

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 Moléculaire et Médicale



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

MASTER

Thème

*Etude de la résistance aux carbapénèmes de
souches bactériennes isolées au niveau des
stations d'épuration de la wilaya de
Bourdj Bou Arreridj*

Présenté par :

BENAMEUR Khouloud

Soutenu le : **18 Juin 2016**

Devant le jury composé de :

M^r ADJEBLI. A
M^{me} TAFOUKT. R
M^{me} LAINCER. F

MCB
MAA
MAA

Président
Promotrice
Examinatrice

Année universitaire : 2015 / 2016

Remerciements

*Je tiens tous d'abord à remercier Dieu le tout puissant et
miséricordieux, qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce
modeste travail*

J'adresse mes remerciements à :

*Ma promotrice M^{me} Tafoukt Rima, pour m'avoir encadré et m'a
permis de bénéficier de ces connaissances de son aide et ses précieuses
orientations.*

*Membres du jury, M^r Adjebli et M^{me} Liancer, de m'avoir honoré en
acceptant d'examiner ce travail.*

*Je tiens à remercier les personnellés des stations d'épuration et le
directeur de l'ONA de B-B-A pour leurs disponibilité à chaque
prélèvement effectué.*

*Mes remerciements vont à l'égard toute l'équipe du laboratoire de
microbiologie tout particulièrement : M^{me} Rahmani, M^{me} Belhadí,
M^{me} Gharout, M^{lle} Mairi, M^{lle} Yousffi, M^r Djoudi.*

*Nous, les étudiants de sciences infirmières tenons à remercier le
département Microbiologie à leur tête P^r. A Touati qui nous a donné
la chance d'accomplir nos études.*

Dédicace

Je dédier ce modeste travail :

- ❖ *A celui qui est toujours là pour moi, et m'a donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance, celui qui m'encourage qui m'a toujours protégé, **mon chère père.***
- ❖ *A celle qui m'a donné la vie et éclaire mon chemin m'a toujours soutenu **ma chère maman.***
- ❖ *A mon frère: **Adel.***
- ❖ *A ma sœur : **Lynda.***
- ❖ *A mes chers petits-enfants **Mohamed** et **Zahra**, Je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur et de réussite.*
- ❖ *A la mémoire de ma grande-mère.*
- ❖ *A tout les membres de la famille **Benameur** et **regouid.***
- ❖ *A mes chers amis : **Walid, Issam, Ali.***
- ❖ *A mes amies fideles : **Amel, Bahia, Salima, Fella, Nadjete, Fatiet Asma.***
- ❖ *A toutes personnes qui m'ont aidé de réaliser ce travail.*
- ❖ *A ce qui je ressens envers eu de l'amour et du respect*

Liban

« Khouloud »

Liste des Abréviations

AMC: Amoxicilline-clavulanate

AmpC :Céphalosporinases

ATCC : American Type Culture Collection

B-B-A :Bourdj Bou Arreridj

BGN : Bacille Gram Négatif

BGNnF : Bacille Gram Négatif non Fermentaire

BLSE : Bêta-Lactamases à Spectre Etendu

C3G : Céphalosporines de troisième génération

CASFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CAZ:Ceftazidime

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CTAB:CetylTrimethyl Ammonium Bromide

CTX:Céfotaxime

CTX-M :Céfotaximase-Munich

DD-test : Double Disc synergie test

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique

ERT:Ertapénème

EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FOX:Céfoxitine

GIM: German imipenemase

I :Intermédiaire

IMP:Imipénème

KPC :*Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase

MBL:Métallo- β -Lactamases

MC : Mac Conkey

MH : Mueller Hinton

NDM : New Delhi Metallo- β -lactamases

OXA : Oxacilline

R : Résistant

S : Sensible

SIM : Seoul imipenemase

SPM : Sao Paulo metallo- β -lactamase

STEP: Station d'épuration d'eau usée

TSI : Three Sugar Iron

UFC: Unité Formant Colonies

VEB: Vietnam Extended-Spectrum β -lactamase

VIM: Verona integron-encoded metallo- β -lactamases

Liste des figures

Figure 01 : Disposition des disques combinés.....	09
Figure 02 : Répartition des souches par STEP.....	10
Figure 03 : Répartition des souches par sites de prélèvements	10
Figure 04: Répartition des bacilles à Gram négatif isolés.....	11
Figure 05 : Répartition des souches par genre.....	11
Figure 06 : Taux de résistance des souches aux antibiotiques.....	12
Figure 07: Résultat de test de Hodge.....	13
Figure 08: Résultat ducarba NP test.....	13

Liste des tableaux

Tableau I: Sites et dates de prélèvements.....	05
Tableau II : Les antibiotiques testés.....	07
Tableau III : Interprétation des résultats du carba NP test.....	08
Tableau IV : Résultats des tests sur les souches d'entérobactéries résistantes isolées au niveau les STEP de B-B-A.....	15

Annexes

- I.** Test de la galerie biochimique classique
- II.** Profile de sensibilité aux β -lactamines

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Sommaire

Introduction.....01

Matériel et méthodes

I. Présentation des STEP de Bordj Bou Arreridj	05
II. Prélèvements	05
III. Enrichissement.....	06
IV. Isolement et purification.....	06
V. Identification	06
VI. Etude de la sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques	06
VII. Phénotypes de résistance	07
VII.1. β -lactamase à spectre étendu (BLSE)	07
VII.1.1. DD-Test ou test de synergie	07
VII.2.Recherche de carbapénémases.....	07
VII.2.1. Hodge-Test modifié.....	07
VII.2.2. Carba NP test modifié.....	08
VII.3. Test des inhibiteurs	09

Résultats

I. Isolats bactériens.....	10
II. Sensibilité des souches d'entérobactéries isolées aux β -lactamines.....	12
III. Caractérisation des phénotypes de résistance aux β -lactamases	12
III.1. β -lactamases à spectre étendu (BLSE)	12
III.2. Recherche de la production de carbapénémases.....	13

III.2.1. Test de Hodge	13
III.2.2. Carba NP test.....	13
III.2.3. Test des inhibiteurs	14
Discussion.....	19
Conclusion.....	22
Référence bibliographiques	
Annexes	

Introduction

Le volume d'eaux usées rejetées à l'échelle nationale est estimé actuellement à près de 750 millions de m³ et dépassera 1,5 milliards de m³ à l'horizon 2020. Afin de prendre en charge l'épuration de ce potentiel d'eaux usées, le secteur des ressources en eau a engagé un programme ambitieux en matière de réalisation d'installations d'épuration (Hannachi et *al.*,2014). Ce qui précède démontre la nécessité de l'épuration des eaux usées et des eaux résiduaires industrielles. Les caractéristiques d'une station d'épuration et le degré de traitement doivent être tels que l'effluent n'altère pas l'état du milieu récepteur dans une mesure incompatible avec les exigences de l'hygiène et de la salubrité publique et, d'une façon générale, avec les exigences des diverses utilisations ou activités (alimentation en eau des hommes et des animaux, utilisation agricole ou industrielles, production piscicole ou production de coquillages, navigation, baignades et autres activités sportives) (Xanthoulis., 1993).

Les effluents générés par l'activité hospitalière peuvent présenter un danger potentiel pour l'homme et son environnement compte tenu de la nature et de l'importance des substances spécifiques qu'ils contiennent (résidus médicamenteux, réactifs chimiques, antiseptiques, détergents, révélateurs et fixateurs de radiographies...) et en raison de leur évacuation, au même titre que les rejets urbains classiques, vers le réseau d'assainissement communal sans traitement préalable (Coralie et *al.*,2002).

Bien que les STEP n'aient pas été initialement conçues pour traiter la pollution microbiologique, il s'avère que ces systèmes permettent de réduire la charge bactérienne totale d'environ 2 log (hors désinfection spécifique), ainsi que certains indicateurs de contaminations fécales et pathogènes. Cependant les quantités de bactéries résistantes, continuellement rejetées dans l'environnement par le biais des STEP restent très élevées (Novo et Manaia., 2010).

L'assainissement urbain, l'élevage et les effluents de l'industrie pharmaceutique sont considérés comme les principaux pôles de diffusion de la résistance. Lors du traitement biologique des eaux usées dans les stations d'épuration, les bactéries résistantes et les germes pathogènes se trouvent en contact étroit avec les bactéries des boues activées et d'autres microorganismes adaptés à la survie dans les milieux d'eau douce. Ainsi, même si l'épuration des eaux permet une bonne élimination des pathogènes, elle est également un lieu d'échange de gènes. C'est un véritable vivier pour la résistance aux antibiotiques. Etant donné que les eaux usées véhiculent également des antibiotiques et d'autres polluants, les stations

d'épuration offrent des conditions qui favorisent la survie des organismes antibiorésistants (Helmut *et al.*, 2015).

Certaines études métagénomiques ont montré l'impressionnante diversité des gènes de résistance portés par des éléments génétiques mobiles présents dans des STEP (Szczepanowski *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011). Ainsi Szczepanowski *et al.* (2009) ont mis en évidence, dans des boues activées de STEP, la présence de 140 gènes impliqués dans la résistance à la quasi-totalité des familles d'antibiotiques (macrolides, tétracyclines, céphalosporines, fluoroquinolones, aminoglycosides, β -lactamines et sulfonamides) et portés par des plasmides, donc potentiellement transférables. La combinaison des structures génétiques mobiles et des gènes de résistance, en association avec les fortes densités et l'importante diversité bactérienne présente dans les bassins biologiques ou les cultures fixées épuratrices, font des STEP des lieux avec des conditions idéales pour les transferts de gènes intracellulaires via transposition et recombinaison et les transferts horizontaux (Szczepanowski *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012). De plus, il a été suggéré que les conditions retrouvées dans les STEP pourraient favoriser l'intégration de gènes chromosomiques dans des plasmides (Martínez, 2009 ; Rahube et Yost, 2010). Ainsi, au lieu de réduire le risque associé à la dissémination de bactéries résistantes et /ou multirésistantes, les STEP maintiendraient voire même amplifieraient le phénomène (Merlin *et al.*, 2011).

Par ailleurs, l'eau traitée n'est pas le seul résidu des STEP, et les boues issues du traitement constitueraient une voie d'entrée majeure de bactéries et gènes de résistance dans l'environnement *via* l'épandage (*i.e.* valorisation agricole). La seule étude ayant fait un bilan quantitatif entre les effluents traités et les boues traités d'une STEP, a montré que la principale voie de sortie des gènes *sulI*, *tetW* et *tetO* est les boues traitées (Munir *et al.*, 2011).

Dans cette course effrénée pour la lutte contre les bactéries résistantes, l'introduction de nouvelles familles d'antibiotiques ainsi que la modification et l'amélioration des classes existantes, au cours des six décennies écoulées, n'a pas suffi. Actuellement, des mécanismes de résistance sont rapportés pour tous les antibiotiques disponibles pour un usage clinique dans les domaines de la médecine humaine et de la médecine vétérinaire. C'est pourquoi une gestion efficace des molécules disponibles, de même que la recherche et le développement de nouveaux composés, sont indispensables afin de préserver la santé humaine et animale, des maladies infectieuses de plus en plus agressives en termes de traitements requis (Boerlin et White, 2006 ; Harbottle *et al.*, 2006).

Depuis plus de 20 ans, la résistance des entérobactéries aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) ne cesse de se renforcer notamment par l'acquisition de β -lactamases à spectre étendu (BLSE). De nombreuses études relatent la progression continue à l'échelle mondiale de ce type de résistance (Coque *et al.*, 2008).

L'usage des antibiotiques de la famille des carbapénèmes s'est répandu au cours des dernières années, notamment pour le traitement d'infections causées par des entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération (Lucie *et al.*, 2010). L'émergence de la résistance aux carbapénèmes est l'un des problèmes les plus importants posé par la résistance aux antibiotiques car il existe peu d'alternatives thérapeutiques possibles (Nordmann., 2010).

La résistance aux carbapénèmes chez les entérobactéries résulte essentiellement de deux mécanismes impliquant tous deux des β -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 lié à l'expression de β -lactamases à forte activité hydrolytique vis-à-vis des carbapénèmes, les carbapénémases (Nordmann *et Carrer.*, 2010). Ces enzymes sont les plus importantes d'un point de vue clinique car elles compromettent l'efficacité de presque toutes les β -lactamines (Queenan et Bush., 2007). Les carbapénémases identifiées chez les bacilles à Gram négatif appartiennent aux 3 classes connues de β -lactamases (classes A, B et D de la classification de Ambler) (Bush et Jacoby., 2010). Les carbapénémases de classe A, tels que les KPC inactivent toutes les β -lactamines et ne sont que partiellement inhibées par les inhibiteurs de bêta-lactamase comme l'acide clavulanique, le tazobactam et l'acide boronique. Les carbapénémases de classe B comprennent les métallo- β -lactamases (MBL), qui sont capables d'hydrolyser toutes les β -lactamines, sauf l'aztréonam, ces enzymes sont inhibées *in vitro* en utilisant des chélateurs de métaux, tels que l'EDTA (Meletis., 2016). Les carbapénémases de classe D appartiennent à la famille des oxacillinases. Elles hydrolysent faiblement les carbapénèmes (Jeon *et al.*, 2015).

A ce jour, il n'y a qu'une seule étude qui rapporte la résistance aux β -lactamines chez des souches isolées d'une station d'épuration en Algérie (Alouache *et al.*, 2014), mais aucune étude n'a rapporté la résistance aux carbapénèmes dans les eaux des stations d'épuration dans notre pays. C'est dans ce contexte que nous proposons d'évaluer la résistance des entérobactéries aux carbapénèmes dans différentes STEP de la wilaya de Bourdj Bou Arreridj (B-B-A). Afin de développer ces aspects, nous avons adopté la méthodologie suivante :

- ✓ Prélèvement d'eaux et de boues à partir de différentes stations d'épuration.
- ✓ Isolement et identification des souches.
- ✓ Etude de la sensibilité des souches d'entérobactéries isolées aux antibiotiques.
- ✓ Détermination phénotypique de la résistance aux β -lactamines.

Matériel et méthodes

I. Présentation des STEP de Bordj Bou Arreridj

La wilaya de Bordj Bou Arreridj s'étend du sud de la Kabylie à la région des hauts-plateaux. En 2008, la population de la wilaya était de 628475 habitants. Les prélèvements d'eau et de boue ont été effectués dans trois stations d'épuration à savoir :

- **STEP B-B-A** : le traitement est de type boues activées. Elle est localisée au sud de la ville sur une surface de 42750m². Sa capacité est de 150000 (Eq/H) équivalent habitant, soit un débit journalier de 30000 m³/j. Elle traite les rejets ménagers, industriels et hospitaliers (2 hôpitaux et plus de 5 centres de santé) (ONA, 2015).
- **STEP HAMMADIA** : le traitement se fait par lagunage aéré, elle est située à 6Km au sud du chef-lieu de la wilaya. Elle a une capacité 26061 (Eq/H) équivalent habitant, avec un débit journalier de 594m³/j. cette station traite les rejets ménagers et hospitaliers (1 centre de soin) (ONA, 2015).
- **STEP BIR ISSA** : Le traitement se fait par lagunage naturel. Sa capacité est de 4454 (Eq/H) équivalent habitant et le débit journalier est de 344 m³/j, elle traite que les rejets ménagers (ONA, 2015).

II. Prélèvements

Les échantillons ont été prélevés dans des flacons en verre, de 250 ml stérilisés à l'autoclave et transportés dans une glacière au laboratoire de microbiologique de l'université. Les dates et les sites de prélèvements dans chaque station sont cités dans le tableau I ci-dessous.

Tableau I: sites et dates de prélèvements

La STEP	Date de prélèvements	Sites de prélèvements	Nombres de prélèvements
HAMMADIA	16/02/2016	Entré ;aération ; sortie ; station d'irrigation ; la boue.	10
B-B-A	28/02/2016	Entré ;aération ;les vis ;l'épaississeur ; sortie ; station d'irrigation ; la boue liquide et sèche.	16
BIR ISSA	06/03/2016	Entré ; les quatre bassins ; wed L'KOBS	12

III. Enrichissement et sélection

Nous avons ensemencé 50 ml d'eau à analyser de chaque échantillon, dans 100 ml de bouillon nutritif auquel nous avons ajouté de l'ertapénème et de la vancomycine à des concentrations finales de 0.5 µg /ml et de 16µg/ml respectivement. Les flacons ont été incubés pendant 24h à 48h à 37°C.

IV. Isolement et purification

A partir du bouillon nutritif présentant un trouble après 24 heures d'incubation, nous avons ensemencé deux géloses Mac Conkey, la première additionnée de 0.5 µg/ml d'ertapénème et de 16 µg/ml de vancomycine, et la deuxième additionnée 0.5 µg/ml d'imépénème et de 16 µg/ml de vancomycine. Les boîtes ont été incubées à 37 C° pendant 24 heures. Après 24h d'incubation, les colonies ont fait l'objet de purification par repiquages successifs sur le même milieu d'isolement jusqu'à obtention des souches pures.

V. Identification

Une fois la culture est pure, l'identification est réalisée sur la base :

- L'examen macroscopique des colonies (couleur, taille, forme).
- coloration de Gram.
- Utilisation d'une galerie biochimique classique (TSI, Citrate de Simmon, Bouillon Nitraté, Clark et Lubs, Eau peptonée exempt d'indole, Urée- indole) (Annexe I).

VI. Etude de la sensibilité des entérobactéries aux β-lactamines

La sensibilité de toutes les souches d'entérobactéries vis-à-vis des β-lactamines est testée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du CA-SFM 2015. Les différents antibiotiques testés sont présentés dans le tableau II ci-après :

A partir d'une culture jeune, une suspension bactérienne est préparée en prélevant 3 colonies bien isolées et identiques dans 3 ml d'eau physiologique stérile, bien homogénéiser la suspension bactérienne, sa charge doit être équivalente au standard Mc Farland (correspondant à environ 10^8 UFC/ml). L'interprétation en Sensible (S), Intermédiaire (I) ou Résistant (R) a été faite selon les critères définis par le comité Français de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2013 ; 2015).

Tableau II : Les antibiotiques testés

Antibiotique	Abréviation	Charge (μg)	Sensible (S)	Résistant (R)	Familles
Cefotaxime	CTX	30	≥ 26	< 23	Céphalosporine
Céftazidime	CAZ	30	≥ 26	< 21	Céphalosporine
Amoxicilline+ A/clavulanique	AMC	30	≥ 19	< 19	Pénicilline
Cefoxitine	CX	30	≥ 19	< 15	Céphalosporine
Méropénème	MER	10	≥ 22	< 16	Carbapénème
Imipénème	IPM	10	≥ 22	< 16	Carbapénème

VII. Phénotypes de résistance

VII.1. β -lactamase à spectre étendu (BLSE)

VII.1.1. DD-Test ou test de synergie

La production d'une β -lactamase à spectre étendu a été détectée par le test de la synergie qui consiste à placer des disques de ceftazidime (CAZ), cefotaxime (CTX) à une distance de 20 mm (centre à centre) d'un disque combiné d'amoxicilline et d'acide clavulanique (AMC). L'augmentation de la zone d'inhibition entre le disque d'AMC et les disques de ceftazidime (CAZ), cefotaxime (CTX) indique la production d'une BLSE (Jarlier et al. 1988).

VII.2. Recherche de carbapénémases

VII.2.1. Hodge-Test modifié

Ce test a été réalisé sur les souches qui présentent une résistance ou une sensibilité diminuée à l'imipénème et ou à l'ertapénème.

Le test Hodge modifié (MHT) est un test phénotypique pour la recherche de la production de carbapénémases. Ce test consiste à déposer un disque d'imipénème (10 μg) ou d'ertapénème (10 μg) au centre d'une boîte de gélose Mac Conkey additionné ZnSO₄ préalablement ensemencée avec la souche d'*Escherichia coli* ATCC25922 (sensible à tous les antibiotiques).

Ensuite, la souche à tester, la souche témoin positif (*klebsiella pneumoniae* KPC) collection du laboratoire écologie microbienne) et la souche témoin négatif *E.coli* (ATCC25922) ont été ensemencées sur la gélose sous forme de stries depuis le disque vers le bord de la gélose. L'incubation a été réalisée à 37C°/24h. La déformation de la zone d'inhibition et la formation

d'un trèfle indique la production probable d'une carbapénémase. (Lee et al, 2010 ; CA-SFM, 2013)

VII.2.2. Carba NP test modifié

Le principe de ce test repose sur la mise en évidence d'une acidification du milieu lors de l'hydrolyse de l'imipénème par une carbapénémase. L'indicateur de pH change de couleur (du rouge au jaune) lorsque le milieu devient acide, traduisant la présence d'une carbapénémase (Bakour et al. 2014).

Protocol:

- Imipénème (Tienam®) poudre pour solution injectable IV.
- Tampon de lyse : cetylTrimethyl Ammonium Bromide (CTAB) (Sigma-Aldrich).
- Rouge de phénol en poudre.
- ZnSO₄, H₂O en poudre (BIOCHEM CHEMOPHARMA).
- La solution A (solution contenant l'indicateur de pH) est préparée comme suite :
 - 1- Préparer une solution concentrée de rouge de phénol à 0.5%.
 - 2- Mélanger 2 ml de la solution concentrée de rouge de phénol dans 16.6 ml d'eau distillée.
 - 3- Ajouter au mélange 180 µl d'une solution de ZnSO₄ à 10 Mm.
 - 4- Ajuster le pH à 7 avec une solution de NaOH (1N).

Pour détecter la production d'une carbapénémase, on procède comme suite :

- Dans un tube Eppendorf, mettre 200 µl de tampon de lyse (CTAB 0.02%).
- Suspendre un ose calibré (10µl) de colonies bactériennes dans le tampon de lyse et vortexer 1 à 2 min.
- Transférer 100 µl dans 2 tubes Eppendorf 'A' et 'B'.
- Ajouter 100 µl de solution A dans le tube Eppendorf 'A' et 100 µl de la solution A+ imipénème à 6mg/ml dans le tube Eppendorf 'B'.
- Vortexer 5 sec puis incubé à 37 C° pendant un maximum de 2h.

Préparer les témoins positif et négatif à partir les souches de référence *K. pneumoniae* productrice de carbapénémase et *E.coli* ATCC 25922 sensible. (Bakour et al. 2014)

Tableau III : interprétation des résultats de carba NP test

Tube A	Tube B	Interprétation
Rouge	Rouge	Pas de production carbapénémase
Rouge	Orange/jaune	Production de carbapénémase
Jaune	Jaune	Non interprétable.

VII.2.3. Test des inhibiteurs

Un antibiogramme est réalisé pour les souches testées, des disques d'imipénème et de papier filtre sont déposés sur gélose Mueller Hinton à une distance de 20mm.

On dépose 10 µl d'une solution d'EDTA (inhibe les métallo-enzymes), 10 µl d'une solution de la cloxacilline (Inhibe les céphalosporinases), et 20 µl d'une solution d'acide boronique (Inhibe les céphalosporinases chromosomiques et les KPC) sur les disques d'imipénème et sur les disques de papier filtre vierges centré par disque d'imipénème seul respectivement selon l'image suivante :

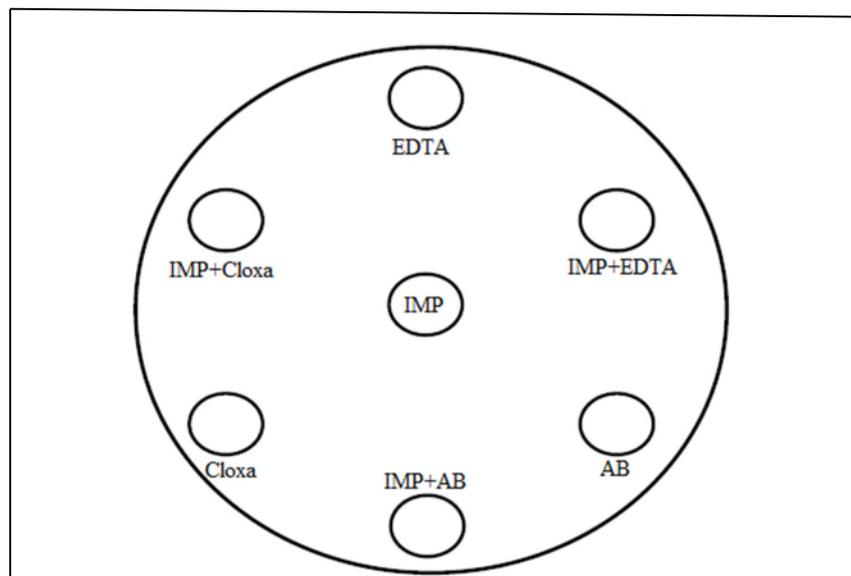


Figure 01 : disposition des disques combinés

Après incubation à 37 C° pendant 24h, un résultat positif se traduit par une augmentation de la zone d'inhibition d'au moins 5 mm entre le disque d'imipénème seul et d'imipénème additionné la solution de l'inhibiteur.

Résultats

38 prélèvements ont été collectés à partir de 03 différentes STEP de la wilaya de B-B-A, sur une période de 05 mois. Notre étude s'est déroulée au laboratoire de Microbiologie à l'université d'Abderrahmane MIRA de Bejaia.

I. Isolats bactériens

L'analyse des prélèvements a permis d'isoler 138 des bacilles à Gram négatif (BGN) des différents STEP. Les figures 02 et 03 ci-dessous, illustrent la répartition des souches isolées par les stations d'épuration étudiées et différents sites de prélèvements.

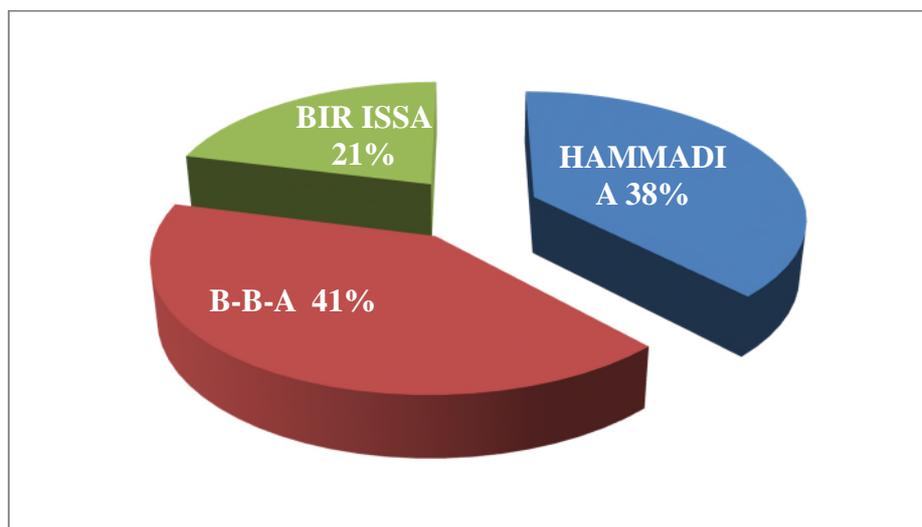


Figure 02 : Répartition des souches par STEP

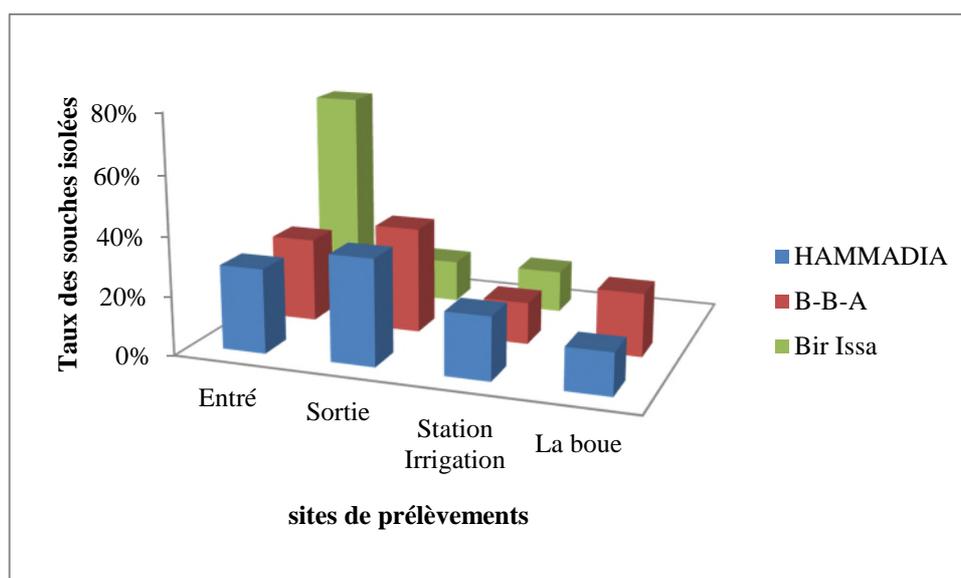


Figure 03 : Répartition des souches par sites de prélèvements

L'identification des souches isolées sur la base des caractères culturaux et à l'aide de la coloration de Gram et la galerie biochimique classique a permis de caractériser 138 bacilles à Gram négatif (BGN) isolés, dont 58 souches (42%) appartenaient au groupe des entérobactéries. (Figure N°04)

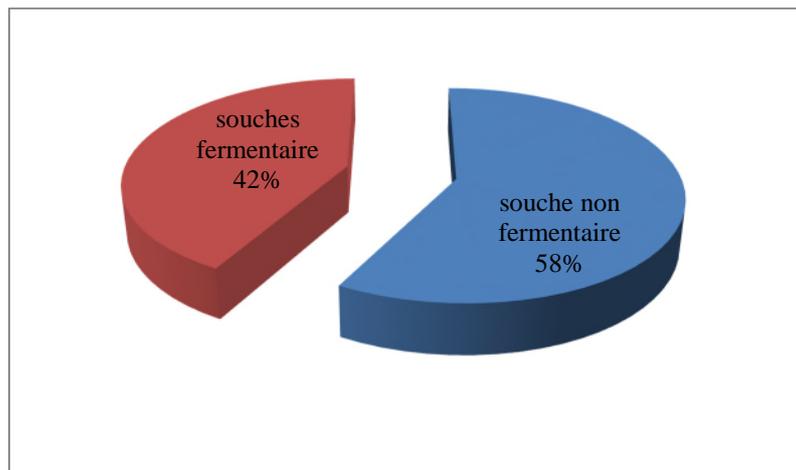


Figure 04: Répartition des bacilles à Gram négatif isolés

La distribution par espèce des souches d'entérobactéries identifiées est présentée dans la figure suivante :

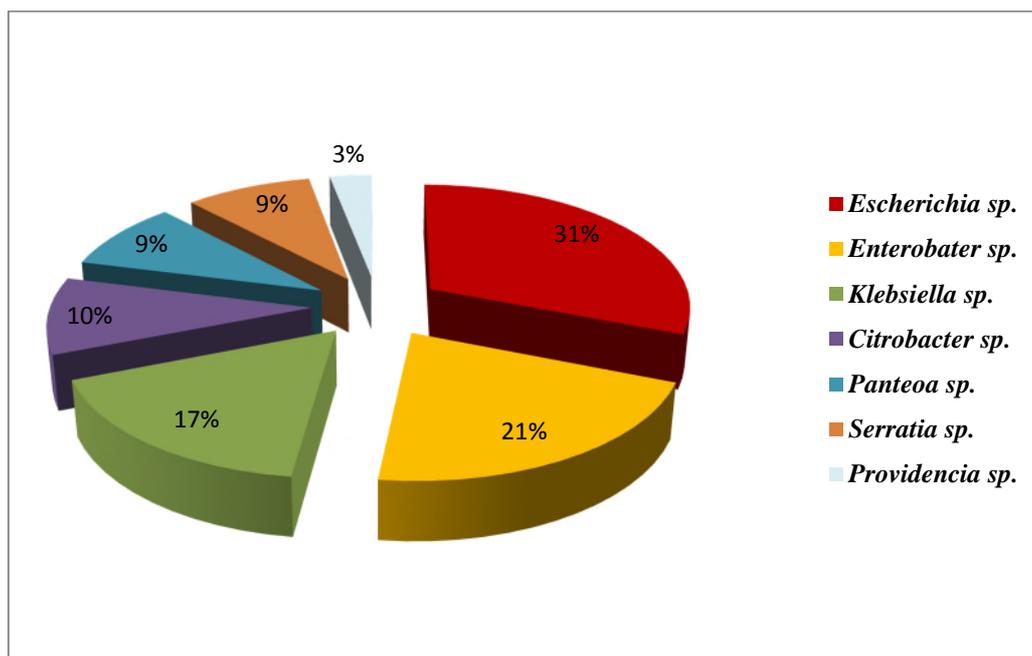


Figure 05 : Répartition des souches par genre

Sur les 58 souches d'entérobactérie isolées, *Escherichia coli* est l'espèce la plus isolée avec un taux de 31%, suivi de *Enterobacter sp.* avec un taux de 21% et *Klebsiella sp.* avec un taux de 17%. *Citrobacter sp.* est isolés avec un taux de 10%. Nous avons obtenu un même taux d'isolement pour *Serratia sp.* et *Panteoa sp.* (9%), et *Providencia sp.* est la moins isolée avec un taux de (3%).

Pour le reste de notre étude, nous nous sommes intéressés uniquement aux souches d'entérobactéries isolées.

II. Sensibilité des souches d'entérobactéries isolées aux β -lactamines

Les résultats du test de sensibilité des entérobactéries isolées aux antibiotiques de la famille de β -lactamines testés sont résumés dans le tableau V ; annexe II.

Les souches d'entérobactéries isolées ont exprimé une résistance élevée vis-à-vis des antibiotiques testés. En effet, toutes les souches (100%) étaient résistantes à amoxicilline+acide clavulanique, 93,10% l'étaient vis-à-vis des carbapénèmes (IMP, MER) testés. Les taux de résistance aux C3G (CTX, CAZ) étaient relativement moins élevés (77,5% et 75,80%). quand aux C2G nous avons remarqué que la Cefoxitine reste relativement l'antibiotique le plus efficace sur les entérobactéries isolées, avec tout de même un taux de résistance de 36,20%. (Figure06) (Annexe II)

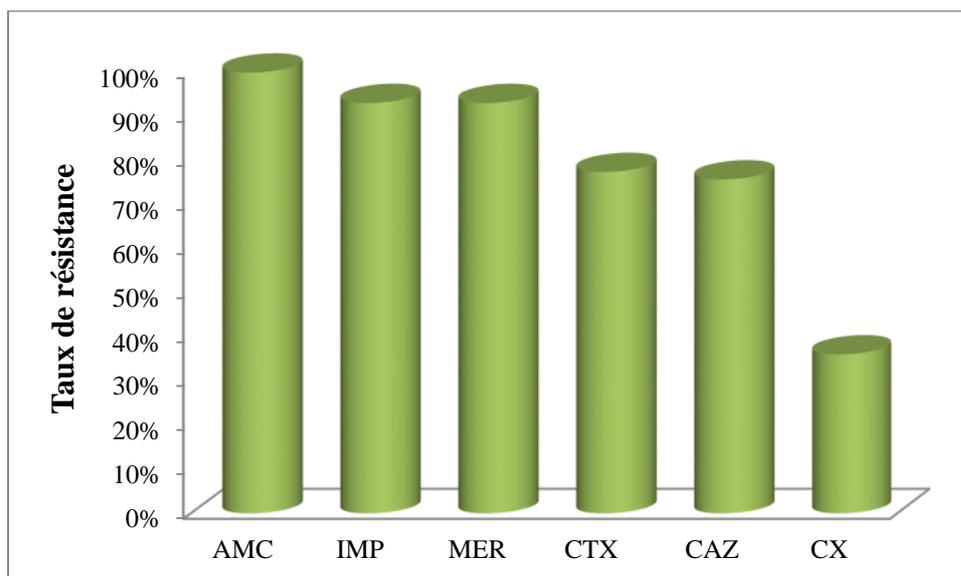


Figure 06 : Taux de résistance des souches aux β -lactamines

III. Caractérisation des phénotypes de résistance aux β -lactamines

III.1. β -lactamases à spectre étendu (BLSE)

Le DD-teste est négatif pour toutes les souches d'entérobactéries isolées. La résistance aux C3G n'est donc probablement pas due à la productrices de BLSE

III.2. Recherche de la production de carbapénémases

III.2.1. Test de Hodge

L'image de trèfle était bien visible pour 44 souches sur les 54 souches d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes testées indiquant que ces dernières produisent une carbapénémase (tableau V)



Figure 07:Résultat de test de Hodge

III.2.2. Carba NP test

La carba NP test effectué sur 54 souches d'entérobactéries a révélé la production de carbapénémases chez 47 souches (tableau V).

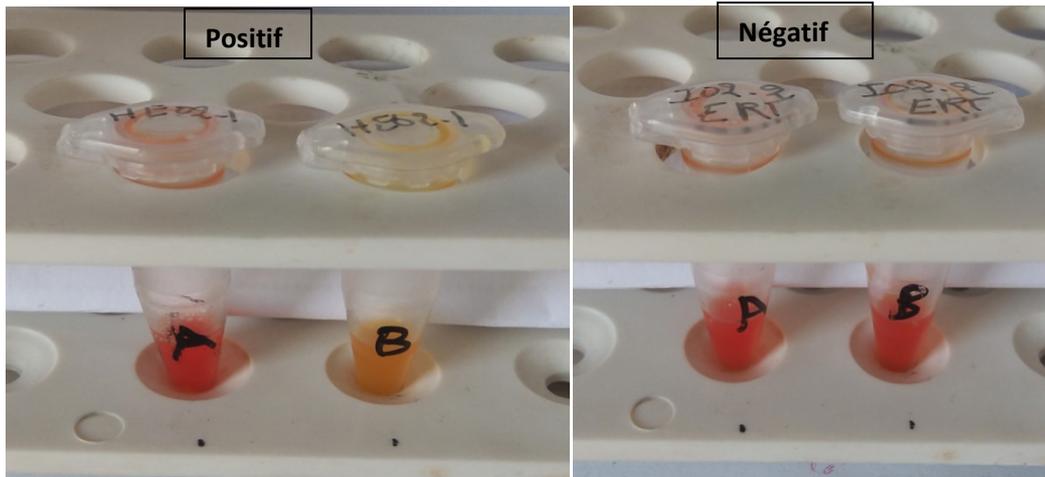


Figure 08: Résultat du carba NP test

III.2.3. Test des inhibiteurs

Les résultats de ce test ont montrés plusieurs phénotypes de résistances selon la sensibilité des souches testées aux inhibiteurs, par l'observation de diamètre d'inhibition autour du disque IMP-inhibiteur supérieur à celui obtenu avec le disque d'IMP seul.

Ce teste à montré que 42 souches étaient probablement productrices d'oxacillinases, 05 souches de métallo β -lactamases, 05 souches de KPC et une souche de AmpC.

Tableau V : Résultats des tests effectués sur les souches d'entérobactéries résistantes isolées au niveau les STEP de B-B-A

	La souche	Code	site	Profile de résistance	teste Hodge	carba	NP test	Test inhibiteur			phénotype
								EDTA	A-boro	Clox	probable
La STEP de HAMMADIA	<i>E.coli</i>	HE01-2 ERT	Entré	IMP MER AMC CTX CAZ	+	+	-	-	-	OXA+autre	
	<i>E.coli</i>	HE02-1 ERT	Entré	IMP MER AMC CTX CAZ	+	+	-	-	-	OXA+autre	
	<i>E.coli</i>	HE02-3 ERT	Entré	IMP MER AMC CTX CAZ	+	+	-	-	-	OXA+autre	
	<i>E.coli</i>	HE02-4 ERT	Entré	IMP MER AMC CTX	-	-	-	-	-	Autre	
	<i>E.coli</i>	HS01-1 ERT	Sortie	IMP MER CX AMC CTX CAZ	+	+	-	+	-	KPC+autre	
	<i>E.coli</i>	HS01-2 ERT	Sortie	IMP MER AMC CTX CAZ	+	+	-	-	-	OXA+autre	
	<i>E.coli</i>	HI01-3 ERT	S.irrigation	IMP MER AMC CAZ	+	+	-	-	-	OXA+autre	
	<i>E.coli</i>	HBA01-2ERT	La boue	IMP MER CTX CAZ AMC CX	+	+	-	-	-	OXA+autre	
	<i>Klebsiella sp.</i>	HA02-1 ERT	Aération	IMP MER CTX CAZ AMC CX	+	+	-	-	-	OXA+autre	
	<i>Klebsiella sp.</i>	HI02-2 ERT	S.irrigation	IMP MER AMC CTX CAZ	+	+	-	-	-	OXA+autre	
	<i>Klebsiella sp.</i>	HBS01 IMP	La boue	IMP MER AMC CTX	+	+	-	-	-	OXA+autre	
	<i>Enterobacter sp.</i>	HS02-1 IMP	Sortie	IMP MER AMC CTX	+	+	+	-	-	OXA+autre	

La STEP de B-B-A	<i>Enterobacter sp.</i>	HA01-2 IMP	Aération	IMP MER AMC CTX CAZ CX	-	+	-	+	-	KPC+autre
	<i>Providencia sp.</i>	HS02-1 ERT	Sortie	IMP MER AMC CTX CAZ	+	+	-	-	-	OXA+autre
	<i>Providencia sp.</i>	HI01-1 IMP	S.irrigation	IMP MER AMC CTX CAZ	+	+	-	-	-	OXA+autre
	<i>Serratia sp.</i>	HS02-3 IMP	Sortie	IMP MER AMC CX CTX	+	+	-	-	-	OXA+autre
	<i>E.coli</i>	BE02-4 ERT	Entré	IMP MER CTX CAZ CX AMC	+	+	+	-	-	MBL+autre
	<i>E.coli</i>	BD01-1 ERT	Dessablage	IMP MER AMC CX CTX CAZ	+	+	-	-	-	OXA+autre
	<i>E.coli</i>	BA01-1 ERT	Aération	IMP MER AMC CTX CAZ CX	+	+	+	+	-	MBL+KPC+autre
	<i>E.coli</i>	BA02-3 ERT	Aération	IMP MER AMC CX CTX CAZ	+	+	-	-	-	OXA+autre
	<i>E.coli</i>	BC01-3-A ERT	Epaississeur	IMP MER AMC CTX CAZ CX	+	+	+	-	-	MBL+autre
	<i>E.coli</i>	BBL01 ERT	La boue	IMP MER AMC CTX CAZ	+	+	-	-	-	OXA+autre
	<i>Klebsiella sp.</i>	BS01-1 ERT	Sortie	IMP MER AMC CTX CAZ	+	+	-	-	-	OXA+autre
	<i>Klebsiella sp.</i>	BBL02IMP	La boue	IMP MER AMC CTX CAZ CX	+	+	-	-	-	OXA+autre
	<i>Klebsiella sp.</i>	BA02-2 ERT	Aération	IMP MER CTX CAZ AMC CX	+	+	-	-	-	OXA+autre
	<i>Klebsiella sp.</i>	BC02-2 ERT	Epaississeur	IMP MER AMC	+	+	-	-	-	OXA+autre
	<i>Citrobacter sp.</i>	BE02-1 ERT	Entré	IMP MER AMC CTX CAZ	-	-	-	-	-	OXA+autre

<i>Citrobacter sp.</i>	BV01-1 ERT	Vis	IMP MER AMC CTX CAZ	+	+	-	-	-	OXA+autre
<i>Citrobacter sp.</i>	BS01-2 ERT	Sortie	IMP MER AMC CTX CAZ CX	-	-	-	+	+	AmpC+autre
<i>Citrobacter sp.</i>	BS02-2-1 ERT	Sortie	IMP MER AMC CTX CAZ	+	+	-	-	-	OXA+autre
<i>Citrobacter sp.</i>	BI01-3-2 ERT	S.irrigation	IMP MER AMC CTX CAZ	+	+	-	-	-	OXA+autre
<i>Serratia sp.</i>	BE01-1 IMP	Entré	IMP MER AMC CTX CAZ CX	-	+	+	+	-	MBL+KPC+autre
<i>Serratia sp.</i>	BC02-1-A ERT	Epaississeur	IMP MER AMC CTX CAZ CX	-	+	-	-	-	OXA+autre
<i>Serratia sp.</i>	BS01-3 IMP	Sortie	IMP MER AMC CTX CAZ CX	-	+	-	-	-	OXA+autre
<i>Serratia sp.</i>	BBL01 IMP	Boue	IMP MER AMC CX CAZ	+	+	+	-	-	MBL+autre
<i>Pontoea sp.</i>	BV02-1 ERT	Vis	IMP MER AMC CX	+	+	-	-	-	OXA+autre
<i>Pontoea sp.</i>	BV02-1-A IMP	Vis	IMP MER AMC CTX CAZ	+	+	-	-	-	OXA+autre
<i>Pontoea sp.</i>	BC02-1 ERT	Epaississeur	IMP MER AMC CTX CAZ	+	+	-	-	-	OXA+autre
<i>Pontoea sp.</i>	BI02-1 ERT	S.irrigation	IMP MER AMC CTX CAZ	+	+	-	-	-	OXA+autre
<i>Enterobacter sp.</i>	BV02-2 ERT	Vis	IMP MER AMC CTX CAZ	+	+	-	-	-	OXA+autre
<i>Enterobacter sp.</i>	BS01-1 IMP	Sortie	IMP MER AMC CTX CAZ	+	+	-	-	-	OXA+autre
<i>Enterobacter sp.</i>	BD02-1 ERT	Dessablage	IMP MER AMC CTX CAZ	+	+	-	-	-	OXA+autre

La STEP de BIR ISSA	<i>Enterobacter sp.</i>	BD01-2 ERT	Dessablage	IMP MER AMC CTX CAZ	+	+	-	-	-	OXA+autre
	<i>E.coli</i>	I01-2 ERT	Entré	IMP MER AMC CX CTX CAZ	+	-	-	-	-	OXA+autre
	<i>Klebsiella sp.</i>	I02-3 ERT	Entré	IMP MER AMC CX CTX CAZ	+	+	+	+	-	MBL+KPC +autre
	<i>Klebsiella sp.</i>	I01-1 ERT	Entré	IMP MER AMC CTX CAZ	-	-	-	-	-	autre
	<i>Klebsiella sp.</i>	I05-2 ERT	Bassin02	IMP MER AMC CTX CAZ	+	+	-	-	-	OXA+autre
	<i>Citrobacter sp.</i>	I02-2 ERT	Entré	IMP MER AMC CAZ CTX CX	+	-	-	-	-	OXA+autre
	<i>Enterobacter sp.</i>	I05-3 ERT	Sortie	IMP MER AMC CTX CAZ	+	+	-	-	-	OXA+autre
	<i>Enterobacter sp.</i>	I08-3 ERT	Bassin03	IMP MER AMC	+	+	-	-	-	OXA+autre
	<i>Enterobacter sp.</i>	I 12 ERT	El-wed	IMP MER AMC CTX CAZ	+	+	-	-	-	OXA+autre
	<i>Enterobacter sp.</i>	I01-3 ERT	Entré	IMP MER AMC CTX CAZ	-	-	-	-	-	autre
	<i>Enterobacter sp.</i>	I03-2 ERT	Bassin01	IMP MER AMC CAZ	-	+	-	-	-	OXA+autre
	<i>Pontoea sp.</i>	I06-1 ERT	Bassin02	IMP MER AMC CTX CAZ	+	+	-	-	-	OXA+autre

Discussion

Les stations d'épuration sont considérées comme des réservoirs de bactéries multirésistantes, elles recueillent des rejets d'origines différentes, exemple des effluents hospitaliers qui sont chargés en bactéries multirésistantes (Brown et *al.*, 2006; Kim et Aga, 2007; Verlicchi, 2012).

Durant cette étude nous nous sommes intéressés à l'antibiorésistance dans les eaux usées des stations d'épurations de la willaya de Bourdj Bou Arreridj.

Sur les 138 souches de bacilles à Gram négatif (BGN) isolées, 80 souches appartiennent au groupe des non fermentant (BGNnF) avec une fréquence d'isolement de 58%, et 58 souches sont des entérobactéries avec une fréquence d'isolement de 42%. Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par Picão et ses collaborateurs au Brésil en 2013, où ils ont identifié des entérobactéries avec un 35,5% dans une station d'épuration (Picão et *al.*, 2013).

Parmi les souches d'entérobactéries isolées, 51 souches sont des coliformes soit un taux de 88%. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Ricardo et ses collaborateurs en 2014, ils ont confirmé l'abondance des coliformes antibiorésistants dans la STEP de León (au nord-ouest Espagne) (Ricardo et *al.*, 2014).

L'étude de la résistance des entérobactéries isolées aux β -lactamines testées montre un taux de résistance de 93,1% vis-à-vis de l'imépénème et méropénème suivi de la résistance aux CTX, CAZ, CX, avec des taux de 77,5%, 75,8%, 36,2% respectivement, en ce qui concerne amoxicilline+A-clavulanique toutes les souches testées sont résistantes. Nos résultats ne sont pas similaires aux ceux rapportés par Picão et ses collaborateurs en 2013, qui ont trouvés un taux de résistance de 20,5%, 16,2%, 55%, 55%, 60,7% pour IMP, MER, CTX, CAZ et CX respectivement, dans une STEP en Brésil (Picão et *al.*, 2013).

Les carbapénèmes sont actifs sur la plupart des entérobactéries. La résistance aux carbapénèmes chez les entérobactéries s'explique essentiellement par deux mécanismes :

- Le premier résulte d'un défaut de perméabilité membranaire par altération qualitative ou quantitative des porines membranaires, voie de pénétration des carbapénèmes dans la bactérie. (Adeline et *al.*, 2012). Ce mécanisme de résistance est probablement apparu dans quatre souches isolées durant notre étude : *E.coli* ; *Citrobacter sp.* ; *Klebsiella sp.* et *Enterobacter sp.*
- Le second correspond à l'inactivation de l'antibiotique par la production de carbapénémases. L'émergence de ces enzymes est décrite de façon croissante dans le monde entier et constitue un réel problème pour la santé publique (Adeline et *al.*, 2012).

Au cours de notre travail la production d'oxacillinasés a été détectée chez 42 souches d'entérobactéries. Parmi elles, 18 souches d'*Escherichia coli* et 08 souches de *Klebsiella pneumoniae*. Nos résultats sont très élevés comparé à ceux rapportés par Galler et ses collaborateurs qui ont détecté pour la première fois la production d'OXA-48 hors des institutions médicales chez *E.coli* et *K.pneumoniae* isolées à partir d'une STEP en Autriche (Galler et al., 2013). Bien que la plupart des ces enzymes aient été décrites presque uniquement chez *A.baumannii* (OXA-23, OXA-24, OXA-58...), certaines ont été isolées d'entérobactéries, notamment OXA-48 (Queenan et al., 2007). Cette enzyme a été identifiée à partir d'un isolat de *K.pneumoniae* en Turquie (2003). Les carbapénèmes de type OXA-48 deviennent de plus en plus répandues chez les entérobactéries dans les régions de l'Afrique du Nord, le Moyen-Orient, la Turquie, la France et l'Allemagne (Nordmann et Poirel, 2014; Dortet et al., 2015).

Durant ce travail, nous avons détecté 05 entérobactéries productrices KPC : 2 *E.coli*, 1 *Enterobacter sp*, 1 *Serratia sp* et 1 *Klebsiella pneumoniae*. Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par Picão et ses collaborateurs, qui ont détecté la production de KPC chez *Enterobacter sp*, *Serratia sp*. et aussi *K.pneumoniae* dans une station d'épuration au Brésil (Picão et al., 2013). Galler et ses collaborateurs, ont isolé une souche de *K.pneumoniae* productrice de KPC pour la première fois dans une station d'épuration en Autriche (Galler et al., 2013).

Les enzymes de type KPC sont les carbapénèmes de classe A les plus fréquentes et les plus menaçantes, du fait de leur pouvoir de dissémination important. La première souche productrice de KPC a été identifiée en 1996 en Caroline du Nord aux États-Unis dans une souche de *K. pneumoniae* (Yigit et al., 2001). Cette découverte fut rapidement suivie par la description de 22 autres variantes (<http://www.lahey.org/Studies/>). Ce sont des enzymes plasmidiques, ce qui leur a permis de diffuser dans de nombreuses espèces comme *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Enterobacter sp.*, *Salmonella sp.*, et même *P. aeruginosa* et *A. baumannii*. (Miriagou et al., 2003 ; Bratu et al., 2005 ; Villegas et al., 2007 ; Robledo et al., 2010).

Dans notre étude, nous avons détecté 05 souches productrices de MBL, 02 *Serratia sp* et 03 *E.coli*. Nos résultats ne sont pas similaires à ceux rapportés par Walsh et ses collaborateurs qui ont étudié la présence de *bla_{NDM-1}* dans la STEP de Gardiff en Inde ou aucune souche productrice de MBL n'a été rapportée. Il existe de nombreux types de MBL regroupées dans plusieurs familles: VIM, IMP, GIM, SIM, SPM ou NDM. Les gènes des MBL de type VIM

ou IMP peuvent présenter des localisations plasmidiques ou chromosomiques (Grall *et al.*, 2011). L'enzyme NDM-1 (New Delhi metallo- β -lactamase) a été décrite pour la première fois en 2008 chez une souche de *K. pneumoniae* chez un patient Suédois ayant séjourné en Inde, pays dans lequel cette enzyme a diffusé très rapidement, tant en milieu hospitalier qu'en milieu communautaire (Yong *et al.*, 2009 ; Kumarasamy *et al.*, 2010). Depuis cette description, NDM-1 s'est propagée dans le monde entier et elle est aujourd'hui l'une des carbapénèmases les plus communes parmi les entérobactéries et *A. baumannii* (Diene et Rolain, 2014). En Algérie, ces enzymes sont isolées pour la première fois chez *A. baumannii* par Boulanger et al, en 2012 (Boulanger *et al.*, 2013) ; puis par Bakour et ses collaborateurs, en 2014 (Bakour *et al.*, 2014).

CONCLUSION

Suite à l'amélioration des soins médicaux, à l'allongement de l'espérance de vie et à l'industrialisation progressive de l'agriculture, la quantité de médicaments consommés a augmenté. Par conséquent, ces résidus peuvent passer à travers les stations d'épuration et atteindre les eaux de surface comme les rivières et les lacs.

Sur les 38 prélèvements effectués dans les 3 STEP de BBA, 138 souches des bacilles à Gram négatif ont été isolées et identifiées, dont 58 entérobactéries, les autres souches étaient identifiées comme des bacilles à Gram négatif non fermentaires.

La sensibilité des entérobactéries aux β -lactamine est exprimée par des taux élevés de résistances aux antibiotiques testés et notamment vis-à-vis des carbapénèmes (93,10%). Les résultats de Hodge test montrent que 44/58 entérobactéries sont productrices carbapénémases alors que 52/58 souches ont exprimé un carba NP test positif soit un taux de 68% d'entérobactéries productrices carbapénémases (EPC). Les résultats des phénotypes probables de résistance aux β -lactamines ont révélé que 42 souches étaient probablement productrices d'oxacillinases, 05 souches de métallob β -lactamases, 05 souches de KPC, une souche de AmpC et aucune ne produit une BLSE.

Notre étude montre que les stations d'épuration sont des réservoirs de bactéries résistantes aux carbapénèmes, Cela peut constituer une menace pour l'environnement mais aussi pour la santé humaine. Donc la surveillance de l'évolution de la résistance aux antibiotiques dans le temps et dans l'espace nous permettra d'éviter plusieurs impasses thérapeutiques.

Les résultats obtenus au cours de notre étude restent préliminaire et méritent d'être exploités et complétés par :

- ✚ Identification de types de carbapénémase par des réactions de PCR et séquençage des gènes.
- ✚ Recherche des gènes de résistance aux autres familles d'antibiotiques.
- ✚ Elargir la période d'étude afin d'avoir des résultats représentatifs et significatifs, ou sera pris en compte un nombre plus considérable de groupe bactériens à savoir les Gram positif et d'autres bactéries à Gram négatif.
- ✚ Suivre l'évolution de la résistance dans les environnements avoisinant les STEP, afin d'évaluer mieux la dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement.

Références bibliographiques

A

Adeline A, Pantel A, Sotto A, Lavigne JP. (2012). Les entérobactéries productrices de carbapénémases. Lettre d'information du CCLin Sud-Est destinée aux Acteurs de la Lutte contre les Infections Nosocomiales & Associées aux Soins.

ALOUACHE S, ESTEPA V, MESSAI Y, BAKOUR R. (2014). Characterization of ESBLs and associated quinolone resistance in *Escherichia coli* and *klebsiella pneumoniae* isolates from an urban wastewater treatment plant in Algeria. *Microbial Drug Resistance*. 20(1):30-8. Doi: 10.1089.

B

Bakour S, Alsharapy SA, Touati A, Rolain JM. (2014). Characterization of *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates Carrying blaOXA-23 Carbapenemase and 16S rRNA Methylase armA genes in Yemen. *Microbial Drug Resistance*. 20:604-9.

Bakour S, Touati A, Bachiri T, Salhi F, Tiouit D, Naim M, Azouaou M, Rolain JM. (2014). First report of 16S r RNA methylase ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* and rapid spread of metallo- β -lactamase NDM-1 in Algerian hospitals. *Microbial Drug Resistance*. 10.1099/.

BOERLIN P, WHITE DG. (2006). Antimicrobial resistance and its epidemiology. In : Giguère S., Prescott J.F., Baggot J.D., Walker R.D., Dowling P.M. (Eds), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, Fourth Edition. Blackwell publishing : Ames, 27-43.

Bratu S, Landman D, Alam M, Tolentino E, Quale J. (2005). Detection of KPC carbapenem hydrolyzing enzymes in *Enterobacter spp* . *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 49:776-8.

Brown KD, Kulis J, Thomson B, Chapman TH, Mawhinney DB. (2006). Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Science of the Total Environment*. 366, 772e783.

Bush K, Jacoby GA. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 54:969-76.

T

Coque T, Baquero F, Canton R. (2008). Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Eurosurveillance. Euro Surveillance.* 13(47): 1-11.

Coralie D, Irène L, Véronique P, Géraldine R. (2002). Effluents des établissements hospitaliers : teneur en microorganismes pathogènes, risques sanitaires, procédures particulières d'épuration et de gestion des boues. Office international de l'eau, Service National d'Information et de Documentation sur l'Eau.

D

Daniele V, Sueli T. (2016). Phenotypic Tests for the Detection of β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Isolated from Different Environments. *Journal of clinical microbiology.* DOI: 10.1007/s00284-016-1036-6

Diene SM, Rolain JM. (2014). Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clinical Microbiology and Infection.* 20:831-8.

Dortet L, Oueslati S, Jeannot K, Tandé D, Naas T, Nordmann P. (2015). Genetic and biochemical characterization of OXA-405, an OXA-48-type extended-spectrum β -lactamase without significant carbapenemase activity. *Antimicrobial Agents Chemotherapy.* 59:3823-8.

G

Galler H, Feierl G, Petternel C, Reinthaler F, Haas D, Grisold A J, Luxner J, Zarfel G. (2013). KPC-2 and OXA-48 carbapenemase harbouring Enterobacteriaceae detected in an Austrian wastewater treatment plant. *Clinical Microbiology and Infection.* 10.1111/1469-0691.12336

Grall N, Andremont A, Armand-Lefèvre L. (2011). Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse ? *Anti-Infective Agents.* 16 : 1-16.

H

Hannachi A, Gharzouli R, Djellouli tabet Y.(2013). Gestion et valorisation des eaux usées en Algérie. *Larhyss Journal*, 1112-3680, n°19, pp. 51-62

Harbottle H, Thakur S, Zhao S, White DG. (2006). Genetics of antimicrobial resistance. *Animal Biotechnol.* 17, 111-124.

Helmut B, Nadine C, Andri B. (2015). Diffusion de la résistance aux antibiotiques dans l'eau. *German acronym for eidgnossische anstal fur wasserversorgung, abwasserreinigung und gesserschutz.*

I

Jarlier V, Nicolas M, Fournier G, Phillipon A. (1988). ESBLs conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae; hospital prevalence and susceptibility parterns. *Reviews Infectious Diseases.* 1988;10:867-78.

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. *International Journal Molecular Sciences.* 16(5), 9654-9692.

K

Khan A, Nordmann P (2012). Spread of carbapenemase NDM-1 producers: The situation in India and what may be proposed. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 44: 531–535 ISSN 0036-5548 print/ISSN 1651-1980 online © Informa Healthcare DOI: 10.3109/00365548.2012.669046

Kim S, Aga DS. (2007). Potential ecological and human health impacts of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria from wastewater treatment plants. *Journal Toxicology and Environmental Health, Part B : Critical Reviews*;10:559–73.

L

Lucie B, Lise-Andrée, Marie G. (2010). Prévention et contrôle de la transmission des entérobactéries productrices des carbapénémases dans le milieu de soin aigus de Québec. TRIMESTRE 2010, BIBLIOTHÈQUE ET ARCHIVES NATIONALES DU QUÉBEC, BIBLIOTHÈQUE ET ARCHIVES CANADA, ISBN : 978-2-550-60425-9 (VERSION IMPRIMÉE), ©Gouvernement du Québec.

M

Martínez JL. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*. 157, 2893–2902.

Merlin C, Bonot S, Courtois S, Block JC. (2011). Persistence and dissemination of the multiple-antibiotic-resistance plasmid pB10 in the microbial communities of wastewater sludge microcosms. *Water Research*. 45, 2897–2905.

Munir M, Wong K, Xagorarakis I. (2011). Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. *Water Research*. 45, 681–693.

N

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

Nordmann P, Carrer A. (2010). Les carbapénémases des entérobactéries. *Archives de Pédiatrie*. 17, 154-162.

Nordmann P, Poirel L. (2014) The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014; 20:821-30.

Novo A, Manaia C. (2010). Factors influencing antibiotic resistance burden in municipal wastewater treatment plants. *Applied Microbiology Biotechnol.* 87, 1157–1166.



Office National de l'Assainissement Direction de l'Exploitation et de la Maintenance, 2015. Tableau de bord mensuel



Picão RC, Juliana PC, Eloiza HC, Adriana GN, Fernanda VB, Diego MA, Luiz J , Ana CG. (2013).The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the environment: focus on the occurrence of KPC-producing *Aeromonas* spp. and Enterobacteriaceae in sewage. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 76 80–85

Poirel L, Héritier C, Nordmann P. (2004) Chromosome-encoded ambler class D beta-lactamase of *Shewanella oneidensis* as a progenitor of carbapenem-hydrolyzing oxacillinase. *Antimicrobial Agents Chemotherapy.* 48:348-51.



Queenan AM, Bush K. (2007) Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*;20:440–58.



Rahube, T. O., et Yost, C. K. (2010). Antibiotic resistance plasmids in wastewater treatment plants and their possible dissemination into the environment. *African Journal of Biotechnology.* 9, 9183–9190.

Ricardo SC, María HV, Elisabet M, José LB, Eloy B. (2014). Prevalence of antibiotic-resistant fecal bacteria in a river impacted by both an antibiotic production plant and urban treated discharges. *Science of the Total Environment* 488–489 220–227

Robledo IE, Aquino EE, Santé MI, Santana JL, Otero DM, León CF, Vázquez GJ. (2010). Detection of KPC in *Acinetobacter spp.* in Puerto Rico. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **54**: 1354-7.

J

Szczepanowski R, Linke B, Krahn I, Gartemann K H, Gützkow T, Eichler W, Pühler A, Schlüter A. (2009). Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. *Microbiology* 155, 2306–2319.

V

Verlicchi P, Al Aukidy M, Galletti A, Petrovic M, Barcelo D. (2012). Hospital effluent: investigation of the concentrations and distribution of and environmental risk assessment. *Science of Total Environment*;430C:109–18.

Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP; Colombian Nosocomial Resistance Study Group.(2007). First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing betalactamase. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **51**:1553-5.

W

Walther-Rasmussen J, Høiby N.(2006). OXA-type carbapenemases. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. **57**:373-83.

<http://www.lahey.org/Studies/>

www.sante.dz

X

Xanthoulis D. (1993). Valorisation agronomique des eaux usées des industries agro-alimentaire.

Y

Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. (2001). Nouvel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae* . *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2001; **45**:1151-61.

Z

Zhang T, Zhang XX, Ye L. (2011). Plasmid metagenome reveals high levels of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in activated sludge. *PLoS ONE* 6, e26041.

Zhang T, Shao MF, et Ye L. (2012). 454 pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *International Society for Microbial Ecology Journal*. 6, 1137–1147.

Annexe

Annexe I

Test de la galerie biochimique classique

Milieu	Mode d'ensemencement	Caractères recherchés	Résultats
TSI	Ensemencement par des colonies bactériennes de la pente de la gélose par des stries serrées, puis le culot par pique profonde et centrale. Incubation à 37 C°/ 24h.	-Glucose -Lactose -Production de gaz -Production d'H ₂ S	Lactose + : virage au jaune de la pente. Glucose + : virage au jaune du culot. Gaz + : apparition de bulles d'air. Production d'H₂S : noircissement de milieu.
Citrate de Simmon	Ensemencement par stries séries de la pente. Incubation à 37 C°/24h.	-Utilisation de Citrate	Citrate + : virage de la couleur verte au bleu due à l'alcalinisation.
Bouillon nitraté	Ensemencement du bouillon à partir de la suspension. Incubation à 37 C°/ 24h.	-Réduction de nitrate e nitrite	Nitrate réductase + : virage au rouge après l'ajout des deux réactifs NRI et NRII. Nitrate réductase - : virage au jaune de milieu.
Clark et Lubs	Ensemencement du milieu avec quelques gouttes de la suspension bactérienne, puis incubée à 37 C° pendant 24h.	-Type fermentaire.	VP + : couleur rouge cerise après l'ajout de VPI et VPII RM + : couleur rouge après l'ajout de réactif RM.
Eau peptoné exempt d'indol	L'ajout de quelques gouttes de la suspension bactérienne au milieu. Incubation à 37 C°/24h et autre à 44°C/24h.	-Production d'indole	Indole + : apparition d'un anneau rouge en surface après ajout de réactif Kovaks.
Urée	L'ajout de quelques gouttes de la suspension bactérienne au milieu. Incubation à 37 C°/24h.	-Présence de l'uréase	Uréase + : virage de la couleur du milieu au rose.

Annexe II

Profile de sensibilité aux β -lactamines

Souche	Code	IMP	MER	CTX	CAZ	AMC	CX
<i>E.coli</i>	HE01-2 ERT	I	I	I	I	R	R
<i>E.coli</i>	HE02-1 ERT	I	I	I	I	R	R
<i>E.coli</i>	HE02-3 ERT	I	I	I	I	R	R
<i>E.coli</i>	HE02-4 ERT	R	R	I	S	R	S
<i>E.coli</i>	HS01-1 ERT	I	I	I	I	R	S
<i>E.coli</i>	HS01-2 ERT	I	I	I	I	R	S
<i>E.coli</i>	HI01-3 ERT	I	I	I	I	R	I
<i>E.coli</i>	HBA01-2ERT	R	R	R	R	R	R
<i>Klebsiella sp.</i>	HA02-1 ERT	I	R	R	R	R	S
<i>Klebsiella sp.</i>	HI02-2 ERT	R	I	I	I	R	I
<i>Klebsiella sp.</i>	HBS01 IMP	R	R	I	I	R	R
<i>Enterobacter sp.</i>	HS02-1 IMP	R	R	I	R	R	S
<i>Enterobacter sp.</i>	HA01-2 IMP	R	R	R	R	R	R
<i>Providencia sp.</i>	HS02-1 ERT	I	R	I	I	I	S
<i>Providencia sp.</i>	HI01-1 IMP	R	I	I	I	R	I
<i>Serratia sp.</i>	HS02-3 IMP	I	I	I	R	R	S
<i>E.coli</i>	BE02-4 ERT	I	I	I	I	R	I
<i>E.coli</i>	BD01-1 ERT	I	I	I	I	R	R
<i>E.coli</i>	BA01-1 ERT	I	I	I	I	R	R
<i>E.coli</i>	BA02-3 ERT	R	I	I	I	R	R
<i>E.coli</i>	BC01-3-A ERT	R	R	R	R	R	R
<i>E.coli</i>	BBL01 ERT	I	I	I	I	R	S

<i>Klebsiella sp.</i>	BS01-1 ERT	R	I	R	R	R	I
<i>Klebsiella sp.</i>	BBL02IMP	R	R	I	R	R	S
<i>Klebsiella sp.</i>	BA02-2 ERT	I	I	R	R	R	S
<i>Klebsiella sp.</i>	BC02-2 ERT	I	I	S	S	R	S
<i>Citrobacter sp.</i>	BE02-1 ERT	R	I	R	R	R	R
<i>Citrobacter sp.</i>	BV01-1 ERT	I	I	I	I	R	I
<i>Citrobacter sp.</i>	BS01-2 ERT	R	R	R	R	R	R
<i>Citrobacter sp.</i>	BS02-2-1 ERT	I	I	R	R	R	R
<i>Citrobacter sp.</i>	BI01-3-2 ERT	I	I	I	I	R	R
<i>Serratia sp.</i>	BE01-1 IMP	I	I	R	R	R	R
<i>Serratia sp.</i>	BC02-1-A ERT	R	I	R	R	R	R
<i>Serratia sp.</i>	BS01-3 IMP	R	I	R	R	R	R
<i>Serratia sp.</i>	BBL01 IMP	R	R	I	R	R	R
<i>Pontoea sp.</i>	BV02-1 ERT	I	I	R	R	R	R
<i>Pontoea sp.</i>	BV02-1-A IMP	I	I	S	S	R	S
<i>Pontoea sp.</i>	BC02-1 ERT	R	I	I	I	R	I
<i>Pontoea sp.</i>	BI02-1 ERT	I	I	I	I	R	I
<i>Enterobacter sp.</i>	BV02-2 ERT	I	I	I	I	R	I
<i>Enterobacter sp.</i>	BS01-1 IMP	R	I	R	R	R	I
<i>Enterobacter sp.</i>	BD02-1 ERT	I	I	I	I	R	I
<i>Enterobacter sp.</i>	BD01-2 ERT	I	I	I	I	R	I
<i>E.coli</i>	I01-2 ERT	I	I	I	I	R	S
<i>Klebsiella sp.</i>	I02-3 ERT	R	I	I	I	R	I
<i>Klebsiella sp.</i>	I01-1 ERT	I	I	I	I	R	I
<i>Klebsiella sp.</i>	I05-2 ERT	I	I	S	S	R	S
<i>Citrobacter sp.</i>	I02-2 ERT	I	I	R	R	R	R

<i>Enterobacter sp.</i>	I05-3 ERT	I	I	I	I	R	S
<i>Enterobacter sp.</i>	I08-3 ERT	I	I	S	S	R	S
<i>Enterobacter sp.</i>	<i>I 12 ERT</i>	I	I	S	I	R	I
<i>Enterobacter sp.</i>	I01-3 ERT	I	I	I	I	R	I
<i>Enterobacter sp.</i>	<i>I03-2 ERT</i>	I	I	S	I	R	S
<i>Pontoea sp.</i>	I06-1 ERT	I	I	I	I	R	I
<i>Pontoea sp.</i>	HA01-2ERT	S	S	S	S	R	S
<i>E.coli</i>	BI01-3-1ERT	S	S	S	S	R	R
<i>E.coli</i>	I10-1ERT	S	S	R	R	R	R
<i>E.coli</i>	BE01-1ERT	S	S	I	I	R	I

Annexe III

Composition des milieux de culture (pour 1L d'eau distillée)

(Guiraud,2003)

Bouillon nutritif :

Peptone.....	10g
Chlorure de sodium.....	.05g
Extrait de viande.....	.05g
PH :	7,2

Gélose Mac Conkey :

Peptone de caséine.....	17g
Peptone de viande.....	.03g
Lactose.....	10g
Mélange de sels biliaires.....	1,5g
Chlorure de sodium.....	.05g
Rouge neutre.....	.0,03g
Cristal violet.....	.0,001g
PH :	7,4

Gélose Mueller Hinton :

Infusion de viande de bœuf.....	.03g
Hydrolysate de caséine.....	17,5g
Amidon.....	1,5g
Agar.....	17g

PH :7,4

Gélose TSI(Tree Sugar and Ion) :

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

PH : 7.4

Milieu de Citrate de Simmons :

Citrate de sodium.....	02g
Chlorure de sodium.....	05g
Sulfate de magnésium.....	0.2g
Phosphate monoammoniaque.....	01g
Phosphate bipotassique.....	0.01g
Bleu de bromothymol.....	0.08g
Agar.....	15g

PH :7.0-7.2

Bouillon nitraté :

Bouillon nutritif.....	1l
Nitrate de potassium.....	1g

Eau peptoné :

Peptone exempte d'indole.....	15g
Chlorure de sodium.....	5g

PH :7.2

Milieu Urée-Indole :

L-tryptophane.....	0.03g
Phosphate monopotassique.....	0.01g
Phosphate bipotassique.....	0.01g
Chlorure de sodium.....	0.05g
Urée.....	20g
Alcool à 95.....	10ml
Rouge de phénol.....	0.025g

PH :7

Milieu Clark –Lubs :

Peptone tryptique de viande.....	0.05g
Phosphate bipotassique.....	0.05g
Glucose.....	0.06g

PH :7

Gélose nutritive :

Extrait de viande.....05g

Peptone.....10g

Chlorure de sodium.....05g

Agar.....20g

PH : 7

Annexe IV

Composition des réactifs utilisés

Réactif de Griess (NRI et NRII) :

NRI :

Acide sulfanilique.....0.8ml

Acide acétique 5N.....100ml

NRII :

Diméthylamine.....0.6ml

Acide acétique 5N.....100ml

Réactif de Kovacs :

P-diméthylaminebenzaldéhyde.....10ml

Acide chloridrique.....50ml

Alcool amylique.....150ml

Réactif de Voges-Proskauer (VPI-VPII) :

VPI :

α -naphthol.....6g

Alcool à 90°.....100ml

VPII :

NaOH 4N

Rouge de méthyle (RM) :

Rouge de méthyle.....0.5g

Alcool éthylique à 60 %.....100ml

Résumé

La station d'épuration peut être une source de propagation et de transfert de la résistance bactérienne dans l'environnement hydrique. L'analyse d'eaux usées des STEP de B-B-A est effectuée pour la recherche des entérobactéries résistantes.

L'identification des souches est basée sur la coloration de Gram et la galerie biochimique classique. La sensibilité des entérobactéries aux β -lactamines est réalisée par la méthode de l'antibiogramme standard. La résistance de ces souches aux carbapénèmes est déterminée par différentes méthodes phénotypiques, le carba-NP test modifié, le test de Hodge modifié et le test aux inhibiteurs.

Sur les 38 prélèvements effectués, 138 souches à Gram négatif sont isolées, 58 souches appartiennent aux entérobactéries et 80 souches appartiennent aux autres genres de bacilles Gram négatif. La sensibilité de ces souches aux β -lactamines a révélé que toutes les entérobactéries isolées sont résistantes à l'AMC, 93,1%, 93,1%, 77,5%, 75,5%, 36,2% sont résistantes respectivement à les carbapénèmes (IMP, MER), CTX, CAZ, et CX.

Les résultats de Hodge test montrent que 44/58 entérobactéries sont productrices carbapénémases alors que 47/58 souches ont exprimé un carba NP test positif soit un taux de 81% d'entérobactéries productrices carbapénémases (EPC). Les résultats des phénotypes probables de résistance aux β -lactamines ont révélé que 42 souches étaient probablement productrices d'oxacillinasés, 05 souches de métallobactémases, 05 souches de KPC, une souche de AmpC et aucune ne produit une BLSE.

Notre étude montre que les stations d'épuration sont des réservoirs de bactéries résistantes aux carbapénèmes, Cela peut constituer une menace pour l'environnement mais aussi pour la santé humaine.

Mots clés : STEP, Entérobactéries, β -lactamines, résistance, phénotypes de résistance.

Abstract:

Wastewater treatment plant could be the source of the spread and transfer bacterial resistance in the aquatic environment. The wastewater of B-B-A WWTP analysis is performed to search the resistant *Enterobacteriaceae*.

The identification of strains is based on Gram stain and classical biochemical gallery. The sensitivity of *Enterobacteriaceae* to β -lactamine is carried out by the standard methods of the antibiogram. The resistance of these strains to carbapenems is determined by different phenotypic methods, carba-NP test modified, the Hodge test modified and the test inhibitors.

Of the 38 samples collected, 138 Gram-negative strains are isolated, 58 strains belong to *Enterobacteriaceae* and 80 strains belong to other kind Gram-negative bacilli. The sensitivity of this strains to β -lactamines revealed that all of BGN isolated are resistant to AMC, 93,1%, 93,1%, 77,5%, 75,5%, 36,2% respectively are resistant to carbapenem (IMP, MER), CTX, CAZ, and CX.

The results of Hodge test show that 44/58 are carbapenemases-producing *Enterobacteriaceae* while 47/58 strains expressed a positive carba NP test for a rate of 81% of carbapenemases-producing *Enterobacteriaceae* (CPE). The results of the probable phenotypes β -lactam resistance showed that 42 strains were probably producing oxacillinases, 05 strains of metallo β -lactamases, 05 strains of KPC, a strain AmpC and none product ESBL.

Our results show that the wastewater are a reservoir of resistant bacteria, it can be a threat to the environment but also to human health.

Keywords: WWTP, *Enterobacteriaceae*, β -lactamines, resistance, resistance phenotypes.