

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université A. MIRA – BEJAIA

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés



En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER 2

En Génie des Procédés

Option : Science et technologie des médicaments

Thème

Recherche des résidus d'antibiotiques et des souches bactériennes multi résistantes dans les milieux aquatiques

Etudiants

MALEK Dahbia

LATRECHE Yamina

Devant le jury composé de :

Mr A. TOUATI Professeur Encadreur

Mm F. BOUCHAL

MCB

Présidente

Mr K. BENDJEDOU

MCA

Examineur

Promotion 2016-2017

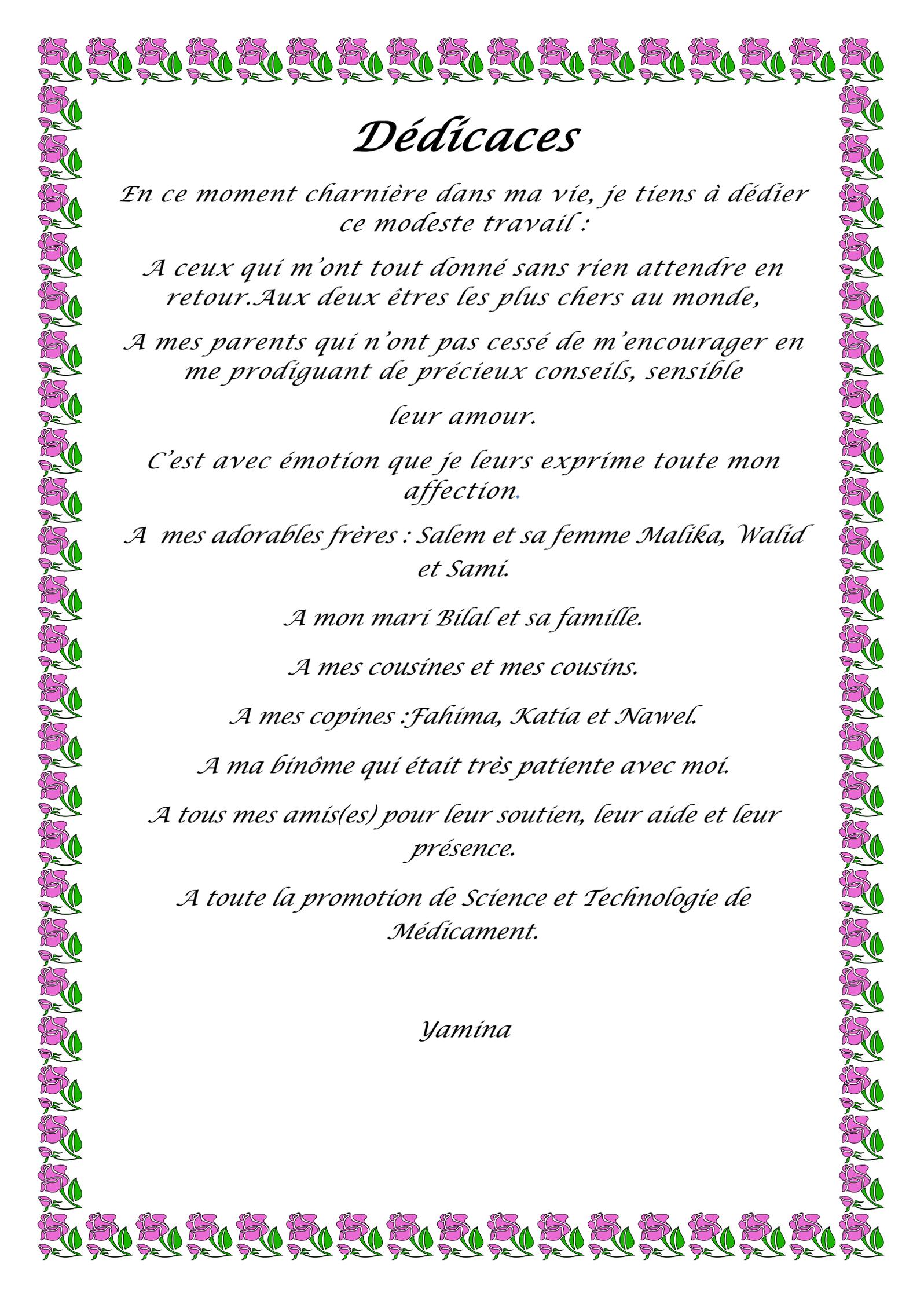


Remerciements

*Nous tenons à remercier notre promoteur le
Pr A.TOUATI*

Ainsi que notre Co-promotrice Melle MAIRI

*Nous remercions les membres du jury pour avoir
accepté d'examiner ce travail*



Dédicaces

*En ce moment charnière dans ma vie, je tiens à dédier
ce modeste travail :*

*A ceux qui m'ont tout donné sans rien attendre en
retour. Aux deux êtres les plus chers au monde,*

*A mes parents qui n'ont pas cessé de m'encourager en
me prodiguant de précieux conseils, sensible*

leur amour.

*C'est avec émotion que je leurs exprime toute mon
affection.*

*A mes adorables frères : Salem et sa femme Malika, Walid
et Sami.*

A mon mari Bilal et sa famille.

A mes cousines et mes cousins.

A mes copines : Fahima, Katia et Nawel.

A ma binôme qui était très patiente avec moi.

*A tous mes amis(es) pour leur soutien, leur aide et leur
présence.*

*A toute la promotion de Science et Technologie de
Médicament.*

Yamina

Dédicaces

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude et l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est tout simplement que : je dédie ce mémoire de fin d'études à :

Mes très chers parents, vous représentez pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui ne cesse pas de m'encourager.

A mes chers frères : Khâled, Nacer et sa femme bahia, Idir et sa femme karima, Rafik et sa femme hamida, Mahmoud, Abdelhak et mon petit frère Hillal.

A mes très chères sœurs : Lila et Djamila et leurs petites familles

A mes deux petite chers neveux Sara et Aya

A mes oncles et leurs familles.

A toute la famille « MALEK »

A tout mes amis(es) pour leur soutien, leur aide et leur présence.

A toute la promotion de Science et Technologie de Médicament

A mon promoteur Pr A.TOUATI

A mon Co-promoteur M^{lle} MAJRI

A ma binôme M^{lle} LATRECHE Yamina

A tous les membres de ma promotion

A tous mes enseignants depuis mes premières années d'études.

A tous ceux qui me sont chers et que j'ai omis de citer.

DAHBLIA

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction général 1

Synthèse bibliographique

I. Définitions des antibiotiques 3

II. Mode d'action des antibiotiques 3

II.1 Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne..... 3

II.1.1 Les β -lactamines 4

II.1.2. Les Fosfomycines 4

II.1.3 Les glycopeptides 4

II.2 Les antibiotiques inhibant la synthèse protéique 5

II.2.1 Les aminosides (ou aminoglycosides) 5

II.2.2 Les phénicolés 6

II.2.3 Les macrolides 6

II.2.4 Les tétracyclines 6

II.2.5 Les oxazolidones 7

II.3. Les antibiotiques actifs sur les acides nucléiques..... 7

II.3.1. Les quinolones 7

II.3.2. Les nitroimidazol 8

II.3.3 Les rifamycines..... 8

II.4. Les antibiotiques agissant sur la membrane 8

II.5. Les antibiotiques agissant sur le métabolisme..... 9

II.5.1. Les sulfamides 9

II.5.2. Le trimétoprime 9

III. Mécanisme de résistance aux antibiotiques	9
III.1 Définition de la résistance.....	9
III.1.1 Résistance naturelle.....	10
III.1.2 Résistance acquise.....	10
III.2 Mécanisme de résistance aux B-lactamines.....	10
III.2.1 Modification de l'affinité de la cible.....	10
III.2.2. Mécanisme d'imperméabilité.....	10
III.2.3 Mécanisme d'efflux	10
III.2.4 Mécanisme enzymatique.....	11
IV. Les β-lactamases	11
V. Classification des β-lactamases	11
VI. Les Carbapénèmases	13
VII. Les résidus d'antibiotiques dans les milieux aquatiques	14

Etude expérimentale

Matériel et méthodes

I. Prélèvements	17
II. Recherche des entérobactéries productrices de carbapénémase	18
II.1 Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques.....	18
II.2 Recherche de la production d'une carbapénémase.....	19
II.3 Recherche de la production d'une β -lactamase à Spectre Etendu par le DD-test.	20
III. Recherche des résidus d'antibiotiques	21

Résultats

I. Souches d'entérobactéries productrices de carbapénémase (EPC)	22
II. Sensibilité des souches aux antibiotiques.....	23
III. Résidus d'antibiotiques.....	25
Discussion et conclusion	26

Références bibliographique

Annexes

LISTES D'ABREVIATION

AC : Acide clavolanique

ADN : Acide désoxyribonucléique

AK :Amikacine

AMC :amoxicilline

ARN : Acide ribonucléique

ATCC: American Type Culture Collection

ATM :Aztréonam

BLSE : β -lactamases à spectre étendu

CAZ :Céftazidime

CIP :Ciprofloxacine

CTX :Céfotaxime

D-ala :D-alanine

DD-test :Double Disc synergie test

E. coli : *Escherichia coli*

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

EDTA: Ethylene Diamine Tetra-Acetate

EPC : Entérobactéries productrices de carbapénèmases

FOX : Céfoxitine

I : Intermédiaire

IMP: Imipénème

KPC :*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

MAC : Mac Conkey

MEM: Méropénème

MH : Muller Hinton

NDM: New Delhi Metallo- β -lactamases

PABA : Acide para-amino-benzoïque

PLP : Protéine liant la pénicilline

R : Résistant

RIF: Rifampicine

S: Sensible

STEP: Station d'épuration

SXT : Co-trimoxazole

TE : Tétracycline

TSB : Tryptic Soy Broth

Liste des figures

N° de figure	Liste des figures	page
1	Structure des bêta-lactamines	4
2	Structure de la Fosfomycines	4
3	Structure de la vancomycine	5
4	Structure de la tobramycine	5
5	Structure du chloramphénicole	6
6	structure des macrolides	6
7	Structure de la tétracycline	7
8	structure du linézolide	7
9	Structure des quinolones	7
10	Structure du nitoimidazoles	8
11	Structure des rifamycines	8
12	Structure des sulfamides	9
13	Structure du triméthoprim	9
14	Réaction d'hydrolyse du noyau bêta-lactame par une bêta-lactamase	11
15	Interactions entre les différents compartiments au sein de l'environnement	16
16	Test de Hodge	20
17	Test de synergie	20
18	Test de détection des résidus d'antibiotiques	21
19	Taux de résistance des souches EPC aux β -lactamines	24
20	Taux de résistance des souches EPC aux autres familles d'antibiotiques	24
21	Indice de multi-résistance calculé pour les 09 souches d'EPC	25

Liste des tableaux

N° de tableau	Titre du tableau	page
I	Classification des β -lactamases	12
II	Nombre d'échantillons par type d'eau, prélevés dans les trois wilaya	17
III	Antibiotiques testés et étude de la sensibilité des souches	19
IV	Répartition des souches d'EPC obtenue	22
V	Résultats de la sensibilité des neuf souches d'EPC aux antibiotiques	23

Introduction

Introduction général

La découverte des antibiotiques par Alexander Fleming en 1928 est l'une des plus grandes avancées en science médicale. Ils présentent probablement la famille la plus réussie des médicaments développés pour traiter et empêcher les infections bactériennes humaines. En plus de cet usage, les antibiotiques ont également été utilisés pour prévenir et traiter les animaux et les plantes ainsi que pour promouvoir la croissance des animaux dans les élevages (Martinez, 2009).

Les antibiotiques diversifiés dans l'environnement, via les activités humaines ont conduit à l'émergence et à la diffusion de bactéries résistantes dans le milieu aquatique (Chang et al., 2010). Les gènes codant cette résistance peuvent par la suite atteindre les pathogènes de l'Homme par la chaîne alimentaire via une contamination accrue de l'eau potable (souterraine et surface), eau traitée et recyclée utilisée pour l'irrigation (Kummer, 2004).

Ces dernières années, l'attention croissante a été prêtée à la présence de bactéries résistantes dans l'environnement aquatique tels que les eaux usées, les eaux de surfaces et les eaux souterraines, y compris les effluents hospitaliers (Focazio et al., 2008). Ces derniers ont la pire impact sur l'écosystème aquatique, principalement en fonction de leur potentiel de bioaccumulation de différentes molécules (Jean et al., 2012). La faible efficacité du traitement des eaux usées hospitalières, peut contribuer à la diffusion des bactéries résistantes et multi-résistantes de l'hôpital à l'environnement (Chagas et al., 2011).

La présence des bactéries résistantes et de gènes de résistance dans les milieux aquatiques peut constituer un danger pour la santé publique puisqu'elle constitue un facteur de risque pour leur diffusion. Ces milieux sont considérés comme un réservoir de diffusion des déterminants de la résistance aux antibiotiques, puisque des gènes de résistance et des éléments génétiques mobiles portant les déterminants de la résistance ont été isolés fréquemment de communautés bactériennes isolées dans les lacs, les rivières ou les eaux usées urbaines ainsi dans les effluents hospitaliers (S. Børjesson et al., 2009)

On parle d'antibiorésistance lorsque certaines bactéries ne sont ni tuées ni inhibées par les doses d'antibiotiques administrées, Ce sont bien les bactéries, hébergées par l'Homme ou l'animal, qui peuvent devenir résistantes à un traitement antibiotique et en conséquence, rendre le traitement de leur hôte inefficace. Toute utilisation d'antibiotique engendre un effet de sélection de bactéries résistantes et crée une pression favorable à leur développement. Ces bactéries vont persister, se multiplier et devenir prépondérantes (El-Ashamawy et al., 2016).

Introduction général

Des inquiétudes ont été soulevées concernant la présence de résidus d'antibiotiques et de bactéries résistantes dans les effluents hospitaliers. Ces derniers, peuvent se retrouver dans l'environnement aquatique et dans le sol ce qui implique des problèmes de santé publique ultérieures et un effet sur le développement de la résistance bactérienne (Diwan et al., 2010). La persistance des antibiotiques dans les rejets et leur présence à long terme dans l'environnement pourrait constituer une certaine menace dans l'écosystème aquatique (Tao et al., 2010).

Les résidus d'antibiotiques peuvent être retrouvés dans les effluents des eaux usées, en particulier dans les endroits où ces médicaments sont largement utilisés, comme les hôpitaux, et les usines de production pharmaceutiques (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). Environ 30 à 90% des doses administrées de tous les antibiotiques consommés par les êtres humains et les animaux sont rejetées sous forme de substances actives (Alighardashi et al., 2008).

Lentement mais sûrement, les eaux de nos lacs et de nos rivières, tout comme les nappes souterraines, se chargent petit à petit en antibiotiques ainsi qu'en bactéries multi-résistantes. Alors que la résistance aux antibiotiques est devenue une menace réelle, nous avons entrepris cette étude afin de faire le point sur la prévalence de la résistance aux antibiotiques chez des souches d'entérobactéries isolées à partir de différents types d'eau ainsi que la recherche de résidus d'antibiotiques dans ces milieux aquatiques.

Pour cela nous avons adopté la méthodologie suivante :

- Recherche des résidus d'antibiotiques
- Isolement et identification des souches à partir des différents prélèvements recueillis
- Etude de la résistance des souches d'entérobactéries aux β -lactamines ainsi qu'à d'autres familles d'antibiotiques.

Synthèse
bibliographiques

I. Définitions des antibiotiques

Les antibiotiques sont des agents strictement antibactériens dont la toxicité sélective, résulte d'un mode d'action spécifique. Ils exercent un effet relativement lent et à faible concentration. Leur forte efficacité permet une utilisation *In vivo* par voie générale (Bosgiraud 2003). Les antibiotiques ont une origine naturelle s'ils sont extraits d'organismes vivants. Ils peuvent aussi être obtenus par synthèse chimique totale ou partielle. Chaque antibiotique possède un mode d'action spécifique et une cible bien déterminée. En fonction de leur concentration et du temps de contact avec les bactéries, ils peuvent être bactéricide ou bactériostatiques (Robert, 2000).

II. Mode d'action des antibiotiques

Le principe d'action des antibiotiques consiste à bloquer sélectivement une étape d'un mécanisme essentiel à la survie ou à la multiplication des micro-organismes. Le mécanisme ciblé par l'antibiotique est le plus souvent spécifique des bactéries et n'a pas d'équivalent chez les eucaryotes et en particulier chez l'Homme. Ainsi, idéalement, l'antibiotique tue ou bloque la multiplication des bactéries mais n'a pas d'impact sur les cellules du patient traité. Selon le mode d'action, les antibiotiques sont classés en 5 groupes (Yala et *al.*, 2001).

II.1 Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne

❖ La paroi bactérienne

La paroi bactérienne est une structure qui entoure la membrane cellulaire bien que n'étant pas présente chez toutes les espèces bactériennes, c'est une structure cellulaire très importante qui joue plusieurs rôles notamment dans le maintien de la forme de la cellule et dans la préservation de l'intégrité en contrant l'effet de la pression osmotique interne (Gangoue., 2007). Elle est constituée de peptidoglycane qui est un polymère réticulé composé d'unités répétitives d'acide N-acétylmuranique, et N-acétyl-glucosamine. Ces chaînes polysaccharidiques sont reliées entre-elles par de courtes chaînes tétrapeptidiques (Koren A et *al.*, 2006). Les précurseurs du peptidoglycane sont synthétisés dans le cytoplasme et assemblés à l'extérieur de la membrane cytoplasmique (Nauciel et Vildé, 2005).

II.1.1 Les β -lactamines

Les β -lactamines constituent une famille majeure d'antibiotiques très largement utilisés en clinique (Cattoir, 2008). Toutes les β -lactamines ont le même mécanisme d'action : elles bloquent la synthèse du peptidoglycane ou muréine. Ce blocage intervient par inhibition de certaines enzymes responsables de la transpeptidation, étape essentielle de la synthèse du peptidoglycane. Ces enzymes, appelées PLP (**P**rotéine **L**iant la **P**énicilline), sont insérées dans l'espace périplasmique de la bactérie (Cavallo et *al*, 2004).

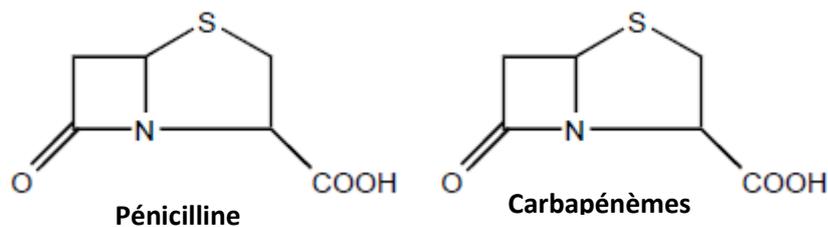


Figure 1 : Structure des Béta-lactamines

II.1.2. Fosfomycine

Elle inhibe l'enzyme impliquée dans la formation de l'acide N-acétyl-muramique, qui est l'un des précurseurs du peptidoglycane (Nauciel et Vildé, 2005).

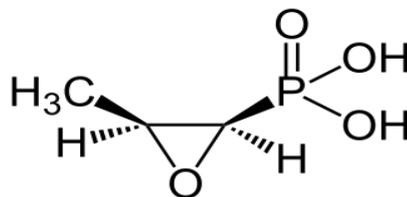


Figure 2 : Structure de la fosfomycines

II.1.3 Les glycopeptides

Ils se fixent de manière non covalente sur la partie D-Ala-D-Ala terminale des peptides impliqués dans la phase de polymérisation du peptidoglycane, de ce fait, la polymérisation est inhibée. Ce groupe comprend la vancomycine et la teicoplanine (Nauciel et Vildé, 2005).

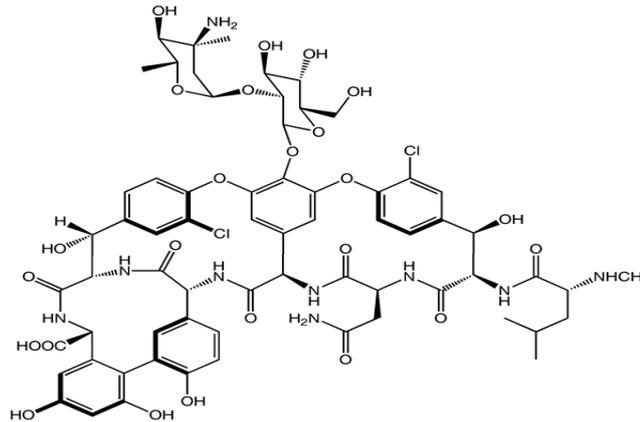


Figure 3 : Structure de la vancomycine

II.2 Les antibiotiques inhibant la synthèse protéique

La synthèse des protéines est un processus essentiel des cellules vivantes. L'acteur central de ce processus dans lequel l'ARN messager est traduit en protéine est le ribosome. Les détails du mécanisme de traduction et les ribosomes des bactéries sont sensiblement différents de ceux des eucaryotes. Il existe un grand nombre de molécules antibiotiques qui exploitent ces différences et sont capables de bloquer sélectivement la traduction des protéines chez les bactéries, mais pas chez l'Homme ou l'animal (Nauciel et Vildé, 2005).

II.2.1 Les aminosides (ou aminoglycosides)

Les aminosides agissent sur diverses fonctions (la réplication et le transport membranaire) mais leur effet principal vient de leur fixation à la sous unité 30S du ribosome où ils s'interfèrent avec la synthèse des protéines (Singleton, 2005).

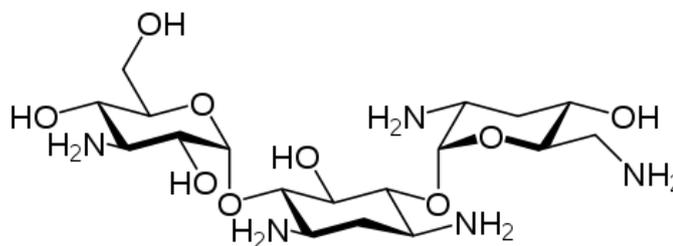


Figure 4 : Structure de la tobramycine

II.2.2 Les phénicolés

Le chloramphénicole a une action bactériostatique par inhibition de la synthèse protéique bactérienne due à l'inhibition de la peptidyltransférase, en se fixant sur la sous-unité 50S du ribosome bactérien (Cattoir, 2004).

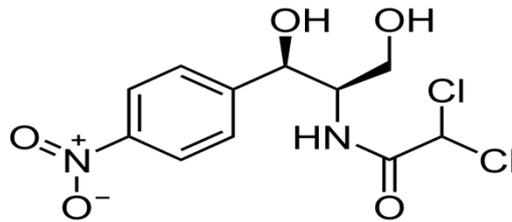


Figure 5 : Structure du chloramphénicole

II.2.3 Les macrolides

Les macrolides sont des antibiotiques macrocycliques qui inhibent la synthèse des protéines en se fixant à la sous unité ribosomique 50S. Et leur action est habituellement bactériostatique, provoquant une terminaison prématurée de la synthèse polypeptidique. Ils se lient à la peptidyltransférase et inhibent la transpeptidation, conduisant à la libération d'un polypeptide incomplet (Singleton, 2005)

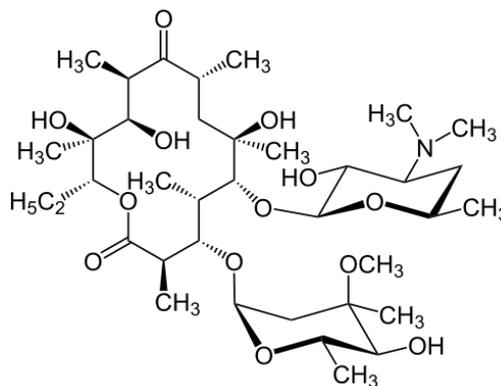


Figure 6 : Structure des macrolides

II.2.4 Les tétracyclines

Les tétracyclines inhibent la synthèse protéique bactérienne par la fixation réversible à la sous-unité 30S des ribosomes empêchant l'attachement des aminoacyl-ARNt au site A du ribosome (Yala et al., 2001)

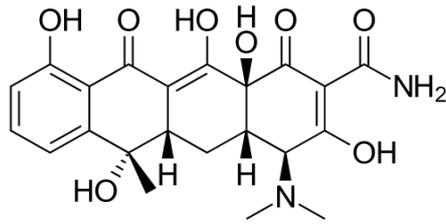


Figure 7 : Structure de la tétracycline

II.2.5 Les oxazolidones

Il agit d'une nouvelle classe d'agents antimicrobiens qui se fixe sur la sous unité ribosomale 50S et empêche sa liaison à la sous unité 30S (Nauciel et Vildé, 2005).

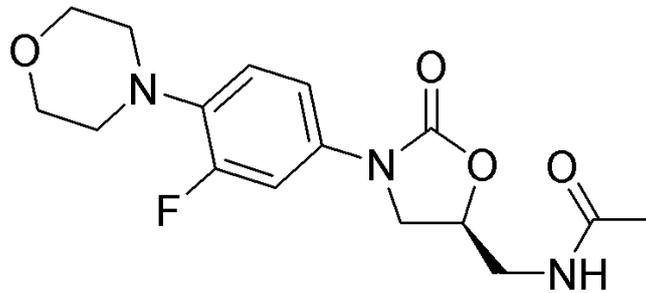


Figure 8 : Structure du linézolide

II.3. Les antibiotiques actifs sur les acides nucléiques

II.3.1. Les quinolones

Ils inhibent spécifiquement la synthèse d'ADN bactérien en agissant sur les topoisomérases de type II ainsi que la topoisomérase IV. Elles se fixent sur la sous-unité A de la gyrase (cible préférentielle des bactéries à Gram négatif) (Meradi et al, 2009)

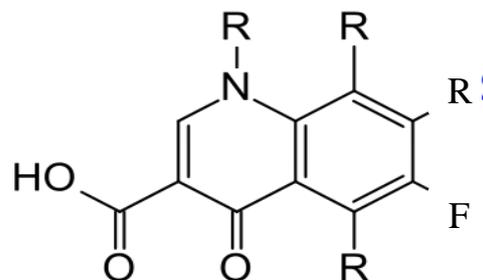


Figure 9 : Structure des quinolones

II.3.2. Les nitroimidazoles

Ces molécules sont utilisées initialement comme un antiparasitaire, libèrent dans les bactéries anaérobies des dérivées très réactives qui provoquent des cassures de l'ADN (Nauciel et Vildé, 2005).

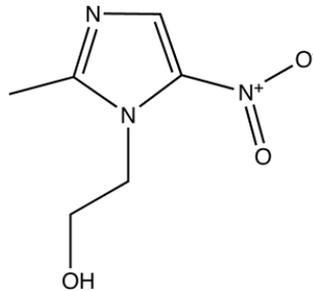


Figure 10 : Structure du nitroimidazole

II.3.3 Les Rifamycines

Elles inhibent l'ARN polymérase ADN-dépendante en se liant à leur cible de manière covalente. Il en résulte un arrêt de la synthèse des ARN messagers (Nauciel et Vildé, 2005).

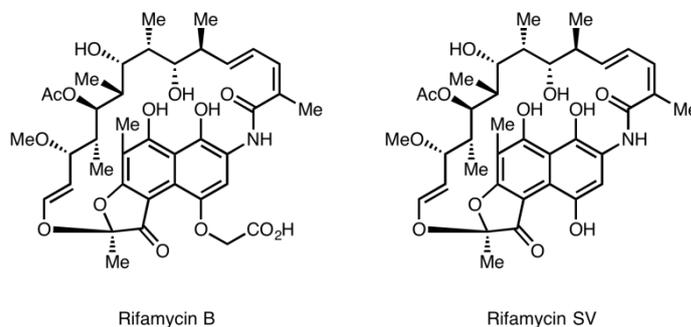


Figure 11 : Structure des rifamycines

II.4. Les antibiotiques agissant sur la membrane

Il existe quelques agents antimicrobiens qui agissent en désorganisant la membrane lipoprotéique, altérant la perméabilité et provoquant la mort cellulaire : les polymyxines principalement, qui sont très actives sur les bactéries Gram négatif (Delmée, 2004).

II.5. Les antibiotiques agissant sur le métabolisme

II.5.1. Les sulfamides

Il s'agit d'un groupe de molécules entièrement synthétiques, de structure analogue à l'acide para-amino-benzoïque (ou le PABA) qui est utilisé par les bactéries pour la synthèse de l'acide folique (vitamine B9). Les sulfamides agissent en compétition avec le PABA pour le site actif, la dihydroptéroate synthétase (Lambert, 1995).

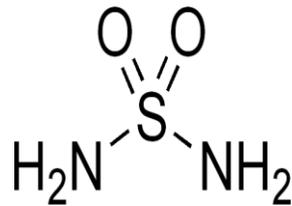


Figure 12 : Structure des sulfamides

II.5.2. Le triméthoprime

C'est un inhibiteur de la déhydrofolate réductase qui peut potentialiser l'activité du sulfamide par inhibition séquentielle de la synthèse de l'acide folique. Il peut être utilisée seul ou en association aux sulfamides (Veyssier, 1999).

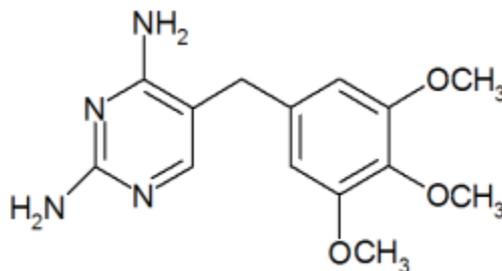


Figure 13 : Structure du triméthoprime

III. Mécanisme de résistance aux antibiotiques

III.1 Définition de la résistance

C'est la capacité pour une souche bactérienne de se multiplier dans une concentration d'antibiotique supérieure à celle qui inhibe la majorité des souches appartenant à la même espèce. La résistance aux antibiotiques peut être naturelle ou acquise (MUYLAERT et al., 2012).

III.1.1 Résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque à un antibiotique est commune à toutes les bactéries d'une même espèce. La résistance naturelle détermine les phénotypes « Sauvage » d'une espèce bactérienne vis-à-vis des antibiotiques (Mayer et al. 2000).

III.1.2 Résistance acquise

Ce terme est utilisé pour désigner des processus permettant à des bactéries appartenant à une espèce originellement sensible de devenir résistante à un ou plusieurs antibiotiques. Cette résistance acquise peut survenir suite à une mutation chromosomique (plutôt rare) (Chopra et al., 2003) ou à l'acquisition d'ADN étranger par le biais de plasmides (plutôt fréquent). On parle de transfert horizontal de gènes de résistance et les mécanismes utilisés sont la conjugaison, la transduction et la transformation.

III.2 Mécanisme de résistance aux B-lactamines

III.2.1 Modification de l'affinité de la cible

Un des mécanismes de résistance aux bêta-lactamines est la modification des protéines cible liant la pénicilline (PLP) : ceci peut avoir lieu par des mutations dans les gènes chromosomiques codant pour de nouvelles PLPs dont l'affinité aux bêta-lactamines est diminuée (Stahl, J. P. 2006).

III.2.2. Imperméabilité

Pour agir, les antibiotiques doivent pénétrer dans la cellule bactérienne. Plusieurs antibiotiques utilisent les systèmes de transport propres à la bactérie pour entrer. Pour résister, la bactérie contrecarre cette entrée d'antibiotiques en diminuant la perméabilité de sa membrane par une altération des porines : ce mode de résistance n'affecte que les bactéries à Gram négatif. Chez ces bactéries, la membrane externe constitue une barrière de diffusion très efficace. Le passage des antibiotiques à travers les porines est d'autant plus facile que les molécules sont de petite taille, neutres et très hydrophiles (Pagès., 2004).

III.2.3 Mécanisme d'efflux

Ce mécanisme est dû à un seul gène ou un opéron codant pour une pompe d'efflux. Ces pompes sont habituellement utilisées par la bactérie pour ses échanges avec le milieu extérieur, mais expliquent l'ensemble des résistances naturelles de certaines bactéries en

particulier vis-à-vis de certaines familles d'antibiotiques qui ne sont pas dégradées au niveau intracellulaire (Li, X., and H. Nikaido. 2004).

III.2.4 Mécanisme enzymatique

C'est le mécanisme le plus efficace et le plus rencontré dans la résistance aux Bêta-lactamines. Ces enzymes inactivent les bêta lactamines en hydrolysant le cycle bêta lactame de l'antibiotique (Sanders, 1992).

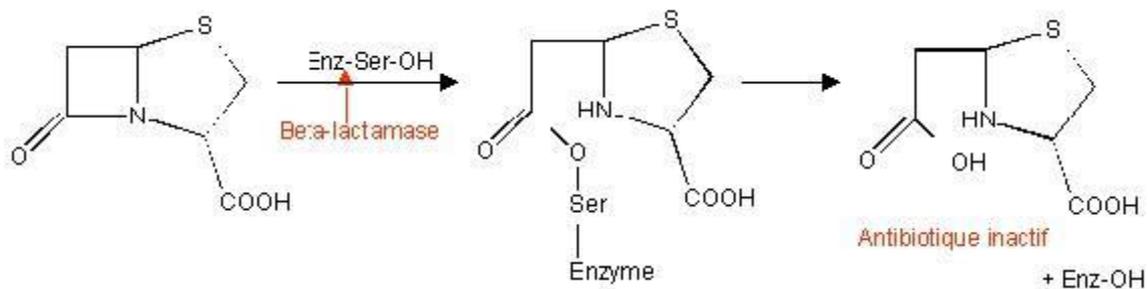


Figure 14 : Réaction d'hydrolyse du noyau bêta-lactame par une bêta-lactamase

IV. Les β -lactamases

Les β -lactamases sont des enzymes hydrolysant les β -lactamines en ouvrant le cycle bêta-lactame et menant à la perte d'un groupement carboxyle, provoquant l'inactivation de l'antibiotique en question. Ces enzymes sont localisées au niveau de l'espace péri-plasmique chez les bactéries à Gram négatif. (Schwaber et Carmeli. 2007),

V. Classification des β -lactamases

La classification des β -lactamases est de deux types : classification structurale d'Ambler et classification fonctionnelle de Bush-Jacoby-Medeiro . La plus utilisée en pratique courante médicale est actuellement celle d'Ambler. Cette classification est fondée sur l'homologie des séquences en acides aminés des β -lactamases. Elle divise ces enzymes en quatre groupes (A à D) selon la structure primaire de l'enzyme. Les enzymes des classes A, C et D sont dites à sérine active (type sérine), alors que la classe B regroupe les métallobêta-lactamases (type métallobêta-lactamases), qui ont besoin d'ions Zn^{2+} (Bush et Jacoby, 2010).

Le tableau N°I donne la corrélation des deux classifications des β -lactamases.

Synthèse bibliographique

Tableau N°I : Tableau de classification des β -lactamases (Bush et Jacoby, 2010)

Bush et Jacoby (2010)	Ambler	Substrats préférés	Inhibée par		Enzymes
			AC ou TZB	EDTA	
1	C	Céphalosporines	non	non	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	Céphalosporines	non	non	GC1, CMY-37
2a	A	Pénicillines	oui	non	PC1
2b	A	Pénicillines, Céphalosporines à spectre large	oui	non	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Céphalosporines à spectre étendu, Monobactames	oui	non	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15
2br	A	Pénicillines	non	non	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Céphalosporines à spectre étendu, Monobactames	non	non	TEM-50
2c	A	Carboxypénicillines	oui	non	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carboxypénicillines, Céfépime	oui	non	RTG-4
2d	D	Cloxacilline	variable	non	OXA-1, OXA-10
2de	D	Céphalosporines à spectre étendu	variable	non	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapénèmes	variable	non	OXA-23, OXA-48
2e	A	Céphalosporines à spectre étendu	oui	non	CepA
2f	A	Carbapénèmes	variable	non	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B(B1)	Carbapénèmes	non	oui	IMP-1, VIM-1, CcrA, NDM-1
	B(B3)	Carbapénèmes	non	oui	L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	B(B2)	Carbapénèmes	non	oui	CphA, Sfh-1

VI. Les Carbapénèmes

Les carbapénèmes sont aujourd'hui parmi les traitements de choix des infections sévères dues aux entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE). Mais leur utilisation pourrait être compromise par l'émergence de souches bactériennes résistantes par production de carbapénémase.

Les carbapénémases sont des β -lactamases ayant une activité hydrolytique vis à vis des carbapénèmes. Ces enzymes appartiennent à trois classes selon la classification d'Ambler (Nordmann et *al.*, 2010) :

- **la classe A** correspond principalement aux enzymes de type KPC, IMI et GES. Elles ont la particularité de voir leur activité *in vitro* totalement ou partiellement inhibée par l'acide boronique et l'acide clavulanique. Elles hydrolysent toutes les β -lactamines.
- **la classe B** correspond aux métallo- β -lactamases de type VIM, IMP et NDM. Ces enzymes hydrolysent très fortement toutes les β -lactamines à l'exception de l'aztréonam. Leur activité *in vitro* n'est pas affectée par les inhibiteurs de β -lactamases (acide clavulanique et tazobactam). Ce sont des métallo-enzymes qui contiennent un ion zinc dans leur site actif expliquant l'inhibition de leur activité par l'EDTA (chélateur des cations divalents) ou l'acide dipicolinique.
- **la classe D** correspond essentiellement aux enzymes de type oxacillinases (OXA-48, OXA-163, OXA-181). Ces enzymes hydrolysent les carbapénèmes mais pas ou peu les céphalosporines de 3ème génération. Elles sont résistantes aux inhibiteurs de β -lactamases (acide clavulanique et tazobactam)

VII. Les résidus d'antibiotiques dans les milieux aquatiques

Les antibiotiques sont des molécules très utilisées en médecine humaine et vétérinaire pour combattre efficacement et prévenir les maladies d'origine bactérienne. Cette forte utilisation conduit à s'interroger sur le devenir de ces molécules dans l'environnement et sur leurs effets potentiels sur l'équilibre des écosystèmes. De plus, cette exposition continue des microorganismes à de faibles concentrations d'antibiotiques pourrait être à l'origine de l'émergence de souches bactériennes résistantes. Utilisés dans les élevages, les antibiotiques sont rejetés soit directement dans les cours d'eau avec les effluents liquides, soit indirectement par l'épandage des déchets de l'élevage sur les terres agricoles. Ces molécules peuvent être retenues dans le sol, ou être entraînées par les eaux de ruissellement vers les cours d'eau (Fatima T et al., 2009)

Les résidus d'antibiotiques rejetés dans l'environnement sans être transformés peuvent rester biologiquement actifs et présenter des risques pour l'environnement, d'autant plus qu'ils peuvent se concentrer dans la chaîne alimentaire, ils peuvent influencer les biomasses bactériennes de l'environnement que ce soit dans les eaux, les sols, les stations de traitement des eaux, ou les réseaux de distribution d'eau potable. Quant à la sélection de bactéries antibiorésistantes, elle a été mise en évidence autour d'établissements d'élevage, de fermes, de cliniques. Ce phénomène concerne toutes les eaux (Jean Marie.H.. 2010).

Des échanges de gènes de résistance peuvent se produire entre les bactéries de l'environnement des fermes piscicoles et les bactéries de l'environnement terrestre, y compris des bactéries pathogènes pour les animaux et pour l'Homme. Des phénomènes d'hépatotoxicité et de génotoxicité se sont exercés sur diverses espèces : poissons, micro-algues, crustacés, la cible variant avec l'antibiotique. Sur les écosystèmes terrestres, les antibiotiques peuvent aussi affecter la qualité des sols en perturbant la communauté bactérienne ou en créant des résistances parmi les bactéries environnementales en apportant des bactéries résistantes transmises par les fumiers et les purins, c'est-à-dire créées dans le tube digestif des animaux (Jean Marie.H.. 2010).

L'eau étant le réceptacle final de bon nombre de nos déchets, la forte consommation d'antibiotiques dans les pays industrialisés, en médecine humaine et vétérinaire, et les rejets d'assainissement conduisent inévitablement à ce que des traces de ces molécules se retrouvent dans les effluents liquides (Yves, 2006).

Synthèse bibliographique

La détection de résidus d'antibiotiques dans les eaux de surface et l'émergence de souches bactériennes résistantes à certains antibiotiques constituent une nouvelle préoccupation pour les scientifiques et les gestionnaires des ressources en eau (Fatima Tamtam *et al.*, 2009).

La pharmacocinétique des antibiotiques de la famille des bêta-lactamines indique que ces derniers sont sécrétés majoritairement dans les urines et sous une forme chimique encore active. Cependant, l'hydrolyse chimique rapide du noyau bêta-lactame, caractérisant les antibiotiques de cette famille, rend difficile leur détectabilité dans l'environnement aquatique (Hirsch *et al.*, 1999).

Que se soit sous leur forme native ou sous leur forme dérivée, les antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire, de même que les bactéries résistantes aux antibiotiques peuvent atteindre l'environnement par le biais des égouts, des stations d'épuration. De même, les produits agrochimiques, comme les fertilisants (produits vétérinaires pouvant contenir des antibiotiques) finissent par être répandus sur les champs par épandage du lisier. Ces substances antimicrobiennes d'origine vétérinaire ou agrochimique sont entraînées avec les pluies, vers les eaux de surface ou les eaux souterraines (Figure 14) (Stamm., 2005).

Les organismes résistant aux antibiotiques de l'Homme et d'animaux sont rejetés dans les eaux usées par des sites contaminés (y compris Urine), des excréments, éventuellement des cadavres et du fumier. En particulier, les eaux usées provenant des hôpitaux et de l'agriculture intensive probablement une source majeure de pathogènes et d'organismes résistant aux antibiotiques et des gènes libérés dans l'environnement (Baquero *et al.*, 2008).

La présence de bactéries résistantes à un ou plusieurs antibiotiques est avérée dans pratiquement tous les types d'eaux, sans qu'il soit facile d'évaluer des tendances claires sur l'aggravation du phénomène ou son association avec les usages d'antibiotiques humains et vétérinaires. Il est évident que les effluents en provenance d'humain ou d'animaux malades et traités aux antibiotiques transportent des bactéries multi résistantes (Yves, 2006).

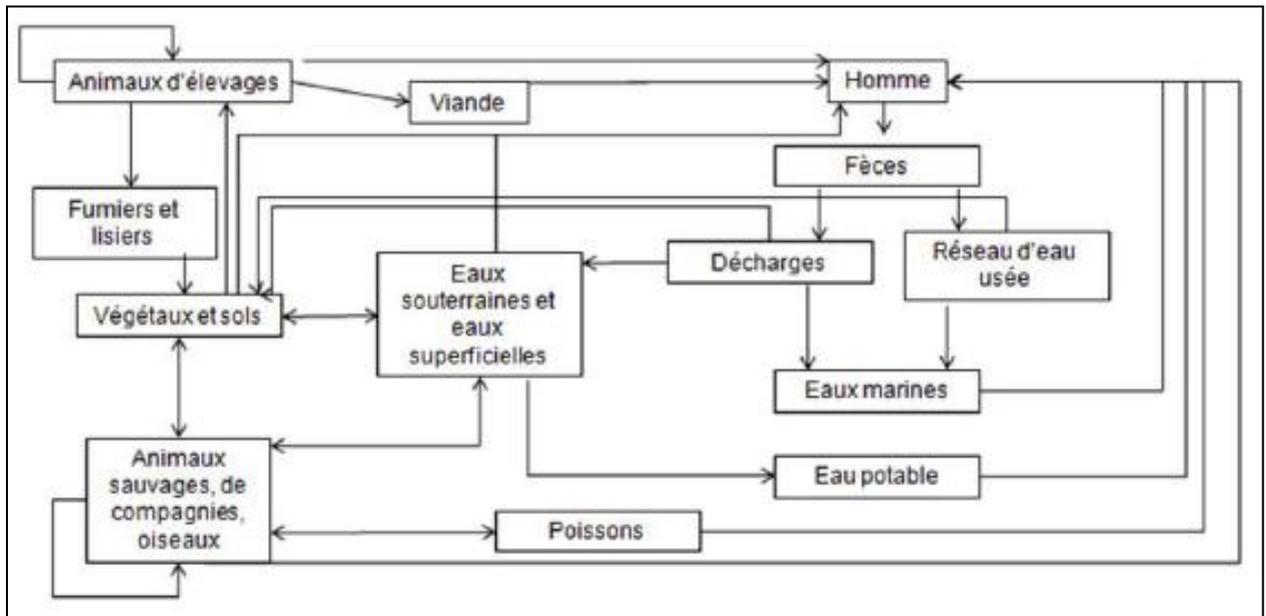


Figure 15 : interactions entre les différents compartiments au sein de l'environnement

Matériel
&
méthodes

I. Prélèvements

Au cour de notre étude qui s'est déroulée sur une période d'un mois du 05 mars au 06 avril 2017, des prélèvements d'eau (eau de mer, eau des lacs, eau des fontaines, eau de sources, eaux usées, eau de STEP) ont été effectués dans différentes régions incluant Tizi Ouzou, Jijel et Bejaia. Les échantillons ont été acheminés au laboratoire d'écologie microbienne de l'université de Bejaia pour être analysés.

La répartition des échantillons par type de prélèvement est donnée dans le tableau ci-dessous (Tableau N°II).

Tableau N°II: Nombre d'échantillons par le type d'eau, prélevé dans les trois willayas

Type d'eau	Bejaia	Tizi Ouzou	Jijel	Total
Eau de source	3	0	0	3
Eau d'Oued	20	2	1	23
Eau de Fontaine	4	0	0	4
Eau de mer	10	0	6	16
Eau de robinet	4	0	0	4
Hammam	2	0	0	2
Eau de Barrage	3	0	0	3
Eau de Puits	1	0	0	1
Eau de STEP*	10	0	0	10
Eau de lac	4	0	0	4
Eau de bassin	1	0	0	1
Total	62	2	7	71

* Nous avons prélevé 10 échantillons dans deux STEP différentes (STEP de bougie plage et la STEP de Sidi Ali Lebhar).

II. Recherche des entérobactéries productrices de carbapénèmase

Le protocole d'isolement des souches que nous avons utilisé est celui mis au point par Melle. MAIRI Assia dans le cadre de sa thèse de doctorat au niveau du laboratoire, d'Ecologie microbienne.

Un volume de 50µl d'eau a été ajouté à un 1ml de bouillon TSB contenant de la vancomycine et de l'Ertapénème. On ajoute quelques gouttes de l'huile de paraffine pour créer l'anaérobiose. Après incubation à 37°C pendant 24h, tous les tubes présentant un trouble ont été ensemencés sur gélose Mac Conkey (MAC) additionnée de vancomycine afin d'inhiber les bactéries à Gram positif et d'ertapénème pour sélectionner les EPC. Les colonies ayant poussé sur gélose MAC ont été purifiées et identifiées. L'identification des souches a été faite au niveau du laboratoire de bactériologie de Nîme (France) par spectroscopie de masse MALDI-TOF.

II.1 Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques

La sensibilité des souches aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de l'antibiogramme par diffusion sur gélose Mueller Hinton (MH) selon les recommandations de l'EUCAST. Des boîtes de gélose Mueller Hinton ont été ensemencées par écouvillonnage à partir d'une suspension bactérienne obtenue en dissociant quelques colonies dans 02 ml d'eau physiologique. Les disques d'antibiotiques (tableau N°III) ont été déposés. Après incubation à 37°C pendant 24h, on mesure les diamètres des zones d'inhibition et l'interprétation en sensible (S), intermédiaire (I) et résistante (R) a été faite selon les recommandations de l'EUCAST 2017, (Tableau N°III).

Tableau N°III : Antibiotiques testés et étude de la sensibilité des souches

Antibiotiques	Abréviation	Charge (µg)	Famille	Diamètre critique (mm) Selon l'EUCAST	
				S	R
Céftazidime	CAZ	10	β-lactamines	≥22	<19
Céfotaxime	CTX	5	β-lactamines	≥20	<17
Méropénème	MEM	10	β-lactamines	≥22	<16
Imipénème	IMP	10	β-lactamines	≥22	<16
Amoxicilline /acide clavulanique	AMC	20+10	β-lactamines	≥19	<19
Aztréonam	ATM	30	β-lactamines	≥26	<21
Ciprofloxacine	CIP	5	Fluoroquinolones	≥21	<15
Amikacine	AK	gb30	Aminoglycosides	≥16	<13
Gentamycine	GN	10	Aminoglycosides	≥17	<14
Tétracycline	TE	30	Tétracyclines	≥15	≤11
Co-trimoxazole	SXT	1,25+23,75	Sulfamides	≥16	<13
Rifampicine	RIF	5	Rifamycines	≥20	≤16

II.2 Recherche de la production d'une carbapénémase

Un disque d'imipénème (IMP) est appliqué au centre d'une gélose de Mac Conkey préalablementensemencée avec une souche de référence d'*E coli* ATCC25922. Ensuite les souches à tester sont ensemencées sur la gélose sous forme de stries déposées à partir du disque d'imipénème jusqu'à la périphérie de la boîte en présence d'un témoin positif (*Klebsiella pneumoniae* NDM-5) et d'un autre négatif (*E.coli* ATCC25922). Après 24h d'incubation à 37°C, la production d'une carbapénémase se traduit par une distorsion de la zone d'inhibition autour du disque d'imipénème (figure 16)

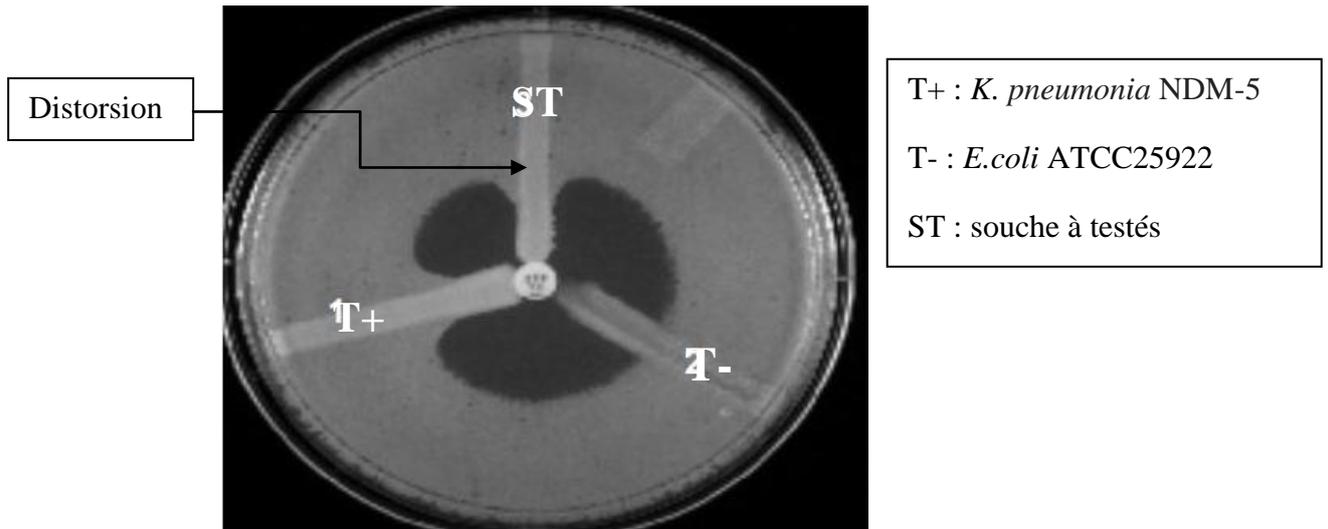


figure 16 :Test de Hodge

II.3 Recherche de la production d'une β -lactamase à Spectre Etendu par le DD-test

La présence d'une β -lactamase à spectre étendu a été détectée par le test de synergie (DD-test) qui consiste à déposer des disques de céftazidime (CAZ, 10 μ g), céfotaxime (CTX, 5 μ g) et aztréonam (ATM, 30 μ g) et à une distance de 20mm d'un disque d'amoxicilline /acide clavulanique (AMC, 20-10 μ g). L'apparition d'une image de synergie entre le disque d'amoxicilline/acide clavulanique et les disques de céftazidime, céfotaxime et aztréonam indique la production d'une β -lactamase à Spectre Etendu. (Figure 17)

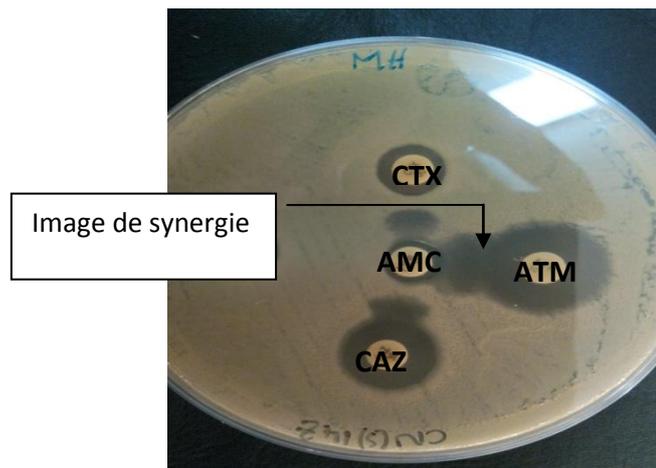


Figure 17 : Test de synergie

III. Recherche des résidus d'antibiotiques

Nous avons coulé la gélose Mueller Hinton dans des boîtes de Pétri. Des puits ont été réalisés dans cette gélose. Nous avons ensuite ensemencé par écouvillonnage la souche *d'E.coli ATCC 25922* sur cette gélose. Les puits ont été remplis par les échantillons d'eau en présence d'un témoin négatif qui est l'eau distillée stérile. L'incubation a été faite à 4°C pendant deux heures puis prolongée pendant 24H à 37°C (figure 18)

L'apparition d'une zone d'inhibition autour des puits indique la présence de résidus d'antibiotiques.

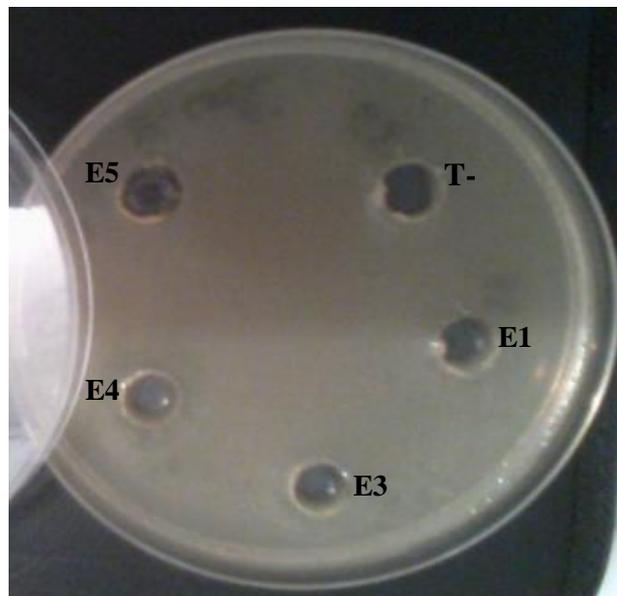


Figure 18 : Test de détection des résidus d'antibiotiques

Résultats

I. Souches d'entérobactéries productrices de carbapénémase (EPC)

Un total de neuf souches d'EPC a été obtenu à partir de 71 d'échantillons d'eau. L'identification des souches a permis d'individualiser les espèces suivantes : *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Cronobacter malonaticus* et *Raoultella ornithinolytica*. De plus, toute ces souches ont présenté un test de Hodge positif (+).

Les sources d'isolement de ces souches sont présentées dans le tableau N°IV.

Tableau N° IV : Répartition des souches d'EPC obtenue

Souche	type d'eau	Lieu	Espèce	Diamètre MEM (mm)	Hodge test
EE3	Oued	Targa Ouzemour	<i>Escherichia coli</i>	13	Positif
EE4	Oued	Stade	<i>Escherichia coli</i>	13	Positif
EE21	Barrage	Kherrata	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12	Positif
EE26	Oued	Bousselam	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14	Positif
EE31	Source	Merouaha(Kherrata)	<i>Cronobacter malonaticus</i>	16	Positif
EE33	Oued	Tagma (Tizi Ouzou)	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	18	Positif
EE42	Mer	Joua	<i>Cronobacter malonaticus</i>	20	Positif
EE48	Fontaine	Brise de mer	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	10	Positif
EE67	Boue	STEP Sidi Ali lebhar	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16	Positif

La prévalence d'EPC obtenue au cours de notre étude est de 12,7% (9/71), dont une prévalence de 33,33%(1/3) dans l'eau de barrage, 25%(1/4) dans l'eau de fontaine, 10%(1/10) dans les stations d'épurations, 17,4%(4/23) dans l'eau des oueds, 33,33%(1/3) dans l'eau de source et 10%(1/10) dans l'eau de mer.

II. Sensibilité des souches aux antibiotiques

Les résultats de l'étude de la sensibilité des souches d'EPC aux antibiotiques sont donnés dans le tableau V. Il est à noter que toutes les souches testées ont été résistantes au méropénème et l'amoxicilline /acide clavulanique et que 33.33% des souches sont résistantes à la céftazidime. Pour le reste des β -lactamines testées, les taux de résistance et de 11.11% pour la céfotaxime et l'aztréonam (figur19).Concernant les autres familles d'antibiotiques, les taux de résistance varient de 22.22% pour la gentamycine et le cotrimoxazole à 66.66% pour la tétracycline (figure N°20). On note aussi que toutes les souches sont sensibles à l'amikacine. (Tableau N° V)

Tableau N° V : Résultats de la sensibilité des neuf souches d'EPC aux antibiotiques

Code de la souche	MER	GEN	SXT	TE	AK	CIP	ATM	CAZ	CTX	AMC	Indice de multi résistance
EE3	13(R)	11(R)	6(R)	6(R)	21(S)	8(R)	26(S)	23(S)	21(S)	10(R)	0,6
EE4	13(R)	15(R)	20(S)	20(S)	22(S)	30(S)	29(S)	24(S)	29(S)	6(R)	0,3
EE21	12 (R)	21(S)	16(S)	6(R)	22(S)	23(S)	28(S)	22(S)	19(I)	7(R)	0,4
EE26	14(R)	22(S)	25(S)	21(S)	21(S)	30(S)	29(S)	24(S)	24(S)	6(R)	0,2
EE31	7(R)	31(S)	6(R)	12(R)	25(S)	30(S)	15(R)	12(R)	16(R)	6(R)	0,7
EE33	18(R)	25(S)	19(S)	6(R)	28(S)	21(S)	26(S)	18(R)	21(S)	6(R)	0,4
EE42	20(R)	17(I)	26(S)	18(S)	23(S)	32(S)	32(S)	20(I)	23(S)	6(R)	0,4
EE48	10(R)	21(S)	24(S)	6(R)	17(S)	27(S)	28(S)	16(R)	24(S)	6(R)	0,4
EE67	16(R)	16(I)	21(S)	15(I)	19(S)	24(S)	21(I)	20(I)	19(I)	6(R)	0,7

(S : sensible ; R : résistante ; I : intermédiaire)

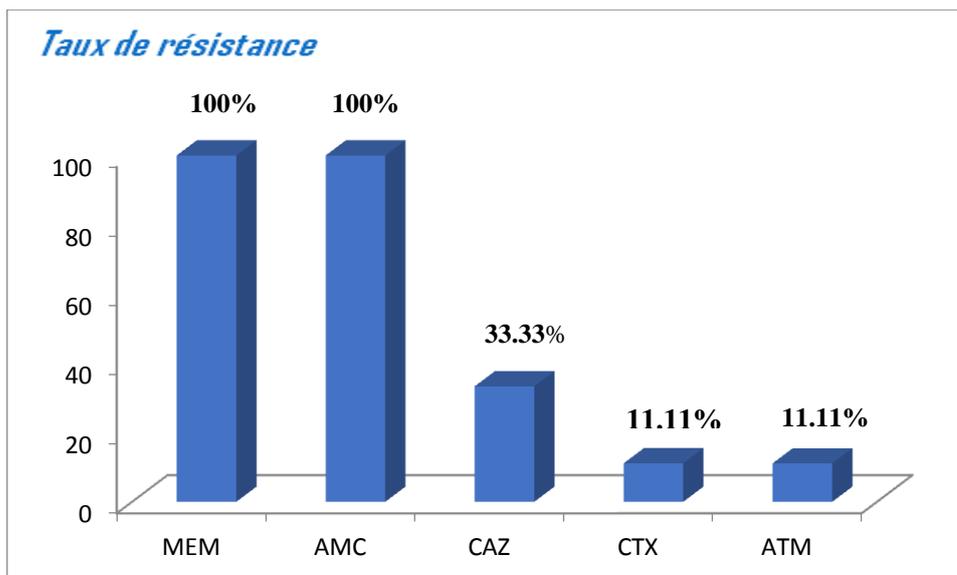


Figure19 : Taux de résistance des souches EPC aux β -lactamines

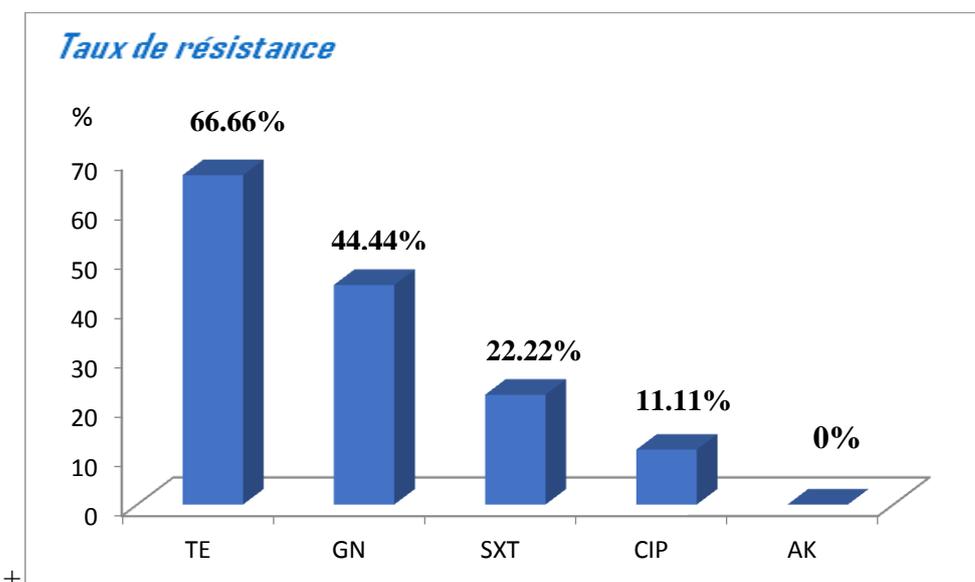


Figure 20 : Taux de résistance des souches EPC aux autres familles d'antibiotiques

L'indice de multi résistance aux antibiotiques nous renseigne sur la multi résistance de la souche. Il est calculé selon le rapport du nombre d'antibiotiques auxquels la souche est résistante sur le nombre total d'antibiotiques testés. La figure 21 donne la distribution des 09 souches isolées par rapport à leurs indices de multirésistance. On observe ainsi que cet indice varie entre 0,2 et 0,7.

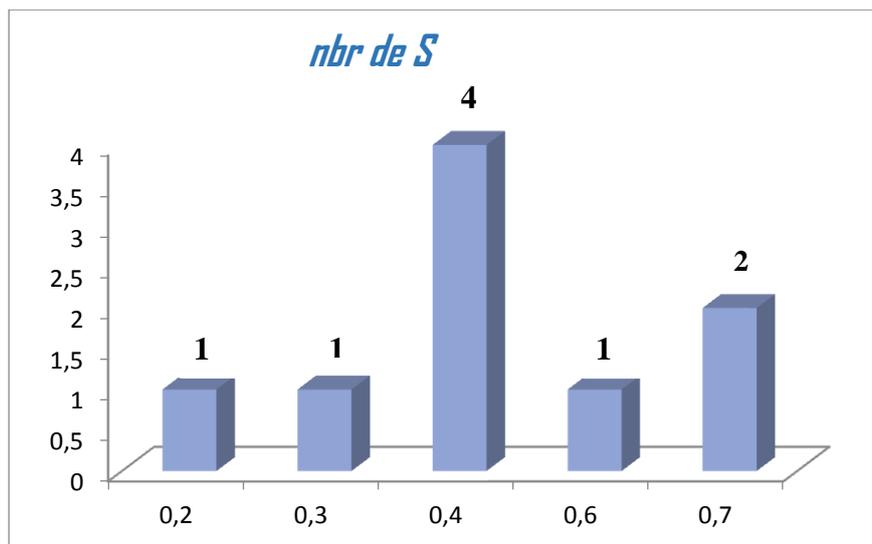


Figure 21 : Indice de multi résistance calculé pour les 09 souches d'EPC

III. Résidus d'antibiotiques

Aucun résidu d'antibiotiques n'a été détecté dans les prélèvements réalisés

Résultats

Discussion
&
conclusion

Discussion & conclusion

L'objectif principal de notre étude est la recherche des résidus d'antibiotiques ainsi l'isolement des EPC dans le milieu aquatique. Les résultats ont montré une prévalence de 13% des EPC est un test négatif de résidus d'antibiotiques.

Dans les différents types d'eau étudiés, nous avons obtenu un résultat nul pour les résidus d'antibiotiques. Ce résultat ne signifie pas réellement l'absence de ces résidus d'antibiotiques dans ces milieux mais il peut reporter aux nombre d'échantillons limités ainsi qu'à la technique utilisée au niveau de laboratoire microbiologie.

Au cours de notre étude, nous avons noté une diversité au niveau des espèces isolées dans les différents types d'eau. Nous avons identifié 3 souches de *K. Pneumoniae*, 2 souches d'*E. coli*, 2 souches de *Cronobacter malonaticus* et 2 souches de *Raoultella ornithinolytica*.. Nos résultats sont semblables à ceux marquée par Tafoukt et al.(2017) en Algérie qui rapporte 12 souches d'*E. coli*, 3 souches de *K. pneumoniae* et 3 souches d'*ornithinolytica de Raoultella* ; et avec les autres études telle que celle faite par Galler et al.(2013) en Autriche ; Alouache S et al.,(2012) en Algérie, Zurfluh K et al.(2013) en suisse.

L'antibiorésistance obtenue dans cette étude pour les prélèvements a révélée que la plus part des souches étudiées ont une résistante importante vis-à-vis les antibiotiques testés tel que les Béta-lactamines, les tétracyclines, les aminoglycosides et les sulfamides.

L'analyse phénotypique de la résistance de ces souches aux B-lactamines indique probablement que ces souches produisent des carbapénèmases de type OXA-48 du fait que ces souches sont résistante au MER et sensible à la CTX, ce qui est eu accord avec le spectre d'hydrolyse des OXA-48.

Ces résultats confirment l'impact des antibiotiques dans la dissémination des bacilles à Gram négatif multi-résistants dans les milieux aquatiques, et la forte probabilité d'acquisition de gènes de résistance par les souches autochtones de l'environnement. De plus, les antibiotiques contaminants peuvent perturber l'écologie microbienne, augmenter la prolifération des bactéries résistantes aux antibiotiques, et constituer une menace pour la santé humaine.

La propagation d'entérobactéries produisant des carbapénèmases dans les eaux de surface est très inquiétante. Des mesures appropriées doivent être appliquées de manière urgente afin de réduire le fardeau anthropique de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement,

Discussion & conclusion

comme l'utilisation judicieuse des antibiotiques dans les médecines humaine et vétérinaire ainsi que dans l'agriculture. (LaPara TM et al., 2006).

Dans une démarche complémentaire il est nécessaire :

- Elargir l'étude sur toute la flore environnementale pour inclure les bactéries à Gram positif.
- Estimer le taux de résidus d'antibiotiques se trouvant dans l'eau par des techniques développées.
- Effectuer une étude à l'échelle nationale pour déterminer l'impacte des antibiotiques et les bactéries multi-résistante sur l'environnement.

*Références
bibliographiques*

A

Alouache Souhila ,Kada Mohamed ,Messai Yamina , Estepa Vanesa, Torres Carmen , et Bakour Rabah. (2012). Antibiotic Resistance and Extended-Spectrum β Lactamases in Isolated Bacteria from Seawater of Algiers Beaches (Algeria). 10.1264 / jsme2.ME11266. 27 (1): 80-86.

Alighardashil A., Pons M.-N., Potier O. (2008). Présence et devenir des médicaments dans les eaux usées urbaines, une analyse bibliographique. *Revue des sciences de l'eau*. 21(4) : 412-426.

B

Baquero F., Martinez J.L., Canton R (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*.

Borjesson S, Matussek A, Melin. S. Lofgren et P.E. Lindgren. (2009). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in municipal wastewater: an uncharted threat?. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04515.x.

Bosgiraud C. (2003). *Microbiologie générale et santé*. Edition : Edeska. Paris.520pe.

Bush K et Jacoby GA. (2010). Updated Functional Classification of β -lactamases. *ANTIMICROBIAL AGENT AND CHEMOTHERAPY*. 54, 969-976.

C

Cattoir. V. (2008). Les nouvelles beta- lactamase à spectre étendue (BLSE).204-209.

Cavallo J D, Fabre R, Jehl F, Rapp C et Garrabé E. (2004). Béta-lactamines. *EMC-maladies infectieuses*.1, 129-616.

Chopra, I., O'Neill, A., and Miller, K. (2003). The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resist Updates*. 6: 137-145.

Chang X, Meyer M T, Lui X, Zhao Q, Chen H, Chen J, Qui Z, Yang L, Cao J et Shu.(2010). Determination of antibiotics in sewage from hospitals, nurse and slaughter house, wastewater treatment plant and source water in chongqing region of Gorge Reservoir in China, *environmental Pollution*. 158,1444-1450.

Chagas T P G, Seki L M , Cury J C, Oliveira J A, Davila A M R, Silva DM et Asensi M D (2011). Multiresistance beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro. *Braz. J. Appl. Microbiol.*111, 572e581.

D

Délmée M. (2004) Microbiologie médicale. Chapitre. IV: 28-34p.

Diwan V, Tamhankar A J, Khandal R k, Sen S, Aggarwal M, Marothi Y, Iyer R V, Sundblad-tonderski K et Stalby-lundborg C. (2010). Antibiotics and antibiotic-résistant bacteria in waters associated with a hospital in Ujjain, India. *BioMed central journal public health.*414 (10), 2-8.

E

El-Ashamawy NE, Khedr EG, El-Bahrawy HA, Selim HM. (2016).Nebivolol prevents indomethacine-induced gastric ulcer in rats.*J Immunotoxicol.*25, 1-10.

F

Focazio M J, Kolpin K K , furlong E F, Meyer M T , Zaugg S D, Barber L B et Thurman M E.(2008). A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States Untreated drinking water source science of the total environment.402, 201-255.

I

Jean J, Perrodin Y Pivot C, Trepo D, Perraud, M, Droguet J, Tissot-Guerraz, F, Locher, F. (2012). Identification and perioritization of bioaccumulation pharmaceutical substances discharged in hospital effluent. *J Environ.Manage.*103, 113e121.

Jean-Marie Haguenoer (2010).Les résidus de médicaments présentent-ils un risque pour la santé publique ?

H

Hirsh R, Ternes T, Haberer K, Kratz KL (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci Total Environ.* Jan 12; 225 (1-2): 109-118.

G

Galler Herbert, Feierl Gebhard, Peternel Christian, Reinthaler F. Franz, Haas Doris, Grisold J. Andrea, Luxner Josefa, Zarfel Gernot.(2013). C-2 and OXA-48 carbapenemase-harboured Enterobacteriaceae detected in an Austrian waste water treatment plant.

Gangoue Pieboji J. (2007). Caractérisation des β -lactamases et leur inhibition par les extraits de plantes médicinales. Thèse de doctorat de science en biochimie. Université de Liège. Centre d'ingénierie des protéines, 104p.

K

Karen A. Cloud-Hansen, S. Brook Peterson, Eric V. Stabb, William E. Goldman, Margaret J. McFall-Ngai, Jo Handelsman (2006). Breaching the great wall: peptidoglycan and microbial interactions. pp710-714.

Kummerer K. (2004). Résistance in the environment .Journal of antimicrobial chemotherapy.54:311—320.

L

LaPara TM, Firl SJ, Onan LJ, Ghosh S, Yan T, Sadowsky MJ.(2006). Traitement des eaux usées municipales: une nouvelle opportunité de ralentir la prolifération des bactéries.

Li, X., and H. Nikaido. 2004. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* **64**:159-204.

Lambert N Z. (1995). Antibiothérapie en pratique clinique. Edition : Bergogne-Berezin P. Dellamonica.33-35p.

M

Meradi L., Djahoudi A., Abdi A., Bouchakour M., Perrier Gros Claude J-D., Timinouni M. 2009. Résistance aux quinolones de types qnr, aac (60)-Ib-cr chez les entérobactéries isolées à Annaba en Algérie. *Pathologie Biologie* 59(2011) e73-e78.

Martinez J L. 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotics resistance determinants. *Environnement pollution*. 157, 2893-2902.

Mayer, K., Opal, S., and Medeiros, A. 2000. Mechanisms of antibiotic resistance. In: Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th edition, Churchill Livingstone. 2: 236-253.

MUYLAERT A., MAINIL J.G. (2012). Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité ». *156*, 109- 123.

N

Nauciel C et Vildé J L. (2005). Principales familles d'antibiotiques et leur mode d'action
Edition : Masson. Paris .49-56p.

Nordmann P, Carrer A. (2010). Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. Arch Pediatr; 17:
S154-62.

P

Pagès J M. (2004). Porines bactériennes et sensibilité aux antibiotiques.Med Sci(Paris).
20(3):346-51.

Poole, K. 2004. "Resistance to beta-lactam antibiotics." *Cell Mol Life Sci.* 61(17): 2200-2223.

R

Robert O. (2000). Résistance aux antibiotiques. Fondation pour la recherche médicale.

S

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

Sanders, C. C. (1992). Beta-Lactamases of gram-negative bacteria: new challenges for new
drugs. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society
of America **14**:1089-1099.

Schwaber, M.J, and Carmeli, Y.(2007). Mortality and delay in effective therapy associated
with extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae* bacteraemia: a
systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* 60: 913-920.résistantes aux
antibiotiques? CURA Reporter 36 : 18-2.

Singleton P. (2005). Bactériologie pour la médecine, la biologie et la bactériologie, Edition :
Durot .Paris.pp100-102.

Soussy CJ. (2006). Quinolones et bactéries à Gram négatif In : Lobel et Soussy CJ. (Eds), les
infections urinaire, Springer, Paris, pp21.

Stahl, J. P. (2006). Épidémiologie, contrôle et traitements des résistances aux antibiotiques: compte-rendu du 45e congrès ICAAC, Washington 2005. Médecine et Maladies Infectieuses **36**:290-296.

STAMM C, (2005). Produits agrochimiques : Quels dangers pour le milieu aquatique ? EAWAG news 59 : 3-5.

T

Tafoukt Rima, Abdelaziz Touati, Thongpan Leangapichart, Sofiane Bakour, Jean-Marc Rolain. (2017). Characterization of OXA-48-like-producing Enterobacteriaceae isolated from river water in Algeria, Water Research (2017), doi: 10.1016/j.watres..04.073.

Fatima Tamtam, Barbara Lebot, Joëlle Eurin, Fabien MercierAnnie, Desportes et Marc Chevreuil. (2009). Surface water contamination by antibiotic residues in rural area. Doi.org/10.1051/water/2009012.pp175 – 186.

Tamtam F., Mercier F., Le bot B., Eurin J., Tuc Dinh Q., Clément M., Chvreiul M. (2008). Occurrence and fate of antibiotics in the seine River in various hydrological conditions. Science of the total environment. 393:84-95.

Tao R, VYing G G , Su H W et Sihu J P S .(2010). Detection of antibiotic resistance and tetracycline resistance genes in *Enterobacteriaceae* isolated from the pearl rivers in south China. Environmental Pollution. 158, 2101-2109.

V

Veyssier P. (1999). Inhibiteurs de la déhydrofolate réductase, nitrohétérocycles et 8-hydroxyquinoléine. In : Bryskier A (Eds), Antibiotique, agents antibactériens et antibiotiques. Ellipses, Paris, pp.1008-1009.

W

Watkinson A J, Murbbby, Kolmpin D W et Costanzo S. (2009). The occurrence of antibiotics in an urbain wastershed: From wastewater to drinking water, Science of the total environment.407, 2711-272.

Y

Yala D., Merad A.S., Mohamedi D. et Ouar Korich M.N. (2001). Classification et mode d'action des antibiotiques. Médecine du Maghreb n°91.

Yves Lévi. (2006). Inquiétudes sur la présence d'antibiotiques et de bactéries antibiorésistantes dans les eaux.

Z

Zurfluh Katrin, Hächler Herbert, Nüesch-Inderbin Magdalena et Stephan Roger.(2013). Characteristics of Extended-Spectrum β -Lactamase- and Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* Isolates from Rivers and Lakes in Switzerland. doi: 10.1128/AEM.00054-13. 79(9): 3021–3026.

Annexes

ANNEXE

Composition des milieux de culture et réactifs (en g/l)

Gélose Mac Conkey

Hydrolysa Pancréatique de gélatine.....	17 g
Peptone de viande	3 g
Monohydrate de lactose	10 g
Mélange de sels biliaires	1.5 g
Chlorure de sodium	5 g
Rouge neutre	0.03 g
Cristal violet	0.001 g
Agar bactériologique.....	13,5 g

pH finale 7.1

Gélose Mueller Hinton

Infusion de viande de bœuf	3 g
Hydrolysat de caséine	17.5 g
Amidon	1.5 g
Agar	17 g

pH 7,4

Bouillon Trypticase Soja

Peptone de caséine	17 g
Peptone de farine de soja	3 g
D-glucose	2.5 g
Chlorure de sodium	5 g
Phosphate dipotassique	12 g
Chlorure de lithium	5 g

Ph= 7.5

Annexe II

Tableau des prélèvements

Code	Lieux	Origine	Date	Souche EPC
EE1	Tabia(Kherrata)	source	05-mars-17	N
EE2	Adekar1	oued	05-mars-17	N
EE3	Targa Ouzemoure	oued	07-mars-17	P
EE4	Stade	oued	07-mars-17	P
EE5	Eau de résidence(berchiche)	robinet	07-mars-17	N
EE6	Mezaia(bejaia)	Lac	07-mars-17	N
EE7	Naceria	fontaine	08-mars-17	N
EE8	Aamriw	fontaine	08/03/2017	N
EE9	Sidi Ali Labhare	lac	08/03/2017	N
EE10	Sidi Ali labhare	mer	08/03/2017	N
EE11	Résidence 17(bejaia)	fontaine	08/03/2017	N
EE12	Alkseur	oued	13-mars-17	N
EE13	Aboudaou	oued	13/03/2017	N
EE14	Sidi Ali labhare	oued	13/03/2017	N
EE15	Sommam(Bejaia)	oued	13/03/2017	N
EE16	Ighzer Amekrane	oued	13/03/2017	N
EE17	Adekar2	oued	13/03/2017	N
EE18	Tazrote1	oued	13/03/2017	N
EE19	Snadla(kherrata)	oued	13/03/2017	N
EE20	Ithensar(kherrata)	oued	13/03/2017	N
EE21	kherrata	barrage	13/03/2017	P
EE22	Tazroute2	oued	13/03/2017	N
EE23	Merouaha(kherrata)	bassin	13/03/2017	N
EE24	Bousselam	lac	13/03/2017	N
EE25	Bousselam2	oued	13/03/2017	N
EE26	Bousselam1	oued	13/03/2017	P
EE27	Bni ourtilane	oued	13/03/2017	N
EE28	Bousselam	puit	13/03/2017	N
EE29	Acif lhammam(adekar)	lhamam ext	13/03/2017	N
EE30	Acif lhammam(adekar)	lhamam int	13/03/2017	N
EE31	Merouaha(kherrata)	source	20/03/2017	P
EE32	Tizi Ouezou	oued	20/03/2017	N
EE33	Tagma	oued	20/03/2017	P
EE34	Tabia (kherrata)	oued	20/03/2017	N
EE35	Tabia(kherrata)	source	20/03/2017	N
EE36	Acif lhammam(Adekar)		20/03/2017	N
EE37	Aghlad	oued	20/03/2017	N

EE38	Jijel	mer	20/03/2017	N
EE39	jijel	oued	20/03/2017	N
EE40	Draa Elgaid(kherrata)	oued	20/03/2017	N
EE41	Rochés(Aoukas)	mer	27/03/2017	N
EE42	Joua	mer	27/03/2017	P
EE43	Tichy	mer	27/03/2017	N
EE44	plage(Aoukas)	mer	27/03/2017	N
EE45	La Brise	mer	27/03/2017	N
EE46	Imaghra	mer	27/03/2017	N
EE47	Jabia	mer	27/03/2017	N
EE48	La Brise	fontaine	27/03/2017	P
EE49	Akbou1	barrage	27/03/2017	N
EE50	Akbou2	barrage	27/03/2017	N
EE51	Akbou	oued	27/03/2017	N
EE52	Bni ksila	mer	27/03/2017	N
EE53	Adkare	lac noir	02/04/2017	N
EE54	Aftis (jijel)	mer	02/04/2017	N
EE55	Plage roge(jijel)	mer	02/04/2017	N
EE56	Alawana(jijel)	mer	02/04/2017	N
EE57	Amrije	cascade	02/04/2017	N
EE58	Souk el tenine	mer	02/04/2017	N
EE59	Taza(jijel)	mer	02/04/2017	N
EE60	Melbou(jijel)	mer	02/04/2017	N
EE61	Bni ksila	mer	02/04/2017	N
EE62	STEP S A labhar	Entrée	02/04/2017	N
EE63	STEP S A labhar	bassin d'aeration	05/04/2017	N
EE64	STEP S A labhar	recirculation	05/04/2017	N
EE65	STEP S A labhar	sortie	05/04/2017	N
EE66	STEP S A labhar	laboue	05/04/2017	N
EE67	STEP S A labhar	laboue final	05/04/2017	N
EE68	Bougie plage	Entrée	06/04/2017	N
EE69	Bougie plage	Recirculation	06/04/2017	N
EE70	Bougie plage	bassin biologique	06/04/2017	N
EE71	Bougie plage	sortie	06/04/2017	N

Résumé

L'objectif de ce travail est la recherche des résidus d'antibiotiques et l'étude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées du milieu aquatique.

Après isolement et identification des souches, la sensibilité des souches aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de diffusion sur gélose Mueller Hinton. Les phénotypes de résistance aux β -lactamines ont été déterminés par l'utilisation de tests phénotypiques incluant le DD-test, test de Hodge et l'antibiogramme.

Au total 9 souches identifier dont 3 souches de *K.Pneumoniae*, 2 souches d'*E.coli*, 2 souche de *Raoultella ornithinolytica* et 2 souches de *Cronobacter malonaticus*. L'étude de la sensibilité des 9 souches isolées vis-à-vis des différentes familles d'antibiotiques a permis de montrer leur multi-résistance. Aucun résidu d'antibiotique n'a été détecté.

Les milieux aquatiques jouent un rôle très important dans la sélection, la propagation et la diffusion des souches multi-résistantes ainsi que dans le transfert de gènes de résistance dans l'environnement.

Mot clés : entérobactéries, milieux aquatiques, EPC, antibiotiques, résistance, résidu.

Summary

The objective of this work is the research of the antibiotic residues and the study of resistance to antibiotics of the enterobacterias isolated from the aquatic environment.

After insulation and identification of the stocks, the sensitivity of the stocks to antibiotics was determined by the method of diffusion on gelose Mueller Hinton. The phenotypes of resistance to the β -lactamines were determined by the use of phenotypical tests including the DD-test, test of Hodge and the antibiogramme.

On the whole 9 stocks to identify including 3 stocks of *K.Pneumoniae*, 2 stocks of *E.coli*, 2 stock of *Raoultella ornithinolytica* and 2 stocks of *Cronobacter malonaticus*. The study of the sensitivity of the 9 stocks isolated with respect to the various families from antibiotics made it possible to show their multi-resistance. No antibiotic residue was detected.

The aquatic environments play a very important part in the selection, the propagation and the diffusion of the multi-resistant stocks like in the transfer of genes of resistance in the environment.

Key words: Enterobacteriaceae, aquatic environments, antibiotics, EPC, resistance, residues.