



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



Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : Biologie Appliquée.

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master.

Domaine : Science de la nature et de la vie.

Filière: Science biologiques.

Option: Microbiologie appliquée.

Thème:

**Identification des *Enterobacteriaceae* multi-résistantes
isolées des effluents hospitaliers.**

Présenté par:

MESSAI Khaoula

Devant le jury:

FENGHOUR Hind

M.A.A Université de Tébessa

Présidente

BELBEL Zineb

M.C.B Université de Tébessa

Promotrice

SMAALI Saoussen

M.A.A Université de Tébessa

Examinatrice

Date de soutenance : 27 Mai 2018



Déclaration sur l'honneur de non-plagiat
 (À joindre obligatoirement au mémoire, remplie et signée)

Je soussigné(e),
 Nom, Prénom : Messaï Khroula
 Régulièrement inscrit(e) en Master au département : Biologie Appliquée
 N° de carte d'étudiant : 2012/4055583
 Année universitaire : 2017/2018
 Domaine : Science de la nature et de la vie
 Filière : Science biologiques
 Spécialité : Microbiologie Appliquée
 Intitulé du mémoire : Identification des Enterobacteriaceae multi-résistantes isolées des effluents hospitaliers

Atteste que mon mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité. Je certifie également que je n'ai ni recopié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets.

Sanctions en cas de plagiat prouvé :

L'étudiant sera convoqué devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité du plagiat sont :

- L'annulation du mémoire avec possibilité de le refaire sur un sujet différent ;
- L'exclusion d'une année du master ;
- L'exclusion définitive.



2018 جوان 06

عن رئيس المجلس العلمي
 وبشؤون من
 إمامة الشؤون الإدارية والتأديبية

تébessa, le 06/06/2018
 Signature de l'étudiant(e)

[Handwritten signature]

Tébera, 06/06/2018

Rapport du président du jury
après correction du mémoire.

Je viens par la présente vous informer que
l'étudiante Mervai Khaoula master 2, microbiologie
appliquée a effectué les corrections nécessaires de son
mémoire de Master Intitulé: Identification des
Enterobactériacées multi résistantes isolés de effluent
hospitaliers.

M^{me} Fengkhan H.
~~_____~~



Remerciements

*To u t d'abord, nous remercions nos dieux Le tout puissant
qui m'a doté de volonté et de patience pour ce travail.
Je tiens tout d'abord à remercier Mdm BELBEL Zineb pour
avoir accepté de diriger ce travail, pour ses conseils, son aide,
ses suggestions sur la rédaction de ce travail.*

*Je tiens également à remercier Mdm FENGHOUR Hind
pour avoir accepté de présider le jury, Mdm SMAALI
Saoussen pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Un merci tout spécial à mes parents, ma sœur, mes frères ,
mes collègues et amis, et l'inspecteur Ounis abd rahmen, mon
enseignant Saadi Morad , pour leurs aide et leurs
encouragements lors de la préparation de ce mémoire.
Les bons moments que nous avons passés ensemble seront
toujours inoubliables.*

Merci.





Dédicace

J'exprime ma profonde affection :

*À mes parents pour leur soutien constant, leur amour et leurs mots d'encouragement qui m'ont permis de me rendre ici aujourd'hui ;
À ma soeur Aïcha et son mari Salem, et la petite fille de maison Imane, À mes frère Mohamed et Saber.*

*À toute la famille Messaï
À mes amies Saloua, Manel, Chaïma, Amel, Sara, avec lesquelles j'ai partagé de très bons moments.*



Khaoula



Résumé

Les effluents générés par l'activité hospitalière représentent une source potentielle de germes résistants aux antibiotiques particulièrement les entérobactéries et constituent ainsi une réelle menace pour la santé publique. L'objectif de cette étude était d'identifier les entérobactéries multirésistantes isolées des eaux usées hospitalières de l'hôpital Mère et enfants de la ville de Tébessa, d'évaluer leur niveau de résistance aux antibiotiques et le comparer avec celui des souches d'entérobactéries cliniques isolées dans le même hôpital.

D'abord, 10 prélèvements ont été effectués de février à avril 2018 à partir du collecteur final des eaux usées de l'hôpital. Puis, les échantillons ont été filtrés, homogénéisés et dilués en 4 dilutions décimales. Ensuite, l'isolement des souches d'entérobactéries multirésistantes a été réalisé sur des milieux sélectifs de Mac Conkey additionnés de différents antibiotiques en poudre (céfotaxime, ertapénème, imipénème et colistine) selon le profil de résistance recherché (BLSE, carbapénémases et résistance à la colistine). En outre, L'identification des souches a été faite biochimiquement par système miniaturisé API 20E .Enfin, La sensibilité aux antibiotiques a été testée par un antibiogramme comportant 11 antibiotiques selon la méthode de diffusion de disque sur milieu Mueller Hinton.

Au total, 25 souches d'entérobactéries ont été isolées de différents milieux sélectifs. L'identification biochimique a révélé une diversité d'espèces d'entérobactéries qui colonisent les effluents hospitaliers avec prédominance d'*Escherichia coli* (52%). Les souches isolées ont montré une résistance très élevée à tous les bétalactamines notamment au carbapénèmes. La majorité de ces souches ont exprimés une résistance croisée aux aminosides (62%), aux quinolones (68%) et aux sulfamides (92%), avec une résistance alarmante à la colistine (92%). Nous avons donc noté une augmentation significative dans les taux de résistance de nos souches spécifiquement la résistance aux carbapénèmes (80%) et à la colistine qui était nulle chez les souches cliniques isolées au même hôpital en 2017.

Finalement, cette étude montre la présence des entérobactéries multi-résistantes dans les effluents hospitaliers, d'où le risque potentiel de dissémination et du transfert de bactéries pathogènes et ses gènes de résistance à l'environnement. En définitif, l'installation de dispositifs de traitement adéquats et une réglementation stricte régissant leur élimination sont nécessaires.

Mots clé: Effluents hospitaliers, *Enterobacteriaceae*, Multirésistances aux antibiotiques, BLSE Carbapénémases, Colistine.

Abstract

The effluents generated by the hospital activity represent a potential source of antibiotic-resistant germs, especially enterobacteria, and thus constitute a real threat to public health. The objective of this study was to identify multidrug-resistant enterobacteria isolated from hospital wastewater from the Mother and Children Hospital of Tebessa City, to evaluate their level of resistance to antibiotics and to compare it with that of enterobacterial strains isolated clinics in the same hospital.

First, 10 samples were taken from February to April 2018 from the hospital's final wastewater collector. Then, the samples were filtered, homogenized and diluted in 4 decimal dilutions. Then, the isolation of multiresistant enterobacterial strains was carried out on Mac Conkey selective media supplemented with various powdery antibiotics (cefotaxime, ertapenem, imipenem and colistin) according to the desired resistance profile (ESBL, carbapenemases and resistance to colistin). In addition, the identification of the strains was made biochemically by API 20E miniaturized system. Finally, antibiotic sensitivity was tested by an antibiogram comprising 11 antibiotics according to the Mueller Hinton disk diffusion method.

A total of 25 enterobacteria strains were isolated from different selective media. Biochemical identification revealed a diversity of enterobacterial species that colonize hospital effluents with predominance of *Escherichia coli* (52%). Isolated strains showed very high resistance to all betalactamines, especially carbapenems. The majority of these strains have expressed cross-resistance to aminoglycosides (62%), quinolones (68%) and sulfonamides (92%), with alarming resistance to colistin (92%). We therefore noted a significant increase in resistance levels of our strains specifically resistance to carbapenomas (80%) and colistin that was zero in clinical strains isolated at the same hospital in 2017.

Finally, this study shows the presence of multi-resistant enterobacteria in hospital effluents, hence the potential risk of dissemination and transfer of pathogenic bacteria and its resistance genes to the environment. Ultimately, the installation of adequate treatment devices and strict regulations governing their disposal are necessary.

Key words: Hospital effluents, Enterobacteriaceae, Multiresistance to antibiotics, ESBL Carbapenemases, Colistin.

تمثل النفايات السائلة الناتجة عن نشاط المستشفى مصدراً محتملاً للجراثيم المقاومة للمضادات الحيوية ، ولا سيما Enterobacteries ، وبالتالي تشكل تهديداً حقيقياً للصحة العامة. وكان الهدف من هذه الدراسة التعرف على Enterobacteries متعددة المقاومة معزولة من مياه الصرف الصحي لمستشفى الأمومة والأطفال في مدينة تبسة، لتقييم مستوى المقاومة للمضادات الحيوية، ومقارنتها مع سلالات Enterobacteries الاستشفائية معزولة من نفس المستشفى.

أولاً، تم أخذ 10 عينات من فبراير إلى أبريل 2018 من المجمع النهائي لمياه الصرف الصحي في المستشفى. ثم تم ترشيح العينات وتجانسها وتخفيفها في 4 تخفيفات عشرية. ثم تم إجراء عزل سلالات Enterobacteries متعددة المقاومة في وسط انتقائي Macconkey مضاف إليه مسحوق مختلف المضادات الحيوية (السيفوناكسيم، إيراتابينيم، الإيميبينيم وكوليسيتين) اعتماداً على البيانات المقاومة المطلوبة (ESBLs، carbapenemases والمقاومة للكوليسيتين). وبالإضافة إلى ذلك، تم تحديد سلالات كيميائية بواسطة نظام المنمنمة API20 E . أخيراً، تم اختبار الحساسية للمضادات الحيوية عن طريق اختبار 11 قرصاً للمضادات الحيوية بطريقة الانتشار Mueller Hinton .

تم عزل ما مجموعه 25 سلالات Enterobacteries من وسائط انتقائية مختلفة. كشفت الهوية البيوكيميائية عن وجود أنواع من Enterobacteries تستعمر نفايات سائلة بالمستشفى مع هيمنة (*Escherichie coli*) (52%). أظهرت السلالات المعزولة مقاومة عالية جداً لجميع أدوية البيبتاكتامين ، وخاصة الكاربابينيم. وقد أعربت غالبية هذه السلالات عن مقاومة متصالبة للأمينوغليكوزيدات (62%) ، والكينولونات (68%) والسلفوناميدات (92%) ، مع مقاومة مقلقة للكوليسيتين (92%). لاحظنا زيادة كبيرة لدينا في معدلات السلالات المقاومة على وجه الخصوص تلك المقاومة للكاربابينيمات (80%)، وكانت مقاومة الكوليسيتين معدودة في السلالات الاستشفائية المعزولة في نفس المستشفى في عام 2017.

وأخيراً، تبين هذه الدراسة وجود مقاومة متعددة ل Enterobacteries في النفايات السائلة في المستشفيات ، وبالتالي خطر نشر ونقل البكتيريا المسببة للأمراض وجيناتها المقاومة في البيئة محتمل. في نهاية المطاف ، من الضروري تركيب أجهزة معالجة مناسبة ولوائح صارمة للتحكم في التخلص منها.

الكلمات المفتاحية: المخلفات السائلة للمستشفيات ، Enterobacteries ، المضاد الحيوي للمضادات الحيوية ، الكاربابيناماز ، ESBL ، كوليسيتين.

Sommaire

Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1
Partie 1: Revue de la littérature.....	3
Chapitre I: La famille Enterobacteriaceae.....	3
1. Taxonomie des <i>Entérobactéries</i>	3
2. Habitat.....	3
3. Caractères bactériologiques.....	3
3.1 Les caractères morphologiques.....	3
3.2 Les caractères culturels.....	3
3.3 Les caractères biochimiques.....	4
3.4 Les caractères antigéniques.....	6
3.4.1 Antigène ECA.....	6
3.4.2 Antigène O.....	6
3.4.3 Antigène H.....	6
3.4.4 Antigène de surface.....	6
4. Les facteurs de la virulence.....	6
4.1 Ilots de pathogénicité.....	6
4.2 La capsule.....	7
4.3 Le pili.....	7
4.4 Variation antigéniques.....	7
5. Le pouvoir pathogène.....	7
Chapitre II: Les effluents hospitaliers.....	8
1. Généralité.....	8
2. Classification des hôpitaux.....	8
3. Typologie des effluents liquides hospitaliers.....	9
4. Les caractères microbiologiques des effluents hospitaliers.....	10

Sommaire

4.1. Les coliformes fécaux : <i>Escherichia coli</i>	10
4.2. Bactéries <i>coliformes thermotolérantes</i>	10
4.3. Streptocoques fécaux.....	10
4.4. Clostridium sulfito-réductrices.....	11
Chapitre III: La résistance des Enterobacteriaceae aux antibiotiques.....	12
1. Définition.....	12
2. Les types de résistance aux antibiotiques.....	12
2.1.Résistance naturelle (ou intrinsèque).....	12
2.2.Résistance acquise.....	13
3. Mode de transfère des gènes de la résistance aux antibiotiques.....	13
4. Mécanisme de la résistance.....	15
4.1.β. Lactamine.....	17
4.2. Les carbapénèmes.....	17
4.3.Les aminosides.....	18
4.4. Les quinolones.....	19
Partie 2: Matériels et Méthodes.....	20
1. Cadre de l'étude.....	20
2. Matériel.....	20
3. Les échantillons.....	20
3.1. Prélèvement.....	20
3.2. Préparation des échantillons.....	21
4. Isolement des bactéries multirésistantes.....	21
4.1. Préparation du milieu d'isolement.....	22
4.2. Ensemencement.....	23
5. Identification des isolats.....	24
5.1. Coloration de Gram.....	24
5.2. Identification biochimique par API20E.....	24
5.3. Test de sensibilité aux antibiotiques par antibiogramme.....	25
Partie 3 : Résultats.....	28
1. Souche bactérienne.....	28
1.1. Aspect macroscopique des isola.....	28
1.2. Aspect microscopique des isolats.....	30

Sommaire

2. Identification des souches des entérobactéries isolées.....	30
2.1. Isolement et identification des souches multirésistantes.....	33
2.2. Distribution des entérobactéries selon les espèces.....	34
2.3. Biotypage.....	34
2.3.1. Biotypage des souches d' <i>E. coli</i> 1 selon les profils numériques en API 20 E.....	34
2.3.2. Biotypage des souches de <i>Serratia odorifera</i> 1 selon les profils numériques en API20E.....	35
2.3.3. Biotypage des souches de <i>K. pneumoniae spp pneumoniae</i> selon les profils numériques en API20E.....	35
3. Résultats des tests des sensibilités aux antibiotiques des souches d'entérobactéries isolées.....	36
3.1. Sensibilité des entérobactéries isolées aux antibiotiques.....	36
3.2. Sensibilité d' <i>E. coli</i> 1 aux antibiotiques testés.....	38
3.3. Sensibilité de <i>Serratia odorifera</i> 1 aux antibiotiques testés.....	38
3.4. Sensibilité de <i>Klebsiella pneumoniae spp pneumoniae</i> aux antibiotiques testés.....	39
Partie 4: Discussion.....	40
Conclusion.....	44
Perspectives.....	45
Références bibliographique.....	46
Annexe.....	52

Liste des abréviations

% : Pourcent

°C : Le degré Celsius

16 S : Svedberg (vitesse de sédimentation)

30 S : Svedberg (vitesse de sédimentation)

ADH: Arginine Dihydrolase

ADN gyrase : Acide désoxyribonucléique gyrase

ADN: Acide désoxyribonucléique.

AHA: L'american Hospital Association.

AK: Amikacine

AMC:Amoxicilline + acide clavulanique

AML: Amoxicilline

API 20E: Analytical profile index 20E (E= Entérobactéries)

ARN: Acide ribonucléique

ARNm: Acide ribonucléique messenger

ATB: Antibiotique

ATM: Aztréonam

BGN: Bacteries à Gram Négatif.

BGP: Bacteries à Gram Positif.

BLSE: Bêta-Lactamase À Spectre Étendu.

BMR : Bactéries Multirésistantes

C3G: Céphalosporine de troisième génération

CA-SFM : Comité de l'antibiogramme de la société française de

Liste des abréviations

CIP: Ciprofloxacine

CIT: Citrate Utilisation

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

CN : Gentamicine

CT : Colistine

CT: Colistine

CTX : Céfotaxime

CTX:Céfotaxime

CTX-M: Céfotaxime Munich.

ECA: Enterobacterial Common Antigen.

EDPI: Énergie Dépendant Phase I

EDPII: Énergie Dépendant Phase II

EP: Espace Périplasmique

ETP: Ertapénème

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

GEL : Gélatinasse

H₂S: Hydrogen Sulfide

I : Intermédiaire

IMP: Imipénème

IND : Production D'indole

IPM: Imipénème

IPP : Institut Pasteur de Paris

K: antigène capsulaire

KPC : *Klebsiella-pneumoniae-carbapenemase*

Liste des abréviations

LDS : Lysine Décarboxylase

LPS: lipopolysaccharides.

MC: Membrane Cytoplasmique

MDR: Multi Drug Resistance

ME: Membrane Externe Microbiologie

ml : Millilitre

mm : Millimètre

n: nombre

NDM-1: *New Delhi metallo- β -lactamase*

O: Antigène somatique

ODC :Ornithine Décarboxylase

OXA-48: Oxacillinase

PG: Peptidoglycane

PLP: Protéines Liant les Pénicillines

R : Résistance

S : Sensible

SME: *Serratia marcescens enzyme*

SXT: Triméthoprim - sulfaméthoxazole

TDA : Tryptophane Désaminase

URE: Uréase

VIM: Veronaintegron-encoded metallo- β -lactamase

VP: Réaction Voges Proskauer

μ g : Microgramme

Liste des figures

N° de figure	Le titre	N° de page
01	Les échanges génétiques des gènes de résistances aux antibiotiques.	14
02	Schéma d'une BGP (gauche) et BGN (droite) avec les mécanismes d'action des principales familles d'ATB.	15
03	Mécanismes de résistance aux antibiotiques	16
04	Structure chimique de la Carbapénème.	17
05	Structure chimique de la famille des aminosides: la streptomycine.	18
06	Image montre les étapes de filtration du prélèvement et la préparation des dilutions décimales.	21
07	Image montre la préparation du milieu Macconkey sélectif pour l'isolement.	22
08	Image montre l'ensemencement de différentes dilutions de l'échantillon sur milieu Macconkey sélectif	23
09	Image montre l'identification des isolats par le système API 20E.	25
10	Image montre les étapes de l'antibiogramme.	26
11	Image montre les boîtes contient l'antibiotique Imipenème (8 mg/l) après l'ensemencement du prélèvement d'eau usée hospitalier, avec une boîte témoin.	29
12	Aspect macroscopique (réisolement) du la souche <i>Klebsiella pneumoniae spp pneumoniae</i> isolées sur gélose MacConkey additionné Imipeneme (8 mg /l) (Référence de la souche 14).	29
13	Observation microscopique (×100) après coloration de Gram d'une souche isolé	30
14	Image montre le résultat biochimique par Api 20 E de l'espèce <i>E.coli</i> (référence de souche 9).	30
15	Image montre le résultat biochimique par Api 20 E de l'espèce <i>Serratia</i>	30

Liste des figures

	<i>odorifera 1</i> (référence de souche 20).	
16	Image montre le résultat biochimique par Api 20 E de l'espèce <i>K.pneumoniae spp pneumoniae</i> (référence de souche 14).	31
17	Distribution des entérobactéries selon les espèces.	34
18	Fréquence des profils numériques en API 20E des souches d' <i>E. coli 1</i>	34
19	Fréquence des profils numériques en API 20E des souches de <i>Serratia odorifera 1</i> .	35
20	Fréquence des profils numériques en API 20E des souches de <i>K. pneumoniae spp pneumoniae</i> .	35
21	Sensibilité aux antibiotiques des 25 souches isolées vis-à-vis les antibiotiques testés.	36
22	Image de l'antibiogramme de la souche <i>E. coli 1</i> isolée (référence de la souche 25).	37
23	Image de l'antibiogramme de la souche <i>Serratia odorifera 1</i> (référence de la souche 4).	37
24	Image de l'antibiogramme de la souche <i>Klebsiella pneumoniae spp pneumoniae</i> (référence de la souche 14).	37
25	Sensibilité des souches d' <i>E. coli 1 étudiées</i> aux antibiotiques testés	38
26	Sensibilité des souches de <i>Serratia odorifera 1</i> aux antibiotiques testés.	38
27	Sensibilité des souches de <i>Klebsiella pneumoniae spp pneumoniae étudiées</i> aux antibiotiques testés	39

Liste des tableaux

N° de tableau	Le titre	N° de page
01	La classification des entérobactéries.	03
02	les caractères biochimiques des quelques espèces de la famille <i>Enterobacteriaceae</i> .	05
03	Classification des hôpitaux par nombre de lits actifs	08
04	Nature des effluents par lieu de production.	09
05	Résistance naturelle chez les entérobactéries.	13
06	Mécanismes de résistance et leurs conséquences.	16
07	Le nombre et les dates des prélèvements	20
08	les concentrations des antibiotiques dans le milieu Macconkey selon le profil de résistance recherché.	22
09	les antibiotiques utilisés dans notre étude.	27
10	Identification et biotypage selon le profil numérique des 25 souches d'entérobactéries isolées dans notre étude.	31
11	Isolement et identification des souches multirésistantes selon le numéro de prélèvement.	33

Introduction

Introduction

Les effluents générés par les activités hospitalières peuvent présenter un danger potentiel pour l'homme et son environnement. Cela, compte tenu de la nature et de l'importance des substances qu'ils contiennent comme les résidus médicamenteux, les réactifs chimiques.

En outre, les effluents hospitaliers contiennent des bactéries potentiellement pathogènes, des virus et des champignons. Ces déchets liquides sont évacués au même titre que les rejets urbains classiques vers le réseau d'assainissement communal sans traitement préalable et surtout vers les eaux de surface comme les eaux lagunaires.

Les effluents non traités générés par les activités hospitalières peuvent contribuer largement à la dissémination des bactéries multirésistantes (BMR) dans l'environnement. Les BMR des effluents proviennent essentiellement soit des produits biologiques (sang, urines, pus etc.) des patients colonisés, soit de transfert horizontal de gènes de résistance entre les souches multi-résistantes infectieuses et des souches environnementales **(35)**.

Les entérobactéries forment une vaste famille de bactéries à Gram-négatif, qui sont à l'origine de maladies de gravité très variable, en raison de mécanismes pathogéniques distincts. Les espèces de cette famille ont été depuis une vingtaine d'années largement exposées à une utilisation extensive des antibiotiques. Revers de la médaille, elles n'ont pas été épargnées par la résistance croissante aux molécules les plus fréquemment utilisées **(19)**.

L'émergence des bactéries multi-résistantes (BMR) est un enjeu majeur de santé publique dans le monde entier qui nécessite une attention immédiate. Parmi ces bactéries, les plus fréquentes rencontrées sont les entérobactéries exprimant une bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE) **(12)**. Les isolats bactériens producteurs de carbapénèmases posent actuellement un problème clinique sévère, car la non-susceptibilité aux bêta-lactamines est souvent accompagnée d'une résistance aux classes de médicaments supplémentaires, par exemple des aminosides ou des quinolones et polymyxines qui peuvent entraîner la modification des gènes des bactéries et deviennent les résistantes, qui favorise entraînant fréquemment des échecs thérapeutiques **(54)**.

Les conséquences en sont très nombreuses, dont une augmentation de la morbidité et de la mortalité, un accroissement des coûts des soins de santé, cause par des hospitalisations plus longues, et la nécessité d'utiliser des médicaments plus coûteux et souvent plus toxiques.

Introduction

Certaines infections résistent même à tous les antibiotiques actuellement disponibles sur le marché (66).

Dans la région de Tébessa, il n'existe pas de données qui permettent de décrire le niveau de résistance des entérobactéries aux antibiotiques au niveau des effluents hospitaliers. L'objectif de cette étude était d'identifier les entérobactéries multirésistantes isolées au niveau du collecteur final des eaux usées hospitalières de l'hôpital Mère et enfants Khaldi Abd Laziz de la ville de Tébessa, d'évaluer leur niveau de résistance vis-à-vis les principaux antibiotiques et comparer ce niveau de résistance avec celui des souches d'entérobactéries cliniques isolées dans le même hôpital lors d'une étude précédente.

Ce manuscrit s'articule autour de quatre parties : la première Partie portera principalement sur un bref rappel sur les entérobactéries leurs mécanismes de résistance aux antibiotiques, ainsi qu'une généralité sur les effluents hospitaliers. La deuxième partie présentera le matériel et les méthodes expérimentales utilisés. La troisième partie portera sur l'ensemble des résultats obtenus et aux discussions qui en découlent. Nous terminerons ce travail par une quatrième partie qui sera consacrée à la conclusion et les perspectives de recherche à venir.

Chapitre 1:
La famille
d'Enterobacteriaceae

1. Taxonomie des *Entérobactéries*

Tableau 1: La classification des entérobactéries (10), (17), (32).

Rangs taxonomiques	Classification
Domaine	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Enterobacteriales</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>

La famille des *Enterobacteriaceae* comprend actuellement 130 espèces répertoriées. Les espèces les plus communément isolées en bactériologie clinique appartiennent à 12 Genres : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia* (17), (32), (56).

2. Habitat

Les entérobactéries sont des hôtes de tube digestif de l'homme et des animaux (61). Ils sont retrouvées partout dans le sol, dans l'eau, soit à l'état de pathogène, soit à l'état de commensaux, ils participent aussi à la dégradation des matières organiques (55), (18), (17).

3. Caractères bactériologiques

3.1. Les caractères morphologiques

Ce sont des bactéries à Gram négatif de 2 à 3 micromètres de long sur 0,6 micromètre de large, polymorphisme; formes longues et filamenteuses ou petits bacilles droits (*Proteus*), mobiles grâce à une ciliature péritriche. Certaines sont immobiles (*Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia pestis*). Les *Klebsiella* sont capsulées. La plupart des espèces pathogènes pour l'homme possèdent des fimbriae ou pili communs qui sont des facteurs d'adhésion (67), (55), (18), (17).

3.2. Les caractères cultureux

Les entérobactéries se poussent en aéro-anaérobiose, sur des milieux sélectifs comme DCL, Hektoéne, MacConkey...

Dans une température de culture de 30 à 37°C. Les colonies sont lisses et régulières et atteignent 2 millimètres de large sauf celles des *Yersinia* qui sont plus petites. Les *Proteus* ont tendance à envahir la gélose et à y former un tapis uniforme. Selon l'espèce, on identifie le caractère macroscopique de la colonie : type R (rugueux), type M (muqueux: *Klebsiella*, certaines souches d'*E. Coli*, *Salmonella*), type S (Smooth=lisse) (67), (55), (17).

3.3. Les caractères biochimiques

Les propriétés qui définissent la famille doivent être mises en évidence pour affirmer que la souche est une entérobactérie.

Les caractères d'identification sont essentiellement "biochimiques" et utilisent des tests qui étudient le métabolisme protéique (production d'indole, présence d'uréase, dégradation du tryptophane) ou la fermentation des sucres (glucose, saccharose, lactose etc.), la présence d'enzymes (décarboxylases, désaminases), la capacité d'utiliser le citrate, , la production d'hydrogène sulfuré ou la formation de gaz **(67), (55), (61), (17), (11)**, et autre caractères dans le **(tableaux 2)** qui déterminer quelques caractères biochimiques pour quelques espèces de la famille *Enterobacteriaceae*

Chapitre 1: La famille des *Enterobacteriaceae*

Tableau 2: les caractères biochimiques des quelques espèces de la famille *Enterobacteriaceae* (67).

Entérobactéries Caractères biochimiques														
	Lac	Gluc	Man	Suc	Cit	Dulc	Ind	Uréase	Mobilité	H ₂ S	MR ^(b)	VP ^(c)	PDA ^(d)	NO ₃
<i>Escherichia coli</i>	+	+g ^(a)	+	±	-	±	+	-	+	-	+	-	-	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+g	+	+	+	±	+	+	-	-	-	+	-	+
<i>K. pneumoniae</i>	+	+g	+	+	+	±	-	+	-	-	-	+	-	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+g	+	+	+	-	-	±	+	-	-	+	-	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+g	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+
<i>Shigella dysenteriae</i>	-	+	+	-	-	-	±	-	-	-	+	-	-	+
<i>Shigella sonnei</i>	±	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>Salmonella typhi</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+
<i>Salmonella paratyphi A</i>	-	+g	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+
<i>Salmonella paratyphi B</i>	-	?	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	+g	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+
<i>Citrobacter freundii</i>	-	+g	+	±	+	±	-	±	+	+	+	-	-	+
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	+g	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+
<i>Serratia marcescens</i>	-	±/g	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+
<i>Hafnia alvei</i>	-	+g	+	-	-	-	-	-	+	-	±	+	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	-	+g	-	±	±	-	-	+	+	+	+	±	+	+
<i>Proteus vulgaris</i>	-	+g	-	+	±	-	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Providencia stuartii</i>	-	+g	-	±	+	-	+	±	+	-	+	-	+	+
<i>Morganella morganii</i>	-	+g	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	+	+	+	-	-	±	±	-	-	+	-	-	+
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
<i>Y. pestis</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+

(a) Production de gaz. (b) Rouge de méthyle. (c) Voges-Proskaver. (d) Phénylalanine désaminase.

3.4. Les caractères antigéniques

3.4.1. Antigène ECA

Antigène ECA (Enterobacterial Common Antigen) ou antigène de Kunin, il n'existe que chez les entérobactéries et de ce fait a un intérêt taxonomique. Sa présence chez les *Yersinia* a permis d'inclure ce genre dans la famille des entérobactéries (17), (28), (21).

3.4.2 Antigène O

L'antigène O est l'endotoxine des bactéries à Gram négatif. Il est composé de lipopolysaccharides (LPS) complexes qui sont thermostables et résistent à l'alcool, très toxiques, Il est constitué d'une mosaïque d'antigènes dont certains sont des constituants communs à toutes les entérobactéries et germes apparentés, et d'autres, des constituants spécifiques de chaque espèce (67), (55), (61), (37).

3.4.3 Antigène H

L'antigène H n'est pas toxique, de nature protéique (flagelline), il est thermolabile et inactivé par l'alcool.

La flagelline spécifique de chaque type de bactérie a des propriétés antigéniques. L'antigène flagellaire H (Ag H) utilisé pour l'identification sérologique de certains groupes avec détermination de sérotype exemple : *E. Coli* O157 H7 (55), (28).

3.4.4 Antigène de surface

L'antigène K capsulaire, de nature polysaccharidique, qui entoure la paroi de certaines entérobactéries et peut masquer l'antigène O, on le trouve chez les *Escherichia coli*, les *Shigelles* ou chez certaines *Salmonelles* et *Citrobacter* (ex: antigène Vi, pour virulence, de *Salmonella typhi*). Les antigènes d'adhérence ou andésines de nature protéique, portés par des pilis communs encore appelés fimbriae (55).

4. Les facteurs de la virulence

On peut distinguer plusieurs facteurs de la virulence chez les *Enterobacteriaceae* selon la spécificité de chaque genre ou espèce:

4.1. Ilots de pathogénicité

Ce sont des gènes codés pour les facteurs de virulence, porté sur des segments d'ADN ou bien de plasmides, il y a plusieurs genres et espèces portent ces ilots comme *E. Coli*, *Salmonella*, *Shigella* (60).

4.2. La capsule

Elle joue un rôle très important dans la pouvoir pathogène, car elle s'oppose à la phagocytose, et à l'activation de la voie alterne du complément. Elle possède chez *E. coli* et *Klebsiella* (21).

4.3. Le pili

Est un filament court (<1µm) et nombreux un à plusieurs centaines, plus fine que les flagelles (3 à 10 nm). Leur rôle est l'adhésion (17).

4.4. Variation antigéniques

C'est la capacité des microorganismes de changer ses antigènes de surface, est la capacité génétiquement réversible de certaines bactéries de désactiver et d'activer l'expression de gènes codant pour des antigènes de surface (60).

5. Le pouvoir pathogène

Chez l'homme, les entérobactéries sont responsables d'environ 50% des infections nosocomiales et plus particulièrement les entérobactéries suivantes :

- *Escherichia coli*
- Les *Klebsiella spp.*
- les *Enterobacter spp.*
- les *Proteus spp.*
- les *Providencia spp.*
- *Serratia marcescens subsp. Marcescens*

Il y a des espèces à fort potentiel pathogène, considérées comme des pathogènes stricts. Elles sont caractérisées par leurs facteurs de virulence (capacité d'adhésion aux cellules de la muqueuse, capacité d'invasion, capacité de toxinogénèse). Leur présence dans l'organisme (intestin) est anormale et se traduit par des syndromes digestifs (diarrhées).

Il s'agit principalement de *Salmonella (Typhi et Paratyphi)*, *Shigella*, certains *E. coli* et *Yersinia*. On peut citer le cas particulier de *Yersinia pestis*, responsable de la peste et qui n'est pas à tropisme intestinal (60), (61).

Il y a aussi des espèces occasionnellement pathogènes, qui correspondent aux espèces commensales de notre organisme ou à des bactéries de l'environnement. Elles jouent un rôle pathogène à l'occasion de la rupture d'une barrière immunologique, lors d'une diminution des résistances de l'organisme ou lors d'un des équilibres de la flore commensale (antibiothérapie). Elles sont responsables d'infections urinaires, méningite, et septicémies ... (60), (61).

Chapitre 2:
Les effluents
hospitaliers

Chapitre 2: Les effluents hospitaliers

1. Généralité

Généralement, les hôpitaux fonctionnent 24 heures sur 24 durant les 365 jours de l'année. Leur spécialité est liée aux types maladies qu'ils traitent. Les différentes pathologies sont réparties en service, c'est ainsi que l'on peut retrouver dans un même hôpital des entités tels que : un service des maladies tropicales et infectieuses (tuberculose, malaria, choléra, SIDA, etc.), un service psychiatrique, un service de pédiatrie, un service d'obstétrique, un service de gynécologie, un service de gastroentérologie...etc (2), (20).

Les hôpitaux sont obligés de disposer des équipements de base permettant aux patients aussi bien qu'aux personnels de santé et aux visiteurs de satisfaire leurs besoins physiologiques. De ces facilités, on peut citer notamment : les salles de consultations, les salles d'hospitalisation, les cafétérias, les toilettes (douches, lavabos), les laveries, les salles de repos, les laboratoires, les unités de chauffage et de climatisation, etc. L'ensemble de ces équipements et les différentes activités de l'hôpital nécessitent un approvisionnement en eau potable adéquat et génèrent des eaux usées, des effluents gazeux et des déchets solides (2), (20).

2. Classification des hôpitaux

L'American Hospital Association (AHA) estime que le nombre de lits actifs d'un hôpital est un indicateur permettant d'évaluer qualitativement et quantitativement les déchets solides, les effluents gazeux et les rejets liquides d'un centre de santé. Sous la base de cette hypothèse, elle a classifié les hôpitaux en huit groupes. Le **tableau 3** fournit la classification de la AHA (2).

Tableau 3: Classification des hôpitaux par nombre de lits actifs (2).

Classe	Nombre de lits actifs
1	6 – 24
2	25 – 49
3	50 – 99
4	100 – 199
5	200 – 299
6	300 – 399
7	400 – 499
8	500 ou plus

3. Typologie des effluents liquides hospitaliers

Les établissements hospitaliers produisent trois types de rejets liquides :

- ✓ les rejets d'origine domestique (les eaux provenant des cuisines, les rejets résultant des activités de blanchisserie, de l'hygiène des patients et du personnel) ;
- ✓ les rejets industriels (les eaux provenant des garages et des ateliers contenant le plus souvent un volume important d'huiles et de détergents) ;
- ✓ les effluents générés par les activités de soins, d'analyse et de recherche, qui sont très spécifiques aux hôpitaux. Ces rejets peuvent contenir des produits chimiques et radioactifs, des liquides biologiques, des déjections/excrétions contagieuses et également des résidus de médicaments éliminés dans les excréta des patients(2).

Tableau 4 : Nature des effluents par lieu de production.

Structure	Nature des effluents liquides
Services d'hospitalisation	- Les liquides biologiques (urines, fèces, vomissements) - Les eaux des lavabos, des bains, des douches... - L'eau des toilettes des services hospitaliers
Blocs opératoires	- Liquides biologiques : sang, urines, selles, liquides gastriques, aspiration trachéo-bronchique, liquide d'épanchement péritonéal ou pleural, de drainage ou d'irrigation.
Laboratoires	- Les liquides biologiques : Ce sont les produits biologiques liquides restant après l'analyse (sang, crachats, urines). - Les effluents chimiques : Ce sont les stocks de produits chimiques liquides périmés (acides, bases, réactifs divers, solvants...) - Les effluents mixtes chimico-biologiques : Ils sont composés de liquides biologiques mélangés à des réactifs chimiques lors des techniques d'analyse manuelles ou automatisées.
Radiologie	- Les effluents liquides des centres de radiologie chargés de produits révélateurs et fixateurs présentent des risques de toxicité pour l'homme et l'environnement.
Unités de stérilisation	- Effluents liquides chargés de détergents et désinfectants
Nettoyage et entretien des locaux	- Détergents et désinfectants.

4. Les caractères microbiologiques des effluents hospitaliers

La flore microbiologique des effluents hospitaliers montre qu'il y a des marqueurs de pollution fécale des eaux « les coliformes fécaux, les streptocoques fécaux et les spores des bactéries sulfitoréductrices». Et la présence aussi des bactéries multi résistantes aux antibiotiques (avec des marqueurs comme : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticiline et *Klebsiella pneumoniae* porteuse de β - lactamase à spectre étendu) (20), (9), (16).

4.1. Les coliformes fécaux : *Escherichia coli*

E. coli est abondant dans les fèces humaines et animales où il peut atteindre des concentrations de 10^9 par gramme de matières fraîches. On le trouve dans les eaux d'égout, les effluents traités, ainsi que dans toutes les eaux naturelles et les sols qui ont subi une contamination fécale récente, qu'elle soit due à l'homme, à l'agriculture ou à la faune sauvage. Il a été récemment avancé que *E coli* peut être présent et même se multiplier dans les eaux tropicales en l'absence de pollution fécale d'origine humaine(9), (20), (53).

4.2. Bactéries coliformes thermotolérantes

Ce terme désigne un groupe de coliformes capables de provoquer la fermentation du lactose à 44-45°C ; ils comprennent le genre *Escherichia*, et dans une moindre mesure, certaines espèces de *Klebsiella*, *Enterobacter* et *Citrobacter*. Les coliformes thermotolérants autres que la *E. coli* peuvent aussi se trouver dans des eaux enrichies en matières organiques, comme les effluents industriels ou des produits de décomposition des plantes et du sol. (9), (20).

4.3. Streptocoques fécaux

Le terme "*streptocoques fécaux*" désigne les streptocoques généralement présents dans les fèces de l'homme et des animaux.

Le genre *Enterococcus* comprend maintenant tous les streptocoques qui se caractérisent par certaines propriétés biochimiques communes et une large tolérance à des conditions de croissance défavorables, notamment les espèces *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. aurons*, *E. faecalis* *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E malodoratus*, *E. mundtii* et *E solitarius*.

La plupart de ces espèces sont d'origine fécale et peuvent généralement être considérées en pratique comme des indicateurs spécifiques d'une pollution fécale humaine. Toutefois, on peut aussi les isoler à partir de fèces d'animaux, et certaines espèces et sous-espèces, comme *E casseliflavus*, *E. faecalis* var. *liquefaciens* *E. malodoratus* et *E solitarius* se rencontrent principalement sur des végétaux (53).

Chapitre 2: Les effluents hospitaliers

Les streptocoques fécaux se multiplient rarement dans l'eau polluée et leur persistance n'est pas supérieure à celle de l'*E. coli* et des coliformes.

4.4. Clostridium sulfito-réductrices

Ce groupe se compose de microorganismes anaérobies sporigènes, dont le plus caractéristique, *Clostridium perfringens*, est normalement présent dans les fèces, mais en bien moins grand nombre qu'*E. coli*. Toutefois, ils ne sont pas d'origine exclusivement fécale et leur présence dans l'environnement peut avoir d'autres raisons. Les spores de clostridium peuvent survivre dans l'eau beaucoup plus longtemps que les coliformes et ils résistent à la désinfection(9), (20), (41).

Chapitre 3:
La résistance des
Enterobacteriaceae
aux antibiotiques

Chapitre 3: La résistance des Enterobacteriaceae aux antibiotiques

1. Définition

Antibiotique; du grec anti (contre), et bios (la vie), les ATB sont des composés chimiques ayant la propriété de tuer ou d'empêcher la prolifération des microorganismes pathogènes. Ce sont des substances produites naturellement par certaines moisissures et bactéries (13) (31).

Ils ont un champ d'efficacité varié, beaucoup sont des antimicrobiens à spectre étroit (une efficacité limitée) à un petit nombre d'agents pathogènes différents, d'autre ont un large spectre et attaquent de nombreux types d'organismes pathogènes (33).

La résistance se définit alors par l'inefficacité de la dose d'antibiotique au niveau du site infectieux : la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'ATB permet d'arrêter la croissance de la bactérie (17), (33).

2. Les types de résistance aux antibiotiques

La résistance bactérienne à un antibiotique est d'origine génétique. Les gènes de résistance se trouvent soit dans le chromosome (résistance chromosomique), soit dans un élément mobile, comme les plasmides, les éléments transposables ou les intégrons (résistance extra chromosomique). La résistance peut être soit naturelle, soit acquise (59).

2.1. Résistance naturelle (ou intrinsèque)

Les gènes de résistance font partie du patrimoine génétique de la bactérie. La résistance naturelle est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce. Ce type de résistance est détecté dès les premières études réalisées sur l'antibiotique afin de déterminer son activité et contribue à définir son spectre antibactérien. Cette résistance peut être due à l'inaccessibilité de la cible pour l'antibiotique, à une faible affinité de la cible pour l'antibiotique ou encore à l'absence de la cible. Par exemple, la résistance des *entérobactéries* et du *Pseudomonas* aux *macrolides* (Tableau 5), ou des bactéries à gram négatif à la *vancomycine* est naturelle. Résistance bactérienne naturelle est permanente et d'origine chromosomique. La résistance naturelle est stable, transmise à la descendance (transmission verticale) lors de la division cellulaire, mais elle n'est généralement pas transférable d'une bactérie à l'autre (transmission horizontale) (56), (59).

Chapitre 3: La résistance des Enterobacteriaceae aux antibiotiques

Tableau 5: Résistance naturelle chez les entérobactéries (65).

Espèces	AM	AMC	TIC/ PIP	C1G	FOX	MA	CXM	GM	TOB	TET	COL	FT
<i>Klebsiella spp.</i>	R		R									
<i>E. hermanii</i>	R		R									
<i>C. koseri</i>	R		R									
<i>C. freundii</i>	R	R		R	R							
<i>E. cloacae</i>	R	R		R	R							
<i>E. aerogenes</i>	R	R		R	R							
<i>H. alvei</i>	R	R		R								
<i>S. marcescens</i>	R	R		R		R	R		R		R	
<i>P. mirabilis</i>										R	R	R
<i>P. vulgaris, P. penneri</i>	R			R		R	R			R	R	R
<i>M. morgani</i>	R	R		R			R			R	R	R
<i>P. stuartii</i>	R	R		R				R		R	R	R
<i>P. rettgeri</i>	R	R		R						R	R	R
<i>Y. enterocolitica</i>	R	R	R	R	R	R	R					

2.2. Résistance acquise

Les bactéries peuvent développer de la résistance à un antibiotique préalablement sensible, ce qui implique des changements génétiques. Cette résistance est souvent instable. Ces changements peuvent être de deux types : soit une mutation spontanée, soit l'acquisition de gènes par un autre micro-organisme

3. Mode de transfère des gènes de la résistance aux antibiotiques

La mutation chromosomique spontanée constitue un mécanisme de résistance aux antibiotiques chez environ 10 à 20 % des bactéries. Les gènes de résistance se situent alors dans le chromosome de la bactérie. Une mutation n'affecte qu'un caractère, et la résistance ne concerne généralement qu'un antibiotique ou qu'une famille d'antibiotiques ayant le même mécanisme d'action. L'utilisation d'une association de deux ou de plusieurs antibiotiques semble pouvoir prévenir l'émergence de mutants résistants. Par exemple, la résistance à la rifampicine et aux quinolones résulte toujours d'une mutation (19) (46) (71).

La résistance bactérienne par acquisition d'information génétique exogène représente la majorité des cas isolés en clinique et s'observe aussi bien chez les bactéries à gram positif qu'à gram négatif. L'acquisition de nouveau matériel génétique peut se faire soit par échange direct de matériel chromosomique, soit par échange d'éléments mobiles. Dans ce dernier cas, les gènes de résistance se trouvent dans un fragment d'ADN bactérien situé à l'extérieur et sur certains éléments mobiles du chromosome, tels les plasmides. Cette forme de résistance est transférable d'une bactérie à l'autre et même à des bactéries d'espèces différentes (19) (46) (71).

Chapitre 3: La résistance des Enterobacteriaceae aux antibiotiques

Le transfert d'un seul plasmide augmente aussi le risque d'une résistance à plusieurs médicaments. Par exemple, le *Shigella*, responsable de la diarrhée, peut transférer un plasmide avec résistance à quatre ou cinq antibiotiques différents. Les gènes ou les groupes de gènes de résistance peuvent s'acquérir par transformation, transduction ou conjugaison (19) (46) (71).

La transformation permet l'acquisition et l'incorporation d'ADN libre dans l'environnement à la suite de la mort de la bactérie mère. (Exemple : le gonocoque résistant à la pénicilline).

La transduction est un mécanisme de transfert de gènes, dont le vecteur est un virus bactérien appelé bactériophage. Ce mécanisme permet le transfert d'information génétique entre bactéries appartenant essentiellement à la même espèce. Les plasmides sont souvent transférés par conjugaison (19) (46) (71).

La conjugaison est un processus au cours duquel l'ADN est transféré d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice par un mécanisme complexe nécessitant un étroit contact cellulaire et responsable en grande partie de l'émergence d'une résistance chez les bactéries pathogènes. En pareil cas, la résistance se transmet aux bactéries filles. Les bactéries ayant reçu cet élément mobile peuvent se rétablir et redevenir sensibles aux antibiotiques si elles ne sont pas exposées à ces derniers. (Figure 1) résume la manière dont les bactéries peuvent acquérir de la résistance aux antibiotiques (19) (46) (71).

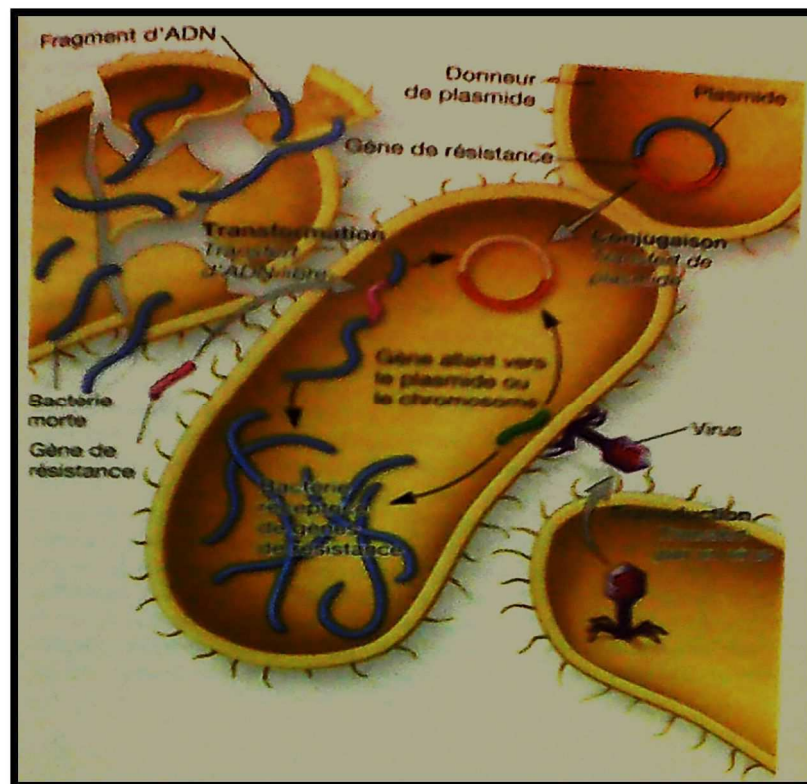


Figure 1 : échanges génétiques des gènes de résistances aux antibiotiques (33).

4. Mécanisme de la résistance

En fonction de leur nature chimique, les ATB peuvent attaquer différents niveaux de la bactérie: la paroi, ou la membrane, ou le chromosome, ou bien les ribosomes. Selon la zone atteinte (**Figure 2**), la bactérie est soit tuée, soit devenue incapable de se multiplier (**19**) (**40**).

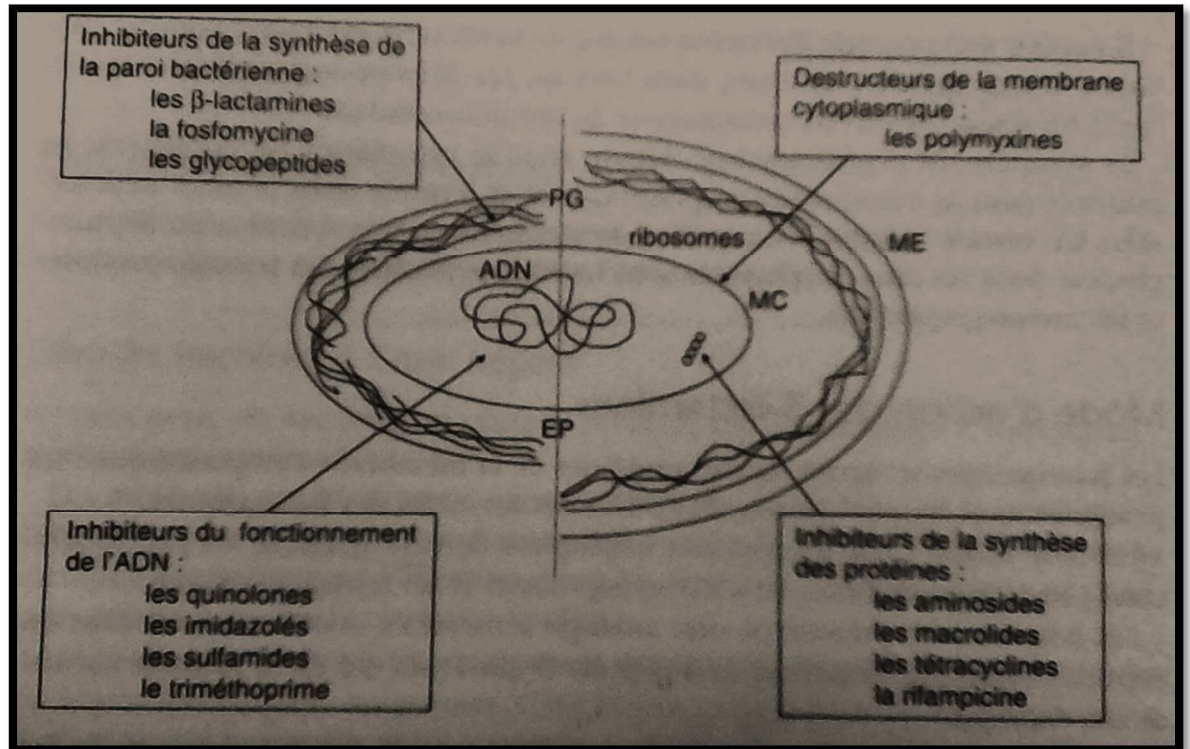


Figure 2: schéma d'une BGP (gauche) et BGN (droite) avec les mécanismes d'action des principales familles d'ATB. EP: espace périplasmique; ME: membrane externe; MC: membrane cytoplasmique; PG: peptidoglycane (**19**).

Les bactéries résistent à l'action des antibiotiques en (**Figure 3**):

- 1) Empêchant ou altérant l'accès de l'antibiotique à la cible.
- 2) Dégradant l'antibiotique.
- 3) Modifiant l'antibiotique.
- 4) Et/ ou rejetant rapidement l'antibiotique (**59**).

Chapitre 3: La résistance des Enterobacteriaceae aux antibiotiques

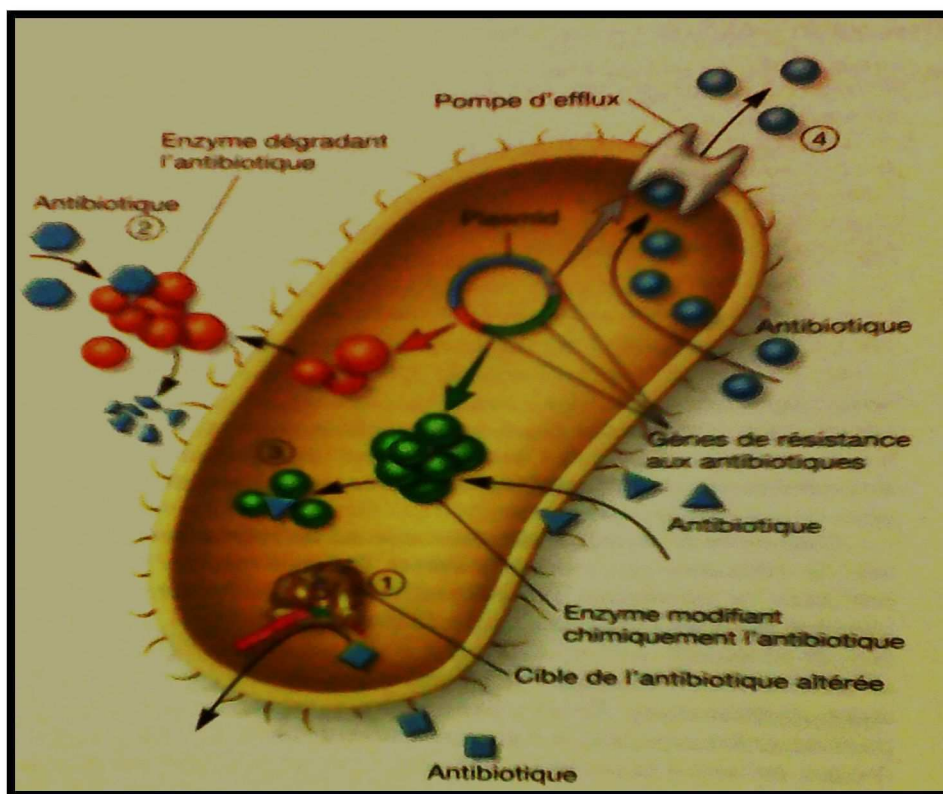


Figure 3: Mécanismes de résistance aux antibiotiques (59).

Tableau 6 : Mécanismes de résistance et leurs conséquences (19).

Mécanismes de résistance	Conséquences
Inhibition enzymatique	Production d'une enzyme qui inactive ou détruit l'antibiotique ; Mécanisme de résistance le plus répandu.
Réduction de la perméabilité cellulaire	Changements de perméabilité de la paroi ou de la membrane bactérienne empêchant le médicament d'atteindre sa cible.
Altération des sites de liaison ciblant par l'antibiotique	Baisse de l'affinité de l'antibiotique pour son site d'action.
Pompes à efflux	Antibiotique éjecté de la cellule par transport actif et site d'action devenant inaccessible

Chapitre 3: La résistance des Enterobacteriaceae aux antibiotiques

4.1.β. lactamine

Sont les antibiotiques les plus couramment utilisés dans le monde pour traiter les infections bactériennes à cause de leur large spectre d'activité et leur faible toxicité. Ces antibiotiques ont actifs sur des bactéries en phase de croissance et agissent en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne (synthèse du peptidoglycane) par inactivation des principales enzymes impliquées dans cette construction: les PLP; protéines liant les pénicillines (33), (6).

Le principal mécanisme de résistance aux bêta- lactamines est la production de l'enzyme bêta-lactamase qui peut les hydrolyser et inactivent les lactamines en détruisant le lien amide sur le cycle lactame (19), (7).

Les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) sont des enzymes sécrétées par les entérobactéries qui leur confèrent une résistance à la plupart des bêta-lactamines (pénicilline, céphalosporines, aztreonam) (15), (29).

4.2. Les carbapénèmes

Il y a deux mécanismes de résistance aux carbapénèmes chez les entérobactéries. L'un combine l'hyperproduction d'une céphalosporinase à celle de la perte d'une porine comme décrit chez *E. cloacae* ou *E. aerogenes*. L'autre consiste en la production d'une carbapénémase de classe A en position chromosomique, donc non transférable entre espèces. Depuis une dizaine d'années, le nombre de carbapénémases avec les types IMP (Active on imipénème), VIM (Veronaintegron-encoded metallo-β-lactamase), SME (*Serratia marcescens* enzyme), KPC (*Klebsiella-pneumoniae*-carbapenemase), OXA-48 (*Oxacillinase*) et NDM-1 (*New Delhi metallo-b-lactamase*) a explosé. La dernière évolution identifiée depuis peu est beaucoup plus inquiétante car elle est liée à la découverte de carbapénémases plasmidique, permettant un transfert inter-espèces et une dissémination rapide (1), (8).

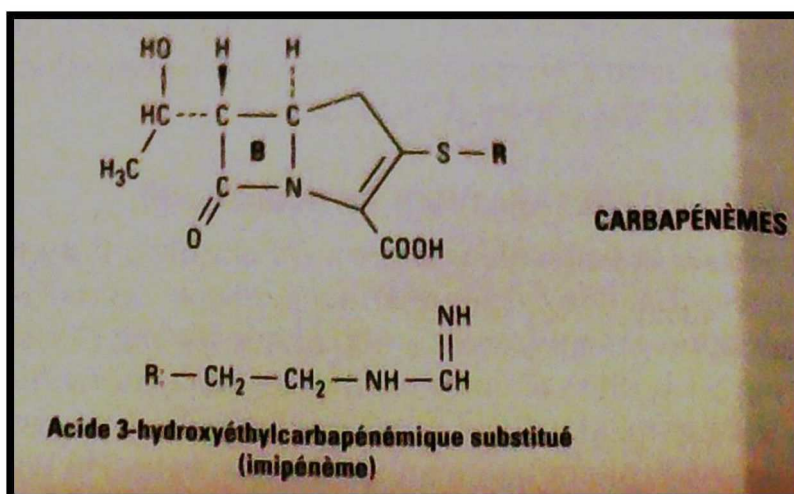


Figure 4: Structure chimique de la Carbapénème (30).

Chapitre 3: La résistance des Enterobacteriaceae aux antibiotiques

4.3. Les aminosides

Sont des antibiotiques ont un spectre d'action étroite et inhibent la synthèse des protéines bactériennes des staphylocoques et des bacilles Gram négatifs. Les antibiotiques de ce groupe, et particulièrement la néomycine, sont généralement plus toxiques que les autres après une prise prolongée (13).

Mode d'action des aminosides

Ces ATB exercent des effets pléiotropiques sur la bactérie qui conduisent à une bactéricide puissante et précoce. Ce sont des molécules de petite taille qui traversent de manière passive les pores de la membrane externe des BGN, et ensuite le peptidoglycane des BGP et BGN, pour se concentrer au niveau de la membrane cytoplasmique. Le passage de la membrane cytoplasmique est un transport actif nécessitant de l'énergie et qui s'effectue en deux phases. La première est lente, EDPI (énergie dépendant phase I), et dépendante du gradient transmembranaire de potentiel électrique.

Les premières molécules d'aminosides rentrent et se fixent sur l'acide ribonucléique (ARN) ribosomal 16S, constituant de la sous-unité 30S du ribosome. Il s'ensuit une altération de la traduction de l'ARN messager, des erreurs de lecture et donc une production de protéines anormales. L'incorporation de certaines de ces protéines dans la membrane cytoplasmique entraîne une altération membranaire.

C'est alors que débute de la seconde phase du passage membranaire des aminosides (EDPII). Les molécules rentrent massivement et rapidement à travers la membrane lésée, se fixent en grand nombre sur le ribosome et bloquent la synthèse des protéines.

Les actions combinées de blocage des synthèses de protéines et d'altération des membranes expliquent l'action bactéricide des aminosides. (19)

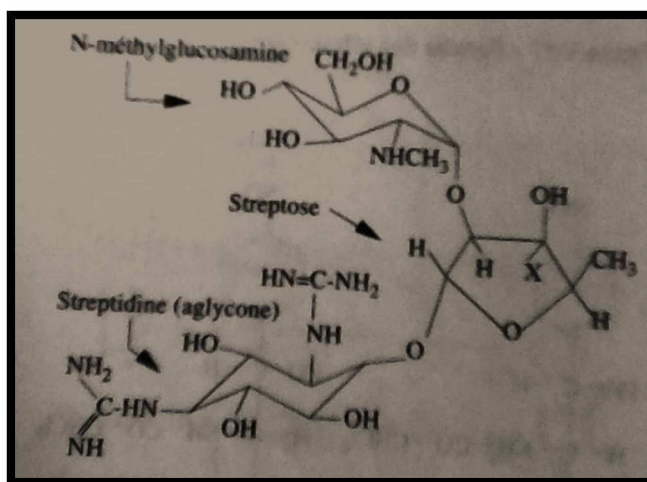


Figure 5: Structure chimique de la famille des aminosides: la streptomycine(30).

Chapitre 3: La résistance des Enterobacteriaceae aux antibiotiques

4.4. Les quinolones

Sont des antibiotiques inhibant le fonctionnement de l'acide désoxyribonucléique **(33)**.

Elles inhibent des topoisomérases, enzymes intervenant dans la conformation de l'ADN, et plus particulièrement la topoisomérase II (ou ADN gyrase) et la topoisomérase IV.

Elles se fixent sur le complexe formé par la topoisomérase et l'ADN. Les quinolones de première génération dont le chef de file est l'acide nalidixique, n'agissent que sur les bacilles à Gram négatif et ne sont utilisées que dans le traitement des infections urinaires **(48)**.

Les quinolones de 2ème génération ou fluoroquinolones comprennent principalement la pefloxacin, l'ofloxacin et la ciprofloxacine. Elles sont bactéricides et sont 100fois plus actives que celles de la 1ère génération **(14)**.

Matériels et méthodes

1. Cadre de l'étude

Cette étude a été menée sur une période de 3 mois de Février à Avril 2018 au laboratoire de microbiologie de l'université de Tébessa. Durant cette période, un total de 25 souches d'entérobactéries ont été isolées à partir du collecteur final des eaux usées hospitalières de l'hôpital Khaldi Abd Laziz. Un hôpital situé au centre-ville de la wilaya de Tébessa, d'une capacité de 120 lits.

Cet hôpital est réservé exclusivement aux maladies maternelles et infantiles et à la pédiatrie, et regroupe 06 différents services (Gynécologie, Grossesse à haute risque, Pédiatrie, Néonatalogie, Poste opératoire).

2. Matériel

Le matériel utilisé dans cette étude sera cité au cours des techniques réalisées.

3. Les échantillons

3.1. Prélèvement

Cette étude est basée sur des prélèvements des eaux usées hospitalières de l'hôpital de Khaldi Abd Lazize de la wilaya de Tébessa. Des échantillons d'eaux usées de 100 ml ont été recueillis une à deux fois par semaine, entre 12h et 15h, auprès du collecteur final des effluents de l'hôpital durant une période de 3 mois de février à Avril 2018. Le nombre et les dates des prélèvements sont mentionnés dans le tableau suivant (**Tableau 7**).

Tableau 7: Le nombre et les dates des prélèvements.

N° de prélèvement	La date
01	18 Février 2018
02	25 Février 2018
03	03 Mars 2018
04	04 Mars 2018
05	12 Mars 2018
06	17 Mars 2018
07	19 Mars 2018
08	09 Avril 2018
09	14 Avril 2018
10	15 Avril 2018

3.2. Préparation des échantillons

Les échantillons d'eaux usées hospitalières de 100 ml ont été filtrés sur compresse stérile de 17 fils par cm^2 pour éliminer les déchets solides et homogénéisés. Ensuite, des dilutions décimales de (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) à partir de l'échantillon mère ont été préparées dans l'eau physiologique stérile.

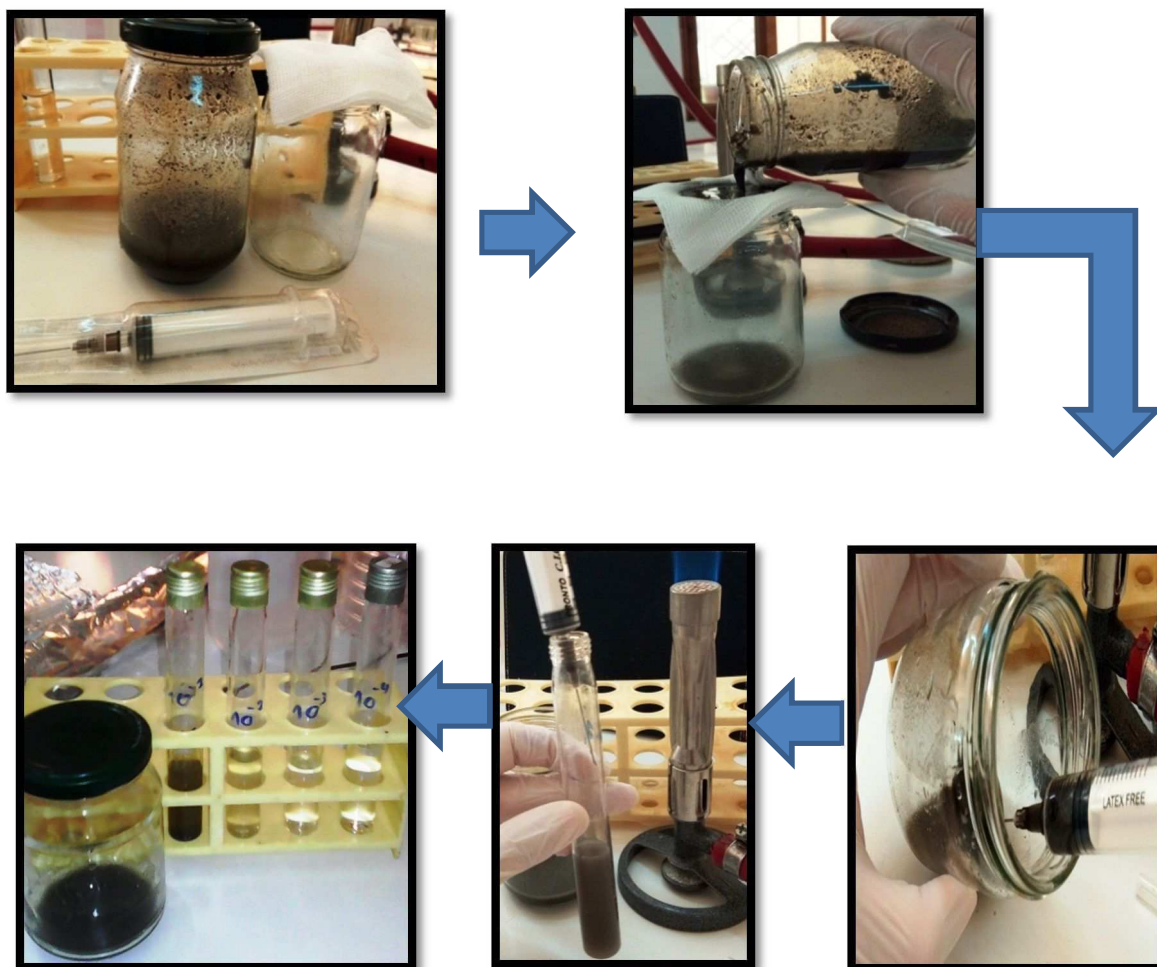


Figure 6: les étapes de filtration du prélèvement et la préparation des dilutions décimales.

4. Isolement des bactéries multirésistantes

Les différentes dilutions des prélèvements des eaux usées hospitalières ont été ensemencées sur une boîte du milieu de culture sélectif solide Mac Conkey (**Annexe1**) comme témoin négatif (sans antibiotique) et d'autres boîtes qui contiennent le milieu Mac Conkey additionné de différents types d'antibiotiques en poudre ; en solution injectable utilisé par voie

Matériels et méthodes

intraveineuse de deux concentrations : les β lactamine à large spectre **Céfotaxime (2 mg/l)**, les carbapénèmes: **Ertapénème (1mg/l)** et **Imipénème (8 mg/l)**, et les polymyxines: **Colistine (2 mg/l)** en fonction du profil de résistance recherché : les bêtalactamases à spectre étendu (BLSE), les carbapénémases et la résistance à la colistine.

4.1. Préparation du milieu d'isolement

Nous avons utilisé une balance (mg) pour peser des quantités très précises des antibiotiques; céfotaxime, ertapénème, imipénème, et colistine, (0,6 mg, 0,15mg), (0,3mg, 0,07mg), (1,35mg, 0,9mg), (0,45mg, 0,15mg) respectivement pour avoir deux concentrations minimales inhibitrices de chaque antibiotiques. Ensuite nous avons mélangé la poudre de chaque antibiotique dans le milieu Mac Conkey stérile en surfusion dans un agitateur pour bien homogénéiser le milieu de culture

Tableau 8: les concentrations des antibiotiques dans le milieu Macconkey selon le profil de résistance recherché.

Profil de résistance	Antibiotiques en poudre vois intraveineuse	Concentration dans le milieu Macconkey (mg/ l)	
β lactamine à large spectre	Céfotaxime	2	1
	Ertapeneme	1	0,5
Carbapénème	Imipeneme	8	6
	Polimixyne	Colistine	2

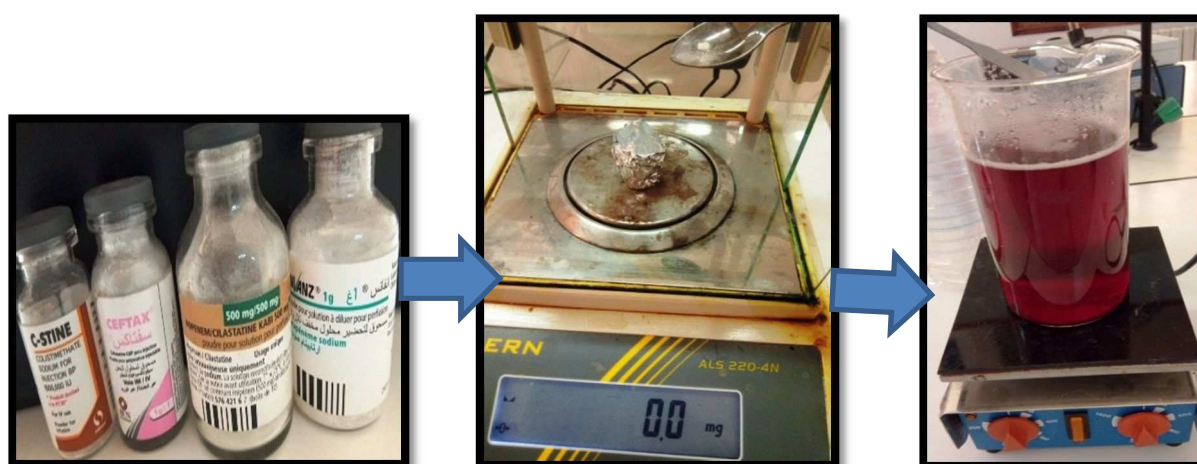


Figure 07: la préparation du milieu Macconkey sélectif pour l'isolement.

4.2. Ensemencement

Nous avons coulé les différents milieux sélectifs de chaque antibiotique (plus une boîte témoin négatif qui contient le milieu Mac Conkey sans antibiotique) dans des boîtes pour les dilutions décimales (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) de chaque prélèvement d'eaux usées hospitalières. Ensuite à l'aide d'une seringue stérile nous avons posé une goutte de l'échantillon et ses dilutions décimales sur les boîtes des milieux sélectifs.

L'ensemencement a été fait à l'aide d'une anse de platine stérile par des stries. L'incubation des boîtes a été réalisée pendant 24 heures à 37°C .

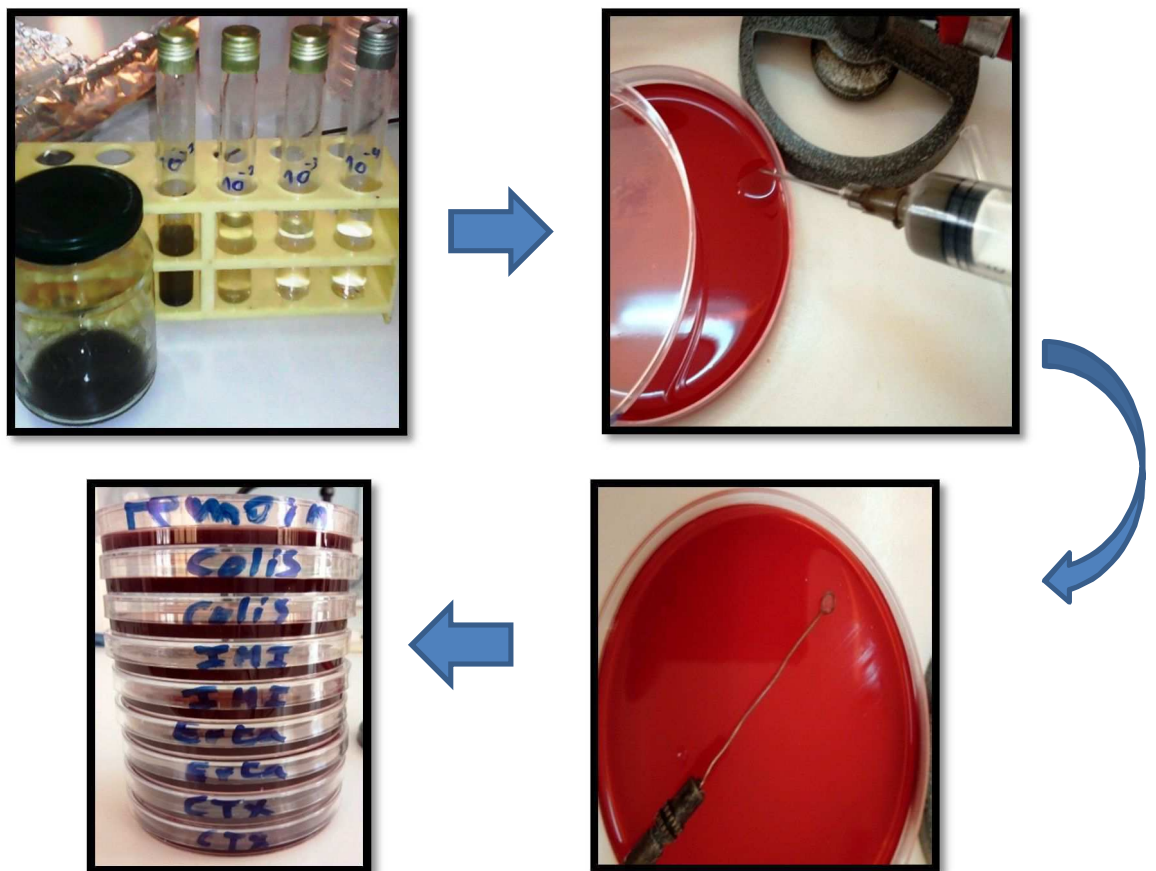


Figure 8: l'ensemencement de différentes dilutions de l'échantillon sur milieu Macconkey sélectif

Après l'incubation nous avons repiquées les souches qui ont poussé sur le milieu de culture sélectif (culture positive), puis nous les avons conservées dans des tubes de gélose nutritive inclinée pour faire l'identification et l'antibiogramme.

5. Identification des isolats

5.1. Coloration de Gram

- **Technique**

Utiliser une lame propre et inonder le frottis bactérien avec la solution de violet de gentiane, laisser agir 1 min, rincer doucement la lame inclinée avec l'eau pendant quelques secondes, puis ajouter à la lame la solution de lugol, laisser agir durant 1 min, rincer doucement la lame inclinée avec l'eau pendant quelques secondes. Faire couler doucement l'éthanol sur la lame inclinée pendant 30 sec à 1 min jusqu'à cessation de l'émission de couleur violette. Rincer pour éliminer l'alcool. Recouvrir la lame avec la fuchsine pendant 1 à 20 sec, et rincer la avec l'eau. Sécher la lame avec papier buvard. Finalement mettre des gouttes de l'huile à émersion et observer par microscope.

- **Lecture**

- ✓ Les bactéries à Gram **positif** apparaissent en violet
- ✓ Les bactéries à Gram **négatif** comme les entérobactéries, apparaissent sous forme de bacilles roses.

5.2. Identification biochimique par API20E

L'identification a été faite par la galerie rapide API système (Analytical profil index). API 20E est un système pour l'identification des entérobactéries et autres bacilles à Gram négatifs non fastidieux, utilisant 20 tests biochimiques standardisés et miniaturisés, ainsi qu'une base de données. Ces galeries API 20E sont fournies par l'IPP (Institut Pasteur de Paris), il s'agit de galerie qui se présente sous forme de produits desséchés que l'on réhydrate par inoculation de la suspension du germe à tester **(25)**.

- **Technique**

On réunit fond et couvercle d'une boîte d'incubation avec la répartition environ 5ml d'eau distillé dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide, sans oublié d'inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.

En effet, on retire la galerie de son emballage individuel et on la dépose dans la boîte d'incubation, puis on prépare l'inoculum bactérien: une colonie dans 5ml d'eau physiologique. Pour inoculer la galerie, il faut remplir à l'aide d'une pipette Pasteur les tubes et les cupules des tests CIT (citrate utilisation), VP (production d'acétone, réaction Voges Proskauer) et GEL (gélatinasse) avec la suspension bactérienne, et pour les autres tests; on va remplir uniquement les tubes (et non les cupules) avec la création d'une anaérobiose dans les tests: ADH (arginine

Matériels et méthodes

dihydrolase), LDS (lysine décarboxylase), ODC (ornithine décarboxylase), URE (Uréase) et H₂S en remplissant leur cupule par l'huile de vaseline stérile.

Enfin, on incube à 37 C° ± 1C° pendant 18-24 heures.

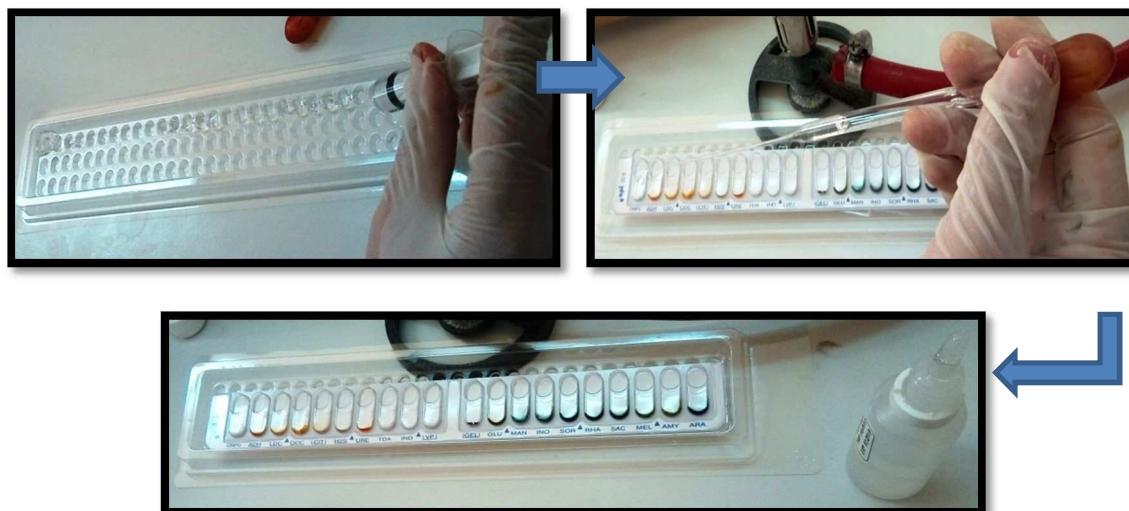


Figure 09: l'identification des isolats par le système API 20E.

- **Lecture**

Après l'incubation, lisez la bande en se référant à la table d'interprétation comprenant toutes les réactions spontanées sur la fiche, si la réaction du glucose est positive ou que trois tests ou plus sont positifs, révéler les résultats nécessitant l'ajout de réactifs : VP, TDA (tryptophane désaminase), IND (production d'indole). Ajoutez les réactifs requis et enregistrez les résultats sur la fiche de rapport.

La lecture des galeries API 20E se fait selon les indications du fournisseur. Après codification des réactions en un profil numérique (**Annexe 3**), on se réfère à un catalogue analytique comparez les résultats enregistrés sur la fiche de rapport avec ceux donnés dans le tableau (**Annexe 2**) (**25**).

5.3. Test de sensibilité aux antibiotiques par antibiogramme

Un antibiogramme de 11 antibiotiques spécifiques pour l'étude des entérobactéries a été réalisé par la méthode de diffusion en gélose (méthode des disques), selon le communiqué du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM. 2015), qui repose sur la connaissance du phénotype caractéristique de l'espèce et de différents phénotypes de résistance acquis. Ces dernières sont définies non seulement par des caractères de résistance en termes de catégories clinique ("I" ou "R"), mais aussi en termes de diminution significative de sensibilité et par des images typiques (Synergie) (**25**). (**Tableau 09**)

- **Technique:**

Préparation une suspension bactérienne, dans l'eau physiologique (0,9 % NaCl) a été bien homogénéisée; puisensemencée par écouvillonnage sur des boites de Pétri gélosées en Mueller-Hinton, et laisser une période du temps.

- ✓ **Application des disques d'ATB:**

Les disques d'antibiotiques correspondant ont été appliqués à l'aide d'une pince en appuyant légèrement ; puis incubés pendant 18-24h à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.



Figure 10: les étapes de l'antibiogramme.

- **Lecture:**

La lecture a été faite par la mesurer avec précision les différents diamètres des zones d'inhibition, en comparaison ces résultats aux valeurs critiques. Les bactéries ont été classées dans l'une des catégories: Sensible, Intermédiaire ou Résistance selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) et l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) publiées en 2015 (**Tableau 9**).

Tableau 9 : les antibiotiques utilisés dans notre étude

Antibiotique	Abréviation	Charge du disque	Diamètre Critique		Famille
Amoxicilline	AML	30 µg	≥21	<14	β-lactamines
Amoxicilline + acide clavulanique	AMC	20 µg	≥21	<14	
Céfotaxime	CTX	30 µg	≥26	<23	
Aztréonam	ATM	30 µg	≥27	<21	
Ertapénème	ETP	10 µg	≥28	<26	Carbapénèmes
Imipénème	IPM	10 µg	≥24	<17	
Gentamicine	CN	10 µg	≥18	<16	Aminosides
Amikacine	AK	30 µg	≥17	<15	
Ciprofloxacine	CIP	5 µg	≥25	<22	Quinolones
Triméthoprim - sulfaméthoxazole	SXT	25 µg	≥16	<10	Sulfamides
Colistine	CT	10 µg	≥11	<8	Polymixines

Résultats

1. Souche bactérienne

Notre étude est basée sur 25 souches d'entérobactéries collectées durant une période de 2 mois (19/02/2017_26/04/2017), à partir du prélèvement des eaux usées hospitaliers de l'hôpital mère et enfants Dr. Khaldie Abd Laziz à Tébessa. L'isolement des souches des entérobactéries durant cette période a été fait sur milieu MacConkey mélangé avec des quantités précises des antibiotiques en poudre (Céfotaxime, Ertapenème, Imipenème, et Colistine), pour la recherche des BLSE (β Lactamase a Spectre Étendu), Carbapénémases, et la résistance à la colistine.

1.1.Aspect macroscopique des isolats

Les isolats bactériens ont montré divers aspects cultureux sur le milieu Mac Conkey, Le diamètre des colonies est de 1.5 à 3 mm avec un aspect particulier selon les espèces (bombées, lisses, rondes, brillantes...), de couleur rose, grenas et jaune (**Figure 11**).

Résultats

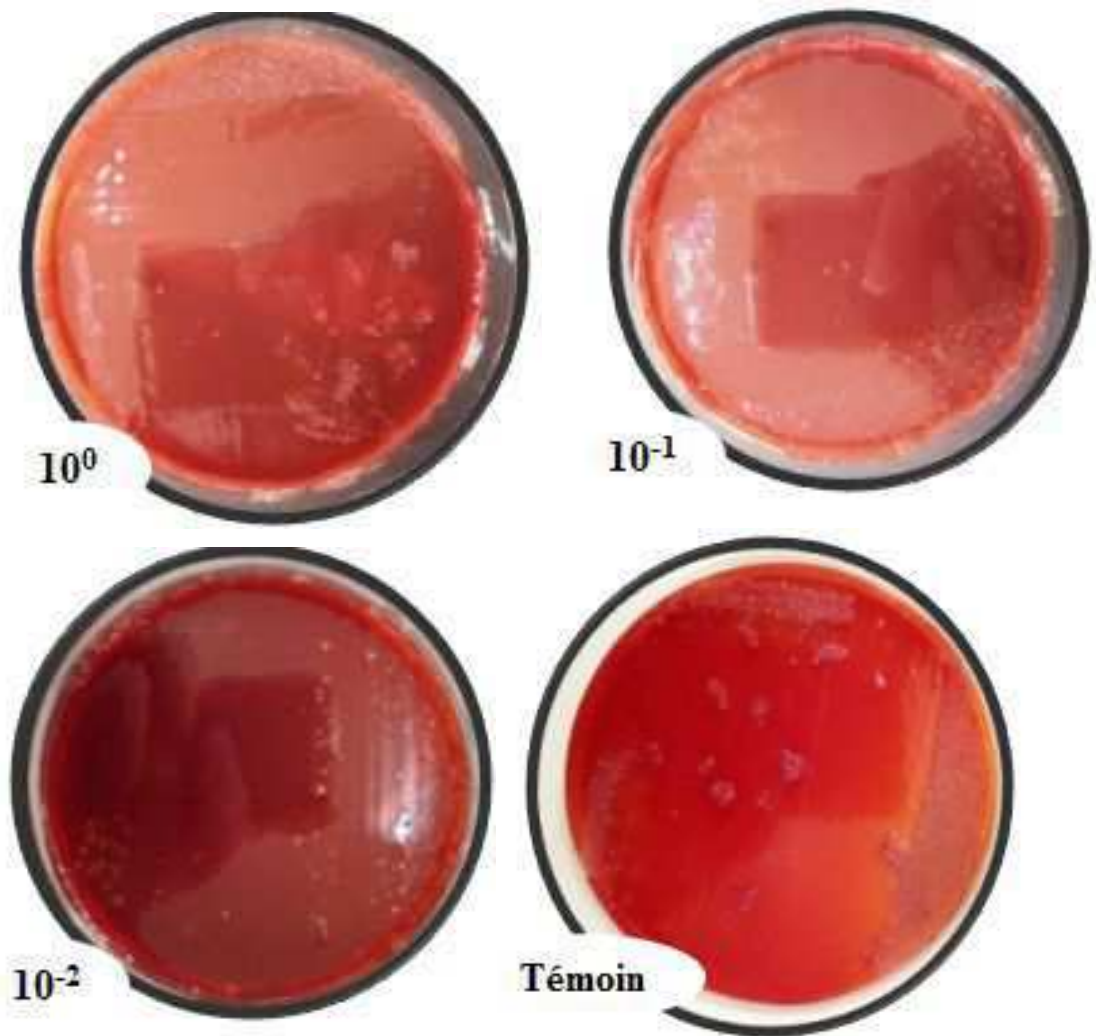


Figure 11: les boîtes contiennent l'antibiotique Imipenème (8 mg/l) après l'ensemencement du prélèvement d'eau usée hospitalier, avec une boîte témoin.



Figure 12: Aspect macroscopique (réisolement) de la souche *Klebsiella pneumoniae* spp *pneumoniae* isolées sur gélose MacConkey additionné Imipenème (8 mg/l) (Référence de la souche 14).

Résultats

1.2. Aspect microscopique des isolats

Après coloration de Gram d'une souche isolée sur MacConkey l'observation microscopique a montré des bacilles d'une couleur rose à Gram négatif (**Figure 13**).

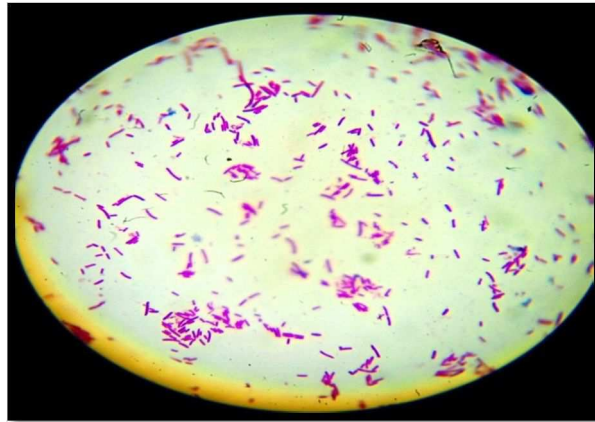


Figure 13: Observation microscopique ($\times 100$) après coloration de Gram d'une souche isolée (*Klebsiella pneumoniae* (Référence de la souche 14).

2. Identification des souches des entérobactéries isolées

L'identification des 25 souches d'entérobactéries isolées dans notre étude a été effectuée biochimiquement par système Api 20E les résultats sont montrés dans les figures et le tableau suivants (**tableau 10**).



Figure 14: le résultat biochimique par Api 20 E de l'espèce *E.coli* 1 (référence de souche 9).



Figure 15: le résultat biochimique par Api 20 E de l'espèce *Serratia odorifera* 1 (référence de souche 20).

Résultats



Figure 16: le résultat biochimique par Api 20 E de l'espèce *K.pneumoniae spp pneumoniae* (référence de souche 14).

Tableau 10: Identification et biotypage selon le profil numérique des 25 souches d'entérobactéries isolées dans notre étude.

Référence de souches	Type des souches	Profil numérique
1	<i>Klebsiella pneumoniae spp pneumoniae</i>	5015673
2	<i>Escherichia coli 1</i>	5344672
3	<i>Escherichia coli 1</i>	5144572
4	<i>Serratia odorifera 1</i>	7347773
5	<i>Escherichia coli 1</i>	5144572
6	<i>Escherichia coli 1</i>	5344572
7	<i>Serratia odorifera</i>	5147771
8	<i>Klebsiella pneumoniae spp pneumoniae</i>	5215773
9	<i>Escherichia coli 1</i>	5144572
10	<i>Escherichia coli 1</i>	5344572
11	<i>Escherichia coli 1</i>	5144572
12	<i>Serratia odorifera 1</i>	7147773

Résultats

13	<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp <i>pneumoniae</i>	5215773
14	<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp <i>pneumoniae</i>	5235773
15	<i>Kluyvera</i> spp	7144573
16	<i>Escherichia coli</i> 1	5144572
17	<i>Kluyvera</i> spp	7344573
18	<i>Escherichia coli</i> 1	5144572
19	<i>Escherichia coli</i> 1	5344572
20	<i>Serratia odorifera</i> 1	7347773
21	<i>Escherichia coli</i> 1	5144572
22	<i>Kluyvera</i> spp	7344573
23	<i>Escherichia coli</i> 1	5344573
24	<i>Serratia odorifera</i> 1	7347773
25	<i>Escherichia coli</i> 1	5344572

Résultats

2.1. Isolement et identification des souches multirésistantes.

Le tableau suivant (**Tableau 11**) montre les différents prélèvements des eaux usées hospitaliers et les détails des cultures positives : type de milieu sélectif, le nombre de souches isolées et la nature de l'espèce bactérienne.

Tableau 11: Isolement et identification des souches multirésistantes selon le numéro de prélèvement

N° de prélèvement	Milieu Macconkey+ l'antibiotique	Nombre des souches isolées	L'espèce	La référence de la souche
1	Céfotaxime	1	<i>Klebsiella pneumoniae spp pneumoniae</i>	1
	Ertapénème	1	<i>Escherichia coli 1</i>	3
2	Céfotaxime	1	<i>Escherichia coli 1</i>	2
	Ertapénème	1	<i>Serratia odorifera 1</i>	4
3	Ertapénème	1	<i>Escherichia coli 1</i>	5
	Imipenème	1	<i>Serratia odorifera 1</i>	12
4	Ertapénème	1	<i>Escherichia coli 1</i>	6
	Imipenème	1	<i>Klebsiella pneumoniae spp pneumoniae</i>	13
	Colistine	1	<i>Escherichia coli 1</i>	19
5	Ertapénème	1	<i>Serratia odorifera 1</i>	7
	Imipenème	1	<i>Klebsiella pneumoniae spp pneumoniae</i>	14
	Colistine	1	<i>Serratia odorifera 1</i>	20
6	Ertapénème	1	<i>Klebsiella pneumoniae spp pneumoniae</i>	8
	Imipenème	1	<i>Kluyvera spp</i>	15
	Colistine	1	<i>Escherichia coli 1</i>	21
7	Ertapénème	1	<i>Escherichia coli 1</i>	9
	Imipenème	1	<i>Escherichia coli 1</i>	16
	Colistine	1	<i>Kluyvera spp</i>	22
8	Imipenème	1	<i>Escherichia coli 1</i>	10
	Colistine	1	<i>Escherichia coli 1</i>	23
9	Ertapénème	1	<i>Escherichia coli 1</i>	11
	Imipenème	1	<i>Kluyvera spp</i>	17
	Colistine	1	<i>Serratia odorifera 1</i>	24
10	Imipenème	1	<i>Escherichia coli 1</i>	18
	Colistine	1	<i>Escherichia coli 1</i>	25

Au total 25 souches d'entérobactéries ont été isolées dans cette étude, 9 souches ont été isolées à partir du milieu additionné d'ertapénème (36%), 7 souches à partir du milieu additionné d'imipenème (28%), et 7 souches à partir du milieu additionné de colistine (28%), et

Résultats

seulement 2 souches à partir du milieu additionné de céfotaxime (8%) parce que ce type de milieu a été utilisé seulement pour les deux premiers prélèvements, ensuite nous avons privilégié les milieux additionnés de carbapenemes parce que les souches qui résistent aux carbapenemes résistent souvent aux céphalosporine de troisième génération (8).

2.2. Distribution des entérobactéries selon les espèces

Parmi le totale des souches isolées l'espèce *Escherichia coli* 1 représente la fréquence la plus élevée (52%) avec un nombre 13 souches de la totalité 25 souches, puis la fréquence de l'espèce de *Serratia odorifera* 1 (20%) avec un nombre 5 souches isolées, et l'espèce *Klebsiella pneumoniae* spp *pneumoniae* (16%) (Figure 17).

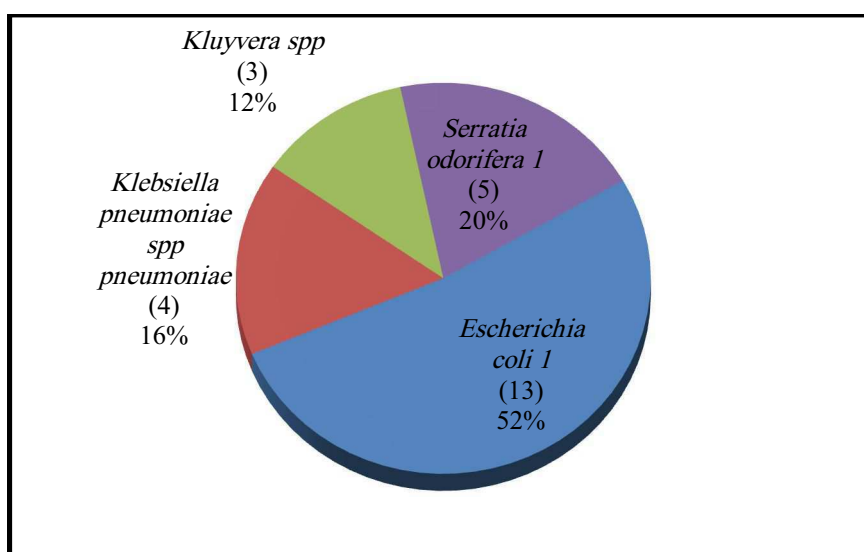


Figure 17: Distribution des entérobactéries selon les espèces.

2.3. Biotypage

2.3.1. Biotypage des souches d'*E. coli* 1 selon les profils numériques en API 20 E

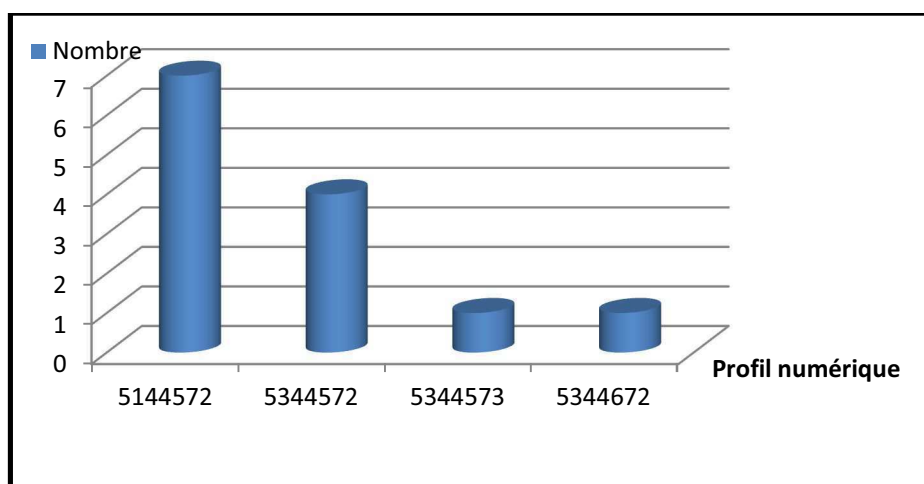


Figure 18: Fréquence des profils numériques en API 20E des souches d'*E. coli* 1.

Résultats

Les deux profils numériques les plus abondants sont 5144572 (7 souches) et 5344572 (4 souches).

2.3.2. Biotypage des souches de *Serratia odorifera* 1 selon les profils numériques en API20E

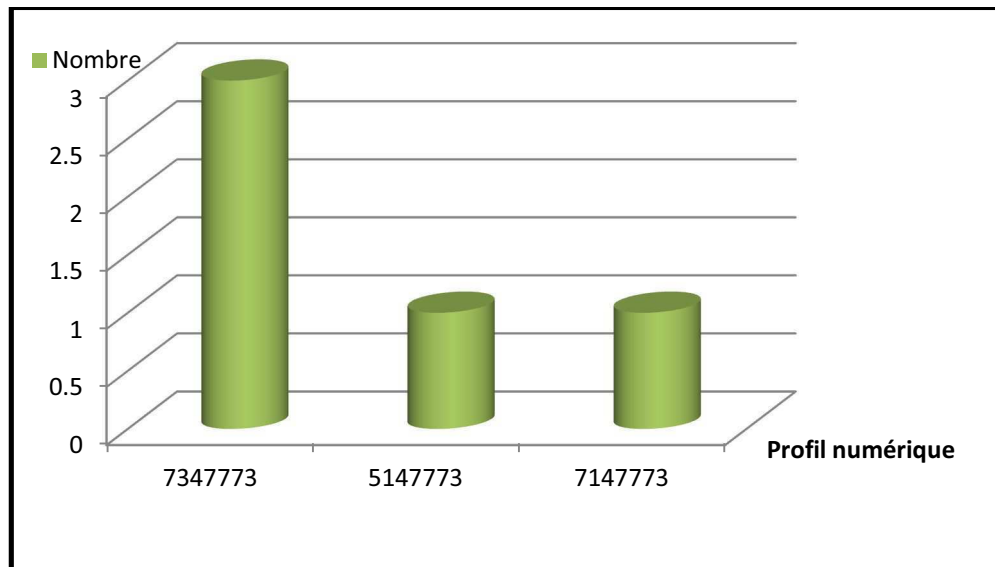


Figure 19: Fréquence des profils numériques en API 20E des souches de *Serratia odorifera* 1.

Le profil numérique le plus abondant est 7347773 (3 souches), suivis par les fréquences 5147773 et 7147773 (une souche).

2.3.3. Biotypage des souches de *K. pneumoniae* spp *pneumoniae* selon les profils numériques en API20E

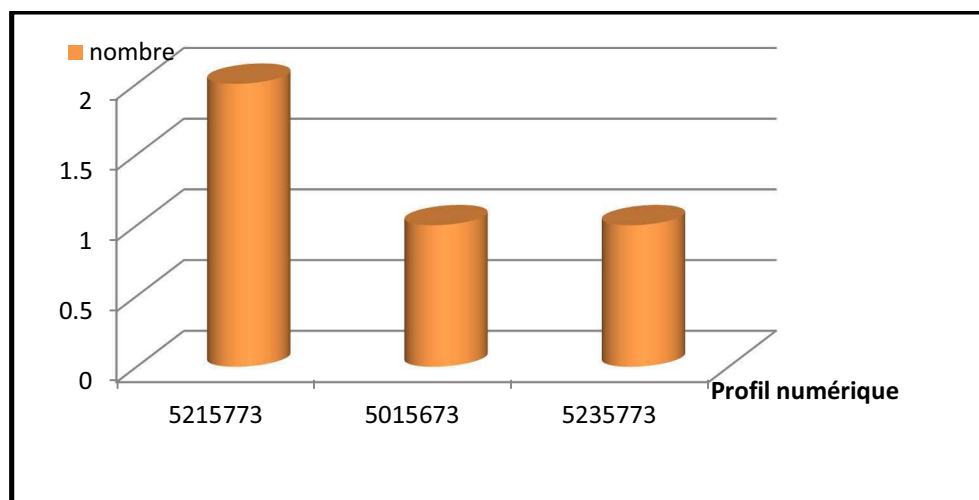


Figure 20: Fréquence des profils numériques en API 20E des souches de *K. pneumoniae* spp *pneumoniae*

Résultats

Le profil numérique le plus abandon est 5215773 (2 souches), suivis par les fréquences 5015673 et 5235773 (une souche) (**Figure 17**).

3. Résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques des souches d'entérobactéries isolées

3.1. Sensibilité des entérobactéries isolées aux antibiotiques

Les résultats de la sensibilité des de 25 souches isolées dans cette étude aux 11 antibiotiques testés selon les diamètres critiques de chaque antibiotique (**figure 21**).

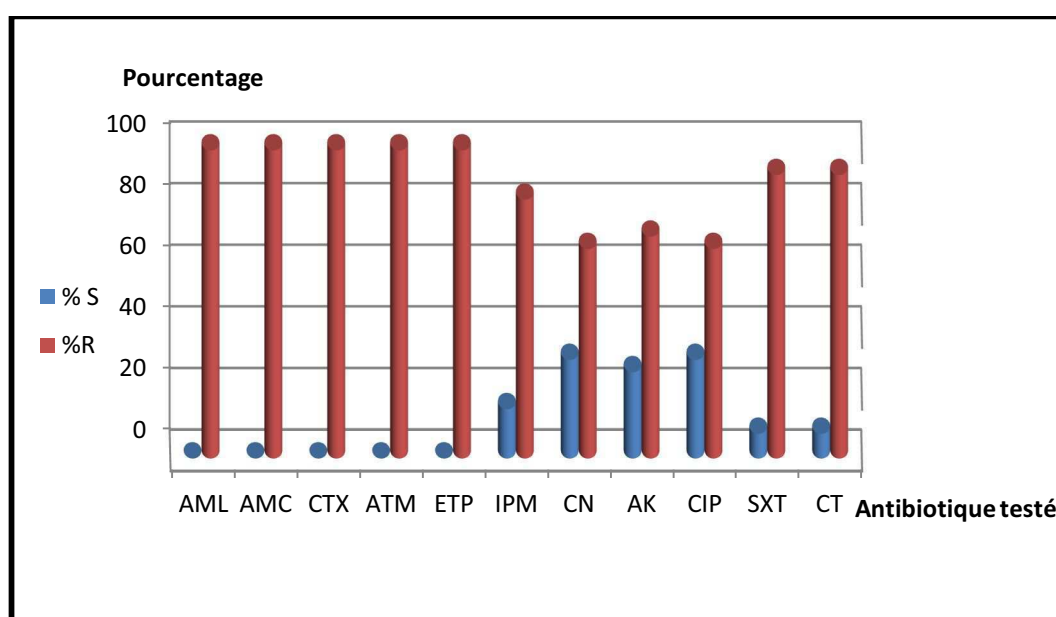


Figure 21 : Sensibilité aux antibiotiques des 25 souches isolées vis-à-vis les antibiotiques testés.

R : résistant, S : sensible.

Après l'étude de profil de résistance aux antibiotiques de 25 souches des *entérobactéries*, nous avons noté une résistance vis-à-vis tous des bêta-lactamines : Amoxicilline, Amoxicilline associé à l'acide clavulanique, Céfotaxime, Aztréonam (100%).

Concernant La résistance aux carbapénèmes nous avons remarqué que toutes les souches étaient résistantes à l'ertapénème (100%) et (84%) à l'imipénème.

Par ailleurs, une résistance remarquable pour les aminosides (Gentamicine 68% et l'Amikacine 72%), et une résistance pour les fluoroquinolones de 68%, et de 92% pour les Sulfamides et la colistine (Polymixines) (**Figure 22**), (**Figure 23**), (**Figure 24**).

Résultats

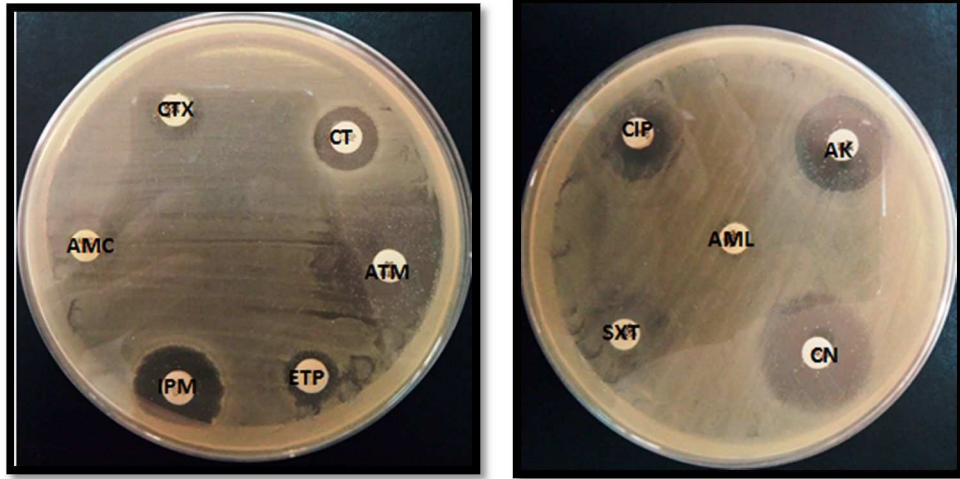


Figure 22 : l'antibiogramme de la souche *E. coli* 1 isolée (référence de la souche 25).

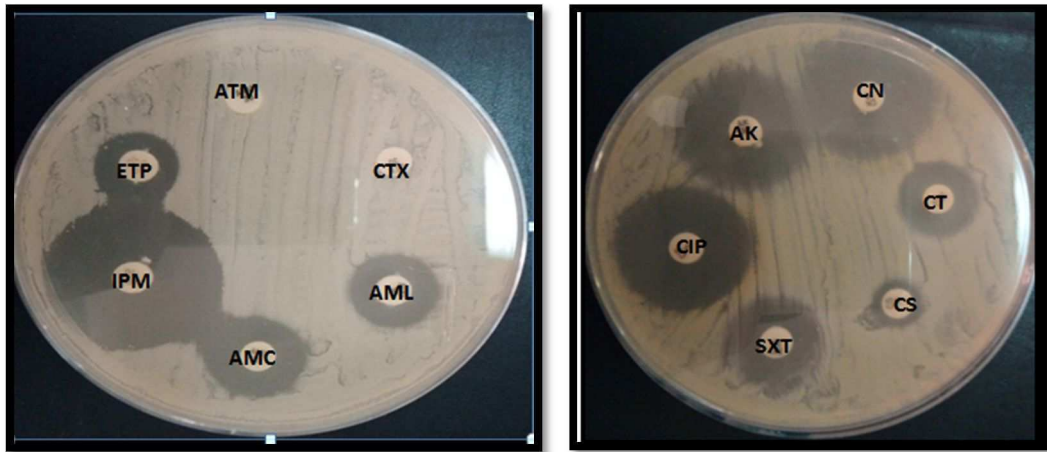


Figure 23 : l'antibiogramme de la souche *Serratia odorifera* 1 (référence de la souche 4).

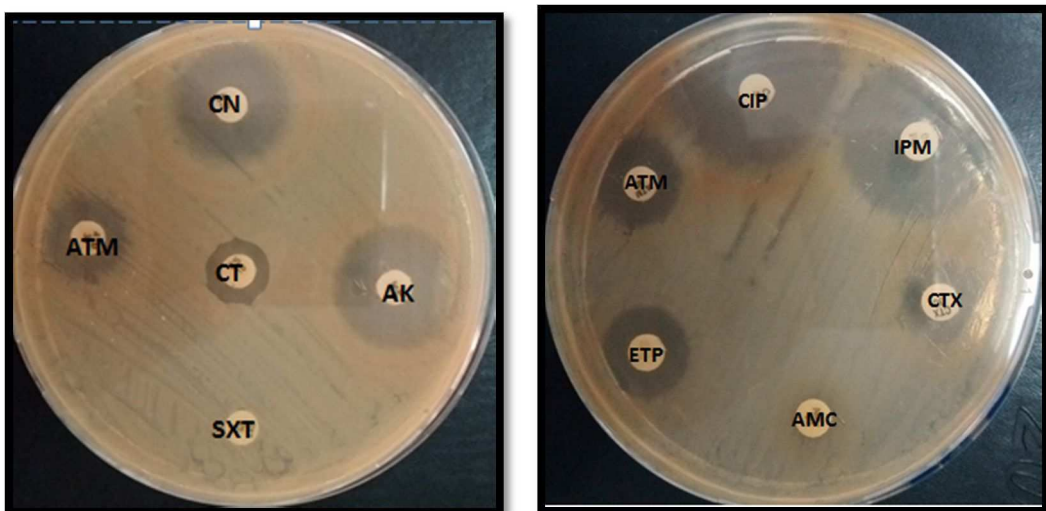


Figure 24 : l'antibiogramme de la souche *Klebsiella pneumoniae* spp *pneumoniae* (référence de la souche 14).

3.2. Sensibilité d'*E. coli* 1 aux antibiotiques testés

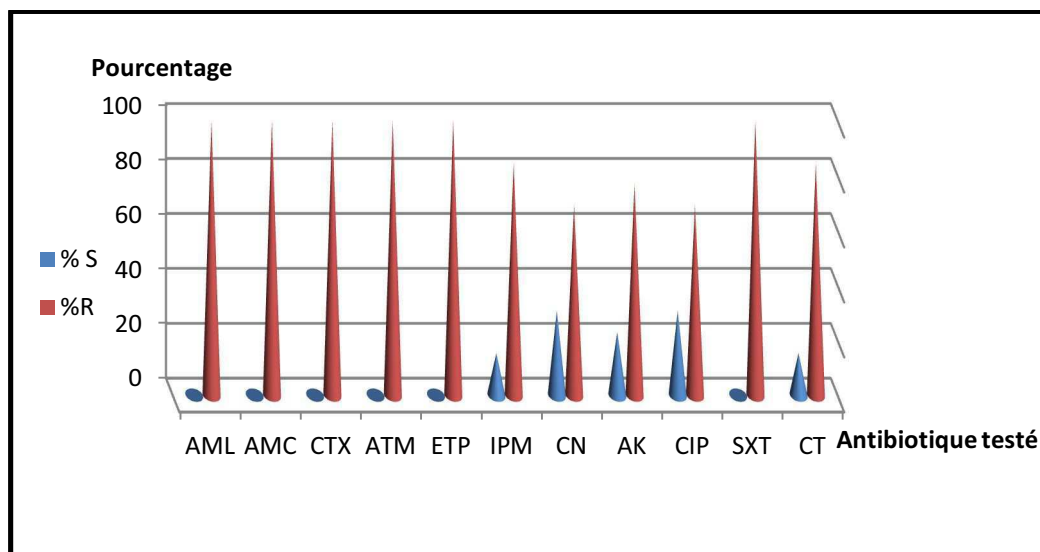


Figure 25 : Sensibilité des souches d'*E. coli* 1 aux antibiotiques testés.

R : résistant, S : sensible.

Les souches d'*E. coli* ont montré une résistance complète vis-à-vis l'amoxicilline, l'Amoxicilline + acide clavulanique, et aux Céfotaxime, Aztréonam, et Ertapénème (100%). Nous avons noté également une résistance totale pour les sulfamides (100%) 65% de résistance pour les aminosides, 69% de résistance aux quinolones et une résistance élevée de 84,61% pour la colistine.

3.3. Sensibilité de *Serratia odorifera* 1 aux antibiotiques testés

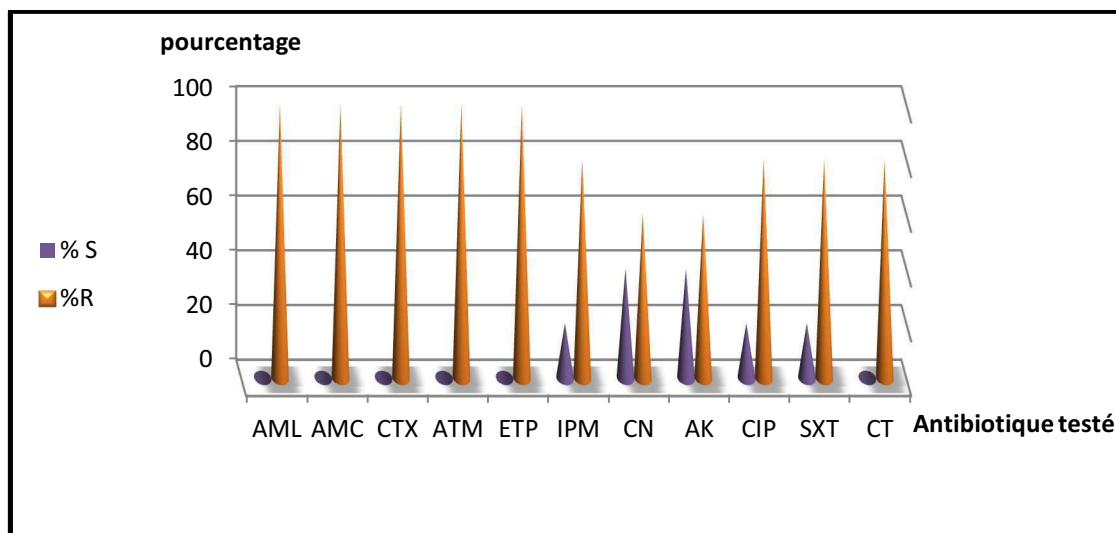


Figure 26: Sensibilité des souches de *Serratia odorifera* 1 aux antibiotiques testés.

R : résistant, S : sensible.

Résultats

Les souches de *Serratia odorifera* isolées étaient à 100% résistantes à l'Amoxicilline, Amoxicilline + acide clavulanique, Céfotaxime, Aztréonam, et Ertapénème. 80% des souches étaient résistantes à l'Imipénème. Ces souches ont enregistré également une résistance très élevée aux aminosides (60%), aux quinolones et aux sulfamides (80%) .

3.4. Sensibilité de *Klebsiella pneumoniae spp pneumoniae* aux antibiotiques testés

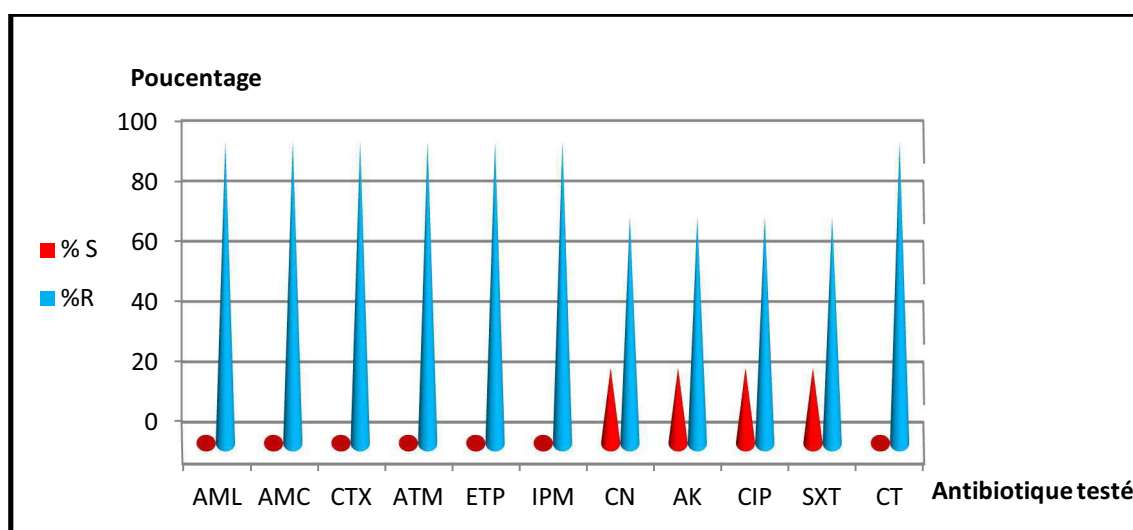


Figure 27 : Sensibilité des souches de *Klebsiella pneumoniae spp pneumoniae* aux antibiotiques testés, R : résistant, S : sensible.

La totalité des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées étaient résistantes à l'Amoxicilline, Amoxicilline + acide clavulanique, Céfotaxime, Aztréonam, et Ertapénème, et aussi à l'Imipénème. Ces souches ont enregistré également une résistance très élevée aux aminosides (75%) et aux sulfamides (80%), aussi aux quinolones (75%), avec une résistance totale pour la colistine (100%).

Discussion

Discussion

Les eaux usées des hôpitaux sont dangereuses pour la santé et l'environnement car elles contiennent probablement de nombreux types de polluants tels que des déchets radioactifs, chimiques et pharmaceutiques et des micro-organismes pathogènes. Le rejet d'eaux usées hospitalier dans l'environnement peut être un facteur important de la prolifération des pathogènes tels que la famille des *Enterobacteriaceae* dans l'environnement (69).

Des niveaux élevés d'antibiotiques sont généralement rejetés dans les déchets hospitaliers, suffisamment pour inhiber les bactéries sensibles et fournir un avantage sélectif aux bactéries résistantes, et la diffusion des bactéries multirésistantes aux antibiotiques (69), (49), (42).

A la région de Tébessa, il n'existe pas de données sur les entérobactéries multirésistantes d'origine effluente hospitalière. Les objectifs de cette étude consistaient à évaluer la résistance aux antibiotiques des souches d'*Enterobacteriaceae* isolées des effluents hospitaliers de l'hôpital de la ville de Tébessa, de mettre en évidence la prévalence des souches productrices de BLSE, de Carbapénémases et la résistantes à la colistine. Enfin, de comparer le niveau de résistance de ces souches avec d'autres cliniques isolée dans le même hôpital.

Notre étude a porté sur 25 souches d'*Enterobacteriaceae* collectées durant une période de 3 mois de Février à Avril 2018, à partir de prélèvements des eaux usées de l'hôpital Mère et Enfants Dr. Khaldi Abd Laziz à Tébessa.

Durant la période d'étude 10 prélèvements ont été analysés, on a isolé 25 souches des entérobactéries sur milieu Mac Conkey additionné de différents antibiotiques (Céfotaxime, Ertapénème, Imipenème, Colistine) en poudre en solution injectable utilisé par voie intraveineuse, pour la recherche des β lactamine à large spectre (BLSE), des Carbapénémases et la résistance à la colistine respectivement.

Dans notre étude nous avons trouvé que les souches isolées ont poussé sur milieu additionné d'Ertapénème d'un nombre 9 souches (36%) puis sur le milieu qui contenait de Imipenème de 7 souches (28%), et celui qui contenait de la Colistine de 7 souches aussi (28%). Ces résultats indiquent que les souches isolées des eaux usées hospitalières produisaient en grande partie des carbapénémases, ceci peut être due à l'utilisation massive des carabapénèmes à l'hôpital parce que ils sont de plus en plus utilisés dans le monde entier car c'est souvent le médicament de dernier recours pour traiter les infections graves causées par les entérobactéries productrices de BLSE (52), (44).

Dans notre étude l'espèce *Escherichia coli* présentait 52% de l'ensemble des entérobactéries isolées, ce résultat est très proche à celui trouvé en Pologne (49,3%) en 2013 par

Korzeniewska et al (43). Par ailleurs, il est plus élevé de celui trouvé en France (19%) par Hocquet et al en (38), et en Côte d'Ivoire (34,7%) par Guessennd. J et al en 2013 (35), mais il reste plus bas par rapport aux études présentées, parmi Varela et al en 2015 au Portugal et Galvin S et al en 2010 en Irlande, et Martins et al en 2016 en Afrique du sud qui ont trouvé 100% des entérobactéries isolées présentées par l'espèce *Escherichia coli* (26), (47), (68).

Une fréquence 20% de l'espèce *Serratia odorifera* a été enregistré dans notre étude cette bactérie a été déjà décrite dans les effluents hospitaliers lors d'une étude réalisée à Al-Madinah Al-Mounwwarah par Atef M.Diab et al en 2008 (5), par contre la majorité des études ont rapporté l'espèce *Serratia marcescens* comme représentant du genre comme celle au Poland de fréquence (1,3%) (43). Ce résultat semble logique parce que le genre *Serratia* est connue par sa haute résistance au stress environnemental, particulièrement aux agents antiseptiques qu'on trouve dans les eaux usées hospitalières (58), (57).

Concernant l'espèce *Klebsiella pneumoniae*, elle constituait 16% de l'ensemble des entérobactéries isolées dans notre étude. Cette fréquence est proche de celle rapportée au Brésil (26%) en 2008 à partir des effluents hospitaliers par Prado T et al (58), plus basse par rapport à ce qui a été trouvé en Côte d'Ivoire (32,7%) ; le pourcentage le plus élevé qui été enregistré en 2013 par Guessennd. J. al à partir d'un prélèvement des effluents et boues d'une station d'épuration d'hôpital de la ville d'Abidjan (35), par contre la fréquence la plus basse a été enregistré en Pologne (8%) la même année par Korzeniewska et al (43).

Dans la présente étude les entérobactéries isolées avaient une résistance remarquable aux bêta-lactamines : la majorité de nos souches étaient résistantes à l'amoxicilline, à l'amoxicilline + acide clavulanique et résistance aux Céphalosporine de 3^{ème} génération (C3G) (Cefotaxime) et Aztrioname (100%) Ce qui indique notre prévalence de production de bêtalactamase à spectre étendu (BLSE), ce résultat est très proche à celui trouvé en Polangne (95,2) (43). Par ailleurs nos résultats sont très élevés à ceux rapportés en Portugal : une résistance à la céfotaxime de 22%, à l'amoxicilline + acide clavulanique 43,5%, et pour Aztrioname 21,3% (3). Pa ailleurs, nous avons trouvé une fréquence de 100% de résistance à l'értapeneme, et 84% de résistance au l'imipenème ; ce qui constitue un taux très élevé de production de de carbpenemases.

La résistance aux sulfamides et fluoroquinolones sont respectivement 68%, et 92%, qui sont des fréquences très élevée par rapport à celle trouvées au Portugal 21.1% et 14,1% pour sulfamides et fluoroquinolones respectivement à partir d'un prélèvement des eaux usées hospitaliers en 2015 (3). On a détecté également une résistance à la colistine de 92% incluant aussi les souches de *Serratia odorifera* qui est naturellement résistantes à ce médicament de

dernier recours, ce résultat confirme ce qui a été rapporté par Liu YY al en 2016 en Chine **(45)**, **(64)**.

La totalité des souches de *Esherichia coli* isolées dans notre étude ont montré une résistance vis-à-vis de molécules suivantes : l'amoxicilline, à l'amoxicilline + acide clavulanique et résistance aux C3G (100%) ce qui indique notre taux de production de BLSE. Ce résultat est très élevé par rapport au taux de résistance au C3G de 55,6% rapportée en 'Afrique du sud **(47)**. Notre taux de résistance aux cabapénèmes (100% à l'ertapénème et 80% à l'imipénème) ces résultats contredient ceux en Tunisie et en Côte d'Ivoire qui ont montré que l'ertapénème et l'imipenème ne sont pas active sur les souches isolées *d'E.coli* isolées des éfflents hospitaliers **(35)**, **(50)**. Par ailleurs, juste une résistance de 3% des souches à l'imipénème a été enregistrée en Inde en 2012 par Diwan V et al **(23)**, **(27)**.

Nos souches *d'E.coli* marquent une résistance remarquable aux fuloroquinolones (65% à la ciprofloxacine) cela est plus bas du résultat trouvé à Alger (85%) par Anssour *et al* en 2016, et proche de celui rapporté en chine (69%) en Iran (63,8%) en en France (67%) **(4)**, **(5)**, **(62)**, **(38)**, et plus élevé de celui trouvé au cote d'ivoire (29,4%) **(35)**.

Dans la présente étude, nous avons remarqué une résistance alarmante à la colistine (84,61%). Cette résistance est très inquiétante car elle touche l'antibiotique de dernier choix pour le traitement des infections causées par *E. coli*. Cela est peut-être dû à l'expression du nouveau gène *mcr-1*, ce dernier a été déjà détecté lors d'une étude de dépistage de la présence d'entérobactéries résistantes à la colistine dans les eaux usées hospitalières en Chine en 2016 **(45)**.

Concernant les souches de *Serratia odorifera*, elles ont exprimé un taux de 100% de production de BLSE et de carbapénemases (100% de résistance à l'ertapénème), et de résistance 65% à l'imipénème ; un résultat plus bas par rapport aux souches isolées a Al-Madinah Al-Mounwwarah ou toutes les souches (100%) étaient résistantes à l'imipénème **(5)**. Ces souches ont exprimé également une résistance élevée aux autres familles d'antibiotiques (60% aux aminosides, 65% aux quinolones 65% 100 aux sulfamides) .

La totalité des souches de *Klebsiella pneumoniae* (100%) a exprimé produisait BLSE et des carbapénemases ; une fréquence est très élevée par rapport à celle trouvé en Brésil en 2017 (27,3% pour la résistance aux C3G et 5,4% pour la résistance au carbapénèmes) **(22)**, **(49)**. Nos souches isolées de *K.pneumoniae* ont marqué une résistance de 100% pour la colistine ; ce résultat confirme celui trouvé en chine en 2017 ou cette résistance était due à la présence du gène *mcr-1* **(24)**.

Notre étude portée sur les souches d'entérobactéries isolées des eaux usées hospitalières de l'hôpital mère et enfants Dr. Khaldie Abd Laziz à Tébessa a enregistré une résistances plus

Discussion

importante à l'ensemble des antimicrobiens par rapport à une étude antérieure réalisée en 2017 par Salem W et al ,mais qui portait sur les souches d'entérobactéries isolée à partir de prélèvements bactériologiques à visée diagnostique reçus au laboratoire de bactériologie du même hôpital, spécifiquement le taux de résistance aux carbapénèmes de 100% enregistré dans notre étude qui contredit ce qui a été trouvé chez les souches cliniques ou toutes les souches étaient sensibles à ces médicaments **(63)**. Par ailleurs, dans notre étude nous avons trouvé une co-résistance des souches d'entérobactéries productrices de BLSE avec les aminosides et les quinolones d'une fréquence de 65%, et 90% de co-résistance aux sulfamides. Ces fréquences sont très élevés par rapport à ce qui a été trouvé chez les souches cliniques (un taux de 30% avec les aminosides, 25% avec les quinolones et seulement 10% avec les sulfamides) **(63)**. Ces phénotypes multirésistants limitent davantage les options thérapeutiques des infections causées par ces bactéries.

La majorité des souches cliniques d'entérobactéries multirésistantes isolées dans la présente étude ont été diagnostiquées dans les urines (68.88%) qui sont inévitablement jetés dans les toilettes et dans le réseau d'eaux usées, ce confirme le taux élevé d'entérobactéries multirésistantes isolées des eaux usées hospitalières du même hôpital dans notre étude **(63)**.

Nos résultat montrent que des mutations chez les souches d'entérobactéries sensibles qui deviennent résistantes dans le milieu liquide d'eau usées hospitalières car c'est environnement riche en nutriments et qui favorise des conditions optimales pour le transfert horizontal de gènes, ce qui implique fréquemment le passage de plasmides et de transposons codant pour la résistance aux antibiotiques **(70), (36), (34), (12)**.

En définitif, les eaux usées hospitalières sont dangereuses pour la santé, car elles véhiculent des micro-organismes pathogènes dans l'environnement et constituent est un habitat potentiel des gènes de résistance présents sur les éléments génétiques mobiles des bactéries qui sont facilement transférés à d'autres bactéries à proximité.

Conclusion

Conclusion

Les résultats de cette étude révèlent d'abord une certaine diversité pour les espèces d'entérobactéries identifiées, l'analyse bactériologique de 10 prélèvements d'effluent hospitaliers a permis d'isoler 25 souches d'entérobactéries. L'identification de ces souches bactériennes a montré la prédominance de l'espèce *Escherichia coli* suivie par *Serratia odorifera*, *K. pneumoniae* et *Klyuvera spp*; des pathogènes opportunistes qui colonisent souvent les effluents hospitaliers qui constituent un milieu de culture riche pour la prolifération des entérobactéries.

Les tests de la sensibilité aux antibiotiques ont montré un taux élevé de résistance aux principales familles d'antibiotiques (béta-lactamines, aminosides, quinolones, Sulfamides, et polymixine) qui était la plupart du temps simultanée, avec une prédominance de souches résistantes aux céphalosporines de troisième génération, aux carbapénèmes, qui peut être due à l'acquisition d'un plasmide portant une β -lactamase à spectre étendu et des Carbapénémases.

Par ailleurs, Dans notre étude nous avons remarqué une augmentation dans le taux de résistance chez les souches isolées des eaux usées hospitalières spécifiquement la résistance aux carbapénèmes et à la colistine qui était nulle. Chez les souches cliniques isolées à partir de produits pathologiques au niveau du même hôpital a en 2017.

Finalement, Nos résultats ont montré la présence des entérobactéries multi-résistances dans les effluents hospitaliers, d'où le risque potentiel de la dissémination et du transfert des bactéries et ses gènes de résistance aux antibiotiques dans l'environnement car ces effluents sont souvent rejetés dans les égouts, les rivières, les lacs et les mers sans traitement préalable.

Dans ce sens, l'installation de dispositifs de traitement adéquats et une réglementation stricte régissant leur élimination est nécessaire, pourrait contribuer à réduire l'impact de la résistance aux antibiotiques.

Perspectives

Perspectives

Comme perspective pour ce travail, nous croyons qu'il est important de :

- Étudier les gènes responsables de ces résistances pour mieux comprendre les mécanismes de résistances aux antibiotiques testés par des techniques de biologie moléculaire.
- Identifier le support génétique (chromosomique ou plasmidique) de ces gènes afin de voir les possibilités de transfert entre les bactéries par des expériences de conjugaison bactérienne.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Abbas M., Cherkaoui C., Fankhauser J., Schrenzel S., Harbarth.** 2012. Carbapénémases: implications cliniques et épidémiologiques pour la Suisse. *Rev Med Suisse* .8: 882-9.
2. **AHA.** 1986. Hospital Statistics American Hospital Association, Chicago.Pp: 250.
3. **Amador PP., Alain H., Edward T.** 2015. Résistance aux antibiotiques dans les eaux usées : apparition et devenir des producteurs de Enterobacteriaceae des β -lactamases de classe A et de classe C *Journal of Environmental Science and Health, Part A* ,Vol. 50, Issue 1, 26-39.
4. **Anssour L., Messai Y., Vanesa E., Carmen T., Rabah B.** 2016. Characteristics of ciprofloxacin-resistant Enterobacteriaceae isolates recovered from wastewater of an Algerian hospital. Antimicrobial resistance in hospital effluents *Journal of Infection in Developing Countries*; 10(7):728-734.
5. **Atef M, Diab I.,Mohamed K. Ibrahim &Khalid D. Al-Zhrany .** 2008. Tracing of Gram-negative antibiotic-resistant bacteria in hospitals final effluent at Al-Madinah Al-Mounwwarah. *Journal of Taibah University for Science*, Vol 1, pages 24-33.
6. **Baba Ahmed-Kazi., Tani Z., Decré D., N Genel., Boucherit-Otmani Z., Arlet G., Drissi M.**2013. Molecular and epidemiological characterization of enterobacterial multidrug-resistant strains in Tlemcen Hospital (Algeria). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23301522>
7. **Baba Ahmed-Kazi., Tani Z., Arlet G.** 2014. News of antibiotic resistance among Gram-negative bacilli in Algeria. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24819127>
8. **Belbel Z.** 2017. Etude Bactériologique et Moléculaire de Klebsiella pneumoniae : Support génétique de la résistance aux antibiotiques des souches isolées en Algérie. ISBN :978-3639653304.
9. **Bernet S., Fines M.** 2000. Effluents du CHU de CAEN : Etude qualitative et quantitative de la flore microbienne et recherche de bactéries multirésistantes. Poster. Quatrième journée du Réseau Régional d'Hygiène de Basse-Normandie, Caen. 1p.
10. **Boone D.R, Garrity G.** 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria.* 2nd Edition. Pp. 721
11. **Bossert I., Young L.** 1986. Anaerobic oxidation of Paracresol by a denitrifying bacterium. *Applied and environmental Microbiology.* 52 (5) : 1117-1122.

Références bibliographiques

12. **Boyer C.** 2013. Lutte contre les bactéries multirésistantes en ville: état des lieux et moyens mis en œuvre après une hospitalisation. Université Paris Diderot - Paris 7. Faculté De Médecine. Pp 92.
13. **Brigitte S.** 2006. Biologie- microbiologie. ellipse: paris. Pp: 273- 275.
14. **Bryskier A.** 1999. Fluoroquinolones (1). Classification, propriétés physicochimiques, activités antibactériennes et pharmacocinétiques. Encyclo Méd Chir, Maladies infectieuses, 8004-B-10.
15. **Bush K., Jacoby G., and Medeiros A.** 1995. A Functional Classification Scheme for Beta-lactamases and Its Correlation with Molecular Structure, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39, no. 6: 1211–1233.
16. **Boillot C.** 2008. "Évaluation des risques écotoxicologiques liés aux rejets d'effluents hospitaliers dans les milieux aquatiques. Contribution à l'amélioration de la phase «caractérisation des effets»," INSA 0021 de Lyon.
17. **Camille D.** 2010. Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux.2^e Edition. PP: 87-95.
18. **Carbonnelle B. Denis F. Marmonier A.** 1987. Bactériologie Médicale: Techniques usuelles. SIMEP SA, Paris. Pp:121-137, 146-155
19. **Catherine G, Jacques B.** 2005. Antibiotiques: pharmacologie et thérapeutique. ELSEVIER, Paris.PP: 18-19, 22-23.
20. **Cclin Paris-Nord .**1999. "Élimination des effluents liquides des établissements hospitaliers - Recommandations". Institut Biomédical des Cordeliers, Paris , 74p
21. **Chaby R.** 2010. Des endotoxines aux lipopolysaccharides. Edition lavoisier. PP: 38-39.
22. **Conte D., Palmeiro JK .,da Silva Nogueira K., de Lima TM., Cardoso MA., Pontarolo R., Degaut Pontes FL., Dalla-Costa LM.** 2017.Characterization of CTX-M enzymes, quinolone resistance determinants, and antimicrobial residues from hospital sewage, wastewater treatment plant, and river water. *Ecotoxicol Environ Saf.* Feb; 136:62-69.
23. **Diwan V., Chandran SP., Tamhankar AJ., Stålsby Lundborg C., Macaden R.** 2012. Identification of extended-spectrum β -lactamase and quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from hospital wastewater from central India. *J Antimicrob Chemother.* Apr; 67(4):857-9.
24. **Feifei Zhao.,Jean-Paul Brion., Marie-Reine Mallaret., Richard Bonnet., Frédéric Robin.** 2017. IncP Plasmid Carrying Colistin Resistance Gene mcr-1 in *Klebsiella pneumoniae* from Hospital Sewage.*Antimicrob Agents Chemother; England Journal of Medicine* 352, no. 4: 380–391

Références bibliographiques

25. **François D. Marie-Cécil P. Christian M, Edouard B. Ronald Q.** Bactériologie Médicale Techniques usuelles. 2^{ém} édition, ELSEVIER. Pp 540.
26. **Galvin S., Boyle F.** 2010. Enumeration and characterization of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* bacteria in effluent from municipal, hospital, and secondary treatment facility sources. *Appl Environ Microbiol.* Jul; 76(14):4772-9.
27. **Garcia S., Wade B., Bauer C., Craig C., Nakaoka K., Lorowitz W.** 2007. L'effet du traitement des eaux usées sur la résistance aux antibiotiques chez *Escherichia coli* et *Enterococcus* sp . *Water Environ Res* , 79(12): 2387 à 95. [[PubMed](#)]
28. **Gazengel J. Orecchioni A.** 2013. le préparateur en pharmacie. 2^{em} Edition. PP:273-344.
29. **George A. Jacoby and Luisa Silvia .Munoz-Price.** 2005, “The New β -Lactamases,” *New*
30. **Géorge L.** 2004. Pharmacologie fondamentale et clinique. 9^{ém} édition: Piccin:Paris. Pp: 733-735.
31. **Gerard J. Louise M. Tortora J.** 2012. Introduction à la microbiologie. 2^e Edition. PP: 238.
32. **Gerard J. berdell R. Christine L.** 2003. Introduction a la microbiologie. 1^{ém} Edition, RENOUVEAU PEDAGOGIQUE, Québec, Canada. Pp: 402-408, 875.
33. **Gerard J. berdell R. Christine L.** 2012. Introduction a la microbiologie. 2^{ém} Edition, RENOUVEAU PEDAGOGIQUE, Québec, Canada. Pp: 843-852.
34. **Gibold L, Robin F, Tan RN, Delmas J, Bonnet R.** Four-year epidemiological study of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in a French teaching hospital. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23927626>
35. **Guessennd. J., Appl. Biosci.** 2013. étude des bactéries multi résistantes des effluents hospitaliers de la ville d'Abidjan *Journal of Applied Biosciences* 69:5456 – 5464. ISSN 1997–5902.
36. **Guzmán-Blanco M., Labarca JA., Villegas MV., Gotuzzo E.** Extended spectrum β -lactamase producers among nosocomial Enterobacteriaceae in Latin America. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24389277>
37. **Hacene H.** 2016. Microbiologie fondamentale et appliquée. Tom 2. PP: 806.
38. **Hocquet D ., Muller A., Bertrand X.** 2016. What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems *Journal of Hospital Infection* 93, 395-402.
39. **Jacoby A., Mills Debra M., Chow N.** 2004. Role of β -lactamases and porins in Resistance to Ertapenem and other β -lactams in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobiol Agents And Chemotherapy*, 48: 3203-3206.

Références bibliographiques

40. **Jean F. Guy L. Michèle T.** Microbiologie générale et appliquée. Delagrave: Paris. Pp: 104.
41. **Jean R. Bernard L. Nicole M.** 2009. L'Analyse de l'eau. 9^{ém} édition, Dunod: Paris. 1600 p.
42. **Jestin E.** 2000. Les rejets liquides des établissements de sante-caractérisation à la source et impact sur l'environnement marin côtier, synthèse réalisée et complétée sur la base du travail de Florence Merrant Lebrun - Chargée d'études Environnement- Centre Hospitalier du Havre – CLIN – Club Environnement.
43. **Korzeniewska E., Harnisz MJ.** 2013. Beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in hospital effluents Environ Manage. Jul 15; 123:1-7.
44. **Lahlaoui H., Ben Haj Khalifa A., Ben Moussa M.** Epidémiologie des Enterobacteriaceae produisant des β -lactamases à spectre étendu de type CTX-M (BLSE).Tunis, Tunisie. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25234380>
45. **Liu YY., Wang Y., Gyoung-Hee Park., Lei-Miao Yin., Jun Ran., Yan-Yan Liu., Yong-Qing Yang.**2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis 16:161–168. doi:10.1016/S1473-3099(15)00424-7.[PubMed] [Cross Ref]
46. **Mandell GL. Bennett JE. Dolin R. Mandel I.** Principles and practice of infectious diseases. 6^{ém} édition: Elsevier, Churchill Livingstone éditeurs, USA.Édition en ligne. <http://www.ppidonline.com>.
47. **Martins A., Adefisoye.** 2016. Identification and antimicrobial resistance prevalence of pathogenic *Escherichia coli* strains from treated wastewater effluents in Eastern Cape, South Africa. Microbiologyopen.; 5(1):143-51.
48. **Meyer J. Deiam A.** 2008.course de microbiologie générale 2^{ém} édition, doin:paris.Pp: 250-251.
49. **Moges F., Endris M., Belyhun Y., Worku W.** 2014. Isolement et caractérisation de pathogènes bactériens multirésistants aux médicaments provenant des eaux usées dans des environnements hospitaliers et non hospitaliers, nord-ouest de l'Éthiopie . BMC Res Notes , 7 : 215. [Article gratuit PMC] [PubMed]
50. **Nasri E.,Subirats J., Sánchez-Melsió A., Mansour HB., Borrego CM., Balcázar JL.**2017. Abundance of carbapenemase genes (blaKPC, blaNDM and blaOXA-48) in wastewater effluents from Tunisian hospitals. Environmental Pollution 229 371-374.
51. **Nordmann P., Carrer A.** 2010. [Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*].4:154-162

Références bibliographiques

52. Nordmann P., Cuzon G., Naas T. 2009. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect. Dis.* 9:228-236.
53. OMS (ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE). 1994. Directives de qualité de l'eau de boisson, 2è ed., Vol. 1: Recommandations, OMS, Genève. Pp: 8-30.
54. Patrice C. 2007. Bacterial antibiotic resistance: combinations of biochemical and genetic mechanisms. *Bull. Acad. Vét. France* — 2008 - Tome 161 - N°1.
55. Pierre et Marie C. 2003. Bactériologie. Service de Bactériologie. Pp :62
56. Pilet C. Bourdon J.L. Toma B. 1979. *Les Entérobactéries* : Bactériologie médicale et vétérinaire : systématique bactérienne. Doins, Paris. Pp: 109-187
57. Poirel L., Benouda A., Hays C., and Nordmann P. 2011. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Morocco. *J. Antimicrob. Chemother.* 66:2781-2783.
58. Prado T., Pereira WC., Silva DM., Seki LM., Carvalho AP., Asensi MD. 2008. Detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. *Lett Appl Microbiol.* (1):136-41.
59. Prescott W. Sherwood. Woolverton. 2010. *Microbiologie*. 3^{ème} Edition, Boeck: Paris .PP:852.
60. Prescott W. Sherwood. Woolverton. 2013. *Microbiologie*. 4^e Edition. PP: 536,539.
61. Prescott. Harley. Klein. 2003. *MICROBIOLOGIE*. 2^e éme édition, Boeck: Paris .PP: 506-509.
62. Reza R., Omid F. 2017. The Prevalence of Plasmid-mediated Quinolone Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolated from Hospital Wastewater Sources in Tehran, Iran. *Iran J Public Health.*;46(9):1285-1291.
63. Salem W. Abidat M. 2017. Profil de résistance aux antibiotiques des *Enterobacteriaceae* isolées des infections nosocomiales. Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master. Université de Tébessa. p83.
64. Sangare SA., Maiga AI., Guindo I., Maiga A., Camara N., Savadogo S., Diallo S., Bougoudogo F., Armand-Lefevre L., Andremont A., Maiga II. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase phenotypes in enterobacteria isolated from blood cultures of patients at admission to the University Hospital of Bamako. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28655678>
65. Soussy CJ. 2015. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. http://nosobase.chulyon.fr/recommandations/sfm/2015_antibiotiques_casf m.

Références bibliographiques

66. Sylvie Carle.2009. La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important. Le parrainage des antimicrobiens : vision 2010 Pharmactuel Vol. 42.
67. Tony H. Paul S. 1997. Atlas de poche de microbiologie. 1^{ère} édition, Flammarion: PARIS. PP: 112.
68. Varela AR., Macedo GN., Nunes OC., Manaia CM. 2015. Genetic characterization of fluoroquinolone resistant *Escherichia coli* from urban streams and municipal and hospital effluents *FEMS Microbiology Ecology*, , Vol. 91, No. 5.
69. Wang A., Yang Y., Lu Q .,Wang Y., Chen Y., Deng L., Wang A., Deng Q., Zhang H., Wang C., Liu L., Xu X., Wang L., Shen X. (2008). Présence de gène qnr chez *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* résistant à la ciprofloxacine isolée de patients pédiatriques en Chine. BMC Infect Dis , 8 : 68. [[Article gratuit PMC](#)] [[PubMed](#)]
70. Yang CM., Lin MF., Liao PC. 2009. Comparaison des profils de résistance aux antimicrobiens entre les souches cliniques et les souches d'eaux usées dans un hôpital régional de Taiwan. Lett Appl Microbiol , 48 : 560-5. [[PubMed](#)]
71. Yvon Michel-Briand. 2012. Aspect de la résistance bactérienne aux antibiotiques. PP: 12-13.

Annexes

Annexe 1

 **Composition chimique du milieu sélectif :**

◆ **Gélose de MacConkey :**

Formule en g/L d'eau distillée :

Peptone de caséine.....	17
Peptone de viande.....	3
Sels biliaires.....	1,5
Cristal violet.....	0,001
Lactose.....	10
Rouge neutre.....	0,03
NaCl.....	5
Agar.....	13,5
pH =	7,1

◆ **Gélose de VRBL:**

Formule en g/L d'eau distillée :

Peptone.....	7
Extrait de levure.....	3
Lactose.....	10
Chlorure de sodium.....	5
Mélange sel biliaire.....	1,5
Cristal violet.....	0,002
Rouge neutre.....	0,03
Agar-agar.....	15
pH.....	7,4

Annexes

Annexe 2

	5144572	5344572	5344573	5344672	5215773	5015673	5235773	7347773	5147773	7147773	7144573	7344573
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
LDC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ODC	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
CIT	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UREE	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
IND	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
GEL	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INO	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
SOR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RHA	+	+	+	=	+	+	+	+	+	+	+	+
SAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MEL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AMY	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
ARA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Annexe 3

api® 20 E BIOMÉRIEUX

CE 07223 C REF.: 9

Origine / Source / Herkunft /
Origen / Origen / Προέλευση /
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+									
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	
ONPG	ADH	LDC	ODC	LGIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	LVP	LGEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO ₂	N ₂	MOB	McC	OF-0	
5		1			4			4			5			7			2									

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση : 09

Profil numérique de *E.coli*

api® 20 E BIOMÉRIEUX

CE 07223 C REF.: 24

Origine / Source / Herkunft /
Origen / Origen / Προέλευση /
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+								
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2		
ONPG	ADH	LDC	ODC	LGIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	LVP	LGEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO ₂	N ₂	MOB	McC	OF-0	OF-F	
7		3			4			7			7			7			3										

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση : 04

Profil numérique de *Serratia odorifera* 1

CE 07223 C REF.: 13

Origine / Source / Herkunft /
 Origen / Origen / Προέλευση /
 Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

BIOMÉRIEUX

+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+											
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4										
ONPG	ADH	LDC	ODC	LCIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	LVP	LGEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX										
5					2			1			5			7			7			3										

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
 Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
 Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
 Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση :
 13

Profil numérique de *K. pneumoniae* spp *pneumoniae*

CE 07223 C REF.: 15

Origine / Source / Herkunft /
 Origen / Origen / Προέλευση /
 Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

BIOMÉRIEUX

+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+									
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4								
ONPG	ADH	LDC	ODC	LCIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	LVP	LGEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX								
7			1			4			4			5			7			3										

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
 Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
 Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
 Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση :
 15

Profil numérique de *Klyuvera* spp