

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
**Université A. MIRA - Bejaia**

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



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

## **MASTER**

### *Thème*

**Criblage de souches de Bacilles à Gram négatif productrices de carbapénèmases isolées de l'Oued Soummam**

Présenté par :

**Adedjou Lynda & Yahiaoui Sihem**

Soutenu le : 12 Juin 2016

Devant le jury composé de :

Mr Aissat K	Professeur	Président
Mme Tafoukt R.	MAA	Encadreur
Mme Belhadi K.	MAA	Examineur

**Année universitaire : 2015 / 2016**

## **Remerciements**

*Au terme de ce modeste travail, nous remercions avant tous Allah le Clément et le Miséricordieux de nous avoir donné la foi, la force et la volonté de réaliser ce travail.*

*Nous exprimons nos remerciements à notre promotrice Tafoukt R qui nous a faits l'honneur de diriger notre mémoire sur un sujet intéressant et nous guider tout au long de sa réalisation.*

*On remercie vivement Mr Aissat et Mme Belhadi qui nous ont honoré de leur présence et d'avoir consacré leur temps afin d'évaluer ce travail.*

*Nous souhaitons adresser nos vifs remerciements au Chef du département de Microbiologie Mr A .Touati pour ses précieuses orientations.*

*Nos remerciements s'étendent également à tous nos enseignants durant toutes nos années d'études.*

*On tient également à remercier Djouhra, Arezki, et Rabih, qui ont consacré leur temps et leurs propres moyens, pour réaliser les prélèvements au sein de la Wilaya de Bejaia.*

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

*Je dédie ce modeste travail*

*A ma mère : qu'elle trouve ici l'hommage de ma gratitude, si grande qu'elle puisse être, ne sera à la hauteur de ses sacrifices et ses prières pour moi ;*

*A mon père en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver ;*

*A ma très chère sœur Sabrina, à mon adorable petit frère Kiki ;*

*A mon chère binôme, Sihem en témoignage de l'amitié qui nous unie ;*

*A mes tantes : Djouhra, Fatiha ; et à ma grand-mère : Djamila qui me sont chères, qu'elles trouvent ici l'expression de mes sentiments les plus dévoués et mes vœux les plus sincères ;*

*A toute la promotion MSBV.*

*Que Dieu, le tout puissant, vous préserve tous et vous procure sagesse et sérénité.*

*Lynda*

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

*Un travail que je dédie à toi, ma chère et tendre maman, que Dieu tout puissant te garde et te procure santé, bonheur et longue vie pour demeurer le flambeau illuminant mon chemin ;*

*A mon père en témoignage de mon profond amour, puisse Dieu le tout puissant te préserver et t'accorder santé et prospérité ;*

*A ma très chère sœur, Lynda, qui a cru en moi, m'a fait confiance, soutenu et encouragé ;*

*A mes très chers frères, Abdennour et Djelloul, que Dieu vous protège.*

*A mes belles sœurs, Radia et Nadia ;*

*A ma chère binôme Lynda en témoignage de l'amitié qui nous unie ;*

*A mes très chères amies : Yamina, Meriem, Aida, Souhila et Ahlam ;*

*A mes chères copines de chambre : Sonia, Dahbia et Yasmina ;*

*Et à toute la promotion MSBV*

*Sihem*

## Liste des abréviations

**AB** : Acide boronique

**ADN** : Acide désoxyrebonucléique

**AMC** : Amoxicilline + acide clavulanique

**AmpC** : Chromosomal located cephalosporinase

**ATB** : Antibiotique

**BGN** : Bacille à Gram Négatif

**BLSE** : Betalactamase à spectre étendu

**C3G** : Céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération

**CASFM** : Communiqué de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

**CAZ** : Ceftazidime

**Cloxa** : Cloxacilline

**CTX** : Céfotaxime

**CTX-M** : Céfotaximase Munich

**CX** : Céfoxitine

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**EDTA** : Ethylène Diamine Tétra-Acétique

**ERT** : Ertapénème

**FEP** : Céfépime

**I** : Intermédiaire

**IMP** : Imipénème

**KPC** : Klebsiella pneumoniae Carbapénémase

**MBL** : Métallo-beta-lactamase

**MER** : Meropénème

**MH** : Muller Hinton

**NR** : Réactif de Griess

**OXA**: Oxacillinase

**PLP** : Protéines liant les pénicillines

**R** : Résistant

**RM** : Rouge de méthyle

**S** : Sensible

**TDA**: tryptophane désaminase

**TEM** : Temoneira

**TSI**: Three Sugar Iron

**U. F. C** : Unités formant colonies

**VIM** : Verona Integron-encoded Metallo  $\beta$ -lactamase

**VP** : Réactif de Voges-Proskauer

## Liste des figures

<b>Figure n°1 :</b> La situation géographique d'Oued Soummam et la localisation des régions de prélèvements.....	4
<b>Figure n°2 :</b> La répartition des bacilles à Gram négatif et les différentes espèces d'entérobactéries isolées à partir d'Oued Soummam .....	10
<b>Figure n°3 :</b> Taux de résistance des entérobactéries isolées du 1 <sup>ER</sup> et du 2 <sup>ème</sup> prélèvement aux $\beta$ -lactamines .....	11
<b>Figure n° 4 :</b> Répartition des phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines probables par anzyme .....	12
<b>Figure n°5 :</b> Photos des tests effectués .....	13

## **Liste des tableaux**

<b>Tableau I</b> : Sites des prélèvements.....	5
<b>Tableau II</b> : Interprétation des résultats du Carba NP-test- modifié .....	8
<b>Tableau I</b> : L'ensemble des résultats obtenus à partir des quatre tests .....	14

## **Tableaux en annexes**

<b>Tableau I</b> : Tableau d'identification des souches par des tests biochimiques.....	Annexe I
<b>Tableau II</b> : Charge et diamètre des antibiotiques testés .....	Annexe II

# Sommaire

Introduction .....	1
--------------------	---

## Matériel et méthodes

I.Présentation de la zone d'étude.....	4
I.1.Situation géographique .....	4
II.Prélèvements.....	4
III.Analyse bactériologique .....	5
III.1.Enrichissement et sélection .....	5
III.2..Isolement et purification.....	5
III.3.dentification des souches.....	5
IV.Etude de la sensibilité des souches d'entérobactéries aux antibiotiques .....	6
V.Phénotypes de résistance probables .....	6
V.1.Recherche des $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) .....	6
V.2.Recherche de production de carbapénèmases .....	7
V.2.1.Test de Hodge modifié .....	7
V.2.2.Carba NP test modifié .....	7
V.3.Test des inhibiteurs.....	8

## Résultats

I.Souches bactériennes isolées .....	10
II.Sensibilité des souches d'entérobactéries isolées aux antibiotique .....	10
III.Phénotypes de résistance probables .....	11
III.1.Recherche des $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) .....	11
III.2.Recherche de la production de carbapénèmases .....	11
Discussion générale.....	16

Conclusion..... 20

Références bibliographiques

Annexes



# INTRODUCTION

Le développement des antibiotiques est l'une des découvertes les plus importantes du 20<sup>ème</sup> siècle, des millions de personnes ont été sauvées dès 1940 quand les premiers antibiotiques, (la pénicilline et la streptomycine) ont été introduits (**Marti et al., 2013**) dès lors, les antibiotiques sont largement utilisés pour la prévention des maladies infectieuses humaines ou animales, une grande quantité est utilisée comme promoteur de croissance, en apiculture et en aquaculture, dernièrement la consommation des antibiotiques dans le monde est estimée entre 100.000 à 200.000 tonnes /an (**Zuccato et al., 2010**).

L'utilisation abusive des antibiotiques dès 1940 a été suivie par l'apparition de la première souche de *S. aureus* résistante à la pénicilline par production de pénicillinase en 1942. Dès lors, s'est engagée une course permanente entre résistance bactérienne d'une part, et le développement de nouvelles molécules d'autre part (**Armand-Lefèvre, 2011**).

Les activités humaines et industrielles sont à l'origine du rejet d'un grand nombre des substances chimiques dans les milieux hydriques (**Joyeux, 2006**), mais malheureusement, les règlementations actuelles ne prennent pas en compte les rejets médicamenteux dans ce milieu, une partie de ces composés n'est pas éliminée dans les stations d'épurations tandis que les produits à usage vétérinaires sont directement dispersés dans l'environnement. (**James et al., 2009**), ce qui conduit à l'émergence et la dissémination des gènes de résistance. (**Tahrani et al., 2015**). La majorité des bactéries qui hébergent les gènes de résistance aux antibiotiques, sont identifiées dans les effluents hospitaliers (**Kümmerer et Henninger, 2003**).

Ainsi, l'environnement hydrique représente un grand réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques qui peuvent être mobilisés aux germes pathogènes cliniques. 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 plus part des antibiotiques sont produits par les champignons et les 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 (**Allen et al., 2010**). En effet, quelques études ont montré que les gènes codant pour la  $\beta$ -lactamase CTX-M identifiée chez les patients hospitalisés, est similaire à celle trouvée dans le génome de *Kluyvera spp* qui est une espèce typique de l'environnement aquatique (**Humeniuk et al., 2002 ; Rodriguez et al., 2004**). Ainsi, certains gènes de résistance aux quinolones portés par des plasmides (*qnrA, qnrS*) et retrouvés chez des souches pathogènes, ont été décrits dans des chromosomes de bactéries aquatiques appartenant respectivement aux

espèces *Shewanella algae*, et *Vibrio splendidus*, soulignant les origines environnementales de ces gènes (Poirel *et al.*, 2005; Cattoir *et al.*, 2007).

Le transfert de gènes peut aboutir à l'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques portés par des éléments génétiques mobiles qui constituent de véritable véhicule de la résistance. Il existe deux types d'éléments génétiques mobiles, ceux qui permettent le transfert de gènes entre différentes molécules d'ADN, comme les séquences d'insertion ou les cassettes et ceux qui permettent le transfert de l'information génétique d'une cellule à une autre comme les plasmides et les éléments intégratifs conjugatifs. Ces éléments génétiques mobiles jouent un grand rôle dans l'émergence et la diffusion de la résistance aux antibiotiques (Drieux-Rouzet *et al.*, 2013). L'émergence des mécanismes de résistance associés aux éléments génétiques mobiles peut favoriser la possibilité de transfert des gènes de virulence et des gènes de résistance aux antibiotiques simultanément, induisant l'émergence de nouveaux pathogènes (Chen *et al.*, 2011).

Les carbapénèmes sont des  $\beta$ -lactamines possédant un très large spectre antibactérien doublé d'une grande stabilité envers la quasi-totalité des  $\beta$ -lactamases. Pour cette raison ils font partie des antibiotiques utilisés en première ligne au cours du traitement probabiliste des infections nosocomiales sévères (Wolff *et al.*, 2009), il est donc important de limiter l'utilisation de cette classe d'antibiotique pour en préserver l'efficacité.

L'activité des carbapénèmes s'étale sur les Gram positifs, les Gram négatifs et les anaérobies, ils inhibent la synthèse de la paroi en inactivant les PLP1<sub>a</sub>, 1<sub>b</sub> et 2 (Hilas *et al.*, 2008). La résistance aux carbapénèmes chez les entérobactéries résulte essentiellement de deux mécanismes impliquant tous les deux des  $\beta$ -lactamases. Le premier mécanisme associe la production d'une céphalosporinase chromosomique ou plasmidique ou une BLSE à une diminution quantitative ou qualitative de l'expression des porines. Le second est liée à l'expression des  $\beta$ -lactamases à forte activité hydrolytique vis-à-vis des carbapénèmes, les carbapénémases (Nordman et carrer, 2010). Selon la classification d'Ambler, elles sont divisées en trois classes: la classe A, la classe B, et la classe D (Nordman *et al.*, 2011). Les carbapénémases de classe A, tels que les KPC inactivent toutes les  $\beta$ -lactamines et ne sont que partiellement inhibées par les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase comme l'acide clavulanique, le tazobactam et l'acide boronique. Les carbapénémases de classe B comprennent les métallob $\beta$ -lactamases (MBL), qui sont capables d'hydrolyser toutes les  $\beta$ -lactamines, sauf l'aztréonam, ces enzymes sont inhibées in vitro en utilisant des chélateurs de métaux, tels que l'EDTA

(Meletis, 2016). Les carbapénèmases de classe D appartiennent à la famille des oxacillinases. Elles hydrolysent faiblement les carbapénèmes (Jeon *et al.*, 2015).

En Algérie la résistance aux antibiotiques indiquent une situation inquiétante, notamment dans le nord du pays. En effet, ces dix dernières années nous avons constaté une importante augmentation de la résistance aux antibiotiques, en particulier chez les bacilles à Gram négatif, selon les études effectuées, quelques entérobactéries productrices de OXA-48 et VIM-19 ont été détectées (Baba Ahmed-Kazi Tani *et al.*, 2014), et des souches de *Acinetobacter baumannii* ont été isolées à partir de l'environnement hospitalier présentent les gènes *bla*<sub>OXA-23</sub> et *bla*<sub>NDM-1</sub>(Zenati *et al.*, 2016).

Alouache et ses collaborateurs (2011) ont étudié la résistance aux antibiotiques et la production de BLSE chez les bactéries isolées à partir d'eau de mer au niveau de quatre plages d'Alger où des gènes codant pour les  $\beta$ -lactamases à spectre étendu de type CTX-M-15 ont été détectés chez des souches de *E. coli* , mais aucune étude n'a rapporté la résistance aux carbapénèmes dans les eaux de surface dans notre pays. C'est dans ce contexte nous proposons d'évaluer la contamination d'Oued Soummam par les bacilles Gram négatif producteurs de carbapénèmases. Pour se faire, nous avons opté pour la méthodologie suivante:

- Prélèvement des échantillons d'eau, suivi d'un enrichissement.
- Isolement et purification des bactéries à Gram négatif.
- Identification des souches par la galerie biochimiques classique.
- Etude de la sensibilité des souches d'entérobactéries aux  $\beta$ -lactamines.
- Détermination des phénotypes de résistance probables aux  $\beta$ -lactamines.

A decorative horizontal scroll graphic with a black outline and rounded ends, resembling a rolled-up document. The text is centered within the scroll.

# Matériel et Méthodes

## I. Présentation de la zone d'étude

### I.1. Situation géographique

Le bassin versant de l'oued Soummam, objet de cette étude, est le plus important de Kabylie .Il s'étend sur une superficie de 9125 Km<sup>2</sup>. Ses limites approximatives sont : Au nord, les monts de Djurdjura ; au sud, les monts du Hodna et le plateau Setifien ; à l'ouest, le plateau de Bouira ; à l'est, la méditerranée (Bennabi, 1989).

Cette rivière parcourt toute la vallée de la Soummam sur environ 90Km et débouche en mer à Bejaia. Le débit moyen est d'environ 25m<sup>3</sup>/S (Bennabi, 1985 ; Benhammiche, 1997).



**Figure N° 1 :** La situation géographique d'Oued Soummam et la localisation des régions de prélèvements (google, earth).

## II. Prélèvements

Durant ce travail deux campagnes de prélèvements ont été effectuées ; la première au cours du mois de Janvier, et la deuxième au mois de Février. Dix-neuf échantillons d'eaux ont été collectés d'Oued Soummam à chaque campagne de prélèvement ; en partant de Tazmalt, jusqu'à son déversement dans la mer méditerranée. Le choix des points de prélèvement a été dicté par l'origine de pollution de l'Oued (decharge, eaux usées urbaines, l'agriculture, l'industrie), qui sont présentés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau I** : Sites des prélèvements

REGION	SITES DE PRELEVEMENT	CRITERES DE CHOIX
TAZMALT	1-Entrée de Tazmalt 2-Sortie de Tazmalt 3-Oued El-sahel	-Zone agricole+décharge -Sablière+décharge -Zone agricole+décharge
AKBOU	4-Entrée d'Akbou 5-Bouzarouel 6-Zone industrielle 7-Halouane	-Sablière -Décharge -Zone industrielle -Sablière+décharge
IGHZER AMOKRAN	8-Usine Ifri 9-Décharge de Salouana	-Zone industrielle -Décharge
SIDI AICH	10-Takerietz 11-Entrée de Sidi Aich 12-Sidi Aich (avant le pont) 13-Sidi Aich (après le pont)	-Décharge -Zone urbaine
EL- KSEUR	14-Remila 15-Village agricole 16-Pont El- kseur	-Sablière+zone agricole -Zone agricole+décharge -Zone agricole
BEJAIA	17-Oued mellala 18-Pont Irriyahan 19-Sidi Ali-EL-bher(Déversement d'Oued Soummam dans la mer)	-Décharge -Zone urbaine

Les échantillons d'eau sont récupérés dans des flacons stériles étiquetés (Date et lieu de prélèvement), puis transportés au laboratoire de Microbiologie dans une glacière.

### III. Analyse bactériologique

#### III.1.Enrichissement et sélection

Un volume de 50mL d'eau a été ajouté à 100 mL de bouillant nutritif additionné d'Ertapénème et de la vancomycine à des concentrations finales de 0,5 $\mu$ g/mL et de 8 $\mu$ g/mL respectivement. Les flacons ont été incubés à 37C° pendant 24 à 48h jusqu'à l'apparition de culture bactérienne qui se manifeste sous forme de trouble.

#### III.2. Isolement et purification

Après incubation, l'isolement a été réalisé à partir des flacons de bouillon nutritif présentant un trouble sur boîtes de Mac Conkey.

-Pour les échantillons d'eau de la première campagne de prélèvement, sur une gélose Mac Conkey additionnée de l'ERT à une concentration finale de 0,5 µg/mL.

-Pour les échantillons d'eau de la deuxième campagne de prélèvement, en plus de la gélose Mac Conkey additionnée de l'ERT, une autre gélose Mac Conkey a été ensemencée, additionnée de l'IMP, à des concentrations de 0,5 µg /mL.

Les boîtes ont été incubées à 37C° pendant 24 à 48 heures. Après incubation, les colonies ont fait l'objet d'une purification par repiquages successifs sur le même milieu d'isolement jusqu'à l'obtention d'un isolat pur.

### III.3. Identification des souches

Elle est basée sur les caractères cultureux (couleur, taille, aspect des colonies), la coloration de Gram, et les tests biochimiques classiques qui sont :

- Utilisation des sucres sur milieu TSI.
- Utilisation du mannitol et vérification de la mobilité sur milieu mannitol mobilité.
- Utilisation du citrate comme seule source de carbone sur milieu citrate de Simmons.
- Le milieu Clark et Lubs permet l'étude des produits de fermentation du glucose.
- Le milieu urée indole permet la recherche d'uréase, TDA, et la production d'indole.
- Le milieu bouillon nitraté permet la recherche du nitrate réductase.
- Production d'indole en utilisant l'eau péptonée exempte d'indole (incubation à 37et 44C°).

### IV. Etude de la sensibilité des souches d'entérobactéries aux antibiotiques

La sensibilité des souches d'entérobactéries 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 (CASFM-EUCAST-2013) et (CASFM-EUCAST-2015). 46 souches fermentaires ont été testées vis-à-vis de 6 antibiotiques de la famille des β-lactamines (**Annexe II**).

A partir d'une culture pure de 18h à 24h sur milieu gélosé non sélectif, on prélève à l'aide d'une anse de platine 2 à 3 colonies bien isolées qu'on dissocie dans 5ml d'eau physiologique, bien homogénéiser la suspension bactérienne, sa charge doit être équivalente au standard Mc Farland (correspondant à environ  $10^8$  UFC/ml). Après une dilution à  $10^{-1}$  de

l'inoculum préparé, l'ensemencement est fait par la méthode d'écouvillonnage à la surface du milieu gélosé Muller Hinton.

Les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse, et l'interprétation en Sensible (S), Intermédiaire(I), ou Résistante(R) a été effectuée selon les critères définis par le CASFM-EUCAST-2013 et CASFM-EUCAST-2015.

### V. Phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines

#### V.1. Recherche des $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) (Jarlier *et al.*, 1988).

La mise en évidence de la présence de  $\beta$ -lactamase à spectre élargie consiste à mettre en évidence une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de  $\beta$ -lactamase (l'acide clavulanique) et un disque de C3G,C4G, et monobactame.

- **Technique**

Elle consiste à placer des disques de céftazidime, céfotaxime et céfoxitine (30  $\mu$ g chacun) à une distance définie (20mm centre à centre) d'un disque d'AMC (amoxicilline-acide clavulanique) (20 $\mu$ g et 10 $\mu$ g, respectivement). Incuber pendant 18 heures à 37°C.

- **Lecture**

L'apparition d'une image de synergie visible entre le disque d'AMC et les disques CAZ, CTX et/ou FOX indique la production d'une BLSE.

#### V.2. Recherche de production de carbapénèmases

##### V.2.1. Test de Hodge modifié.

Ce test a été réalisé afin de mettre en évidence la production d'une carbapénèmase pour les souches qui présentent une résistance ou une sensibilité diminuée aux carbapénème, le test a été réalisé comme suit (Lee *et al.*, 2010) :

- Une souche d'*E coli* de référence ATCC25922 (Sensible), a été ensemencée par écouvillonnage sur gélose Mac Conkey additionnée de la poudre de Zinc(0,75g/l), à partir d'une suspension bactérienne de 3mL.
- Un disque d'IMP a été déposé au centre de la boîte, puis chaque souche à tester a été ensemencée par stries à partir du disque d'IMP jusqu'à la périphérie de la boîte.

- Incubation à 37C°/24h, la déformation du diamètre de la zone d'inhibition à l'intersection entre la strie et la culture d'*E coli* (image en trèfle), indique la production d'une carbapénèmase (par la souche testée) qui hydrolyse l'IMP.

### V.2.2. Carba NP test modifié (Bakour et al., 2015)

La recherche des carbapénèmases est mise en évidence par le Carba NP test modifié

- **La préparation de la solution 'A'**

- ✓ Préparer une solution concentrée de rouge de phénol 0,5% poids /volume [0,5g de poudre dans 100mL d'eau distillée stérile].
- ✓ Mélanger 2mL de la solution concentrée de rouge de phénol (bien vortexer avant pipetage) dans 16,6mL d'eau distillée.
- ✓ Ajouter 180µL d'une solution de ZnSO<sub>4</sub> 10mM pour obtenir une concentration finale de ZnSO<sub>4</sub> à 0,1Mm.
- ✓ Ajuster le pH à 7 avec une solution d'NaOH (1N).

- **Protocol**

- ✓ Dans un tube Eppendorf, mettre 200µL de tampon de lyse : Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB 0,02%) [0,02g de poudre dans 100mL d'eau distillée].
- ✓ Bien suspendre un ose calibré de colonies bactériennes, vortexer 1 à 2min
- ✓ Transférer la suspension bactérienne dans 2 tubes Eppendorf 'a' et 'b' (100µL dans chaque tube).
- ✓ Ajouter 100µL de solution 'A' dans le tube Eppendorf 'a' puis 100µL de solution 'A'+Imipeneme 6mg /mL dans le tube Eppendorf 'b', vortexer 5 sec.
- ✓ Incuber à 37C° pendant un maximum de 2 heures.
- ✓ Lecture visuelle de la couleur dans chaque tube Eppendorf.

Le tube 'a' est considéré comme témoin négatif.

**Tableau II** : Interprétation des résultats du Carba NP-test modifié

	Tube a	Tube b
Pas de carbapenemase	Rouge	Rouge
Carbapenemase	Rouge	Orange /Jaune
Non interprétable	Jaune	Jaune

### V.3. Test des inhibiteurs

#### V.3.1. Inhibiteurs utilisés

- **L'EDTA (détection de MBL)**
  - ✓ pH=8, Concentration=0,5M
  - ✓ Dépôt de 5 à 10µL par disque
- **L'Acide boronique (détection de KPC)**
  - ✓ 20g/mL, soit 120mg dans 3mL de DMSO+3mL d'eau distillée.
  - ✓ Dépôt de 20µL par disque, soit 400µg par disque.
- **La Cloxacilline (détection d'AmpC)**
  - ✓ 1g d'Orbénine dans 40mL d'eau distillée.
  - ✓ Dépôt de 10µL par disque, soit 250µg par disque.

### V.3.2. Protocol

-Quatre disques d'Imipénème sont déposés séparément sur la gélose MH. Les trois inhibiteurs ont été ajoutés sur trois disques d'Imipénème, alors que le quatrième disque au centre reste comme témoin.

- Les mêmes inhibiteurs ont été ajoutés aussi sur trois disques vierges.

-Après 24h d'incubation à 37C°, les diamètres des zones d'inhibition autour du disque d'ATB+inhibiteur et l'ATB seul sont comparés.

### V.3.3. Interprétation des résultats

Un résultat positif se traduit par une augmentation de la zone d'inhibition autour du disque IMP+inhibiteur par rapport au disque d'IMP seul. Les souches dont le diamètre d'inhibition autour du disque IMP-inhibiteur est supérieur à celui obtenu avec le disque d'IMP seul, d'au moins 5 mm, sont considérées comme souches productrices soit de KPC, de MBL, ou d'AmpC (*Birgy et al., 2012*).



# Résultats

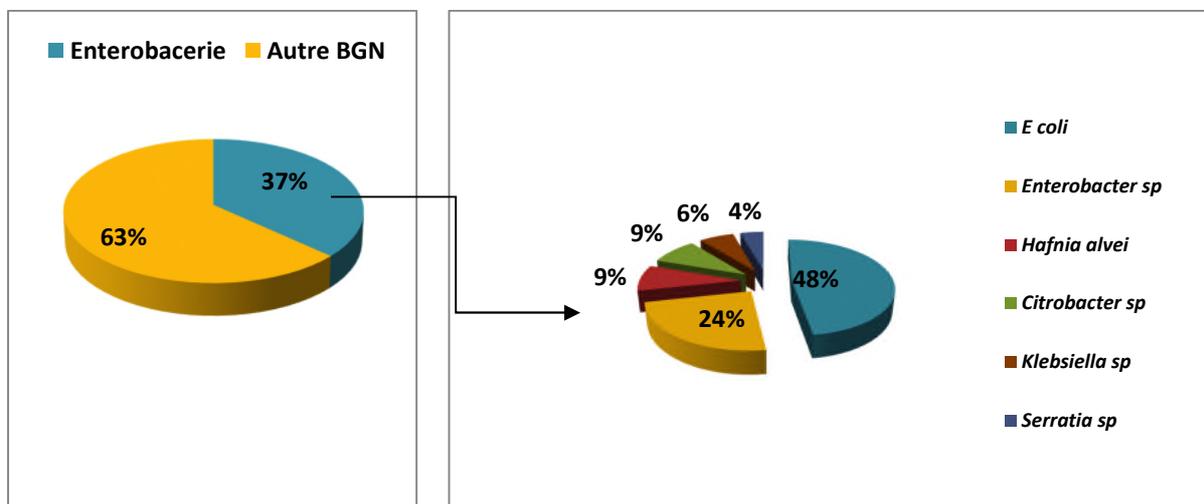
Notre étude a été effectuée au laboratoire de microbiologie à l'université A. Mira de Bejaïa durant une période de cinq mois, allant de Janvier à Mai 2016. Deux campagnes de prélèvements ont été effectuées, au total 38 échantillons d'eau ont été collectés au niveau de différents sites de l'Oued Soummam.

### I. Souches bactériennes isolées

125 isolats bactériens ont été isolés, dont 46 (36,8%) souches ont été isolées à partir de la première campagne de prélèvement, et 79(63,2%) souches ont été isolées de la deuxième campagne de prélèvement.

Parmi les 125 souches de BGN isolées, 46 (36,8%) d'entre elles appartiennent à la famille des entérobactéries, alors que 79(63,2%) appartiennent à d'autres familles de bacilles à Gram négatif (**Figure N° 2**).

Parmi les entérobactéries, *E. coli* est l'espèce la plus isolée avec un taux de 48%(22 souches), suivi par 11 souches d'*Enterobacter. sp* ; 4 souches de *Hafnia alvei* ; 4 souches de *Citrobacter. sp* ; 3 souches de *Klebsiella. sp* ; 2 souches de *Serratia. sp*, avec des taux de 24% ,9% ,9% ,6% ,4% respectivement (**Figure N° 2**).

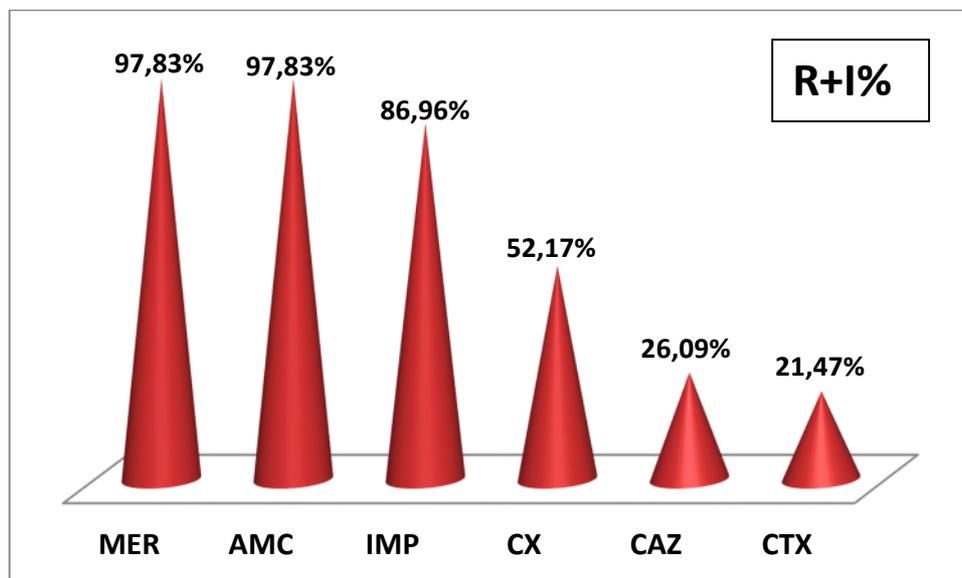


**Figure N° 2** : La répartition des bacilles à Gram négatif et les différentes espèces d'entérobactéries isolées à partir d'Oued Soummam.

### II. Sensibilité des souches d'entérobactéries isolées aux antibiotiques

Les 46 souches d'entérobactéries isolées ont été testées vis-à-vis 6 ATB de la famille des  $\beta$ -lactamines à savoir : IMP, MER, CX, CTX, CAZ, AMC.

La figure ci-dessous montre des taux de résistance des souches isolées à partir des deux campagnes de prélèvement vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines testées. La résistance au MER et l'AMC est observée avec un taux important allant jusqu'à 97,83% , suivi de la résistance à l'IMP,CX,CTX,CAZ avec des taux de 86,96% , 52,17%,21,74%,26,09% respectivement.



**Figure N° 3 :** Taux de résistance des souches d'entérobactéries isolées aux  $\beta$ -lactamines.

### III. Phénotypes de résistance probables

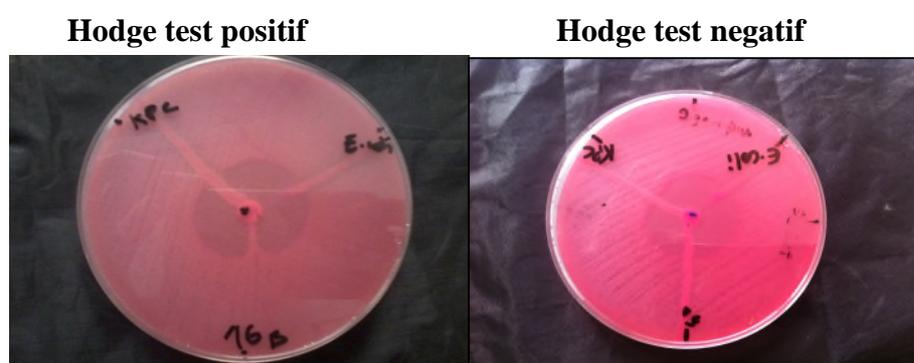
#### III.1. Recherche des $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE)

Aucune image de synergie n'a été observée sur toutes les souches d'entérobactéries, indiquant que la résistance aux C3G des souches isolées n'est probablement pas due à une production de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE).

#### III.2. Recherche de la production de carbapénèmases

- **Hodge test modifié**

25/46(45,65%) des souches présentent un test de Hodge positif (image de trèfle) indiquant qu'elles sont probablement productrices de carbapénèmases (**Tableau III**).

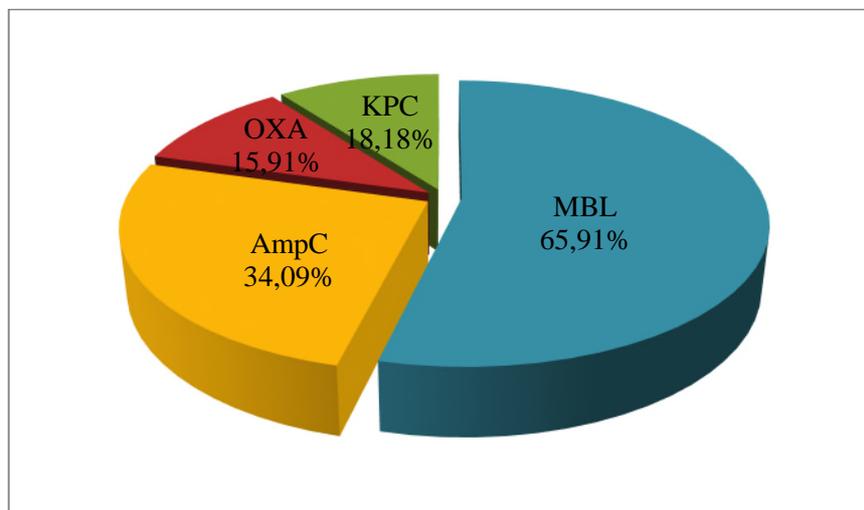


- **Carba NP test**

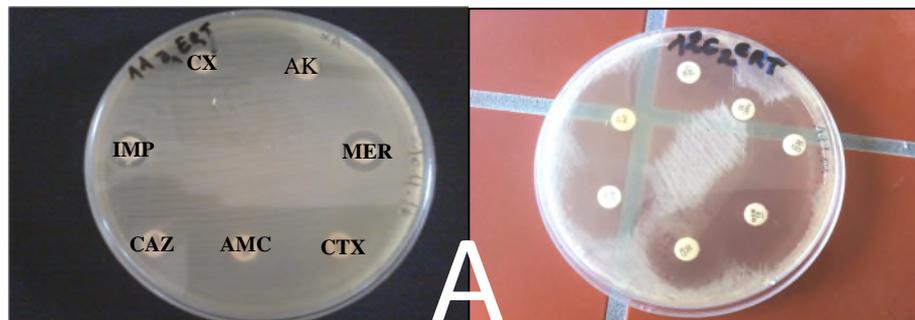
Parmi les 46 souches d'entérobactéries testées, le Carba NP test a été positif pour 37(80,43%) souches, elles sont donc probablement productrices de carbapénèmases ( **figure N° 5**) et négatif pour 7 souches (15,22%) et non interprétable pour 2 souches (4,37%) (**Tableau III**).

- **Test des inhibiteurs**

Le test des inhibiteurs est positif pour 44/46 des souches, dont Le test à l'acide boronique est positif pour 8/44(18,18%) des souches isolées, elles sont donc probablement productrices de carbapénémase de type KPC. Le test à l'EDTA est positif pour 29/44(65,91%) des souches elles sont donc probablement de carbapénémase de type MBL. Le test à la cloxacilline est positif pour 15/44(34,09%), ces souches sont donc résistantes aux carbapénèmes par production d'AmpC. Le test des inhibiteurs est négatif pour 7/44(15,91%) des souches d'entérobactéries isolées, alors qu'elles présentent un Hodge test modifié positif. Dans ce cas, la résistance aux carbapénèmes testés est probablement due à la production d'oxacillinases, (**Tableau III**).



**Figure N° 4 :** Répartition des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines probables par enzyme.



Souche résistante

Souche sensible



**Figure N° 5** : Photos des tests effectués ; A : Antibiogramme, B : Cabra NP test modifié, C : Test des inhibiteurs.

**Tableau II** :L'ensemble des résultats obtenus à partir des quatre tests.

Espèces	Code	Site de prélèvement(1 <sup>er</sup> et 2 <sup>ème</sup> )	Profils de résistance	<u>Test de synergie</u>	Hodge test modifié	Carba NP test modifié	Test des inhibiteurs			Phénotypes probables
							Test EDTA	Test AB	Test cloxa	
<i>E coli</i>	1	Tazmalt	IMP,MER,AMC	-	+	+	+	-	-	MBL
<i>E coli</i>	1CAB	Tazmalt	IMP,MER,AMC ,CX,CTX ,CAZ	-	-	+	+	-	+	MBL+AMPC
<i>E coli</i>	2-c	Tazmalt	IMP,MER,AMC ,CX,CTX ,CAZ	-	+	+	+	-	+	MBL+AMPC
<i>E coli</i>	4-A	Akbou	IMP,MER,AMC ,CX	-	+	+	+	+	+	MBL+AMPC+KPC
<i>E coli</i>	5AIMP	Akbou	IMP,MER,AMC ,CAZ	-	+	+	+	-	-	MBL
<i>E coli</i>	5A	Akbou	IMP,MER,AMC	-	+	+	+	-	-	MBL
<i>E coli</i>	6B1ERT	Akbou	IMP,MER,AMC	-	+	+	+	+	-	MBL+KPC
<i>E coli</i>	7AIMP	Ighzer Amoukrane	IMP,MER,AMC	-	-	+	+	-	-	MBL
<i>E coli</i>	9	Ighzer Amoukrane	IMP,MER,AMC	-	+	+	+	-	-	MBL
<i>E coli</i>	9CP	Ighzer Amoukrane	IMP,MER,AMC	-	-	+	+	-	-	MBL
<i>E coli</i>	9AP	Ighzer Amoukrane	IMP,MER,AMC	-	-	-	-	-	-	Imperméabilité
<i>E coli</i>	10BERT	Sidi Aich	IMP,MER,AMC	-	-	+	+	-	-	MBL
<i>E coli</i>	10AERT	Sidi Aich	IMP,MER,AMC,CX	-	+	NI	+	+	+	MBL+KPC+AMPC
<i>E coli</i>	10CAERT	Sidi Aich	IMP,MER,AMC,CX	-	+	-	-	-	+	AMPC
<i>E coli</i>	10C2ERT	Sidi Aich	IMP,MER,AMC,CX	-	-	+	+	-	+	MBL+AMPC
<i>E coli</i>	10CBA	Sidi Aich	IMP,MER,AMC,CX	-	+	NI	+	-	+	MBL+AMPC
<i>E coli</i>	13AIMP	Sidi Aich	IMP,MER,AMC,CX	-	+	+	-	+	+	AMPC+KPC
<i>E coli</i>	14AIMP	El- kseur	IMP,MER,AMC	-	-	+	+	-	-	MBL
<i>E coli</i>	16AIMP	El- kseur	IMP,MER,AMC	-	-	+	-	+	-	KPC
<i>E coli</i>	18ERT	Bejaia	IMP,MER,AMC ,CX,CTX ,CAZ	-	+	+	+	-	+	MBL+AMPC
<i>E coli</i>	2A	Tazmalt	IMP,MER,AMC ,CTX ,CAZ	-	-	+	+	-	-	MBL
<i>E coli</i>	19B	Bejaia	IMP,MER,AMC ,CTX ,CAZ	-	-	+	+	-	-	MBL
<i>Enterobacter sp</i>	1CIMP	Tazmalt	IMP,MER,AMC ,CTX ,CAZ	-	+	+	+	-	+	MBL+AMPC
<i>Enterobacter sp</i>	4CP	Akbou	IMP,MER,AMC ,CX	-	-	-	-	-	+	AMPC
<i>Enterobacter sp</i>	13AERT	Sidi aich	IMP,MER,AMC ,CX	-	+	+	+	+	+	MBL+AMPC+KPC
<i>Enterobacter sp</i>	15A2IMP	El- kseur	MER,CTX,CX,AMC,CAZ	-	-	-	-	-	-	Impermabilité
<i>Enterobacter sp</i>	16B	El-kseur	IMP,MER,AMC ,CX	-	+	+	+	-	-	MBL
<i>Enterobacter sp</i>	19A1IMP	Bejaia	IMP,MER,AMC ,CX	-	+	+	-	-	-	OXA

<i>Enterobacter sp</i>	19A2IMP	Bejaia	IMP,MER,AMC ,CX	-	+	+	-	-	-	OXA
<i>Enterobacter sp</i>	19CERT	Bejaia	MER,AMC ,CX	-	+	+	-	-	-	OXA
<i>Enterobacter sp</i>	3CERT	Tazmalt	MER,AMC ,CX	-	+	-	-	-	+	AMPC
<i>Enterobacter sp</i>	1-3P	Tazmalt	IMP,MER,AMC ,CX	-	+	+	-	-	-	OXA
<i>Enterobacter sp</i>	4C	Akbou	IMP,MER,AMC ,CX	-	-	+	-	-	-	OXA
<i>Hafnia alvei</i>	1A	Tazmalt	IMP,MER,AMC	-	+	+	-	-	-	OXA
<i>Hafnia alvei</i>	12AIMP	Sidi Aich	IMP,MER,AMC	-	+	+	+	-	-	MBL
<i>Hafnia alvei</i>	4B1IMP	Akbou	IMP,MER,AMC	-	-	+	+	-	-	MBL
<i>Hafnia alvei</i>	6A	Akbou	IMP,MER,AMC	-	-	+	+	-	-	MBL
<i>Citrobacter sp</i>	3AIMP	Tazmalt	IMP,MER,AMC,CX	-	+	+	+	-	+	MBL+AMPC
<i>Citrobacter sp</i>	16AERT	El-kseur	IMP,CX	-	-	-	-	-	+	AMPC
<i>Citrobacter sp</i>	3BERT	Tazmalt	MER,AMC ,CX	-	+	-	-	-	-	OXA
<i>Citrobacter sp</i>	6B3IMP	Akbou	IMP,MER,AMC ,CX ,CAZ	-	-	+	+	-	-	MBL
<i>Klebsiella sp</i>	8AERT	Ighzer Amoukrane	IMP,MER,AMC,CAZ	-	-	+	-	+	-	KPC
<i>Klebsiella sp</i>	13BIMP	Sidi aich	IMP,MER,AMC	-	+	+	-	+	-	KPC
<i>Klebsiella sp</i>	13BERT	Sidi aich	MER,CTX,CX,AMC,CAZ	-	-	+	+	-	-	MBL
<i>Serratia sp</i>	13B1ERT	Sidi aich	MER,AMC ,CTX	-	-	+	+	-	-	MBL
<i>Serratia sp</i>	16BIMP	El-kseur	IMP,MER,AMC ,CTX ,CAZ	-	-	+	+	-	-	MBL

**NI** : Non interprétable



# Discussion générale

Les rivières sont des écosystèmes profondément perturbés par les activités humaines (**Garcia et al., 2013**). De ce fait, elles sont considérées comme de véritables réservoirs de gènes de résistance, car elles sont des récepteurs de bactéries provenant de différentes sources tel que: les effluents hospitaliers, les effluents des stations d'épuration des eaux usées, les rejets d'élevage, et ceux de l'agriculture (**Lupo et al., 2012**).

125 souches de bacilles à Gram négatif ont été isolées à partir d'eau de surface d'Oued Soummam. 46(37%) des espèces isolées appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*, nos résultats sont similaires avec ceux rapportés dans une étude effectuée par **Tacão et ses collaborateurs en 2012**, sur la résistance aux antibiotiques à large spectre dans les systèmes aquatiques, parmi la totalité des souches isolées, 35% appartiennent à la famille d'entérobactéries (**Tacão et al., 2012**). Dans une autre étude effectuée par **Goni-Urizza et ses collaborateurs en 2014**, sur l'impacte des effluents urbains sur la résistance des entérobactéries, *Aeromonas sp* dans la ravière d'Arga, 44% des souches d'entérobactéries ont été isolées, qui est un taux élevé comparé à celui que nous avons obtenu. Cependant, 56% ont été identifiées comme autre bacilles à Gram négatif, qui est un taux inférieur à celui de notre étude (**Goni-Urizza et al., 2014**).

Durant cette étude, parmi les 46 souches d'entérobactéries isolées, 48% de souches étaient identifiées comme étant *E. coli*, suivi d'*Enterobacter.sp*; *Hafnia .alvei*; *Citrobacter.sp*; *Klebsiella.sp*; *Serratia.sp* avec des taux de 24%,9%,9%,6%,4% respectivement. A l'exception de *Kluyvera* et *Proteus*, les souches d'entérobactéries isolées par **Holder-Franclin et ses collaborateurs en 1992**, sont les mêmes que nous avons identifié avec des taux différents : *E.coli* (20,9%), *Enterobacter.sp* (20,9%), *Klebsiella.sp* (20%), *Citrobacter.sp* (13,6%), *Serratia.sp* (2,7%). Ces résultats montrent que la plus part des bactéries isolées de ces milieux aquatiques sont des Gram négatif (**Holder-Franclin et al., 1992**).

Les souches de *E .coli* résistantes aux antibiotiques ont été détectées dans différents environnements comme les rivières, les lacs, les eaux usées, les eaux de surface, les sidéments et les effluents hospitalier .En effet, La présence ou l'absence d'*E.coli* multirésistantes aux antibiotiques dans l'environnement aquatique nous permet d'évaluer et d'identifier les différentes sources de contamination (**Agwu et Oluwagunke, 2014**).

Au cours de notre étude, les résultats de la sensibilité des souches isolées à partir d'Oued Soummam vis-à-vis des antibiotiques appartenant à la famille des  $\beta$ -lactamines étaient importants allant jusqu'à 97,83% pour l'AMC et le MER ,puis 86,96%, 52,17%,

26,09%, 21,74% pour IMP, CX, CAZ, CTX respectivement, à l'exception de l'IMP, CX, AMC, les mêmes antibiotiques ont été testés par **Oliveira et Van Der Sand en 2016**, dans une étude sur la détection des  $\beta$ -lactamases produites par les entérobactéries isolées à partir de différents environnements par les tests phénotypiques où ils ont observés des taux de résistance plus élevés au CTX (83,87%) et à la CAZ(58,06%), cependant le taux de résistance au MER(19%) est largement inférieur à celui que nous avons obtenu (**Oliveira et Van Der Sand, 2016**). Les souches de *E. coli* sont naturellement sensibles aux  $\beta$ -lactamines, malgré la présence d'une céphalosporinase chromosomique qui est exprimée à très bas niveau (**Sougakoff et Tristram D, 2003**).

*Enterobacter.sp*; *Hafnia alvei*; *Citrobacter.sp*; *Serratia.sp*, sont des espèces d'entérobactéries naturellement productrices de AmpC, résistante aux inhibiteurs, le phénotype de résistance naturelle est marqué par une résistance aux aminopénicillines seuls ou associés aux inhibiteurs et une résistance aux céphalosporines de 1<sup>re</sup> génération. Selon les espèces il peut s'ajouter une résistance ou une sensibilité intermédiaire à la cefoxitine et au céfuroxime. Les espèces du genre *Enterobacter* et *C. freundii* sont plus résistantes à la cefoxitine qu'au céfuroxime, *S. marcescens* est plus résistante au céfuroxime qu'à la cefoxitine, cependant les souches d'*Hafnia alvei* sont généralement sensibles aux deux molécules, *Klebsiella.sp* possède une pénicillinase chromosomique constitutive exprimée à bas niveau, le phénotype de résistance est caractérisé par une résistance aux aminopénicillines et aux carboxypénicillines (**Robin et al., 2012**).

Dans une autre étude, effectuée par **Aubron et ses collaborateurs en 2005**, sur la production des carbapénèmases chez les entérobactéries dans une rivière aux Etats-Unis, la résistance à l'IMP qui a été rapporté avec un taux de 96,67%, est supérieure à celle observée dans notre étude (86,96%). (**Aubron et al., 2005**), **Diab et ses collaborateurs 2008**, ont trouvé une résistance à l'AMC et CX avec des taux de 52,22%, 46,82% respectivement, ces taux sont inférieurs à ceux que nous avons obtenu (**Diab et al., 2008**).

La détection phénotypique de production de carbapénèmases pour Les 46 souches qui présentaient une résistance à l'IMP et au MER ont été testées par le Hodge test modifié, ainsi que le Carba NP- test, a montré que le test de Hodge était positif chez *E. coli* avec un taux de 54,55%, et chez *Enterobacter.sp*; *Hafnia alvei*; *Citrobacter.sp*; *Klebsiella.sp*, avec des taux de 72,72%, 50%, 50%, 33,33% respectivement, indiquant que la résistance aux carbapénèmes est probablement due à la production de carbapénèmases, alors que, aucune souche de

*serratia* n'a été Hodge positif. Dans la même étude effectuée par **Oliveira et Van Der Sand en 2016**, une seule souche de *Klebsiella pneumoniae* a été Hodge positif, alors que le Hodge test modifié était non interprétable pour quatre souches de *Klebsiella pneumoniae* et une souche d'*Enterobacter. sp*. Ce taux est très faible par rapport à celui qu'on a trouvé (**Oliveira et Van Der Sand, 2016**)

Dans une autre étude effectuée par **Birgy et ses collaborateurs en 2012**, sur la recherche des carbapénèmases et les  $\beta$ -lactamases associées à la résistance aux carbapénèmes chez les entérobactéries par les tests phénotypiques, 21 /22 souches soit un taux de 95,45% ont présenté un test de Hodge positif, ce taux est important en le comparant avec celui que nous avons obtenu (**Birgy et al., 2012**).

Parmi les 46 souches d'entérobactéries testées, le Carba NP- test modifié était positif pour 37 souches, elles sont donc probablement productrices de carbapénèmases, ces souches productrices de carbapénèmases appartenaient toutes à la famille des entérobactéries. Des souches productrices de carbapénèmases ont été détectées dans les rivières aux Etats-Unis (**Aubron et al., 2005**), la Chine (**Chen et al., 2011**), France (**Girlich et al., 2010**), et le Portugal (**Poirel et al., 2012**), indiquant qu'une diffusion mondiale des carbapénèmases dans l'environnement est actuellement en cours. La résistance aux carbapénèmes est rare chez les *Enterobacteriaceae* et peut être médiée par trois mécanismes : hyperproduction d'un type AmpC céphalosporinases combinée à une diminution de la perméabilité à travers la membrane externe, une diminution de l'affinité de protéines liant la pénicilline qui constitue des protéines cibles pour les carbapénèmases, et carbapénème-hydrolysant les  $\beta$ -lactamases (**Lee et al., 1993**).

L'analyse phénotypique de la résistance aux carbapénèmes a été réalisée par le test des inhibiteurs, afin d'identifier le type de carbapénémase produite. Tous les 46 isolats qui présentent une résistance aux carbapénèmes testés, sont testés par le test des inhibiteurs en utilisant: AB, EDTA, et la Cloxacilline.

44/46 des souches soit un taux de 95,65% sont positives à ce test, les 44 isolats présentent une zone d'inhibition d'une différence de 5mm au moins à un seul inhibiteur dont 21/44 (47,73%) des souches isolées sont des *E.coli*, et 10/44(22,73%) sont des *Enterobacter. sp*, 4/44(9,09%) sont *Hafnia alvei*, 4/44(9,09%) sont des *Citrobacter.sp*, 3/44(6,81%) sont des *Klebsiella.sp*, et enfin, 2/44(4,54%) sont des *Serratia.sp*.

8/44(18,18%) des souches isolées présentent un diamètre de zone d'inhibition supérieur à 5mm à l'acide boronique, donc sont probablement productrices de carbapénèmase de type KPC, 29/44(65,91%) des souches présentent un diamètre de zone d'inhibition supérieur à 5mm à l'EDTA, donc sont probablement des MBL, 15/44(34,09%) des souches présentent un diamètre de zone d'inhibition supérieur à 5mm à la Cloxacilline, elles sont probablement des AmpC, 7/44(15,91%) des souches ont été sensibles aux trois inhibiteurs, mais le Hodge test modifié été positif, donc la résistance peut être due a la production d'OXA. Dans, une étude effectuée par **Oliveira et Van Der Sand en 2016**, 40/62(64,52%) des souches sont positives à ce test, ce taux est inférieur à celui qu'on a trouvé(95,65%), et 29/40(72,5%) des souches isolées sont *Klebsiella .sp* qui est un taux supérieur à celui qu'on a obtenu, alors que 1/40(2,5%) est une *E .coli* qui est un taux très faible en le comparant à celui qu'on a obtenu. 10/40(25%) des souches isolées sont des *Enterobacter.sp*, qui est un taux un peu supérieur à celui qu'on a trouvé. 25/40(62,55%) des souches sont productrices de carbapénèmases de type KPC, ce taux est largement supérieur à celui trouvé dans notre étude, 8/40(20%) des souches sont productrices de MBL, ce taux est inférieur à celui qu'on trouvé, et enfin 2/40(5%) des souches produisent une AmpC , qui est un taux inférieur à celui qu'on a obtenu(**Oliveira et Van Der Sand, 2016**).

Dans une autre étude effectuée par **Amador et ses collaborateurs en 2015**, sur la résistance aux antibiotiques dans les eaux usées, où un taux de 48,4% des souches étaient productrices d'une AmpC, ce taux est supérieur à celui de notre étude (**Amador et al., 2015**).

Dans une autre étude sur l'abondance des gènes de résistances aux antibiotiques dans la rivière d'Almendar, **Graham et ses collaborateurs en 2011**, ont détecté les gènes *bla*-OXA et *bla*-TEM tout au long de la rivière montrant la relation qui existe entre les activités anthropogéniques et la dissémination des gènes de résistance (**Graham et al., 2011**).

L'étude effectuée par **Zurfluh et ses collaborateurs en 2013**, sur la caractérisation des BLSE et les carbapénèmases produites par les entérobactéries isolées à partir des Rivières des Lacs en Suisse, parmi les 58 rivières analysées, une souche de *Klebsiella pneumoniae* productrice d'une carbapénèmase de type KPC, et l'autre de type VIM, ont été rapportées (**Zurfluh et al., 2013**).



# CONCLUSION

Au cours de cette étude, nous avons étudié les phénotypes de résistance aux carbapénèmes des entérobactéries isolées à partir d'Oued Soummam de la wilaya de Bejaia.

Sur les 38 prélèvements effectués, 125 souches de bacilles à Gram négatif ont été isolées, parmi lesquelles 46 souches sont identifiées comme étant des entérobactéries, réparties comme suit : 22 souches de *E.coli*, 11 souches d'*Enterobacter.sp*, 4 souches de *Hafnia alvei*, 4 souches de *Citrobacter.sp*, 3 souches de *Klebsiella.sp*, et 2 souches de *Serratia .sp*.

Le résultat des tests des inhibiteurs, le Hodge test modifié, et le Carba NP-test modifié montrent que 7/46 des souches sont probablement productrices d'OXA, 8/46 des souches sont productrices de KPC, 15/46 des souches sont productrices d'AmpC, et 29/46 des souches sont productrices de MBL.

L'émergence des souches d'entérobactéries productrices de carbapénémases en particulier *E. coli*, qui est un germe commensal majeur du tube digestif de l'Homme constitue un enjeu de santé public. En effet, parmi les  $\beta$ -lactamases, les MBL sont les plus craintes à cause de leur capacité d'hydrolyser presque toutes les  $\beta$ -lactamines y compris les carbapénèmes, les souches productrices de cette enzyme sont souvent résistantes aux aminoglycosides et les fluoroquinolones.

La propagation de carbapénémases dans les eaux de surface en particulier dans les rivières est très inquiétante, car cela peut causer un déséquilibre écologique menant à la dominance des bactéries résistantes et à la perturbation globale des écosystèmes, de ce fait des mesures appropriées doivent de toute urgence être appliquées afin de réduire la charge anthropique de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement aquatique tels que l'utilisation rationnelle des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire, ainsi qu'en agriculture.

En perspectives, les résultats obtenus au cours de notre étude restent préliminaires et méritent d'être exploités et complétés par :

- Détermination de l'évolution de la contamination des eaux de surface dans le temps.
- L'élargissement de l'étude sur toute la flore environnementale pour inclure les bactéries Gram positif et la flore autochtone.
- La quantification des résidus d'antibiotiques dans l'environnement aquatique, ainsi les antibactériens.

- La réalisation d'autres tests phénotypiques comme la conjugaison.
- La détermination des mécanismes de la résistance aux antibiotiques par des techniques de biologie moléculaire qui confirmeront les phénotypes de résistance probables.



## Références Bibliographiques

## Références bibliographiques

---

### A

Agwu OA et Oluwagunke TO. (2014).Pattern of multiple antibiotics resistance among surface water Escherichia coli.Advance in Life Science, 4(5):213-219.

Allen HK , Donato J, Huimi Wang H, Karen A, Claud-Hansen KA,Dovies J et Handelsman J.(2010).Call of wild:Antibiotic resistance genes in natural environment.Microbiologie.8,251-259.

Alouache S, Kada M, Messai Y, Estepa V, Torres C ,et Bakour R.(2012).Resistance aux antibiotiques et à spectre étendu des  $\beta$ -lactamases à des bactéries isolées à partir de l'eau de mer des plages d'Alger(Algérie). Microbiology environment.27(1) :80-86.

Amador PP, Fernandes RM, Prudêncio MC, Barreto MP et Duarte IM. (2015).La résistance aux antibiotiques dans les eaux usées:presence et le sort des d'enterobacteries producteurs de classe A et de classe C  $\beta$ -lactamases .Environnement Science Santé.50(1) :26-39.

Armand-Lefèvre L, Andermont A, Grall N. (2011) .Resistance aux carbapénèmes :vers une nouvelle impasse ? Journal des anti-infectieux, 16 .

Aubron C, Poirel L, Ash RJ, et Nordman P.(2005).Carbapénèmase-producing Enterobacteriaceae ,U.S. Rivers.Emerg Infect Dis.11(2):260-264.

### B

Baba Ahmed-kazi Tani Z, Arlet G. (2014).Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles Gram négatif en Algérie. Pat hologie Biologie, 62 .169-170.

Bakour S, Garcia V, Loucif L, Brunel J-M, Gharout-Sait A, Touati A, Rolain M J.(2010).Rapid identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae,Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii using a modified Carba NP test.New Technologies for infectious and tropical diseases.7,89-93.

Benhamiche N. (1997). Modélisation de la relation pluie-relief en vue de la cartographie par Krigeage : cas du bassin versant de la Soummam. Thèse de Magister en Science Agro .Opt Aménagementet mise en valeur .INA, Alger, 158P.

## Références bibliographiques

---

Bennabi MH. (1989). Contribution A L'étude Hydrogéologique de la vallée de l'Oued Sahel-Soummam (Algérie). Thèse pour obtenir le titre de Docteur de 3<sup>ème</sup> cycle de Géologie Appliquée, option Hydrogéologie. Université Scientifique et Médicale De GRENOBLE.

Birgy A, Bidet P, Genel N, Doit C, Decré D, Arlet G, et Bingen E. (2012). Phenotypic Screening of Carbapenemases and Associated  $\beta$ -lactamases in Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology* P.1295-1302.

### C

CA- SFM . (2015). Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

Cattoir V, Poirel L, Mazel D, Soussy C-J, et Nordmann P. (2007). *Vibrio splendidus* as the source of plasmid-mediated QnrS-like quinolone resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 2650–2651.

Chandrasekaran S, Venkatesh B, et Lalitakumari D. (1998). Transfer and expression of multiple antibiotic resistance plasmid in marine bacteria. *Curr Microbiol* 37(5):347-351.

Chen B, Zheng W, Yu Y, Huang W, Zheng S, Zhang Y, Guan X, Zhuang Y, Chen N, Topp E. (2011). Integrons de class 1, les genes de virulence sélectionnés et la résistance aux antibiotiques dans *Escherichia coli* isolé de la rivière Minjiang, province du Fujian, en Chine. *Applied Environment Microbiology*. 77, 148-155.

Costigliani S, Bagnati R, Calamari D, Fanelli R, et Zuccato E. (2005). A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and HPLC-MS to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. *J Chromatogr. A* 1092 206-215.

Covallo C, Bonnet R, Fobre R, Jehl F, Rapp C, et Carrabe E, (2004).  $\beta$ -lactam antibiotics. *EMC. Maladies infectieuses* . 1, 129- 202 .

### D

Diab AM, Al-Turk IM, Ibrahim MK, et Al-Zahrani KD. (2008). Tracing of Gram-negative antibiotic resistant bacteria in hospitals final effluent at Al-Madina Al Mounawwarah. *Journal of Taibah University for Science*. 1, 23-34.

## Références bibliographiques

---

Dioz-Cruz MS, Lopez de Aldo MJ, et Barcelo D ,(2003).Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sedements and sludge ,Trends Anal. Chem . 22. 340-351.

### *F*

Frédéric Robin, Lucie Gibold et Richard Bonnet. (2012).Résistances naturelles et aquises aux  $\beta$ -lactamines chez les enterobacteries : Comment les identifier en pratique quotidienne ?.Revue Francophone des Laboratoires. N°455: 47-57.

### *G*

Garcia N, Moreno J, Cartmell E, Rodriguez-Roda I et Judd S.(2013).The application of microfiltration-reverse osmosis/ nanafiltration to trace organics removal for municipal wastewater reuse .Environmental Technology.34(24):3183-3189.

Haut conseil de la santé publique, (juillet,2013) ,France .Prévention de la transmission croisée des bactéries Hautement résistantes aux antibiotiques émergentes, GNPIN.

Girlich D, Poirel L, et Nordman p.(2020).Roman Class Ambler A $\beta$ -lactamases of carbapenems hydrolyse in pseudomonas fluorescens isolats from Seine,Paris,France.Antimicrobial Agents Chemother.54:328-332.

Graham DW, Olivares-Rieumont S,Knapp WC, Lima L, Werner D et Bowen E.(2011).Antibiotic resistance gene abundances associated with waste discharge to the Almendares River near Havana,Cuba.

### *H*

Hodge W, Ciak J, Tramont E.C.(1978).Simple method for detection of penicillinase-producing *N.gonorrhoeae*.Journal of clinical Microbiology.7,102-103.

Holder –Franclin MA, 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.

## Références bibliographiques

---

Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R, Philippon A.(2002). $\beta$ -lactamase of *Kluyvera ascorbata* ,probable progenitors of some plasmide-encoded CTX-M types .Antimicrob.Agent Chemoter.46,40 38-4040 .

Olga H, Danielle C. Ezzo,Tomas. Z.Jodlowsk. (2008) .Doripeneme (Doribox), a new carbapenem antibacterial agent .A peer- Reviewed journal for managed care and hospital formulary managemen. PT. 2008 Mar; 33 (3): 134 – 136, 180.

### **J**

James A, Maude C- B-C , Catherine M , Gilles B . (2009). Contamination des milieux aquatiques par les substances pharmacocinétiques et cosmétiques. Direction centre de Nantes , Département Biogéochimiques et Eco toxicologies . Cellule ARC. Analyse des risques chimiques en milieu marin. P : 2.

Jeon JH., Lee JH., Lee JJ, Park KS, Karim AM., Lee CR., Jeong BC., Lee SH.( 2015). Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. Int. J. Mol. Sci. 16(5), 9654-9692.

Joyeux M. (2006).Résidus médicamenteux et risque sanitaire d'origine hydrique. Vol 5 ; N° 4.

### **K**

Kummerer K,Henninger A.(2003).Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluents.Clin .Microbiol.Infec.9,1203-1214.

Kummerer K. (2004).Resistance in the environment.J.Antimicrob. Chemother. 54, 311- 320 10 . 1093 / jac/dkh 325.

### **L**

Lee EH, Nicolas MH, Kitzis MD, Pialoux G, Collatz E et Gutman L. (1991). Association de deux mécanismes de résistance dans un isolat Clinique de *Enterobacter cloacae* avec haut niveau de résistance a l'imipénème .Antimicrob Agents Chemother . 35 : 1093-8.

Lee K, Kim C.K, Yong D, Jeong.S.H,Yum.J.H,Seo.Y.H,Docquier.J.D,Chong.Y.(2010). Improved performance of the modified Hodge test with MacConkey agar for screening

## Références bibliographiques

---

carbapenemases producing Gram negative bacilli. *Journal of Microbiological methods* 83,149-152.

Lupo A, Coyne S, et Bernadonk TU. (2012). Origin and evolution of antibiotic resistance :the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. *From. Microbiol.* 18:1-13.

Armand-Lefèvre L, Andremont A, Grall N .(2011). Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse ? *Journal des anti-infectieux* (2011). – 16.

Laurence D.R, Vincent J. (2014) .Bactériemulti résistante dans l'eau : Modèles des entérobactéries productrices de bêta-lactamase à spectre étendu .*Micro-organismes pathogène dans l'eau .Revue Francophone des Laboratoires Mars 2014 .460 P (77-78)*

### *M*

Marti E , Variatza E et Balcozar JL. (2013). The role of aquatic ecosystems as reservoirs of Antibiotic resistance .*Trends in Microbiology*. January 2014, Vol.22, No.1 .

### *N*

Nordmann P,et Carrer A(2010).Resistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif .*Medecines /Sciences.*26(11) ,950-959 .

Nordmann P , Naas T, et Poirel L .(2011).Global Spread of carbapénèmase-producing Enterobacteriaceae .*Emerg Infection Dis.*17:1791-1798.

### *O*

Oliveira DV, Sueli Van Der Sand T.(2016).Phenotypic tests for detection of  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolated from different environments.*Curr Microbiol DOI 10.1007/s00284-016-1036-6.*

### *P*

Poirel L, Potron A et Nordman P. (2012). OXA-48 comme carbapénamase : La menace fantôme. *Journal Antimicrobial Chemother.* 67 :1597-1606.

Poirel L, Rodriguez-Martinez J-M., Mammeri H., Liard A, et Nordmann P. (2005).

## Références bibliographiques

---

Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 3523–3525.

### **R**

Rodriguez MM, Power P, Radice M, Vay C, Famiglietti A Galleni M, Ayala JA, et Gabriel Gutkind. (2004). Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata* : a possible origin of plasmid-born CTX-M-1 derived cefotaximases – *Antimicrob .Agents .Chemother .48,4895 – 48 97.*

### **S**

Schluter A, et Szczepanowski R. (2007). Genomics of Inc p-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool. *Microbial. Rev – 31, 449 – 477.*

Sougakoff W et Trystram D. (2003). Résistance aux  $\beta$ -lactamines, université Pierre et Marie Curie, P :34 .

### **T**

Tacão M, Correia A, et Henrique I. (2012). Resistance to broad –spectrum antibiotics in aquatic systems: Anthropogenic Activities modulate the dissemination of bla<sub>ctx-m</sub> –like genes .*Appl Envir Microbiol, 78(12):4134-4140.*

Tahrani L ; Soufi L , Mehri I , Najjari A , Hassen A , Van Loco J , Reyns T , Cherif A , ben Mansour H.(2015) . Isolation and characterization of antibiotic-resistant bacteria from pharmaceutical industrial waste waters .*Microbpathog (2015) Dee : 4;89 :54 -61 . E pub 2015 sep4.*

### **W**

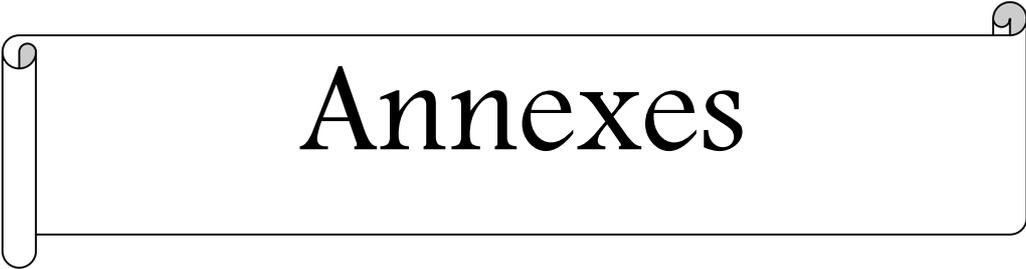
Wolf M, Joly-Guillou M-L, Pajot O. (2009). Les carbapenemes .*Reanimation (2009) 18, S 199-S208.*

### Z

Zenati K ,Touati A, Bakour S ,Sahli F ,Rolain JM .(2016) .Caractérisation of NDM-1- and OXA-23- producing *Acinetobacterbaumannii* isolates from inanimate surfaces in hospital environment in Algeria . J Hospinfect 2016 Jan; 92(1):19-26.

Zuccato E, Castiglioni S , Bagnati R , Melis M ,et Fanelli R . (2010). Source , occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment. Journal of Hazardous Materials 179 (2010) 1042 -1048.

Zurfluh K, Hachler H, Nuesch-Inderbinen M et Stephan R.(2013).Characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and Carbapenemase –producing Enterobacteriaceae isolates from Rivers and Laks in switzerland.Appl Environ Microbiol.79(9): 3021-3026.



# Annexes

## Annexe I

Tableau d'identification des souches par des tests biochimiques.

	Glucose	Lactose	Gaz	H <sub>2</sub> S	Indole à 37C°	Indole à 44C°	Uréase	TDA	VP	RM	NR	C.S	Man	Mobilité
<i>E.coli</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+
<i>Citrobacter sp</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>K.oxytoca</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-
<i>Hafnia alvei</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	d	-	+	d	+	d
<i>Serratia sp</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	d	-	+	+	+	+
<i>Enterobacter SP</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+

d : Variable.

## Annexe II

Liste des ATB testés.

Famille	Antibiotique	Symboles	Charge µg	Diamètres critiques(mm)	
				S≥	R<
Amino- pincillines	Amoxicilline+acide clavulanique	AMC	30	19	19
C3G	Céftazidime	CAZ	30	21	19
	Céfotaxime	CTX	30	26	23
C2G	Céfoxitine	CX	30	19	15
Carbapénèmes	Imipenème	IMP	10	22	16
	Méropénème	MEM	10	22	16

## Annexe IV

### Composition des milieux de culture (g/l'eau utilisée)

#### Gélose Mac Conkey (pH 7.4)

• Peptone .....	20
• Lactose .....	10
• Sels biliaires .....	0.072
• Chlorure de sodium .....	05
• Agar .....	12

#### Gélose Muller Hinton (pH 7.4)

• Infusion de viande de bœuf .....	300
• Hydrolysate de caséine.....	17.5
• Amidon.....	1.5
• Agar.....	17

#### Gélose TSI (pH 7)

• Extrait de viande de bœuf.....	03
• Extrait de levure .....	03
• Peptone trypsine .....	20
• Chlorure de sodium .....	05
• Citrate ferrique .....	0.3
• Thiosulfate de sodium .....	0.3
• Lactose .....	10
• Glucose.....	01
• Saccharose .....	10
• Rouge de phénol.....	0.05
• Agar.....	12

#### Milieu de citrate de Simmons (pH 7)

• Infusion de sodium .....	02
• Chlorure e sodium .....	05
• Sulfate de magnésium .....	0.2
• Phosphate mono ammoniacque.....	01
• Phosphate bi potassique.....	01
• Bleu de bromothymol.....	0.08
• Agar .....	15

### **Mannitol mobilité (pH 7.6-7.8)**

• Peptone trypsine de viande.....	02
• Agar.....	04
• Mannitol.....	02
• KNO <sub>3</sub> .....	01
• Rouge de phénol à 1%.....	04 ml

### **Milieu VRBL (pH= 7,4)**

• Peptone.....	7
• Extrait de levure.....	3
• Lactose.....	10
• Chlorure de sodium.....	3
• Mélange sel biliaire.....	1.5
• Cristal violet.....	0.002
• Rouge neutre.....	0.03
• Agar-agar.....	15

### **GN (pH= 7)**

• Peptone.....	06
• Extrait de bœuf.....	01
• Extrait de levure.....	2.5
• Chlorure de sodium.....	05
• Agar.....	14

### **Milieu Clark-lubs (pH= 7)**

• Peptone trypsine de viande.....	05
• Phosphate bi potassique.....	05
• Glucose.....	06

### **Bouillon nutritif (pH=7.7)**

• Macération de viande.....	01
• Peptone trypsine.....	15
• NaCl.....	05

**Bouillon Nitraté (pH= 7)**

- Infusion cerveau-cœur .....25
- Nitrate de potassium .....10

**Milieu Urée-Indole (pH 7)**

- Urée .....2
- L-Tryptophane .....0.3
- Chlorure de sodium .....0.5
- Dihydrogénophosphate de potassium .....0.1
- Rouge de phénol .....0.0025

**EPEI (pH = 7.2)**

- Peptone exempte d'indole .....10
- Chlorure de sodium .....5

## ANNEXE V

### Réactifs utilisés

#### Réactifs de Kovacs

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

#### Réactif de TDA

- Solution 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)

- Alpha-naphtol ..... 6g
- Alcool éthylique à 90% ..... 100mL

#### Réactif de voges-proskauer(VPII)

- NaOH 4N

#### Réactifs de Griess I (NRI)

- Acide parasulfanilique ..... 8g
- Acide acétique 5N ..... 1L

#### Réactifs de Griess II (NRII)

- Alpha -naphtylamine ..... 6g
- Acide acétique 5N ..... 1L

## Résumé

Les rivières sont des écosystèmes aquatiques profondément perturbés par les activités humaines, en effet ils sont les récepteurs principaux des effluents hospitaliers, des rejets municipaux, des métaux lourds, et des décharges publiques, ce qui les rend des réservoirs idéals à l'émergence et la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques.

Sur les 38 prélèvements effectués, 125 souches de bacilles à Gram négatif ont été isolées à partir d'Oued Soummam, 46 souches appartiennent à la famille des entérobactéries. La sensibilité de ces souches aux antibiotiques a été détectée par l'antibiogramme standard, qui a révélé que 97,83% des souches sont résistantes à l'AMC et au MER, 86,96%, 52,17%, 26,09%, 21,74% sont des souches résistantes à l'IMP, CX, CAZ, CTX respectivement. La production de carbapénèmases a été détectée par le Hodge test modifié et le Carba NP-test, et confirmée par le test des inhibiteurs, ce test a révélé que 29/46 des souches sont productrices de MBL, 8/46 des souches sont productrices de carbapénémase de type KPC, et 7/46 des souches sont probablement productrices d'OXA.

Cette étude a montré la présence des souches d'entérobactéries productrices de carbapénèmases dans les eaux de l'environnement et a mis en évidence le rôle potentiel des milieux aquatiques comme réservoirs de bactéries résistantes aux antibiotiques utilisés en dernier recours dans le clinique, avec un potentiel de propagation dans d'autres environnements.

**Mots clé :** Oued Soummam, BGN, carbapénèmes, résistance, carbapénèmases.

## Abstract

Rivers are aquatic ecosystems deeply disturbed by human's activity, in fact, they are the main receivers of hospital wastewater, municipal discharges, heavy metals and landfills, which make them ideal tanks to the emergence and spread of antibiotic resistance genes.

Among of the 38 samples carried out; 125 Gram negative bacilli strains were isolated from Soummam wadi, 46 strains belong to the *enterobacteriaceae* family.

The sensitivity of these strains to antibiotics has been detected by standard antibiogram which revealed that 97,83% of the strains are resistant to AMC and MER, 86,96%, 52,17%, 26,09%, 21,74% are resistant to : IMP, CX, CAZ, CTX respectively. Carbapenemases production is detected by modified Hodge test and Carba NP test and confirmed by inhibitors test. This last, revealed that 29/46 of strains produced MBL, 8/46 strains produced KPC, and 7/46 strain produced OXA.

This study showed the presence of carbapenemase producing Enterobacteriaceae in water environments and highlighted the potential role of aquatic environments as reservoirs of clinically relevant antimicrobial-resistant bacteria, with the potential to spread throughout the community.

**Key words:** Soummam wadi, GNB, carbapenems, resistance, carbapenemases.