi qui ont accepté d'examiner et de valoriser ce travail.

Le chef du département de Microbiologie Mr TOUATI pour son aide et ses orientations. Tous les enseignants et techniciens du laboratoire de recherche de microbiologie pour leur aide précieuse dans la réalisation de ce mémoire.

Mon épouse Tarik qu'il ma aidé durant la période de stage, qui a consacré tout son temps et ses propres moyen pour réussir ce travail. Mon cher oncle Mokrane pour ses importants conseils à la réalisation des prélèvements au sein de la région de BEJAJA

Toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin de quelque façon que ce soit, à la concrétisation de ce travail.

Dédicaces

Aucune dédicace ne serait être assez éloquente pour exprimer ma gratitude, mon amour et mon respect à tous ceux qui m'ont aidé, soutenu et encouragé tout au long de ce travail.

*Un travail que je dédie à, toi, mon très cher **papa**, malgré le vide immense que tu nous as laissé, tu resteras à tout jamais présent dans nos cœurs et dans nos mémoires, toi, mon ange gardien. Sans oublier mon petit frère **Ghilas** que dieu vous accueille dans son vaste paradis.*

Je le dédie, également, à ma très chère et tendre maman, que dieu tout puissant te garde et te procure santé, bonheur et longue vie pour demeurer le flambeau illuminant mes chemins.

*A mon très cher épouse **CAROL**, à qui je dois tout le respect, qui m'a été d'un grand soutien et qui a toujours été là pour moi, ainsi que toute sa famille.*

*A mon très cher oncle, **Mokrane** (papa), les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement et l'affection que je te porte.*

*A mes grands-parents que dieu les garde et leurs donne longue vie, à ma chère tante **BOLBA**, à mes sœurs **Soussou**, **Tata**, **SaZou** et **Samou**, qui ont cru en moi, m'ont fait confiance, soutenus et encouragés. à tout mes oncles et tantes que dieu les protège.*

*A mes très chère amis **Tata**, **Kami**, **Sofiane**, **Samir**, **Zahra**. Et fatma*

*Surtout **Safia***

*A toute la promo **MMM** 2013-2014*

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Listes des figures	
Introduction.....	1
Matériel et méthodes	
I.Présentation du site de prélèvement.....	4
I.1 Les principales villes et les principaux affluents	4
I.2 Choix des points de prélèvement	5
II. Isolement et identification.....	6
II.1 Prélèvements.....	6
II.2 Enrichissement.....	6
II.3 Isolement et purification.....	7
II.4 Identification des souches résistantes.....	7
III. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques.....	7
IV. Recherche de phénotypes de résistance probable.....	10
Résultats	
I. Isolement et identification des souches.....	11
I.1.Les différentes souches isolées.....	11
II. Sensibilité des souches à Gram négatif aux antibiotiques.....	12
III. Les phénotypes de résistance probables.....	14
Discussion.....	17
Conclusion.....	21
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des tableaux

Tableau I :Principaux efflux d'oued Soummam.....	05
Tableau II : Sites de prélèvement	06
Tableau III : Antibiotiques testés	09
Tableau IV : Dates de prélèvement et nombre	11
Tableau V : B-lactamases produites et les nombres des souches productrices...	14

Annexe I

Tableau I : Résistance des souches isolées aux B-lactamines

Tableau II : Résistance des souches isolées aux autres antibiotiques

Liste des figures

Figure N°01 : Position géographique de d'oued Soummam.....	04
Figure N°02 : Position des disques d'antibiotiques.....	10
Figure N°03 : Différentes souches à Gram négatif isolées.....	12
Figure N°04 : Taux de résistance aux B-lactamines.....	13
Figure N°05 : Taux de résistance aux autres antibiotiques.....	14
Figure N°06 : Répartition des BLSE selon les espèces	15
Figure N°07 : Photo d'une souche BLSE + et souche BLSE-	15
Figure N°08 : Photo d'une souche productrice d'AmpC et une souche AmpC + BLSE...	16

Liste des abréviations

CAZ : Céftazidime

CTX : Céfotaxime

ATM : Aztréonam

FEP : Céfépime

AMC : Amoxicilline / acide clavulanique

TOB : Tobtamycine

C : Chloramphenicol

TR : Triméthoprim

TE : Tetracycline

NA : acide Nalidixique

CX : Cefoxitine

BLSE : β -lactamase spectre étendu

D-D test: double disque test

MH: Muller hinton

I: Intermédiaire

S: Sensible

R: Résistant

Introduction

Introduction

Les antibiotiques sont des substances chimiques ou élaborées naturellement par certains micro-organismes, et qui ont un effet bactéricide ou bactériostatique. Ces antimicrobiens sont utilisés pour lutter contre les infections bactériennes en médecine humaine, mais au cours de ces cinquante dernières années l'usage de ces molécules a été augmenté (Servais et Passerat, 2009). En plus de leurs utilisations pour traiter ou pour prévenir les maladies humaines, les antibiotiques sont également utilisés en médecine vétérinaire et en élevage comme compléments alimentaires. Cette utilisation massive de ces molécules favorise l'émergence de la résistance bactérienne (Castiglioni et *al.*, 2008). La résistance aux antibiotiques d'une bactérie se traduit par la capacité d'une bactérie à échapper à l'action d'un ou plusieurs antibiotiques. Elle est considérée comme un problème majeur de santé publique (Moore et *al.*, 2009).

L'utilisation excessive d'antibiotiques en médecine humaine et comme promoteur de croissance a conduit à un problème mondial de contamination du milieu aquatique par les antibiotiques (Jiang et *al.*, 2013). Les résidus d'agents antimicrobiens peuvent être retrouvés dans les effluents des eaux usées, en particulier dans les endroits où ces médicaments sont largement utilisés, comme les hôpitaux, les usines de production pharmaceutique et autour des fermes (Sabate et *al.*, 2008). Ces molécules sont souvent partiellement métabolisées dans l'organisme et sont excrétées sous forme inchangée ou autant que métabolites dans les urines et les fèces avant d'être évacuées, dans les eaux usées (Tamtam et *al.*, 2008).

La contamination de l'environnement naturel 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 égouts, en effet les antibiotiques utilisés en médecine humaine et leurs métabolites sont évacués dans les égouts et peuvent être retrouvés dans les boues et les effluents des stations d'épuration qui peuvent eux-mêmes être par l'arrosage ou la fertilisation des terres agricoles. Les antibiotiques sont ensuite retrouvés dans les eaux des surfaces ou les eaux souterraines ou ils peuvent favoriser l'émergence des souches bactériennes multi-résistantes (Laurence et *al.*, 2013).

Cependant, l'utilisation des antibiotiques par l'homme n'est probablement pas la seule pression sélective pour la résistance aux antibiotiques dans les communautés microbiennes naturelles. En effet, la plupart des antibiotiques sont produits par les champignons et de bactéries présentes naturellement dans l'environnement, y compris le sol. La plupart des souches productrices d'antibiotiques portent des gènes codant pour la résistance aux

antibiotiques qu'ils produisent. Les antibiotiques produits dans l'environnement peuvent exercer une pression de sélection sur les organismes voisins (Allen et *al.*; 2010). Le Sol, l'un des plus importants et diversifiés habitats microbiens sur terre, est de plus en plus reconnu comme un vaste réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques (Forsberg, 2012)

Du fait que l'environnement est un réservoir de plusieurs micro-organismes et le lieu des remaniements génétiques, le transfert de la résistance et la diffusion des gènes de résistance aux antibiotiques augmente au fur et à mesure entre les bactéries de l'environnement (Baudart et Paniel, 2013). Une fois présent dans l'environnement les gènes de résistance sont largement transférés entre les espèces bactériennes et répandus dans ce milieu (Jiang et *al.*, 2013).

On rencontre couramment des bactéries résistantes aux antibiotiques dans les milieux où ceux-ci sont utilisés, mais également dans divers environnements naturels comme le milieu aquatique (Garcia et *al.*, 2010). La plupart des bactéries isolées à partir de ces milieux aquatiques sont des Gram négatif, aérobies et des hétérotrophes (Holder -Franklin et *al.*, 1992), et quelques Gram positif comme les streptocoques, la présence des *E.coli* et des entérocoques intestinaux indique une contamination fécale de ces milieux (Servais et Passerat, 2009) . Les pathogènes hydriques peuvent exister à l'état naturel dans ces environnements aquatiques c'est le cas des bactéries appartenant au groupe des cyanobactéries, au genre *Legionella sp*, *Aeromonas sp* ou encore des espèces de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Burkholderia pseudomallei* qui sont présents dans les lacs, les eaux douces et dans les rivières (Baudart et Paniel, 2013).

Les fleuves et les rivières sont des écosystèmes profondément perturbés par l'activité humaine due aux rejets des métaux lourds, des polluants organiques et des produits pharmaceutiques ainsi que les micro organismes fécaux qui coexistent avec la population microbienne autochtone (Garcia et *al.*, 2013).

Machado et coll. ont montré que des souches des entérobactéries productrices de β -lactames à spectre étendu (EBLSE) produisant les enzymes TEM-24, 52, CTX-M-14 et -32 étaient présentes dans des échantillons d'eau prélevés dans la rivière Sousa et au niveau de la côte de Porto, au Portugal, à proximité de points de déversement d'eaux usées. En République tchèque, des souches de EBLSE, principalement des souches de *E. coli* produisant une BLSE de type CTX-M-15, ont été retrouvées dans les effluents traités d'une station d'épuration qui sont déversés dans la rivière Svratka. Le clone qui dominait dans cette étude était le clone B2-O25b-ST131 qui prédomine également chez l'homme. Cette étude tchèque faisait écho à une

étude anglaise montrant la présence de souches de *E. coli* BLSE appartenant au ST131 dans la Tamise aux alentours de Londres (Drieux-Rouzet et Jarlier, 2014).

En Algérie peu d'études ont été réalisées sur la contamination des milieux aquatiques par des bactéries résistantes. Alouache et ses collaborateurs ont étudié la résistance aux antibiotiques et la production de BLSE chez les bactéries isolées à partir d'eau de mer de plages d'Alger (Algérie). Habi et Daba ont rapporté la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds chez les souches d'entérobactéries isolées des cours d'eaux en Algérie.

Les menaces de pollution qui pèsent sur le bassin de la Soummam sont multiples et clairement identifiées. Des décharges communales et sauvages par dizaines, les eaux usées de centaines d'agglomérations rejetées directement dans les lits des oueds, rejets d'usines, de poulaillers et d'hôpitaux, une urbanisation anarchique, une vingtaine de sablières qui pillent systématiquement le sable et l'eau de la rivière. Oued Soummam joue le rôle d'exutoire et de transports des différents rejets urbains et industriels (Dahdouh 1994). C'est dans ce contexte que nous proposons d'évaluer la contamination d'oued Soummam par des bacilles à Gram négatif résistants aux antibiotiques et la caractérisation des phénotypes de résistance des différentes souches isolées à partir de ce bassin qui est en relation directe et indirecte avec la vie humaine dans la Wilaya de Bejaia. Afin de développer ces aspects nous avons adopté la méthodologie suivante:

- Prélèvement des échantillons d'eau.
- Isolement des bactéries à Gram négatif à partir d'eau de surface.
- Identification des souches par la galerie biochimique classique.
- Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques.
- Etude des phénotypes de résistance aux β -lactamines.

Matériel et méthode

I-Présentation du site de prélèvements

Oued Soummam se trouve dans l'axe TAZMALT - BEJAIA (Dahdouh 1994), il se situe à environ 230Km à l'est d'Alger et appartient administrativement à la wilaya de Bejaia. Il est considéré comme le troisième fleuve d'Algérie, situé à la charnière de la basse et la haute Kabylie, Oued Soummam est formé de la confluence d'Oued Sahel qui descend des montagnes du Djurdjura et du plateau de Bouira, et d'Oued Bousellam qui descend de plateau Sétifien. Il se jette dans la méditerranée à Bejaia après un cours de 80 Km environ orienté Sud-ouest-Nord-Est (Mouni et *al.*, 2009).

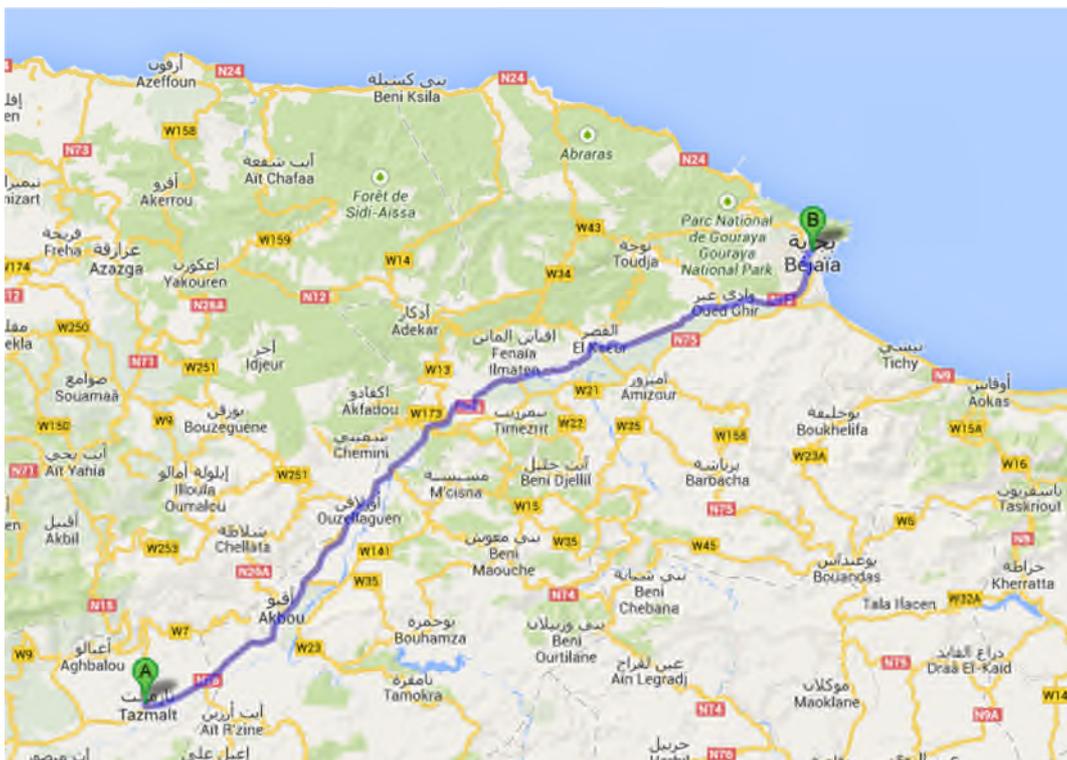


Figure N° 1 : position géographique d'Oued Soummam. (google,earth)

I-1 Les principales villes et principaux affluents

Par son occupation d'un large couloire dans la wilaya de Bejaia Oued Soummam traverse la ville d'Akbou, Ighzer Amokrane, Sidi Aich, El-Kseur et la ville de Bejaia. Ce bassin versant Soummam est un collecteur principal de plusieurs cours d'eau, ces principaux affluents sont illustrés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Principaux affluents d'oued Soummam (Mouali 2008)

Les rives	Les affluents
Rive gauche	Oued Sahel
	Oued Illoula
	Oued Ighzer Amokrane
	Oued Remila
	Oued Ghir
	Oued el-kseur
Rive droite	Oued bousellam
	Oued seddouk
	Oued amassine
	Oued Amizour

I-2 Choix des points de prélèvements

Les points de prélèvements ont été choisis là où il y a une prédominance agricole, industrielle et là où il y a une surexploitation de cette rivière par les activités humaines. Dans le cadre de notre étude nous avons optés pour six points de prélèvement dont les caractéristiques géographiques sont différentes, en partant de Tazmalt (oued Sahel) en suivant le bassin Soummam jusqu'à sa sortie à la mer, en passant par le point de la jonction d'oued sahel et d'oued Bosselam à Akbou. Les différents sites de prélèvements sont résumés dans le tableau II.

Tableau II : Sites de prélèvements

Région	Sites de prélèvement
*TAZMALT	1- Sortie de Tazmalt 2- Alaghen (oued sahel) 3- Région entre Tazmalt et akbou
*AKBOU	4- Entrée d'akbou 5- Bouzerouel (oued Soummam) 6- Zone industrielle
*IGHZER AMOKRAN	7-Usine ifri 8- Décharge 9- Salouana
*SIDI AICH	10- Takarietz 11- Sidi aich à 500 m avant le pont 12- 50 m après le pont
*EL KSEUR	13- Remila 14- Village agricole 15- Pont d'el kseur
*BEJAIA	16- Oued Mellala 17- Quatre chemins 18- Sortie d'oued Soummam sisi Ali lebher

II-Isolement et identification

II-1 Prélèvements

Dans des flacons de 250 ml stériles on a recueilli des échantillons d'eau du Oued Soummam, ils sont transportés au laboratoire de microbiologie dans une glacière.

II-2 Enrichissement

On aensemencé 50ml d'eau à analyser de chaque échantillon dans 100ml de bouillon nutritif auquel on a ajoutés de la ceftazidime et de la vancomycine à des concentrations finales de 2µg/ml et de 4µg/ml respectivement afin de sélectionner les germes résistants et éliminer les Gram positif , ensuite les flacons sont incubés pendant 18 à 24 h à 37°C.

II-3 Isolements et purification

A partir des cultures positives dans le bouillon nutritif, on a ensemencé à l'aide d'une anse de platine la gélose de Mac conkey (FluKa analytical) additionnée de 800µl de la céftazidime à une concentration finale de 4µg/ml. Les boîtes ensemencées sont incubées à 37°C pendant 24 heures. Après l'incubation, les boîtes de Mac conkey sont examinées selon les caractéristiques des colonies et chaque type de colonie est ré-isolé sur la même gélose.

II-4 Identification des souches résistantes

Elle est basée sur la coloration de Gram, les caractères cultureux et les tests biochimiques. A partir d'une culture pure de 18 à 24 h on a préparé les suspensions bactériennes dans 05ml d'eau physiologique.

*les différents tests biochimiques qu'on a utilisés pour identifier les souches sont :

- Utilisation des sucres sur gélose TSI
- Etude de type fermentaire en utilisant le milieu Clark et Lubs
- Recherche de l'uréase et la TDA en utilisant le milieu Urée indole
- Mise en évidence la présence de la nitrate réductase dans le bouillon nitraté
- Utilisation du citrate comme seule source de carbone en utilisant la gélose citrate de Simmons
- Sur du milieu mannitol mobilité pour vérifier la mobilité de la souche et son utilisation du mannitol
- Production d'indole en utilisant l'eau péptonnée exempte d'indole, incubation à 37 et à 44°C.

III- Etude de la sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques est testée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Muller Hinton selon les recommandations du comité français de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM 2013).

III-1 L'inoculum

A partir d'une culture pure de 18 H sur un milieu d'isolement, on prépare une suspension bactérienne, en dissociant 3 à 5 colonies dans 5 ml d'eau physiologique équivalente au standard Mac Farland 0,5 ($\sim 10^8$ UFC/ml), (CA .SFM. 2013).

III-2 Ensemencement

Après une dilution à 10^{-1} de l'inoculum préparé, on a Ensemence par écouvillonnage toute la surface du milieu gélosé Muller Hinton en stries serrées en réalisant 3 orientation successives en respectant Les mesures de sécurité. Puis on dépose les disques d'antibiotiques et on incube les boites à 37°C pendant 24h.

III-3 Lecture

On mesure à l'aide d'un pied à coulisse les différents diamètres des zones d'inhibition .l'interprétation sensible (S), intermédiaire (I) et résistant (R) a été faite selon les critères définis par comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA.SFM 2013).

Les antibiotiques testés ainsi que leurs charges sont présentés dans le tableau III.

Tableau III : Antibiotiques testés (Hémidia).

Antibiotiques	Symboles	Charges (µg)	Familles
Amoxicilline+acide claulanique	AMC	30	Aminopinicillines
Céftazidime	CAZ	30	C3G
Céfotaxime	CTX	30	C3G
Céfoxitine	CX	30	C2G
Céfepime	FEP	30	C4 G
Aztréonam	ATM	30	B-lactamines
Tobramycine	TOB	10	Aminosides
Chloramphénicol	C	30	Phénicole
Triméthoprim	TR	25	Sulfamides
Acide nalidixique	NA	30	Quinolones
Tétracycline	TE	30	Tétracyclines

IV- Etude des phénotypes de résistance probables

IV-1 les BLSE

La production d'une B-lactamase à spectre étendu (BLSE) est détectée par l'épreuve de synergie qui consiste à placer des disques de céfotaxime, céftazidime, céfépime et d'Aztréonam à une distance de 20 mm (centre à centre) d'un disque d'AMC (Amoxicilline +acide clavulanique). La présence d'une BLSE se traduit par l'apparition d'une image de synergie entre les disque de ;céfépime, céftazidime, céfotaxime et AMC (Jarlier et *al* 1988).

La figure ci-dessous montre la position des disques d'antibiotique utilisés lors du D-D test

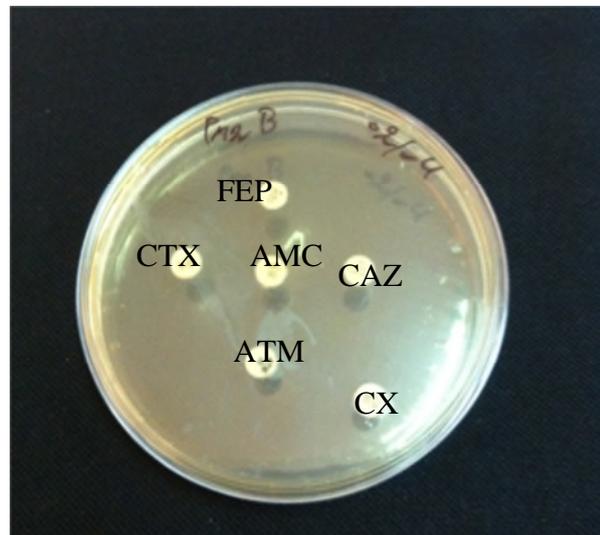


Figure N°2 : position des disques d'antibiotiques

IV-2 Les céphalosporinase

Pour mettre en évidence la production d'une céphalosporinase on teste la résistance des souches isolées à la céfoxitine (CX) qui est considéré comme marqueur phénotypique de céphalosporinase.

Résultats

Notre travail s'est déroulé au niveau du laboratoire de microbiologie à l'université A. Mira de Bejaïa, durant la période de trois mois allant de février au mois de Mai 2014. Les échantillons d'eau ont été collectés dans six points différents d'Oued Soummam (wilaya de Bejaïa). Au total 33 prélèvements ont été effectués en deux sorties.

I- Isolement et identification des souches

Le tableau ci-dessous nous donne le nombre total (106) des durant les deux compagnies de prélèvement.

Tableau IV : Date de prélèvement et le nombre de souches.

Prélèvements	Date de prélèvement	Nombre de souche
P (premier prélèvement)	19 -02-2014	43 souches isolées
P' (deuxième prélèvement)	21-03-2014	63 souches isolées

I-1 La répartition souches isolées

la figure N° 03 ci-dessous montre que parmi la totalité (106) des souches isolées d'oued Soummam 103 de souches appartiennent à la famille des *enterobctériacae* soit un taux de 97,16%, la souche la plus isolée est *Escherichia coli* avec un taux de 51.89% ce qui correspond à un nombre de 55/106 souches, suivi de *Plesiomonas* qui été isolée avec un taux de 15.06% (16/106) ,de *Citrobacter sp* avec un taux de 11.31% (11/106) et 06 souches appartenant au genre Entérobacter ont été isolées (5.66%). *Klebseilla pneumoniae* et *Klebseilla oxytoka* ont été isolées avec des nombres de 05/106 et de 03/106 ce qui correspond à des taux de 4.71% et de 2.83% respectivement. 04 souches de *Hafnia alvei* ont été isolées (3.77%), on a isolé une seule souche de *Serratia marcescence*, une de *Proteus sp* et une de *Salmonella* .

03 (2.83%.) souches parmi 106 isolées appartiennent à d'autre bacilles à Gram une souche de *Pseudomonas sp*, une souche d'*Acinetobcter sp* et une d'*Aeromonas sp* ont été isolées et avec des taux de 0.94%.

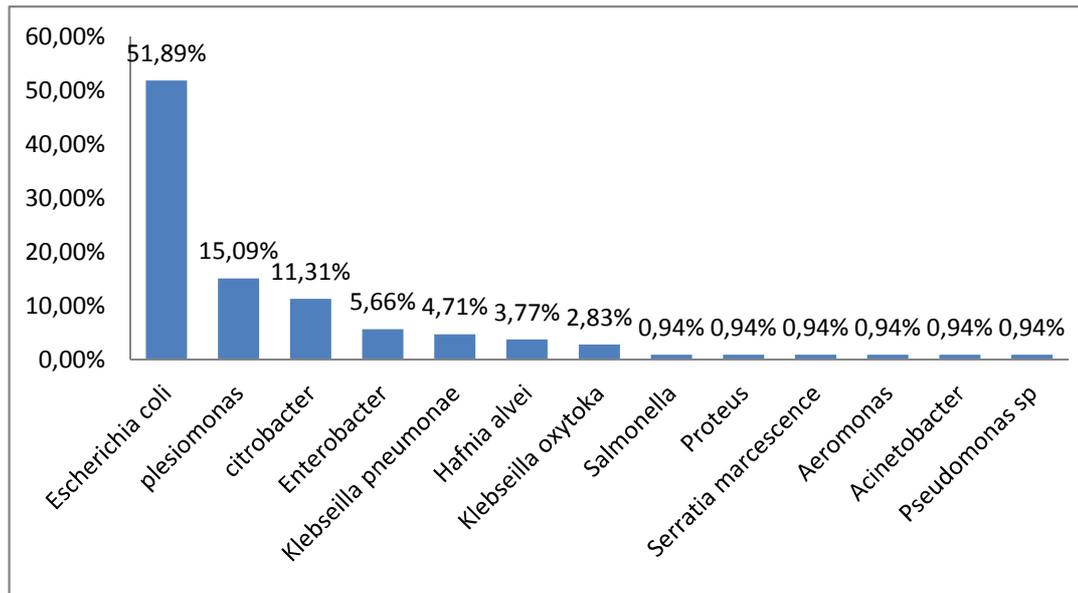


Figure N°03 : Les différentes souches à Gram négatif isolées.

II-Sensibilité des souches à Gram négatif isolées aux antibiotiques

Les 106 souches à Gram négatif isolées a partir de différents échantillons ont été testées vis-à-vis de 11 antibiotiques de différentes familles.les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux I et II (Annexe I)

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

L'ensemble des souches isolées ont été testées vis-à-vis de 5 antibiotiques de la famille des β -lactamines dont les céphalosporines de troisième génération (CAZ et CTX), les céphalosporines de quatrième génération (FEP), monobactame (ATM), céphalosporine de deuxième génération (CX) et amino-pénicilline (AMC). Tableau I (annexe I)

La figure N°04 nous donne les taux de résistance de souches isolées à chacun des cinq antibiotiques testés de la famille des β -lactamines.

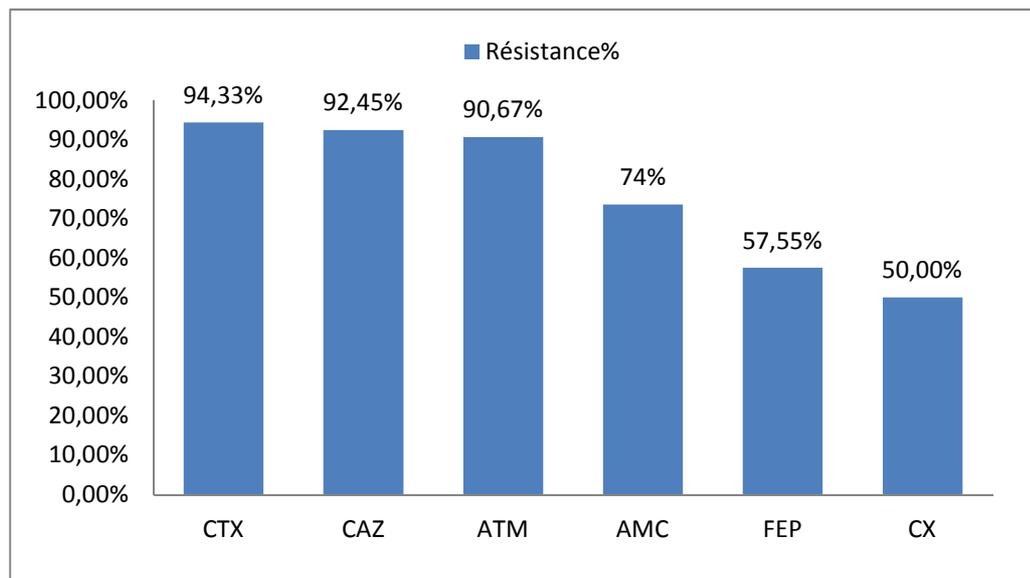


Figure N°04 : Taux de résistance des souches de bacilles à Gram négatif aux B-lactamines.

D'après la figure N°04, on note que les souches à Gram négatif isolées de l'oued Soummam sont très résistantes aux β -lactamines testés. Les taux les plus élevés sont enregistrés vis-à-vis du CTX, CAZ, ATM avec des taux de 94.33%, 92.45% et 90.67% respectivement, suivi de la résistance à l'AMC, la FEP et CX avec des taux de 73.58%, 57.55% et de 50.94% respectivement.

II-2 Sensibilité des souches à Gram négatif aux autres familles d'antibiotique

Les 106 souches isolées ont été testées vis-à-vis de cinq antibiotiques autre que les β -lactamines à savoir : Tobramycine (TOB), Chloramphénicol (C), Triméthoprime (TR), Acide Nalidixique (NA), Tétracycline (TE). Les résultats des antibiogrammes sont résumés dans le tableau II (annexe I). Les taux de résistance des souches aux antibiotiques sont illustrés dans la figure N°5.

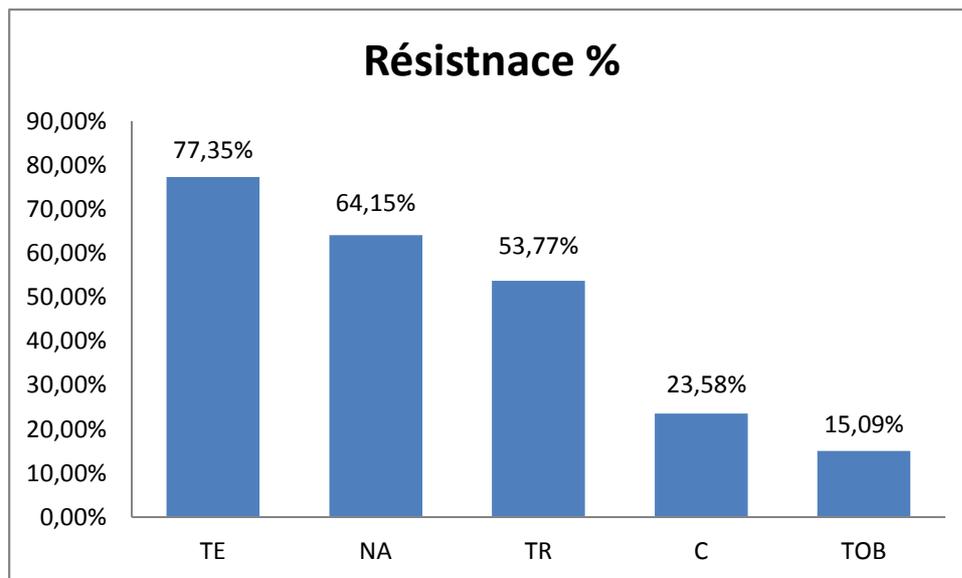


Figure N°05: taux de résistance des bacilles à Gram négatif isolés aux autres antibiotiques.

D'après cette figure le taux de résistance le plus élevé est enregistré vis-à-vis de la tétracycline avec un taux de 77.35% suivi des taux de 64.15% et de 53.77% vis-à-vis de l'acide nalidixique et de la triméthoprine respectivement. 23.58% des souches isolées sont résistantes au chloramphénicol, le plus faible taux de résistance (15.09%) est enregistré vis-à-vis de la Tobramycine.

III- Phénotypes de résistance probables

Tableau V : les B-lactamases produites ainsi que le nombre de souches productrices.

Phénotype de résistance	Nombre de souches productrices	Taux de production
BLSE+	67/106	63.2%

III-1 Les β -lactames à spectre étendu (BLSE)

Le D-D test montre la présence d'une image de synergie pour 67/106 souches. Elles sont donc probablement productrices d'une BLSE vis-à-vis de 39/106 souches. la figure N°6 illustre la distribution des BLSE selon les espèces.

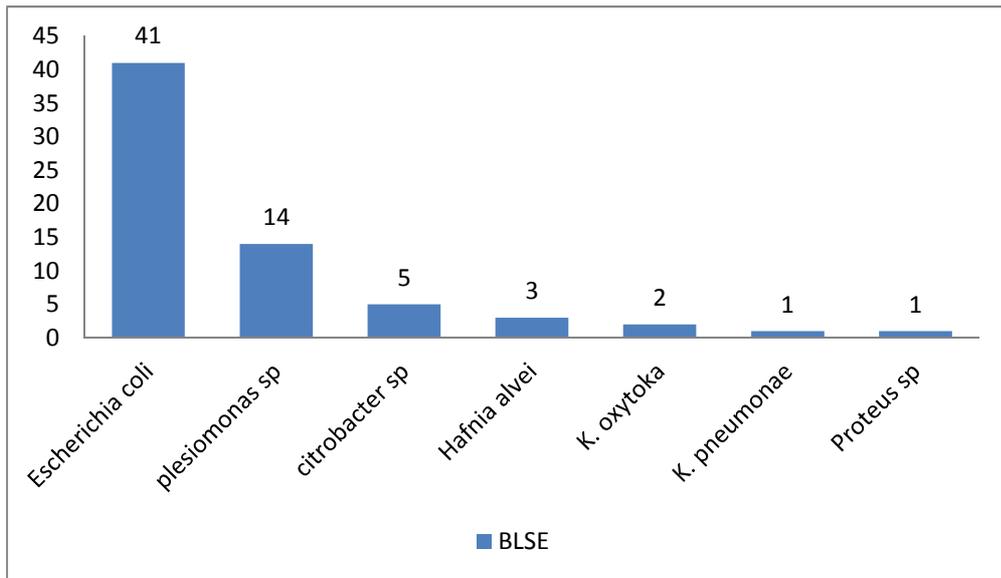
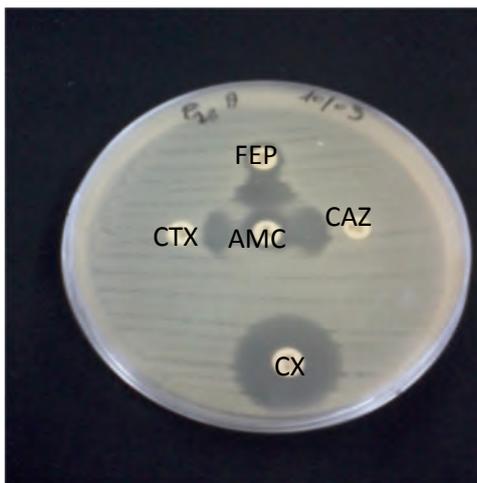


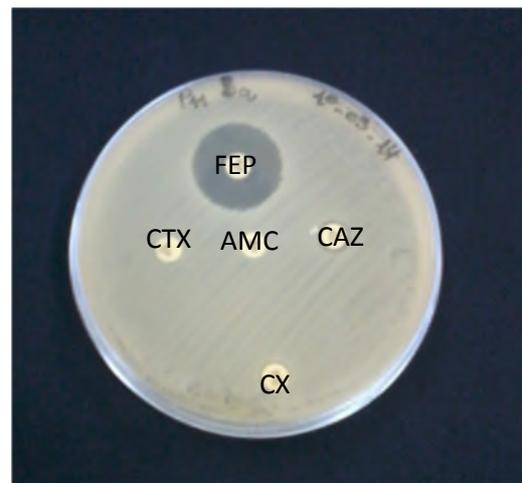
Figure N°06 : Répartition des BLSE selon les espèces.

D’après cette figure on note que parmi les souches productrices de BLSE : 41/67 de souches de *Escherichia coli* ,14/67 de *Plesiomonas sp*,5/67 de *Citrobacter sp*,3/7 souches de *Hafnia alvei* ,2/7 de souches *Klebseilla oxytoca* ,une souche parmi 5 souches de *Klebseilla pneumoniae* et une seule souche isolée de *Proteus sp*.

Il est à noter que les souches de :*Acinetobacter sp*, *pseudomonas sp*, *Aeromonas sp*, *Serratia marcescense* et *Enterobcater* sont probablement BLSE-, il reste à confirmer ce résultat phénotypique par le test à la cloxacilline. .



Souche BLSE+ (*Escherichia coli*)



Souche BLSE- (*Klebseilla pneumoniae*)

Figure n°07 : photos de souches BLSE+ et souches BLSE-

III-2 Les céphalosporinases (Amp C)

54/106 des souches isolées d'oued Soummam sont productrices d'une céphaosporinase probables. Dont 35 (AmpC) et 19 (AmpC) + (BLSE+) avec un taux de 50.94%. La figure 6 montre des exemples des souches productrices d'une céphalosporinase seule et celles qui possède les deux enzymes (AmpC) + (BLSE+).



Souche céphalosporinase+

Escherichia coli



Souche céphalosporinase+ et BLSE+

Escherichia coli

Figure N°08 : Photos d'une souche productrice d'une AmpC et une souche productrice d'une AmpC+BLSE

Discussion

106 souches de bacilles à Gram négatif ont été isolées à partir d'eau de surface d'oued Soummam. 97,16% des espèces appartiennent à la famille des *enterobacteriaceae*. Dans cette étude on a isolé 55 souches de *Escherichia coli* soit un taux de 51,89%, l'oued soummam est donc contaminé par des coliformes fécaux. En effet, les micro-organismes les plus recherchés pour établir un diagnostic sanitaire de la qualité d'une eau sont des germes indicateurs d'une contamination fécale dont *Escherichia coli* (Baudart et Paniel., 2013).

Dans notre étude les résultats de la résistance observés vis-à-vis des antibiotiques de la famille β -lactamines sont 94,33% ,92,45%,57.5% pour CTX,CAZ et FEP respectivement, ils sont similaires à ceux rapportés par Ojer-Usoz et ses collaborateurs en 2013 (la haute Diffusion des entérobactéries productrices β -lactamases à spectre étendu dans les effluents des stations de traitement des eaux), ou on a observé un taux de résistance 81.3% vis-à-vis du CTX, la résistance à la FEP et la CAZ est de 74.2%, de 67.2% respectivement , ce qui reflète l'altération des eaux de surface notamment les rivières par les activités humaines (Ojer-Usoe et *al.*, 2014).

Durant ce travail 47/55 souches de *Escherichia coli* sont résistantes au CTX avec un taux de 85.45%, cependant la résistance vis-à-vis de la CAZ et l'AMC été de 83,63% (46/55) et de 58,18% (32/55) respectivement , ces taux obtenus dans notre étude sont élevés par rapport à ceux rapportés par Servais et Passerat en 2009 lors d'une étude sur la résistance aux antibiotiques des bactéries fécales dans la rivière de la seine ou ils ont isolés 214 des *Escherichia coli*, dont 42% sont résistantes aux β -lactamines avec un taux de 16% pour l'AMC et $\leq 2\%$ pour la CAZ et CTX . Les souches de *Escherichia coli* sont naturellement sensibles à toutes les β -lactamines, malgré la présence d'une céphalosporinase chromosomique de classe C qui est exprimée à bas niveau (Lavigne et *al.*, 2002). La résistance acquise aux β -lactamines repose essentiellement sur la synthèse des β -lactamases plasmidiques généralement sensibles aux inhibiteurs de β -lactamases (Maurin et *al.*, 1995). Dans notre cas d'étude, la production des β -lactamases à spectre étendu est enregistrée pour 41/55 souches d'*Escherichia coli* (51,7%).

Les cinq souches de *Klebsiella pneumoniae* sont avérées résistantes à la plupart des β -lactamines testés. La β -lactamase SHV1 produite par *Klebsiella pneumoniae* est responsable d'environ 20% des résistances plasmidiques à l'Ampicilline chez cette espèce (Bradford, 2001). Des mutants TEM et SHV sont capables d'hydrolyser les céphalosporines à large spectre et les monobactames (Avril et *al.*, 2000).

Parmi les 33 échantillons d'eau prélevés. On a isolé une seule souche de Salmonella. Ce taux est très faible comparé aux 44 souches de Salmonella isolées à partir de 30

échantillons lors d'une étude réalisée par Mehrabian et ses collaborateurs sur les salmonelles dans les eaux superficielles et usées en 1977.

Dans cette étude aucun image de synergie n'a été observée lors des D-D tests réalisés sur les souches de *Enterobacter sp* isolées, elles sont donc probablement non productrices d'une BLSE. Leur résistance aux β -lactamines testés est probablement due à la production d'une AmpC inductible. En effet, la résistance des *Enterobacter* aux C3G est le plus souvent causée par une hyperproduction de β -lactamase de type AmpC (David et Paterson., 2006)

La seule souche de *Pseudomonas sp* isolée de oued Soummam est apparue résistante à tous les antibiotiques de la famille des β -lactamine, *Pseudomonas* est naturellement résistant à un grand nombre d'antibiotiques de cette famille en raison de la production d'une beta-lactamase chromosomique inductible de classe C qui n'est pas inhibée par le clavulanate et qui hydrolyse préférentiellement les céphalosporines de première génération, et d'une perméabilité membranaire (Sougakoff et Trystram., 2003).

Durant notre étude on a isolé une seule souche de *Aeromonas sp*, cette dernière présente une résistance vis-à-vis de toutes les molécules de β -lactamines testées. Elle présente un profile de résistance différent que celui rapporté par Carvalho et ses collaborateurs en 2012 dans une étude sur la résistance aux antibiotiques des souches d'*Aeromonas sp* dans les eaux. *Aeromonas sp* résiste naturellement aux β -lactamines par production de trois β -lactamases chromosomiques inductibles dont une AmpC, une oxacillinase de classe D (Oxa-12) et une imipénèmase de classe B. toutes les souches d'*Aeromonas* sont naturellement résistantes à l'ampicilline (Sougakoff et Trystram., 2003).

La résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération est souvent traduite par la production d'une β -lactamase à spectre étendu (BLSE) et d'une AmpC, ces deux types d'enzymes confèrent une résistance aux autres antibiotiques de la famille β -lactamine (Blaak et al, 2013). Parmi les 106 souches isolées d'Oued Soummam, 67 sont productrices de BLSE et 39 non productrices de cette enzyme.

La résistance aux β -lactamines conférée par la synthèse de BLSE est fréquemment associée à la résistance aux différentes classes d'antibiotiques telles que la Triméthoprimé, quinolone, aminoside et tétracycline (Falagas et Karageorgopoulos, 2009). En effet, l'étude de la sensibilité des souches isolées d'oued Soummam, sont avérées résistantes à la tétracycline avec un taux de 77,35% et 23,58% de résistance au Chloramphénicol, ces résultats obtenus dans cette présente étude sont élevés par rapport à ceux obtenus par Habi et Daba en 2009 sur l'incidence de la résistances plasmidique aux antibiotique chez des entérobactéries isolés des cours d'eau ou ils ont observés des taux de 70% et de 1-8% pour la résistance des

entérobactéries isolés vis-à-vis de la tétracycline et de Chloramphénicol respectivement. 33/55 souches d'*Escherichia coli*, soit un taux de 60% sont résistantes à la tétracycline, ce taux est élevé comparé à celui rapporté par Servais et son collaborateur concernant la résistance à cet antibiotique qui est de 27%. La tétracycline est l'un des antibiotiques les plus détectés dans la nature et plus fréquemment dans des eaux usées (Michael et al., 2012; Minh et al., 2010). Les gènes de résistance aux tétracyclines ont été détectés dans les eaux de l'environnement (Jiang et al., 2013)

En ce qui concerne la résistance aux autres antibiotiques, la Tobramycine s'est avérée la molécule la plus efficace sur ces bacilles à Gram négatif isolés de l'oued Soummam, uniquement 16 souches parmi les 106 souches sont résistantes à cet antibiotique appartenant à la famille des Aminosides. Dans notre étude nous avons obtenus un taux de 21,82% et de 29,09% de *Escherichia coli* isolées résistantes respectivement au Chloramphénicol et au Triméthoprim ce qui est élevé par rapport à ceux obtenus par Löch et ses collaborateurs en 2008, où seulement 5,9% et 4,4% des *E. coli* isolées des eaux douces (eaux de surface, eaux souterraines et eaux d'alimentation) ont développé une résistance respectivement au sulfaméthoxazole-triméthoprim et au chloramphénicol

la résistance à l'acide nalidixique est enregistrée avec un taux de 74,62% observé chez les souches productrices de β -lactamase à spectre étendu (50/67), cependant la résistance aux Chloramphénicol est observée avec un taux de 30,76% chez les souches non productrices de BLSE (12/39), ces taux sont similaires à ceux trouvés par Tacao et ses collaborateurs en 2013 dans une étude réalisée sur la Co-résistance aux antibiotiques entre les souches productrices de BLSE dans le milieu aquatique, où ils ont rapportés un taux de 81% de résistance à l'acide nalidixique chez les souches productrices de BLSE et 58% de résistance au Chloramphénicol chez les non productrices de β -lactames à spectre étendu. Dans notre étude nous avons enregistrés une résistance élevée avec un taux de 67,27% à l'acide nalidixique ce qui ne concorde pas avec le taux enregistré par Servais et Passerat en 2009 qui est uniquement de 04%. L'acquisition de la résistance aux quinolones par les bactéries à Gram négatif est principalement liée aux mutations dans le QRDRs des gènes de *gyrA* et de *parC* (Alkaide et al. 2010).

Conclusion

Au cours de cette étude nous avons étudié la contamination d'eau de surface, à oued Soummam au niveau de la Wilaya de Bejaia, par des bactéries résistantes aux antibiotiques.

Sur les 33 prélèvements effectués, 106 souches de bacilles à Gram négatif ont été isolées parmi lesquelles 103 souches sont identifiées comme étant des entérobactéries réparties comme suite : 55 souches de *Escherichia coli*, 16 souches de *Plesiomonas*. 11 sont des *Citrobacter sp*, 08 souches de *Klebseilla sp*, 06 d'*Entérobacter sp*, 04 souche de *Hafnia alvei* une souche parmi *salmonella sp*, *proteus sp* et de *Serratia marcescence* et Les résultats des DD-tests montrent que 67 souches sont probablement productrices de BLSE et 54 souches productrices de AmpC. En ce qui concerne les 03/106 souches, elles sont identifiées comme étant des bacilles à Gram négatif autre que les entérobactéries réparties comme suite : une souche d'*Acinetobacter sp*, de *Pseudomonas sp* et une souche d'*Aeromonas sp* L'émergence de souches productrices de BLSE en particulier *Escherichia coli* productrice de β -lactamase à spectre étendu constitue un défi réel car ce germe est le commensal majeur de tube digestif de l'Homme. La maîtrise des bactéries multirésistantes dans l'eau constitue un enjeu de santé publique car ces bactéries sont responsables d'une nouvelle forme de péril fécal : la diffusion de la multirésistance aux antibiotiques.

Suite aux actions humaines, les milieux aquatiques sont modifiés et parfois dégradés. L'altération d'un des paramètres du milieu peut provoquer une perturbation générale de tout l'équilibre naturel. D'après les résultats obtenus nous sommes arrivés à constater que les systèmes aquatiques une fois sont altérés par ceux qui sont citées précédemment ils peuvent être des réservoirs des gènes de la résistance qui persistent même en l'absence d'antibiotique, ce qui renforce la diffusion des bactéries multi-résistantes.

Les résultats obtenus au cours de notre étude sont préliminaires et méritent d'être exploités et compléter par :

- ✓ La détermination de l'évolution de la contamination des eaux de surface dans le temps.
- ✓ l'augmentation du nombre de prélèvements pour une meilleure prévention de la dissémination.
- ✓ L'élargissement de l'étude sur toute la flore environnementale, pour inclure les bactéries à Gram positif et la flore autochtone.
- ✓ La réalisation d'autres tests phénotypiques : DD-test à la cloxacilline, Hodge test, Conjugaison.

- ✓ La détermination des mécanismes génétiques de la résistance aux antibiotiques par des techniques de biologie moléculaire qui confirmeront les phénotypes de résistance probables.

Liste bibliographique

A

Alouache S, Kada M, Messai Y, Estepa V, Torres C et Bakour R. (2012). Antibiotic resistance and extended-spectrum β -lactamases in isolated bacteria from seawater of Algiers beaches (Algeria). *Microbes Environ.* **27(1)**, 80-86.

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. *Microbiology.* **8**, 251-259.

Alkaid E, Blasco MD et Esteve C. (2010). Mechanisms of quinolone resistance in *Aeromonas* species isolated from humans, waters and eels. *Research in Microbiology.* **161**, P 40-45.

Avril JL, Dabernat H, Denis F et Monteil H. (2000). Bactériologie clinique. Caractères généraux de *Staphylococcus aureus*. Ed. Ellipses paris. P 7-28.

Armisen TG, Anzil A, Cornelis P, Chevreuil M et Servais P. (2013). Identification of antimicrobial resistant bacteria in rivers: Insights into the cultivation bias. *Water Research.* **47**, P 4938-4947.

B

Baquero F, Martinez JL et Canto R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **19**, P 260–265.

Bellaoui N, Belabbes H, Lahsoun M, et El Mdaghri N. (2009). Bactériémies à *Kluyvera*: à propos d'une épidémie dans un CHU au Maroc. *Médecine et maladies infectieuses.* **39**, P 133–135.

Blaak HH, van Hoek A, H.A.M, Veenman C, Arieke E, Leeuwen V, Lynch G, Wendy M, Overbeek V et Roda Husman AM. (2014). Extended spectrum β -lactamase- and constitutively AmpC-producing Enterobacteriaceae on fresh produce and in the agricultural environment. *International Journal of Food Microbiology.* **168–169**, P 8–16.

Références bibliographiques

Baudart J et Paniel N. (2014). Sources et devenir des micro-organismes pathogènes dans les environnements aquatiques. Revue francophone des laboratoires .N°459.

Ƨ

Castiglioni S, Pomati F, Miller K, Burns BP, Zuccato E, Calamari D et Neilan BA. (2008). Novel homologs of the multiple resistance regulator marA in antibiotic-contaminated environments. Water Research.42, P 4271- 4280.

Carvalho MJ, Martinez-Murcia A, Esteves AC, Correia A et Saavedra MJ. (2012). Phylogenetic diversity, antibiotic resistance and virulence traits of *Aeromonas spp.* from untreated waters for human consumption International journal of food Microbiology. 159, P 230-239.

Ɖ

Dahdouh NE. (1994). Situation de l'assainissement dans la wilaya de Bejaia.

David L et Paterson MD. (2006). Resistance in Gram-negative bacteria: enterobacteriaceae. The American Journal of infectioncontrol. 34, P 20-28.

Ƒ

Falagas ME et Karageorgopoulos DE. (2009). Extended spectrum β -lactamase producing organisms.J.Hosp.Infct. 1-10.

Forsberg KJ, Reyes A, Wang B, Selleck EM, Sommer MOA et Dantas G. (2012). The Shared Antibiotic Resistome of Soil Bacteria and Human Pathogens. Science vol 31.

Ɠ

HABI S et DABA H. (2009). Plasmid incidence, antibiotic and metal resistance among enterobacteriaceae isolated from Algerian streams. Pakistan journal of biology science.12 (22), P 1474-1482.

Références bibliographiques

Harnisz M. (2013). Total resistance of native bacteria as an indicator of changes in the water environment. *Environmental Pollution*. **174**, P 85-92.

Holder-Franklin M A, Thorpe A et Wuest L. (1992). Evaluation of tests employed in the numerical taxonomy of river bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. **15**, P 263 – 277.

J

Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G et Philippon A. (1988). Extended broad spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in enterobacteriaceae. Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev infect dis*. **10**, P 867-878.

Jiang L, Hua X, Xua T, Zhang H, Sheng D et Yin D. (2013). Prevalence of antibiotic resistance genes and their relationship with antibiotics in the Huangpu River and the drinking water sources, Shanghai, China. *Science of the Total Environment*. **458-460**, P 267–272.

K

Korzeniewska E, Harnisz M. (2013). Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive Enterobacteriaceae in municipal sewage and their emission to the environment. *Journal of Environmental Management*. **128**, P 904-911.

Korzeniewska E, Harnisz M. (2013). Beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in hospital effluents. *Journal of Environmental Management*. **123**, P 1-7

L

Laurence DR et Jarlier V. (2014). Bactéries multirésistantes dans l'eau : modèles des entérobactéries productrices de bêta-lactamase à spectre étendu. *Revue francophone des laboratoires* N°460.

M

MOALI A. (2006-2008). Fiche Descriptive Ramsar de la Vallée de l'oued Soummam.

Références bibliographiques

Marti E, Variatza E et Balcazar JL. (2014). The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. Vol **22**.

Michael I, Hapeshi E, Michael C, Varela AR, Kyriakou S, Manaia CM et Fatta KD. (2012). Solar photo-Fenton process on the abatement of antibiotics at a pilot scale: Degradation kinetics, ecotoxicity and phytotoxicity assessment and removal of antibiotic resistant enterococci. *Water Research*. **46**, P 5621-5634.

Minh N, Khan SJ, Drewes JE et Stuetz RM. (2010). Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes. *Water Research*. **44**, P 4295-4323.

Moore EJ, Rao JP, Moore A, Millar CB, Goldsmith EC, Loughrey A et Rooney JP. (2010). Determination of total antibiotic resistance in waterborne bacteria in rivers and streams in Northern Ireland: Can antibiotic-resistant bacteria be an indicator of ecological change. *Aquat Ecol*. **44**, P 349–358.

Mouni L, Merabet D, Arkoub H et Moussaceb K. (2009). Etude et caractérisation physico-chimique des eaux de l'oued Soummam (Algerie). *Sécheresse*. **20 (4)**, P 360.

Muarin M, Musso D, Charrel R, Perez R, N'GuyenA, Dumon H et De MicoP. (1995). Résistance aux antibiotiques des bactéries hospitalières (bacilles à Gram négatif aérobies). *Médecine et Maladies infectieuses*. **25**, P 508-514.



Ojer-Usoz E, Gonzalez D, Jalo IG et Vitas AI. (2014). High dissemination of extended-spectrum b-lactamase-producing Enterobacteriaceae in effluents from wastewater treatment plants. *Water Research*. **56**, P 37- 47.



Robina F, Gibolda L et Bonnetta R. (2012). Résistances naturelles et acquises aux β -lactamines chez les entérobactéries : comment les identifier en pratique quotidienne ? *Revue francophone des laboratoires* n° 445.



Références bibliographiques

Sabate M, Prats G, Moreno E, Balleste E, Blanch AR et Andreu A. (2008). Virulence and antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from human and animal wastewater. *Research in Microbiology*. **159**, 288-293.

Servais P et Passerat J. (2009). Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France). *science of the total environment*. *Science of the Total Environment*. **408**, P 365–372.

Sougakoff W et Trystram D. (2003). Résistance aux β -lactamines. *Faculté de médecine, université de pierre et Mary curie*. P 7 et 51.

J

Tacao M, Moura A, Correia A et Henriques I. (2014). Co-resistance to different classes of antibiotics among ESBL-producers from aquatic systems. *Water Research*. **48**, P 100 -107.

Tamtam F, Mercier F, Le Bot B, Eurin J, Tuc Dinh Q, Clément M et Chevreuil M. (2008). Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. *Science of the Total Environnement*. **393**, 84 – 95.

Annexes

Annexe I

Tableau I: la résistance des souches à gram négatif aux β -lactamines.

Code de la souche			Les β -lactamines utilisés										synergie
	AMC		CAZ		CTX		FEP		CX		ATM		
P1A	6	R	6	R	13.30	R	20.9	I	6	R	6.40	R	-
P1B	6	R	12.0	R	21.05	R	26.0	S	7.49	R	15.8	R	-
P2A	7.80	R	13.8	R	11.21	R	12.2	R	16.2	R	20.6	R	+
P2B	11.9	R	14.6	R	9.56	R	12.7	R	23.3	S	22.3	I	+
P3A	15	R	6	R	22.06	R	23.6	I	22.8	S	13.2	R	+
P3Ba	6	R	6	R	6	R	6	R	9.19	R	10.2	R	+
P3Bb	10.4	R	10.2	R	7.90	R	11.5	R	19.2	I	17.3	R	+
P3C	6.62	R	14.7	R	12.76	R	15.4	R	21.2	S	18.4	R	+
P4A	6	R	6	R	13.40	R	25.9	S	14.5	R	9.89	R	-
P4B	6	R	6.80	R	16.66	R	24.1	S	6.40	R	8.67	R	-
P4C	6	R	6	R	6	R	16.4	R	6	R	6	R	-
P5A	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	-
P5B	6	R	6	R	13.84	R	21.8	S	6	R	9.10	R	-
P5C	6.14	R	10.5	R	10.62	R	9.24	R	17.1	I	15	R	+
P5D	6	R	9.18	R	22.13	R	23.0	S	6	R	11.5	R	-
P6A	6	R	6.40	R	21.93	R	21.5	S	6	R	11.2	R	-
P6B	6	R	6	R	6	R	6	R	10.3	R	11.2	R	+
P7A	6	R	6	R	6	R	6	R	24	S	18.6	R	+
P7B	6	R	6	R	6	R	16.5	R	6	R	6	R	-
P7C	6	R	6	R	6	R	13.6	R	6	R	7.94	R	-
P7D	6	R	6	R	14.39	R	25.7	S	6	R	10.9	R	-
P8A	6	R	13.4	R	18.25	R	15.5	R	8.80	R	18.8	R	-
P8B	6	R	6	R	18.20	R	25.0	S	10.	R	11.7	R	-
P8C	16.4	I	12	R	24.24	I	22.1	S	24.	S	16.6	R	+
P9A	6	R	6	R	16.85	R	25.6	S	12.6	R	10.8	R	-
P9B	6	R	6	R	6	R	21.8	S	6	R	6	R	-
P10A	6	R	6	R	13.60	R	22.3	S	6	R	10.9	R	-
P10B	6	R	15.4	R	14.30	R	16.7	R	6	R	18.8	R	-
P10C	6	R	11	R	26.34	S	23.9	S	6	R	13.6	R	-
P11A	6	R	6	R	19.90	R	23.6	S	8.70	R	12	R	-
P11Ba	6	R	6	R	7	R	21.4	S	6	R	6	R	-
P11Bb	6	R	6	R	6	R	18	R	6	R	6	R	-
P11C	6	R	6	R	8.22	R	7.20	R	27.6	S	6	R	+
P12A	7	R	6	R	6	R	7.80	R	21.4	S	10.7	R	+
P12B	7.20	R	11	R	7.60	R	8.50	R	22	S	14.2	R	+
P12C	6	R	6	R	9.30	R	20.1	I	6	R	6	R	-
P13A	8	R	6	R	14	R	20	I	6	R	6	R	+
P13B	9.20	R	10.1	R	7	R	12	R	25.3	S	14.2	R	+
P14B	7.30	R	6	R	6.30	R	6.70	R	20	I	9.40	R	+
P14C	6	R	6	R	6	R	16.3	R	6	R	6	R	-

P14D	14	R	8	R	6.50	R	8	R	15.6	I	12.2	R	+
P15A	9	R	8.60	R	6.72	R	11.1	R	19.9	I	16	R	+
P15B	6	R	6	R	6	R	6	R	19.9	I	6	R	+
P15C	6	R	6	R	12.59	R	25.9	S	6	R	9.19	R	-
P'1B	9.5	R	13	R	9	R	10	R	22.2	I	16.6	R	+
P'1C	12.4	R	18	R	9.5	R	13	R	23	S	19	R	+
P'1D	14.4	R	15.4	R	9.2	R	15	R	20	R	16.7	R	+
P'2A	7.07	R	10.8	R	18.22	R	24.	S	6	R	18.5	R	-
P'2B	6	R	6	R	13.11	R	21.1	I	6	R	18.1	R	-
P'3C	6	R	6	R	6	R	14.8	R	6	R	8.92	R	-
P'3D	6	R	15.3	R	7.63	R	7.89	R	14.4	R	12.6	R	+
P'4A	19.5	I	13.4	R	8.44	R	10.6	R	22.1	I	15.7	R	+
P'4B	8.76	R	15.8	R	22.27	R	30.6	S	15	I	26.8	S	+
P'4C	-		22	S	30	S	32	S	35	S	-	-	+
P'4D	20	I	17	R	13	R	15	R	23	S	14.3	R	+
P'4 ^E	7	R	9	R	19	R	26	S	6	R	18.7	R	-
P'5A	15.5	R	10.8	R	7.60	R	9.60	R	17.3	I	10.7	R	+
P'5C	6	R	12.4	R	7.33	R	10.7	R	6	R	9.30	R	+
P'5D	12	R	10.5	R	7.79	R	10.1	R	16.4	I	11.5	R	+
P'6C	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	+
P'6D	26	S	20	I	27	S	28	S	36	S	11	R	+
P'7A	16	I	13	R	6	R	6	R	12	R	9	R	+
P'7B	24	S	18	R	28	S	26	S	25	S	11	R	-
P'7C	15	R	10	R	15	R	30	S	6	R	15	R	+
P'7D	6	R	13	R	6	R	10	R	6	R	15	R	+
P'8B	18	I	20	I	13	R	18	R	30	S	23	S	+
P'1A	-	-	26	S	30	S	29	S	28	S	20	R	S
P'2C	-	-	6	R	10	R	14	R	16	I	20	R	+
P'3A	24	S	6	R	10	R	15	R	24	S	6	R	+
P'6A	12	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	+
P'8A	-	-	6	R	6	R	6	R	16	I	6	R	+
P'8C	6	R	19	I	6	R	12	R	6	R	12	R	-
P'8D	-	-	6	R	8	R	14	R	25	S	12	R	+
P'9A	-	-	6	R	12	R	14	R	16	I	18	R	+
P'9B	-	-	15	R	10	R	7	R	15	I	14	R	+
P'9C	9	R	6	R	6	R	25	S	6	R	17	R	+
P'10A	-	-	16	R	8	R	16	R	24	S	16	R	+
P'12A	-	-	6	R	6	R	6	R	18	I	6	R	+
P'14A	6	R	12	R	14	R	29	S	6	R	22	I	-
P'14B	-	-	14	R	6	R	12	R	18	I	14	R	+
P'14C	-	-	6	R	12	R	18	R	15	I	20	R	+
P'15A	-	-	6	R	6	R	12	R	30	S	14	R	+
P'15B	-	-	8	R	12	R	18	R	12	R	20	R	+
P'15C	6	R	30	S	17	R	30	S	20	I	25	S	+
P'15D	-	-	9	R	6	R	16	R	20	I	16	R	+
P'16C	7	R	15	R	14	R	29	S	6	R	22	I	-
P'16e1	10	R	20	I	6	R	17	R	6	R	13	R	-
P'16e2	-	-	14	R	6	R	12	R	21	I	14	R	+
P'17A	10	R	8	R	15	R	30	S	10	R	20	R	+
P'17B	-	-	10	R	6	R	16	R	16	I	13	R	+

P'17C	-	-	6	R	6	R	12	R	30	S	12	R	+
P'18A	10	R	6	R	14	R	30	S	6	R	20	I	+
P'18B	-	-	16	R	20	R	24	S	20	I	20	I	+
P'18C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
P'18D	-	-	6	R	10	R	16	R	24	S	6	R	+
P'18 ^E	7	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	+
P'6B	6	R	6	R	6	R	19	I	13	R	18	R	+
P'11A	6	R	6	R	6	R	13	R	17	I	8	R	+
P'11B	6	R	6	R	14	R	20	I	15	I	18	R	+
P'12C	6	R	6	R	6	R	27	S	6	R	10	R	-
P'12D	10	R	11	R	17	R	33	S	17	I	27	S	-
P'13A	10	R	10	R	20	R	20	I	20	I	16	R	+
P'13B1	6	R	18	R	18	R	35	S	9	R	34	S	-
P'13B2	6	R	6	R	12	R	28	S	6	R	18	R	-
P'13C	10	R	6	R	6	R	6	R	25	S	6	R	+
P'16A	6	R	12	R	8	R	20	I	20	I	26	S	+
P'16B	13	R	6	R	17	R	30	S	6	R	20	R	+

Tableau II : Résistance des bacilles à gram négatif isolés aux autres antibiotiques

Le code de la souche	Les antibiotiques de différentes familles									
	TOB		C		TR		TE		NA	
P1A	18.71	S	26.36	S	27.62	S	6	R	19.84	I
P1B	21.59	S	24.31	S	24.41	S	18.62	I	14.97	R
P2A	12.11	R	14.02	R	6	R	6	R	10.54	R
P2B	15.15	R	32.98	S	6	R	23.3	S	26.67	S
P3A	21.09	S	30.50	S	6	R	6	R	6	R
P3Ba	9.33	R	26.85	S	6	R	6	R	6	R
P3Bb	10.56	R	30.08	S	6	R	6	R	6	R
P3C	7.92	R	29.60	S	29.13	S	6	R	6	R
P4A	20.60	S	29.64	S	6	R	6	R	6	R
P4B	20.96	S	11.25	R	6	R	6	R	6	R
P4C	24.34	S	27.28	S	28.11	S	18.12	I	23.29	S
P5A	6	R	6	R	27.26	S	20.10	S	17.88	I
P5B	23.52	S	29.71	S	23.82	S	21.95	S	22.37	S
P5C	10.30	R	8.59	R	6	R	6	R	6	R
P5D	8.23	R	16.19	R	14.79	I	6	R	6	R
P6A	8.88	R	16.19	R	14	I	6	R	6	R
P6B	20.63	S	13.75	R	6	R	6	R	6	R
P7A	21.70	S	28.60	S	25.60	S	21.42	S	25	S
P7B	21.35	S	20	I	6	R	6	R	6	R
P7C	21.85	S	25.67	S	24.60	S	15.70	R	22	S
P7D	22.76	S	26.50	S	6	R	6	R	19	I
P8A	25.84	S	11.48	R	10.54	R	21.64	S	20.88	S
P8B	23.06	S	28.90	S	24.14	S	21.04	S	25.56	S
P8C	18.43	I	18.67	R	6	R	6	R	14.26	R
P9A	22.20	S	27	S	25.22	S	23	S	25.06	S
P9B	19.78	S	29.27	S	24.87	S	16.48	R	22.58	S
P10A	19.70	S	22.29	I	21.56	S	18.10	I	6	R
P10B	24.20	S	6.25	R	6	R	12	R	6	R
P10C	12	R	20.29	I	18.75	S	6	R	6.30	R
P11A	19	S	6	R	25.60	S	6	R	24	S
P11Ba	22	S	23	S	21.80	S	16.60	R	18.80	I
P11Bb	22.30	S	23.50	S	23	S	16.50	R	19.60	I
P11C	7	S	25.70	S	14.80	I	7.70	R	6	R
P12A	22	S	26	S	20	S	21.20	S	6	R
P12B	20.90	S	13.50	R	6	R	6	R	6	R
P12C	24.30	S	30	S	26	S	20	S	2.50	R
P13A	23	S	28.30	S	6	R	6	R	20	S
P13B	21.79	S	27.65	S	6	R	6	R	12.90	R
P14B	20.90	S	6	R	6	R	19	S	18.90	I
P14C	20.33	S	26.19	S	23.40	S	16.30	R	22.80	S
P14D	22.70	S	16.70	R	25.80	S	6	R	6	R
P15A	23.57	S	32.16	S	6	R	19.77	S	6	R
P15B	9.92	R	26.60	S	6	R	6	R	6	R
P15C	18.91	S	24.38	S	16.70	S	16.18	R	27.71	S
P'1B	19.40	S	30	S	6	R	6	R	6	R

P'1C	18.8	S	29.7	S	29.5	S	6	R	6	R
P'1D	19.68	S	29.62	S	6	R	6	R	6	R
P'2A	23.74	S	6	R	27.12	I	6	R	8.78	R
P'2B	21.97	S	26.60	S	6	R	22.71	S	26.44	S
P'3C	21.75	S	23.62	S	23.13	I	17.83	I	24.31	S
P'3D	19.18	S	26.28	S	6	R	6	R	6	R
P'4A	28.14	S	25.88	S	24	S	19.72	S	6	R
P'4B	26.79	S	16.48	R	19.63	S	6	R	29.44	S
P'4D	16.40	I	25.91	S	6	R	6	R	6	R
P'4 ^E	29.53	S	6	R	27.46	S	6	R	6	R
P'5A	17,84	I	15	R	6	R	22.89	S	6	R
P'5C	20.12	S	19.32	I	6	R	6	R	6	R
P'5D	18.17	S	24.57	S	6	R	20.70	S	6	R
P'6C	15	I	6	R	6	R	6	R	7	R
P'6D	27	S	36	S	35	R	25	S	6	R
P'7A	14	R	30	S	6	R	6	R	6	R
P'7B	30	S	35	S	6	R	6	R	6	R
P'7C	28	S	26	S	22	S	25	S	26	S
P'7D	22	S	26	S	6	R	6	R	6	R
P'8B	21	S	30	S	6	R	6	R	6	R
P'1A	28	S	34	S	13	I	28	S	29	S
P'2C	24	S	32	S	6	R	12	R	6	R
P'3C	29	S	36	S	6	R	24	S	11	R
P'6A	17	I	18	R	6	R	6	R	6	R
P'8A	25	S	6	R	6	R	6	R	26	S
P'8C	27	S	6	R	6	R	6	R	6	R
P'8D	18	S	11	R	6	R	25	S	6	R
P'9A	24	S	31	S	6	R	13	R	6	R
P'9B	15	R	27	S	6	R	24	S	6	R
P'9C	25	S	31	S	30	S	6	R	28	S
P'10A	22	S	32	S	28	S	23	S	20	S
P'12A	18	S	25	S	6	R	6	R	6	R
P'14A	23	S	33	S	6	R	6	R	32	S
P'14B	20	S	30	S	6	R	20	S	6	R
P'14C	27	S	34	S	6	R	13	R	6	R
P'15A	20	S	27	S	16	S	30	S	6	R
P'15B	25	S	32	S	6	R	12	R	6	R
P'15C	30	S	22	I	24	S	7	R	30	S
P'15D	19	S	28	S	6	R	6	R	6	R
P'16C	26	S	30	S	24	S	6	R	29	S
P'16e1	29	S	6	R	6	R	6	R	6	R
P'16e2	17	I	25	S	6	R	6	R	6	R
P'17A	25	S	26	S	25	S	6	R	22	S
P'17B	15	R	25	S	6	R	6	R	10	R
P'17C	21	S	28	S	6	R	14	R	6	R
P'18A	26	S	30	S	23	S	6	R	6	R
P'18B	26	S	20	I	6	R	22	S	22	S
P'18C	28	S	42	S	6	R	19	S	6	R

P'18D	30	S	35	S	6	R	23	S	10	R
P'18E	17	I	29	S	6	R	6	R	20	S
P'6B	18	S	13	R	23	S	6	R	6	R
P'11A	15	R	28	S	26	S	6	R	6	R
P'11B	24	S	28	S	24	S	9	R	6	R
P'12C	25	S	24	S	30	S	13	R	22	S
P'12D	28	S	32	S	28	S	6	R	27	S
P'13A	21	S	34	S	24	S	6	R	6	R
P'13B1	27	S	29	S	22	S	9	R	12	R
P'13B2	25	S	30	S	23	S	17	I	24	S
P'13C	16	I	24	S	30	S	6	R	29	S
P'16A	13	R	30	S	25	S	6	R	6	R
P'16B	25	S	30	S	32	S	15	R	24	S

ANNEXE II

Composition des milieux de culture

(En g/L d'eau distillée)

Gélose Mueller Hinton

Infusion de viande de bœuf	300	
Hydrolysate de caséine	17.5	Ph 7.4
Amidon	1.5	
Agar	17	

Gélose Mac conkey

Peptone	20	
Lactose	10	
Sels biliaire	0.075	Ph 7.4
Chlorure de sodium	05	
Agar	12	

Gélose TSI

Extrait de viande de bœuf	3	
Extrait de levure	3	
Peptone trypsine	20	
Chlorure de sodium	5	
Citrate ferrique	0.3	Ph 7.
Thiosulfate de sodium	0.3	
Lactose	10	
Glucose	1	
Saccharose	10	
Rouge de phénol	0.05	

Agar	12	
Milieu Clark-Lubs		
Peptone trypsine de viande	5	
Phosphate bipotassique	5	Ph 7
Glucose	6	
Bouillon nutritif		
Macération de viande	1	
Peptone trypsique	15	Ph 7.7
NACL	5	
Bouillon nitraté		
Infusion cerveau-cœur	25	ph 7
Nitrate de potassium	10	
Milieu de citrate de Simmons		
Citrate de sodium	02	
Chlorure de sodium	05	
Sulfate de magnésium	0.2	
Phosphate monoammoniaque	01	ph 7 – 7.2
Phosphate bipotassique	01	
Bleu de bromothymol	0.08	
Agar	15	
Mannitol mobilité		
Peptone trypsique de viande	02	
Agar	04	
Mannitol	02	ph 7.6 – 7.8
KNO ₃	01	
Rouge de phénol à 1%	04ml	

ANNEXE III

Réactifs utilisés

Réactifs de Kovacs

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

Réactif de TDA

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

Rouge de méthyle

Rouge de méthyle	0.5g
Alcool éthylique à 60%	100ml

Réactif de voges-proskauer (VPI)

α -naphthol	6g
Alcool éthylique à 90%	100ml

Réactif de voges-proskauer (VPII)

NaOH 4N

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 :

Les rivières sont des milieux négligés et surexploités que ce soit pour l'Homme ou par l'Homme. Par les accumulations des décharges publiques au niveau des rives, par les rejets municipaux ou encore par l'influence des hôpitaux via leurs effluents, ces milieux pourraient être la source de propagation et du transfert de la résistance bactérienne.

L'analyse bactériologique d'eau de différents sites d'oued Soummam est effectuée pour la recherche des bacilles à Gram négatif. L'identification des souches est basée sur la coloration de Gram, 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 (D-D test).

Sur les 33 prélèvements effectués, 106 souches à Gram négatif sont isolées, 103 sont des entérobactéries et 03 souches appartiennent au d'autre genre de bacille à Gram négatif. La sensibilité de ces souches aux antibiotiques (06 β -lactamines et 05 appartenant aux autres familles d'antibiotiques). A révélé que 94,33% des souches BGN isolées sont résistantes à la CTX, 92,45%, 90,67%, 74%, 57,55%, 50,94% sont résistantes respectivement à la CAZ, ATM, AMC au FEP et à la CX avec 67 souches sont productrices de BLSE. Les taux de résistance aux autres antibiotiques sont les suivants : 77,35%, 64,15%, 53,77%, 23,58% et vis-à-vis de TE, NA, TR, C. La Tobramycine est plus active sur ces souches avec un taux de résistance de 15,09%.

Mots clés : eaux de rivière, analyse bactériologique, bacilles à Gram négatif, antibiotiques, résistance.

Abstract:

Rivers are neglected and overexploited that it is for the Man or by the Man. By accumulations of the refuse tips on the level of banks, by the municipal rejections or by the influence of the hospitals by their effluents, this rivers were considered the source of propagation and the transfer of bacterial resistance.

The bacteriological water analysis of various sites of Soummam wadi is carried out for the research of the Gram negative bacilli. The identification of the strains is based on the colouring of Gram, the biochemical tests and the traditional biochemical gallery. The sensitivity of the strains to antibiotics is carried out by the standard antibiogramme. Production of extended spectrum β - lactamase is detected by the test of Synergy (D-D test).

On the 33 taking away carried out, 106 strains with Gram negative are insulated, 103 are enterobacteriaceae and 03 strains belong to other kind of bacillis Gram negative. Sensitivity of these strains to the antibiotics (06 β - lactames and 05 pertaining to the other families of antibiotics). With revealed that 94,33% of insulated strains GNB are resistant to the CTX, 92,45%, 90,67%, 74%, 57,55%, 50,94% are resistant respectively to the CAZ, ATM, AMC with the FEP and to the CX with 67 stocks are producers of ESBL. The rates of resistance to other antibiotics are as follows: 77,35%, 64,15%, 53,77%, 23,58% and with respect to TE, NA, TR, C Tobramycin is more active on these strains with a rate of resistance of 15,09%.

Key words: River water, bacteriological analysis, Gram negative Bacilli, antibiotics, resistance.