



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Larbi Tébessi-Tébessa-
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : Biologie Appliquée

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Option : Microbiologie appliquée

Thème:

***Isolement des entérobactéries productrices
des carbapénèmases à partir des eaux
usées hospitalières de Tébessa***

Présenté par :

Djellab Wafa

Larfi Aya

Nessaibia Souha

Mechai Abdelbasset

MCA U.de Tébessa

Président

Belbel Zineb

MCB U.de Tébessa

Promotrice

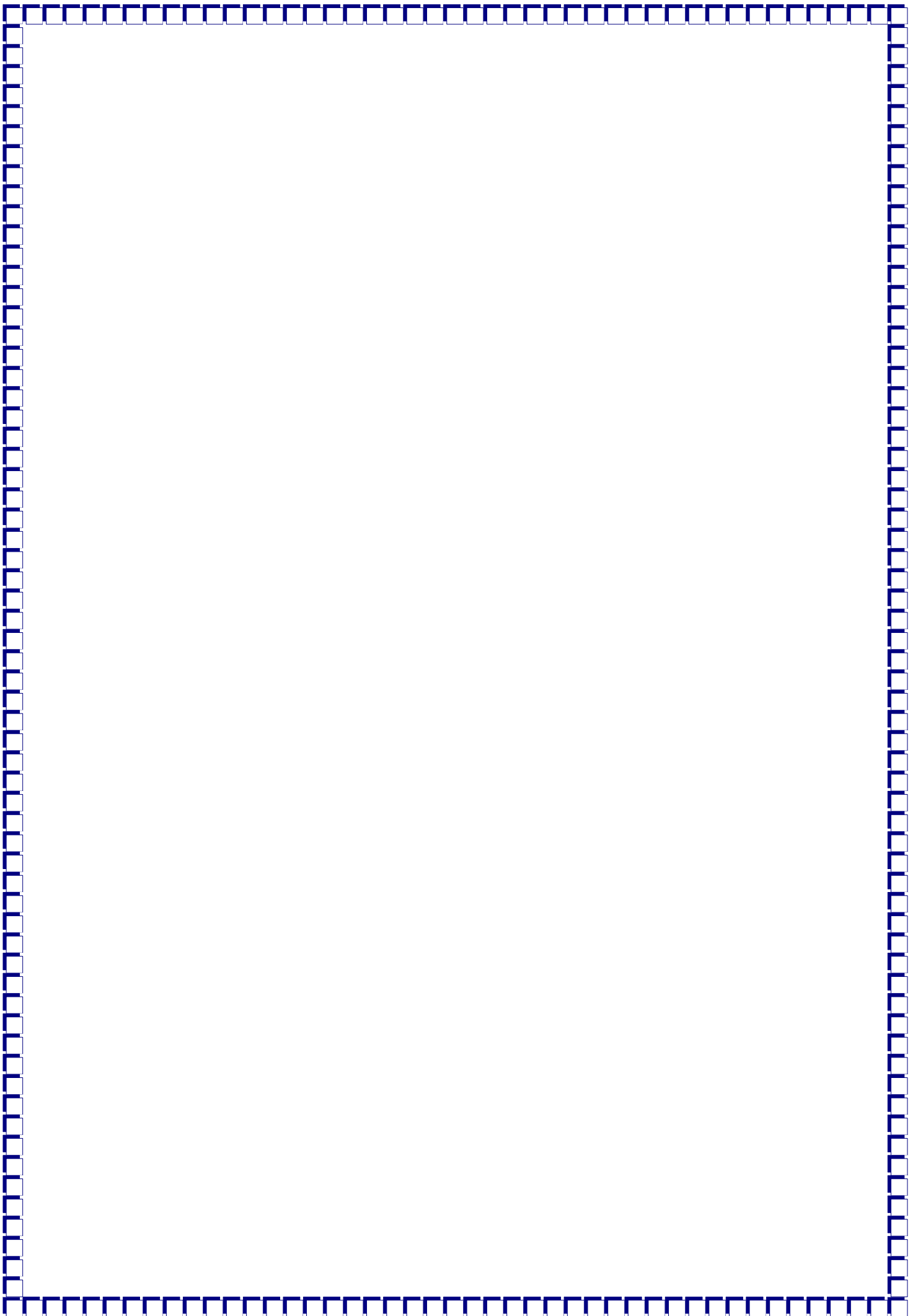
Debabza Manel

MCA U.de Tébessa

Examinatrice

Date de soutenance : 19/06/2019

Année universitaire : 2018/2019



ملخص

تمثل المخلفات السائلة الناتجة عن نشاط المستشفى مصدراً محتملاً للبكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية المتعددة--وخاصة *entérobactérie* ، وبالتالي تشكل خطراً على صحة الإنسان. كان الهدف من هذه الدراسة هو تحديد التعرف على *entérobactéries* المنتجة للكاربابينيمات المعزولة من مياه الصرف الصحي بالمستشفيات من مستشفى الأم والطفل خالد بن عبد العزيز من مدينة تبسة وتقييم مستويات مقاومتها للعائلات المختلفة من المضادات الحيوية.

أولاً ، تم أخذ 8 عينات لمدة 3 أشهر من المجمع النهائي لمياه الصرف الصحي في المستشفى. ثم تم ترشيح العينات وتجانسها. بعد ذلك ، تم إجراء عزل سلالات *entérobactéries* المنتجة للكاربابينيمز في وسط *macconkey* انتقائي مكمل بالمضادات الحيوية (إيميبينيم وإيرتابينيم). تم التعرف على العزلات عن طريق الاختبارات الكيميائية الحيوية باستخدام نظام مصغر API 20E. تم اختبار الحساسية للمضادات الحيوية عن طريق اختبار الحساسية للمضادات الحيوية باستخدام طريقة نشر القرص Muller Hinton وتم تحديد الحد الأدنى من التركيزات المثبطة *imipenem* وعائلات مختلفة من المضادات الحيوية بواسطة شرائط الاختبار.

في المجموع في مجموع، تم عزل 14 سلالة من *entérobactéries*، كشفت الهوية البيوكيميائية وجود مجموعة متنوعة من أنواع *entérobactéries* التي تستعمر النفايات في المستشفى مع هيمنة *Escherichie* $n=4$ و $n=4$ *selmonella arizone* أظهرت السلالات المعزولة مقاومة عالية جداً لجميع أنواع البيبتالاكتاماز ، عبرت غالبية هذه السلالات عن مقاومة للامينوغليكوسايدات، السلفوناميد و الكينولون أخيراً، توضح هذه الدراسة وجود *enterobacteries* المسببة للأمراض متعددة المقاومة في المياه السائلة التي يمكن أن تنتشر في البيئة، وفي نهاية المطاف ، من الضروري تركيب أجهزة معالجة مناسبة ، ولوائح صارمة للتحكم والتخلص منه.

الكلمات المفتاحية: نفايات المستشفيات ، *entérobactéries* ، مقاومة المضادات الحيوية ، الكاربابينيماتاز

Abstract

Abstract

The Effluents generated by the hospital activity represent a potential source of antibiotic resistant pathogenic germs, particularly enterobacteria, and thus constitute a danger to human health. The objective of this study was to identify enterobacteria producing carbapenemases isolated from hospital wastewater from the Kheldi Abd Laziz Mother and Children hospital in the City of Tébessa; to evaluate their levels of resistance to different families of antibiotics.

First, 10 samples were taken for a period of 3 months from the hospital's final wastewater collector. Then the samples were filtered and homogenized. Then, the isolation of multidrug resistant enterobacterial strains was carried out in mac Conkey selective medium with added antibiotic (imipenem, Ertapenem) the isolates were selected for biochemical tests by a miniaturized API 20E system. Antibiotic sensitivity was tested with an antibiogram with 13 antibiotics using the Mueller Hinton medium. Finally, The minimum inhibitory concentrations of imipenem and E-test strips determined different families of antibiotics.

A total of 14 enterobacterial strains were isolated, biochemical identification revealed a diversity of enterobacterial species that colonize hospital effluents; predominantly *Escherichia coli* (n=4) and *salmonella* (n=4). The isolated strains showed very high resistance to all beta-actamines; the majority of these strains expressed significant cross-resistance to aminosids, quinolons and sulfamids.

Finally, this study shows the presence of multi-resistant enterobacteria in hospital effluent that can spread to the environment. Finally, the installation of a device of management of pathological waste in the hospital and for the post-treatment of hospital effluents governs the disposal of these bacteria becomes indispensable.

Key words: Hospital effluents, *Enterobacteriaceae*, antibiotics resistant, carbapenemases

Résumé

Résumé

Les effluents générés par l'activité hospitalière représentent une source potentielle de bactéries pathogènes multirésistantes aux antibiotiques particulièrement les entérobactérie, constituant ainsi un danger pour la santé humaine. L'objectif de cette étude était d'identifier les entérobactéries productrices des carbapénèmases isolées à partir des eaux usées hospitalières de l'hôpital mère et enfant Kheldi AbdLaziz de la ville de Tébessa et d'évaluer leurs niveaux de résistance aux différentes familles d'antibiotiques.

D'abord 10 prélèvements ont été effectués durant 3 mois à partir du collecteur final des eaux usées de l'hôpital. Puis, les échantillons ont été filtrés et homogénéisés. Ensuite, l'isolement des souches d'entérobactéries productrices de carbapénèmases a été réalisé en milieu sélectif mac conkey additionné d'antibiotiques (imipenème et értapénème) en outre, Les isolats ont été identifiés par tests biochimiques utilisant le système miniaturisé API 20E. La sensibilité aux antibiotiques a été testée par un antibiogramme comportant 13 antibiotiques selon la méthode de diffusion des disques sur milieu Mueller Hinton an fin, les concentrations minimales inhibitrices de l'imipenème et différentes familles d'antibiotiques ont été déterminées par bandelettes E-test.

Au totale, 14 souches d'entérobactéries ont été sélectionnées, l'identification biochimique a révélé une diversité d'espèces d'entérobactéries qui colonisent les effluents hospitaliers avec prédominance d'*Escherichia coli* (n=4) et *Salmonella arizonae* (n=4). Les souches isolées ont montré une résistance très élevée à tous les bêtalactamines ; la majorité de ces souches ont exprimés une résistance croisée importante aux aminosides, aux quinolones et aux sulfamides.

Finalement, cette étude montre la présence des entérobactéries pathogènes multi-résistantes dans les effluents hospitaliers qui peuvent propager dans l'environnement. En définitif, l'installation d'un dispositif de gestion de déchets pathologiques à l'hôpital et de post-traitement des effluents hospitaliers régissent l'élimination de ces bactéries devient indispensable.

Mot clés : Effluents hospitaliers, *Enterobacteriaceae*, résistance aux antibiotiques, carbapénèmases.

Dédicace

Je dédie ce travail marquant de ma vie à la mémoire de mon père disparu trop tôt : Seghaier, jamais je ne t'oublierai ; tu resteras toujours dans mon cœur (repose en paix mon papa).

A ma chère mère : Laadjel Cherifa

Que dieu te protège et te garde toujours en bonne santé, qu'il te donne le courage et la force pour surmonter la perte de notre cher père (Puisse Dieu Le Tout Puissant et Miséricordieux l'accueille en Son Vaste Paradis.)

A mes deux frères : Mahdi et Manssour

Avec tous mes sentiments de respect, d'amour, de gratitude, et de reconnaissance pour tous les sacrifices que vous avez faits pour moi. Je vous aime et je vous souhaite que du bonheur et de réussite.

A ma sœur : Aziza

La source de tendresse et de bonté, je suis fière de toi ma petite sœur j'espère que je continuerai à l'être.

wafa

Dédicace

*Avant toute chose, je tiens à remercier Dieu le tout puissant, De
M'avoir donné la force et la patience.*

*A mon père « Abdelgani » tu m'as toujours encouragé pour avancer
A fin de réaliser mes rêves et ambitions, Tu as cru en moi quand moi je
n'y croyais pas tant*

*A maman « Hadda » ton enthousiasme et ton énergie désormais
légendaires, sont pour moi une source d'inspiration formidable, tu
es l'âme de ma vie, Merci pour ton soutien.*

A mes chères sœurs « Souad.Linda.Meriem ».

*A mes chers frères « Walid et son épouse Amel, Sofien et son
épouse Aicha, Salah et son épouse Wafa.»*

*À mon fiancé "Aymen" pour son amour et son soutien constants sans
jamais se plaindre, et qui a su m'accompagner et me rassurer,
toute la période de ce travail, c'est avec lui que j'ai partagée des bons
moments, et qui a été mon binôme en toutes circonstances, merci d'avoir
toujours été présent et à l'écoute.*

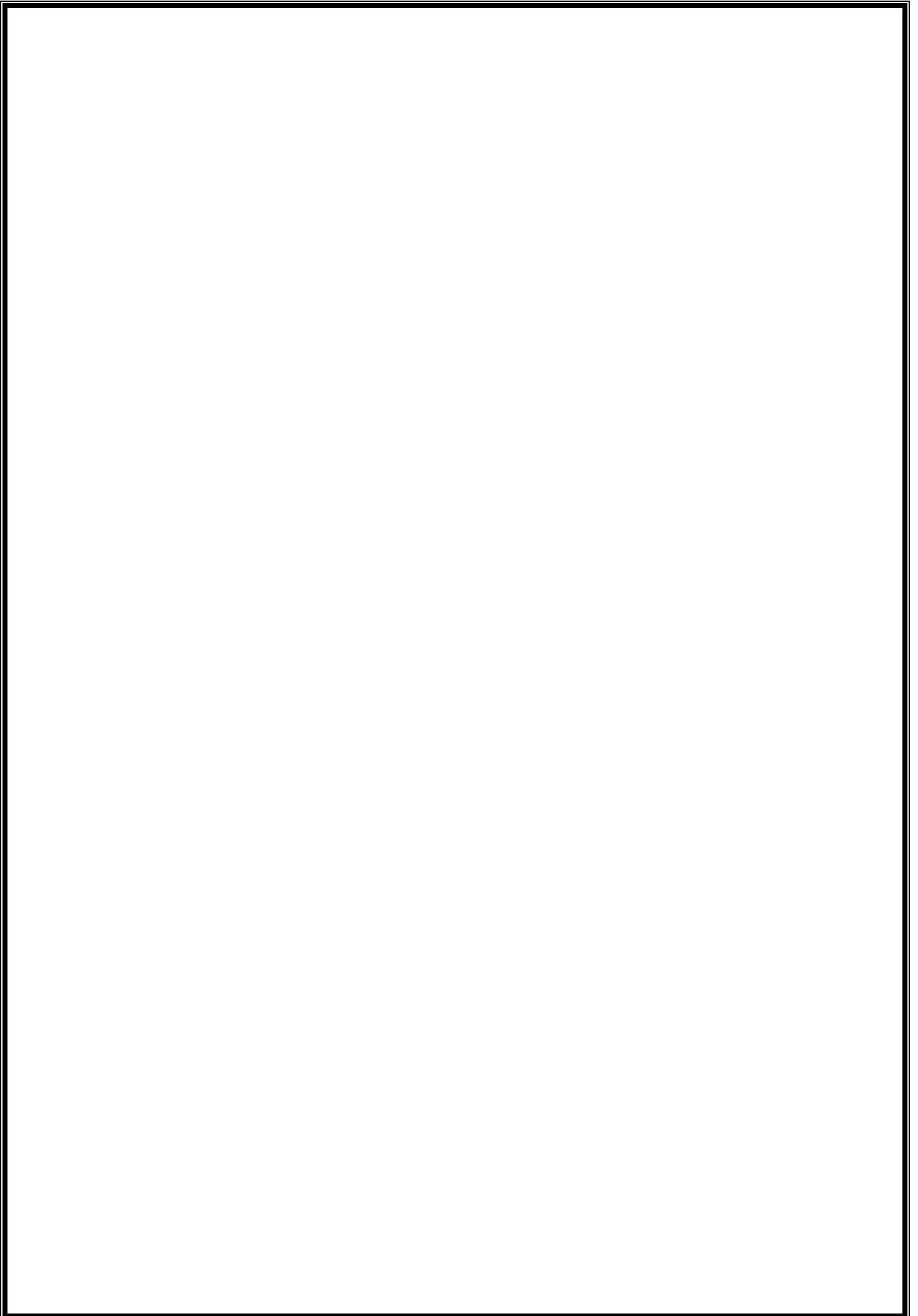
*A mes amies « Djouhaina, Doudi, Houda, Sonia, Karima, Rabab,
Amani, Rokaya, Asala ».*

*A Mon amie Selma je n'oublierai jamais les bons moments qu'on avait
passés ensemble. La personne sur laquelle je peux toujours compter. Tu
me fais voir la
vie autrement.*

*sans oublier « Amel, Nedja, Khawla, Khadija, Imen, Sakina,
Douaa, Chifa ».*

Je remercie, Ma famille, pour leur encouragement leur soutien.

AYA



Dédicace

Je dédie ce travail à

A MA TRÈS CHÈRE MÈRE : OUSSALAH Habiba

Comment pourrai-je t'exprimer ma gratitude, mon amour, et ma reconnaissance pour tout ce que tu as fait pour moi. Tu as toujours été à mes côtés tu étais ma source d'inspiration, et ma protectrice, que dieu te garde pour moi.

A MON TRÈS CHER PÈRE : Ridha papa je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir. Que dieu le tout puissant te garde et te protège.

A Mon cher grand-père paternel :

Une preuve vivante de la fidélité. Tu représentes pour moi l'amour inconditionnel que tu avais su garder pour ma grande mère disparue. (Que Dieu, le miséricordieux, l'accueille dans son éternel paradis).

A mon cher, et unique frère Hani, pour ton ambiance, ta bonne humeur et ta patience. tu es la prunelle de mes yeux ; que dieu te guérise je t'aime plus que tout.

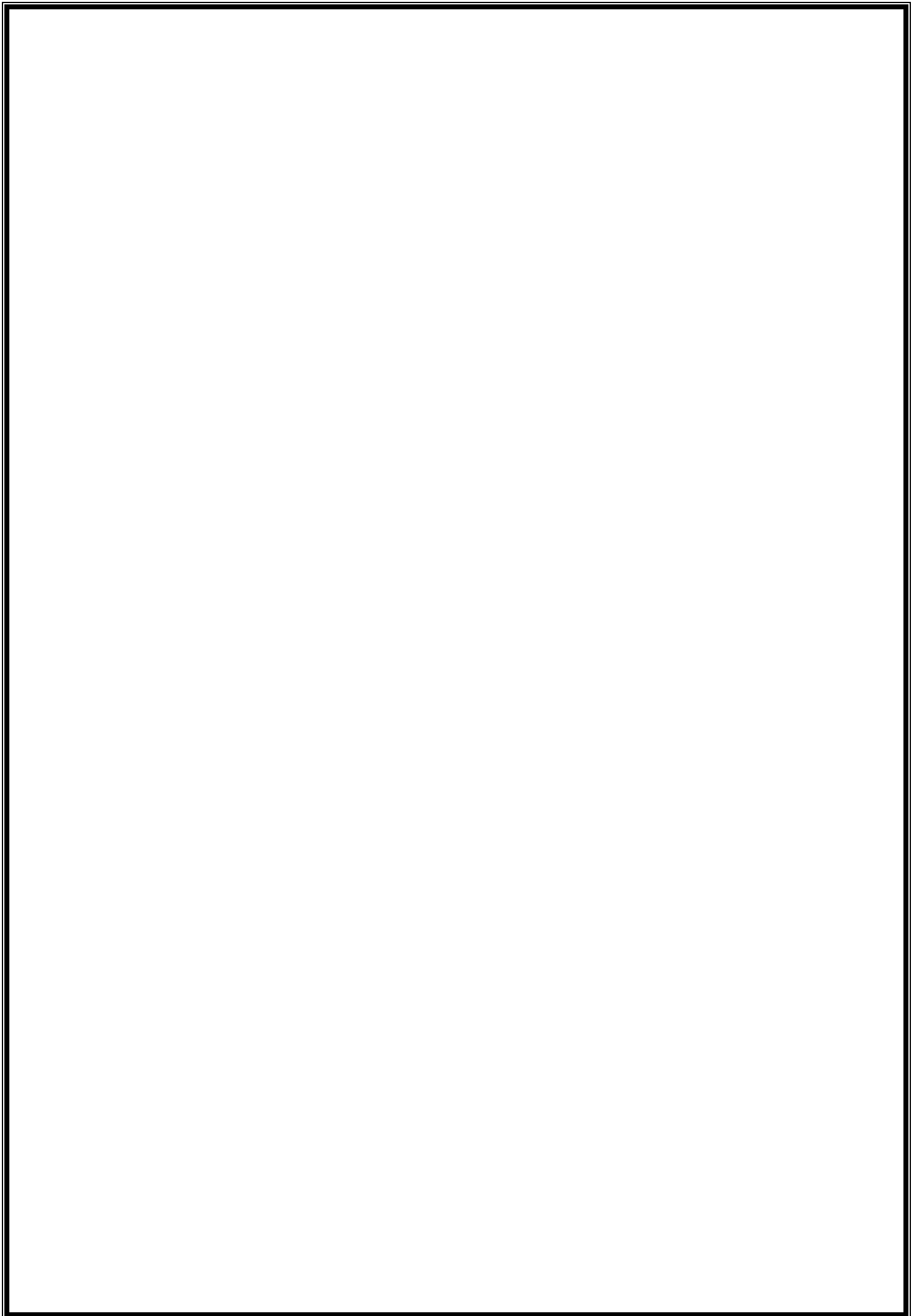
A mes très chères sœurs Sabrina et Narimane En souvenir d'une enfance dont nous avons partagé les meilleurs et les plus agréables moments.

A mon amie d'enfance Bouchra tu es la personne qui est restée dans ma vie malgré la distance et les années je te dis Merci.

A Mon amie Besma je n'oublierai jamais les bons moments qu'on avait passé ensemble.

A Mon amie Oumaima la personne sur laquelle je peux toujours compter. Tu me fais voir la vie autrement.

Souha



REMERCIEMENT

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir cet humble travail.

En second lieu, nous tenons à remercier notre encadreur Dr. Belbel Zineb pour ces conseils et ces critiques qui ont guidé nos réflexions et nous ont aidé à trouver des solutions pour avancer durant toute la période du travail.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury Dr.MECHAI Abd EL-Bassetet ,Dr .Dbebza Manel pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à tous les professeurs qui nous ont enseigné et qui par leurs compétences nous ont soutenu dans la poursuite de nos études.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Table de Matières	
ملخص	
Abstract	
Résumé	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste d'abréviation	
Introduction	
Partie 1: synthèse bibliographique	
Chapitre I: Les entérobactéries	
1. Définition	01
2. Habitat	01
3. ClassificationdesEntérobactéries	01
4. Caractères bactériologiques	02
4.1 Les caractères morphologiques	02
4.2 Les caractères culturaux	02
4.3 Les caractères biochimiques	02
4.4 Les caractères antigéniques	02
4.4.1 Antigène ECA	03
4.4.2 Antigène O	03
4.4.3 Antigène R	03
4.4.4 Antigène H	03
4.4.5 Antigène de surface K	03
5. Etude de quelques espèces	03
5.1. <i>Escherichia</i>	03

5.2. <i>Salmonella</i>	04
5.3. <i>Enterobacter</i>	04
5.4. <i>Serratia</i>	05
5.5. <i>Yersinia</i>	05
5.6. <i>proteus</i>	05
5.7. <i>morganella</i>	06
6. Les facteurs de la virulence	06
6.1 Ilots de pathogénicité	06
6.2 La capsule	06
6.3 Le pili	07
6.4 Variation antigéniques	07
Chapitre II : les eaux usées hospitalières	
1. Définition des eaux usées	08
2. Problématique des effluents hospitaliers	08
3. Origine de l'effluent hospitalier	08
4. Caractéristiques microbiologique des effluents hospitalières	09
5. Les bactéries photogènes des eaux usées hospitalière	09
6. Risques sanitaires et environnementaux	09
Chapitre III : Entérobactéries et Résistance aux antibiotiques	
I .Antibiotiques	
1. Définition	11
2. Mécanisme d'action des antibiotiques	11
3. Spectre d'activités des antibiotiques	12
4. Type de Résistance aux antibiotiques	12
4.1. Résistance naturelle	12
4.2. Résistance acquise	12

4.3.Résistances croisées	13
5. Mécanismes de résistances des entérobactéries	13
6. déterminants génétiques des résistances aux antibiotiques	14
7. Mécanisme de la résistance	15
7.1. β lactamine	15
7.2. Les aminosides	17
7.3. Les quinolones	18
II .les carbapénèmes	
1. Définition	19
2. Mode d'action	19
3. Les carbapénémases	19
3.1. Définition	19
3.2. Classification	20
3.3. Epidémiologie	21
Partie2: Matériels et Méthodes	
1.Cadre de l'étude	24
2. Matériels	24
3. méthodes	24
3.1.Prélèvement	24
3.2.Préparation des échantillons	25
3.3 préparation des dilutions décimales	25
4. Sélection des bactéries résistantes aux carbapénèmes	25
4.1 La première Méthode : isolement sur milieu mac conkey additionné d'imipénème et d'értapénème	26
4.2 La deuxième méthode : Bouillon nutritif additionné d'imipénème et d'értapénème	27
4.3 la troisième méthode : milieu kligleriron agar contenant un disque	27

d'imipenème et d'ertapénème	
4.4. Purification des souches isolées	28
5. Identification des isolats	28
5.1. Coloration de Gram	28
5.2. test oxydase	29
5.3. Identification biochimique	31
6. Test de sensibilité aux antibiotiques par l'antibiogramme	31
7. détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E-tes	33
Résultat :	
1. Souche Bactérienne	35
1.1.Aspect macroscopiques des isolats de la culture des BGN sur milieu mac-conkey additionnée d'ertapénème et imipenème	35
1.2 .Purification de souches	37
1.3 .Conservation des souches	38
1.4. Aspect microscopique des isolats	38
2. Identificationbiochimique des isolats	39
3 .identification des espèces isolées selon le prélèvement	41
3.1.Distribution des souches isolées selon les espèces	42
3.2.Test d'oxydase	42
4. Biotypage	43
4.1. Biotypage des souches d'<i>E. coli</i> 1 selon les profils numériques en API 20 E	43
4.2. Biotypage des souches de <i>salmonella Arizonaselon</i> les profils numériques en API 20 E	43
5. Résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques des souches d'entérobactéries	44
6.détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des principales familles d'antibiotiques	45
Partie 4 : Discussion	

Conclusion	
Perspectives	
Références bibliographique	
Annexes	

Liste des figures

N° de figure	Titre	Page
01	cible des principales familles d'antibiotiques	13
02	principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques.	16
03	Action des bêta-lactamine	18
04	Résistance aux bêta-lactamine	18
05	Distribution géographique des isolats producteurs de carbapénémases KPC	23
06	Distribution géographique mondiale (A) et européenne (B) des EPC de type VIM et IMP	24
07	Distribution géographique des isolats producteurs de carbapénémases NDM	24
08	Distribution géographique des isolats producteurs de carbapénémases OXA-48	25
09	les étapes de filtration du prélèvement	26
10	Préparation des dilutions décimales	26
11	préparation du milieu d'isolement	26
12	ensemencement de l'échantillon dans un tube de bouillon nutritif contenant disque d'imipénème et ertapénème.	27
13	les étapes de l'ensemencement de l'échantillon sur milieu kligleriron agar (KIA) ou mac conkey contenant un disque d'imipénème au centre de la gélose	28
14	préparation de la galerie API 20 E	29
15	ajout de réactifs	30
16	les étapes d'antibiogramme	33
17	Les étapes d'E-test	34
18	Aspect de culture selon la méthode 01	
19	Aspect de culture dans bouillon nutritif	36
20	résultat de culture par la méthode 02	37
21	Résultat de culture par la méthode 03	37
22	aspect macroscopique après reisolement de la souche <i>E. coli</i> sur mac-conkey	38
23	aspect microscopique des isolats	38
24	résultat de teste oxydase de la souche <i>E coli</i> (référence de souche 10)	40
25	le résultat d'identification biochimique par API20E de l'espèce <i>Escherichia coli</i> (Référence de souche 03)	41
26	Distribution des entérobactéries selon les espèces .	43

N° de Figure	Titre	page
27	Fréquence des profils numériques en API 20E des souches <i>d'E. coli 1</i> .	44
28	Fréquence des profils numériques en API 20E des souches <i>salmonella Arizonae</i> .	44
29	Sensibilité aux antibiotiques des 14 souches isolées vis-à-vis les antibiotiques testés.	47
30	résultat de l'antibiogramme de la souche <i>serratiaodorifera</i> (référence de souche 13)	48
31	E-Test trimethoprime-sulfamathexazole (SXT) de la souche <i>serratiaodorifera</i> (référence de la souche13)>32 ug/ml	49
32	E-Test imipenème (IMP) de la souche <i>serratiaodorifera</i> (référence de la souche13)>32ug/ml	49
33	ETest Gentamicine (GM) de la souche <i>Escherichia coli 1</i> (référence de la souche11) 32 a 48 ug/ml	49

Liste des tableaux

N° de tableaux	Titre	Page
01	le nombre et les dates des prélèvements	24
02	couleur des colonies sur la gélose mac-conkey	26
03	Les antibiotiques utilisés dans notre étude	32
04	Résultat de culture selon le prélèvement	35
05	Identification et bio typage selon le profile numérique des 07 souches isolées dans cette étude	39
06	isolement et identification des bacille à Gram négatif selon les prélèvements	40
07	Effectif et pourcentage des souches selon les espèces	41
08	profils de sensibilité aux ATB des souches testées	44
09	le profile détaillé de chaque souche est montré dans letableau suivant	45

Introduction

Les eaux usées générés par les activités hospitalières peuvent présenter un danger potentiel pour l'homme et son environnement. Cela, compte tenu de l'importance des substances chimiques qu'ils contiennent **(27)**.

Les effluents hospitaliers peuvent contribuer largement à la dissémination des bactéries multi résistantes aux antibiotiques (BMR) et leur support génétique dans l'environnement **(70)**.

Les entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif présents au sein de la flore intestinale normale des hommes et des animaux. Responsables d'infections variées (infections urinaires, septicémies, pneumonies, infections hépato-digestives, méningites...). Les entérobactéries sont considérées comme la source principale d'infections communautaires et hospitalières **(69)**.

Les carbapénèmases sont identifiées de façon croissante chez les entérobactéries dans le monde entier, les entérobactéries productrices de carbapénèmases (EPC) représentent actuellement un problème majeur de santé publique **(70)**.

La diffusion des carbapénèmases chez les entérobactéries revêt une importance clinique particulière. En effet, les souches productrices de carbapénèmases résistent à la majorité des β -lactamines et sont souvent résistantes à d'autres familles d'antibiotiques comme les aminosides et quinolones. Elles ont un rôle important en pathologie humaine, Conduisant ainsi à un échec thérapeutique **(65)**.

Les eaux usées non traitées générés par les activités hospitalières peuvent contribuer largement à la dissémination des bactéries multi résistantes (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 BMR par leurs fréquences, ou leurs conséquences thérapeutiques justifient une surveillance spécifique tant à l'hôpital que dans l'environnement **(68)**.

Dans la région de Tébessa, il existe seulement une étude réalisée en 2018 qui permet de décrire le niveau de résistance des entérobactéries aux antibiotiques au niveau des eaux usées hospitalières. L'objectif de cette étude était d'identifier les entérobactéries résistantes aux carbapénèmases isolées au niveau du collecteur final des eaux usées hospitalières de l'hôpital

introduction

Mère et enfants Khaldi Abd Laziz de la ville de Tébessa, par ailleurs, déterminer leurs niveau de résistance aux principales familles d'antibiotiques.

De ce fait, l'objectif de ce travail, consiste à déterminer et estimer la prévalence des entérobactéries productrices de carbapénèmases isolées des eaux usées hospitaliers de Tébessa. Ce manuscrit s'articule autour de quatre parties :

La première Partie portera principalement sur un bref rappel sur les entérobactéries, leurs mécanismes résistance aux antibiotiques ainsi qu'une généralité sur les effluents hospitaliers. La deuxième partie présentera le matériel et les méthodes expérimentales utilisées. 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.

1. Définition

La famille des entérobactéries comprend d'environ 30 genres de bactéries et de plus de 100 espèces. Ce sont des bacilles à Gram négatif, immobiles ou mobiles grâce à une ciliature péritriche. Ils sont aéro-anaérobies facultatifs et se développent sur milieu ordinaire (1). Ils sont dépourvus d'oxydase et ont la faculté de fermenter le glucose, mais aussi de réduire les nitrates en nitrites. Les différences entre les nombreux genres et espèces viennent de critères plus précis, comme la fermentation des différents sucres, la production ou non de sulfure, la présence ou l'absence d'enzymes du métabolisme (désaminases, décarboxylases) (1).

2. Habitat

Elles sont très répandues, certaines ne sont retrouvées que dans l'environnement, en particulier dans les milieux humides. La plupart des genres comportent des espèces pathogènes qui provoquent des troubles dont la gravité varie énormément d'une souche à l'autre. Certaines sont responsables de maladies des végétaux (phytopathogènes) et d'autres pour l'animal (2).

On peut les retrouver dans de nombreux écosystèmes :

- certaines espèces sont seulement saprophytes : milieux humides surtout, sols, eaux, végétaux, produits alimentaires.
- mais la plupart des espèces sont commensales, isolées dans l'intestin de l'homme et des animaux, d'où le nom d'entérobactéries (3).

3. Classification

Actuellement, les entérobactéries sont classées sur la base du séquençage des ARNr 5S et 16S dans : Domaine : Eubacteria.

Phylum XII : Proteobacteria.

Classe : Gammaproteobacteria.

Ordre : Enterobacteriales.

Famille : Enterobacteriaceae.

44 genres dont les genres récents *Alterococcus*, *Arsenophorus*, *Brenneria*, *Pectobacterium*, *Raoultella*, *Samsonia*, *Sodalis*(4).

Les genres de cette famille sont regroupés en cinq tribus, d'après leurs propriétés fermentatives: *Escherichiae*, *Klebsielleae*, *Proteae*, *Yersinia* et *Erwiniae*(5).

4. Caractères bactériologiques

4.1. Caractères morphologiques

Ce sont des bacilles à Gram négatif, de 2 à 3 microns de long et de 0,6 microns de large, généralement polymorphes(6). La plupart des entérobactéries sont mobiles, grâce à leur ciliature péritriche. D'autres sont immobiles, telles que *Klebsiella* et *Shigella*. Les espèces pathogènes pour l'homme possèdent des facteurs d'adhésion : fimbriae ou pili(7)..

4.2. Caractères cultureux

Les entérobactéries se développent rapidement in vitro sur des milieux ordinaires, en aéro-anaérobiose. La température optimale de croissance est de 37 °C mais la culture est possible entre 20 et 40 °C (6). Leurs exigences nutritionnelles sont en général, réduites et la plupart se multiplient en milieu synthétique avec une source de carbone simple comme le glucose. Sur milieux gélosés, les colonies d'entérobactéries sont habituellement lisses, brillantes, de structure homogène (type « smooth » ou S). Cet aspect peut évoluer après cultures successives pour donner des colonies à surface sèche rugueuse (type « rough » ou R). Les *Klebsiella* forment des colonies souvent très muqueuses, larges et luisantes. Les *Proteus* ont tendance à envahir la gélose et à y former un tapis uniforme. En milieu liquide, les entérobactéries occasionnent un trouble uniforme du bouillon (7),(8).

4.3. Caractères biochimiques

L'identification du genre et espèce bactérienne repose d'abord sur l'étude des caractères biochimiques (7). Des galeries biochimiques permettent de déterminer avec précision le genre et l'espèce, se basant sur :

- L'étude du métabolisme glucidique (dégradation des sucres : glucose, lactose, galactose),
- L'étude du métabolisme peptidique par la dégradation des acides aminés, recherche d'uréase et de tryptophane désaminase (TDA),
- L'utilisation du citrate comme seule source de carbone,
- La production d'acétoïne, d'H₂S (9).

4.4. Caractères antigéniques

Les entérobactéries possèdent différents antigènes :

4.4.1. Antigène de Kunitz ou (ECA)

C'est un antigène qui n'existe que chez les entérobactéries et, de ce fait, a un intérêt taxonomique.

4.4.2. Les antigènes O ou somatiques

Très toxiques, ils correspondent aux polysides fixés sur les lipopolysaccharides (LPS). Ils sont thermostables et résistent à l'alcool. Les bactéries portant des antigènes O sont agglutinées par les anticorps correspondants (6).

4.4.3. L'antigène R

correspond au polysaccharide du core central. La disparition de l'antigène O rend les souches "rough" (colonies rugueuses) autoagglutinables dans l'eau physiologique, plus sensibles aux substances bactéricides du sérum, facilement phagocytées et moins pathogènes (7).

4.4.4. Les antigènes H ou flagellaires

Ils n'existent que chez les souches mobiles. Constitués de protéines spécifique dénommées flagelline, ils sont thermolabiles et inactivés par l'alcool. On peut les mettre en évidence par agglutination sur lame avec des sérums spécifiques (7).

4.4.5. Les antigènes K

C'est l'antigène capsulaire, de nature polysaccharidique. Ils masquent l'agglutination par les anticorps anti O qui peut être restituée après chauffage de la souche car ils sont détruits par ébullition. Ce sont des antigènes de surface (6).

5. Etude de quelques espèces d'entérobactéries

5.1. *Escherichia*

5.1.1. Habitat

E. coli est une bactérie intestinale des mammifères, commensale du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux, c'est l'espèce aérobie la plus représentée dans le tube digestif (10).

5.1.2. Caractères bactériologiques

E. coli est une entérobactérie mobile capable de fermenter le lactose et de produire de l'indole. Il est en outre acétoïne -, citrate -, H₂S -, gaz +, uréase- (10).

5.1.3. Pouvoir Pathogène

En médecine humaine, les *E. coli* peuvent donner lieu à divers types d'infections : infections urinaires, intestinales, néonatales, septicémies et méningites(11). Certaines souches d'*E. coli* sont virulentes, d'autres appartenant à la flore commensale, peuvent être responsables d'infections opportunistes variées, surtout chez les sujets immunodéprimés(12).

5.2. Salmonella

5.2.1. Habitat

Les *salmonelles* sont des parasites intestinaux des animaux vertébrés qui se disséminent dans la nature par les excréta. Chez les animaux à sang chaud, elles sont souvent pathogènes. Les aliments susceptibles de contenir ces bactéries, citons les viandes crues ou insuffisamment cuites, le lait non pasteurisé et les œufs. Les fruits et les légumes (13).

5.2.2. Caractères bactériologiques

Les *Salmonelles* sont uréase-, indole -, lactose -, H₂S +, citrate +. Certains sérovarsont des caractères particuliers (13).

5.2.3. Pouvoir Pathogène

Les *salmonelloses* peuvent donner lieu à trois types de manifestations cliniques :

*Des formes bactériémiques, strictement humaines, qui sont les fièvres typhoïde et paratyphoïde dues à *Salmonella* Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B et Paratyphi C.

*Des toxi-infections alimentaires donnant lieu à des gastro-entérites dues à tous les autres sérovars mais également à Paratyphi B et C.

*Des manifestations extra-digestives dans lesquelles divers sérovars sont en cause et qui sont plus fréquentes chez les sujets fragilisés (infections pleuro-pulmonaires, atteintes ostéo-articulaires, ...) (14).

5.3. Enterobacter

5.3.1. Habitat

Les *Enterobacter* sont présents dans l'environnement, et également des commensaux du tube digestif (15).

5.3.2. Caractères bactériologiques

Ce sont des entérobactéries mobiles, VP+, Lactose+, ONPG+, Urée-, Indole-, Citrate+, H₂S- (15).

5.3.3. Pouvoir Pathogène

Ce sont des pathogènes opportunistes responsables, en milieu hospitalier surtout, d'infections urinaires, de bactériémies, de méningites ou de suppurations diverses (15).

5.4. *Serratia*

5.4.1. Habitat

D'une manière générale, les espèces du genre *Serratia* sont isolées des plantes (légumes, champignons, mousses), on les trouve aussi dans le tube digestif de l'homme, des rongeurs, des insectes, ainsi que dans le sol, l'eau. *Serratia* est capable aussi de se développer sur des aliments tels que le pain, la viande et le lait (16).

5.4.2. Caractères bactériologiques

sont des bactéries ONPG, VP, indole, H₂S, urease, TDA.

5.4.3. Pouvoir pathogène

Les espèces de *Serratia* sont des agents pathogènes opportunistes. Elles sont à l'origine d'une multitude d'infections, dont la bactériémie, la pneumonie, les infections liées aux cathéters intraveineux, l'ostéomyélite, l'endocardite, mais elles sont rares. En médecine vétérinaire, *Serratia marcescens* est un agent des mammites chez la vache laitière (17).

5

5.5. *Yersinia*

5.5.1 Habitat

Yersinia enterocolitica a un réservoir très vaste: environnement (eaux, sols,) ou animaux (rongeurs, porcs, etc.), avec souches adaptées ou non à des espèces animales voire à l'homme (18).

5.5.2. Pouvoir pathogène

Yersinia enterocolitica est responsable d'entérocolite chez le jeune enfant, d'adénite méésentérique chez l'adolescent et l'adulte jeune. Les formes septicémiques sont plus rares et surviennent sur terrain fragilisé, immunodéprimé, et des manifestations cliniques un variées ont été décrites (abcès profonds, endocardite, méningite, etc.)(18).

5.6 .Proteus

5.6.1. Habitat

Les *Proteus* sont largement répartis dans l'environnement naturel, y compris l'eau polluée, le sol et le fumier, on les rencontre aussi dans la viande putride, des abcès (19).

5.6.2.Caractère bactériologiques

Les bactéries appartenant à l'espèce *Proteus*. Ont une morphologie des petits bacilles à Gram négatif en forme de bâtonnet, généralement très mobiles, *Proteus mirabilis* a la capacité de s'allonger et sécréter un polysaccharide lorsqu'il est en contact avec des surfaces solides, ce qui rend extrêmement mobiles sur des éléments tels que l'équipement médical. Elle se caractérise par sa capacité à fermenter le maltose et son incapacité à fermenter le lactose (19).

5.6.3.Pouvoir pathogène

Elle est l'un des principaux agents pathogènes de l'appareil urinaire humain chez les patients hospitalisés. Ces infections urinaires peuvent donner lieu à des bactériémies hautement mortelles et qui sont difficiles à traiter et souvent fatale. Qui peuvent être opportunistes et causer des lésions septiques sur d'autres sites du corps (19).

5.7.Morganella

5.7.1.Habitat

Il existe comme commensal dans le tractus intestinal des humains, des mammifères et des reptiles comme une flore normale (20).

5.7.2 .Pouvoir pathogène

À l'origine, il s'agissait d'une cause fréquente de diarrhée estivale, mais des infections cliniques associées aux voies urinaires, à la peau et aux tissus mous et au tractus

hépatobiliaire Infection urinaire Infections extra-digestives diverses. Rares infection materno-fœtale Bactériémies et septicémies (20).

6. Les facteurs de la virulence

6.1. Ilots de pathogénicité

Ce sont des gènes codés pour les facteurs de virulence, portés sur des segments d'ADN ou bien de plasmides, il y a plusieurs genres et espèces portant ces ilots comme *E. Coli*, *Salmonella*, *Shigella*(21).

6.2. La capsule

Elle joue un rôle très important dans le 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*(22).

6.3. Lepili

Est un filament court (<1µm) et nombreux un à plusieurs centaines, plus fins que les flagelles (3 à 10 nm). Leur rôle est l'adhésion(7).

6.4. Variation antigéniques

C'est la capacité des microorganismes de changer ses antigènes de surface, est la capacité génétiquement réversible de certaines bactéries de désactiver(21).

1. Définition des eaux usées

Les eaux usées sont les eaux chargées de polluants, solubles ou non, prévenants essentiellement de l'activité humaine.

Les activités humaines, domestiques, agricoles et industrielles produisent toutes sortes de déchets et de souillures qui sont transportées par voie liquide.

Ils sont susceptibles d'engendrer différentes sorte de pollution et de nuisance dans le milieu récepteur .Cet ensemble d'eau rejetées et de déchet constitue ce qu'on appelle les eaux usées (23) ,(24).

2. Problématique des effluents hospitaliers

L'un des principaux problèmes environnementaux posés par les effluents hospitaliers est leur rejet, au même titre que les effluents classiques urbains, vers le réseau d'assainissement communal sans traitement préalable Le dosage des polluants d'origine hospitalière montre que certaines substances, particulièrement les composés organohalogénés et les résidus de médicaments, quittent le plus souvent les stations d'épuration avec peu de dégradation

Un questionnaire sur le devenir des polluants hospitaliers dans l'environnement et sur la nécessité de développer des outils de gestion durable des eaux usées de ces établissements(25).

3. Origine de l'effluent hospitalier

Les établissements hospitaliers produisent trois types de rejets liquides :

*Les rejets d'origine domestique :les eaux provenant des cuisines.les rejets résultats 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 rejets générés par les activités de soins, d'analyse et de recherche, qui sont très spécifiques aux hôpital .Ces rejets peuvent contenir des produits chimiques et radioactifs, des liquides biologiques, des déjections / excréctions contagieuses et également des résidus de médicaments éliminés dans les excréctions des patients (26).

4. Caractéristiques microbiologique des effluents hospitalières

Les hôpitaux donne naissance à de grands volumes de rejets liquides chargés de micro-organismes pathogènes, dont certains sont multi résistants aux antibiotiques, de substances chimiques toxiques et des radio-isotopes Bien que la consommation élevée en eau des centres hospitaliers puisse assurer une dilution importante des charges organiques et inorganiques des effluents des différents services.

Les effluent non traité généré par les activités hospitalières peuvent contribuer largement à la désamination des bactéries multi-Résistances (BMR) dans les effluents hospitalières et d'évalué leur niveaux de résistance vis à vis des antibiotiques (27).

5. Les bactéries photogènes des eaux usées hospitalière

Les bactéries sont les plus fréquentes des agents pathogènes microbiens présents dans les eaux usées. Il existe une large gamme d'agents pathogènes bactériens et des agents pathogènes opportunistes qui peuvent être détectés dans les eaux usées (28).

Les bactéries des eaux usées ont été caractérisées et appartiennent aux groupes suivants :

- Bactéries Gram négatives anaérobies facultatives : par exemple, Aeromonas, Plesiomonas, Vibrio, selmonellaEnterobacter, Escherichia, Klebsiella, et Shigella.
- Bactéries aérobies à Gram négatif : par exemple, Pseudomonas, Alcaligenes, Flavobacterium, Acinetobacter.
- Bactéries sporulantes Gram positif : par exemple, Bacillus spp.
- Bactéries non sporulantes Gram positif : par exemple, Arthrobacter, Corynebacterium, Rhodococcus(29).

6. Risque sanitaire et environnementaux

Les notions de danger et de risque sont directement liées à l'existence de substances dangereuses dans les milieux. Le danger est potentiellement ce qui peut générer un risque.

Les eaux usées représentent à la fois une ressource et un danger. Les eaux usées non traitées renferment divers organismes excrétés.

Ces organismes peuvent contaminer les cultures, les sols, les eaux de surface, les eaux souterraines. Les eaux usées représentent un important véhicule d'agents biologiques et chimiques issus de l'activité humaine et/ou industrielle. Les agents pathogènes peuvent être

transmis à l'homme lors du contact direct avec les eaux usées ou indirectement par la consommation de cultures irriguées avec ces eaux usées, ou encore par des produits d'origine animale (30).

I. Les antibiotiques

1. Définition

Un antibiotique est une substance produite par des micro-organismes vivants ou substance analogue obtenue par synthèse, capable d'inhiber in vivo, la multiplication de micro-organismes pathogènes (action bactériostatique) ou capable de provoquer leur destruction (action bactéricide) (31).

2. Mécanisme d'action des antibiotiques

Quatre catégories d'antibiotiques peuvent être distinguées par rapport à leur mode d'action :

- les antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne : bêta-lactamines, glycopeptides, fosfomycine .
- les antibiotiques inhibant la synthèse des protéines : aminosides, macrolides, rifampicine, tétracyclines .
- les antibiotiques inhibant le fonctionnement de l'ADN : quinolones, sulfamide/triméthoprim.
- les antibiotiques entraînant la destruction de la membrane cytoplasmique (32).

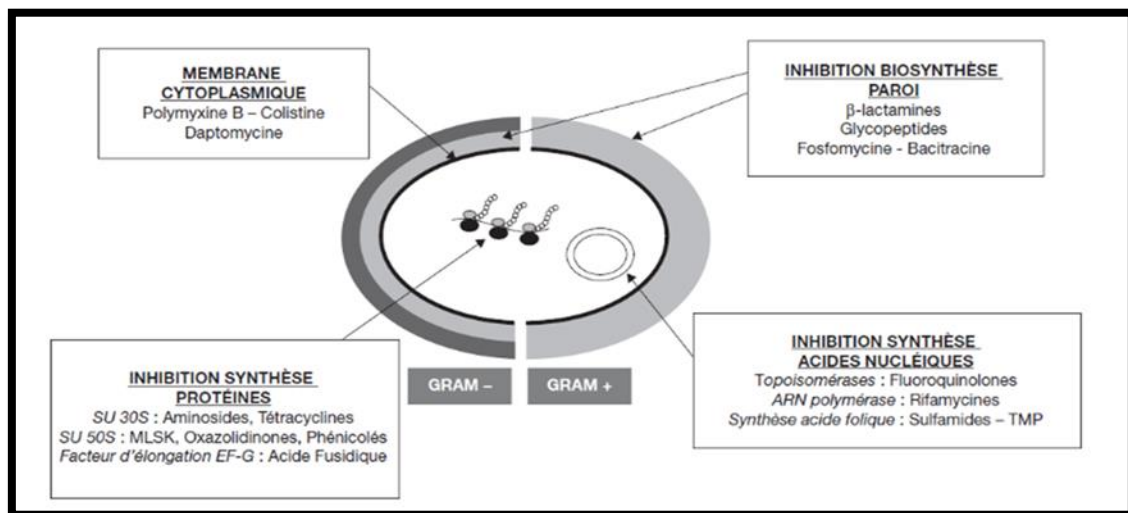


Figure 01: cible des principales familles d'antibiotiques (33).

3. Spectre d'activités des antibiotiques

Selon leur structure, leur cible d'action, et leurs propriétés pharmacocinétiques, les antibiotiques sont actifs sur les bactéries à Gram positif ou à Gram négatif (spectre étroit) ou sur les deux à la fois (spectre large). Les antibiotiques ont une action bactériostatique ou bactéricide, et leur action est soit dépendante de la durée de traitement (temps- dépendants) ou de la concentration (concentration- dépendants). Ces différentes notions permettent de définir le spectre d'activité des antibiotiques ainsi que les profils de sensibilité des bactéries (souches résistantes, sensibles ou intermédiaires).(33)

4. Type de la résistance aux antibiotiques

La résistance se définit alors par l'inefficacité de la dose d'antibiotiques au niveau du site infectieux : la concentration d'antibiotique est très inférieure à la CMI permettant d'arrêter la croissance de la bactérie.(33).

4.1. Résistance naturelle

La résistance à un antibiotique est dite naturelle si ce caractère est présent chez toutes les souches d'une même espèce ou d'un même genre ; elle peut être liée aux caractères physiologiques de l'espèce ou à la présence constitutive d'un gène de résistance. La résistance naturelle est due, le plus souvent, à l'inaccessibilité de la cible à l'antibiotique ou à une faible affinité de la cible pour l'antibiotique. On peut citer par exemple, la résistance naturelle des Entérobactéries et de *Pseudomonas spp* aux macrolides (molécules volumineuses ne pouvant être transportées via les porines), des bactéries à Gram négatif à la vancomycine (inaccessibilité du peptidoglycane). Enfin, certaines Entérobactéries produisent de façon naturelle des bêta-lactamases : c'est le cas, par exemple, de *Klebsiella pneumoniae* (pénicillinase) ou d'*Enterobacter cloacae* (céphalosporinase).(33)

4.2. Résistance acquise

La résistance à un antibiotique est dite acquise si elle n'est présente que chez certaines souches d'une espèce normalement sensible. L'acquisition de la résistance peut être liée à deux mécanismes :

- soit à une mutation affectant un gène de structure ou un gène de régulation ;
- soit à l'acquisition de matériel génétique exogène (plasmides, intégrons, transposons). Les plasmides de résistance codent le plus souvent pour des

enzymes inactivatrices comme les bêtalactamases ou des phospho- ou acétyltransférases (résistance aux aminosides). Un plasmide peut porter

- plusieurs gènes de résistance et une même bactérie peut contenir plusieurs plasmides, ce qui explique une résistance à de multiples antibiotiques non liés structurellement. (33).

4.3. Résistances croisées :

La résistance croisée résulte de la présence d'un seul mécanisme biochimique et concerne des antibiotiques appartenant ou non à la même famille, comme par exemple la résistance aux macrolides- lincosamides- streptogramines, conférée par la méthylation de l'ARN 23S.(33)

4. 4. Résistances associées :

La résistance associée est liée à plusieurs mécanismes (plusieurs gènes de résistance impliqués) et concerne des antibiotiques appartenant à différentes familles ; ces gènes peuvent être portés par un plasmide par exemple. (33).

5. Mécanismes de résistances des entérobactéries

Les entérobactéries peuvent développer quatre grands mécanismes de défense pour résister contre les antibiotiques :

- la membrane externe des entérobactéries forme une barrière hydrophile compacte expliquant la résistance naturelle de toutes les entérobactéries aux antibiotiques hydrophobes et de haut poids moléculaire (ex. pénicillines G, V et M, macrolides et apparentés, rifampicine, glycopeptides) ;
- l'efflux actif dû à des systèmes de « pompes » qui permettent d'expulser activement les antibiotiques vers l'extérieur de la bactérie.

Ce mécanisme explique des résistances de bas niveau croisées à différentes classes d'antibiotiques (ex. β -lactamines, quinolones, chloramphénicol, tétracyclines). À noter que l'efflux actif est souvent combiné à l'imperméabilité chez les entérobactéries, ces deux mécanismes diminuant la concentration intracellulaire des antibiotiques;

- la modification des cibles moléculaires des β -lactamines (c'est-à-dire les protéines liant les pénicillines ou PLP) ce qui entraîne une diminution d'affinité de l'antibiotique pour sa cible. Ce type de résistance est très rare chez les entérobactéries ;

- la production d'enzymes inactivatrices appelées β -lactamases. Ceci est le principal mécanisme de résistance des entérobactéries vis-à-vis des β -lactamines. À noter qu'il existe de nombreuses β -lactamases avec des structures et des spectres d'hydrolyse différents.(34).

6. Déterminants génétiques de la résistance aux antibiotiques

6.1.Résistance par mutation chromosomique :

Les résistances bactériennes par mutation chromosomique sont induites par des modifications structurales pouvant se traduire soit par un problème de perméabilité à un ou plusieurs antibiotiques, soit en rendant les cibles spécifiques des antibiotiques indifférentes. La résistance chromosomique est un phénomène qui présente plusieurs caractères exceptionnels. Il s'agit premièrement de sa rareté puisqu'il intervient en moyenne tous les 10^5 à 10^{10} divisions de la bactérie. Ensuite elle possède un caractère aléatoire car l'antibiotique n'est pas une molécule mutagène donc n'induit pas de mutation chez la bactérie. Cependant l'antibiotique participe à la sélection des bactéries mutantes. On note aussi son caractère spécifique (affecte un antibiotique ou une famille d'antibiotiques qui ont le même mécanisme d'action), son indépendance et son absence de transmissibilité. (34).

6.2. Résistance par acquisition de gènes :

Il s'agit ici de la résistance par un gain d'ADN extra-chromosomique le plus souvent un plasmique. Le plasmide est un fragment d'ADN extra-chromosomique (présent dans le cytoplasme) et qui peut porter un ou plusieurs gènes de résistance. Ces fragments d'ADN peuvent être transmis d'une bactérie donneuse à une autre bactérie dite receveuse ; cette transmission peut se faire entre deux espèces différentes de bactéries. A travers ce mécanisme, on se trouve face à une facilité d'acquisition de résistance et même de multi-résistance contrairement à celle acquise par mutation d'ADN chromosomique.(34).

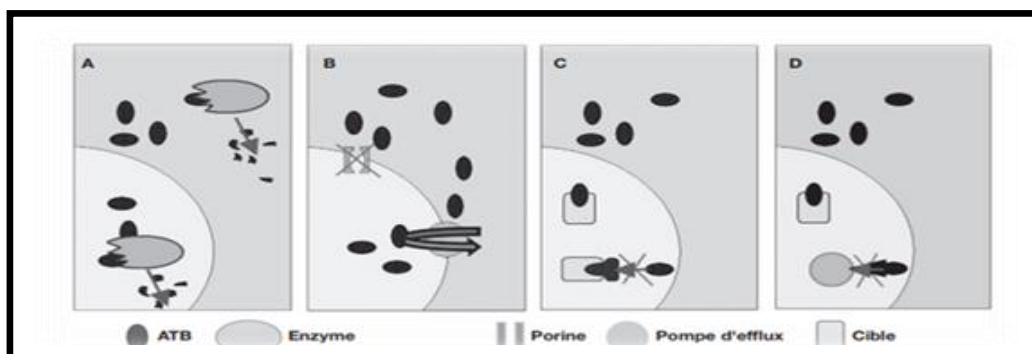


Figure 02: principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques. A : inactivation enzymatique de l'antibiotique B : Diminution de la perméabilité et efflux actif ; C : Modification de la cible ; D : Protection de la cible/Séquestration de l'antibiotique.(33)

7.Mécanisme de résistance par famille d'antibiotiques /entérobactéries

les entérobactéries utilisent différents mécanismes pour développer une résistance aux antibiotiques: il peut s'agir de troubles de perméabilité pour les antibiotiques, ce qui empêche la pénétration de l'antibiotique dans la bactérie; de systèmes d'efflux qui permettent d'évacuer les antibiotiques qui auraient pénétré dans la bactérie; ou de modification de la cible bactérienne de l'antibiotique ex : PBP, ce qui empêche la synthèse de la paroi de la bactérie ou la modification de la gyrase pour les quinolones). Mais le plus fréquemment, il s'agit d'enzymes détruisant les bêta-lactamines, les bêtalactamases.(34)

7.1-β. Lactamine

7. 1. 1. définition

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.(36)

7. 1. 2. Classification

Les β -lactamines sont classées en quatre groupes:

- ✎ **Les pénicillines** : (noyau péname) dont font partie la pénicilline G, la méticilline, les amino-benzyl pénicillines (ampicilline et amoxicilline), les uréido-pénicillines (pipéracilline), les carboxy-pénicillines (ticarcilline) et les amidino-pénicillines (mécillinam).
- ✎ **Les céphalosporines** : (noyau céphème) constituées de 4 générations : la première (céfalotine, céfalaridine), la deuxième (céfamandole, céfoxitine), la troisième (céfotaxime, ceftazidime) et la quatrième génération (céfépime, cefpirome).
- ✎ **Les carbapénèmes** (noyau carbapénème) qui sont les plus efficaces actuellement (imipénème, méropénème).
- ✎ **Les monobactames** : (noyau azétidine) représentés par l'aztréonam(36).

7. 1. 3. mode d'action

Tous ces antibiotiques agissent sur les bactéries en phase de croissance, en inhibant la formation des liaisons peptidiques spécifiques de la paroi bactérienne : ce sont des inhibiteurs compétitifs des enzymes polymérisant de la paroi bactérienne.(33).

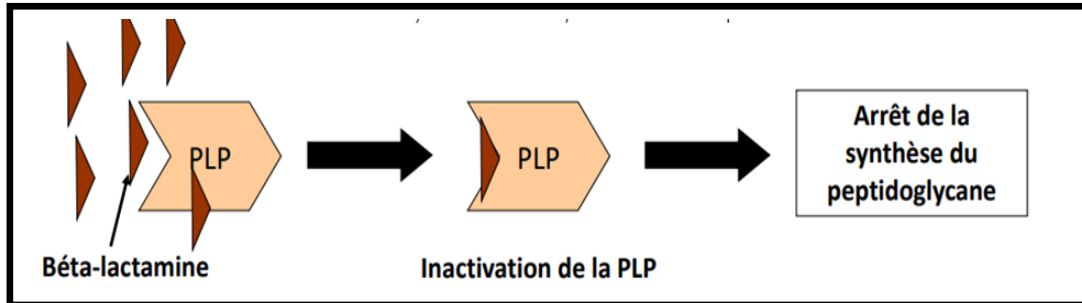


Figure 3 :Action des bêta-lactamine

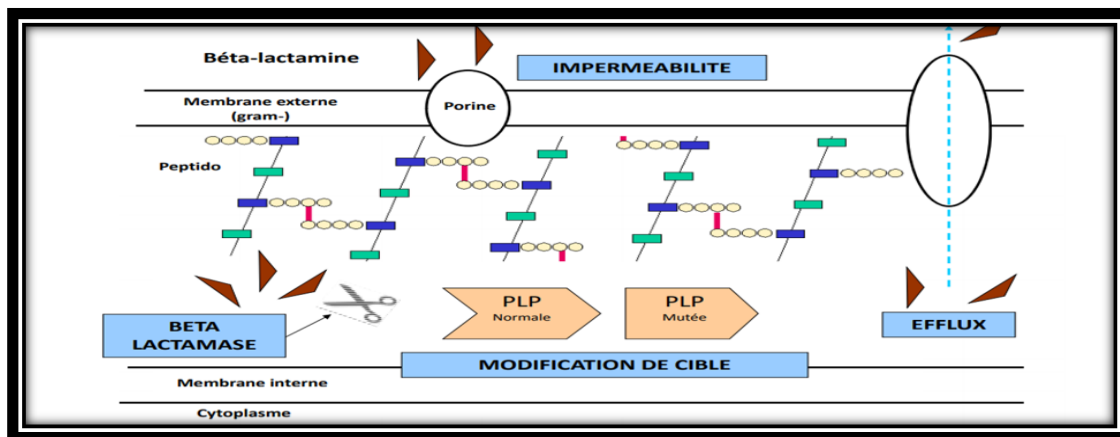


Figure 4 :Résistance aux bêta-lactamine

7.1.4 Bactamases

La production d'enzymes variées inactivant l'antibiotique : les beta lactamases qui existent naturellement dans les gènes de la bactéries et permettent sa prolifération parmi la flore de son biotype, et qui coupent le cycle bêta-lactame en l'inactivant.

Les beta-lactamases à spectre étendu (BLSE) sont des enzymes secrétées par les entérobactéries qui leurs confèrent une résistance à la plupart des bêta-lactamines(pénicilline ; céphalosporines ;aztreonam)(37).

7.2. Les aminosides

7.2.1. définition

- Les aminosides sont des hétérosides de bases fortes.
- Antibiotiques bactéricides, leurs spectre antibactérien est large.
- Ils comprennent de nombreux produits : streptomycine,kanamycine , gentamycine tobramycine , paromomycine, méomycine,framycétine, spectinomycine , sisomycine.....
- Inhibent la synthèse des protéines bactériennes des grams négatifs.(37).

7.2.2. Mode d'action des aminosides

Ils agissent par fixation sur l'ARN 16S, au niveau de la sous- unité 30S du ribosome bactérien, entraînant un changement morphologique de l'ensemble du ribosome et une altération de toutes les étapes de la synthèse des protéines. En raison des nombreuses erreurs de lecture, il y a synthèse de protéines anormales, incorporées ensuite dans la membrane cytoplasmique qui perd son intégrité (37).

7.2.3. Mécanisme de résistance

L'utilisation des aminosides a contribué à la sélection de souches résistantes par différents mécanismes incluant l'inactivation enzymatique, la modification de la cible ribosomale et la diminution de leur accumulation intracellulaire. Ces mécanismes peuvent être isolés ou coexister, ils génèrent dans ce dernier cas des résistances cumulées qui compliquent la compréhension du phénotype. En préalable à l'analyse phénotypique, il convient de rappeler que les mécanismes de diminution d'imperméabilité membranaire affectent l'activité de tous les aminosides. Les modifications de la cible ribosomale relèvent de trois mécanismes : mutation de l'ARN16S, mutation de protéines de la sous-unité 30S et

méthylation de l'ARN16S sur certaines bases impliquées dans la fixation des aminosides au niveau du site A .(38)

7.3. Les quinolones

7. 3. 1. définition

Sont des antibiotiques inhibant le fonctionnement de l'acide désoxyribonucléiques Elles inhibent des topoisomérases, enzyme intervenant dans la conformation de l'ADN et plus particulièrement la topoisomérase II (ou ADN gyrase) et la topoisomérase IV. (39)

7. 3. 2. mode d'action

- Elle se fixe 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 négatifs et ne sont utilisé que dans le traitement des infections urinaires.(39)
- les quinolones de 2^{ème} génération ou fluoroquinolones comprennent principalement la pefloxacin, l'ofloxacin et la ciprofloxacine, elles sont bactéricides et sont 100 fois plus actives que celles de la 1^{ère} génération.(40)

7. 3. 3. Mécanisme de résistance

La résistance aux quinolones est principalement chromosomique, généralement due à une diminution d'affinité de l'antibiotique pour sa cible. Ceci est dû à une modification de l'ADN gyrase et/ou de la topoisomérase IV par mutations ponctuelles. À noter que ce mécanisme est le seul responsable du phénotype de résistance de haut niveau aux fluoroquinolones. Les mutations apparaissent quasiexclusivement dans de courtes régions conservées des deux protéines appelées « quinolone résistance-determiningregions » (QRDR) . Ce type de résistance est multi-étapes (mutants de 1^{er} niveau, de 2^e niveau,...) avec une première mutation facilitant la sélection d'une seconde et ainsi de suite (potentiellement jusqu'à 3 ou 4), une augmentation du niveau de résistance avec le nombre de mutations et une mutation de 1^{er} niveau au niveau de la cible primaire (généralement l'ADN gyrase chez les bactéries à Gram négatif. Un phénotype de résistance, en général de bas niveau, peut être dû à une diminution d'accumulation intracellulaire de l'antibiotique par imperméabilité et/ou efflux actif . Le mécanisme d'imperméabilité est dû à une modification qualitative et/ou quantitative d'une porine de la membrane externe des bactéries à Gram négatif impliquée dans l'entrée de

fluoroquinolones hydrophiles (ex. norfloxacine, ciprofloxacine). L'efflux actif, dû à l'hyper-expression de systèmes de pompes d'efflux par mutations au niveau des régulateurs, confère généralement un phénotype de résistance croisée à plusieurs familles d'antibiotiques de structures différentes. (38)

Plus récemment, des mécanismes de résistance plasmidique ont été décrits chez les bactéries à Gram négatif, généralement associés aux mécanismes chromosomiques. Il y a trois types de résistance plasmidique décrits à ce jour : la protection de la cible due aux protéines Qnr décrite en 1998, l'inactivation enzymatique identifiée en 2005 et l'efflux actif médié par la pompe QepA rapporté en 2007 (40).

II. Les carbapénèmes

1. Définition

Les carbapénèmes sont des β -lactamines à large spectre ils sont actifs vis-à-vis de très nombreuses espèces de bacilles à Gram négatif dont les entérobactéries.(41) ils font partie des antibiotiques utilisés en première ligne au cours du traitement probabilisé des infections nosocomiales sévères. Trois molécules sont commercialisées : l'imipénème, le méropénème et l'ertapénème.(42).

2. Mode d'action

L'activité de ces carbapénèmes est liée en particulier à la rapidité de leur pénétration à travers la paroi externe des bacilles à Gram négatif et à leur stabilité vis-à-vis de la plupart des β -lactamases naturelles ou acquises.

Les carbapénèmes exercent leur activité bactéricide en se liant aux protéines de liaison des pénicillines (PLP). Contrairement aux céphalosporines et aux aminopénicillines qui se lient principalement à la PLP3, les carbapénèmes ont pour cibles privilégiées les PLP1a, 1b et 2, avec pour conséquence une lyse sans filamentation préalable et une moindre libération d'endotoxine par les bacilles à Gram négatif.(41).

3. Les carbapénémases

3.1. Définition :

Les enzymes qui possèdent une activité hydrolytique vis-à-vis des carbapénèmes, les carbapénémases, appartiennent à trois des quatre classes d'Ambler (A, B et D) Comme les

souches qui produisent ces enzymes sont fréquemment résistantes à d'autres classes d'antibiotiques, elles constituent une menace sanitaire par risque d'impasse thérapeutique. L'émergence des carbapénémases chez les entérobactéries au cours de ces dernières années a conduit les autorités sanitaires de certains pays à mettre en place des programmes visant à maîtriser leur diffusion.(43).

3.2. Classes et épidémiologie des carbapénémases

3.2.1. Les carbapénémases de la classe A d'Ambler :

Les carbapénémases de classe A sont partiellement inhibées par l'acide clavulanique (Les enzymes KPC sont les carbapénémases de classe la plus fréquemment identifiées en Bactériologie clinique). Les carbapénémases de type *KPC* sont majoritairement produites par des souches de *K pneumoniae* d'origine hospitalière mais dans une moindre proportion, elles peuvent être isolées chez d'autres espèces d'entérobactéries et chez *P aeruginosa*.(38).

3.2.2. Les carbapénémases de la classe B d'Ambler Les Métallo Lactamases (MBL)

Les carbapénémases de classe B (groupe fonctionnel 3) Les métallo-B-lactamases (MBL) sont essentiellement des enzymes de type IMP (IMiPéménase) ou VIM (VeronaI Mipéménase) responsables d'épidémies hospitalières sévères dans certains pays, Ces MBL possèdent des ions zinc dans leur site actif et hydrolysent fortement toutes les B-lactamines à l'exception de l'aztreonam. Leur activité est inhibée par EDTA.

NDM-1 (New Delhi metallo- B-lactamase 1), identifiée en 2008, est une nouvelle zine-metallo- B-lactamase identifiée dans une souche de *K pneumoniae* et dans une souche d'*E coli*.(38)

3.2.3. Les carbapénémases de la classe D d'Ambler :

Carbapénémases de classe D: L'enzyme OXA-48, initialement décrite dans une souche de *K. pneumoniae* isolée en Turquie (167), hydrolyse faiblement les pénicillines et carbapénèmes mais pas les C3G. Cette particularité la rend difficile à détecter en l'absence d'un autre mécanisme de résistance associé aux B-lactamines. Elle peut être associée à une BLSE, en particulier CTX-M-15 et SHV-12, rendant les souches résistantes à toutes les B-lactamines.(38)

3.3.Epidémiologie

3.1.Classe A

,,,,,Le premier variant de cette famille a été identifié en Caroline du Nord, aux Etats-Unis en 1996 (52), puis a diffusé dans les états voisins de la côte Est des Etats-Unis, à Porto Rico, en Colombie, en Israël, en Grèce et en Chine l'absence de cette famille en Algérie.

La distribution est mondiale, a probablement joué un rôle important dans la diffusion des enzymes KPC-2 et KPC-3 (58–60). Les isolats producteurs de KPC sont actuellement endémiques aux Etats-Unis, en Colombie, en Grèce et en Italie.(44)

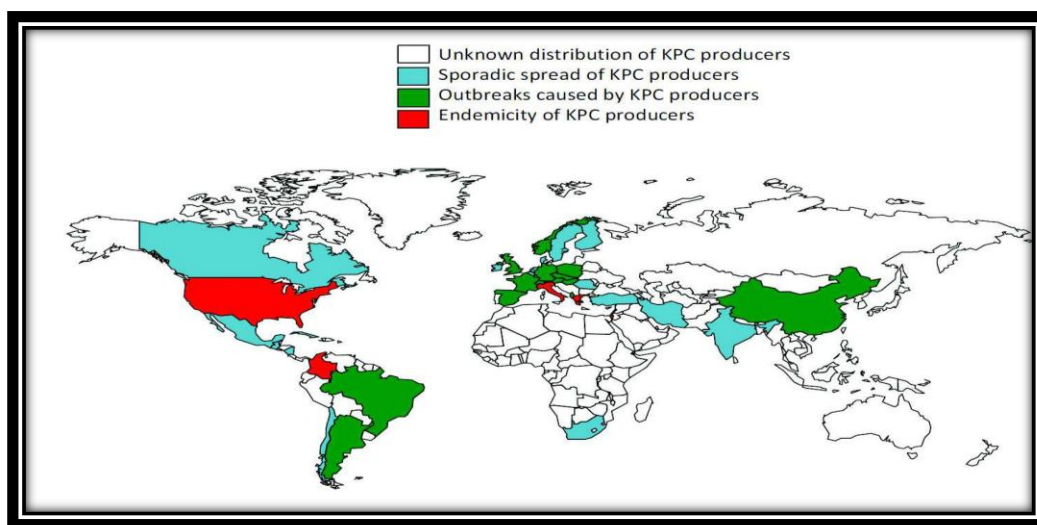


Figure05 : Distribution géographique des isolats producteurs de carbapénémases KPC(44)

3.2.Classe B

VIM-1 a initialement été décrite en 1997 à Vérone, en Italie, chez *P. aeruginosa*. À la fin des années 1990 et au début des années 2000 cette enzyme était principalement rapportée dans des souches du genre *Pseudomonas* responsables d'épidémies dans les hôpitaux italiens ont émergé dans de nombreux pays en Europe Ce pays étant également confronté à une endémicité des carbapénémases de type KPC

On a vu émerger ces dernières années des souches co-produisant les enzymes KPC-2 et VIM-1 (82, 83). L'Espagne, l'Italie et l'Autriche Dans les autres pays européens, aux Etats-Unis, en Afrique du Nord et en Asie du Sud-Est, des cas de portage ou d'infection à entérobactéries productrices de VIM ont été rapportés ces cas étant le plus souvent importés de Grèce

Les enzymes de type IMP ont été les premières MBL acquises décrites. Chez les entérobactéries, le variant IMP-1 a été décrit pour la première fois en 1991 au Japon, chez *S.*

marcescens. Depuis, les enzymes IMP ont été identifiées chez d'autres entérobactéries, chez *P. aeruginosa* et *A. baumannii* dans de nombreuses régions du monde. Toutefois, à l'exception de l'Asie du Sud-Est (44).

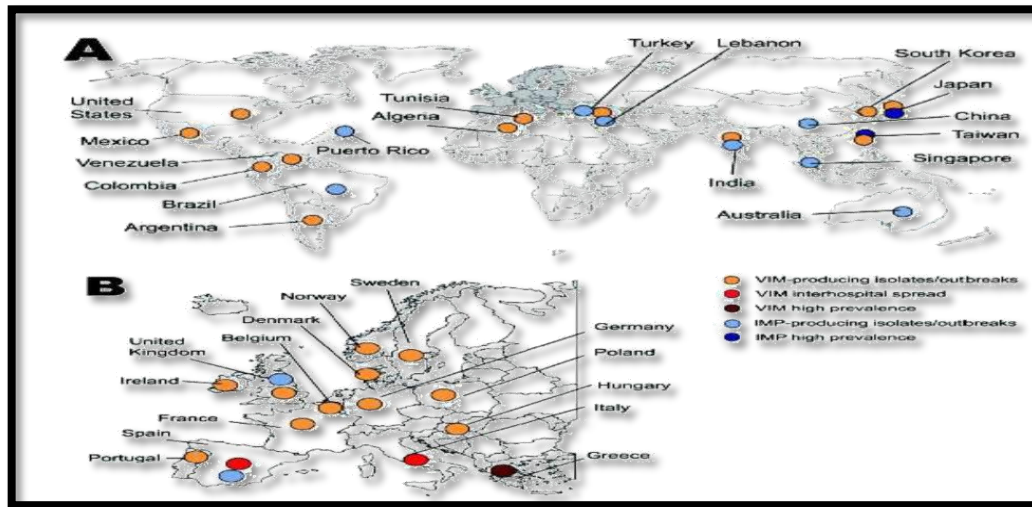


Figure 6 : Distribution géographique mondiale (A) et européenne (B) des EPC de type VIM et IMP (44).

L'enzyme NDM-1 a été décrite pour la première fois en 2008 dans une souche de *K. pneumoniae* chez un patient Suédois ayant séjourné en Inde, pays dans lequel cette enzyme a diffusé très rapidement. Les Balkans, le Moyen-Orient, l'Afrique et la Chine constitueraient des réservoirs secondaires à l'origine de la dissémination de ces enzymes. Depuis 2010, des souches cliniques d'EPC de type NDM impliquant différentes espèces ont été isolées sur tous les continents (44).

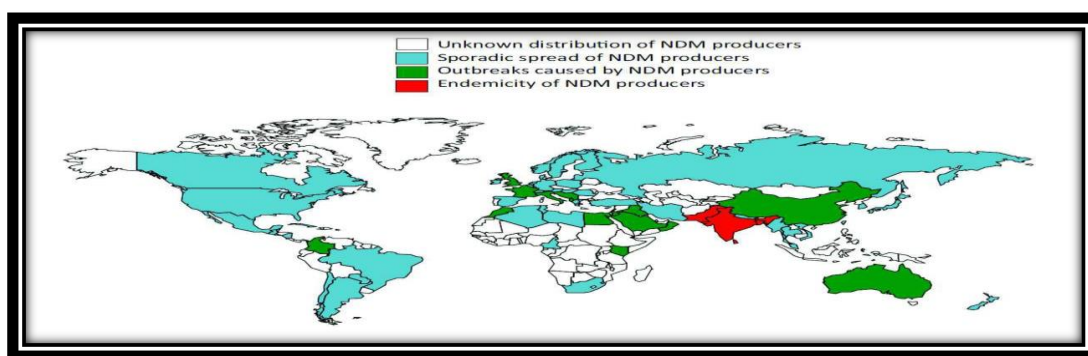


Figure 7. Distribution géographique des isolats producteurs de carbapénémases NDM (44)

3.3. Classe D

L'enzyme OXA-48 a été identifiée pour la première fois en 2003 dans une souche de *K. pneumoniae*, en Turquie. Depuis, les EPC de type OXA-48 ont largement diffusé dans de

nombreux pays du pourtour méditerranéen et semblent actuellement endémiques en Turquie et en Afrique du Nord Leur support génétique est généralement un plasmide du groupe IncL/M, diffusant principalement chez *K. pneumoniae* et *E. coli* . Dans le sous-continent indien,

Trois autres variantes dérivent également de l'enzyme OXA-48. Le variant OXA-204 a été décrit chez plusieurs isolats de *K. pneumoniae* hébergés par des patients ayant un lien avec la Tunisie ou l'Algérie. Le variant OXA-232 a été identifié en France chez des patients rapatriés d'Inde. Les variants OXA-163 et OXA-247 ont récemment émergé en Argentine et, pour OXA-163, en Egypte. Leur capacité d'hydrolyse des carbapénèmes est inférieure à celles de l'enzyme OXA-48 mais leur spectre est élargi vis-à-vis des C3G. Par ailleurs, leur activité est partiellement inhibée par l'acide clavulanique.(45)

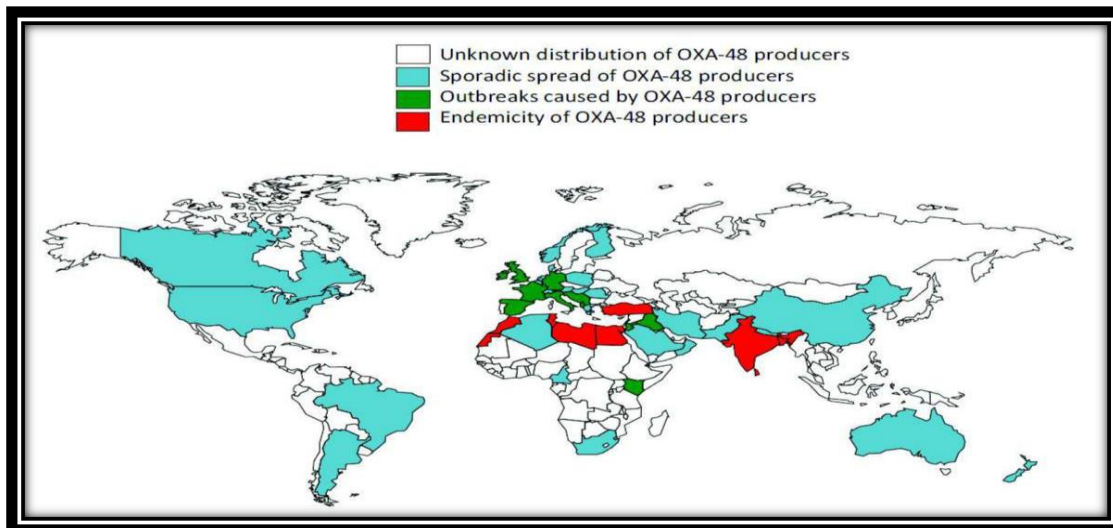


Figure 8. Distribution géographique des isolats producteurs de carbapénémases OXA-48-(45)

1. Cadre de l'étude

Cette étude a été menée en 3 mois de Février à Avril 2019 au laboratoire de microbiologie de l'université de Tébessa. Les prélèvements ont été collectés à partir des eaux usées hospitalières de l'hôpital Kaldi Abd EL-Aziz Tébessa.

Cet hôpital se situe au centre-ville de la wilaya de Tébessa. Il est réservé exclusivement maladies maternelles et infantiles et à la pédiatrie avec une capacité de 120 lits.

Les différentes techniques bactériologiques ont été réalisées au niveau de laboratoires de microbiologie de l'université de Tébessa.

2. Matériel utilisé

Le matériel utilisé dans cette étude sera cité au fur et à mesure des techniques réalisées.

3. Méthodes

3.1 Prélèvement :

10 prélèvements ont été effectués à partir du collecteur final des eaux usées de l'hôpital Khaldi Abd Laziz de la wilaya de Tébessa, des échantillons de 100 ml ont été acheminés au laboratoire une fois par semaine en moyenne durant une période de 03 mois de février à avril 2019.

Les nombres et les dates des prélèvements sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau 01 : le nombre et les dates des prélèvements.

Nombre de prélèvement	La date
Prélèvement n° 1	17 février 2019
Prélèvement n°2	24 février2019
Prélèvement n°3	03 Mars2019
Prélèvement n°4	05 Mars2019
Prélèvement n°5	8 avril 2019
Prélèvement n°6	9 avril 2019
Prélèvement n° 7	14 avril 2019
Prélèvement n°8	22 avril 2019
Prélèvement n°09	23 avril 2019
Prélèvement n°10	28 avril 2019

3.2 Préparation de l'échantillon

Les échantillons d'eaux usées hospitalières ont été filtrés sur une compresse stérile pour éliminer les déchets solides, et ensuite homogénéisés.



Figure09 : les étapes de filtration du prélèvement

3.3 Préparation des dilutions décimales :

Des dilutions successivement décimales de 10^{-1} à 10^{-4} ont été effectuées à partir de l'échantillon dans l'eau physiologique stérile.



Figure 10 : Préparation des dilutions décimales

4. Sélection des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes :

Nous avons mis en œuvre trois méthodes dans notre étude pour la sélection des bactéries résistantes aux carbapénèmes.

4.1. La première Méthode : isolement sur milieu mac conkey additionné d'imipinène et d'ertapénème

L'ensemencement a été réalisé sur milieu mac-conkey une quantité de 0.0001 (1mg) d'antibiotique en poudre (imipenème) et (2mg) (d'ertapenem) a été pesé à l'aide d'une Balance à précision .puis additionnée a 500 ml de milieu stérile en surfusion dans un agitateur pour bien mélangé à poudre et homogénéisé le milieu.

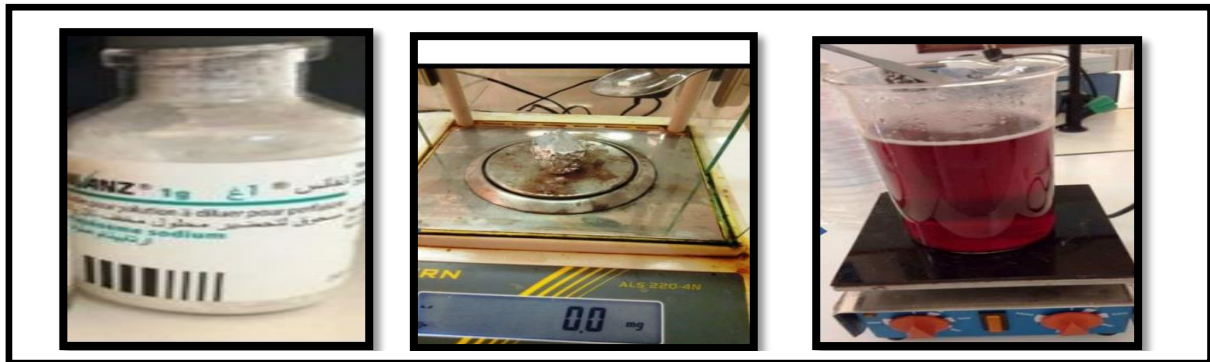


Figure11 : préparation du milieu d'isolement

○ **Ensemencement**

Les dilutions de l'échantillon ont été ensemencées sur une boîte de milieu de culture mac-conkey sans antibiotique comme témoin négatif, et sur les boîtes qui contiennent Le milieu additionné d'antibiotique (imipenème et ertapénème) par des stries à l'aide d'une anse de platine stérile. Après ces boîtes ont été incubé à 37C° pendant 24 h.

○ **Lecture**

Tableau 02 : couleur des colonies sur la gélose mac conkey

Couleur des colonies	Lactose
Rose	Lac+
Incolore	Lac-

Matériel et méthodes

4.2. La deuxième méthode : Bouillon nutritif additionné d'imipénème et d'értapénème :

Cette méthode est basée sur l'addition de 05 ml de bouillon nutritif, puis l'ajout d'un disque de 10 µg d'imipénème afin d'atteindre la concentration de 2 Ug /ml d'imipénème et 01 ml de l'échantillon a analysée.

Dans un autre tube on a mis 10 ml de bouillon nutritif, puis on ajoute un disque d'ertapénème de 10 µg et 01 ml de l'échantillon. Afin d'atteindre la concentration de 1 µg /ml.

Après l'incubation à 37 C° pendant 24 heures, nous avons ensemencé les cultures positives (bouillon trouble) dans le milieu kligler iron agar (KIA) ou mac conkey.

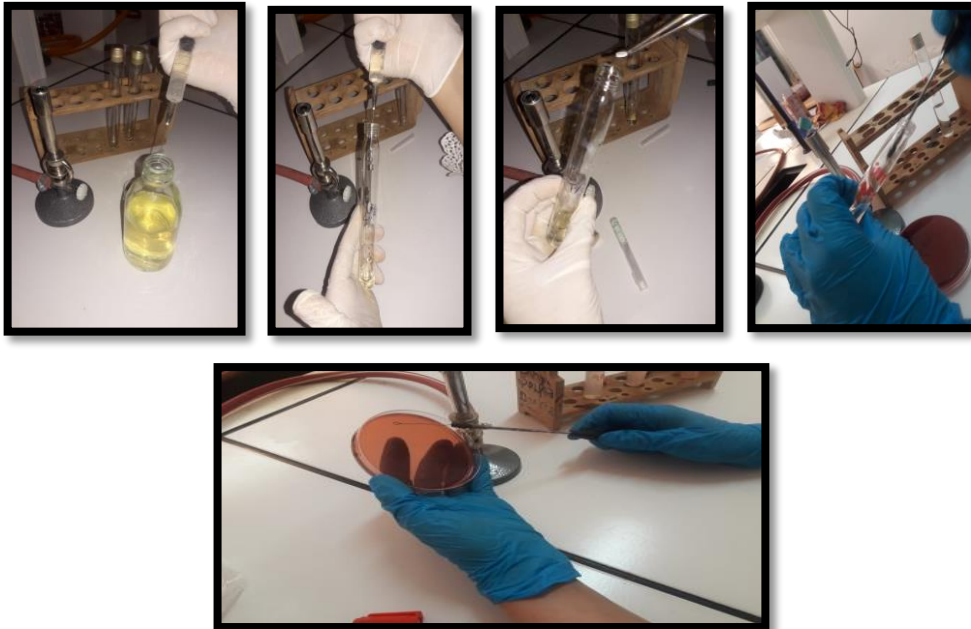


Figure12 : ensemencement de l'échantillon dans un tube de bouillon nutritif contenant disque d'imipénème et ertapénème.

4.3-la troisième méthode : milieu kligler iron agar contenant un disque d'imipénème et d'ertapénème.

Cette méthode est basée sur la préparation d'une suspension bactérienne, puis l'ensemencement à partir de l'échantillon de deux boites contenant le milieu sélectif des bactéries gram négatifs (kia ou Mac conkey par la méthode d'écouvillonnage, Ensuite, l'application d'un disque d'imipénème et d'ertapénème au centre des deux boites. L'incubation a été faite à 37°C pendant 24 heures.

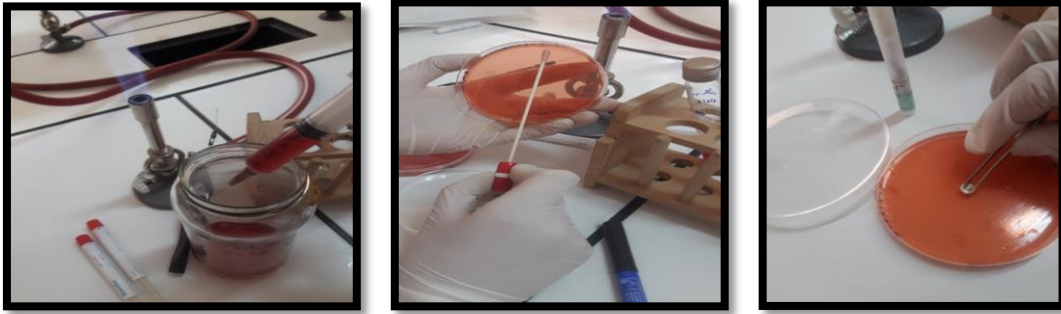


Figure13 : les étapes de l'ensemencement de l'échantillon sur milieu kligler iron agar (KIA) ou mac conkey contenant un disque d'imipenème au centre de la gélose

4.4. Purification des isolats

Les isolats ont été purifiés après plusieurs passages (repiquage plusieurs fois) sur le milieu kligler iron agar, Ensuite, ces isolats ont été conservés dans des tubes de gélose nutritive inclinée pour réaliser une identification et des tests de sensibilité aux antibiotiques ultérieurement.

5. Identification des isolats

5.1. Coloration de Gram

Un frottis fixé à la chaleur, est colorée pendant une minute au violet de cristal ; il est ensuite rincé rapidement à l'eau courante, traité pendant une minute par la solution de lugol et de nouveau rincée rapidement. On soumet alors le frottis coloré à une étape de décoloration on le traitant avec un solvant comme l'éthanol. Il s'agit ici de l'étape critique : la lame est maintenue inclinée et on fait couler le solvant sur le frottis pendant 01 à 03 secondes seulement, jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. Celui-ci est alors immédiatement rincé à l'eau courante. A ce stade, les cellules gram négatives comme les entérobactéries apparaissent sous forme de bacilles roses, les cellules gram positives en violet. On soumet ensuite le frottis à une contre coloration de 30 secondes à la fuschine basique dilué, pour colorer les cellules gram négatives présente. Après un bref rinçage, on sèche le frottis au buvard et on l'examine à l'objectif à immersion (grossissement $\times 1.000$ environ) (46).

5.2. Identification biochimique

5.2.1 Test oxydase

L'oxydase est une enzyme qui catalyse une réaction d'oxydoréduction impliquant une molécule de dioxygène (O₂) comme accepteur d'électrons (48). Sa présence ou son absence représente un des critères systématiques les plus discriminatifs et les plus employés pour l'identification des BGN. Ce test permet de distinguer les entérobactéries, qui sont oxydase négatif, des *Aeromonas*, qui sont oxydase positive, les bactéries du genre *Acinetobacter* sont, en revanche, oxydase négative (49).

5.2.1.1 Technique

La mise en évidence de l'oxydase a été faite selon la méthode des disques d'oxydase qui consiste à :

- Déposer sur une lame un disque d'oxydase, et l'imbiber avec une goutte d'eau physiologique stérile.
- Prélever une colonie à l'aide d'une pipette pasteur et l'étaler sur le disque (48).

5.2.1.2 Lecture

On déduit l'absence d'une cytochrome-oxydase, en 20 à 60 secondes, si rien n'apparaît, cela signifie que la bactérie est oxydase négative et qu'elle ne possède pas l'enzyme respiratoire (cytochrome oxydase).

5.2.2 Api 20 E

Api20E est un système standardisé pour l'identification des entérobactéries et autres Bacilles à Gram négatif non fastidieux. Comportant 21 tests biochimiques miniaturisés ainsi qu'une base de données.

5.2.2.1 Principe

La Galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés ; la suspension bactérienne répartie dans les microtubes dissout les substrats. Après incubation, les réactions sont mises en évidence par les virages colorés spontanés ou par l'ajout de réactif. La lecture de la galerie est faite à l'aide d'un codeur qui transforme automatiquement les 20 résultats des tests biochimiques en nombre de 7 chiffres appelé

« profil numérique » ; l'identification est alors obtenue grâce au catalogue analytique (38).

5.2.2.2 Technique

Préparation de la galerie

- ✓ Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée stérile dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide
- ✓ Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- ✓ Sortir la galerie de son emballage.
- ✓ Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation (47).

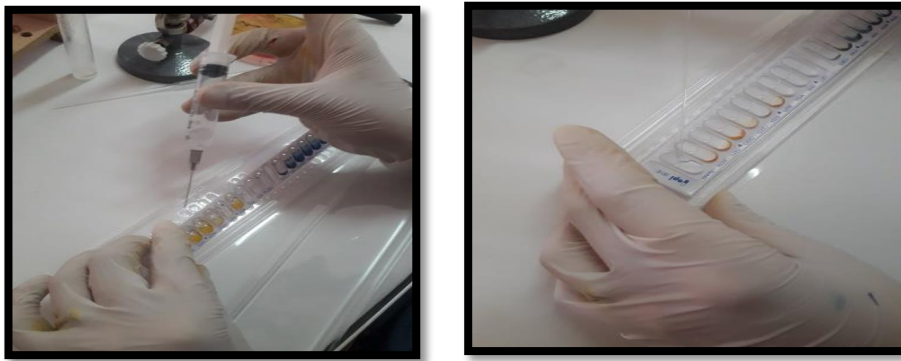


Figure 14: préparation de la galerie API 20 E

Préparation de l'inoculum

Préparer une suspension bactérienne dense dans 10ml d'eau physiologique stérile à partir d'une culture pure et jeune de 18 à 24 h sur GN (47).

Ensemencement de la galerie API 20 E

- Introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette pasteur stérile, pointe appuyée à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation de bulles d'air :
- Pour les caractères soulignés ADH, LDC, ODC, H₂S, URE, ensemercer le tubule par la suspension et la capsule par l'huile de vaseline stérile.
- Pour les caractères encadrés VP, CIT, GEL, ensemercer le tubule et la cupule par la suspension.

Matériel et méthodes

- Pour les caractères non encadrés, non soulignés ensemercer uniquement le tubule par la suspension.
- Refermer la boîte d'incubation et la placer à 37°C pendant 18 à 24 heures (47).

5.2.2.3 Lecture de la galerie :

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture.
- Si trois tests ou plus (test GLU + ou -) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :
 - ✓ **Test TDA** : ajouter une goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
 - ✓ **Test IND** : ajouter une goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
 - ✓ **Test VP** : ajouter une goutte de réactif VP1 et VP2. Attendre au minimum 10 minutes (47).



Figure15 : ajout de réactifs

5.2.2.4 Interprétation

L'identification a été réalisée à 'aide d'un logiciel d'identification feuille Excel pour l'identification microbiennes) (47).

6. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

6.1. Antibiogramme standard

L'antibiogramme standard est un test in vitro de sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques par la technique de diffusion sur milieu gélosé.

- Le test de sensibilité des souches vis à vis 13 antibiotiques (tableau) a été déterminé par la méthode de diffusion sur gélose Mueller Hinton (MH) selon les recommandations du comité française de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (49).

Tableaux 03 : Les antibiotiques utilisés dans notre étude (50).

ABRV	Antibiotiques	Charge du disque	Diameters d'inhibition(mm)		Concentrations critiques mg/L		Famille
			S ≥	R <	S ≤	R >	
CTX	Céfotaxime	30	20	17	01	02	β-lactamines
IPM	Imipénème	10	22	16	02	08	Carbapénèmes
ATM	Aztreonam	30	26	21	01	04	β-lactamines
AML	Ampicilline	30	14	14	08	08	β-lactamines
CEP	Cephalothin	30	18	14	08	16	Céphalosporine
AUG	Amoxicillin/clavulanic Acid	30	19	19	32 ³	32 ³	Pénicillines
ETP	Ertapénem	10	25	22	0.5	01	Carbapénèmes
OFX	Ofloxacin	5	24	22	0.25	0.5	Quinolones
CIP	Ciprofloxacine	5	26	24	0.25	0.5	Quinolones
K	Kanamycine	30	16	13	02	04	Aminosides
AK	Amikacine	30	16	13	08	16	Aminosides
CS	Colistine	10	11	8	02	02	Polymixines
SXT	Triméthoprime-sulfaméthoxazole	25	14	11	2 ³	4 ³	Sulfamides

6.1.1 Technique

- A partir d'une culture visible du prélèvement, réaliser une suspension bactérienne en solution salée.
- Plonger un écouvillon en coton stérile dans la suspension bactérienne et éliminer l'excès de liquide en tournant l'écouvillon sur les parois du tube.
- Ecouvillonner sur la totalité de la surface de la gélose dans quatre directions.
- Déposer les disques à la surface de la gélose inoculée. Les disques une fois déposés ne peuvent être déplacés car la diffusion des antibiotiques est très rapide.
- Incuber les boîtes à 37°C pendant 24 heures **(50)**.



Figure 16: les étapes d'antibiogramme

6.1.2 Lecture et interprétation

Pour chaque antibiotique : mesurer le diamètre de la zone d'inhibition au revers de la gélose. L'interprétation des souches (sensible, intermédiaires ou résistantes) se fait selon les diamètres critiques recommandés par **(50)**.

6.2. détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E-test

Le principe de la CMI par E-test est basé sur la combinaison des deux concepts : dilution et diffusion. Le système E-test consiste en une bande de plastique, non poreuse, calibrée par un gradient préétabli de concentration d'antibiotiques, pour déterminer la CMI en $\mu\text{g/ml}$ d'une souche testée en milieu gélosé. Le gradient couvre une gamme de concentration allant de 0.016 à 256 $\mu\text{g/ml}$ ou 0.002 à 32 $\mu\text{g/ml}$ selon l'antibiotique.

L'inoculum a été préparé en réalisant une suspension de colonies obtenues d'une culture pure de 18 à 24 heures, dans de l'eau physiologique, l'ensemencement a été effectué par écouvillonnage sur la gélose Mueller Hinton. Lorsqu'une bandelette E-test est appliquée sur une boîte de gélose ensemencée, l'antibiotique est immédiatement libéré de la surface du support et se diffuse sur la surface de la gélose. Un gradient continu et exponentiel de concentration en antibiotique se crée juste en dessous du support. Après 18 à 24 heures d'incubation, ce qui rend la croissance bactérienne visible, une ellipse d'inhibition symétrique, axée sur le support, se forme, les bords de l'ellipse d'inhibition indiquent la valeur de CMI, exprimée en $\mu\text{g/ml}$ (38).

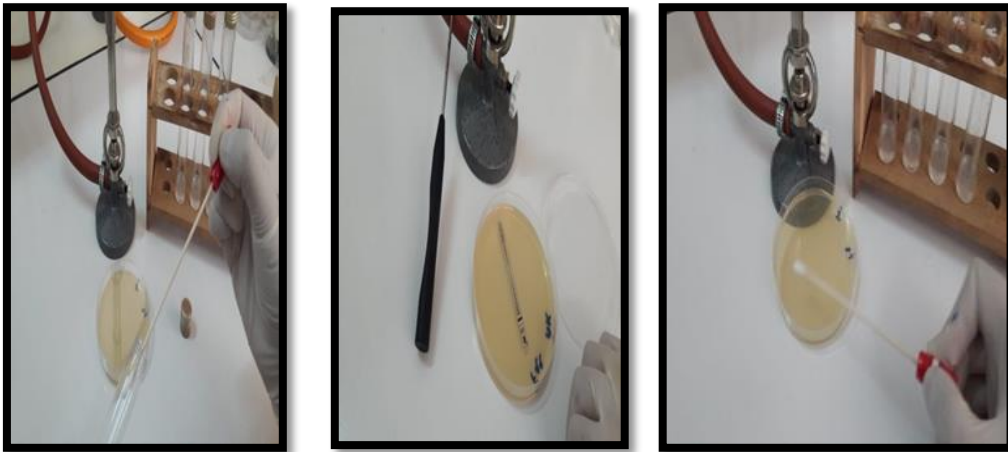


Figure 17: Les étapes d'E-test

1. Souche Bactérienne

Notre étude a porté sur 14 souches de bacilles à Gram négatif résistantes aux carbapénèmes collectés durant une période de 03 mois de février à avril, 10 prélèvements d'eau usée hospitalière ont été réalisés à partir du collecteur final de l'eau usée de l'hôpital Khaldi Abd Laziz de la wilaya de Tébessa. Le tableau montre les résultats de culture des BGN fermentaire pour chaque prélèvement.

Tableau04 : Résultat de culture selon le prélèvement

Prélèvement	Résultat
1	Positif
2	Positif
3	Positif
4	Positif
5	Positif
6	-
7	Positif
8	Positif
9	-
10	Positif

1.1 Aspect macroscopiques des isolats

○ Méthode 01

Après incubation des boîtes de la méthode 01 (mac-conkey additionné d'imipénème et d'ertapénème) nous avons remarqué une poussée bactérienne sous forme de 02 types de colonies:

- Lactose+ : des colonies roses.
- Lactose - : des colonies transparentes.



Figure 19: Aspect de culture selon la méthode 01

○ **Méthode 2 :**

Après incubation l'apparition d'un trouble à l'intérieur des tubes , résultat positive. Exprimant une résistance l'imipénème et ertapénème .



Figure20 : Aspect de culture dans bouillon nutritif

Après ensemencement sur milieu sélectif kligler Mac conkey des BGN nous avons remarqué 02 types de colonies :

- Rose : lactose +
- Transparente : lactose -

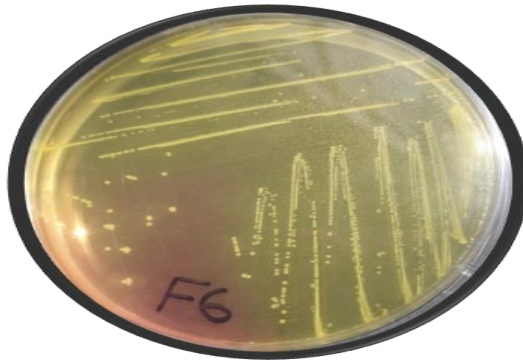


Figure21 :résultat de culture par la méthode 02

○ **Méthode 3**

Nous avons observé après l'utilisation de disque d'imipénème et d'ertapénème au centre de la boîte une mélange de colonies

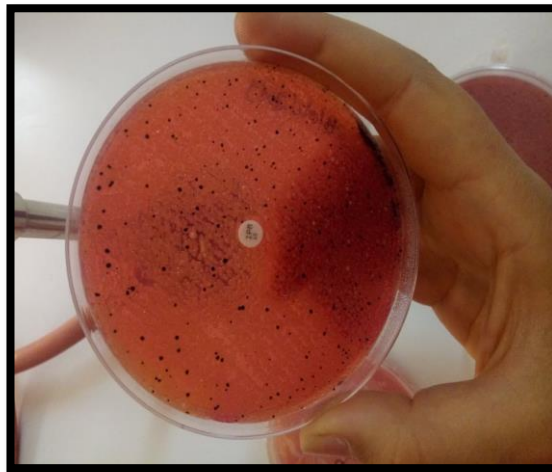


Figure22 : Résultat de culture par la méthode 03



Figure 23 : aspect macroscopique après reisolement de la souche *salmonella* sur kligler iron agar

1.2 Aspect microscopique des isolats

Après coloration de Gram, l'observation microscopique montre des bacilles à Gram négatif (BGN) droits, courts, moyens ou longs, épais ou fins, isolés ou regroupés.

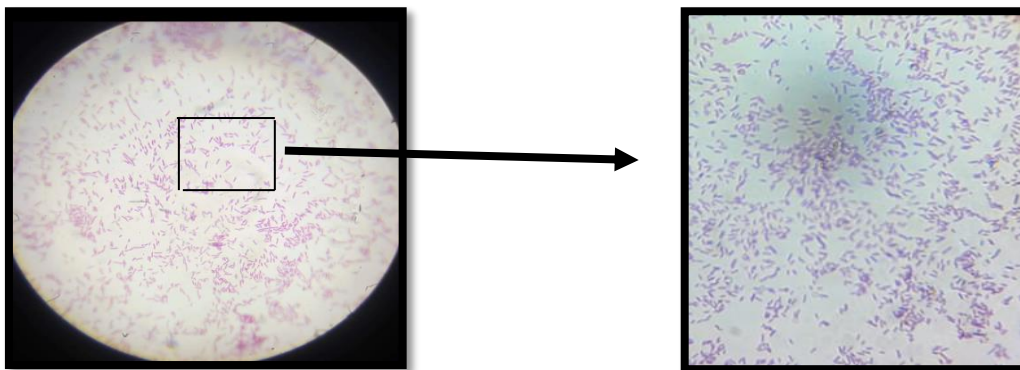


Figure 24 : aspect microscopique des isolats

Résultats

2. Identification biochimique

Tableau 05: Identification biochimique des isolats.

Référence de la souche	Type de souche	Profil numérique
01	<i>Salmonella Arizonae</i>	7704572
02	<i>Enterobacter sakazaki</i>	7357562
03	<i>Escherichia coli 1</i>	7347572
04	<i>Escherichia coli 1</i>	6145572
05	<i>Salmonella Arizonae</i>	3717552
06	<i>Yersinia enterocolitica</i>	0174120
07	<i>Salmonella Arizonae</i>	3544552
08	<i>Morganellamorganii</i>	0170000
09	<i>Escherichia coli 1</i>	5144572
10	<i>Proteus mirabilis</i>	0134000
11	<i>Escherichia coli 1</i>	6145572
12	<i>Serratia odorifera1</i>	7172753
13	<i>Serratia odorifera1</i>	7372753
14	<i>Salmonella Arizonae</i>	7704572

Résultats

3. identification des espèces isolées selon le prélèvement

3.1 Test d'oxydase

Rien n'apparaît pour la totalité des souches isolés, cela signifie que les bactéries sont oxydase (-) et qu'elles ne possèdent pas l'enzyme respiratoire (cytochrome oxydase).



Figure 25 : Résultat de teste oxydase de la souche *E.coli* (références de souches 10)

3.2. Distribution des souches isolées selon les prélèvement

Tableau06 : identification des entérobactéries selon les prélèvements

N° de prélèvement	Espèces	Référence de la souche
01	<i>Salmonella Arizonae</i> <i>Escherichia coli 1</i>	01 02
02	<i>Enterobacter sakazaki</i>	03
03	<i>Escherichia coli 1</i>	04
	<i>Escherichia coli 1</i> <i>Salmonella Arizonae</i>	05 06
05	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Salmonella Arizonae</i>	07 08
06	/	/
07	<i>Morganellamorganii</i> <i>Escherichia coli 1</i>	09 10
08	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Escherichia coli 1</i>	11 12
09	/	/
10	<i>Serratia odorifera1</i> <i>Salmonella Arizonae</i>	13 14



Figure 26: le résultat d'identification biochimique par API20E de l'espèce *Escherichia coli 1* (Référence de souche 04)

Résultats

3.3 distribution des souches isolées selon les espèces

Tableau 07 : Effectif et pourcentage des souches selon les espèces

GENRE	EFFECTIF	POURCENTAGE
<i>Escherichia coli 1</i>	<u>04</u>	26.66%
<i>Salmonella arizonae</i>	<u>04</u>	26.66%
<i>Serratia adorifera</i>	<u>02</u>	13.33%
<i>Enterobacter sakazakii</i>	<u>01</u>	6.66%
<i>Morganella morganii</i>	<u>01</u>	6.66%
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<u>01</u>	6.66%
<i>Proteus mirabilis</i>	<u>01</u>	6.66%

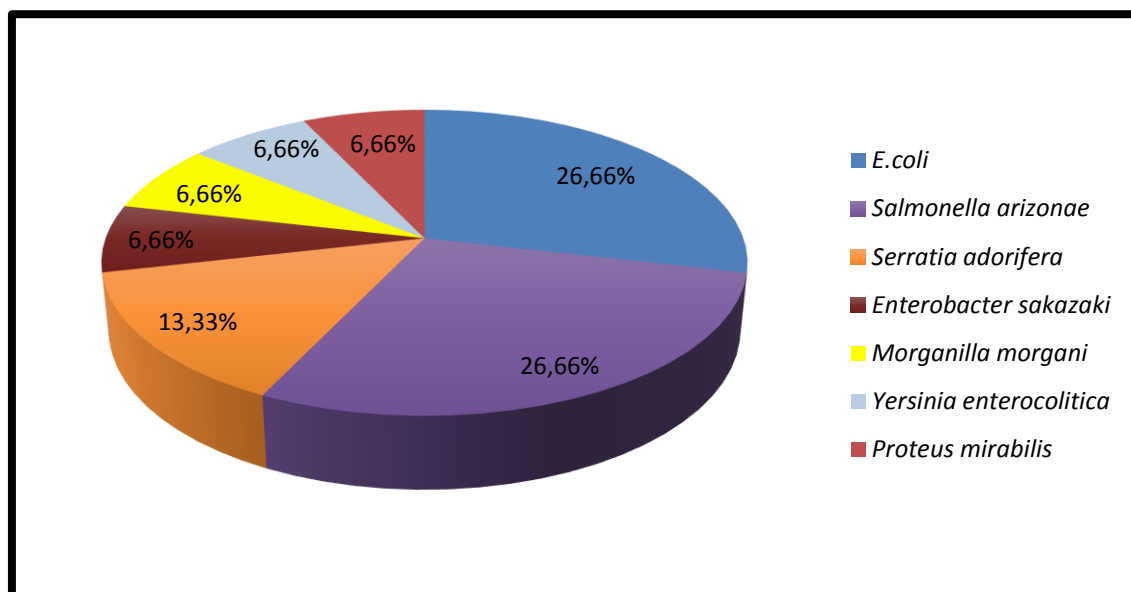


Figure30 : Distribution des entérobactéries selon les espèces .

Parmi le totale des souches isolées l'espèce *Escherichia coli 1* et *salmonella arizonae* représentent la fréquence le plus élevée (26.66%) avec un nombre 04 souches de la totalité 14 souches

Résultats

La fréquence de l'espèce de *Serratia adorifera* 1 (13.33%) avec un nombre de 02 souches isolées, et les espèces *enterobacter sakazaki*, *morganella morganii*, *proteus mirabilis*, et *yersinia enterocolitica* avec fréquence de(6.66%).

4. Biotypage

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

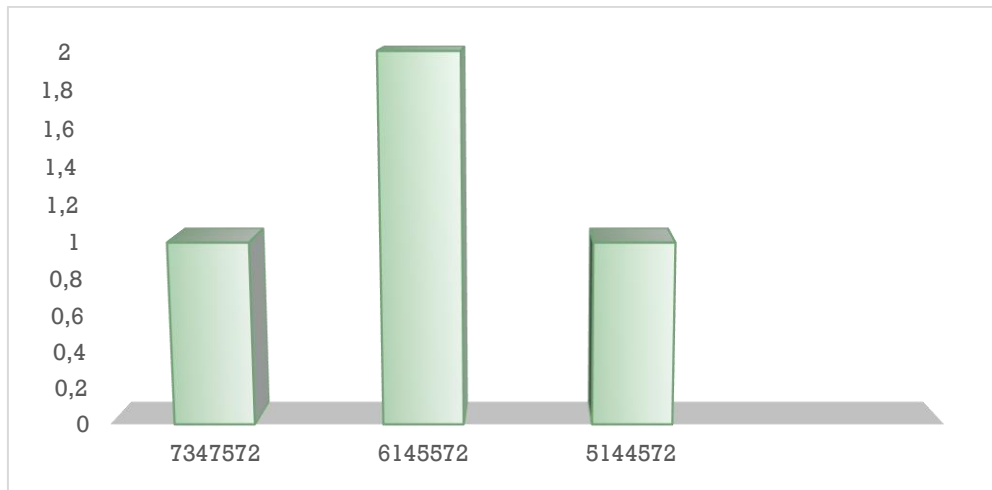


Figure 32: Fréquence des profils numériques en API 20E des souches d'*E. coli* 1.

Le profil numérique le plus abandon est 6145572(2 souches),suivis par les fréquences 7347572 et 5144572 (une souche).

4.2. Biotypage des souches de salmonella Arizona selon les profils numériques en API 20 E

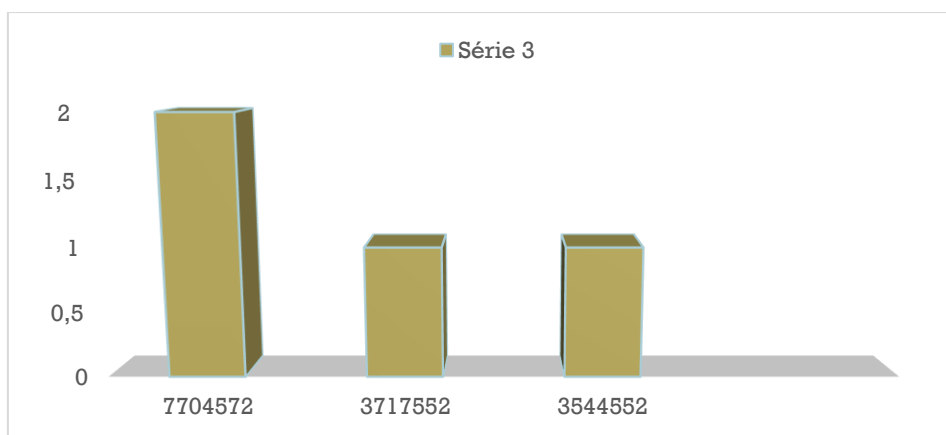


Figure33 : Fréquence des profils numériques en API 20E des souches salmonella Arizonae.

Résultats

Le profil numérique le plus abandon est 7704572 (2souches), suivis par les fréquences 3717552 et 3544552 (une souche).

Le profil numérique le plus abandon est 7172753 (2souches), et 7372735(2souches)

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

Les profils de sensibilité aux ATB des souches testées sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 08 : Taux des souches sensibles et résistants.

Famille d'ATB	ATB	R		S	
		Effectif	%	Effectif	%
β-lactamines	Céfotaxime	14	100%	00	0%
	Aztreonam	05	35.71%	09	46.29%
	Ampicilline	14	100%	00	0%
Carbapénemes	Ertapénem	14	100%	00	0%
	Imipénème	05	35.71%	09	46.29%
Céphalosporine	Cephalothin	14	100%	00	0%
Pénicillines	Amoxicillin/clavulanic Acid	14	100%	00	0%
Quinolones	Ofloxacine	12	85.71%	02	14.29%
	Ciprofloxacine	10	71.42%	04	28.57%
Aminosides	Amikacine	04	28.57%	10	71.42%
	Kanamycine	06	42.86%	08	57.14%
Polymixines	Triméthoprime-sulfaméthoxazole	09	46.29%	05	35.71%
Sulfamides	Colistine	09	46.29%	05	35.71%

Résultats

Tableau 09 :le profile détaillé de chaque souche isolées :

Souche	ATB codes	AML	AUG	CTX	CEP	IM P	A K	CIP	K	ATM	ETP	OFX	SXT	CS
<i>Salmonella Arizona</i>	F1	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	S	R	S
<i>Enterobacter Sakazaki</i>	F2	R	R	S	R	S	S	R	R	S	R	R	R	R
<i>Escherichia Coli 1</i>	F3	R	R	S	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S
<i>Escherichia Coli 1</i>	F4	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S
<i>Salmonella Arizona</i>	F5	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R
<i>Yersinia enterocolitica</i>	F6	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
<i>Salmonella Arizona</i>	F7	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	R
<i>Morganella Morganii</i>	F8	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	S	R
<i>Escherichia Coli 1</i>	F9	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R
<i>Proteus Mirabilis</i>	F10	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
<i>Escherichia Coli 1</i>	F11	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R	S	S
<i>Serratia Odorifera 1</i>	F12	R	R	S	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R
<i>Serratia Odorifera 1</i>	F13	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
<i>Salmonella Arizona</i>	F14	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S

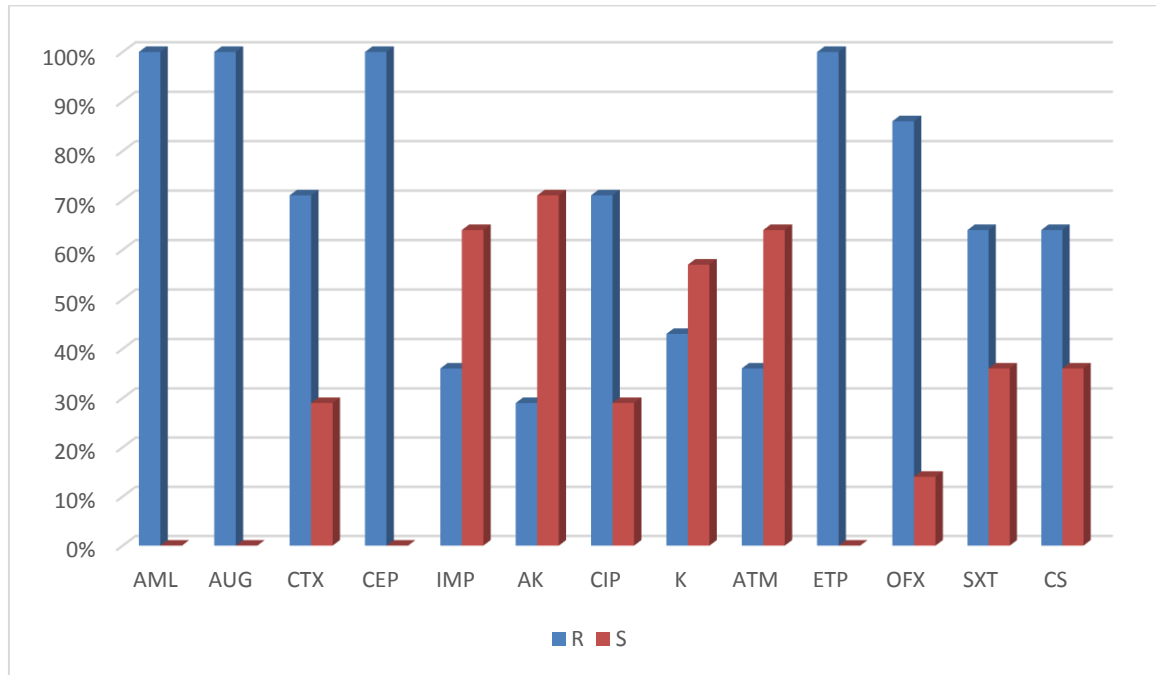


Figure35 : Sensibilité aux antibiotiques des 14 souches isolées vis-à-vis les antibiotiques testés.

R : résistant, S : sensible

Après l'étude de profil de résistance aux antibiotiques de 14 souches des *entérobactéries*, nous avons noté une résistance élevée vis-à-vis tous des bêta-lactamines : (100%). Céfotaxime (71.42%), Aztréonam (28.57%) amoxicilline + l'acide clavulanique, (100%). et à la céphalosporine (100%).

Concernant La résistance aux carbapénèmes nous avons remarqué que toutes les souches ont une forte résistance à l'ertapénème (100%) et (35%) à l'imipénème. Par ailleurs, une résistance remarquable pour les quinolones : ofloxacine (85.71%) et ciprofloxacine (70%), et une résistance pour les sulfamides de (64.28%). Pour les aminosides nous avons remarqué une faible résistance au kanamycine (36%) et pour la colistine (Polymixines) (71%).

Résultats

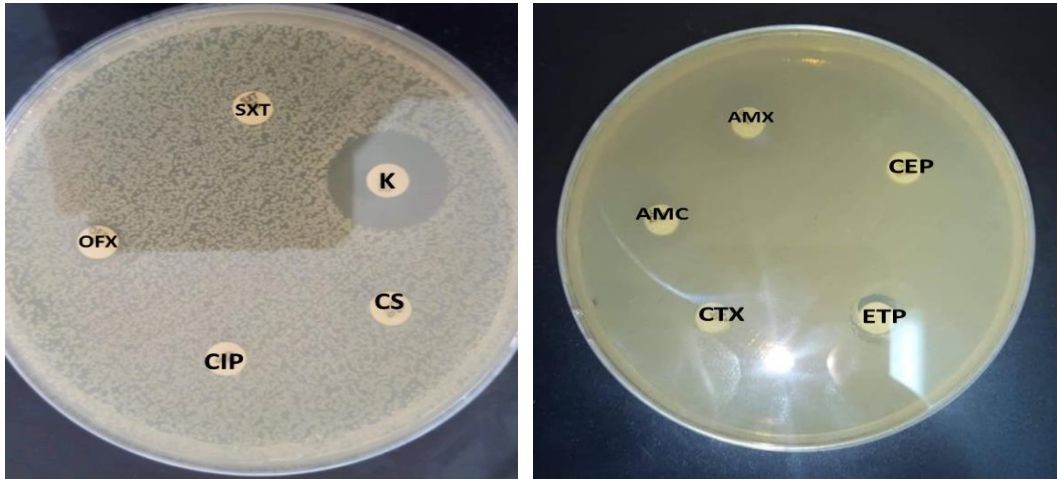


Figure 36 : résultat de l'antibiogramme de la souche *serratia odorifera*(référence de souche 13)

SXT : triméthoprim-slfamétozole ;

CS :colistine ;k :kanamycine ;CIP :ciprofloxacine ;OFX :ofloxacine ;ETP :erapénemes ;

AUG :amoxicilline+l'acide clavulanique ;CEP :cephalothin ;AMC :

ampicilline ;ATM :aztrenom

6. détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des principales familles d'antibiotiques

Les souches de notre sélection ont montré un niveau de résistance très élevée aux β -lactamines ;05 souches étaient résistantes a l'imipénème avec des (CMI) comprise entre 08 ug/ml et 32 ug/ml ,concernant les aminosides 04 souches étaient résistante au Gentamicine avec une (CMI) de 32 ug/ml a 48 ug /ml ,la majorité des souches étaient résistantes aux fluroquinolones qui étaient résistantes a la ciprofloxacine avec une (CMI) de 0.5 a 1.5 ug /ml Finalement , les plupart des souches étaient résistantes aux triméthoprim-sulfamétocazole avec des (CMI) de > 32ug / ml.

Résultats



Figure 33 :E-Test triméthoprime-sulfaméthexazole (SXT) de la souche *serratia odorifera* (référence de la souche13) >32 ug/ml



Figure 34 :E-Test imipénème (IMP) de la souche *serratia odorifera* (référence de la souche13) >32ug/ml



Figure36 :ETest Gentamicine (GM) de la souche *Escherichia coli* 1 (référence de la souche11) 32 a 48 ug/ml

Résultats

DISCUSSION

Discussion :

Les entérobactéries multirésistantes constituent un danger pour la santé humaine à cause des options de traitement limitées disponibles ; les hôpitaux sont un élément clé qui favorise l'émergence et la dissémination de ces bactéries. L'utilisation à grande échelle d'antibiotiques en milieu hospitalier a contribué à une augmentation des résidus d'antibiotiques. Par conséquent, les eaux usées peuvent servir de voie de transfert des déterminants de résistance bactérienne des hôpitaux dans l'environnement (51).

La propagation des bactéries Gram négatif multirésistantes est devenue un problème mondial. Leur prévalence augmente, tant dans les hôpitaux que dans l'environnement (51). Les carbapénèmes sont considérés comme le traitement de dernier choix cependant l'utilisation de ces médicaments a contribué à l'émergence de la résistance à ces antibiotiques ce qui peut conduire à un échec thérapeutique (52).

La surveillance des effluents hospitaliers pour les BMR pourrait avoir des applications importantes dans la détection et la gestion des risques de la diffusion non reconnue dans le milieu des soins de santé et d'environnement.

A la région de Tébessa il existe seulement une étude réalisée en 2018 qui porte sur la résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées des effluents hospitaliers au niveau du collecteur final des eaux usées de l'hôpital Khaldi Abd Laziz de la ville de Tébessa (53).

L'objectif de cette étude était d'identifier les entérobactéries productrices des carbapénèmases et de déterminer le niveau de résistance à différentes familles d'antibiotiques et de comparer nos résultats avec l'étude précédente dans le but de suivre l'évolution du phénomène de la résistance aux antibiotiques dans le même collecteur.

Durant une durée de 3 mois d'étude, les souches bactériennes résistantes aux carbapénèmes ont été isolées, à partir des prélèvements des eaux usées de l'hôpital Mère et enfants Khaldi Abd Laziz Tébessa. Tous les échantillons ont été examinés pour la production de carbapénèmases.

Durant la période d'étude les prélèvements ont été analysés. Les isolats ont été sélectionnés sur milieu MacConkey et Kligler iron agar additionnés d'antibiotiques (Imipénème, Ertapénème) pour l'isolement des entérobactéries productrices des carbapénèmases.

Dans notre étude nous avons trouvés 14 souches qui ont poussé sur les milieux sélectifs. Ces résultats indiquent que les souches isolées des eaux usées hospitalières produisent des

DISCUSSION

carbapénèmes, ceci peut être due à l'utilisation massive des carbapénèmes à l'hôpital par ce qu'ils sont de plus en plus utilisés dans le monde entier car c'est souvent le médicament de dernier recours (54).

Dans notre étude nous avons sélectionné quatre souches d'*Escherichia coli* 26.66% de l'ensemble des 14 souches des entérobactéries résistant, ce résultat est très proche à celui trouvé en Côte d'Ivoire 34.7% en 2013 (55). par ailleurs il est plus élevé que celui trouvé en France 19% en 2016 (56).

Il a également été conclu que : *E. coli* a été le principal vecteur de la résistance aux antimicrobiens en flore fécale.

Une étude menée sur les eaux de surface en Australie a indiqué que plus de 50 % des isolats d'*E. coli* dans les eaux de surface sont susceptibles d'avoir été provenus des eaux usées soulignant l'importance du traitement des eaux municipales considéré comme une source potentielle de pathogènes dans les eaux de surface (57).

L'espèce *Salmonella enterica arizonae*, c'est la deuxième bactérie prédominante dont nous avons sélectionné 4 souches 26.66% de l'ensemble des entérobactéries isolées dans notre étude ; cette bactérie *Salmonella enterica* a été déjà décrite dans les eaux de surfaces et les ressources d'eau dans les régions agricoles du Canada, des États-Unis et de l'Argentine pour un résultat : entre 9 % - 14 % ; 8 % et 8,8 % respectivement. Ces derniers résultats sont plus bas par rapport au résultat présenté par notre étude qui lui aussi reste plus bas par rapport au taux de détection de *Salmonella* dans l'eau des rivières de Taïwan (rivière Puzih et rivière Kaoping) qui était de 31,7 à 42,2 % entre les années 2010 et 2011 (58).

L'isolement de *Salmonella spp* à partir d'échantillons cliniques et environnementaux de *Salmonella enterica* isolées en Arabie saoudite ; a présenté *Salmonella enterica Arizona* d'une fréquence de 12,1 % (59).

Deux souches de *Serratia odorifera* 13.33% ont été sélectionnées dans notre étude, cette bactérie a été déjà décrite dans les effluents hospitaliers lors d'une étude réalisée à El Madinah Al Mounwarah en 2008, par contre la majorité des études ont rapporté l'espèce *Serratia marcescens* comme représentant du genre comme celle en Pologne de fréquence 1.3%. Ce résultat semble logique par ce que le genre *Serratia* est connue par sa haute résistance au stress

DISCUSSION

environnemental particulièrement aux agents antiseptiques qu'on trouve dans les eaux usées hospitalières (60).

L'émergence des souches multirésistantes dans les hôpitaux est souvent signalé comme un problème de santé majeur, en particulier β -lactamase produisant du *Proteus mirabilis*, qui pourrait être considéré comme le plus important agent pathogène opportuniste responsable des infections nosocomiales et communautaires ; Nos résultats démontrent une souche de *Proteus mirabilis* productrices des carbapénèmases et BLSE . Un taux de 9% de production de β -lactamases déclaré en tunisie durant une étude de 2010 à 2013. Ce n'est pas le cas pour la Communauté européenne, y compris l'Espagne, l'Allemagne et la Belgique qui ont déclaré un faible taux de BLSE 1,2 % entre août 2013 et Janvier 2014 (61).

Nous avons remarqué une diversité d'espèces d'entérobactéries productrice de carbapénèmases (EPC) isolées dans notre étude à savoir une souche d'*Enterobacter* qui a été isolé dans notre étude, ce résultat est proche de celui observé en Pologne (2009) 4.0% (51).

Une souche de *Morganella morgani* 6.66% a été isolée ; Notre résultat est proche à celui trouvé lors d'une étude réalisée à Bejaia 5,30% en 2013 (62).

et une souche de *Yersinia entérolitica* , Ce résultat est proche de celui rapporté également à Bejaia 6.45% en 2017 (63).

Les souches de *Proteus* , *Morganella* et *Serratia* productrices de carbapénèmases sont naturellement résistantes à la colistine, Ces bactéries Extensively drug resistant (XDR) ont limité d'avantage le choix thérapeutique. Le problème majeur de ces souches productrices de carbapénèmases c'est la résistance naturelle à la colistine qui est considéré comme la dernière option thérapeutique des EPC, Dans la présente étude nous avons remarqué une souche d'*Escherichia coli* résistante à la colistine. Dans ce contexte cette résistante est inquiétante, car la colistine est le médicament de dernier choix pour le traitement des infections causée par *E. coli* productrices de carbapénèmases (65).

Par ailleurs Plusieurs études ont montré que de différentes classes d'antibiotiques se trouvent dans l'environnement et de nombreuses espèces d'organismes peuvent ne pas recevoir une attention particulière. A cet égard, la résistance aux différentes familles d'antibiotiques : les β .lactamines ; les carbapénèmes ; les aminosides ; pourraient déclencher une perturbation écologique importante. Bien que certaines études suggèrent que le risque de propagation de la résistance aux antibiotiques dans les eaux usées des hôpitaux est limitée (66).

DISCUSSION

Dans la présente étude les entérobactéries isolées avaient une résistance remarquable aux bêta-lactamines : les 14 souches sélectionnées étaient résistantes à l'amoxicilline ; à l'amoxicilline + acide clavulanique résistante aux céphalosporines aux 1 ère génération 1(C1G) (cephalothin) 100%, ainsi que 10 souches étaient résistantes aux céphalosporines de 3eme génération (C3G) (céfotaxime) ce résultat est inférieur à celui trouvé en Pologne ; Les souches d'*Enterobacteriaceae* isolées des effluents hospitalières en olsztyn trouvé également en Pologne 95,2 % étaient résistantes au céfotaxime **(67)**. Par ailleurs nos résultats sont très élevés comparés avec ceux rapportés en Portugal : une résistance à la céfotaxime de 22%, à l'amoxicilline +acide clavulanique 43.5%, et pour Aztrioname 21.3% **(68)**.

; De plus nous avons constaté que cinq souches 36% ont résisté à l'imipeneme, ce résultat est plus élevé par rapport à celui trouvés dans une étude en France en 2016 ou des souches résistantes à l'imipénème ont été détectées à un taux de 16.81%, Quatre souches 29% ont résisté aux aminosides ce résultat est plus bas que celui trouvé dans la même étude réalisée en France en 2016 dont 60% des isolats étaient résistantes aux aminosides **(69)**.

Ainsi qu'une autre étude réalisée en 2018 à Tébessa avec un taux de résistance plus élevé aux aminosides 72% **(53)**.

Neuf souches 86% ont résisté aux sulfamides et dix souches 71% ont résisté aux fluoroquinolones qui sont d'un niveau très élevés par rapport à celui trouvées au Portugal 21.1% et 14.1% pour sulfamides et fluoroquinolones respectivement à partir d'un prélèvement des eaux usées hospitalières en 2015 **(68)**.

La totalité de nos souches d'*E.coli* ont marqué une résistance faible 25% aux fluoroquinolone , Ce résultat est plus bas que celui trouvé dans une étude réalisée en 2018 à Tébessa avec un taux de résistance de 65% **(53)**.

Notre résultat est proche de celui trouvé à la cote d'ivoire 29.4% **(55)**.

Concernant les souches de *Salmonella arizonae* trois souches isolées sont hautement résistantes à tous les bêtalactamines : l'amoxicilline, l'amoxicilline+acide clavulanique, le céfotaxime et l'ertapénème ce qui signifie une production très élevés de BLSE et de carbapénèmases une souche a résisté également l'imipénème Une telle résistance élevée de *Salmonella* isolée des eaux usées hospitalière indique un risque élevé de contamination de l'environnement. Des isolats de *Salmonella* multirésistants provenant des eaux usées ont également été observés dans d'autres études **(70)**.

DISCUSSION

La totalité de nos souches de *Serratia odorifera* et de *Morganilla morgani* ont résisté à tout β -lactamines(céfotaxime,aztreonam,ampicilline,amoxicilline+acide clavulanique) y compris l'imipénèmes et aux autres familles d'antibiotiques (sulfamides et quinolones) .ce résultat est similaire à celui trouvé des souches isolées à AL-Madinah Al-Mounwwarah ou toutes les souches 100% étaient résistantes à l'imipénème, *Serratia odorifera* et *Morganilla morgani* qui sont naturellement résistantes aux colestine . Le taux de résistance de *Serratia odorifera* dans une étude réalisé en 2018 à Tébessa vis-à-vis les différentes familles d'antibiotiques était le suivant 100% à l'Ertapénème, 65% à l'mimipénème,60% aux aminosides, 65% aux quinolones et 100% aux sulfamides) **(53)**.

Ces souches multirésistantes limitent d'avantage Les options thérapeutiques des infections nosocomiales causées par les entérobactéries ; Toute résistance aux carbapénèmes chez les entérobactéries, indépendamment du mécanisme, est un problème clinique et thérapeutique. Mais les souches productrices de carbapénèmases portées par des structures génétiques mobiles sont un problème plus inquiétant encore par le risque de dissémination qu'elles leur confèrent. Pour cela il est devient indispensable de développer des techniques simple et rapide de dépistage des carbapenemases afin de contrôler la désamination des souches multirésistantes **(71)**.

Concernant la recherche d'entérobactéries productrices de carbapénèmases, il n'existe pas actuellement de milieu qui soit à la fois très sensible et très spécifique. Dans l'état actuel des connaissances, il est donc recommandé d'ensemencer le prélèvement sur un milieu sélectif utilisé pour l'identification de souches productrices. En outre, L'identification de telles bactéries doit également faire l'objet d'un signalement car le nombre est en perpétuelle évolution **(71)**.

En Irlande, comme dans de nombreux pays d'Europe, les effluents des hôpitaux sont généralement rejetés non traités dans les eaux usées urbaines pour être traités dans une usine de traitement des eaux usées avant d'être rejetés dans l'environnement. Le traitement des eaux usées urbaines vise principalement à éliminer les contaminants organiques et inorganiques ; toutefois, il n'est pas conçu pour éliminer les résidus d'antibiotiques ou les BRA .Des bactéries résistantes aux antimicrobiens ont déjà été détectées dans les effluents traités des usines de traitement des eaux usées urbaines **(70)**.

DISCUSSION

L'organisation mondiale de la santé (OMS) recommande que les hôpitaux disposent d'installations sur place pour le traitement des effluents hospitaliers avant leur rejet dans le flux général des eaux usées afin d'éliminer la présence de composants dangereux, y compris les agents pathogènes microbiologiques, les médicaments radioactifs, les produits chimiques toxiques et les antibiotiques. Au cours des dernières années, certains pays, dont l'Allemagne et le Danemark, ont commencé à traiter sur place les effluents des hôpitaux pour l'élimination de tous les contaminants nocifs avant leur rejet dans le flux général d'eaux usées. Malheureusement, en raison des coûts élevés et des défis opérationnels associés au traitement sur place des effluents hospitaliers, les progrès dans ce domaine ont été lents dans de nombreux autres pays (70).

Comprendre les risques associés aux antibiotiques multirésistants dans l'environnement est essentiel pour clarifier comment les pressions de sélection environnementale peuvent attribuer à des problèmes accrus d'infections causées par des bactéries résistantes (70).

Les bactéries multirésistantes (BMR) qui cumulent de nombreuses résistances acquises posent des problèmes particuliers : diffusion épidémique, circulation des patients ou animaux porteurs, mode de transmission, menace de diffusion des gènes de résistance impliqués à d'autres espèces bactériennes. Les BMR, par leur fréquence ou leurs conséquences thérapeutiques, tant à l'hôpital que dans l'environnement, justifient une surveillance spécifique chez l'homme, à l'hôpital et dans la communauté, chez l'animal et dans l'environnement. Cette surveillance permet d'aider à la prise de mesures et d'apprécier l'impact des mesures de préventions. En outre, les risques importants consistent en la possibilité d'un transfert horizontal de gènes de résistance à d'autres bactéries à proximité et la possibilité de contact direct avec les résidus d'antibiotiques présents dans les eaux usées (69).

Après le processus du traitement des effluents, les eaux usées se déversent dans les rivières, les microbes se propagent dans l'environnement, et ceux-ci pourraient potentiellement coloniser la faune (69).

Enfin, notre étude tire l'alarme sur la propagation des bactéries MDR dans l'environnement à partir des eaux usées hospitalières non traitées et espérons sensibiliser les autorités algérienne afin d'établir un système de traitement de déchets bactériologiques dans nos hôpitaux avant d'être jetés dans le réseau d'assainissement.

DISCUSSION

conclusion

Conclusion

L'analyse bactériologique des eaux usées hospitalières de l'hôpital Kheldi Abd Laziz de Lawillaya de Tébessa a révélé d'abord une diversité pour les espèces d'entérobactéries productrices de carbapénémases,

l'analyse bactériologique de 10 prélèvements d'effluent hospitaliers a permis d'isoler 14 souches d'entérobactéries et a montré la prédominance de l'espèce *Escherichia coli*. L'identification de ces souches bactériennes a montré la prédominance de l'espèce *Escherichia coli* suivie par *Serratia odorifera* et *Salmonella arizonae* ; des pathogènes opportunistes qui colonisent souvent les effluents hospitaliers qui constituent un milieu de culture riche pour la prolifération des entérobactéries .

Une résistance élevée de toutes les souches à la majorité des classes d'antibiotiques cliniquement pertinents y compris les carbapénèmes et la colistine.

Enfin nos résultats signalent le risque de propagation de ces bactéries multirésistantes et leurs gènes de résistance dans l'environnement.

En définitif, les BMR par leur fréquence ou leurs conséquences thérapeutiques, justifient une surveillance spécifique dans l'environnement.

Cette surveillance permet d'aider à la prise de mesures et d'apprécier l'impact des mesures de préventions. En outre les risques importants consistent en la possibilité d'un transfert horizontal de gènes de résistance à d'autres bactéries à proximité et la possibilité de contact direct avec les résidus d'antibiotiques présents dans les eaux usées.

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. **Denis F. et Ploy M.-C. (2007).** Bactériologie médicale: techniques usuelles. Elsevier Masson. p 316-318.
2. **(Dortet.et al., 2013).** Paris, p257-235 identification des entérobacteries productrices de carbapénémases. Feuillet de Biologie, 312
3. **Avril J, Monteil H et al. (2011).** Bactériologie clinique. 2ème édition.
4. **Delarras C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Edition Techniques et Documentation Lavoisier, Paris. p.128-129,247
5. **Larpen J.P. (2000).** Introduction à la nouvelle classification bactérienne. Les principaux groupes bactériens. Edition Technique et Documentation Lavoisier. Paris. p280.
6. **Morice V. (2003).**Chapitre 7 - Entérobactéries et autres bacilles à Gram négatif non exigeants.
7. **Decoster A. (2005).**Entérobactéries . FLM. p. 1–16. 8-Avril J-L, Dabernat H, Denis F, Monteil H. Bactériologie clinique. 2000. 602 p.
8. **Nauciel C.(2001).** Bactériologie médicale. 275 p.
9. **Jean P ., (1998).** Collection Médecine-Sciences. Paris. ISBN 2-257-16399-0.1030 p.
10. **11-Larpen J.P. (2000).** Introduction à la nouvelle classification bactérienne. Les principaux groupes bactériens. Edition Technique et Documentation Lavoisier. Paris. p280.
11. **Saint D., (2002).** Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche des Salmonella spp.27 p.
12. **Bruxelle .(2004).** Programme de surveillance pour la réduction de la prévalence de Salmonella. 473-481P.
13. **Pierre., (2002).**Bacteriologies Niveau DCEM1. P122
14. **Vaaje-Kolstad G et al. , (2010).**An Oxidative Enzyme Boosting the Enzymatic Conversion of Recalcitrant Polysaccharides . Vol 330 . 219 – 222 P
15. **Van R., Givskov M et al., (2007).** Quorum sensing in Serratia.FEMS Microbiology Reviews.407-424P.

Références bibliographiques

16. **Minor L. et Veron M. (1989)** bactériologie médicale 2e édition Edition Flammarion Medical Science. Paris p312-459
17. **Williams & Wilkins, Baltimore MD (1986).** Bergey's Manual of Systemic Bacteriology, Vol. I & II.
18. **Mayank Gangwar et al (2015)** .Antibiogram and Genotypic Analysis using 16S rDNA after Biofield Treatment on *Morganella morganii*, Dahryn Trivedi.
19. **Prescott W. Sherwood. Woolverton. (2013).** Microbiologie. 4e Edition. P: 536,539.
20. **Chaby R. (2010).** Des endotoxines aux lipopolysaccharides. Edition Lavoisier. P: 38-39
21. **F Rejsek. (2002).** Analyse des eaux: Aspects réglementaires et techniques. Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine (CRDP). Bordeaux. 358 p. 136).
22. **Emmanuel, Evens. (2003).** Evaluation des risques sanitaires et écotoxicologiques liés aux effluents hospitaliers. INSA de Lyon.
23. **EMMANUEL E. PERRODIN Y. (2001).** Caractérisation chimique, biologique et écotoxicologique des effluents hospitaliers. Déchets Sciences et Techniques, revue francophone d'écologie industrielle, 22:31-33.
24. **Bennets, F. 2000.** Effluents du CMH de CAEN : Etude qualitative et quantitative de la flore microbienne et recherche de bactéries multirésistantes poster. 4^{ème} journée du réseau régional d'hygiène de basse-Normandie, Caen-1P.
25. **Guessened J., et al. 2013.** Etude des bactéries multirésistantes des effluents hospitaliers d'un centre hospitalier et universitaire CHU de la ville d'Abidjan (côte d'Ivoire). Journal of applied bioscience. Vol (69) : 5456-5464
26. **Toze S. (1997)** . Microbial pathogens in wastewater , Literature Review for Urban Water Systems . Multi - divisional Research Program , Technical Report N 1 / 97 , p . 7 - 8 .
27. **Baumont S. (2004)** . Rutilisation des eaux usées purées : risques et faisabilité en Ile de France , Rapport de stage . ENSAT (Toulouse) , p . 19.
Elimination des effluents liquides des établissements hospitaliers
Recommandations"1999. Institut Biomédical des Cordeliers, Paris, 74p.
28. **Hallouet, P. (2016).** Antibiotiques Méga Mémo IFSI, 1050-1056.
Actualités pharmaceutiques, 53, S1-S5.
29. **Jean. C et al (2012)** . pharmacie clinique et thérapeutique 4^{ème} édition Elsevier Masson 795-816.
30. **Vallée M et al (2018).** résistance bactériennes : que doit savoir l'urologue ? Progrès en urologie-FMC.

Références bibliographiques

31. **Jean-L, Aboya M, (2013).** Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes issue de morinda morindoides, thèse de doctorat : science agricoles, Brest, université de Bretagne occidentale 214P., 02.
32. **Gerard J, berdell R. Christine L. (2012).** Introduction à la microbiologie. 2^{ème} Edition, RENOUVEAU PEDAGOGIQUE, Québec, canada P 843-852
33. **P. Bustany . P et al (1993)** internat nouveau programme tome,17 pharmacologie P69-71.
34. **Belbel Z. (2017).** Etude Bactériologique et Moléculaire de *Klebsiella pneumoniae* : Support génétique de la résistance aux antibiotiques des souches isolées en Algérie.
35. **Meyer J. Deiam A,(2008).** Cours de microbiologie générale 2^{ème} Edition, doin , paris, P 250-251.
36. **Briskier A. (1999).** fluoroquinolones (1) classification, propriétés physicochimiques activité antibactériennes et pharmacocinétiques. Encyclo Méd chir, Maladies infectieuses 8004-B-10.
37. **Dortet, L., Nordmann, P. et al (2013).** Epidémiologie, détection et identification des entérobactéries productrices de carbapénème ses. Feuillet de Biologie, 312.
38. **-Wolff, M., Joly-Guillou, M. L. (2008).** Le point sur les carbapénèmes. Réanimation, 17,242-250.
39. **Wang H, Dzink-Fox J, Chen M, Levy SB. (2001).** Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of acrR mutations. Antimicrob Agents C Les profils de sensibilité aux ATB des souches testées hemothér.
40. **Yigit H. Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle Jw Tenover FC (2001).** carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 45:1151-6.
41. **Alix P .(2015).** Multirésistance des entérobactéries aux antibiotiques Modulation de l'influx et de l'efflux membranaires chez *Escherichia coli* ST131. Thèse de doctorat : Microbiologie. université De Montpellier. Epidmiologie D ET B .
42. **Singleton,P . 2005.**Bacteriologie /pour la medcine,la biologie etles biotechnologies.6^{ème} éditioib .paris/Dunod.541 .ISBN :2100488732-
43. **BioMérieux**
44. **Denis,F.,etal.2017.**BacteriologieMedical :the cechniqueusuelles.PARIS. Elsevier MassonSAS.640.

Références bibliographiques

45. Corvaglia, AR .2006.Rôle des résidu d'antibiotique dans les environnements hydrique sur la selection et la diffusion de bactéries résistantes des genres *Aeromonas*, *Acinetobacter* et *Legionella*. Thèse de doctorat en science/Biologie. Université de Genève.230.
46. CA-SFM (2018)antibiogramme en diffusion .Recommandation technique et Guide d'interpritarion Communiqué du comitè de l4antibiogramme de la société.
47. (Korzeniewska, E., &Harnisz, M. (2013). Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive Enterobacteriaceae in municipal sewage and their emission to the environment. *Journal of Environmental Management*, 128, P 904–911)
48. (Nordmann, P., & Carrer, A. (2010). Les carbapénèmases des entérobactéries. *Archives de Pédiatrie*, 17, S154–S162.)
49. Messai k. (2018). Identification des *Enterobacteriaceae*multirésistantes isolées des effluents hospitalières. Mémoire de master : microbiologie, Tébessa, 83P.
50. Renoué, A., et al. 2017. Revue de la pertinence des prescriptions de carbapénèmes au sein d'un centre hospitalo-universitaire, 18es journée national d'infectiologie/ médecine et maladie infectieuses. Vol (47). P 38-52.)
51. HocquetD.,et al .2016. What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems. *Journal of wastewater systems journal of hospital infection*. 93, P 395-402
52. Martins A. et.,allIdentification and antimicrobial resistance prevalence of pathogenic *Escherichia coli* strains from treated wastewater effluents in Eastern Cape, South Africa.,*MicrobiologyOpen* 2016; 5(1): 143–151
53. Ho, Y et al (2018). The association of *Salmonella enterica* from aquatic environmental and clinical samples in Taiwan. *Science of The Total Environment*, 624, 106–113.
54. El-Tayeb, M. A et al (2017). Prevalence, serotyping and antimicrobials resistance mechanism of *Salmonella enterica* isolated from clinical and environmental samples in Saudi Arabia. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(3), P 499–508.
55. Diab, A. M.,et al. (2008). Tracing of Gram-negative antibiotic-resistant bacteria in hospitals final effluent at Al-Madinah Al- Mounwwarah. *Journal of Taibah University for Science*, 1(1), 24–33.
56. .Hadjer B., et al (2019) Molecular drivers of emerging multidrug resistance in *Proteus mirabilis* clinical isolates from Algeria,P 1-27.

Références bibliographiques

57. **Kari N. Laifaoi S. (2013)** Etude de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles a gram négatifs isolé a partir des effluents de deux hôpitaux de la wilaya de Bejaia. Mémoire de master, microbiologie. Bejaia ; université de Bejaia 49P.
58. **Hammami N et Boulbina R.(2017)** Recherche des bacilles à gram négatif multirésistante aux antibiotiques dans les effluents hospitalières.Mémoire de master ; microbiologie . Bejaia, université Abderrahman Mira.P64.
59. **Belbel ,Z., et al. 2018.** First report of colistin résistance in an OXA-48 and a CTX-M-15 producing *klebsiellapneumoniae* clinical isolate in Algeria due to PmrB protein modification and mgrB inactivation. Journal of global antimicrobial resistance. Vol (14) P 158-160.
60. **Berto, J et al. (2009).** Physico-chemical, microbiological and ecotoxicological evaluation of a septic tank/Fenton reaction combination for the treatment of hospital wastewaters. Ecotoxicology and Environmental Safety, 72(4), 1076–1081
61. **Korzeniewska E et al., 2013.** Bêta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in hospital effluents Environ manage.Jul15 ; P 1-7.
62. **Amador PP., et al (2015).** Résistance aux antibiotiques dans les eaux usées : apparition et devenir des producteurs de *enterobacteriaceae* des β - lactamase de classe A et classe C Journal of Environnement science and health,Vol . 50 issues 1, P 26-39.
63. **Ory, J.,et al (2016).** Ciprofloxacin residue and antibiotic-resistant biofilm bacteria in hospital effluent. Environmental Pollution, 214, 635–645.
64. **Masarikova, M et al . (2016).** *Salmonella enterica* resistant to antimicrobials in wastewater effluents and black-headed gulls in the Czech Republic, 2012. Science of The Total Environment, 542, 102–107.
65. **Cahill, N., et al, (2019).** Hospital effluent: A reservoir for carbapenemase-producing Enterobacterales? Science of the Total Environment. P 618-624.
66. **Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., & Larsson, D. G. J. (2017).** Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. FEMS Microbiology Reviews, 42(1).
67. **Dolejska, M.,et al. (2011).** CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella spp.* isolates in municipal wastewater treatment plant effluents. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 66(12), 2784–2790.
68. **Masarikova, M et al . (2016).** *Salmonella enterica* resistant to antimicrobials in wastewater effluents and black-headed gulls in the Czech Republic, 2012. Science of The Total Environment, 542, 102–107.

Références bibliographiques

69. Nordmann, P, & Carrer, A. (2010). Les carbapénèmases des entérobactéries. Archives de pédiatrie, 17, S154-S162. L, & Poirela.
70. (Dortet.et al., 2013). Epidémiologie .détection identification des entérobacteries productrices de carbapénémases. Feuilletts de Biologie, 312

Annexes

Annexes 01

Tableaux de lecture de L'API 20E

Les testes	Résultat négatif	Résultat positif
ONPG	Incolore	Jaune
ADH	Jaune	Rouge/orangé
LDC	Jaune	Rouge/orangé
ODC	Jaune	Rouge/orangé
CIT	Vert pâle	Bleu vert –bleu
H2S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir
URE	Jaune	Rouge/ orangé
TDA	Jaune	Marron/rougeâtre
IND	Incolore /vert pale/jaune	Rose
VP	Incolore/rose pâle	Rose/rouge
GEL	Non diffusion	Diffusion de pigment noire
GLU	Bleu/bleu-vert	Jaune/jaune grise
MAN	Bleu-vert/bleu	Jaune
INO	Bleu-vert/bleu	Jaune
SOR	Bleu-vert/bleu	Jaune
RHA	Bleu-vert/bleu	Jaune
SAC	Bleu-vert/bleu	Jaune
MEL	Bleu-vert/bleu	Jaune
AMY	Bleu-vert/bleu	Jaune
ARA	Bleu-vert/bleu	Jaune

Annexes

Annexes 2

Tableaux : caractères biochimique des 14 souches isolées

14	13	12	11	10	09	08	07	06	05	04	03	02	01	Isolat Test
+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	<u>ONPG</u>
+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	<u>ADH</u>
+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	<u>LDC</u>
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<u>ODC</u>
+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	<u>CIT</u>
+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	<u>H2S</u>
+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	<u>URE</u>
-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	<u>TDA</u>
+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	<u>IND</u>
+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	<u>VP</u>
+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	<u>GEL</u>
+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<u>GLU</u>
+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	<u>MAN</u>
-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<u>INO</u>
+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	<u>SOR</u>
+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	<u>RHA</u>
+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	<u>SAC</u>
+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	<u>MEL</u>
-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<u>AMY</u>
+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	<u>ARA</u>

Annexes



Figure : le résultat d'identification biochimique par API20E de l'espèce *Salmonella Arizonae* (Référence de souche 01)



Figure : le résultat d'identification biochimique par API20E de l'espèce *Salmonella Arizonae* (Référence de souche 01)

Annexes 03

1. milieu kligler

1.1préparation du milieu

Mettre en suspension 52g du milieu déshydraté dans un litre d'eau distillé bien mélanger et chauffer en agitant fréquemment .Faire bouillir une minute en l'autoclave 121c°pendant 15min

2. Gélose Nutritive (GN)

2.1. Composition

- Extrait de viande : 1,0g
- Extrait de levure : 2,5g
- Peptone : 5,0g
- Chlorure de sodium 5,0 g
- Agar: 15,0 g pH: 7,0

Annexes

2.2.préparation

20,0 g dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée. Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution. Répartir en tubes ou en flacons. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes

3. Gélose Mac Conkey

3.1. .Composition

Peptone: 20,0 g Lactose : 10,0 g Sels biliaries : 5,0 g Cristal violet: 0,001 g Rouge neutre : 0,075 g Chlorure de sodium : 5,0 g Agar: 12,0 g

3.2. Préparation

Suspendre 52g dans 1 litre d'eau distillée. Porter à ébullition pour dissoudre complètement Stériliser à l'autoclave à 121°C pour 15 minutes. Verser dans des boîtes de Pétri stériles

4. Gélose Mueller-Hinton

4.1Définition

La gélose Mueller–Hinton est un milieu solide standardisé recommandé pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux agents antimicrobiens par la méthode de diffusion ou de dilution en gélose

4.2. Composition

- Peptones 3,0
- Hydrolysate de caséine 17,5
- Agar 15
- Ca²⁺20 - 25 mg/L
- Mg²⁺10 - 12,5 mg/L
- pH final 7,4 ± 0,2
- Suppléments : + 5%
- sang de mouton (pour le milieu MHB) ou 5% sang de cheval (pour le milieu MHF) β-NAD (pour le milieu MHF) 20 mg/

Annexes

4.3. Préparation du milieu :

Homogénéiser la poudre contenue dans le flacon. Mettre 35 grammes de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau fraîchement distillée. Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète

5. Bouillon nutritif :

5.1 Définition

Le Bouillon Nutritif est un milieu largement utilisé pour la culture des micro-organismes peu exigeants. Il est recommandée dans de nombreuses méthodes standardisées d'analyses des aliments, des laitages, de l'eau et d'autres produits.

5.2. Composition

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée

- .Peptone5,00
- Extrait de viande3,00
- pH final à 25°C : $6,8 \pm 0,$