



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR & DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE ABDERRAHMANE MIRA DE BEJAIA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

MEMOIRE DE MAGISTER

Option Microbiologie Appliquée aux substances antimicrobiennes

Thème

Caractérisation phénotypique des mécanismes
de résistance aux antibiotiques des souches
d'*Escherichia coli* isolées de la station
d'épuration d'Aokas (Béjaia)

Présenté par

M^{me} Rima TAFOUKT

Devant le jury :

M ^r IGUEROUADA M.A. Professeur à l'Université de Béjaia	Président
M ^r IDOUI T. Maitre de conférences à l'Université de Jijel	Examineur
M ^r NABTI A.H. Maitre de conférences à l'Université de Béjaia	Examineur
M ^r TOUATI A. Maitre de conférences à l'Université de Béjaia	Promoteur

2011

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le directeur de ce mémoire, Mr A. TOUATI Maitre de conférences de l'université de Béjaïa, pour m'avoir fait confiance, pour m'avoir guidé, encouragé, conseillé, en me laissant une grande liberté pour mener à bien ce travail. Au travers de nos discussions, il m'a apporté une compréhension plus approfondie des divers aspects du sujet.

J'adresse mes remerciements à :

Mr Iguerouada Professeur à l'université de Béjaïa, qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury.

Mr Idoui Maitre de conférences à l'université de Jijel, et Mr Nabti Maitre de conférences à l'université de Béjaïa, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je souhaite aussi remercier le personnel de la station d'épuration d'Aokas, à leur tête le directeur, Mr TABOURI, et plus particulièrement M^{lle} M. TOUATI pour sa disponibilité précieuse et sa gentillesse à chaque prélèvement effectué.

Je remercie M^{me} Gharout, Mr Belhadi, M^{me} Bendalli, M^{me} Boullila, pour leurs encouragements et pour les discussions que nous avons eues aux moments où je manquais de repères.

Mes remerciements vont à l'égard de toute l'équipe du Laboratoire de Microbiologie tout particulièrement à mes amies: Salima, Karima et Sabrina. Mais aussi : Betty, sofiane, Karima, Ibtissem, Samiha, Bania, Fahima, Mohamed et tous les autres, pour leur soutien et tous les bons moments passés ensemble. Sans oublié ma mina.

Enfin, un grand merci à toute ma famille. Pour l'amour, le soutien, les précieux encouragements, la patience et la confiance à mon égard sans quoi je n'aurais jamais pu mener à bien ce travail. Aucun mot ne pourrait vous exprimer tout mon amour.

DEDICACE

Je dédie ce travail

A

Mes très chers et précieux parents,

Pour m'avoir encouragé et soutenu durant mes études

Mes frères et sœurs

Mon adorable nièce et son papa

Ma grand-mère

Ainsi qu'à tous mes amis (es)

et

Toute la promotion de magister (2009)

Liste des abréviations

ATB : Antibiotique

C1G : Céphalosporines de 1^{ère} Génération

C2G : Céphalosporines de 2^{ème} Génération

C3G : Céphalosporines de 3^{ème} Génération

C4G : Céphalosporines de 4^{ème} Génération

CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CTX-M : Céfotaximase- Munich

DD-test : Double Disque test

EDTA : Ethylene-Diamine-TetraAcétate

EMB : Eosine-Bleu de Méthylène

I : intermédiaire

LPS : Lipo-PolySaccaride

ME : Membrane Externe

MI: Membrane Interne

NDM-1: New Delhi Métallo- β -Lactamase

Omp : Outer Membrane Protein

R : résistant

S : Sensible

SHV: Sulfhydrique Variable

STEP Station d'Épuration

TEM: Temmory

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Sources et mouvements des gènes de résistance aux antibiotiques dans l'environnement	11
2	Enveloppe d' <i>Escherichia coli</i>	15
3	Représentation schématique des cinq familles de pompes d'efflux	16
4	Mécanisme d'hydrolyse d'une β -lactamine par une β -lactamase	17
5	Représentation schématique d'un intégron	23
7	Schéma synoptique de la STEP d'AOKAS	28
8	Technique de transfert plasmidique par conjugaison	34
9	Taux de résistance globaux des souches aux C3G	41
10	Taux de résistance des souches aux autres β -lactamines.	43
11	Images de DD-test des Souches <i>E.coli</i> 14 et <i>E.coli</i> 36.	44
12	Distribution des Phénotypes de résistance aux β -lactamines des souches d' <i>E.coli</i>	48
13	Taux de résistance globaux des souches aux aminosides	50
14	Taux de résistance globaux des souches aux autres antibiotiques	54
15	croissance des transconjugants des souches <i>E.coli</i> 36 et <i>E.coli</i> 2 sur la gélose de sélection	60
16	Images des DD- tests de la souche E51 et de son transconjuguant	62
17	Résultats des CMI à la céfoxitine de quelques souches donatrices.	65
18	Résultats des CMI à la céfoxitine et au céfotaxime des transconjugants.	67

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I.	Concentrations (ng / L) des antibiotiques mesurées dans les milieux aqueux	05
II.	Concentrations des antibiotiques trouvées dans des eaux usées	07
III.	exemples de bactéries résistantes et de gènes de résistance trouvés dans l'environnement	13
IV.	Classification selon Ambler des principales β -lactamases	19
V.	Relation entre la classification moléculaire d'Ambler et celle fonctionnelle	21
VI.	Structure de base schématisée des différents types d'éléments transposables	24
VII	Caractéristiques des eaux avant et après traitement	25
VIII.	Liste des antibiotiques testés	31
IX.	Volumes utilisés pour la réalisation de la gamme d'antibiotique	35
X.	Date et origine des souches isolées	37
XI.	Répartition des souches par origine de prélèvement	39
XII.	Répartition des souches résistantes aux C3G par origine de prélèvement	42
XIII.	Comparaison entre les diamètres (mm) des zones d'inhibition sur gélose Mueller Hinton et Mueller Hinton additionné de cloxacilline.	45
XIV.	Phénotypes de résistance d' <i>E.coli</i> aux β -lactamines	47
XV.	Phénotype de résistance aux aminosides	51
XVI.	Répartition des phénotypes de résistance aux aminosides	53
XVII.	Nombres de souches (résistantes + intermédiaires) pour chaque β -lactamine et à chaque origine.	56
XVIII.	Nombres de souches (résistantes + intermédiaires) pour chaque aminoside et à chaque origine.	57
XIX	Nombres de souches (résistantes + intermédiaires) pour à chaque antibiotique et à chaque origine	66
XX	Diamètres (mm) des zones d'inhibition des souches conjuguées et de leurs	61

	transconjugants	
XXI	CMI des antibiotiques testés sur les souches donatrices	64
XXII	Comparaison des CMI des différents antibiotiques testés sur les souches donatrices et leurs transconjugants	65

Annexes

- I. Diamètres (mm) des zones édités par le CA-SFM, 2010
- II. Résultat de l'identification par la galerie biochimique
- III. Résultats de la Sensibilité des souches d'*E.coli* aux β -lactamines
- IV. Diamètres (mm) des zones d'inhibition du DD-test
- V. Résultats de la Sensibilité des souches d'*E.coli* aux autres antibiotiques
- VI. Significativité par case (Test exact de Fisher) : β -lactamines
- VII. Significativité par case (Test exact de Fisher) : Aminosides
- VIII. Significativité par case (Test exact de Fisher) : Autres antibiotiques

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction01

Partie I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Résistance aux antibiotiques dans l'environnement

I. Généralités.....	03
II. Antibiotiques dans l'environnement.....	04
II.1. Antibiotiques dans les eaux usées.....	06
III. Résistance dans l'environnement.....	08
III.1. Résistance aux antibiotiques dans les stations d'épuration.....	09
III.2. Sources et mouvements des gènes de résistance aux antibiotiques dans l'environnement.....	10
III.3. Impact des STEPs sur le transfert d'éléments génétiques conférant la résistance.....	12
IV. Conséquences de la pollution aux antibiotiques et de la résistance aux antibiotiques.....	13

Chapitre II : Résistance aux antibiotiques

I. Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	14
I.1. Mécanismes non enzymatiques.....	14
I.1.1. la modification de la cible.....	14
I.1.2. Diminution de la perméabilité.....	15
I.1.3. Systèmes d'efflux.....	16
I.2. Mécanisme enzymatique.....	17
I.2.1. les β -lactamases.....	17
I.2.1.1. La classification d'Ambler.....	18
I.2.1.2. Mise à jour de la classification fonctionnelle.....	20

II. Supports génétiques et mobilité de la résistance aux antibiotiques.....	22
II.1. Les plasmides.....	22
II.2. les intégrons.....	22
II.3. les transposons.....	23

Partie II : MATERIEL & METHODES

1. Présentation de la STEP d'Aokas.....	25
2. Principes du traitement des eaux usées par épuration biologique.....	25
2.1. Prétraitement physique de l'effluent.....	25
2.2. La décantation primaire.....	26
2.3. Le traitement biologique.....	26
2.4. La décantation secondaire.....	26
2.5. Le traitement des boues.....	27
3. Echantillonnage.....	27
4. Mise en culture.....	29
4.1. Enrichissement.....	29
4.2. Isolement et purification.....	29
5. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques.....	30
6. Recherche de β -lactamases à spectre étendu (BLSE).....	32
6. 1. DD-test.....	32
6. 2. DD-Test sur gélose à la cloxacilline.....	32
7. Transfert par Conjugaison.....	32
8. Détermination des CMI en milieu solide.....	35
9. Traitement statistique des données.....	36

Partie III : RESULTATS & DISCUSSION

I. Isolement des souches d' <i>Escherichia coli</i>	37
II. Sensibilité des souches d' <i>E.coli</i> aux antibiotiques.....	40
II.1. Sensibilité des souches d' <i>E.coli</i> aux β -lactamines.....	40
II.1.1.Sensibilité des souches d' <i>E.coli</i> aux céphalosporines de 3 ^{ème} génération (C3G).....	41
II.1.2.Sensibilité des souches d' <i>E.coli</i> aux autres β -lactamines.....	43
II.1.3. Recherche des β -lactamases à spectre élargi (BLSE).....	44
• DD-test.....	44
• DD-test sur gélose Mueller Hinton additionnée de cloxacilline.....	45
II.1.4. Phénotype de résistance aux β -lactamines.....	47
II-2. Sensibilité des souches d' <i>E.coli</i> aux autres familles d'antibiotiques.....	50
II.2.1. Sensibilité des souches d' <i>E.coli</i> aux aminosides.....	50
II.2.3. Sensibilité des souches d' <i>E.coli</i> aux autres antibiotiques.....	54
III. Sensibilité des souches d' <i>E.coli</i> dans les différentes installations de la STEP.....	56
III.1. distribution de la résistantes aux β -lactamines dans chaque installation de la STEP.....	56
III.2. distribution de la résistantes aux aminosides dans chaque installation de la STEP.....	57
IV. Résultats de la conjugaison.....	60
V. Détermination des CMI.....	63
V.1. Détermination des CMI des souches donatrices.....	63
V.2. Détermination des CMI des transconjugants.....	66
Conclusion	68

Références bibliographiques

Annexes

La possibilité qu'un microorganisme interfère avec la croissance d'un autre a fait l'objet d'intenses recherches depuis les premiers jours de la microbiologie. Cette possibilité fut confirmée par Fleming en 1928 (Kong et *al.*, 2010). L'introduction de la Benzypenicilline au cours d'essais cliniques représente clairement une des percés majeures de la chimiothérapie moderne. Le succès des pénicillines et de ses divers composés reconnue pour leur haute efficacité et spécificité font d'elles la famille d'antibiotique la plus largement utilisée (Matagne et *al.*, 1998).

Les antibiotiques sont probablement l'une des formes les plus abouties de la chimiothérapie dans l'histoire de la médecine. Ils ont sauvé des millions de vies et placé la majorité des maladies infectieuses sous contrôle (Aminov, 2009). Toutefois, l'augmentation de la résistance des agents pathogènes aux antimicrobiens menace d'inverser les progrès dans le traitement des maladies infectieuses. La résistance aux antibiotiques a été et est toujours sélectionnée par l'utilisation abusive et la mauvaise utilisation de ces agents dans la médecine humaine et vétérinaire, et en tant que promoteurs de croissance dans la production animale (Schluter et *al.*, 2007 ; Tamtam et *al.*, 2008).

Les résidus d'agents antimicrobiens peuvent être retrouvés dans les effluents des eaux usées, en particulier dans les endroits où ces médicaments sont largement utilisés, comme les hôpitaux, les usines de production pharmaceutique et autour des fermes (Sabate et *al.*, 2008). Ces molécules sont souvent partiellement métabolisées dans l'organisme et sont excrétées sous forme inchangée ou autant que métabolites dans les urines et les fèces avant d'être évacuées, dans les eaux usées (Tamtam et *al.*, 2008). 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).

La flore digestive est le principal réservoir d'entérobactéries et parmi celles-ci, *Escherichia coli* est l'espèce la plus prédominante (Janvier et *al.*, 2011). Étant donné le contact étroit que les bactéries de cette espèce ont avec les humains et les animaux à sang chaud, ainsi que leur omniprésence reconnue, ces organismes sont parmi les vecteurs les plus importants dans la diffusion de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement (Deschamps et *al.* 2008). Les eaux usées municipales, étant des récepteurs du microbiote intestinal des humains et des animaux, elles constituent des vecteurs importants dans la diffusion de *Escherichia coli* dans l'environnement urbain (Figueira et *al.*, 2011).

Parce que les STEP peuvent supporter une croissance de forte densité cellulaire, et qu'elles combinent microorganismes résistants et antibiotiques, certains auteurs suggèrent qu'elles pourraient aussi être un endroit propice au transfert de gènes de résistance et à l'émergence de bactéries résistantes (Marcinek *et al.*, 1998 ; Geisenberger *et al.*, 1999).

De part sa place stratégique à l'interface entre les activités humaines et l'environnement, la STEP est le dernier rempart avant le rejet de bactéries antibiorésistantes dans l'environnement. De ce fait, maîtriser les facteurs affectant le transfert de résistance en STEP, serait déjà un moyen de limiter la dissémination de résistance dans l'environnement.

Actuellement, très peu de travaux nationaux ont été consacrés à l'étude de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement. Il est donc indispensable de disposer de données sur l'évolution de la résistance dans l'environnement hydrique. C'est dans ce contexte que nous proposons d'évaluer la sensibilité aux antibiotiques des souches d' *Escherichia coli* isolées au niveau d'une station d'épuration.

Dans cette étude, l'isolement des souches a été effectué à partir des eaux usées ainsi que des boues sèches prélevées au niveau de la station d'épuration des eaux usées (STEP) d'Aokas (Béjaia), et cela, dans l'objectif d'évaluer la présence d'*E.coli* multirésistantes dans les eaux usées et la détermination des profils de résistance aux β -lactamines ainsi qu'à d'autres familles d'antibiotiques. Afin de développer ces aspects, nous avons adopté la méthodologie suivante :

- Isolement des souches d'*E. coli* à partir des eaux usées et des boues sèches prélevées à la STEP d'Aokas.
- Etudes de la sensibilité de ses souches vis-à-vis des β -lactamines et d'autres familles d'antibiotique.
- Caractérisation phénotypique des mécanismes de résistance en cause.
- Etude de la capacité de transfert des déterminants génétiques de la résistance par conjugaison.
- Détermination des CMI de certains antibiotiques.

I. Généralités

Les antibiotiques sont largement utilisés en médecine humaine et vétérinaire afin de contrôler les infections bactériennes. Ils sont également utilisés en tant qu'additifs alimentaires pour promouvoir la croissance et prévenir les maladies du bétail (Kümmerer, 2004; Tao et al., 2010 ; Martinez, 2009). Il n'y a pas une bonne absorption intestinale des antibiotiques par l'homme et par les animaux, la majorité d'entre eux est excrétée sous forme inchangée dans les matières fécales et l'urine, et se retrouve ainsi dans l'environnement par l'élimination des eaux usées urbaines, les effluents hospitaliers et les excréments d'animaux (Tamtam, 2008 ; Tao et al., 2010).

Quant à la question de la résistance, elle est presque toujours abordée dans les publications décrivant la présence d'antibiotiques dans l'environnement (Kümmerer, 2009). Cependant, l'utilisation des antibiotiques par l'homme n'est probablement pas la seule pression sélective pour la résistance aux antibiotiques dans les communautés microbiennes naturelles. En effet, la plupart des antibiotiques sont produits par des souches de champignons et de bactéries présentes naturellement dans l'environnement, y compris le sol. La plupart des souches productrices d'antibiotiques portent des gènes codant pour la résistance aux antibiotiques qu'ils produisent. Les antibiotiques produits dans l'environnement peuvent exercer une pression de sélection sur les organismes voisins (Allen et al., 2010).

En général, l'émergence de la résistance est un processus très complexe qui n'est pas encore entièrement compris à l'égard de l'importance des interactions des populations bactériennes et des antibiotiques. Il est connu par exemple, que les antibiotiques à des concentrations sub-inhibitrices peuvent avoir un impact sur les fonctions cellulaires et modifier l'expression génétique de facteurs de virulence ou le transfert de résistance aux antibiotiques (Kümmerer, 2009).

II. Antibiotiques dans l'environnement

Les antibiotiques sont utilisés dans divers contextes dont la production alimentaire. Les animaux sont traités avec les antibiotiques pour le traitement des maladies et la promotion de la croissance, les arbres fruitiers sont souvent traités par prophylaxie avec des antibiotiques pour le contrôle des infections bactériennes (Allen et *al.*, 2010), la consommation mondiale est estimée entre 100 000 et 200 000 tonnes par an (Wise, 2002). Dans chacune de ces situations, les effets des antibiotiques dépassent le site d'utilisation. Les antibiotiques appliqués dans les fermes d'animaux s'infiltrent dans les cours d'eaux usées et des eaux souterraines; les antibiotiques pulvérisés sur les plantes peuvent dériver par voie aérienne (Allen et *al.*, 2010).

Bien que les antibiotiques aient été utilisés en grandes quantités depuis quelques décennies, jusqu'à présent, on a accordé très peu d'attention à l'existence de ces substances dans l'environnement. Des études menées dans divers pays ont détecté un certain nombre d'antibiotiques de l'ordre du microgramme ou du nanogramme par litre dans différents compartiments de l'environnement (Tableau I) à savoir des effluents d'hôpitaux, eaux usées municipales, effluents des usines de traitement des eaux usées, eaux de surface et dans certains cas des eaux souterraines. Les composés détectés font parti de différentes classes d'antibiotiques telles que les macrolides, tétracyclines, sulfamides et quinolones (Kümmerer, 2004). Les β -lactamines ont été détectées dans les systèmes de traitements des eaux usées, et cela malgré que ces antibiotiques ne soient pas persistants dans l'environnement hydrique à cause de l'hydrolyse du noyau β -lactame (Borjesson, 2009).

Il faut cependant noter que de nombreux antibiotiques tels que le méropénème, le céfotiamé ou le nitrothiazole ne sont pas éliminés. De plus, les quinolones et fluoroquinolones sont connus pour être « peu biodégradables » (Alighardashi et *al.*, 2008). Il a été démontré que la ciprofloxacine présente dans des échantillons d'eau de fleuve est complètement dégradée après 3 mois, alors que seulement 20% de l'acide oxolinique présent dans ces échantillons est dégradé qu'après cinq mois. Des travaux récents ont montré que la fixation des quinolones au sol et aux sédiments tarde leur biodégradation. Néanmoins, le traitement des eaux usées contenant les quinolones élimine efficacement ces antibiotiques par des procédés qui comprennent non seulement la biodégradation, mais aussi la photodégradation (Martinez, 2009).

Des concentrations d'antibiotiques élevées que l'on trouve généralement dans les écosystèmes naturels peuvent être trouvés dans l'eau (exemple, les eaux usées) et les sols (exemple des sols traités avec du fumier). Toutefois, ces concentrations élevées sont généralement concentrées dans les zones où il y a une activité humaine, tandis que les environnements vierges ont généralement de faibles concentrations d'antibiotiques. Les évaluations des risques pourraient ainsi prendre en compte principalement les domaines ayant une charge élevée d'antibiotiques et contenant des microorganismes associées à l'homme pour analyser l'effet de la pollution des antibiotiques sur les écosystèmes naturels (Martinez, 2009).

Tableau I: Concentrations (ng / L) des antibiotiques mesurées dans les milieux aqueux (Kümmerer, 2004).

classe	composé	Effluents d'hôpitaux	eaux usées	Eaux de surface	Eaux souterraines
Pénicillines	ampicilline	>80			
Tétracyclines			1		
Macrolides	erythromycine-H ₂ O		>6.0	0.1-1.7	0.05
	clarithromycine et roxithromycine		<1.0	0.1-0.6	0.03
Quinolones	Ciprofloxacine	>124.5	0.4	0.1	
Sulphonamides	sulfamethoxazole		>1.0	0.1-0.2	0.4
	trimethoprim et autres		<0.2	>0.03	

II.1. Antibiotiques dans les eaux usées

La pollution est généralement définie comme: «entrées nocives des produits chimiques, biologiques et physiques, des déchets produits dans l'environnement provenant de diverses sources telles que les hôpitaux, les maisons, les industries agricoles et urbaines ». Les stations de traitement des eaux usées (STEP) jouent un rôle essentiel dans la gestion de matières fécales et la suppression des contaminants toxiques organiques et inorganiques contenus dans les déchets provenant des deux activités municipales et agricoles. L'objectif d'un processus de traitement des eaux usées est de réduire la concentration, la dissolution du carbone organique, de l'azote et du phosphore et d'éliminer les agents pathogènes viables de l'effluent liquide. Des procédés physiques (eg : filtration), chimiques (eg : désinfection) et les activités microbiennes sont utilisés efficacement pour remédier à l'entrée des déchets à la station. La diversité des communautés microbiennes dans une station d'épuration peuvent être importantes selon les constituants bio-chimiques reçus par la station d'épuration (Rahube et Yost,2010) .

Les agents antimicrobiens utilisés en thérapie humaine ainsi que leurs résidus atteignent les systèmes d'égouts via l'urine et les fèces. Leurs concentrations dans les eaux usées, bien que nettement inférieures aux doses thérapeutiques, sont soupçonnées d'affecter les bactéries sensibles et de sélectionner des souches résistantes (Quczkiwicz *et al*, 2010).

Des efforts considérables ont été effectués pour mesurer les doses d'antibiotiques dans les systèmes de traitement des eaux usées par l'Union européenne et les États-Unis. Les résultats de différentes études sont résumés dans le tableau II, montrant les concentrations d'antibiotiques que l'on trouve dans les eaux usées traitées et non traitées. Le tableau II montre également que dans les cas où les concentrations d'antibiotiques ont été mesurées tant dans l'affluent et l'effluent traité, des concentrations inférieures ont été observées dans les eaux usées traitées, ce qui suggère qu'il y'a une élimination partielle d'antibiotiques dans les stations d'épuration. Malgré ces faibles concentrations leur apport continu dans les STEP_s soulève des préoccupations au sujet de leur potentiel effets indésirables écologiques et leur contribution au développement de la résistance aux antimicrobiens qui pourraient influencer sur la santé humaine (Kim et Aga, 2007)

Tableau II: Concentrations ($\mu\text{g/ml}$) des antibiotiques trouvées dans des eaux usées

(Kim et Aga, 2007).

Antibiotiques	Concentrations maximales trouvés ($\mu\text{g/L}$)	Pays
Amoxicilline	150	Etats unis
Chlortetracycline	1.2 2.8 ^a	Etats unis Etats unis
Ciprofloxacine	0.6 1.4, 0.5 ^a	Suisse Etats unis
Clarithromycine	0.3	suisse
Erythromycine-H2O	6.0 ^a 0.6 ^a	Allemagne Etats unis
Gentamicine	7.6	Allemagne
Norfloxacine	0.5	Suisse
Sulfamethoxazole	2.8, 0.7 ^a 0.8 ^a	Etats unis Etats unis
Tetracycline	4 1.1, 0.3 ^a	Etats unis Etats unis
Trimethoprime	0.4 ^a 7.9, 2.4 ^a	Etats unis Etats unis

a : concentrations d'antibiotiques dans les eaux usées traitées.

III. Résistance dans l'environnement

Les gènes de résistance ainsi que les bactéries résistantes dans l'environnement sont de plus en plus considérés comme un problème écologique. Les exemples les plus frappants en pathologie humaine sont les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV), les *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM), et *Pseudomonas* multirésistantes. En ce qui concerne les causes de la résistance, l'accent est mis sur l'utilisation d'antimicrobiens dans les hôpitaux et dans l'élevage. (Kümmerer, 2004)

Vanneste et ses collaborateurs (2008) ont isolés des cours d'eau, des bactéries phytopathogènes qui étaient résistantes au cuivre et / ou à la streptomycine même dans les zones où aucune agriculture ou horticulture est présente et les cours d'eau ne sont pas utilisés pour l'irrigation des cultures. Ces résultats suggèrent que les cours d'eaux naturels pourraient être une source de gènes qui confèrent la résistance à la streptomycine (Vanneste et *al.*, 2008)

Des souches *E. coli* résistantes aux antibiotiques ont été retrouvées avec une incidence étonnamment élevée dans les eaux souterraines rurales. Les auteurs n'ont pas émis d'hypothèses sur l'origine de cette résistance, mais les eaux de ruissellement du fumier dans les fermes ou des fuites provenant de fosses septiques sont des possibilités claires pour l'entrée de bactéries résistantes dans les eaux souterraines (Kümmerer, 2004).

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

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

III.1. Résistance aux antibiotiques dans les stations d'épuration

Peu est connu actuellement sur la dynamique des bactéries résistantes aux antibiotiques et des gènes codant pour la résistance aux antibiotiques dans les stations de traitement des eaux usées (STEP) (Borjesson, 2009). Ces stations reçoivent les bactéries qui sont déjà exposées aux antibiotiques à partir des ménages privés, des hôpitaux et des animaleries, et sont considérées comme des points chauds pour le transfert horizontal de gènes à cause de leur richesse nutritionnelle et de la haute densité bactérienne (Tennstedt et al., 2003 ; Schluter et al., 2007). Des bactéries résistantes et multi-résistantes telles que *E. coli*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, entérobactéries, et les bactéries phylogénétiquement éloignées, comme les membres de α -et β -protéobactéries, sont présentes dans les eaux usées municipales. La résistance aux β -lactamines, aux quinolones, à la tétracycline et sulfamathoxazole / triméthoprimine et aux autres sulfamides a été retrouvée dans les eaux usées et des boues d'épuration du monde entier (Kümmerer, 2009).

Des données ont montré un nombre significativement plus élevé de bactéries résistantes aux antibiotiques dans les eaux usées par rapport à l'environnement naturel (Borjesson, 2009 ; Kim et Aga, 2007). Effectivement, Schwartz et al. (2003) ont étudié la présence de bactéries résistantes aux antibiotiques dans les biofilms recueillis dans les eaux usées des hôpitaux et des municipalités, l'eau des rivières et l'eau potable en Allemagne. Des entérocoques résistants à la vancomycine et des entérobactéries hydrolysant les β -lactamines ont été retrouvés plus fréquemment dans les biofilms d'eaux usées que dans les biofilms de rivière ou d'eau potable. En outre, les gènes de résistance aux antibiotiques tels que *vanA*, *mecA*, et *ampC* ont été retrouvés à des niveaux plus élevés dans les eaux usées des hôpitaux (Schwartz et al., 2003).

Il a été suggéré que le processus de traitement des eaux usées peut augmenter la proportion de bactéries résistantes à la sortie (Borjesson, 2009). Les processus biologiques sur la base des boues activées, en raison de la forte densité de cellules, sont considérés comme des facteurs favorisant la dissémination de la résistance chez les bactéries (Quczkiwicz et al., 2010). Les différences dans la conception des centrales de traitement et de leur fonctionnement peuvent aussi influencer sur le sort de bactéries résistantes et des gènes de résistance dans les eaux usées. Kim et al. (2006a) ont évalué le sort des populations bactériennes résistantes à la tétracycline dans le processus biologiques de traitement des eaux usées et ont démontré une

augmentation de la charge organique et de la croissance, les deux aboutissent à l'amplification de la résistance à la tétracycline (Kim et al., 2007).

Saisissez du texte, l'adresse d'un site Web ou [importez un document à traduire](#).

[Annuler](#)

Traduction (anglais > français)

III.2. ÉLIRE phonéSources et mouvements des gènes de résistance aux antibiotiques dans l'environnement.

La présence d'éléments de résistance aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes est d'autant plus problématique en raison de la prévalence du transfert horizontal de gènes, processus par lequel les bactéries acquièrent des gènes de l'environnement. La plupart des gènes de résistance aux antibiotiques connus se trouvent sur les transposons, intégrons ou des plasmides, qui peuvent être mobilisés et transférés à d'autres bactéries de la même espèce ou d'espèces différentes (Allen et al., 2010).

Il est généralement reconnu que l'environnement naturel abrite une grande diversité de gènes de résistance aux antibiotiques (Aminov, 2009). Les gènes de résistance existent naturellement dans l'environnement grâce aux pressions de sélection exercées dans la nature. L'Homme a appliqué une pression de sélection supplémentaire sur les gènes de résistance aux antibiotiques en raison des grandes quantités d'antibiotiques que nous produisons, consommons et utilisons en médecine et en agriculture. Les forces physiques et biologiques causent une large diffusion des gènes de résistance à travers de nombreux environnements (figure 1) (Allen et al., 2010).

Le transfert des gènes de *Streptomyces* à d'autres micro-organismes du sol potentiellement pathogènes pour l'homme a été montré pour un transfert vers une mycobactérie atypique. On peut aussi imaginer qu'il y a ingestion de micro-organismes du sol porteurs de gènes de résistance par des animaux, puis transfert de ces gènes à des bactéries peuplant les écosystèmes animaux, puis passage chez celui-ci avec l'alimentation. Le transfert de gènes de résistance entre bactéries phylogénétiquement éloignées est possible *in vivo*. Des gènes de résistance pourraient aussi être administrés à l'homme avec certaines préparations antibiotiques ou ils ont été retrouvés. Toutefois, l'analyse phylogénétique des séquences de gènes qui codent pour la résistance aux glycopeptides chez les micro-organismes producteurs et chez les enterocoques qui infectent l'homme vont plutôt dans le sens d'un transfert ancien que d'un transfert récent. Il en est de même des observations faites concernant la présence

sous forme non exprimée de certains gènes de résistances aux aminoglycosides chez *Salmonella* (Andremont, 2000).

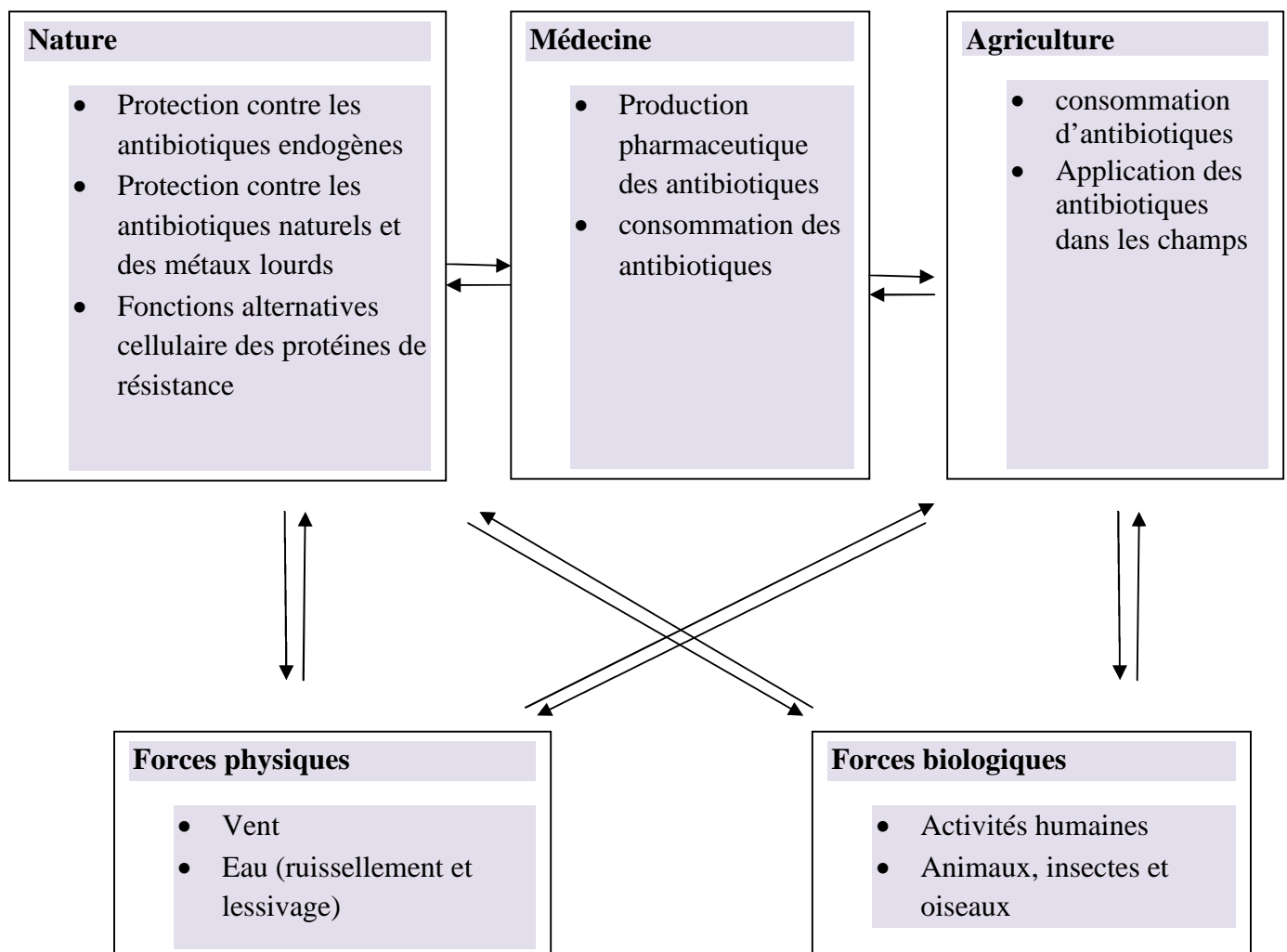


Figure N°1 : Sources et mouvements des gènes de résistance aux antibiotiques dans l'environnement (Allen et *al.*, 2010).

III.3. Impact des STEPs sur le transfert d'éléments génétiques conférant la résistance

La grande majorité des mécanismes de résistance aux antibiotiques sont acquis par transfert horizontal. L'analyse phylogénétique de plusieurs groupes de gènes de résistance aux antibiotiques a suggéré que le matériel génétique de résistance aux antibiotiques d'aujourd'hui a eu une longue histoire de sélection et de diversification bien avant l'actuelle «ère des antibiotiques» (Aminov, 2009).

Les stations d'épuration ont été reconnues comme un réservoir de bactéries résistantes aux antibiotiques et de gènes de résistance aux antibiotiques, y compris les plasmides codant pour la résistance aux antibiotiques. Les plasmides codant pour la résistance aux antibiotiques peuvent conférer une résistance pour la plupart sinon toutes les classes d'antibiotiques cliniquement significatives telles que les macrolides, les tétracyclines, les céphalosporines, fluoroquinolones, les aminosides et les β -lactamines. L'accumulation de différents gènes de résistance aux antibiotiques sur des plasmides peut être augmentée dans l'environnement des STEPs (Rahube et Yost, 2010).

Au cours des dernières années, différents plasmides conjugatifs de multirésistance ont été obtenus à partir de stations d'épuration municipales. Par exemple, différents plasmides codant pour la résistance à la gentamicine ont été isolés des eaux usées. Des connaissances acquises sur l'analyse génomique comparative complètes de plasmides isolés à partir des bactéries des boues d'épuration et de plasmides isolés à partir des bactéries cliniques et d'autres environnements sont passés en revue. Différents types de résistance, leur organisation génétique et l'insertion dans les structures du squelette plasmidique sont décrites. Ces analyses fournissent une preuve claire de l'échange génétique entre des bactéries pathogènes des humains, des animaux et des plantes et des bactéries de l'environnement, y compris celles des eaux usées (Schluter *et al.*, 2007).

Le réservoir des éléments génétiques mobiles (EGMs) de la résistance aux antibiotiques dans les stations d'épuration comprend; les éléments conjugatifs transposables (transposons et séquences d'insertion) et les intégrons. La combinaison de ces éléments avec les plasmides conjugatifs forme un environnement où ces plasmides peuvent rapidement acquérir ces EGMs via la transposition ou la recombinaison et deviennent des mosaïques de multiples éléments génétiques de la résistance (Rahube et Yost, 2010).

IV. Conséquences de la pollution aux antibiotiques et de la résistance aux antibiotiques

L'utilisation des antibiotiques à des fins cliniques ou de l'élevage sélectionne des microorganismes résistants. Il est donc prévisible que les résidus provenant des hôpitaux ou des fermes contiennent deux types de polluants: les antibiotiques et les gènes de résistance. Néanmoins, le sort des deux types de polluants est probablement différent. Plusieurs antibiotiques sont des composés naturels qui ont été en contact avec le microbiote de l'environnement des millions d'années et sont donc biodégradables, et peuvent même servir de source de nutriments pour plusieurs micro-organismes. Les antibiotiques synthétiques (exemple : quinolone) peuvent être plus réfractaires à la biodégradation. Toutefois, ils sont encore dégradés à des vitesses différentes dans des environnements naturels (Martinez, 2009).

Le fait que les antibiotiques sont dégradés dans les écosystèmes naturels ne veut pas dire qu'ils ne sont pas des polluants. Par exemple, le processus de dégradation est lent à basse température en hiver, et la composition et l'humidité du sol ont clairement un impact sur la dégradation des antibiotiques. Plus important encore, dans certains écosystèmes il y'a une libération constante d'antibiotiques (par exemple les effluents hospitaliers, les résidus des fermes) (tableau III), de sorte qu'ils sont constamment pollués, quel que soit la dégradation de l'antibiotique (Martinez, 2009).

Tableau III: exemples de bactéries résistantes et de gènes de résistance trouvés dans l'environnement (Kümmerer, 2004).

Source	Bactéries résistantes/ gènes de résistance détectés
Effluents d'hôpitaux	<i>vanA, mecA</i>
Eaux usées	<i>vanA, ampC</i> , gènes de résistance à la gentamicine, <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter spp.</i> , <i>Camylobacter spp.</i> , <i>E.coli</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Enterococci</i>
sols	<i>E.coli</i>
Eaux de surface	<i>vanA, ampC</i>
Eaux souterraines	<i>Mycobacterium spp.</i> , <i>Streptomyces spp.</i>

En outre, la présence des gènes de résistance couramment trouvés, des agents pathogènes pour l'homme ont été signalés dans des environnements sans antécédents de contamination aux antibiotiques. Plusieurs mécanismes permettent le maintien et, éventuellement, la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques dans les écosystèmes naturels, de sorte que la diversité de la contamination aux antibiotiques, la pollution par les déterminants de la résistance aux antibiotiques ne disparaîtraient pas nécessairement même si la libération des gènes de résistance aux antibiotiques dans l'environnement est abandonnée (Martinez, 2009).

I. Mécanismes de résistance aux β -lactamines.

Les principaux mécanismes qu'utilisent les bactéries pour résister à l'action d'un antibiotique sont de quatre types :

- la modification de la cible bactérienne de l'antibiotique.
- La diminution ou suppression de la pénétration de l'antibiotique dans la bactérie désignée imperméabilité.
- L'efflux actif hors de la cellule bactérienne
- l'inactivation enzymatique (Tennstedt *et al.*, 2003)

I.1. Mécanismes non enzymatiques

I.1.1. la modification de la cible

La cible cellulaire peut être modifiée par mutation ou par modification enzymatique d'une manière à réduire l'affinité de l'antibiotique pour la cible, par exemple, la résistance aux fluoroquinolones peut être effectuée par mutation dans la cible de l'antibiotique ; ADN gyrase et topoisomérase IV. Ces mécanismes peuvent être spécifiques pour un antibiotique seul ou pour une classe d'antibiotique (Nishino *et al.*, 2009). Parfois, la cible n'est pas modifiée mais la bactérie est capable de synthétiser une nouvelle cible résistante à l'antibiotique, on parle alors de substitution de cible (Guillemot et Leclercq, 2005). L'impossibilité d'interaction avec la cible (ou toutes les cibles identiques) relève de plusieurs mécanismes.

- Nouvelle cible
- Cible modifiée par une enzyme
- Cible modifiée par un important remaniement ou mutée au niveau de son site d'interaction

La résistance liée à la cible peut résulter d'autres éventualités plus rares

- Protection de la cible
- Augmentation du nombre de cibles normales
- Disparition de la cible (Michel-Briand, 2009).

I.1.2. Diminution de la perméabilité

En combinant une bicouche lipidique très hydrophobe avec des protéines formant des pores de propriétés et de dimension spécifiques, la membrane externe agit comme une barrière sélective. Les propriétés de la perméabilité de cette barrière, par conséquent, a un impact majeur sur la sensibilité des micro-organismes aux antibiotiques (Delcour, 2009)..

Les petits médicaments hydrophiles, tels que les β -lactamines, utilisent les porines pour accéder à l'intérieur de la cellule, pendant que les macrolides et autres médicaments hydrophobes diffusent à travers la bicouche lipidique (figure 2) (Delcour, 2009).

L'existence de résistance aux antibiotiques dans un grand nombre d'espèce bactérienne est due à des modifications dans les lipides ou protéines qui composent cette membrane et met en valeur en effet l'importance que joue cette dernière dans la sensibilité aux antibiotiques (Delcour, 2009).

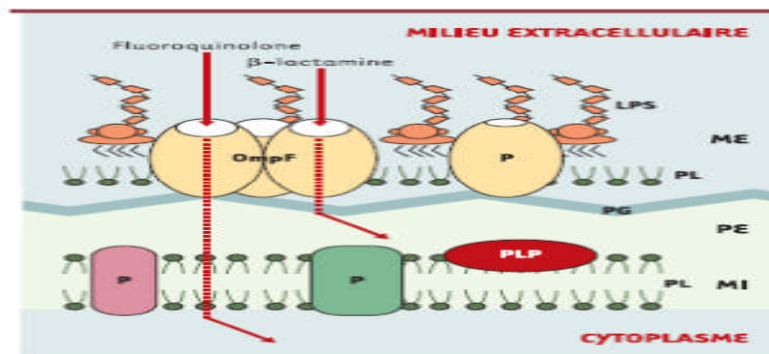


Figure N° 2 : Enveloppe d'*Escherichia coli* (Pagés, 2004).

Le passage d'antibiotiques va dépendre du nombre de molécules de porines présentes, par conséquent, la résistance par ce mécanisme est liée à une diminution ou à une perte de porines (Pourriat et Martin, 2005).

Plusieurs résultats ont montré la relation existante entre la porine et la sensibilité aux β -lactamines et aux fluoroquinolones. Les analyses d'isolats résistants aux antibiotiques (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas* ou *Serratia*) ont établi que la disparition des porines, associée à la production d'enzymes bactériennes détruisant le cycle β -lactame (β -lactamases), est un élément clé dans la résistance aux β -lactamines. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, la disparition d'une porine (opr D) a été rapportée dans le cas de résistance à l'imipénème (Pagés, 2004).

I.1.3. Systèmes d'efflux

Les pompes d'efflux se retrouvent parmi les catégories majeures de transporteurs de la membrane bactérienne. Se sont des protéines intégrantes de la membrane (figure 3) qui utilisent l'énergie cellulaire pour expulser activement des antibiotiques ou des toxines de la cellule (Nishino *et al.*, 2009). C'est ce rôle de détoxification qui a surtout été mis en évidence. La résistance intrinsèque à de nombreux antibiotiques par efflux actif est largement répandue parmi les bactéries à Gram négatif. Elle est modérément exprimée dans la plupart des cas. Cependant, elle peut atteindre un niveau élevé si plusieurs pompes sont co-exprimées, où en cas d'hyperexpression des gènes encodant des transporteurs. Il existe aussi des associations entre l'efflux actif et les autres mécanismes de résistance. C'est par exemple le cas de la synergie entre l'efflux et des mutations dans les gènes des topoisomérases (*gyrA*, *gyrB* et *parC*, *parE*) dans la résistance aux fluoroquinolones de *Streptococcus pneumoniae*. L'exportation des fluoroquinolones favoriserait la sélection de mutants par exposition à des concentrations insuffisantes de l'antibiotique (Cattoir, 2004).

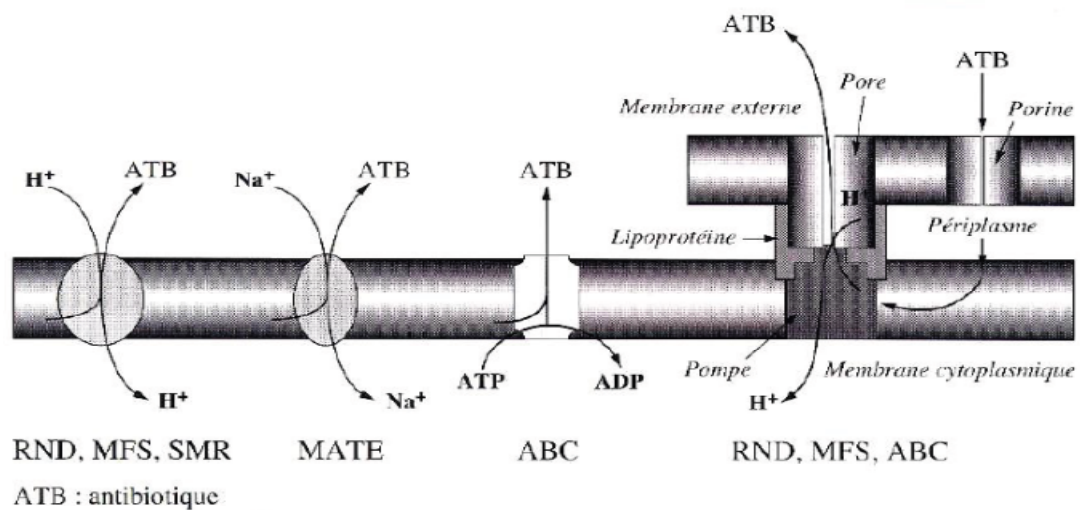


Figure N° 3 : Représentation schématique des cinq familles de pompes d'efflux (Cattoir *et al.*2004) .

MFS ou major facilitator superfamily ; **SMR** ou small multidrug resistance ; **MATE** ou multidrug and toxic compound extrusion; **RND** ou resistance-nodulation cell division; **ABC** ou ATP-binding cassette. **ME, EP** : membrane externe et espace périplasmique des bactéries à Gram négatif ; **MC**: membrane cytoplasmique ; **ATB** : antibiotique.

I.2. Mécanisme enzymatique

Ce mécanisme implique la production d'enzymes qui inactivent par hydrolyse ou par modification les antibiotiques ce qui aboutit à la formation des dérivés inactifs. Les exemples d'enzymes les plus connues sont les β -lactamases (Nishino et *al.*, 2009).

I.2.1. Les β -lactamases

Les β -lactamases sont des hydrolases qui catalysent l'hydrolyse irréversible de la liaison amide du cycle β -lactame, inactivant ainsi les β -lactamines (figure 4) (Bush, 1999). Ces enzymes peuvent être chromosomiques ou plasmidiques et produites d'une manière inductible ou constitutive. Elles sont sécrétées dans l'espace périplasmique chez les bactéries à Gram négatif ou dans le liquide extracellulaire chez les bactéries à Gram positif (Essack, 2001).

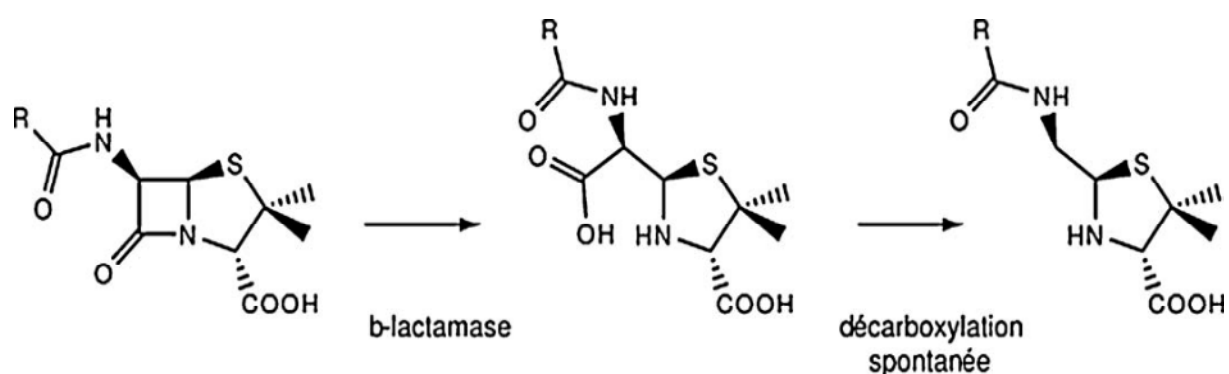


Figure N°4: Mécanisme d'hydrolyse d'une β -lactamine par une β -lactamase (Bush, 1999)

Sur la base de leur mécanisme catalytique, les β -lactamases sont divisées en deux types : les sérines- β -lactamases, utilisant un site actif à sérine pour hydrolyser le noyau β -lactame et les métallos- β -lactamases nécessitant des ions Zn^{2+} (Jacoby et Bush, 2005). La diversité des β -lactamases a entraîné de nombreuses tentatives de classification. Deux sont actuellement utilisées : la classification structurale de Ambler basée sur la séquence primaire en acides aminés d'éléments conservés du site enzymatique actif et la classification fonctionnelle (Tableau IV) de Bush-Jacobi-Medeiros qui repose sur l'activité hydrolytique et la sensibilité des β -lactamases aux inhibiteurs (Naas et *al.*, 2008).

I.2.1.1. La classification d'Ambller

Selon la classification de Ambler, utilisée en pratique médicale, il est possible de définir phylogénétiquement quatre classes de β -lactamases : les classes A, B, C ou D. Au sein de chacune de ces classes, il existe des sous-groupes en fonction du support génétique des gènes de résistance, chromosomique ou plasmidique (tableau IV).

- **La classe A**

Ces enzymes étaient initialement décrites dans des plasmides de bactéries Gram positive. Cependant, les β -lactamases véhiculées par des plasmides, transposons et chromosomes (VHS, PER, TEM and SHV) de bactéries Gram négative ont été rapportées (Kong et al., 2010). Les enzymes formant la classe A sont décrites comme hydrolysant l'ampicilline et la ticarcilline. Elles sont sans action sur les céphalosporines de troisième génération (C3G), la céfoxitine et les carbapénèmes. Toutefois, des mutations spontanées conduisant à la surexpression ou introduisant des changements précis dans la structure primaire des β -lactamases peuvent accroître leur activité vis-à-vis de β -lactamines relativement résistantes à l'hydrolyse enzymatique. C'est pourquoi, dans les années 1990 sont apparues des enzymes dérivant des pénicillinases à spectre étroit, capables d'inactiver des C3G et appelées de ce fait « β -lactamases à spectre étendu» ou BLSE. Les principales enzymes représentantes de ce groupe sont les TEM, SHV et les CTX-M (Pitout et al., 2008).

- **La classe B**

Les enzymes de la classe B sont un petit nombre de Zn^{2+} métallo- β -lactamases, où leurs activités pourraient être inhibées par l'EDTA. IMP-1 est la première métallo- β -lactamase décrite chez *Pseudomonas aeruginosa*. Son gène, *bla_{IMP}* semble être dispersé entre *Pseudomonas aeruginosa* et les autres Gram négatives au Japon. L'intégron à l'origine du gène de la métallo- β -lactamase, *bla_{VIM}*, qui a été initialement décrit chez *Pseudomonas aeruginosa* isolées en Italie et sa prévalence constatée en Grèce, engendre la résistance au méropénème et à l'imipénème (Kong et al., 2010).

- **La classe C**

Les sérines-enzymes de la classe C regroupent toutes les céphalosporinases de type AmpC insensibles à l'acide clavulanique et qui hydrolysent les céphalosporines 5 à 10 fois plus vite que la benzylpénicilline. On distingue les céphalosporinases chromosomiques constitutives ou inductibles et les céphalosporinases plasmidiques.

Tableau IV : Classification selon Ambler des principales β -lactamases (Nordmann *et al.* 1998).

Classe	Localisation	Spectre d'activité	Types d'enzymes	organismes
A	Chromosome	Spectre restreint	SHV-1	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Plasmide	β -lactamases à spectre étendu (BLSE)	TEM-3-29, 42, 43, SHV-2-9 PER-1,2 CTX-M, CTX-M2, MEN-1, VEB-1, TOHO-1	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> ++ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Plasmide	β -lactamases résistantes aux inhibiteurs	TEM-30-41, 44 et 45	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>E. coli</i> ++
	Plasmide	β -lactamases Résistantes aux inhibiteurs et à large spectre	SHV-10, TEM-33 et 15	<i>E. coli</i>
	Chromosome	Carbapénémases	Nmc A, Sine-1, IMP-1	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Serratia marcescens</i>
B	Chromosome Plasmide	Carbapénémases	IMP-1	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
C	Plasmide	Céphalosporinases	MIR-1, MOX-1, CMY-1, 2 1.AT-1, BIL-1, FOX-1, ACT-1	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> ++
	Chromosome		AmpC	Bacille Gram négative
D	Chromosome Plasmide		OXA-24-26,40,51,58,72	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Les céphalosporinases chromosomiques constitutives d'AmpC s'expriment généralement à très bas niveau chez *E. coli* ou *Shigella* et ne contribuent pas de façon significative à la résistance aux β -lactamines chez ces espèces. Cependant des mutants promoteurs forts peuvent exister et entraîner une hyperproduction de la céphalosporinase. Dans ce cas, les bactéries deviennent résistantes à l'amoxicilline et à la céfalotine. L'activité des C2G et C3G peut être alors diminuée tandis que celle de l'imipénème reste normale (Caroff et *al.* 2000).

- **La classe D**

Les enzymes appartenant à cette classe sont appelées les oxacillinases, en effet, elles sont capables d'hydrolyser l'oxacilline ou encore la méthicilline. Tandis que l'acide clavulanique sert de bon inhibiteur pour ces enzymes (Kong et *al.*, 2010).

I.2.1.2. Mise à jour de la classification fonctionnelle

La classification fonctionnelle mise à jour dans l'article de Bush et Jacoby, est basée sur la proposition de Bush et *al.*, en 1995. Cette classification inclut le groupe 1 (classe C) des céphalosporinases, le groupe 2 (classe A et D) des β -lactamases à large spectre, des BLSE et des carbapénèmases à serine et le groupe 3 (classe B) des métallo- β -lactamases. Plusieurs nouveaux sous-groupes de chacun des grands groupes sont décrits en fonction du substrat préférentiel de l'enzyme (Tableau V) (Bush et Jacoby, 2010).

Tableau V : Relation entre la classification moléculaire d'Amblar et celle fonctionnelle de Bush *et al.*, (Bush et Jacoby, 2010).

Groupe de Bush-Jacoby (2009)	Groupe de Bush-Jacoby (1995)	Classe moléculaire d'Amblar	Substrat préférentiel de l'enzyme	Inhibition par		Caractéristiques	Enzymes représentatives
				AC ou TZB	EDTA		
1	1	C	Céphalosporines	Non	Non	- Hydrolyse meilleure des céphalosporines que de la benzylpénicilline; - Hydrolyse des céphamycines	ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1 ^e	NI	C	Céphalosporines	Non	Non	Hydrolyse accrue de la ceftazidime et souvent autres oxyimino-β-lactamines	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Pénicillines	Oui	Non	Hydrolyse meilleure de la benzylpénicilline que des céphalosporines.	PC1
2b	2b	A	Pénicillines et C1G	Oui	Non	Hydrolyse similaire de la benzylpénicilline et céphalosporines	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Céphalosporines à spectre étendu et monobactames	Oui	Non	Hydrolyse augmentée des oxyimino-β-lactamines	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Pénicillines	Non	Non	Résistance au clavulanate, sulbactam et tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Céphalosporines à spectre étendu et monobactames	Non	Non	- Hydrolyse augmentée des oxyimino-β-lactamines - Résistance aux inhibiteurs de β-lactamines	TEM-50
2c	2c	A	Carbénicilline	Oui	Non	Hydrolyse meilleure pour la carbénicilline	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbénicilline, céfépime	Oui	Non	Hydrolyse de la carbénicilline, céfépime et cefpirome	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacilline	Variable	Non	Hydrolyse de la cloxacilline ou l'oxacilline	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Céphalosporines à spectre étendu	Variable	Non	Hydrolyse de la cloxacilline ou l'oxacilline et oxyimino-β-lactamines	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapénèmes	Variable	Non	Hydrolyse de la cloxacilline ou l'oxacilline et des carbapénèmes	OXA-23, OXA-48
2 ^e	2e	A	Céphalosporines à spectre étendu	Oui	Non	- Hydrolyse des céphalosporines; - Inhibition par le clavulanate, pas par l'aztréonam	CepA
2f	2f	A	Carbapénèmes	Variable	Non	Hydrolyse des carbapénèmes, oxyimino-β-lactamines et céphamycines	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1)	Carbapénèmes	Non	Oui	Hydrolyse à large spectre incluant les carbapénèmes mais pas les monobactames	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
		B (B3)					L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapénèmes	Non	Oui	Hydrolyse préférentielle des carbapénèmes	CphA, Sfh-1
NI	4	inconnu					

AC : acide clavulanique, **TZB**: tazobactam, **EDTA** : Acide Ethylène Diamine Tétracétique, **NI** : non inclus

II. Supports génétiques et mobilité de la résistance aux antibiotiques

II.1. Supports génétiques

Habituellement, il est supposé que la propagation rapide des déterminants de la résistance aux antibiotiques chez les souches cliniques est en rapport avec la présence et les propriétés des éléments mobiles. En premier, on a considéré que ces éléments étaient les plasmides et les transposons qui ont été retrouvés dans plusieurs groupes systématiques bactériens. Plus tard, les transposons conjugatifs ont été détectés, et leur rôle dans le transfert de gène entre les bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif a été étudié. Cependant, les principaux mécanismes de l'apparition de la résistance des bactéries aux antibiotiques et leur émergence étendue a été clarifié seulement ces dernières années dû à la découverte d'intégrons et l'analyse de leur structure (Mindlin *et al.*, 2006).

Les différents types d'entités (plasmides, transposons, intégrons et phages) sont susceptibles de diriger les transferts génétiques selon différents modes, les bactériophages avec la transduction, les transposons et les intégrons avec le déplacement et la capture de gènes, les plasmides transférables avec la conjugaison, ou encore la transformation par internalisation d'ADN libre extracellulaire. (Sota et Top, 2008 ; Kelly *et al.*, 2009).

II.1.1. Les plasmides

Ce sont des molécules d'ADN double brin, circulaire, cytoplasmique et indépendantes du chromosome capables d'autoréplication. Leur transmission naturelle d'une bactérie à l'autre s'effectue habituellement par conjugaison. Un plasmide peut porter plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques conférant ainsi en bloc une multirésistance (Skurnik, 2009; ploy *et al.*, 2005).

Les plasmides se caractérisent par leur type et origine de répllication (*OriV*), leur nombre de copies, leur compatibilité entre plasmides, leur mobilisation, leur spécificité d'hôte et leur origine de transfert (*OriT*). La notion de spécificité de l'hôte des plasmides est très importante dans le transfert de gènes entre espèces bactériennes et se détermine par sa capacité de répllication dans différentes espèces et genres bactériens (Caspi *et al.*, 2001)

II.1.2. les intégrons

Les intégrons ont eu plusieurs définitions. Actuellement celle de Hall et Collis datant de 1995 est adoptée par tous : « Un intégron est une unité génétique qui inclut un site spécifique de recombinaison, capable de capturer et mobiliser des gènes contenus dans des

éléments mobiles appelés gènes cassettes et un promoteur pour l'expression des gènes cassettes. Il agit comme un système naturel de clonage et comme un vecteur d'expression. » Le composant indispensable d'un intégron est un gène *int* codant une recombinase spécifique de site appartenant à la famille des intégrases. Les autres composants essentiels sont, un site adjacent *attI* qui est reconnu par l'intégrase et qui sert de site récepteur pour les gènes cassettes, et un promoteur orienté à la suite qui permet l'expression des gènes cassettes (Skurnik, 2009).

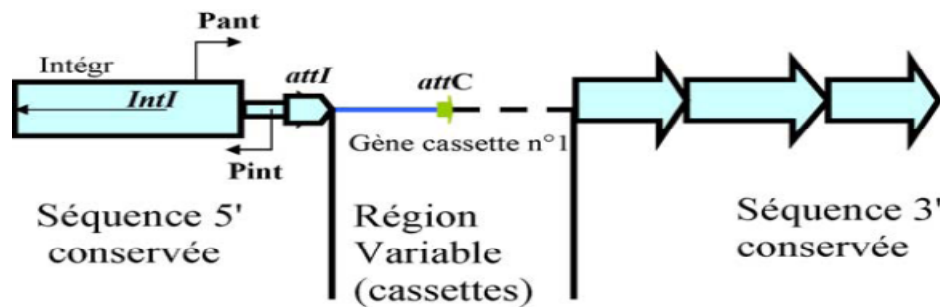


Figure N° 5: Représentation schématique d'un intégron (Skurnik, 2009)

On divise l'intégron en trois fragments : un fragment 5' et un fragment 3' constants qui flanquent une région variable composée des gènes cassettes (figure 5)

Les intégrons ne sont pas automobilisables mais sont souvent associés à des transposons et/ou à des plasmides conjugatifs qui peuvent ainsi servir de véhicules pour la transmission inter- et intraspécifique de matériel génétique. Tn21 et Tn7 sont les deux des principaux exemples d'associations de transposons et d'intégrons (Skurnik, 2009).

II.1.3. les transposons




Les transposons sont des éléments qui sont capables se déplacer par eux même (transposition) voir de se répliquer au sein du génome de la bactérie qui les héberge. Cependant, pour être transférés d'une cellule à une autre, ces éléments doivent être associés à des éléments génétiques capable de mobilité intercellulaire tel que certains plasmides, les phages, ou encore les ICE (Integrative and Conjugative Elements, ou transposons conjugatifs) (Galimand *et al.*, 2005).

Ce sont habituellement les transposons eux mêmes qui codent leurs protéines de transpositions (transposase et intégrase). On décrit trois principaux types (tableau VI) de transposons dont :

- les séquences d'insertions (SI),
- les transposons non-composites;
- les transposons composites (Skurnik, 2009).

Les éléments transposables se composent à minima d'un gène codant pour une transposase (enzyme assurant la transposition de l'élément mobile) et de séquences inversées répétées bordant l'élément. La transposase reconnaît les régions inversées répétées et catalyse la transposition des extrémités du transposon vers un site cible. Outre les séquences impliquées dans la transposition, les transposons peuvent porter des gènes accessoires comme des gènes de résistance aux antibiotiques par exemple (Galimand *et al.*, 2005).

Tableau VI: Structure de base schématisée des différents types d'éléments transposables selon la nomenclature proposée par Roberts *et al.* (2008).

Type d'éléments transposables	Définition	Structure schématisée
Séquence d'insertion (IS)	Elément codant pour une transposase, encadré de 2 séquences inversées répétées (IR)	
Transposon composite	Elément codant pour une résistance à un antibiotique, encadré de 2 éléments IS.	
Transposon non composite	Elément codant pour une excisionase et porteur d'un ou plusieurs gènes accessoires.	

1. Présentation de la STEP d'Aokas.

Inaugurée en septembre 2006, la station d'épuration d'Aokas (Béjaia) est destinée à épurer les eaux usées urbaines domestiques, d'une population de 14776 habitants, avec un débit journalier de $1000 \text{ m}^3 / \text{j}$ et un débit moyen de $42 \text{ m}^3/\text{h}$. Les milieux récepteurs finals des eaux usées épurées et des sous produits de l'épuration (boues) sont la mer et la décharge publique respectivement. Les caractéristiques des effluents avant et après traitement sont résumées dans le tableau VII

Tableau VII : Caractéristiques des eaux avant et après traitement.

Eaux caractéristiques	Brutes	Epurées
Demande Biologique en oxygène (DBO ₅)	400mg/L	≤à 40mg/L
Matières En Suspension (MES)	400mg/L	≤à 30mg/L

2. Principes du traitement des eaux usées par épuration biologique

Une station d'épuration comprend classiquement plusieurs unités de traitement, placées en série, qui assurent :

- Un prétraitement physique de l'effluent,
- Un traitement biologique,
- Une décantation secondaire,
- Le traitement des boues récoltées dans les bassins de décantation.

2.1. Prétraitement physique de l'effluent

Destiné à préparer l'effluent au traitement biologique ultérieur.

- Le dégrillage

Premier poste de traitement (situé à l'arrivée des eaux usées dans la station). Il a pour but de retenir les déchets solides et volumineux (papiers, feuilles, objets divers...). Charriés par l'eau brute, insensibles au traitement biologique et nuisibles pour les installations situées en aval (pompes, conduites).

L'effluent passe pour cela entre les barreaux métalliques d'une grille. Les déchets ainsi recueillis, après stockage, ont des destinations variables selon leur nature : mise en décharge, incinération...

2.2. La décantation primaire

Elle permet de retirer des eaux usées les matières décantables qu'elles contiennent encore. Dans ce cas, la séparation qui s'effectue par gravité ne concerne que les particules de diamètres supérieurs à 100 micromètres. Celles de diamètre inférieur à 100 micromètres ne décantent pas mais seront entraînées vers les unités ultérieures de traitement. Les matières décantables sont dite « boues primaires » et sont récupérées et orientées vers le traitement des boues. A ce stade de traitement les eaux usées sont dépourvues de la quasi-totalité des particules en suspension qu'elles contenaient et peuvent subir le traitement biologique.

2.3. Le traitement biologique

Le principe du traitement biologique repose sur la dégradation des composés organiques présents dans l'effluent par des microorganismes (aérobies et/ou anaérobies). Ceux-ci pour se développer, vont se nourrir de cette pollution organique dissoute. Ces microorganismes exercent, d'autre part, un effet physique de rétention de la pollution organique par leur propension à se rassembler en films ou flocons. Dans le cas des bactéries aérobies, l'oxygène nécessaire à leur métabolisme leur est apporté par des dispositifs d'aération.

- Les boues activées

Ce procédé est encore appelé système à cultures libres car les microorganismes épurateurs flottent librement dans l'effluent. Un dispositif de brassage permet un mélange homogène floc bactérien-eaux usées. L'apport d'oxygène nécessaire aux bactéries est assuré par le brassage de l'eau, permettant la dissolution de l'oxygène atmosphérique dans l'eau et/ou par adjonction d'oxygène pur. Après un temps de contact suffisant (26H), l'effluent épuré est séparé des microorganismes par décantation.

2.4. La décantation secondaire

La séparation des boues formées à lieu dans un décanteur secondaire (ou clarificateur) après un temps de contact de 2 à 5H. La masse biologique ainsi récupérée constitue les boues secondaires dont une partie est évacuée vers le traitement des boues, tandis que l'autre est recyclée pour maintenir une masse biologique suffisante pour l'épuration.

2.5. Le traitement des boues

Qu'il s'agisse des boues primaires ou secondaires, leur traitement est un corollaire inévitable du traitement de l'eau et représente une charge d'exploitation importante pour la station.

Il a plusieurs objectifs :

- réduire la masse organique : par digestion aérobie ou anaérobie
- réduite le volume des boues par épaissement

2.5.1. La stabilisation

L'apport prolongé d'oxygène stimule le développement des microorganismes jusqu'à épuisement du milieu. Pour cela, les boues séjournent dans des bassins dits de stabilisation. Elle consiste par une aération prolongée, à stimuler ou à entretenir le développement des microorganismes aérobies jusqu'à dépasser la période de synthèse des cellules et réaliser leur propre auto-oxydation.

2.5.2. L'épaissement

L'épaissement permet de réduire leur volume en évacuant l'eau interstitielle qu'elles contiennent. Il peut se faire par décantation, qui consiste à laisser reposer les boues et après sédimentation à récupérer en surface l'eau interstitielle.

3. Echantillonnage

Les différents échantillons d'eau, 200 ml à chaque point de prélèvement ainsi que les différents échantillons de boues ont été collectés aseptiquement lors de plusieurs campagnes de terrain effectuées entre le 25 décembre 2010 et 29 mai 2011 dans la station d'épuration des eaux usées d'Aokas (Béjaia). Les échantillons d'eaux sont prélevés dans des flacons en verre stériles de 250ml, au niveau :

- De l'entrée de la station ;
- Du bassin d'aération ;
- Du décanteur secondaire ;
- Du stabilisateur (figure 7)

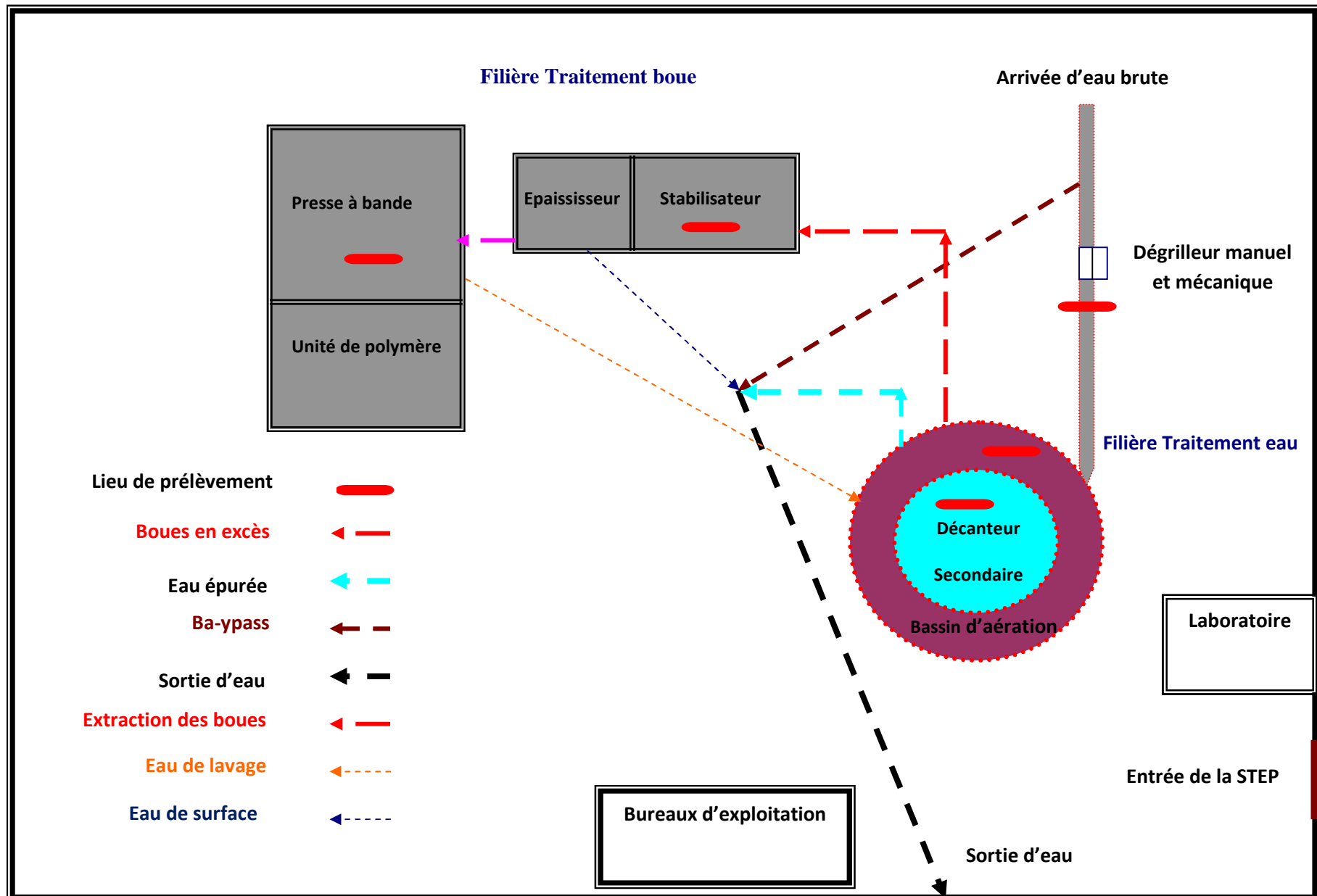


Figure N°7: Schéma synoptique de la STEP d'AOKAS

4. Mise en culture

4.1. Enrichissement

✓ 1 ml de chaque échantillon d'eau usée est ajouté à 5 ml de bouillon nutritif additionné de 2µg/ml de céftazidime (CAZ), puis incubé à 44°C pendant 18 à 24h.

✓ A l'aide d'une anse de platine on prélève une ose de boue sèche dans 5 endroits différents et on inocule chacune d'elles 5 ml de bouillon nutritif additionné de 2µg/ml de céftazidime, puis on incube à 44°C pendant 18 à 24h.

4.2. Isolement et purification

Afin d'isoler les souches d'*Escherichia coli*, à partir de la suspension du milieu d'enrichissement on réalise une dilution de 10⁻².

100 µl de la solution mère et de la dilution 10⁻² sontensemencés à l'aide d'un râteau étaleur sur la gélose EMB (annexe I) additionnée de 8µg/ml de céftazidime. Les boîtesensemencées sont incubées à 44°C pendant 24h.

Après incubation, 3 à 5 colonies caractéristiques des souches d'*E. coli*, sont repiquées sur la gélose de sélection (EMB+ CAZ à 8µg/ml).

On procède à une purification des souches en réalisant un autre repiquage à partir de la gélose de sélection sur la gélose TSA (annexe I)

➤ Identification des souches

L'identification des souches *Escherichia coli* est réalisée par l'étude du Gram et de plusieurs tests biochimiques (Le Minor et Richard, 1993) dont :

- Utilisation du glucose, du lactose et production de gaz et d'H₂S sur gélose TSI.
- Recherche de la nitrate-réductase sur bouillon nitraté.
- Recherche d'uréase, production d'indole, et d'une TDA sur milieu urée-indole.
- Etude du type fermentaire (réaction de Voges-Proskauer et RM) sur milieu Clark et Lubs.
- Dégradation des acides aminés sur milieu Moeller.
- Fermentation du mannitol et mobilité sur milieu mannitol-mobilité.
- Utilisation du citrate sur milieu citrate de Simmons.
- Production d'indole à partir du tryptophane à 44°C sur milieu eau peptonnée exempte d'indole. (La composition de ces milieux est donnée en annexe I)

5. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques

Toutes les souches *Escherichia coli* purifiées et identifiées ont été testées vis-à-vis d'un ensemble d'antibiotique (tableau VIII). La sensibilité des souches aux antibiotiques est évaluée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du Comité Français de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2010).

- **Milieu**

Nous avons utilisé la gélose Mueller Hinton (annexe I). L'épaisseur de la gélose est de 4 mm. Après avoir coulé la gélose, les boîtes sont séchées afin d'éliminer l'excès d'humidité.

- **Inoculum**

A partir d'une culture de 18 à 24h sur milieu gélosé non sélectif (TSA ou PCA, annexe I), on réalise une suspension en dissociant 4 à 5 colonies dans 5 ml d'eau physiologique stérile. L'inoculum est ajusté jusqu'à obtenir une DO de 0.10 à 550 nm (correspondant à environ 10^8 bactéries/ml). Après homogénéisation de la suspension, on réalise une dilution de 10^{-1} (CFA-SFM, 2010).

- **Ensemencement**

Les boîtes de Pétri préalablement coulées, sont ensemencées par écouvillonnage avec la suspension inoculum diluée 10^{-1} (~ 10^7 UFC/mL), en respectant les mesures de sécurité nécessaires. Par la suite, les disques d'antibiotiques sont déposés à l'aide d'une pince stérile. On incube les boîtes pendant 24h à 37°C.

- **Lecture**

On mesure à l'aide d'un pied à coulisse les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques. L'interprétation en Sensible (S) Intermédiaire (I), ou Résistante (R) est effectuée selon les critères définis par le CFA-SFM (CFA-SFM, 2010) (Annexe III).

Tableau VIII : Liste des antibiotiques testés

Antibiotiques	Abréviation	Charge (µg)	Famille
Amoxicilline/clavulanate	AMC	20/10	β-lactamines [Aminopénicillines]
Céfazoline	CZ	30	β-lactamines [C2G]
Céfoxitine	FOX	30	β-lactamines [C2G]
Céfotaxime	CTX	30	β-lactamines [C3G]
Ceftazidime	CAZ	30	β-lactamines [C3G]
Cefepime	FEP	30	β-lactamines [C4G]
Imipénème	IPM	10	β-lactamines [Carbapénèmes]
Aztréonam	ATM	30	β-lactamines [Monobactames]
Acide nalidixique	NA	30	Quinolones
Amikacine	AMK	30	Aminosides
Gentamicine	GM	10 UI	Aminosides
Kanamycine	K	30	Aminosides
Tobramycine	TOB	10	Aminosides
Fosfomycine	FOS	50	Fosfomycine
Colistine	CS	50	Polypeptides
Rifampicine	RA	30	Rifamycines
Triméthoprimé-sulfaméthoxazole	SXT	1,25+ 23,75	Sulfamides

6. Recherche de β -lactamases à spectre étendu (BLSE)

La recherche de la BLSE concerne les souches résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération : céfotaxime (CTX) ou céftazidime (CAZ).

6. 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 céphalosporines de 3^{ème} génération : ceftazidime et céfotaxime, et de 4^{ème} génération : céfépime (30 μ g chacun) à une distance de 20 mm (centre à centre) d'un disque combiné d'amoxicilline et d'acide clavulanique (AMC) (20 μ g et 10 μ g, respectivement). L'augmentation de la zone d'inhibition entre le disque d'AMC et les disques de ceftazidime (CAZ), céfotaxime (CAZ), ou céfépime (FEP) indique la production d'une BLSE (Jarlier et *al.*, 1988)

6. 2. DD-Test sur gélose à la cloxacilline

La production d'une céphalosporinase est vérifiée sur une gélose Muller Hinton +cloxacilline. Dans ce cas, nous avons refait le DD-test en utilisant la gélose Mueller Hinton additionnée de cloxacilline (250 μ g/ml) dans le but d'inhiber l'activité céphalosporinasique. La comparaison des diamètres d'inhibition entre les boites avec et sans cloxacilline permet de mettre en évidence la présence d'une céphalosporinase qui se traduit par une différence de diamètre entre la boite sans et avec cloxacilline est ≥ 5 mm (Jarlier et *al.*, 1988).

7. Transfert par Conjugaison (Aibinu et *al.*, 2003)

C'est le transfert d'un plasmide conjugatif codant pour la résistance à un ou plusieurs antibiotiques d'une souche donatrice à une souche réceptrice. La sélection des transconjugants s'effectue en présence de 2 antibiotiques : l'un correspond à l'une des résistances transférées, l'autre à la résistance chromosomique de la souche réceptrice.

La conjugaison a été réalisée pour toutes les souches productrices d'une BLSE et/ou d'une céphalosporinase. La souche de référence *Escherichia coli* C600 résistante à la rifampicine et sensible à tous les autres antibiotiques, a été utilisée comme souche réceptrice.

Nous avons utilisé aussi :

-Solution de rifampicine (2mg/ml).

-Solution de céftazidime (2mg/ml).

• **Technique**

1. On cultive les souches donatrices et la souche réceptrice dans 10 ml de bouillon trypticase soja (TSB). On incube une nuit à 37°C au bain-marie avec agitation.

2. On effectue une dilution au 1/50^{ème} (200µl dans 10 ml de TSB) de la souche donatrice et réceptrice puis on incube à 37°C pendant 3 heures.

3. Dans un erlen stérile, on mélange 1 ml de la culture de la souche donatrice avec 2 ml de la culture de la souche réceptrice et 1ml du bouillon TSB (rapport V/2V/V).

4. On incube le mélange et les témoins à l'étuve de 37°C pendant 2 heures.

5. Le milieu de sélection des transconjugants est représenté par la gélose Mueller Hinton contenant deux antibiotiques : la céftazidime (pour une concentration finale de 4 µg/ml) qui correspond au caractère suspecté plasmidique de la souche donatrice et la rifampicine (pour une concentration finale de 250 µg/ml) qui est un caractère chromosomique de la souche réceptrice.

Des boîtes témoin contenant de la gélose MH additionnée de rifampicine (culture des souches donatrices) et une autre boîte contenant le milieu MH additionné de ceftazidime (culture de la souche réceptrice) sont préparées afin de vérifier la sélectivité du milieu.

6. On étale 200 µl du mélange sur la surface des boîtes de sélection.

Afin de vérifier la sélectivité des milieux de sélection, onensemence la souche donatrice et la souche réceptrice séparément (boîtes témoin).

7. On incube les boîtes de sélection à 37°C pendant 18 heures.

8. Après incubation, on note la présence des transconjugants dans les boîtes contenant la gélose de sélection.

L'étude de la résistance des transconjugants est réalisée par la méthode de l'antibiogramme standard.

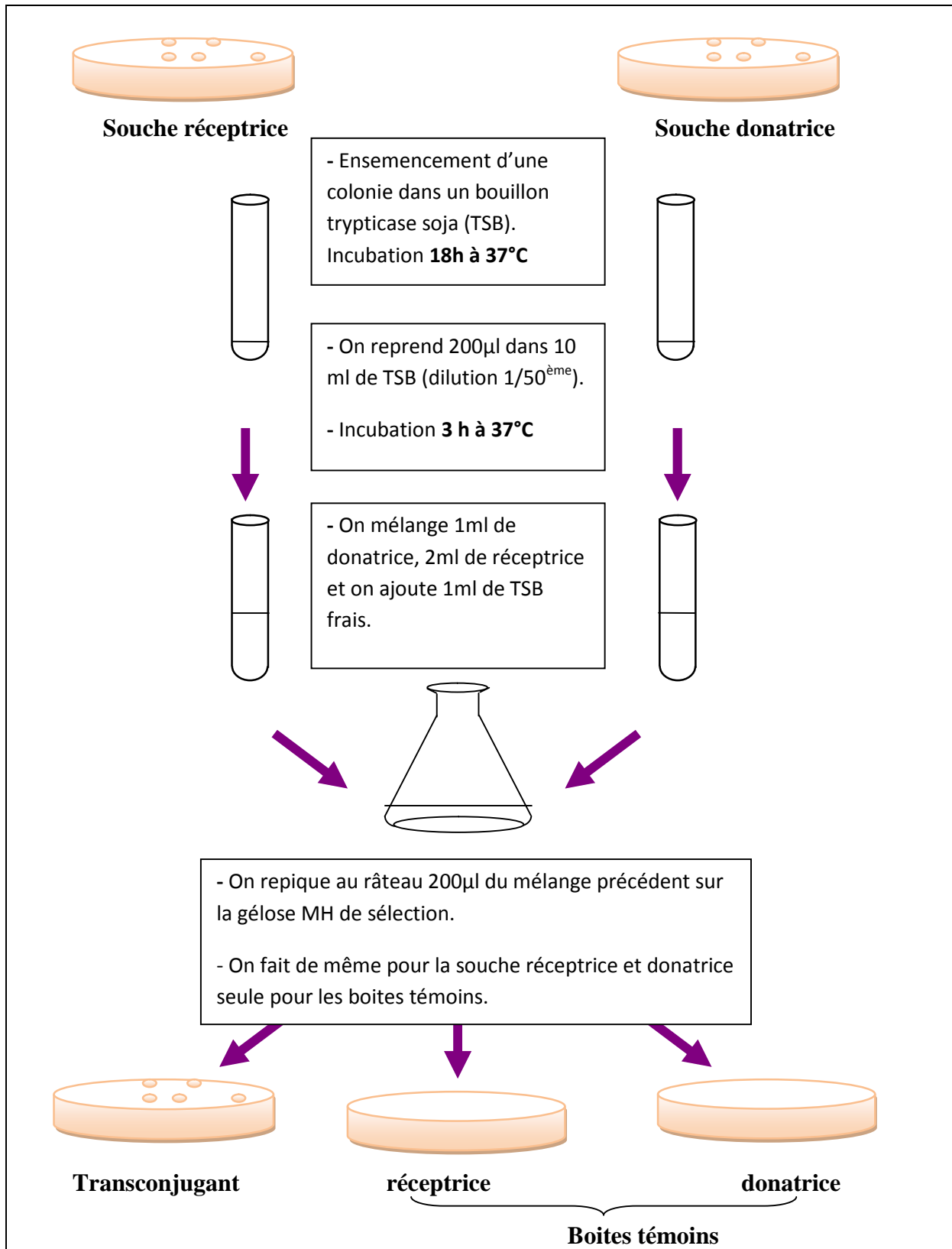


Figure N°8 : Technique de transfert plasmidique par conjugaison

8. Détermination des CMI en milieu solide (CA-SFM, 2010)

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont déterminées pour le céfotaxime, ceftazidime, céfépime, céfoxitine, gentamicine et ciprofloxacine.

Les souches testées sont les mêmes que celles testées pour le transfert des gènes de résistance par conjugaison ainsi que les transconjuguants obtenus.

8.1. Préparation des boîtes

- Une solution mère de chaque antibiotique à 2 mg/ml a été préparée - A partir de cette solution mère, des volumes déterminés sont prélevés et ajoutés à un certain volume de gélose Mueller Hinton en surfusion, dans le but de réaliser des concentrations croissantes (à raison de 2) de l'antibiotique (Tableau IX).
- Après homogénéisation, le milieu (Mueller Hinton + Antibiotique) est coulé sur boîte.
- Les boîtes sont ensuite séchées 30 minutes à l'étuve à 37° C.

Tableau IX : Volumes utilisés pour la réalisation de la gamme d'antibiotique

Concentration finale en ATB (µg/ml)	8	16	32	64	128	256
Volume de la solution d'ATB en (ml)	0.4	0.8	1.6	3.2	6.4	12.8
Volume de Mueller Hinton en (ml)	99.6	99.2	98.4	96.8	93.6	87.2

8.2. Ensemencement

A partir d'une solution de 10^8 UFC/ml, on réalise une dilution de 10^{-2} . On ensemence par spot 10 µl de la suspension bactérienne, soit un inoculum de 10^4 UFC/spot. On incube 18 à 24h à 37°C.

8.3. Lecture

La concentration minimale inhibitrice est définie comme étant la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle il n'y a pas de croissance visible. La présence d'une ou de deux colonies ou d'un fin film n'est pas pris en considération.

9. Traitement statistique des données

Des tests statistiques sont effectués par XL Stat 2011. 3.01. Le test de khi 2 et le test exact de Fisher sont employés pour l'étude de l'association de deux caractères.

I. Isolement des souches d'*Escherichia coli*

Au cours des 5 campagnes de prélèvement dans la station d'épuration d'Aokas décrite précédemment, 58 souches d'*Escherichia coli* ont été isolées sur la gélose de sélection contenant 8µg/ml de céftazidime des différentes installations.

L'identification des souches d'*Escherichia coli* a été réalisée sur la base de :

- L'aspect des colonies sur milieux sélectif (EMB) (Annexe IV).
- Les résultats des tests biochimiques (Annexe IV).

Le tableau X résume les dates et les lieux des prélèvements ainsi que les codes donnés aux souches d'*Escherichia coli* isolées et identifiées.

Il est à noter que les souches isolées à partir de la même boîte d'isolement et ayant un même profil de résistance aux β-lactamines mais aussi aux autres antibiotiques, ont été considérées comme étant la même souche.

Tableau N°X : Dates et origines des souches isolées

Date	Lieu de prélèvement	Code de la souche	
25/12/2010	Stabilisateur	EDB 1	<i>E.coli 1</i>
	Entrée	ENT 1	<i>E.coli 2</i>
	Entrée	ENT 2	<i>E.coli 3</i>
	Boue	B4(3)	<i>E.coli 4</i>
	Boue	B2(1)	<i>E.coli 5</i>
	Aérateur	Aé 1(2)	<i>E.coli 6</i>
	Boue	B1(3)	<i>E.coli 7</i>
	Boue	B1(2)	<i>E.coli 8</i>
15/01/ 2011	Aérateur	Aé 2	<i>E.coli 9</i>
	Aérateur	Aé3	<i>E.coli 10</i>
	Stabilisateur	EDB	<i>E.coli 11</i>
	Entrée	ENT	<i>E. coli 12</i>
	Boue	B3(3)	<i>E. coli 13</i>
	Boue	B3(2)	<i>E. coli 14</i>
	Boue	B1	<i>E. coli 15</i>
	Boue	B5	<i>E. coli 16</i>
Boue	B4	<i>E. coli 17</i>	

Tableau N°X : Dates et origines des souches isolées

Date	Lieu de prélèvement	Code de la souche	
05/03/2011	Aérateur	Aé 1	<i>E. coli</i> 18
	Aérateur	Aé 2	<i>E. coli</i> 19
	Boue	B1(1)	<i>E. coli</i> 20
	Boue	B1(3)	<i>E. coli</i> 21
	Aérateur	Aé3	<i>E. coli</i> 22
	Boue	B3(3)	<i>E. coli</i> 23
	Boue	B3(2)	<i>E. coli</i> 24
	Décanteur Secondaire	S2	<i>E. coli</i> 25
	Décanteur Secondaire	S3	<i>E. coli</i> 26
	Stabilisateur	EDB 1	<i>E. coli</i> 27
	Stabilisateur	EDB 3	<i>E. coli</i> 28
	Boue	B5(2)	<i>E. coli</i> 29
	Boue	B5(1)	<i>E. coli</i> 30
	Boue	B4(2)	<i>E. coli</i> 31
	Boue	B4(1)	<i>E. coli</i> 32
	Entrée	ENT 1	<i>E. coli</i> 33
	Entrée	ENT 2	<i>E. coli</i> 34
	26/03/2011	Boue	B1(2)
Aérateur		Aé 2	<i>E. coli</i> 36
Entrée		ENT 2	<i>E. coli</i> 37
Boue		B2(1)	<i>E. coli</i> 38
Entrée		ENT 1	<i>E. coli</i> 39
Stabilisateur		EDB 1	<i>E. coli</i> 40
Boue		B5(1)	<i>E. coli</i> 41
Boue		B5(3)	<i>E. coli</i> 42
Boue		B5(2)	<i>E. coli</i> 43
Boue		B4(1)	<i>E. coli</i> 44
29/05/11		Boue	B4(3)
	Boue	B4(3)	<i>E. coli</i> 46
	Boue	B4(2)	<i>E. coli</i> 47
	Boue	B1(2)	<i>E. coli</i> 48
	Boue	B1(3)	<i>E. coli</i> 49
	Stabilisateur	EDB 1	<i>E. coli</i> 50
	Décanteur Secondaire	S	<i>E. coli</i> 51
	Boue	B2(1)	<i>E. coli</i> 52
	Boue	B5(1)	<i>E. coli</i> 53
	Boue	B5(2)	<i>E. coli</i> 54
	Entrée	ENT 2	<i>E. coli</i> 55
	Boue	B1(1)	<i>E. coli</i> 56
	Aérateur	Aé3	<i>E. coli</i> 57
	Boue	B3	<i>E. coli</i> 58

Le nombre de souches d'*E.coli* obtenu des divers prélèvements reflète le bon fonctionnement de la méthode mise en place pour l'isolement de ces bactéries à partir d'échantillons de boues et d'eaux usées. La facilité d'isolement de ces bactéries provient de la sélectivité du milieu de culture utilisé (EMB) ainsi que de la morphologie et l'aspect (reflet vert métallique) comparable entre les colonies appartenant à cette espèce et celles appartenant aux autres genres bactériens pouvant croître sur le milieu.

L'isolement des souches à partir des origines décrites a été entrepris uniquement dans le but d'obtenir des souches d' *Escherichia coli* résistantes. De ce fait, le nombre des souches isolées mentionné dans le tableau ci-dessus ne reflète, en aucun cas, l'abondance relative de l'espèce bactérienne considérée dans les divers échantillons analysés.

Tableau XI : Répartition des souches par origine de prélèvement

Nombre	Boues	Eaux				Total
		Entrée	Aérateur	Décanteur II	Stabilisateur	
	33	8	8	3	6	58
%	56,9	13,8	13,8	5,17	10,34%	100%

Le tableau XI mentionne la répartition des souches d'*E.coli* par origine de prélèvement. De manière générale, les souches d'*Escherichia coli* sont plus nombreuses dans les boues avec un taux de 56,9%, suivent les eaux usées à l'entrée de la station d'épuration ainsi que les boues activées (aérateur) avec un taux de 13,8%. Le taux d'*E. coli* dans les eaux épurées (Décanteur II) est de 5,17%. Ces résultats montrent que le nombre de souches isolées résistantes à la CAZ à une concentration de 8µg/ml diminue de l'entrée à la sortie de la station. Des auteurs ont confirmé que le processus de traitement des eaux usées réduit insuffisamment le nombre de pathogènes (Strauch, 1998) et que les eaux usées traitées par processus biologique peuvent contenir entre 10 et 10³ coliformes/ ml résistants aux antibiotiques (Stelzer et Ziegert, 1988). Il a été aussi suggéré que le processus de traitement des eaux usées peut augmenter la proportion de bactéries résistantes à la sortie (Borjesson, 2009). Les processus biologiques sur la base des boues activées, en raison de la forte densité de cellules, sont considérés comme des facteurs favorisant la dissémination de la résistance chez les bactéries (Quczkiwicz *et al.*, 2010).

Les coliformes sont déversés dans les milieux naturels, dans le cas de la STEP d'Aokas, ils se retrouvent dans la mer. Une étude a montré qu'à l'échelle du bassin de la Seine, les rejets directs d'eaux usées traitées sont responsables de plus de 95 % des *E. coli* présents dans les cours d'eau (Garcia-Armisen et Servais, 2007)

II. Sensibilité des souches d'*E.coli* aux antibiotiques

Les souches d'*E.coli* isolées des différents prélèvements, présentent une résistance variable vis-à-vis des 17 antibiotiques testés, les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau III et le tableau V annexe V.

On note que chaque souche isolée des 58, résiste à au moins un antibiotique des 17 testés, ces résultats sont élevés par rapport à ceux rapportés par Passerat et ses collaborateurs en 2010, où 71 % des souches d'*E. coli* isolées d'effluents hospitaliers sont résistantes à au moins un antibiotique et que plus que 44 % de celles isolées des eaux usées municipales le sont.

II.1. Sensibilité des souches d'*E.coli* aux β -lactamines

L'ensemble des souches isolées ont été testées vis-à-vis de 8 β -lactamines à savoir : CZ (céphalosporines de 1^{ère} génération), FOX (céphalosporines de 2^{ème} génération), CAZ et CTX (céphalosporines de 3^{ème} génération), FEP (céphalosporines de 4^{ème} génération), AMC (amino-pénicilline), ATM (monobactams) et IMP (carbapénème), Les résultats des antibiogrammes effectués sur les 58 souches d'*E.coli* vis-à-vis de ces antibiotiques sont donnés dans le tableau III annexe V.

Lorsqu'on s'intéresse au nombre d'antibiotiques de la famille des β -lactamines auxquels les isolats résistent, on observe une forte résistance des souches. Effectivement, 15.51% du total des souches isolées (9/58) sont résistantes à 7 des 8 antibiotiques testés appartenant à cette famille.

L'imipénème reste la seule molécule des β -lactamines testées à être efficace. Il est à noter dans notre étude, qu'aucune résistance n'a été enregistrée vis-à-vis de celle-ci, le même résultat a été obtenu par Quczkiewicz et ses collaborateurs en 2010 dans leurs études sur des souches isolées des eaux usées municipales en Pologne (Quczkiewicz *et al.*, 2010).

La résistance aux carbapénèmes est médiée par des mécanismes tels que la perte de protéines de la membranaire externe, et la production de carbapénémases qui sont capables d'hydrolyser le carbapénèmes.

Bien que les *E. coli* producteurs de carbapénémases restent rares, néanmoins, des cas de *E. coli* multirésistants producteurs d'une carbapénémase plasmidique de classe B de type New Delhi Métallo- β -Lactamase (NDM-1) ont été rapportés (Deshpande *et al.*, 2010).

II.1.1.Sensibilité des souches d'*E.coli* aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G)

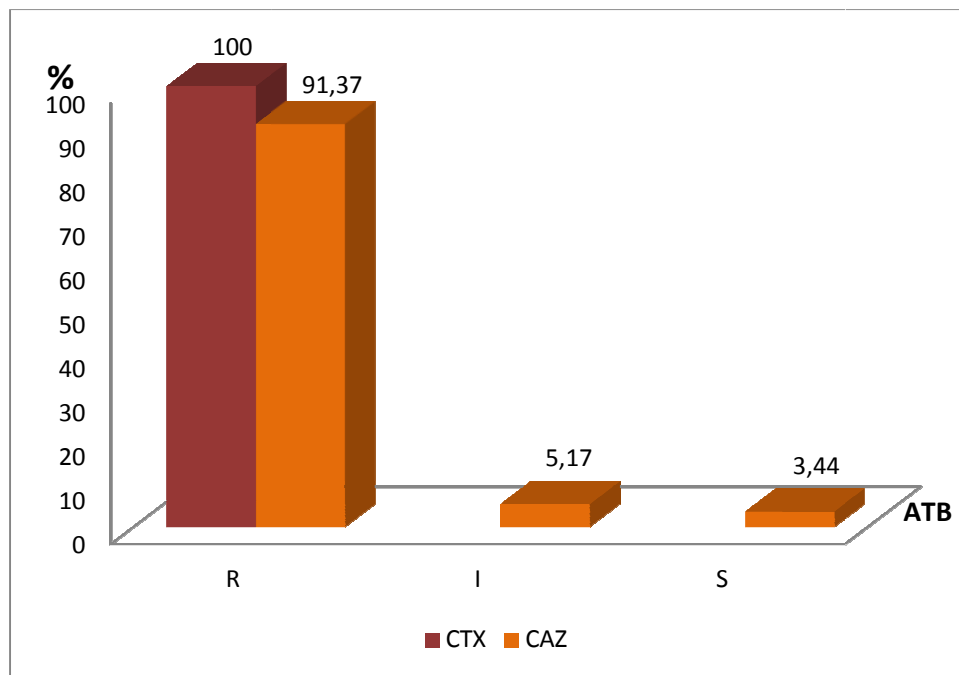


Figure N° 9 : Taux de résistance globaux des souches aux C3G.

Légende: CAZ (Céftazidime), CTX (Céfotaxime), R (Résistantes), I (Intermédiaire), S (Sensible).

La figure ci-dessus, indique que toutes les souches isolées sont résistantes au céfotaxime et 91.37% le sont vis-à-vis de la céftazidime. Le céfotaxime est théoriquement l'un des antibiotiques les plus actifs sur les entérobactéries. L'émergence de souches résistantes à cet antibiotique est de plus en plus observée de part le monde (Larabi *et al.*, 2003). Les taux de résistance à ces deux antibiotiques appartenant aux C3G dans notre étude sont élevés par rapport à ceux notés dans des études dans le milieu communautaire ou hospitalier. Effectivement, un taux de 25,7% a été enregistré par une étude de Mkaouar et ses collaborateurs dans le milieu communautaire en 2008 en Algérie et un taux de 47,08% par Ahoyo et ses collaborateurs dans le milieu hospitalier en 2007. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la sélection des souches d'*E.coli* isolées s'est faite sur la base de la résistance à la CAZ à une concentration de 8µg/ml.

Les souches d'*E.coli* sont résistantes à la Céftazidime et au Céfotaxime, soit par hyperproduction de céphalosporinase, soit par production d'une β-lactamase à spectre étendu (Nijessen *et al.*, 2004, Lartigue *et al.*, 2007)

❖ **Répartition des souches d'*E.coli* résistantes aux C3G.**

Le tableau ci-dessous donne le nombre de souches d'*E.coli* résistantes aux C3G isolées de chaque installation de la station d'épurations.

Tableau XII : Répartition des souches résistantes aux C3G par origine de prélèvement

Origine	CAZ	CTX
Entrée	8/8	8/8
Aérateur	8/8	8/8
Décanteur II	3/3	3/3
Stabilisateur	5/6	6/6
Boues	32/33	33/33
Total	56/58	58/58

Toutes les souches d'*E.coli* isolées des différentes installations de la station d'épuration sont résistantes au CTX et elles le sont aussi vis-à-vis de la CAZ, il n'y a que deux souches qui y sont sensibles à cet antibiotique, l'une isolée du stabilisateur et l'autre des boues sèches. Des comparaisons entre ces taux de résistance aux C3G dans les différentes installations de la station d'épuration notés dans cette étude avec d'autres études ne peuvent s'établir car ces comparaisons n'ont pas été étudiées jusqu'ici.

Le test statistique d'homogénéité a montré qu'au seuil $\alpha=5$, que la résistance à la CAZ est indépendante du site de prélèvement à cet antibiotique. Il n'y a pas de différences significatives quant à la résistance des souches d'*E.coli* isolées des différentes installations de la station d'épuration à la CAZ. Par conséquent, soit c'est l'origine des prélèvements qui n'a pas d'incidence sur la résistance des souches à la céftazidime, ou bien c'est le nombre de souches isolées qui ne permet pas de détecter si il y'a oui ou non une influence des origines de prélèvements sur la résistance à cet antibiotique.

II.1.2.Sensibilité des souches d'*E.coli* aux autres β -lactamines.

La figure qui suit résume les taux de résistance des 58 souches d'*E. coli* aux autres β -lactamines testées.

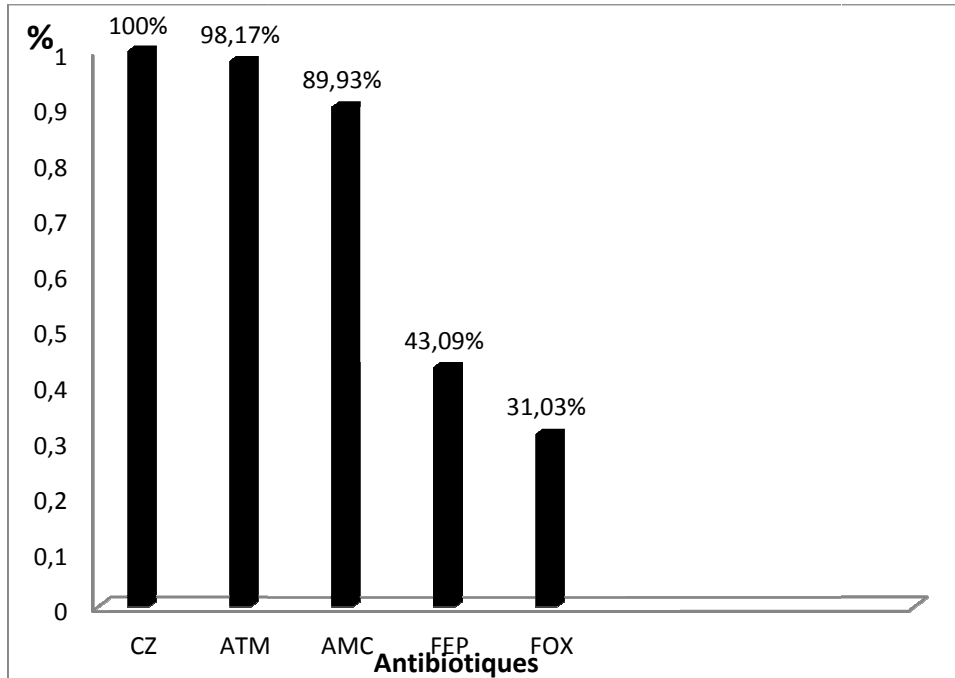


Figure N° 10 : Taux de résistance globaux des souches aux β -lactamines.

Légende: CZ (Céfazoline), FEP (Céfépime), AMC (Amoxicilline + Acide clavulanique), FOX (Céfoxitine), ATM (Aztréonam), R (Résistantes).

La figure 10 indique que toutes les souches sont très résistantes à la majorité des β -lactamines testées avec un taux de 100% pour la céfazoline. Des taux de 98.17% et 89.93% sont enregistrés vis-à-vis de l'ATM et l'AMC respectivement. Une résistance modérée est observée vis-à-vis de la FEP ainsi qu'à la FOX avec des taux respectivement de 43.09% et 31.03%. Ces taux sont élevés par rapport à ceux rapportés par Reinthaler et ses collaborateurs en 2003, où 0 à 18% du total des souches d'*E.coli* isolées sont résistantes aux pénicillines (amoxicilline, amoxicilline+ acide clavulanique et à la piperacilline) et aucune d'elles ne s'avèrent être résistante au FEP (Reinthaler *et al.*, 2003).

Watkinson et ses collaborateurs dans leur étude menée en 2007 sur la résistance aux antibiotiques d'*Escherichia coli* dans les eaux usées, les eaux de surface, et des huîtres ont rapporté un taux de résistance de 15% vis-à-vis de l'ampicilline et un taux de 14% vis-à-vis de la céfalotine (Watkinson *et al.*, 2007).

II.1.3. Recherche des β -lactamases à spectre étendu (BLSE)

Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) sont recherchées pour les souches résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération (céfotaxime et/ou céftazidime).

- **DD-test**

Toutes les souches ont été testées pour la production de β -lactamases à spectre étendu en utilisant la méthode du double disque.

Le DD-Test (figure 11) montre des images de synergie pour 56 des 58 souches d'*E. coli* résistantes (tableau IV, annexe V). Seules les souches *E. coli* 36 et *E. coli* 17 ne présentent pas une image de synergie

Reinthaler et ses collaborateurs ont noté des taux aussi élevés d'*E. coli* producteurs de BLSE dans les échantillons environnementaux, en particulier dans les boues d'épuration, probablement due à l'accumulation des bactéries après déshydratation (Reinthaler et *al.*, 2010).

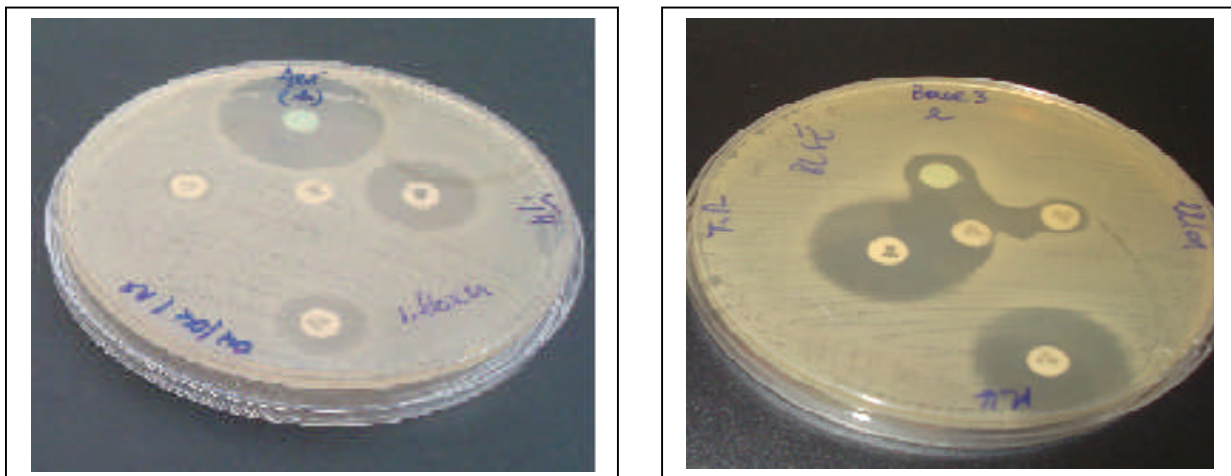


Figure N°11: Images de DD-test des Souches *E.coli* 14 et *E.coli* 36.

❖ DD-test sur gélose Mueller Hinton additionnée de cloxacilline

Pour mettre en évidence la présence de l'activité céphalosporinase, un DD-test incorporant la céfoxitine en plus du céfotaxime, ceftazidime et céfépime est effectué sur gélose Mueller Hinton additionnée de cloxacilline à une concentration de 250µg/ml. Les souches testées sur géloses Mueller Hinton additionnée de cloxacilline sont celles qui ne présentent pas d'images de synergie lors du DD-test ou bien celles qui présentent une image de synergie et sont résistantes à la céfoxitine.

Tableau XIII: Comparaison entre les diamètres (mm) des zones d'inhibition sur gélose Mueller Hinton et Mueller Hinton additionné de cloxacilline.

Code		CAZ	CTX	FEP	FOX	Enzymes
<i>E. coli</i> 2	Ø sur MH	12	6	14.5	18	BLSE
	Ø sur MH+cloxa	14	6	14.8	22	
	≠ (mm)	2	0	0.3	4	
<i>E. coli</i> 6	Ø sur MH	15	6	20	12	BLSE + AmpC
	Ø sur MH+cloxa	17	6	22	23.2	
	≠ (mm)	2	0	2	11.2	
<i>E. coli</i> 9	Ø sur MH	6	6	16	15	BLSE
	Ø sur MH+cloxa	6	6	22	19	
	≠ (mm)	0	0	6	4	
<i>E. coli</i> 12	Ø sur MH	11.6	8	20	12	BLSE + AmpC
	Ø sur MH+cloxa	13	10	23	24	
	≠ (mm)	1.4	2	3	12	
<i>E. coli</i> 17	Ø sur MH	6	6	18.5	6	hyperproduction
	Ø sur MH+cloxa	15.5	17	23	6	
	≠ (mm)	9.5	11	4.5	0	
<i>E. coli</i> 19	Ø sur MH	10.7	8	21.5	21	BLSE + AmpC
	Ø sur MH+cloxa	14.5	12.4	25.6	28	
	≠ (mm)	3.8	4.4	4.1	7	
<i>E. coli</i> 25	Ø sur MH	13.2	11	22	19	BLSE + AmpC
	Ø sur MH+cloxa	15	11.5	33	27.4	
	≠ (mm)	1.8	0.5	11	8.4	
<i>E. coli</i> 26	Ø sur MH	14	9	22.3	18.5	BLSE + AmpC
	Ø sur MH+cloxa	14	13	25.8	23.5	
	≠ (mm)	0	4	3.5	5	
<i>E. coli</i> 34	Ø sur MH	11	10	21	16.3	BLSE + AmpC
	Ø sur MH+cloxa	11.4	10	23.9	21.8	
	≠ (mm)	0.4	0	2.9	5.5	
<i>E. coli</i> 36	Ø sur MH	10.2	22.7	35	12.6	BLSE + AmpC
	Ø sur MH+cloxa	17	25	38.3	22.4	
	≠ (mm)	6.8	2.3	3.3	9.8	

<i>E. coli</i> 43	Ø sur MH	7.7	11.7	18.3	20	BLSE
	Ø sur MH+cloxa	9	13	24.2	23	
	≠ (mm)	1.3	1.3	5.9	3	
<i>E. coli</i> 45	Ø sur MH	6	7.5	15	16	BLSE + AmpC
	Ø sur MH+cloxa	6	9	21.6	21.7	
	≠ (mm)	0	1.5	6.6	5.7	
<i>E. coli</i> 46	Ø sur MH	16.6	16	14.2	17	BLSE + AmpC
	Ø sur MH+cloxa	20	25.3	19	22.3	
	≠ (mm)	3.4	9.3	4.8	5.3	
<i>E. coli</i> 51	Ø sur MH	11	8	25	11	BLSE + AmpC
	Ø sur MH+cloxa	26.6	28.8	36.8	21.6	
	≠ (mm)	15.6	20.8	11.8	10.6	
<i>E. coli</i> 52	Ø sur MH	18.8	14.6	17	13	BLSE + AmpC
	Ø sur MH+cloxa	25.3	22	27	22.5	
	≠ (mm)	6.5	7.4	10	9.5	
<i>E. coli</i> 57	Ø sur MH	10	8.5	25	7	BLSE + AmpC
	Ø sur MH+cloxa	22	19.2	30	16.5	
	≠ (mm)	12	10.7	5	9.5	

Légende: MH : Mueller Hinton, Ø : Diamètre sur gélose Mueller Hinton et sur Mueller Hinton additionnée de 250µg/ml de la cloxacilline.

Le tableau ci-dessus mentionne les diamètres des zones d'inhibitions autour des disques de CAZ, CTX, FEP et FOX sur la gélose Muller Hinton et Muller Hinton additionnée de 250µg/ml de cloxacilline.

Pour les souches *d'E.coli* 6, 12, 19, 25, 26, 34, 36, 45, 46, 51, 52 et 57, l'augmentation des diamètres d'inhibition autour des disques de céfotaxime et ceftazidime sur gélose Mueller Hinton additionnée de cloxacilline (tableau XIII) suggère que ces souches résistent aux bêta-lactamines par production d'une BLSE mais aussi par hyperproduction de céphalosporinases chromosomiques ou plasmidiques.

Les β-lactamases de la classe C (AmpC) sont codées par des gènes chromosomiques ou plasmidiques. Ces céphalosporinases sont capables d'hydrolyser les céphalosporines y compris les céphamycines (céfoxitine) ainsi que les pénicillines, mais pas le céfépime.

Ces β-lactamases sont résistantes aux inhibiteurs de β-lactamases. Le gène AmpC constitutif est faiblement exprimé chez *E. coli*. Cependant, elles peuvent acquérir différents sous-groupes d'Amp C codés par des plasmides. Ce sont des Amp C dérivées de *Citrobacter freundii* (BIL-1, CMY-2, LAT-1,2), d'*Enterobacter cloacae* (MIR-1, ACT-1) ou encore de *P.*

aeruginosa (CMY-1, FOX-1, MOX-1). Il existe plus de 20 β -lactamases AmpC différentes codées dans des plasmides (Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006).

Les souches d'*E. coli* 2et 43 ne présentent qu'une légère variation dans leur diamètre des zones d'inhibition sur gélose à la cloxacilline (tableau XIII) indiquant l'absence d'une céphalosporinase plasmidique. La résistance de ces souches aux β -lactamines est due à la présence de BLSE, par contre, la résistance à la céfoxitine peut être due à une imperméabilité membranaire.

Les DD-tests sur géloses Mueller Hinton et Mueller Hinton additionnées de cloxacilline n'ont pas permis de déterminer les mécanismes de résistance aux β -lactamines de la souche d'*E.coli* 9. .

II.1.4. Phénotype de résistance aux β -lactamines.

E.coli est naturellement sensible à toutes les β -lactamines, malgré la présence d'une céphalosporinase chromosomique d'espèce de classe C, qui est exprimée à très bas niveau (Sougakoff et Trystram, 2003).

La détermination phénotypique des mécanismes de résistance enzymatique des souches d'*E.coli* aux β -lactamines est faite selon le tableau XIV

Tableau XIV: Phénotypes de résistance d'*E.coli* aux β -lactamines (Lavigne *et al.*, 2002)

Phénotype	AM	AMC	CF	FOX	CTX	CAZ	FEP	IMP
Sauvage	S	S	S	S	S	S	S	S
Pase haut niveau	R	I/R	I/R	I/R	S	S	S	S
BLSE	R	R	R	S	R	R	R	S
TRI	R	R	S	S	S	S	S	S
Case haut niveau	R	R	R	R	R	R	S	S

Légende : AM : amoxicilline ; AMC : amoxicilline + acide clavulanique ; CF : céfalotine ; FOX : céfoxitine ; CTX : céfotaxime ; CAZ : ceftazidime ; FEP : céfépime ; IPM : imipénème ; Case : céphalosporinase ; Pase : pénicillinase ; BLSE : β -lactamase à spectre étendu ; TRI : TEM résistant aux inhibiteurs.

Les différents phénotypes de résistance aux β -lactamines des 58 souches d'*E.coli* isolées sont présentés dans la figure suivante :

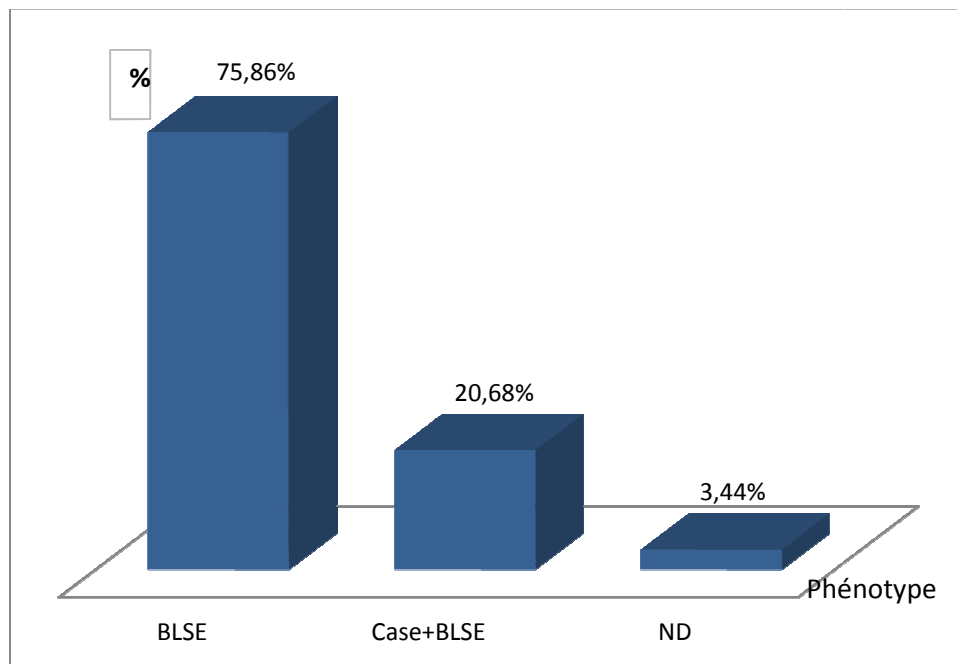


Figure N°12 : Distribution des Phénotypes de résistance aux β -lactamines des souches d'*E.coli*

Dans cette présente étude, 75.86% des souches d'*E.coli* isolées sont du phénotype BLSE. Effectivement, La résistance aux β -lactamines repose essentiellement sur la synthèse de β -lactamases plasmidiques généralement sensibles aux inhibiteurs de β -lactamases (Maurin et al.,1995). Elles sont capables d'hydrolyser les pénicillines, céphalosporines de première, deuxième, troisième et quatrième génération (C1G, C2G, C3G et C4G). Elles n'hydrolysent pas les carbapénèmes ainsi que les céphamycines et sont inhibées *in vitro* par les inhibiteurs de β - lactamases (acide clavulanique, tazobactam et sulbactam) (Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006).

TEM-1 est la β -lactamase la plus rencontrée chez les bactéries à Gram négatif. Plus de 90% de la résistance à l'ampicilline chez *E.coli* est due à la production de cette enzyme. Celle-ci est capable d'hydrolyser les pénicillines et les C1G (Bradford, 2001). Des mutants structuraux de pénicillinases plasmidiques à large spectre TEM-1, TEM-2 et SHV-1 qui sont très répandues chez les souches d'*E.coli* ont acquis la capacité d'hydrolyser des molécules comme le céfotaxime (oxyimino-céphalosporine) (Denton, 2007). Plus de 150 variantes de β -

lactamases de type TEM, ont été identifiées à ce jour, beaucoup d'entre elles montrent un phénotype BLSE (<http://www.lahey.org/studies/>).

L'histoire des BLSE a changé avec l'émergence des BLSE de type CTX-M. En 1989, en Allemagne, Bauernfeind et *al.*, caractérisèrent chez une souche d'*E.coli* résistante au céfotaxime une BLSE non-TEM et non-SHV, qu'ils nommèrent CTX-M-1. Depuis, les BLSE de type CTX-M ont formé une vaste famille d'enzymes qui ont évolué à partir de β -lactamases chromosomiques de *Kluyvera ascorbata* (enzymes désignées par KLUA) et qui sont en pleine expansion (Brigante et *al.*, 2005). Ces enzymes hydrolysent plus rapidement le céfotaxime que la ceftazidime. Plusieurs hydrolysent le céfépime (Bush et *al.*, 2009).

Certains variant de CTX-M ont une activité augmentée sur la ceftazidime : les CTX-M-32, -15, -16, et -27 dérivent respectivement de CTX-M-1, -3, -9, et -14 suite à une mutation ponctuelle en position 240(Asp-Gly). Cette mutation augmente d'environ 8fois les CMI à la CAZ par rapport aux CTX-M mère (Cattoire, 2008, Ruppé, 2010).

Les plasmides codant pour des CTX-M portent souvent d'autres gènes de résistance (notamment aux aminosides, aux tétracyclines, aux sulfamides et au triméthoprime) d'où la notion de co-résistance, co-sélection et co-expression.

Il y a d'autres BLSE dites mineures, ce sont les enzymes BEL-1, BES-1, SFO-1, TLA-1, TLA-2, et les β -lactamases de type PER et VEB (Bush et *al.*, 2009).

Le deuxième phénotype incriminé dans la résistance aux β -lactamines des souches d'*E.coli* isolées est la production d'une céphalosporinase à haut niveau avec un taux de 20.68%. L'hyperproduction du gène *ampC* peut être expliquée par l'absence des gènes de régulation de type *ampR* ou autres chez les céphalosporinases plasmidiques ou par des mutations dans le promoteur, des mutations dans le système d'atténuation, l'insertion d'une séquence IS2 ou l'amplification génétique de la céphalosporinase chromosomique (Philippon et *al.*, 2002). Cependant, phénotypiquement on ne peut pas distinguer entre l'hyperproduction chromosomique et plasmidique.

II.2. Sensibilité des souches d'*E.coli* aux autres familles d'antibiotiques

II.2.1. Sensibilité des souches d'*E.coli* aux aminosides

L'ensemble des souches isolées ont été testées vis-à-vis de 4 antibiotiques de la famille des aminosides à savoir : la gentamicine, la tobramycine, l'amikacine ainsi que la kanamycine.

La figure14 ci-dessous résume les taux de résistance des souches d'*E.coli* vis-à-vis des 4 aminosides testés.

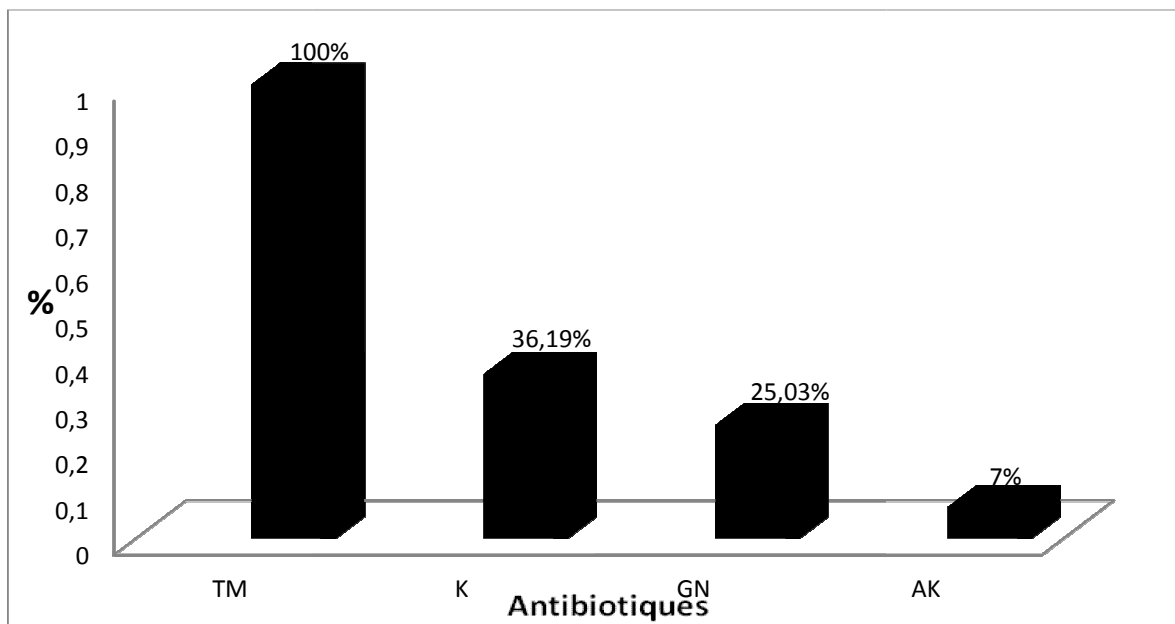


Figure N° 13: Taux de résistance globaux des souches aux aminosides.

Légende: TM (tobramycine), GN (gentamicine), AK (l'amikacine), K (kanamycine), R (Résistantes), S (Sensibles), I (intermédiaire).

Toutes les souches isolées sont résistantes la tobramycine, 36.19% du total des souches sont résistantes à la kanamycine et 25.03% le sont vis-à-vis de la gentamicine. l'amikacine reste efficace avec un taux de résistance de 7%.

Les résultats obtenus par Quczkiwicz et ses collaborateurs en 2010 montrent qu'aucune des souches d'*E.coli* isolées des eaux usées municipales en Pologne ne montre une résistance vis-à-vis de la tobramycine ou encore de l'amikacine.

La résistance acquise des souches d'*E.coli* aux aminosides, est due à plusieurs mécanismes dont le plus fréquent est le résultat de l'expression des enzymes qui modifient de façon covalente les antibiotiques, soit par l'acétylation, la phosphorylation ou adenylylation

(Wright, 2003). Ces enzymes modificatrices sont l’AAC (aminoside acétyl-transférase), l’ANT (aminoside nucléotidyltransférase) et l’APH (aminoside phosphotransférase).

D’autres mécanismes peuvent être en cause, tels que l’altération de la cible (l’ARN 16S), l’impermeabilité ou l’efflux actif de l’antibiotique (Courvalin et *al.*, 2006 ; Georgopapadakou, 2008).

Les résultats des antibiogrammes effectués sur les 58 souches d’*E.coli* vis-à-vis de ces antibiotiques ainsi que les phénotypes de résistance et les mécanismes de résistance probables aux aminosides des souches sont donnés dans le tableau XV.

Tableau XV : Phénotype de résistance aux aminosides

Code	GN	TM	K	AK	Phénotype
<i>E. coli</i> 1	S	R	R	S	TK
<i>E. coli</i> 2	S	R	I	S	TK
<i>E. coli</i> 3	R	R	I	S	GTK
<i>E. coli</i> 4	S	S	S	S	sensible
<i>E. coli</i> 5	S	R	R	S	TK
<i>E. coli</i> 6	R	R	I	S	GTK
<i>E. coli</i> 7	R	R	I	S	GTK
<i>E. coli</i> 8	R	R	S	S	GTK
<i>E. coli</i> 9	R	R	I	S	GTK
<i>E. coli</i> 10	S	S	S	S	sensible
<i>E. coli</i> 11	R	R	R	S	GTK
<i>E. coli</i> 12	S	R	S	S	T
<i>E. coli</i> 13	S	R	R	I	TKA
<i>E. coli</i> 14	S	S	S	S	sensible
<i>E. coli</i> 15	S	S	S	S	sensible
<i>E. coli</i> 16	S	S	S	S	sensible
<i>E. coli</i> 17	S	S	S	S	sensible
<i>E. coli</i> 18	R	R	R	S	GTK
<i>E. coli</i> 19	S	R	S	S	T
<i>E. coli</i> 20	S	S	S	S	sensible
<i>E. coli</i> 21	S	S	S	S	sensible
<i>E. coli</i> 22	S	S	S	S	sensible
<i>E. coli</i> 23	S	S	S	S	sensible
<i>E. coli</i> 24	S	S	S	S	sensible
<i>E. coli</i> 25	R	R	R	I	GTKA
<i>E. coli</i> 26	R	R	R	S	GTK

Tableau XV : Phénotype de résistance aux aminosides (suite).

Code	GN	TM	K	AK	Phénotype
<i>E. coli</i> 27	R	R	R	S	GTK
<i>E. coli</i> 28	R	R	R	I	GTKA
<i>E. coli</i> 29	S	S	S	S	sensible
<i>E. coli</i> 30	S	S	S	S	sensible
<i>E. coli</i> 31	S	S	S	S	sensible
<i>E. coli</i> 32	S	S	S	S	sensible
<i>E. coli</i> 33	S	S	S	S	sensible
<i>E. coli</i> 34	S	S	R	S	T
<i>E. coli</i> 35	S	S	S	S	sensible
<i>E. coli</i> 36	S	S	S	S	sensible
<i>E. coli</i> 37	S	S	S	S	sensible
<i>E. coli</i> 38	S	S	S	S	sensible
<i>E. coli</i> 39	S	S	S	S	sensible
<i>E. coli</i> 40	R	R	R	I	GTKA
<i>E. coli</i> 41	R	R	I	S	GTK
<i>E. coli</i> 42	S	R	S	S	T
<i>E. coli</i> 43	S	S	S	S	Sensible
<i>E. coli</i> 44	S	R	S	S	T
<i>E. coli</i> 45	R	R	I	S	GTK
<i>E. coli</i> 46	R	R	R	S	GTK
<i>E. coli</i> 47	S	S	S	S	sensible
<i>E. coli</i> 48	S	S	S	S	sensible
<i>E. coli</i> 49	S	S	S	S	sensible
<i>E. coli</i> 50	S	S	R	S	K
<i>E. coli</i> 51	S	S	S	S	sensible
<i>E. coli</i> 52	S	S	S	S	sensible
<i>E. coli</i> 53	S	S	S	S	sensible
<i>E. coli</i> 54	S	S	S	S	sensible
<i>E. coli</i> 55	S	S	S	S	sensible
<i>E. coli</i> 56	I	S	S	S	G
<i>E. coli</i> 57	S	S	S	S	sensible
<i>E. coli</i> 58	R	R	R	S	GTK

Les diamètres des zones d'inhibitions sont donnés dans l'annexe.

Légende : R : Résistantes, S : Sensibles, I : intermédiaire

Tableau XVI : Répartition des phénotypes de résistance aux aminosides

Nombre	Phénotypes				Total
	T	TK	GTK	Sensibles	
	5	4	16	32	57
%	8.62	6.9	27.6	55.17	98.27

Le tableau ci-dessus résume la répartition des phénotypes de résistance aux aminoides, on note que le phénotype GTK est le plus dominant (16/58 souches ont été retrouvées résistantes à trois aminosides : gentamicine, tobramycine et kanamycine). Ce phénotype serait dû à la synthèse d'une enzyme modificatrice de type ANT (2'') chez les bactéries à Gram négatif (Wright, 2008). Cette tendance est aussi observée dans une étude menée par Pontes et *al.*, (2009) chez les bactéries à Gram négatif isolées des lacs oligotrophiques naturels des régions tropicales, rapportant la présence des souches d'*E.coli*, avec une dominance du phénotype GTK.

Quatre souches (E1, E2, E5 et E13) ont été retrouvées résistantes à la tobramycine et kanamycine (Le phénotype TK). Cette résistance serait due à la synthèse d'une APH (3')-I, qui phosphoryle ces deux aminosides. Par ailleurs, un mécanisme de piégeage a été proposé pour expliquer ce phénotype (Menard, et *al.* 1993).

Cinq souches sont résistantes uniquement à la tobramycine avec un taux de 8.62% (E12, E19, E34, E42 et E44) et seule la souche E50 s'avère être résistante uniquement à la kanamycine.

55.17% des souches isolées sont sensibles aux 4 antibiotiques de la famille des aminosides testés. Selon Lambert (2006), la quasi-totalité des genres bactériens composant la famille des *Enterobacteriaceae* est naturellement sensible aux aminosides. Les gènes de résistances aux aminosides sont souvent co-transférés avec des gènes produisant des BLSE par des plasmides.

II.2.3. Sensibilité des souches d'*E.coli* aux autres antibiotiques

Les souches d'*E.coli* isolées ont été testées vis-à-vis de quatre autres antibiotiques, à savoir : l'acide nalidixique (NA) appartenant à la famille des quinolones, la colistine (Cs) à la famille des polypeptides, la fosfomycine (FOS), la rifampicine (RA) ainsi qu'triméthoprime-sulfaméthoxazole (SXT) de la famille des sulfamides. Les résultats des antibiogrammes effectués sur les 58 souches d'*E.coli* vis-à-vis de ces antibiotiques sont donnés dans le tableau V annexe V.

La figure 16 ci-dessous illustre les taux de résistance obtenus vis-à-vis de chacun des antibiotiques testés.

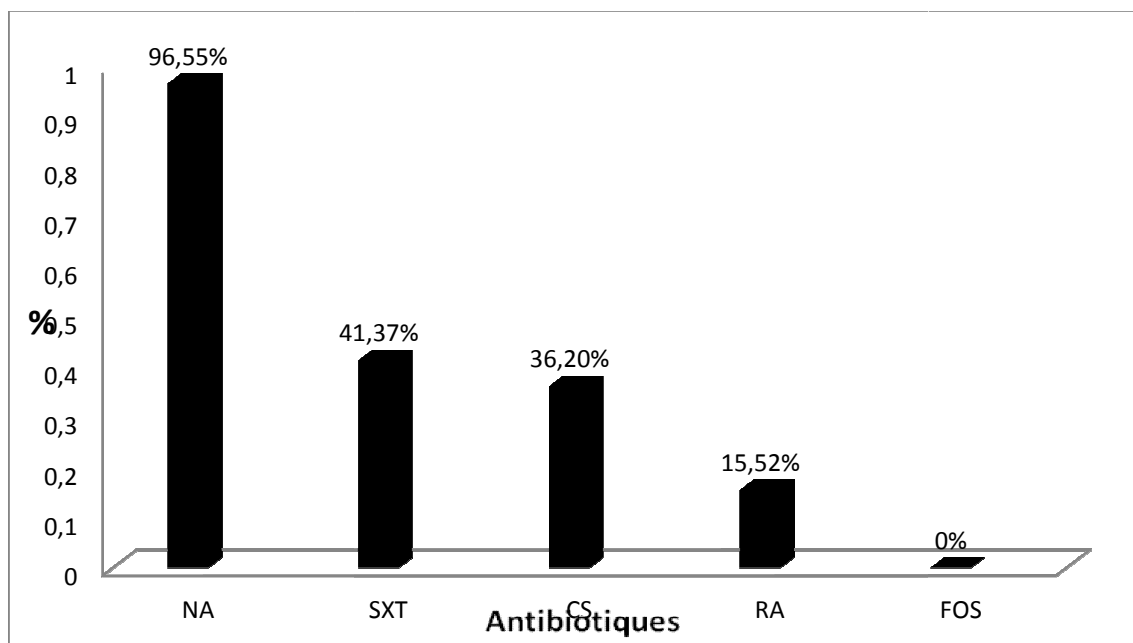


Figure N° 14: Taux de résistance globaux des souches aux autres antibiotiques

Légende: NA (l'acide nalidixique), Cs (la colistine), FOS (la fosfomycine), RA (la rifampicine), SXT (triméthoprime-sulfaméthoxazole), R (Résistantes), S (Sensibles), I (intermédiaire)

L'acide nalidixique, qui correspond à la plus ancienne substance de la famille des quinolones, a une très faible activité sur les *E.coli* isolées. Effectivement, 96.55% des souches sont résistantes à cet antibiotique, seules *E.coli* 51 et *E.coli* 57 sont sensibles. Ces taux sont élevés par rapport à ceux rapportés par Reinthaler et ses collaborateurs en 2003, ou seulement 15% du total des *E.coli* isolés sont résistants à l'acide nalidixique et aussi à ceux rapportés par Watkinson et ses collaborateurs en 2007, qui ont observé une résistance de 5% des souches d'*E.coli* à cette molécule.

La résistance acquise aux quinolones chez les souches *d'E.coli* est le plus souvent le résultat de mutations chromosomiques au niveau des enzymes impliquées dans la synthèse d'ADN bactérien qui sont ; la gyrase et l'ADN topoisomérase IV, diminuant ainsi l'affinité de ces antibiotiques à leurs cibles. Toutefois, une résistance plasmidique a été décrite en 1998, qui est due à la protection de la cible par les protéines Qnr (Courvalin et *al.*, 2006).

En 2008, Cantón et ses collaborateurs ont décrit le gène codant pour SHV-12 en association avec le déterminant plasmidique de résistance aux quinolones, QnrB.

La colistine et le triméthoprime-sulfaméthoxazole ont des taux de résistance plus relative des souches de *E.coli* isolées de la STEP, avec des taux respectivement de 36.20% et 41.37%. Quczkiwicz et ses collaborateurs en 2010 ainsi que Reinthaler et ses collaborateurs en 2003 ont observé une meilleure activité du SXT avec des taux respectivement de 11.1% et 13%.

Le "bypass" est fréquemment observé dans la résistance au Triméthoprime et aux sulfamides, il est défini, comme une acquisition de nouveaux gènes chez une bactérie qui peut lui permettre de déjouer l'effet toxique d'un antibiotique en contournant l'élément compromis de la voie affectée. Effectivement, ces agents antimicrobiens ont pour fonction d'interrompre la synthèse de l'acide folique en inhibant la dihydrofolate réductase (DHFR) et la dihydroptéroate synthétase (DHPS), respectivement. Toutefois, la présence de DHFR et DHPS d'origine plasmidique, dont *dfraI* et *sull*, faiblement ou non inhibés par ces composés, assure la synthèse normale d'acide folique chez ces organismes (Radstrom et Swedberg, 1988 ; Sundstrom *et al.*, 1993).

La fosfomycine et la rifampicine sont plus efficaces vis-à-vis des souches étudiées, ainsi, toutes les souches de *E.coli* isolées de la STEP sont sensibles à la fosfomycine et 84.48% le sont vis-à-vis de la rifampicine.

La résistance aux β -lactamines conférée par la synthèse de BLSE est fréquemment associée à la résistance aux différentes autres classes d'antibiotiques telles que les céphamycines, fluoroquinolone, aminosides, tétracyclines, et triméthoprime-sulfaméthoxazole (Falagas et *al.*, 2009).

III. Sensibilité des souches d'*E.coli* dans les différentes installations de la STEP.

III.1. distribution de la résistantes aux β -lactamines dans chaque installation de la STEP

La distribution du nombre de souches (résistantes+ intermédiaire) pour chaque β -lactamine et à chaque origine de prélèvement est mentionnée dans le tableau suivant :

Tableau XVII : Nombres de souches (résistantes + intermédiaires) pour chaque β -lactamine et à chaque origine.

	FEP	ATM	FOX	AMC
Entrée (n=8)	4	8	3	7
Aérateur (n=8)	2	8	5	8
Décanteur II (n=3)	0	3	3	3
Stabilisateur (n=6)	3	6	1	6
Boue (n= 33)	16	32	6	28

Le CZ n'est pas mentionné dans le tableau car toutes les souches de chaque origine y sont résistantes à 100%, elles sont aussi toutes sensibles à l'IMP.

Toutes les souches d'*E.coli* isolées à l'entrée de la station sont résistantes à l'ATM. 7/8, 4/8 et 4/8 le sont à l'AMC, au FEP et à la FOX, respectivement.

5/8 et 2/8 des souches isolées de l'aérateur sont résistantes à la FOX et au FEP respectivement, alors qu'elles y sont toutes vis-à-vis de l'ATM et de l'AMC.

Toutes les souches isolées à partir du décanteur secondaire sont résistantes à 6 des 8 antibiotiques de la famille des β -lactamines testées, il n'ya que le céfépime et l'imipenème qui restent actifs sur ces souches.

D'après le tableau XVII, on note que toutes les souches isolées du Stabilisateur sont résistantes à la majorité des β -lactamines testées. Toutes ces souches sont résistantes à l'ATM et à l'AMC en plus de la CZ. 3/6 le sont vis-à-vis du FEP et une seule d'entres elles est résistante à la FOX.

Les 33 souches d'*E.coli* isolées des boues sèches, ne demeurent pas moins résistantes que celles isolées des autres installations de la STEP. Effectivement, 32/ 33, 28/33 et 16/ 33 sont résistantes à la l'ATM, à l'AMC et au FEP, respectivement. 6/33 sont résistantes à la céfoxitine.

III.2. distribution de la résistantes aux aminosides dans chaque installation de la STEP

La distribution du nombre de souches (résistantes+ intermédiaire) pour chaque aminoside et à chaque origine de prélèvement est mentionnée dans le tableau XVIII:

Tableau XVIII: Nombres de souches (résistantes + intermédiaires) pour chaque aminoside et à chaque origine.

	GN	TM	K	AK
Entrée (n=8)	1	3	3	0
Aérateur (n=8)	3	4	3	0
Décanteur II (n=3)	2	2	2	1
Stabilisateur (n=6)	4	5	6	2
Boue (n= 33)	7	10	7	1

3/8 des souches d'*E.coli* isolées à l'entrée de la station sont résistantes à la tobramycine et à la kanamycine. Une seule est résistante à la gentamicine et aucune ne l'est à l'amikacine.

Les souches isolées de l'aérateur sont résistantes à des proportions de 3/8 à la gentamicine et kanamycine, 4/8 à la tobramycine et 0/8 vis-à-vis de l'amikacine.

2/3 des souches isolées du décanteur secondaire sont résistantes à la gentamicine, à la tobramycine et à la kanamycine, alors qu'elles y sont toutes sensibles à l'amikacine.

Toutes les souches isolées à partir du stabilisateur sont résistantes à la kanamycine. 4/6, 5/6 et 2/6 sont résistantes à la gentamicine, tobramycine et amikacine, respectivement.

Les 33 souches d'*E.coli* isolées des boues sèches, ont une résistance modérée vis-à-vis des aminosides testés. Effectivement, 7/ 33 d'entre elles sont résistantes à la gentamicine et à la kanamycine, 10/33 le sont à la tobramycine. Enfin, une seule est résistante à la kanamycine.

III.3. distribution de la résistantes aux autres antibiotiques dans chaque installation de la STEP

La distribution du nombre de souches (résistantes+ intermédiaire) pour chaque antibiotique et à chaque origine de prélèvement est mentionnée dans le tableau XIX :

Tableau XIX : Nombres de souches (résistantes + intermédiaires) pour à chaque antibiotique et à chaque origine.

	SXT	CS	NA	RA
Entrée (n=8)	3	3	8	0
Aérateur (n=8)	4	3	7	1
Décanteur II (n=3)	2	2	2	0
Stabilisateur (n=6)	5	4	6	0
Boue (n= 33)	10	9	33	8

3/8 des souches d'*E.coli* isolées à l'entrée de la station sont résistantes à la colistine et à l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole. Toutes les souches sont résistantes à l'acide nalidixique alors qu'aucune ne l'est à la rifampicine.

Les souches isolées de l'aérateur sont résistantes à des proportions de 4/8, 3/8 et 7/8 à l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole, à la colistine et à l'acide nalidixique, respectivement. Il n'y qu'une seule souche qui est résistante à la rifampicine.

2/3 des souches isolées du décanteur secondaire sont résistantes à l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole, à la colistine et à l'acide nalidixique, alors qu'elles y sont toutes sensibles à la rifampicine.

Toutes les souches isolées à partir du stabilisateur sont résistantes à l'acide nalidixique. 4/6 et 5/6 sont résistantes à l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole et à la colistine, aucune n'est résistante à la rifampicine.

D'après le tableau XIX, on note que toutes les souches d'*E.coli* isolées des boues sèches sont résistantes à l'acide nalidixique, 10 des 33 souches à l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole, 9/33 sont résistantes à la colistine et 8/33 le sont à la rifampicine.

Des comparaisons entre des taux de résistance aux antibiotiques dans les différentes installations des stations d'épuration n'ont pas été étudiées jusqu'ici.

L'analyse statistique (Tableaux VI, VII, et VIII; Annexe VI) par application du test d'indépendance entre deux variables a montré qu'au seuil $\alpha=0.05$, on maintient l'hypothèse que les résistances aux différents antibiotiques testés (β -lactamines, aminosides et autres antibiotiques) obtenues soient indépendantes de l'origine de prélèvement. Par conséquent, Il n'y a pas de différence significative quant à la résistance des souches d'*E.coli* isolées des différentes installations de la station d'épuration à ces antibiotiques. Donc, soit c'est l'origine des prélèvements qui n'a pas d'incidence sur la résistance des souches à ces antibiotiques, ou bien c'est le nombre de souches isolées qui ne permet pas de détecter si il y'a oui ou non une influence des origines de prélèvements sur la résistance.

IV. Résultats de la conjugaison

Le transfert par conjugaison a été réalisé pour les souches productrices de BLSE, résistantes ou intermédiaires à la FOX et intermédiaires ou sensibles à la rifampicine : *E.coli* 2, 6, 9, 12,17, 19, 25, 26, 34, 36, 43,45, 46, 50, 51, 52 et 57

Les transconjugants sont les seuls qui poussent sur la gélose de sélection (figure 15). Le transfert par conjugaison de résistance a été obtenu pour 7 des 17 souches testées : *E.coli* 2, 36, 45, 51, 50, 52 et 57. Aucune croissance n'a été observée sur la gélose de sélection dans le cas des autres souches, donc le transfert de la résistance aux antibiotiques n'a pas probablement eu lieu

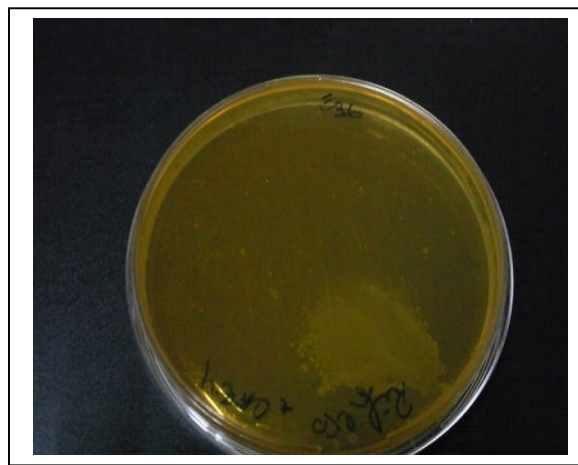


Figure N°15 : croissance des transconjugants des souches *E.coli* 36 sur la gélose de sélection

Fernandez-Astorga *et al.* 1992 ainsi que Mach *et al.* 1982 ont suggéré qu'il y'avait possibilité de transfert de plasmides dans les usines de traitement des eaux usées et des eaux de surface. Feuerpfeil *et al.* 1999 confirment que le transfert horizontal de gènes par conjugaison est possible dans la nature où la concentration bactérienne est élevée et donc le risque de contact entre deux cellules de bactéries approprié est élevé. Grabow et Prozesky ont montré que 26% de l'ensemble des coliformes dans les eaux usées des hôpitaux ont des résistances transférables, et que 4% des coliformes dans les eaux usées municipales l'ont.

Les transconjugants obtenus sont issus de souches d'*E.coli* des différentes installations de la station d'épuration (*E.coli* 2 de l'entrée, *E.coli* 36, 57 de l'aérateur, *E.coli* 45, 52 des boues, *E.coli* 50 du stabilisateur et enfin *E.coli* 57 du décanteur secondaire), l'échange des gènes de résistance est optimale dans des conditions de nutriments élevés, telles que celles trouvées dans les traitements aérobies (aérateur) et anaérobies (stabilisateur) des eaux usées,

et de haute densité bactérienne, comme dans les boues (Schluter, 2007 ; Castiglioni *et al.*, 2008)

En se basant sur les profils de résistance aux β -lactamines et autres antibiotiques, on a considéré que les transconjugants issus de la même souche sont les mêmes quand ils présentent des profils identiques. Pour chaque souche conjuguée on a obtenu qu'un seul transconjugant sauf pour la souche *E.coli* 2 on a eu 2 transconjugants (E2(1) et E2(2)).

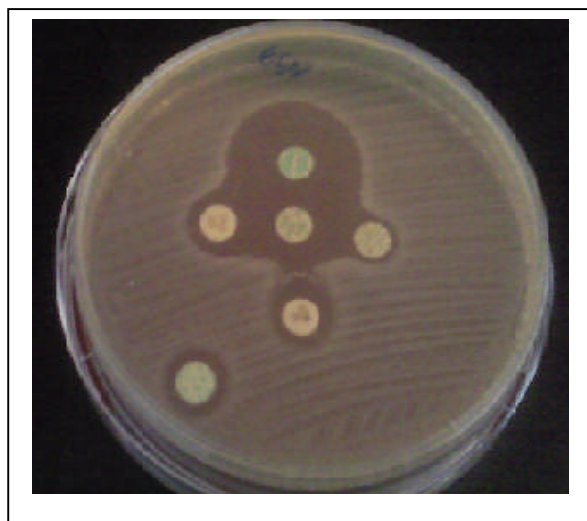
Après avoir sélectionné les transconjugants et réalisé les tests nécessaires (identification, antibiogramme et DD-test), nous avons constaté que les transconjugants d'*E.coli* produisent aussi des β -lactamases et montrent des profils de résistance similaires à ceux des souches donatrices (tableau XVII). Les déterminants de la résistance aux β -lactamines ainsi que ceux codants pour la résistance aux autres antibiotiques testés ont été transférés indiquant ainsi que ces déterminants sont plasmidiques.

Tableau XX : Diamètres (mm) des zones d'inhibition des souches conjuguées et de leurs transconjugants

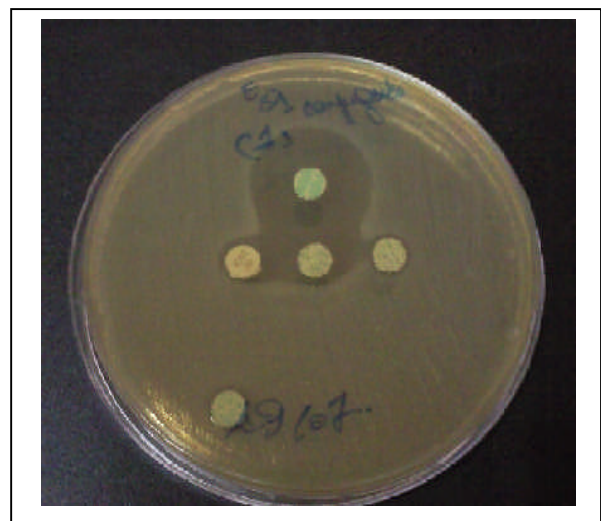
Code	CAZ	CTX	FEP	AMC	FOX	GN	SXT	K	AK	CS
<i>E.coli</i> 2	12	6	14.5	14	18	19.7	6	16.5	17.8	14
E2(1)	19.2	14.7	16.4	ND	28.3	24.7	6	16.6	21.6	16.6
E2(2)	17.6	6	12.3	ND	21.9	20	6	15.5	16.6	13.5
<i>E.coli</i> 36	10.2	22.7	35	6	12.	22	28.6	22.6	22.6	16
E36	17.8	19.6	26.6	12	16.8	23	28.7	23.6	23.2	15.3
<i>E.coli</i> 45	6	7.5	15	6	16	12	6	16.3	18.7	15.7
E45	15	6	11	16.4	21.5	9.3	6	12.2	15	14
<i>E.coli</i> 50	6	11.2	16	6	23	19.4	6	6	20.8	15
E50	17	16.3	30.2	12.6	31.2	21.4	31	22.8	19	18
<i>E.coli</i> 51	11	8	25	6	11	22.3	23.4	6	21.7	15.7
E51	9.3	7	24	10.5	8.8	20.5	26.5	20.5	18.2	14.3
<i>E.coli</i> 52	18.8	14.6	17	6	13	22.5	26.9	24.6	21.8	16
E52	20.2	12	19.2	21.6	27	22.5	28.8	24	22.4	16
<i>E.coli</i> 57	10	8.5	25	12	7	22.4	28.7	23.6	20	15
E57	9	7.8	22	12	10.6	19.5	25.5	21	19.6	13.6

Le transfert des gènes de résistance codant pour les BLSE par conjugaison, implique des éléments génétiques mobiles, tels que les plasmides. Ceux-ci, peuvent facilement dupliquer et se propager rapidement parmi différentes espèces bactériennes par transfert horizontal, ce qui représente un grand risque avec des conséquences significatives environnementales (Pei *et al.*, 2006). le système intégrons/gènes cassettes sur les plasmides ou transposons ont été identifiés comme source de résistance et ont servit comme réservoirs des gènes de résistance y compris chez les isolats d'*E.coli* et ils pourraient contribuer à la dissémination rapide des gènes de résistance dans l'environnement hydrique (Dolejska *et al.*, 2009; Moura *et al.*, 2007).

La figure 16 représente les résultats des DD-tests de la souche *E.coli* 51 et de son transconjugant. Ces images illustrent le transfert des gènes de résistance codant pour une BLSE par conjugaison mais aussi éventuellement d'une céphalosporinase plasmidique.



DD- test de la souche E51



DD-test du transconjugant
de la souche E51

Figure N°16: Images des DD- tests de la souche E51 et de son transconjugant

V. Détermination des CMI

V.1. Détermination des CMI des souches donatrices

Les résultats de l'évaluation de la résistance aux antibiotiques par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) sur milieu solide des souches donatrices sont donnés dans le tableau N°XVIII.

Tableau XXI : concentrations minimales inhibitrices des antibiotiques testés sur les souches donatrices

Souche	CAZ	CTX	FEP	FOX	GN	CIP
<i>E. coli 2</i>	32	256	32	256	16	8
<i>E. coli 6</i>	8	128	<32	64	32	4
<i>E. coli 9</i>	32	<32	<64	64	8	8
<i>E. coli 12</i>	16	128	32	8	8	4
<i>E. coli 17</i>	128	256	16	128	4	64
<i>E. coli 19</i>	32	256	32	8	8	32
<i>E. coli 25</i>	16	256	32	8	16	32
<i>E. coli 26</i>	32	32	32	64	16	8
<i>E. coli 34</i>	16	64	32	8	8	8
<i>E. coli 36</i>	32	16	4	4	4	16
<i>E. coli 43</i>	16	256	16	8	4	8
<i>E. coli 45</i>	16	128	32	64	16	16
<i>E. coli 46</i>	32	128	16	16	8	64
<i>E. coli 51</i>	32	32	16	8	4	16
<i>E. coli 52</i>	64	32	16	8	4	4
<i>E. coli 57</i>	64	128	4	4	4	32

Les résultats des CMI montrent une variabilité entre les souches et leurs réponses aux différents antibiotiques testés. Les valeurs des CMI varient de 4 µg/ml à 256 µg/ml pour tous les antibiotiques confondus.

Les CMI de nos souches d'*E.coli* sont toutes $>32\mu\text{g/ml}$ pour le CTX, les souches *E.coli* 6, 12, 45, 46 et 57 présentent des CMI de $128\mu\text{g/ml}$, tandis que les souches *E.coli* 2, 17, 19, 25, et 43 présentent des CMI de $256\mu\text{g/ml}$ pour ce même antibiotique (figure 17).

Les CMI de la cétazidime (CAZ) s'étalent de 4 à $>128\mu\text{g/ml}$ et celles du céfépime vont de 4 à $64\mu\text{g/ml}$ pour toutes les souches testées. Les CMI du céfotaxime sont largement supérieures à celles de la céftazidime et celles du céfépime chez toutes les souches, ce constat est une caractéristique des souches productrices de BLSE de type CTX-M (Palucha *et al.*, 1999).

Les CMI de la céfoxitine ne sont pas très élevées, elles varient entre de 4 à $64\mu\text{g/ml}$. *E.coli* 6, 9, 26, 45 présentent les CMI les plus élevées ($64\mu\text{g/ml}$). Ces résultats confortent ceux obtenus lors des tests de résistance par la méthode des antibiogrammes standards. Effectivement, ces souches sont soit résistantes ou bien intermédiaires avec des diamètres de 12, 15, 18.5 et 16 mm respectivement à cet antibiotique. *E.coli* 2 présente la CMI la plus élevée ($256\mu\text{g/ml}$).

Les CMI de la gentamicine ne sont pas très élevées, elles varient de 4 à $32\mu\text{g/ml}$. On constate qu'*E.coli* 6 présente la CMI la plus élevée ($32\mu\text{g/ml}$).

Différentes CMI de la ciprofloxacine sont obtenues, elles s'étalent de 4 à $64\mu\text{g/ml}$ pour toutes les souches testées. Ces CMI ne sont pas très élevées, alors que la plus part des souches testées ont une résistance contact vis-à-vis de l'acide nalidixique. Le mécanisme de résistance aux quinolones transmis par le gène *qnr* est généralement faible (CMI de la ciprofloxacine : $0.09\mu\text{g/ml}$) (Honoré *et al.*, 2006).

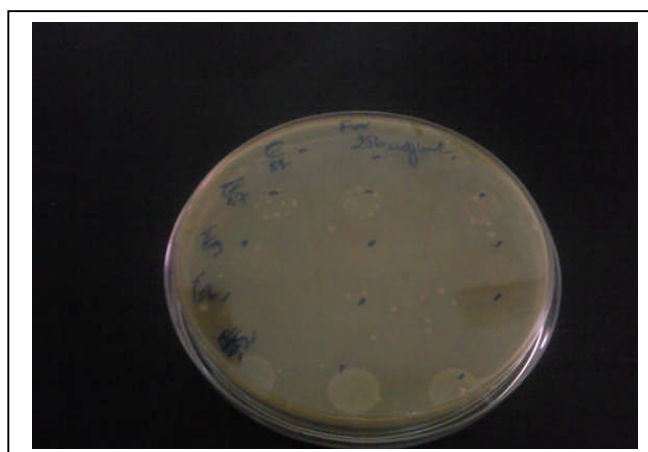


Figure N°17: Résultats des CMI à la céfoxitine de quelques souches donatrices.

V.2. Détermination des CMI des transconjugants.

Les CMI des transconjugants obtenus ont été déterminées, par rapport au CTX, CAZ, CIP et la gentamicine, par la même méthode effectuée pour les souches donatrices. Les résultats de l'évaluation de la résistance aux antibiotiques par la détermination de la CMI sur milieu solide des transconjugants sont donnés dans le tableau XIX.

Tableau XXII : Comparaison des CMI des différents antibiotiques testés sur les souches donatrices et leurs transconjugants

Code	CAZ	CTX	FEP	FOX	GN	CIP
E2(1)	>256 / 32	>256/ 256	128/ 32	>256/ 256	64/ 16	16/ 8
E2(2)	<32/ 32	256/ 256	16/ 32	<32/ 256	16/ 16	4/ 8
E36	16/ 32	4/ 16	4/4	16/4	4/4	4/ 16
E45	128/ 16	<32/ 128	>32/ 32	16/ 64	32/ 16	64/ 16
E46	16/ 32	16/ 128	4/ 16	32/ 16	8/8	4/ 64
E51	128/ 32	128/ 32	32/ 16	128/8	64/4	4/ 16
E52	<16/ 64	32/ 32	16/ 16	16/8	4/4	16/4
E57	64/ 64	64/ 128	8/4	64/4	8/4	8/ 32

Les CMI indiquées en gras sont celles des souches donatrices.

Les résultats de la détermination des CMI aux différents antibiotiques testés montrent une variabilité de la résistance entre les transconjugants. En effet, on note des CMI plus élevées du transconjugant E2(1) par rapport à celles du transconjugant E2(2) qui présente des CMI aux différents antibiotiques similaires à celles obtenues pour la souche donatrice E2, alors que le transconjugant E2(1) résiste à des concentrations beaucoup plus élevées qui varient de 16µg/ml à 256 µg/ml. Le transconjugant E51 présente également des résistances plus élevées aux antibiotiques testés comparé à sa souche donatrice.

D'après ces résultats on note qu'il y'a eu non seulement le transfert de BLSE mais aussi le transfert de résistance à la gentamicine et à la ciprofloxacine. La plupart des souches productrices de BLSE de type CTX-M, sont non seulement résistantes à la majorité des β-lactamines mais également à de nombreux antibiotiques des autres familles tels que les fluoroquinolones, les aminosides, le cotrimoxazole, les tétracyclines ou encore le chloramphénicol (Ruppé, 2010).

La figure 18 qui suit présente les transconjugants qui ont poussés sur les boîtes contenant 256µg/ml de céfoxitine et de céfotaxime.

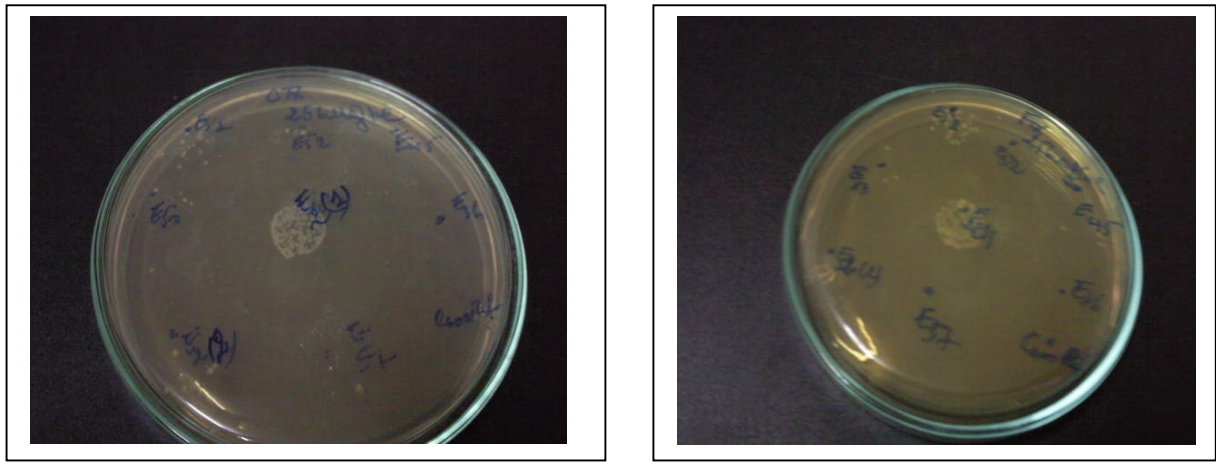


Figure N° 18: Résultats des CMI à la céfoxitine et au céfotaxime des transconjugants.

La résistance aux antibiotiques est une menace majeure de santé publique, et la présence d'organismes résistants dans les eaux de l'environnement est une préoccupation émergente dans le monde. Le potentiel de transfert de cette résistance aux microorganismes autochtones ou à d'autres espèces pathogènes est largement inconnu et justifie une étude plus approfondie.

Les stations d'épuration des eaux usées semblent être une source potentielle d'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques et notamment des *E.coli* dans l'environnement. Toutes les eaux (usées et épurées) et boues analysées dans cette étude, se sont révélées contenir des nombres élevés d'*E.coli* résistants aux antibiotiques.

Cette présente étude, montre que les souches isolées sont résistantes à la majorité des antibiotiques testés (7 des 8 β -lactamines testées sont inactives ou ont une activité réduite sur les 58 souches isolées). Ce constat est inquiétant, sachant que les eaux usées traitées sont rejetées dans les milieux naturels, dans le cas de la STEP d'Aokas, elles sont déversées en mer. Un traitement adéquat des eaux usées rejetées permettant, à la fois, la détérioration chimique des résidus d'antibiotiques actifs et les autres substances pharmacologiques, ainsi que l'élimination du plus grand nombre de bactéries présentes dans ces milieux, pourraient représenter une mesure utile et préventive, non seulement pour contenir les échecs thérapeutiques et les coûts de la santé, mais également pour la préservation de notre environnement.

Plusieurs perspectives peuvent être envisagées pour élargir les balises de cette étude. Par exemple :

- il serait favorable de procéder à la détermination des concentrations d'antibiotiques présents dans les eaux usées.
- Il serait intéressant d'étudier la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds des souches autochtones et des souches pathogènes présentes dans ces eaux (Gram positif et Gram négatif).
- il serait bon d'établir une relation entre la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds dans des environnements hydriques naturels et dans les sols avoisinant les stations d'épuration.

- On peut également envisager l'extension à d'autres antibiotiques de type macrolide. D'autres antibiotiques encore pourraient être testés, par exemple en fonction de leur consommation : la tétracycline qui présente une consommation assez remarquable de part le monde pourrait faire partie des candidats.
- Déterminer les mécanismes biochimiques et génétiques de la résistance aux antibiotiques par des techniques de biologie moléculaire qui confirmeront les phénotypes de résistance probables ; l'identification et la caractérisation de l'environnement et des supports génétiques responsables d'une éventuelle dissémination de la résistance aux antibiotiques des bactéries autochtones et pathogènes présentes dans les eaux usées. Cela nous permettrait de mieux comprendre la logistique du recrutement moléculaire de gènes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries qui est à l'origine de plusieurs maux de la médecine moderne.

Références bibliographiques

A

Ahoyo A. T., Baba-Moussa L., Anaga A.E., Avogbe P., Missihoun T.D., Loko F., Prévost G., Sanni A., Dramane K. (2007). Incidence d'infections liées à *Escherichia coli* producteur de beta-lactamase à spectre élargi au Centre hospitalier départemental du Zou et Collines au Bénin. *Médecine et maladies infectieuses*. **37** : 746-752.

Aibinu, I. E., V. C. Ohaegbulam, E. A. Adenipekun, F. T. Ogunsola, T. O. Odugbemi, and B. J. Mee. (2003). Extended-spectrum beta-lactamase enzymes in clinical isolates of *Enterobacter* species from Lagos, Nigeria. *J Clin Microbiol*. **41**: 2197-2200.

Alighardashi 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)** : 413-426.

Allen H.K., Donato J., Huimi Wang H., Karen A. Cloud-Hansen K.A., Davies J. and Handelsman J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Microbiology*. **8**: 251-259.

Aminov R.I. (2009). The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental Microbiology*. **11** : 2970–2988

Andremont A. (2000). Impact des antibiotiques sur l'écologie de la résistance bactérienne: rôle du tube digestif. *Méd Mal Infect*. **30**: 178-184

B

Börjesson S, Melin S, Matussek A. and Lindgren P.-E. (2009). A seasonal study of the *mecA* gene and *Staphylococcus aureus* including methicillin-resistant *S. aureus* in a municipal wastewater treatment plant. *Water research*. **43**: 925 – 932.

Bradford P.A. (2001). Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*. **14** : 933-951.

Brigante G., Luzzaro F., Perilli M., Lombardi G., Coli A., Rossolini G., Amicosante G., and Toniolo A. (2005). Evolution of CTX-M beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **25**: 157- 162.

Buch K. and Jakoby G.A. (2010). Updated functional classification β -lactamases. *Antimicrob agents chemother*, Rev. **54**: 969-976.

Bush k. (1999). Beta-lactamase of increasing clinical importance. *Curr Pharm Des.* **5**:839-845.

Bush K., Jacoby G.A. and Medeiros A.A. (1995). A functional classification scheme for β -lactamases and it's correlation with molecular structure. *Antimicrob agents chemother*, **39**: 1211-1233.

C

Cantón R., Novais A., Valverde A., Machado E., Peixe L., Baquero F., Coque T.M. (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect.***14**:144-153

Caroff, N., E. Espaze, D. Gautreau, H. Richet, and A. Reynaud. (2000). Analysis of the effects of -42 and -32 ampC promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing ampC. *J Antimicrob Chemother* **45**:783-8.

Caspi, R., M. Pacek, G. Consiglieri, D. Helinski, A. Toukdarian, and I. Konieczny. (2001). A broad host range replicon with different requirements for replication initiation in three bacterial species. *The EMBO Journal* **20**:3262-3271

Castiglioni S., Pomati F., Miller K., Burns B., Zuccato E., Calamari D and Neilan B.A. (2008). Novel homologs of the multiple resistance regulator mar A in antibiotic contaminated environments. *Water research.* **42**: 4271-4280.

Cattoir V. (2004). Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathol Biol*, **52**: 607-616.

Cattoir V.(2008). Les nouvelles bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE). *MAPAR* : 204-209.

Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Communiqué 2010.

Courvalin P., Leqclercq R. et Bingen E. (2006). In: Antibiogramme, 2ème ed. ESKA. Paris. P: 21-31, 227-244, 263-277.

D

Delcour A .H. (2009). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*,**1794** : 808–816.

Denton. M. (2007). Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents.* **29** (3):S9-S22.

Deschamps C., Clermont O., Hipeaux M.C., Arlet G., Denamur E. and Branger C. (2009). Multiple acquisition of CTX-M plasmids in the rate D2 genotype of *Escherichia coli* provide evidence for convergent evolution. *Microbiology*. **155**: 1-8.

Deshpande P., Rodrigues C., Shetty A., Kapadia F., Hedge A. and Soman R. (2010). New Delhi Metallo- β lactamase (NDM-1) in Enterobacteriaceae: Treatment options with Carbapenems Compromised. *JAPI* . **58**

Dolejska M., Bierosova B., Kohoutova L., Literak I., and Cizek A. (2009). Antibiotic-resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended-spectrum betalactamases in surface water and sympatric black-headed gulls. *J Appl Microbiol*. **106**(6): 1941-1950.

E

Essack S.Y. (2001). The development of β -lactam antibiotic in response to the evolution of β -lactamase. *Pharm. Res.***18**:1391-1399.

Expressing an SHV -type extended β -lactamase (ESBL) during a hospital outbreak: Emergence of an ESBL- hyperproducing strain resistant to extended spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. **43**(2): 393-396.

F

Falagas M.E., Karageorgopoulos D.E. (2009). Extend-spectrum β -lactamase producing organisms. *J. Hosp. Infect.* 1-10.

Fernandez-Astorga A., Muela A., Cisterna R., Iriberry J., Barcina I. (1992). Biotic and abiotic factors affecting plasmid transfer in *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol*. **58**:392–398.

Feuerpfeil I., Lopez-Pila J., Schmidt R., Schneider E., Szewzyk R. (1999). Antibiotic resistant bacteria and antibiotics in the environment (Antibiotika resistente Bakterien und Antibiotika in der Umwelt). *Bundesgesundheitsbl.***42**:37–50.

Figueira V., Serra E., Manaia C.M. (2011). Differential patterns of antimicrobial resistance in population subsets of *Escherichia coli* isolated from waste- and surface waters. *Science of the Total Environment* .**409**: 1017–1023.

G

Galimand M., Sabtcheva S., Courvalin P., Lambert T. (2005). Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **49**:2949-2953.

Garcia-Armisen T. et Servais P. (2007). Respective contributions of point and non-point sources of *E. coli* and enterococci in a large urbanized watershed (the Seine River, France). *J. Environ. Manage.***82**: 512–518

Geisenberger O., Ammendola A., Christensen B.B., Molin S., Schleifer K.H., Eberl L. (1999). Monitoring the conjugal transfer of plasmid RP4 in activated sludge and *in situ* identification of the transconjugants, *FEMS Microbiology Letter.* **174**: 9-17.

Georgopapadakou N.H. (2008). Antibiotic Resistance in Enterobacteria. *In* : Bacterial resistance to antimicrobials. *Ed.* Taylor and Francis Group. New York. 343-362.

Grabow W.O.K and Prozesky O.W. (1973). Drug resistance of coliform bacteria in hospital and city sewage. *Antimicrobial Agents and Chemotherapie.***3**:175–80.

Guillemot D. et Leclercq R. (2005). Impact de l'exposition des populations sur le risque de résistance bactérienne. *Médecine et maladies infectieuses*, **35**: 212-222

H

Honoré, S., C. Lascols, D. Malin R. Targaouchi, V. Cattoir, P. Legrand, C.-J. Soussy and E. Cambau. (2006). Emergence et diffusion chez les entérobactéries du nouveau mécanisme de résistance plasmidique aux quinolones Qnr (hospital Henri_Mondor 2002-205). *Pathol Biol.* **54**: 270-279.

J

Jacoby, G., and Bush K. (2005). β -Lactam Resistance in the 21st Century. *Frontiers in antimicrobial resistance: a tribute to Stuart B. Levy.* ASM Press, Washington, DC:53–65

Janvier F., Mérens A., Delaune D., Soler C., Cavallo J.-D. (2011). Portage digestif d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération dans une population d'adultes jeunes asymptomatiques : évolution entre 1999 et 2009. *Pathologie Biologie* ; **59**: 97-101.

Jarlier, V., M. H. Nicolas, G. Fournier, and A. Philippon. (1988). Extended-broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis.* **10**:867-878.

K

Kelly B.G., Vespermann A., Bolton D.J. (2009). Gene transfer events and their occurrence in selected environments, *Food and Chemical Toxicology*, **47**:978-983.

Kim S. and Aga D.S. (2007). Potential ecological and human health impacts of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria from wastewater treatment plants. *J. of Tox. and Environ. Health.* **10**:559-573.

Kong K.-F., Schneper L., and Mathee K. (2010). Beta-lactam antibiotics : from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS*, **118 (1)**: 1-36.

Kümmerer K. (2004). Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* **54**: 311–320.

Kümmerer K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II. *Chemosphere.* **75** : 435–441.

L

Lambert T. (2006). Aminosides et bactéries à Gram négatif. *In.* Antibiogramme. Ed. ESKA, Paris. pp: 227-24

Larabi K., Masmoudi A., Fendri C. (2003). Etude bactériologique et phénotypique de résistance des germes responsables d'infections urinaires dans un CHU de Tunis : à propos de 1930 cas. *Méd Mal Infect.* **33** : 348-52.

Lartigue M.F., Poirel L., Poyart C., Réglie-Poupet H. and Nordmann P. (2007). Ertapenem resistance of *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* **13**: 315-317.

Lavigne J-P., Sotto A., Merle C., Jourdan J., Soussy C.-J., Sirot D. (2002). Résistance enzymatique d'*Escherichia coli* aux bêtalactamines et prévalence en Clinique. *Pathol Biol.* **50**: 388-393.

Le Minor, C., and C. Richard. (1993). Méthode de laboratoire pour l'identification des entérobactéries. Institut Pasteur, France.

M

Mach P. A., and Grimes D. J. (1982). R-plasmid transfer in a wastewater treatment plant. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**:1395–1403.

Marcinek H., Wirth R., Muscholl-Silberhorn A., Gauer M. (1998). *Enterococcus faecalis* gene transfer under natural conditions in municipal sewage water treatment plants, *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 626-632.

Martinez J.L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*. **157**: 2893–2902

Matagne, A., Lamotte-Brasseur, J., and Freare, J. M. (1998). Catalytic properties of class A β -lactamases : efficiency and diversity. *Biochem.J* .**330**: 581-598.

Maurin M., Musso D., Charrel R., Perez R., N’Guyen A., Dumon H., et De Micco P. (1995). Résistance aux antibiotiques des bactéries hospitalières (bacilles à Gram négatif aérobies). *Médecine et Maladies Infectieuses*. **41** : 1738- 1739.

Michel-Briand Y. (2009). Une Histoire de la Résistance aux Antibiotiques.Ed. *L’Harmattan*. 360 p.

Mindlin S. Z., Petrova M. A., Bass I. A., and Gorlenko Zh. M.(2006). Origin, Evolution, and Migration of Drug Resistance Genes. *Russian Journal of Genetics*. **42** : 1495–1511.

Mkaouar D., Mahjoubi F., Mezghani S., Znazen A., Ktari S., Hammami A. (2008). Etude de la résistance des entérobactéries aux céphalosporines de troisième génération dans les hôpitaux de Sfax, Tunisie (1999-2005). *Médecine et maladies infectieuses*. **38**: 293-298.

Moura A, Henriques I, Ribeiro R and Correia A. (2007). Prevalence and characterization of integrons from bacteria isolated from a slaughterhouse wastewater treatment plant. *J Antimicrob Chemother* 60: 1243-50.

N

Naas T., Poirel L. and Nordmann P.(2008). Minor extended-spectrum- β -lactamases. *Clinical Microbiology and infection*. **14** (1):42-52.

Nishino K., Nikaido E . and Yamaguchi A. (2009). Regulation and physiological function of multidrug efflux pumps in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Elsevier*, **1794** :834–843.

Njissen S., Florijn A., Bonten M.J., Schmitz F.J., Verhoef J., Fluit A.C. (2004). β -lactam susceptibilities and prevalence of ESBL producing isolates among than 5000 European *Enterobacteriaceae* isolates. *Int.J. Antimicrob. Agents*. **25**: 585-591.

Nordmann, P. (1998). Trends in β -Lactam Resistance Among *Enterobacteriaceae*. *Clin Infect Dis* **27**:100-106.

P

Pagès J. M. (2004). Porine bactérienne de sensibilité aux antibiotiques. *Médecine science*. **20**:346-350.

Palucha A., Mikiewicz B. and Gniadkowski M. (1999). Diversification of *Escherichia coli*

Passerat J., Tamtam F., Le Bot B., Eurin J., Chevreuil M et Servais P. (2010). Rejets hospitaliers d'antibiotiques et de bactéries fécales antibiorésistantes dans les rivières du bassin de la Seine. *Eur. j. water qual.* **41:** 1-13.

Pei R., Kim S., Carlson K.H., Pruden A. (2006). Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). *Water Res.***40:**2427–35.

Philippon A., Arlet G., and Jacoby G.-A. (2002). Plasmid-Determined AmpC β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **46** (1): 1-11.

Pitout, J. D., and K. B. Laupland. (2008). Extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* .**8:**159-66.

Ploy M.C., Gassama A., Chainier D. et Denis F. (2005). Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques. Ed. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée.* **20:** 343–352.

Pontes D.S., Pinheiro F.A., Lima-Bittencourt C.I., Guedes R., Cursino L., Barbosa F., Santos R., Chartone-Souza E and Nascimento A.M.A. (2009). Multiple antimicrobial resistance of Gram negative bacteria from natural oligotrophic lakes under distinct Anthropogenic influence in a Tropical region. *Microb Ecol.* **58:** 762- 772.

Pourriat J.L., Martin C. (2005). Principes de réanimation chirurgicale. *Arnette.* 1430p.

Q

Quczkiewicz A., Jankowska K., Fudala-Ksiażek S. and Olanczuk-Neyman K. (2010). Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant. *water research.* **44:** 5089-5097.

R

Radstrom, P., and G. Swedberg. (1988). RSF1010 and a conjugative plasmid contain *szrIII*, one of two known genes for plasmid-borne sulfonamide resistance dihydropteroate synthase. *Antimicrob Agents Chemother.* **32(11):** 1684-1692.

Rahube T. O. and Yost C. K. (2010). Antibiotic resistance plasmids in wastewater treatment plants and their possible dissemination into the environment. *African Journal of Biotechnology.* **9 (54) :** 9183-9190.

Reinthaler F.F., Feierl G., Galler H., Haas D., Leitner E., Mascher F., Melkes A., Posch J., Winter I., Yarfel G. and Marth E. (2010). ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge. *Water Res.* **44 :** 1981-1985.

Reinthal F.F., Posch J., Feierl G., Wust G., Haas D., Ruckebauer G. (2003). Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Res.***37**:1685–90.

Roberts, A. P., M. Chandler, P. Courvalin, G. Guedon, P. Mullany, T. Pembroke, J. I. Rood, C. Jeffery Smith, A. O. Summers, M. Tsuda, and D. E. Berg. (2008). Revised nomenclature for transposable genetic elements. *Plasmid*. **14**: 80-83.

Rodriguez-Villalobos H., Struelens M.-J. (2006). Résistance bactérienne par β -lactamases à spectre étendu : implication pour le réanimateur. *Réanimation*.**15** : 205-213.

Ruppé E. (2010). Epidémiologie des bêta-lactamases à spectre élargi : l'avènement des CTX-M. *Antibiotique*. **12** : 3-16.

S

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

Schlüter A., Szczepanowski R., Pühler A. and Top E.M. (2007). Genomics of IncP I antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool. *FEMS Microbiol Rev*. **31**: 449–477.

Schwartz T., Kohlen T., Jansen B. (2003). Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*. **43** : 325–335.

Skurnik D. (2009). Les intégrons : structure et épidémiologie. *Antibiotiques* . **11**: 116—129.

Sota M., Top E.M. (2008). Horizontal gene transfer mediated by plasmids. *In: Plasmids: Current Research and Future Trends*, Lipps G. (ed), Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 111-181.

Stelzer W. and Ziegert E. (1988). Occurrence of antibiotic-resistant coliforms in waste water of a sewage treatment plant. (Das Vorkommen von antibiotikaresistenten Koliformen im Abwasser einer Kl. anlage). *Zentralbl Mikrobiol.***143**:415–423.

Strauch D. (1998). Pathogenic microorganisms in sludge. Anaerobic digestion and disinfection methods to make sludge usable as fertiliser. *Eur Water Manage.***1**:12–26.

Sundstrom L., Swedberg G., and Skold O. (1993). Characterization of transposon Tn5086, carrying the site-specifically inserted gene *dhfrVII* mediating trimethoprim resistance. *J. Bacteriol.* **175**(6): 1796-1805.

T

Tamtam F., Mercier F., Le Bot B., Eurin J., Tuc Dinh Q., Clément M., Chevreuil 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., Ying G.G., Su H.C., Zhou H.W., Sidh 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

Tennstedt T., Szczepanowski R., Braun S., Puhler A. and Schluter A.(2003). Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology*. **45**: 239-252.

V

Vanneste J.L., Cornish D.A., Yu J., Boyd R.J. and Morris C.E. (2008). Isolation of copper and streptomycin resistant phytopathogenic *Pseudomonas Syringae* from lakes and rivers in the central north island of New Zealand. *NZ Plant Prot.* **61** : 80–85.

W

Watkinson AJ, Micalizzi GR, Bates JR, Costanzo SD. (2007). Novel method for rapid assessment of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates from environmental waters by use of a modified chromogenic agar. *Appl Environ Microbiol.* **73**:2224–2229.

Wise R. (2002). Antimicrobial resistance : priorities for action. *J. Antimicrob. Chemoth.***49** : 585-586.

Wright G.D. (2003). Mechanisms of resistance to antibiotics. *Current Opinion in Chemical Biology.* **7**:563–569.

Wright G.D. (2008). Mechanisms of Aminoglycosides antibiotic *In: Bacterial resistance to antimicrobials. Ed. Taylor and Francis Group. New York.* 71-101.

Site

- <http://www.lahey.org/studies/>

Annexe I

Composition des milieux de culture (en g/l d'eau distillée) (Guiraud, 2003).

Gélose à l'éosine et au bleu de méthylène (EMB)

Peptone de viande ou de gélatine	10	
Lactose	10	
Phosphate diploblastique.....	02	pH : 6,8 - 7
Eosine jaunâtre	0,4	
Bleu de méthylène.....	0,067	
Agar-agar.....	13,5	

Gélose TSI

Extrait de viande de bœuf.....	03	
Extrait de levure	03	
Peptone trypsine	20	
Chlorure de sodium	05	
Citrate ferrique	0,3	
Thiosulfate de sodium	0,3	
Lactose	10	pH : 7,4
Glucose.....	01	
Saccharose.....	10	
Rouge de phénol.....	0,05	
Agar.....	12	

Milieu Urée-Indole

L-tryptophane	03	
Phosphate monopotassique	01	
Phosphate bipotassique	01	
Chlorure de sodium	05	pH : 7
Urée	20	
Alcool à 90°	10 ml	
Rouge de phénol en solution à 1%	2,5ml	

Bouillon nitraté

Infusion cerveau-cœur	25	pH : 7
Nitrate de potassium	10	

Milieu Clark-Lubs

Peptone tryptique de viande	05	pH : 7
Phosphate biphosphorique	05	
Glucose	06	

Mannitol mobilité

Peptone tryptique de viande	20	pH: 7,6-7,8
Agar	04	
Mannitol	02	
KNO ₃	01	
Rouge de phénol à 1%	04ml	

Milieu de Citrate de Simmons

Citrate de sodium	02	pH : 7 - 7,2
Chlorure de sodium	05	
Sulfate de magnésium	0,2	
Phosphate monoammoniacal	01	
Phosphate biphosphorique	01	
Bleu de bromothymol	0,08	
Agar	15	

Milieu Moeller

Peptone pepsique de viande	5	pH : 6
Extrait de viande	5	
Pourpre de bromocrésol	0,01	
Rouge de crésol	0,005	
Glucose	0,5	
Pyridoxal	0,005	

Gélose Mueller Hinton (g/l d'eau distillée)

Infusion de viande de bœuf	300
Hydrolysat de caséine.....	17,5
Amidon.....	1,5
Agar.....	17

pH : 7,4

Bouillon Trypticase soja (g/l d'eau distillée)

Peptone trypsique de caséine.....	17
Peptone papainique de soja.....	3
Chlorure de Sodium.....	5
Phosphate bipotassique.....	2
Glucose.....	2

pH : 7,3

Annexe II

Réactifs utilisés

Réactif de Kovacs

Alcool amylique ou isoamylique.....150ml

P.diméthylaminobenzaldehyde10ml

Acide chlorhydrique concentré50ml

Réactif de TDA

Soluté de perchlorure de fer $FeCl_3$ 10ml

Eau distillée20ml

Rouge de méthyle

Rouge de méthyle.....0,5g

Alcool éthylique à 60%100ml

Réactif de Voges-Proskauer (VPI)

α Naphтол6g

Alcool éthylique à 90°100ml

Réactif de Voges-Proskauer (VPII)

NaOH 4N

Réactif de Griess I (NRI)

Acide parasulfanilique.....8g

Acide acétique 5N1L

Réactif de Griess II (NRII)

α -naphtylamine6g

Acide acétique 5N1L

Annexe III

Tableau I : Diamètres (mm) des zones édités par le CA-SFM, 2010

Antibiotiques	Abréviation	S	R
Céfazoline	CZ	≥ 18	< 12
Céfotaxime	CTX	≥ 21	< 15
Ceftazidime	CAZ	≥ 21	< 15
Céfépime	FEP	≥ 21	< 15
Céfoxitine	FOX	≥ 22	< 15
Aztréonam	ATM	≥ 23	< 21
Imipénème	IMP	≥ 22	< 17
Amoxicilline-clavulanate	AMC	≥ 21	< 14
Colistine	CT	≥ 15	< 15
Acide nalidixique	NA	≥ 20	< 15
Triméthoprim-sulfaméthoxazole	SXT	≥ 16	< 10
Rifampicine	RA	≥ 19	< 14
Amikacine	AK	≥ 17	< 15
Gentamicine	GN	≥ 18	< 16
Kanamycine	K	≥ 17	< 15
Tobramycine	TM	≥ 18	< 16
Fosfomycine	FS	≥ 14	< 14

Annexe IV

Tableau II : Résultat de l'identification par la galerie biochimique

Caractère Souche	Cat	Urée	Ind	TDA	Ind	VP	RM	Nit	Glu	Lac	Gaz	H ₂ S	Man	Mob	Cit	ADH	LDC	ODC
E.coli	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+

Légende : **Cat :** catalase, **Oxy :** Oxydase, **Ind :** Indole, **TDA:** Tryptophane désaminase, **VP:** Voges Proskauer **RM:** Rouge de méthyle, **Nit:** Nitrate réductase, **Glu:** Glucose, **Lac:** Lactose, **H₂S:** Sulfure d'hydrogène, **Man:** Mannitol, **Mob:** Mobilité, **Cit:** Citrate, **ADH:** Arginine déshydrogénase, **LDC:** Lysine décarboxylase, **ODC:** Ornithine décarboxylase.

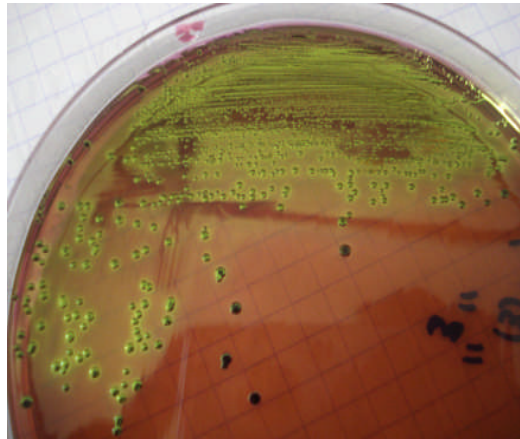


Figure 1: Aspect des colonies d'*E.coli* sur milieu EMB (Eosine-bleu de méthylène)

Annexe V

Tableau III : Résultats de la Sensibilité des souches d'*E.coli* aux β -lactamines

CODE	Antibiotiques							
	CAZ	CTX	FEP	ATM	FOX	CZ	IMP	AMC
<i>E. coli</i> 1	S	R	S	R	S	R	S	R
<i>E. coli</i> 2	R	R	R	R	I	R	S	R
<i>E. coli</i> 3	R	R	R	R	S	R	S	R
<i>E. coli</i> 4	I	R	S	R	S	R	S	R
<i>E. coli</i> 5	S	R	S	R	S	R	S	R
<i>E. coli</i> 6	R	R	I	R	R	R	S	R
<i>E. coli</i> 7	R	R	I	R	S	R	S	R
<i>E. coli</i> 8	I	R	S	R	S	R	S	R
<i>E. coli</i> 9	R	R	R	R	I	R	S	R
<i>E. coli</i> 10	R	R	S	R	S	R	S	R
<i>E. coli</i> 11	R	R	R	R	S	R	S	R
<i>E. coli</i> 12	R	R	I	R	R	R	S	R
<i>E. coli</i> 13	R	R	S	R	S	R	S	R
<i>E. coli</i> 14	R	R	S	R	S	R	S	R
<i>E. coli</i> 15	R	R	S	R	S	R	S	R
<i>E. coli</i> 16	R	R	S	R	S	R	S	I
<i>E. coli</i> 17	R	R	S	R	R	R	S	R
<i>E. coli</i> 18	R	R	S	R	S	R	S	R
<i>E. coli</i> 19	R	R	S	R	I	R	S	R
<i>E. coli</i> 20	R	R	S	S	S	R	S	R
<i>E. coli</i> 21	R	R	I	R	S	R	S	R
<i>E. coli</i> 22	R	R	S	R	S	R	S	R
<i>E. coli</i> 23	R	R	S	R	S	R	S	R
<i>E. coli</i> 24	R	R	S	R	S	R	S	R
<i>E. coli</i> 25	R	R	S	R	I	R	S	R
<i>E. coli</i> 26	R	R	S	R	I	R	S	R
<i>E. coli</i> 27	R	R	I	R	I	R	S	R
<i>E. coli</i> 28	R	R	S	R	S	R	S	R
<i>E. coli</i> 29	R	R	S	R	S	R	S	R
<i>E. coli</i> 30	R	R	S	R	S	R	S	R
<i>E. coli</i> 31	R	R	S	R	I	R	S	R
<i>E. coli</i> 32	R	R	S	R	S	R	S	R
<i>E. coli</i> 33	R	R	S	R	S	R	S	R
<i>E. coli</i> 34	R	R	S	R	I	R	S	R
<i>E. coli</i> 35	R	R	R	R	S	R	S	R
<i>E. coli</i> 36	R	R	S	R	R	R	S	R
<i>E. coli</i> 37	R	R	S	R	S	R	S	R
<i>E. coli</i> 38	R	R	S	R	S	R	S	R
<i>E. coli</i> 39	I	R	S	R	S	R	S	R
<i>E. coli</i> 40	R	R	R	R	S	R	S	R
<i>E. coli</i> 41	R	R	R	R	I	R	S	R
<i>E. coli</i> 42	R	R	R	R	S	R	S	R
<i>E. coli</i> 43	R	R	R	R	I	R	S	R
<i>E. coli</i> 44	R	R	R	R	S	R	S	ND
<i>E. coli</i> 45	R	R	R	R	I	R	S	R

<i>E. coli 46</i>	R	R	R	R	I	R	S	R
<i>E. coli 47</i>	R	R	I	R	S	R	S	R
<i>E. coli 48</i>	R	R	R	R	S	R	S	R
<i>E. coli 49</i>	R	R	R	R	S	R	S	R
<i>E. coli 50</i>	R	R	S	R	S	R	S	R
<i>E. coli 51</i>	R	R	S	R	R	R	S	R
<i>E. coli 52</i>	R	R	R	R	S	R	S	R
<i>E. coli 53</i>	R	R	R	R	S	R	S	ND
<i>E. coli 54</i>	R	R	S	R	S	R	S	ND
<i>E. coli 55</i>	R	R	R	R	S	R	S	ND
<i>E. coli 56</i>	R	R	R	R	S	R	S	ND
<i>E. coli 57</i>	R	R	S	R	R	R	S	R
<i>E. coli 58</i>	R	R	R	R	S	R	S	ND

R : Résistantes

S : Sensibles

I : intermédiaire

Tableau IV: Diamètres (mm) des zones d'inhibition du DD-test

CODE	CAZ	CTX	FEP	Synergie
<i>E. coli</i> 1	21	10.5	24	+
<i>E. coli</i> 2	12	6	14.5	+
<i>E. coli</i> 3	13	6	16.7	+
<i>E. coli</i> 4	20	13	22	+
<i>E. coli</i> 5	22	10	22	+
<i>E. coli</i> 6	15	6	20	+
<i>E. coli</i> 7	12	6	20	+
<i>E. coli</i> 8	20	12	24	+
<i>E. coli</i> 9	6	6	16	+
<i>E. coli</i> 10	13	13	24.6	+
<i>E. coli</i> 11	13.6	11	25.6	+
<i>E. coli</i> 12	11.6	8	20	+
<i>E. coli</i> 13	13.6	11	25	+
<i>E. coli</i> 14	9	9	24	+
<i>E. coli</i> 15	10.6	11.5	24	+
<i>E. coli</i> 16	13	11	31	+
<i>E. coli</i> 17	6	6	18.5	-
<i>E. coli</i> 18	14.8	11.7	26.4	+
<i>E. coli</i> 19	10.7	8	21.5	+
<i>E. coli</i> 20	10.8	11.3	22.7	+
<i>E. coli</i> 21	6	9	20.5	+
<i>E. coli</i> 22	10	11	24	+
<i>E. coli</i> 23	12	13.7	26	+
<i>E. coli</i> 24	11	13	25	+
<i>E. coli</i> 25	13.2	11	22	+
<i>E. coli</i> 26	14	9	22.3	+
<i>E. coli</i> 27	9	8	20	+
<i>E. coli</i> 28	15	9.7	27	+
<i>E. coli</i> 29	13.2	14	26.5	+
<i>E. coli</i> 30	13	12	25	+
<i>E. coli</i> 31	10	12	21.6	+
<i>E. coli</i> 32	12.2	13	23	+
<i>E. coli</i> 33	12.7	12.5	21	+
<i>E. coli</i> 34	11	10	21	+
<i>E. coli</i> 35	7.8	10.8	18	+
<i>E. coli</i> 36	10.2	22.7	35	-
<i>E. coli</i> 37	14.5	13	23	+
<i>E. coli</i> 38	17	14	21	+
<i>E. coli</i> 39	19	17	21.1	+
<i>E. coli</i> 40	14.4	8	11	+
<i>E. coli</i> 41	8.2	8.6	15	+
<i>E. coli</i> 42	14	14	16.5	+
<i>E. coli</i> 43	7.7	11.7	18.3	+
<i>E. coli</i> 44	17	11	17	+
<i>E. coli</i> 45	6	7.5	15	+

<i>E. coli</i> 46	16.6	16	14.2	+
<i>E. coli</i> 47	9.8	15	19.6	+
<i>E. coli</i> 48	8.5	11.6	17	+
<i>E. coli</i> 49	6	11.2	16	+
<i>E. coli</i> 50	6	17.4	26	+
<i>E. coli</i> 51	11	8	25	+
<i>E. coli</i> 52	18.8	14.6	17	+
<i>E. coli</i> 53	16.2	12	18	+
<i>E. coli</i> 54	16	11	25.3	+
<i>E. coli</i> 55	17	12	15	+
<i>E. coli</i> 56	18	13	17.2	+
<i>E. coli</i> 57	10	8.5	25	+
<i>E. coli</i> 58	17	6	15	+

Tableau V : Résultats de la Sensibilité des souches d'*E.coli* aux autres antibiotiques.

CODE	SXT	CS	NA	FOS	RA
<i>E. coli</i> 1	S	R	R	S	S
<i>E. coli</i> 2	R	R	R	S	S
<i>E. coli</i> 3	R	S	R	S	S
<i>E. coli</i> 4	S	R	R	S	S
<i>E. coli</i> 5	R	R	R	S	S
<i>E. coli</i> 6	R	S	R	S	S
<i>E. coli</i> 7	R	R	R	S	S
<i>E. coli</i> 8	R	S	R	S	S
<i>E. coli</i> 9	R	R	R	S	S
<i>E. coli</i> 10	S	S	R	S	S
<i>E. coli</i> 11	R	R	R	S	S
<i>E. coli</i> 12	S	S	R	S	S
<i>E. coli</i> 13	R	R	R	S	S
<i>E. coli</i> 14	R	R	R	S	S
<i>E. coli</i> 15	S	R	R	S	S
<i>E. coli</i> 16	S	S	R	S	I
<i>E. coli</i> 17	R	R	R	S	S
<i>E. coli</i> 18	R	R	R	S	S
<i>E. coli</i> 19	R	S	R	S	I
<i>E. coli</i> 20	S	S	R	S	S
<i>E. coli</i> 21	S	S	R	S	S
<i>E. coli</i> 22	S	R	R	S	S
<i>E. coli</i> 23	S	S	R	S	S
<i>E. coli</i> 24	S	S	R	S	S
<i>E. coli</i> 25	R	R	R	S	S
<i>E. coli</i> 26	R	R	R	S	S
<i>E. coli</i> 27	R	S	R	S	S
<i>E. coli</i> 28	R	R	R	S	S
<i>E. coli</i> 29	S	S	R	S	S
<i>E. coli</i> 30	S	S	R	S	S
<i>E. coli</i> 31	S	S	R	S	S
<i>E. coli</i> 32	S	S	R	S	S
<i>E. coli</i> 33	S	S	R	S	S
<i>E. coli</i> 34	R	R	R	S	S
<i>E. coli</i> 35	S	S	R	S	S
<i>E. coli</i> 36	S	S	R	S	S
<i>E. coli</i> 37	S	R	R	S	S
<i>E. coli</i> 38	S	S	R	S	I
<i>E. coli</i> 39	S	S	R	S	S
<i>E. coli</i> 40	R	R	R	S	S
<i>E. coli</i> 41	I	S	R	S	I
<i>E. coli</i> 42	S	S	R	S	S
<i>E. coli</i> 43	S	S	R	S	I
<i>E. coli</i> 44	S	S	R	S	S
<i>E. coli</i> 45	R	S	R	S	S
<i>E. coli</i> 46	R	R	R	S	I

<i>E. coli</i> 47	S	S	R	S	S
<i>E. coli</i> 48	S	S	R	S	S
<i>E. coli</i> 49	S	S	R	S	S
<i>E. coli</i> 50	R	S	R	S	S
<i>E. coli</i> 51	S	S	S	S	S
<i>E. coli</i> 52	S	S	R	S	S
<i>E. coli</i> 53	S	S	R	S	I
<i>E. coli</i> 54	S	S	R	S	R
<i>E. coli</i> 55	S	S	R	S	S
<i>E. coli</i> 56	S	S	R	S	S
<i>E. coli</i> 57	S	S	S	S	S
<i>E. coli</i> 58	R	R	R	S	I

R : Résistantes
S : Sensibles
I : intermédiaire

Annexe VI

Tableau VI : Significativité par case (Test exact de Fisher) : β -lactamines

	FEP	ATM	FOX	AMC
ENTREE	>	<	>	<
AERATEUR	<	<	>	>
DECANTEUR II	<	<	>	<
STABILISATEUR	>	=	<	>
BOUE	>	>	<	<

Les valeurs affichées en gras sont significatives au seuil $\alpha=0,05$

Tableau VII : Significativité par case (Test exact de Fisher) : Aminosides

	GN	TM	K	AK
ENTREE	<	>	>	<
AERATEUR	>	>	<	<
DECANTEUR II	>	<	<	>
STABILISATEUR	<	<	>	>
BOUE	>	>	<	<

Les valeurs affichées en gras sont significatives au seuil $\alpha=0,05$

Tableau VIII : Significativité par case (Test exact de Fisher) : Autres antibiotiques

	SXT	CS	NA	RA
ENTREE	<	>	>	<
AERATEUR	>	>	<	<
DECANTEUR II	>	>	<	<
STABILISATEUR	>	>	<	<
BOUE	<	<	>	>

Les valeurs affichées en gras sont significatives au seuil $\alpha=0,05$

Introduction

*Partie 1 : Synthèse
bibliographique*

Chapitre I :
Résistance aux
antibiotiques dans
l'environnement

Chapitre II :
Résistance aux
antibiotique

Partie 2

Matériel et Méthodes

Résultats et Discussion

Conclusion

Et

Perspectives

*Références
bibliographiques*

Annexes

تمت دراسة مقاومة عينات *Escherichia coli* المعزولة من محطة معالجة مياه الصرف (STEP) لبلدية اوقاس ببيجاية لمضادات البكتيريا. حيث تم اختبار حساسية العزلات لفعل 17 مضاد حيوي ، بما في ذلك ثمانية β -lactamines، أربعة aminosides و 5 ينتمون إلى عائلات أخرى من المضادات الحيوية. تم الحصول على 58 عزلة التي تتميز بمقاومة عالية لفعل معظم المضادات الحيوية المختبرة، 15.51% (9 / 58) من إجمالي العزلات مقاومة لسبعة من ثمانية مضادات حيوية من عائلة- β lactamines

56 عزلة منتجة للأنزيمات ESBL. ان اختبار المقاومة ل aminosides كان أكثر اعتدالا بمعدل 36.19% ، 25.03% و 7% . للالكاناميسين، جنتاميسين والأميكاسين، على التوالي ، توبراميسين هو المضاد الحيوي الوحيد الذي ينتمي الى هذه العائلة التي فقدت كل نشاط على هذه عزلات .كان معدل مقاومة لحمض الناليديكسيك أكثر ارتفاعا(96.55%) والفوسفوميسين هو الأكثر فعالية بنسبة 100% .تظهر نتائج MIC اختلاف بين ردود فعل العزلات على مختلف المضادات الحيوية التي تم اختبارها .وتراوحت قيم MIC من 4 ميكروغرام /مل إلى 256 ميكروغرام /مل لجميع المضادات الحيوية المختبرة .تم الحصول على نقل المقاومة من قبل الاقتران لسبع عزلات من بين 17 المختبرة.

Résumé

La résistance aux antimicrobiens des isolats d'*Escherichia coli* a été étudiée dans la station d'épuration des eaux usées municipales (STEP) d'Aokas (Béjaia) basée sur le procédé des boues activées. La sensibilité des souches isolées est testée vis-à-vis de 17 antibiotiques, dont 8 β -lactamines, 4 aminosides et 5 appartenant à d'autres familles d'antibiotiques. Les 58 souches isolées présentent des taux de résistances élevés à la majorité des β -lactamines testées, 15.51% du total des souches isolées (9/58) sont résistantes à 7 des 8 antibiotiques appartenant à cette famille. L'imipenème reste la seule molécule à être efficace. 56 souches sont productrices de BLSE. La résistance aux aminosides testés est plus modérée avec des taux de 36.19%, 25.03% et 7% pour la kanamycine, la gentamicine et l'amikacine respectivement, la tobramycine est le seul antibiotique appartenant à cette famille à avoir perdu toute activité sur ces souches. La résistance aux autres antibiotiques est très variable, le taux de résistance à l'acide nalidixique est le plus élevé (96.55%) et la fosfomycine est le plus efficace avec un taux de 100% d'inhibition. Les résultats des CMI montrent une variabilité entre les souches et leurs réponses aux différents antibiotiques testés. Les valeurs des CMI varient de 4 $\mu\text{g/ml}$ à 256 $\mu\text{g/ml}$ pour tous les antibiotiques confondus. Le transfert de résistance par conjugaison n'est obtenu que pour 7 des 17 souches testées.

Mots clés: Antibiotiques; Resistance; *E. coli*; Eaux usées, Stations d'épuration des eaux.

Abstract

Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates was investigated in municipal wastewater treatment plant (WWTP) of Aokas (Bejaia) based on the activated sludge process. The sensitivity of isolates tested against 17 antibiotics, including 8 β -lactams, 4 aminoglycosides and 5 belonging to other families of antibiotics. The 58 isolates have high rates of resistance to most β -lactams tested, 15.51% of total isolates (9 / 58) are resistant to 7 of 8 antibiotics tested. Imipenem is the only molecule to be effective. 56 strains produced ESBLs. Resistance to aminoglycosides tested are more moderate with rate of 36.19%, 25.03% and 7% for kanamycin, gentamicin and amikacin, respectively, tobramycin is the only antibiotic that belongs to this family to have lost all activity on these strains. Resistance to other antibiotics is variable, the rate of resistance to nalidixic acid was highest (96.55%) and fosfomycin is most effective with a rate of 100% inhibition. The MIC results show variability between strains and their responses to different antibiotics tested. MIC values ranged from 4 $\mu\text{g} / \text{ml}$ to 256 $\mu\text{g} / \text{ml}$ for all antibiotics combined. The transfer of resistance by conjugation was obtained for seven of the 17 strains tested.

Keywords: Antibiotics; Resistance; *E. coli*; wastewater, wastewater treatment plant.