

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة سعيدة مولاي الطاهر
Université de Saïda, MOULAY Tahar



كلية العلوم

Faculté des Sciences

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

N° d'Ordre

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

En Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

Recherche des bactéries multirésistantes dans les effluents de établissement hospitalier spécialisé HAMDANE Bakhta de la wilaya de Saïda

Présenté par :

- Melle : HOCINE Kamilia
- Mme : MEKKATI Khadidja

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

Président

Mr. BENREGUIG Mokhtar

MCA à USMT

Examineur

Mr. BELLIL Yahia

MCA à USMT

Rapporteur

Mr. BENABBOU Taha Ahmed

MCB à USMT

Année universitaire 2022/2023

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة سعيدة, مولاي الطاهر

Université de Saida, MOULAY Tahar



N° d'Ordre

كلية العلوم

Faculté des Sciences

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

En Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

**Recherche des bactéries multirésistantes dans les effluents de
établissement hospitalier spécialisé HAMDANE Bakhta de la
wilaya de Saida**

Présenté par :

- Melle : HOCINE Kamilia
- Mme : MEKKATI Khadidja

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

Président

Mr. BENREGUIG Mokhtar

MCA à USMT

Examineur

Mr. BELLIL Yahia

MCA à USMT

Rapporteur

Mr. BENABBOU Taha Ahmed

MCB à USMT

Année universitaire 2022/2023

Dédicaces

Je dédie ce travail

A ma chère mère, qu'est la personne grâce à tes paroles, tes conseils je devienne ce que je suis aujourd'hui, et les mots sont insuffisant pour j'explique mes sentiments pour toi, et ce que je peux dit que le Dieu pitié d'elle.

A mon cher papa, qu'est m'encourager afin de réalise ce travail.

A mon cher frère Abdou, merci pour ton soutien et grâce à toi je n'ai jamais l'abandonner et je te l'aime toujours

A ma tante H. Ouardia qu'est comme une deuxième mère a mou je l'apprécie tes sacrifices et ton amour

A ma copine et ma sœur khadija et son fils Djoud

A mes grands parents

A tous la familles Hocine

A mes cousins et mes cousines

Tous les enfants de la famille et surtout Mehdi, Feriel, Yahia, Iman, Sara, Inass.

Tous simplement, a tous ceux que j'aime et que m'aiment.

Kamilia

Dédicace

Je dédie ce mémoire

A ma chère mère, grâce à ses prières et sa présence avec moi je ne serai pas devenue qui je suis aujourd'hui merci maman, la prunelle de mes yeux

A mon soutien et cher père

A mon mari, mon supporter qu'était comme un bras protecteur qui m'a fait couronner d'un sentiment merveilleux, m'aide sur cette voie

Et de façon particulière à mon fils Djoud et ma copine kamília qu'était comme ma sœur

A mes chers frères et ma sœur

Et toutes la famille Hakem et Mekkatí

Et en général a tous les membres de ma famille sans exception qui m'ont donné l'impuissance moral dans mon travail

Khadija

Remerciements

Tout d'abord, nous nous remercions Dieu « Allah » Tout Puissant, le Généreux et le miséricordieux pour nous avoir donné la force, la patience, la volonté et le courage de terminer ce modeste travail, et pour nous avoir guidé vers la lumière de la recherche du savoir et de la science.

Nous tenons en premier lieu à exprimer nos sincères remerciements à notre encadreur Taha Ahmed BENABBOU pour avoir accepté diriger ce travail, pour ses conseils, son aide, ses suggestions sur la rédaction de ce mémoire ainsi que la confiance qu'il nous a témoigné tout au long de cette étude. Tout au long de la réalisation de ce mémoire, nous avons pu apprécier son enthousiasme, son savoir-faire, sa pédagogie, son sens de communication. Nous avons beaucoup apprécié la confiance qu'il vous nous a toujours accordée, et grâce à laquelle nous vous avons bénéficié d'une grande liberté dans notre travail. Merci pour ces bons moments.

Nous sommes particulièrement nous remercier Mr Benruguig Mokhtar notre enseignant et chef de départements de la faculté de science de la nature et la vie.

Nous sommes particulièrement reconnaissantes à Mr Benruguig Mokhtar d'avoir accepté de juger ce travail en tant que présidente ainsi que, Mr Bellil Yahia, de bien vouloir évaluer et examiner ce mémoire. Et tous les enseignants de département des sciences de la nature et de la vie.

Nous remercier Mr Bellil Yahia qui nous se aides dans certaines difficultés leur de la réalisation de notre partie expérimentale au niveau de laboratoire.

Enfin nous remercier tous ceux qui nous avons aidée de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Liste des abréviations

ATB : Antibiotiques

A. hydrophila : *Aeromonas hydrophila*

ADH : Arginine dihydrolase

AMY : Amygdaline

ARA : Arabinose

AUG : Augmentin

ARNr16s : Acide ribonucléique ribosomique 16 s

BMR : Bactéries multi résistances

BN : Bouillon nutritif

BEA : Bile esculine agar

B: beta

BLSE : Bêta- lactamase à spectre

CAZ, Ce : Ceftazidime

CN : Gentamicine

C : Chloramphénicol

Co : Colistine

CO₂ : Dioxyde de Carbone

C : Cytosine

C: Celsius

C. koseri : *Citrobacter koseri*

CIT : Tri sodium citrate

DCO : demande chimique en oxygène

DBO₅ : demande biochimique en oxygène pendant 5 jours

DBO : Demande biochimique en oxygène

E. feacalis : *Enterococcus feacalis*

E. faecium: *Enterococcus faecium*

ED: Eau distille

EMP: Eosine Bleu de méthylène

G: guanine

INO: Inositol

IND: Indole

IMP: Imipénème

I: Intermediaries

H₂: Hydrogene

H₂S: Sulfure d'hydrogène

LDC: Lysine decarboxylase

MC: Mac conkey

Mg: Milligrammes

MSE: Mayeux, Sandine et Elliker

MEL: Melibiose

MAN: Mannitol

NTU: Unité de turbidité néphélogétries

NAG: N acétyle glucosamine

NaCl : Chlorure de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

ODC : Ornithine décarboxylase

ONPG : L'orthonitrophényl-β-galactoside

P. rettgi : *Providencia rettgi*

P. fluvialis : *Proteus fluvialis*

P. mirabilis : *Proteus mirabilis*

P. ponneri : *Proteus ponneri*

P. hauseri : *Proteus hauseri*

P. cibarus : *Proteus cibarus*

P. calumbae : *Proteus calumbae*

P. terrae : *Proteus terrae*

RHA : Rhamnose

R : résistance

SAC: Saccharose

SOR: Sorbitol

TSE: Tryptone sel eau

TDA: Tryptophane

TE : Tétracycline

VP: Sodium pyruvate

URE: urease

IND: indole

Gel: gelatinase

Glu: glucose

Man: mannose

INO: inositol

Sor: sorbitol

S: Sensible

SXT: Triméthoprim - sulfaméthoxazole

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification des entérocoques	19
Tableau 2: Les antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme	37
Tableau 3 : Résultats de la galerie API 20 E de la souche Co3	48
Tableau 4: Résultat de la galerie API20E de la souche Ce11	49
Tableau 5: Résultat de la galerie API20E de la souche Ce13	50
Tableau 6 : Résultat de la galerie API20E de la souche Ce 14	52
Tableau 7 : Résultat de la galerie API20E de la souche Co8	53
Tableau 8 : Résultats de l'identification des souches par galerie API 20E.	54
Tableau 9: Concentration minimale inhibitrice ($\mu\text{g}/\text{mL}$) des souches à Gram négatif vis-à-vis des différents antibiotiques.	58
Tableau 10: Concentration minimale inhibitrice ($\mu\text{g}/\text{mL}$) des souches à Gram positif de <i>Enterococcus spp</i> vis-à-vis des différents antibiotiques.	58

Liste des figures

Figure 1 : Dendrogramme ARNr16s de la position phylogénétique de genre <i>Enterococcus</i>	18
Figure 2: Arbre phylogénique du genre <i>Enterococcus</i> reposant sur le séquençage par ARNr16s	19
Figure 3: Aspect microscopique optique (x 1000) de <i>E. faecium</i> après coloration de Gram	21
Figure 4: Paroi bactérienne du <i>E. faecalis</i> (Thiercelin and E., 1899).....	22
Figure 5: Mode d'action des antibiotiques	25
Figure 6: Les différents mécanismes de résistance chez les bactéries du genre <i>Enterococcus</i>	28
Figure 7: Échantillon d'eau d'effluents hospitaliers de l'hôpital HAMDANE Bakhta	30
Figure 8: Site de prélèvement	30
Figure 9: Aspect de la galerie API20E avant incubation.....	34
Figure 10: Préparation de gel d'agarose pour électrophorèse.	40
Figure 11: Chargement des échantillons d'ADN dans les puits du gel d'agarose.....	41
Figure 12: Configuration du générateur d'électrophorèse et du système d'électrophorèse	42
Figure 13: Aspect des colonies sur le milieu MacConkey :(a) avec la Ceftazidime et (b) avec la Colistine	46
Figure 14: Aspect des colonies sur le milieu Slantez et Bartely en présence de la Vancomycine.....	46
Figure 15: Aspect microscopique de la souche Co3 (coccobacille) et V1 (cocci) au grossissement X 1000	47
Figure 16: Résultat du test de catalase pour la souche Co3.....	48
Figure 17: Résultat de la galerie API20E de la souche Co3	49

Figure 18: : Capture d'écran de l'affichage de grille d'identification de la souche Co3 par le site web https://lab.upbm.org	49
Figure 19: Résultat de la galerie API20E de la souche Ce 11.....	50
Figure 20: Capture d'écran de l'affichage de grille d'identification de la souche Ce11 par le site web https://lab.upbm.org	50
Figure 21: Résultat de la galerie API20E de la souche Ce13	51
Figure 22: Capture d'écran de l'affichage de grille d'identification de la souche Ce13 par le site web https://lab.upbm.org	51
Figure 23: Résultat de la galerie API20E de la souche Ce 14	52
Figure 24: Capture d'écran de l'affichage de grille d'identification de la souche Ce14 par le site web https://lab.upbm.org	52
Figure 25: Résultat de la galerie API20E de la souche Co8	53
Figure 26: Capture d'écran de l'affichage de grille d'identification de la souche Co8 par le site web https://lab.upbm.org	53
Figure 27: Détermination de la CMI des souches vis-à-vis de la colistine par la méthode de dilution en milieu solide.	57
Figure 28: Détermination de la CMI de la souche Ce9 vis-à-vis la colistine par la méthode de dilution en milieu liquide (micro-dilution).....	57
Figure 29: Taux de résistances des souches aux différents antibiotiques.....	70
Figure 30: Production des BLSE par <i>A. hydrophila</i>	71
Figure 31: Résultats de la lyse des bactériophages spécifiques à: <i>Micrococcus</i> (A), <i>Listeria</i> (B), <i>Enterococcus</i> (C)	72

Résumé

L'objectif principal de cette étude est d'investiguer la présence de bactéries multi-résistantes dans les effluents hospitaliers non traités de l'établissement hospitalier HAMDANE Bakhta à Saida et d'évaluer leur niveau de résistance vis-à-vis de certains antibiotiques

À partir de ces effluents hospitaliers, nous avons effectué le dénombrement de la flore résistante sur milieu MacConkey à la ceftazidime, ce qui a révélé une concentration de l'ordre de $2,6 \times 10^6$ UFC/mL. De même, la flore résistante à la colistine a été dénombrée à une concentration de $1,4 \times 10^5$ UFC/mL, comparativement à la flore totale estimée à environ 1×10^7 UFC/mL. Par ailleurs, la flore résistante à la vancomycine sur milieu Slanetz et Bertelay était présente à une concentration de $2,4 \times 10^2$ UFC/mL, par rapport à la flore totale qui était de l'ordre de 10^4 UFC/mL.

Au cours de notre étude, nous avons réussi à isoler 30 souches bactériennes, dont 12 souches d'*Aeromonas hydrophila*, 3 souches de *Vibrio fluvialis*, 1 souche de *Citrobacter koseri*, 1 souche de *Proteus vulgaris*, 1 souche de *Providencia rettgi* et 12 souches d'*Enterococcus* spp.

La sensibilité aux antibiotiques a été évaluée à l'aide de l'antibiogramme et de la mesure de la CMI. Les résultats ont révélé que la plupart des souches étaient multi-résistantes à différentes familles d'antibiotiques testées, notamment aux antibiotiques utilisés en milieu hospitalier tels que la ceftazidime, la colistine et la vancomycine. Ces souches ont montré un taux élevé de résistance, avec des valeurs de CMI dépassant 512 µg/mL. De plus, nous avons détecté la production de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) chez trois souches d'*Aeromonas hydrophila* (Ce10, Ce15 et Ce16).

Parallèlement, nous avons isolé des bactériophages efficaces contre plusieurs souches bactériennes, y compris *Staphylococcus*, *E. coli*, *Micrococcus*, *Salmonella*, *Enterococcus*, et autres. Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé ces bactériophages en combinaison avec la ceftazidime. Cependant, aucune synergie entre les deux n'a été observée sur les souches d'*Enterococcus* isolées des effluents hospitaliers.

Ces résultats soulignent la présence de bactéries multi-résistantes dans les effluents hospitaliers, ce qui constitue un défi majeur pour le traitement des infections nosocomiales. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour développer des stratégies efficaces de lutte contre ces bactéries résistantes, en explorant d'autres combinaisons d'antibiotiques et de bactériophages, ainsi que d'autres approches novatrices.

Mots clés : Effluents hospitaliers, antibiorésistance, ceftazidime, colistine, vancomycine, BLSE, bactériophages.

Abstract

The main objective of this study was to investigate the presence of multidrug-resistant bacteria in untreated hospital effluents from HAMDANE Bakhta Hospital in Saida and evaluate their resistance levels to certain antibiotics.

From these hospital effluents, we conducted a count of the resistant flora on MacConkey medium using ceftazidime, revealing a concentration of approximately 2.6×10^6 CFU/mL. Similarly, the colistin-resistant flora was counted at a concentration of 1.4×10^5 CFU/mL, compared to an estimated total flora of around 1×10^7 CFU/mL. Furthermore, the vancomycin-resistant flora on Slanetz and Bertelay medium was present at a concentration of 2.4×10^2 CFU/mL, compared to a total flora concentration of approximately 10^4 CFU/mL.

During our study, we successfully isolated 30 bacterial strains, including 12 strains of *Aeromonas hydrophila*, 3 strains of *Vibrio vulgaris*, 1 strain of *Citrobacter koseri*, 1 strain of *Proteus fluviatis*, 1 strain of *Providencia rettgi*, and 12 strains of *Enterococcus* spp.

Antibiotic susceptibility was evaluated using the antibiogram and minimum inhibitory concentration (MIC) measurement. The results revealed that most strains were multidrug-resistant to various tested antibiotic families, particularly to hospital-used antibiotics such as ceftazidime, colistin, and vancomycin. These strains exhibited a high level of resistance, with MIC values exceeding 512 $\mu\text{g/mL}$. Additionally, we detected the production of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in three strains of *Aeromonas hydrophila* (Ce10, Ce15, and Ce16).

Furthermore, we isolated bacteriophages effective against several bacterial strains, including *Staphylococcus*, *E. coli*, *Micrococcus*, *Salmonella*, *Enterococcus*, and others. In this study, we utilized these bacteriophages in combination with ceftazidime. However, no synergy between the two was observed against the *Enterococcus* strains isolated from hospital effluents.

These findings underscore the presence of multidrug-resistant bacteria in hospital effluents, posing a major challenge for the treatment of nosocomial infections. Further research is needed to develop effective strategies to combat these resistant bacteria, including exploring alternative combinations of antibiotics and bacteriophages, as well as other innovative approaches.

Keywords: Hospital effluents, antibiotic resistance, ceftazidime, colistin, vancomycin, ESBL, bacteriophages.

ملخص

الهدف الرئيسي لهذه الدراسة هو التحقيق في وجود البكتيريا المتعددة المقاومة في مخلفات المستشفى غير المعالجة من مستشفى حمدان بخته في سعيده وتقييم مستوى مقاومتها تجاه بعض المضادات الحيوية.

من خلال هذه المخلفات المستشفى، قمنا بعمل عد للتجمع الجرثومي المقاوم على وسط ماكونكي باستخدام سيفتازيديم، حيث بلغت تركيزه تقريباً 2.6×10^6 وحدة تكوين جرثومي/مل. بالمثل، تم عد التجمع الجرثومي المقاوم للكوليسيتين بتركيز يبلغ 1.4×10^5 وحدة تكوين جرثومي/مل، مقارنة بالتجمع الجرثومي الكلي المقدر بحوالي 1×10^7 وحدة تكوين جرثومي/مل. علاوة على ذلك، كان التجمع الجرثومي المقاوم للفانكوميسين على وسط سلانيتز وبيرتلي بتركيز 2.4×10^2 وحدة تكوين جرثومي/مل، مقارنة بتركيز التجمع الجرثومي الكلي الذي كان حوالي 10^4 وحدة تكوين جرثومي/مل.

خلال دراستنا، تمكنا بنجاح من عزل 30 سلالة بكتيرية، بما في ذلك 12 سلالة من *Aeromonas hydrophila*، و 3 سلالات من *Vibrio vulgaris*، و 1 سلالة من *Citrobacter koseri*، و 1 سلالة من *Proteus fluviatilis*، و 1 سلالة من *Providencia rettgi*، و 12 سلالة من *Enterococcus spp*.

تم تقييم حساسية المضادات الحيوية باستخدام الأنتيبايوجرام وقياس التركيز المثبط الأدنى (MIC). أظهرت النتائج أن معظم السلالات كانت متعددة المقاومة لمجموعات مختلفة من المضادات الحيوية المختبرة، بش.

كل خاص تجاه المضادات الحيوية المستخدمة في المستشفيات مثل السيفتازيديم والكوليسيتين والفانكوميسين. هذه السلالات أظهرت مستوى عالٍ من المقاومة، مع قيم MIC تتجاوز $512 \mu\text{g/mL}$. بالإضافة إلى ذلك، اكتشفنا إنتاج إنزيمات بيتا-لاكتاماز طيف واسع (ESBL) في ثلاث سلالات من *Aeromonas hydrophila* (Ce10 و Ce15 و Ce16).

علاوة على ذلك، عزلنا فيروسات بكتيرية فعالة ضد عدة سلالات بكتيرية، بما في ذلك العنقوديات الذهبية و *E.coli* و *Micrococcus* و *Salmonella* و *Enterococcus* وغيرها. في إطار هذه الدراسة، استخدمنا هذه الفيروسات البكتيرية بالتزامن مع السيفتازيديم. ومع ذلك، لم يتم ملاحظة أي تفاعل تآزري بين الفيروسات البكتيرية والسيفتازيديم على السلالات المعزولة من مخلفات المستشفى.

تؤكد هذه النتائج وجود البكتيريا متعددة المقاومة في مخلفات المستشفى، مما يشكل تحدياً كبيراً لعلاج العدوى المستشفى. يتطلب الأمر بحثاً إضافياً لتطوير استراتيجيات فعالة لمكافحة هذه البكتيريا المقاومة، بما في ذلك استكشاف تراكيب بديلة من المضادات الحيوية والفيروسات البكتيرية، وكذلك استخدام نهج جديدة ومبتكرة.

الكلمات المفتاحية: مخلفات المستشفى، مقاومة المضادات الحيوية، سيفتازيديم، كوليسيتين، فانكوميسين، ESBL، فيروسات بكتيرية.

Table des matières

DEDICACES.....	4
REMERCIEMENTS	6
LISTE DES ABREVIATIONS	I
LISTE DES TABLEAUX.....	IV
LISTE DES FIGURES.....	V
RESUME	VII
ABSTRACT.....	VIII
ملخص	IX
TABLE DES MATIERES.....	X
PARTIE I. INTRODUCTION.....	1
PARTIE II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	4
II.1. Les effluents hospitaliers.....	5
II.1.1. Définition.....	5
II.1.1.1. Les rejets domestiques.....	5
II.1.1.2. Les rejets assimilables à des effluents industriels.....	5
II.1.1.3. Les effluents spécifiques aux établissements de santé	5
II.2. Les caractérisations des effluents hospitalières.....	6
II.2.1. Paramètres physiques.....	6
II.2.2. Paramètres chimiques	6
II.2.3. Les caractéristiques microbiologiques.....	7
II.2.4. Le rejet des médicaments.....	7
II.3. La contamination des effluents par les résidus des médicaments et les produits toxiques.....	8
II.4. La microbiologie des effluents hospitaliers	9
II.4.1. Les bactéries bacilles à Gram négatifs.....	9
II.4.1.1. Les genre <i>Aeromonas</i>	10
II.4.1.1.1. Caractères bactériologiques de <i>Aeromonas</i>	10

II.4.1.1.1.1. Caractères morphologiques:.....	10
II.4.1.1.2. Caractères cultureux et biochimiques	11
II.4.1.2. Pouvoir pathogène	11
II.4.2. Le genre <i>Citrobacter</i>	11
II.4.2.1. Taxonomie	11
II.4.3. Caractères morphologique, biochimique et cultureux de <i>Citrobacter</i>	12
II.4.4. <i>Pouvoir pathogène</i>	13
II.5. Le genre <i>Proteus</i>	13
II.5.1. Historique	13
II.6. Caractères bactériologiques	14
II.6.1. Caractère morphologique	14
II.6.2. Caractères cultureux	14
II.6.3. Caractères biochimiques.....	14
II.7. Le genre <i>Providencia</i>	15
II.7.1. Définition	15
II.7.2. Habitat.....	15
II.7.3. Caractéristiques bactériologiques	16
II.7.3.1. Caractères Morphologique et cultureux	16
II.7.3.2. Caractères enzymatiques et biochimique	16
II.8. Le genre <i>Vibrio</i>	17
II.8.1. Historique.....	17
II.8.2. Caractères bactériologiques	17
II.8.2.1. Caractère morphologique, cultureux et biochimique.....	17
II.9. Le genre <i>Enterococcus</i>	17
II.9.1. La taxonomie	18
II.9.2. Les Caractères bactériologiques	20
II.9.2.1. Caractère morphologique	20
II.9.2.2. Caractères cultureux	20
II.9.2.3. Les caractères biochimiques et antigéniques.....	21
II.10. La résistance aux antibiotiques.....	22
II.10.1. Définition des antibiotiques.....	22
II.10.2. Classification des antibiotiques.....	23

II.10.3. Mode d'action des antibiotiques	23
II.10.4. Mécanisme générale de la résistance aux antibiotiques	25
II.11. Antibiorésistances	26
II.11.1. Définition de l'antibiorésistance	26
II.11.2. L'antibiorésistance chez le genre <i>Aeromonas</i>	26
II.11.3. L'antibiorésistance chez <i>Citrobacter</i>	27
II.11.4. L'antibiorésistance chez <i>Proteus</i> et <i>Providencia</i>	27
II.11.5. La résistance chez vibrion	27
II.11.6. L'antibiorésistance chez <i>Enterococcus</i>	27
PARTIE III. MATERIEL ET METHODES	29
III.1. Provenance des échantillons.....	30
III.2. Dénombrement de la flore totale et la flore résistante	30
III.3. La purification des isolats bactériens	31
III.4. Observation microscopique	31
III.5. La conservation des isolats	31
III.5.1. La conservation à court durée	31
III.5.2. La conservation a longue durée	32
III.6. Critères biochimiques des isolats	32
III.6.1. Recherche de la catalase	32
III.6.2. Identification par la galerie API20E	33
III.6.2.1. Préparation de la galerie	33
III.6.2.2. Préparation de l'inoculum.....	33
III.6.2.3. Inoculation de la galerie	33
III.6.2.4. Lecture et interprétation des résultats.....	33
III.7. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	34
III.7.1. Préparation de l'inoculum pour la mesure de la CMI.....	34
III.7.1.1. Norme de turbidité pour la préparation de l'inoculum	34
III.7.1.2. Préparation des solutions mère d'antibiotiques	35
III.7.2. Méthode de la microdilution	35
III.7.3. Méthode de dilution en gélose.....	35
III.8. Procédure pour effectuer le test de diffusion de disque (Antibiogramme)	36

III.8.1. Inoculation de boîtes de test	36
III.8.2. Application de disques sur des boîtes d'agar inoculées	36
III.8.3. Lecture de boîtes et interprétation des résultats	36
III.8.4. Recherche des BLSE (Bêta-lactamases à spectre étendu)	37
III.9. Recherche de bactériophages	37
III.9.1. Culture bactérienne	38
III.9.2. Isolement des bactériophages	38
III.9.3. Synergie phages / Antibiotique	38
III.10. Extraction de l'ADN plasmidique	39
III.11. Protocole d'extraction d'ADN plasmidique	39
III.11.1. Récupération et lavage des cellules	39
III.11.2. Lyse bactérienne	39
III.11.3. Purification de l'ADN plasmidique	40
III.11.4. Électrophorèse sur gel d'agarose	40
III.11.4.1. Préparation du gel	40
III.11.5. Chargement d'échantillons	41
III.11.6. Électrophorèse	41
PARTIE IV. RESULTATS ET DISCUSSION	43
IV.1. Dénombrement de la flore totale et la flore résistantes	44
IV.2. Isolement et identification des isolats	45
IV.2.1. Examen microscopique des isolats	47
IV.3. Critères biochimiques	47
IV.3.1. Recherche de l'activité catalase	47
IV.4. Identification biochimique	48
IV.5. Mesure de la concentration minimale inhibitrice	56
IV.5.1. CMI de la colistine	58
IV.5.2. CMI de la ceftazidime	59
IV.5.3. CMI de l'ampicilline	60
IV.5.4. CMI de la vancomycine	61
IV.5.5. CMI de la gentamicine	61
IV.6. Détermination des profils de résistance aux antibiotiques (Antibiogramme)...	63

IV.7. Recherche des bêta – lactamase a spectre large (BLSE)	70
IV.8. La recherche de bactériophages	71
IV.8.1. Résultat de la synergie phages / Antibiotique	73
IV.9. Extraction d'ADN plasmidique	73
PARTIE V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	75
PARTIE VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	78
PARTIE VII. ANNEXES	94
VII.1. Annexe 1 : Milieu de culture	95
VII.2. Annexes 2 : Les étapes de coloration de Gram.....	98
VII.3. Annexes 3 : Figure d'identification de la galerie API20E.....	99
VII.4. Annexe 4 : Préparation des solutions pour extraction D'ADN.....	105
VII.5. Annexe 5 : Profil de résistances des isolats à Gram négatifs et à Gram positifs	107

PARTIE I. INTRODUCTION

Introduction

Les bactéries multi-résistantes (BMR) constituent un problème de santé publique croissant dans le monde entier, et leur présence dans les effluents hospitaliers représente une préoccupation majeure. Ces bactéries, souvent appelées "superbactéries", ont développé la capacité de résister à de multiples classes d'antibiotiques, ce qui limite considérablement les options de traitement disponibles et augmente le risque de complications et de décès chez les patients infectés (Kooli et al., 2014).

Les effluents hospitaliers, tels que les eaux usées et les déchets médicaux, sont des sources potentielles de dissémination des BMR dans l'environnement. Ces effluents contiennent une diversité de micro-organismes, y compris des bactéries pathogènes, qui peuvent être résistantes aux antibiotiques en raison de l'exposition continue aux agents antimicrobiens dans les établissements de soins de santé (Al Aukidy, Al Chalabi and Verlicchi, 2018).

Les bactéries multi-résistantes isolées des effluents hospitaliers présentent une menace pour la santé publique de plusieurs façons. Tout d'abord, elles peuvent être directement transmises aux patients lors de leur admission à l'hôpital, ce qui peut entraîner des infections nosocomiales graves et difficiles à traiter (Li et al., 2022). Deuxièmement, ces bactéries peuvent être dispersées dans l'environnement, notamment dans les eaux de surface, les sols et les écosystèmes aquatiques, contribuant ainsi à la dissémination de la résistance aux antibiotiques (Guessennd et al., 2013).

La résistance aux antibiotiques est souvent associée à l'acquisition de gènes de résistance par transfert horizontal, ce qui permet aux bactéries de partager rapidement et efficacement ces mécanismes de résistance. Les effluents hospitaliers constituent un milieu propice à ce transfert génétique en raison de la coexistence de différentes espèces bactériennes et de la présence d'éléments génétiques mobiles tels que les plasmides et les intégrons (Nadella et al., 2022).

Dans cette étude, notre objectif principal est de caractériser les bactéries multi-résistantes isolées des effluents de l'hôpital HAMDANE Bakhta. Nous nous concentrons spécifiquement sur la recherche de bactéries résistantes aux antibiotiques de dernier recours et d'utilisation hospitalière, tels que la ceftazidime, la colistine et la vancomycine, dans la Wilaya de Saida.

Pour atteindre cet objectif, nous évaluons le profil de résistance aux antibiotiques de ces bactéries, en identifiant les antibiotiques auxquels elles présentent une résistance. Nous nous intéressons particulièrement aux antibiotiques utilisés en milieu hospitalier, car la résistance à ces médicaments peut avoir un impact significatif sur la gestion des infections nosocomiales.

De plus, nous cherchons à trouver des solutions pour lutter contre les bactéries isolées en utilisant une approche combinée de phages et d'antibiotiques. Nous explorons donc le potentiel de l'utilisation des phages en combinaison avec des antibiotiques pour surmonter la résistance et améliorer l'efficacité des traitements.

En outre, nous avons comme objectif de rechercher la présence de plasmides chez les bactéries multi-résistantes.

PARTIE II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1. Les effluents hospitaliers

II.1.1. Définition

Les effluents hospitaliers (EF) font référence aux eaux usées générées par un établissement de santé. Ils se répartissent en différentes catégories (Deloffre-Bonnamour, 1995).

II.1.1.1. Les rejets domestiques

Les effluents hospitaliers regroupent les eaux provenant des cuisines ainsi que les rejets résultant de l'hygiène des patients non contagieux et du personnel.

II.1.1.2. Les rejets assimilables à des effluents industriels

Les effluents hospitaliers sont générés par certains équipements spécifiques tels que les blanchisseries, les chaufferies, les ateliers, etc.

II.1.1.3. Les effluents spécifiques aux établissements de santé

Les rejets générés par les activités de soins peuvent contenir divers éléments tels que des produits chimiques, des substances radioactives, des liquides biologiques, des déjections/excrétions contagieuses, ainsi que des résidus de médicaments éliminés dans les excréta des patients. Les rejets liquides englobent également (Emmanuel, 2004) :

- a) **Les effluents des services du soin**, les effluents hospitaliers contiennent des désinfectants tels que le glutaraldéhyde, des détergents, des résidus de médicaments tels que des antibiotiques, des agents anticancéreux, des anti-inflammatoires, ainsi que des rejets contenant des germes pathogènes résistants aux antibiotiques. Ces germes sont responsables des infections nosocomiales, notamment *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.
- b) **Les effluents des services médicotechniques**, les liquides provenant des salles d'opération présentent une forte concentration en matières organiques ou en liquides biologiques tels que le sang, les urines, les selles et les liquides gastriques
- c) **Les rejets de laboratoire de biologie médicale**, comprennent des substances telles que le sang, les crachats, les urines, les acides, les bases, les réactifs divers et les solvants.

II.2. Les caractérisations des effluents hospitalières

Les paramètres les plus étudiés de manière courante sont la présence et la charge de matière organique ou inorganique, mesurées par la conductivité (Oliveira, Al Aukidy and Verlicchi, 2017).

Les valeurs de tous les paramètres dépassent les normes de rejet des eaux usées dans l'environnement (Todedji et al., 2020).

II.2.1. Paramètres physiques

La température de l'eau joue un rôle crucial dans l'équilibre écologique de son milieu. Lorsque celle-ci augmente de manière excessive, elle peut entraîner une perturbation significative de la vie aquatique, entraînant ainsi la pollution thermique. La conductivité électrique, mesurée en Siemens par centimètre (S/cm), évalue la capacité d'une solution à permettre le passage d'un courant électrique. La turbidité, quant à elle, mesure le degré de trouble et d'opacité de l'eau, utilisant l'unité de mesure unité Néphélogéométrie Turbidité Unit (NTU). Les matières en suspension (MES) se réfèrent aux particules organiques ou minérales insolubles transportées par l'eau, exprimées en milligrammes par litre (mg/l) (Seddik, 2011).

II.2.2. Paramètres chimiques

Les matières organiques comprennent les substances oxydables qui requièrent une certaine quantité d'oxygène pour se décomposer. Deux paramètres sont utilisés pour évaluer leur teneur : la Demande Chimique en Oxygène (DCO) et la Demande Biologique en Oxygène sur 5 jours (DBO₅). L'acidité ou l'alcalinité des eaux usées est exprimée par le pH, qui mesure le degré d'acidité ou d'alcalinité. La Demande Chimique en Oxygène (DCO) est un indicateur de l'oxydation des composés organiques, nécessitant la quantité d'oxygène nécessaire à cette oxydation dans l'eau. La Demande Biologique en Oxygène (DBO) permet d'évaluer les matières organiques biodégradables présentes dans l'eau, mesurant la quantité d'oxygène nécessaire à leur dégradation par des processus d'oxydation aérobie. Le phosphore est présent dans l'eau, avec l'une de ses sources les plus importantes provenant des

déjections humaines et animales. Il se présente sous différentes formes, telles que les phosphates, les poly phosphates et le phosphore organique (Seddik, 2011).

II.2.3. Les caractéristiques microbiologiques

Les effluents hospitaliers présentent une forte concentration et grande diversité microbienne, virale ou parasitaire qui provient de la flore digestive du patient. On peut détecter ces microorganismes par la présence des indicateurs classiques de contaminations fécales et des pathogènes. Les coliformes fécaux sont également détectés par la recherche des *E. coli* et d'autre analyse spécifique qui applique dans les effluents hospitaliers pour la recherche des spores des bactéries anaérobies, *Pseudomonas* sp, *Staphylococcus aureus* ou *Salmonella* sp. (Emmanuel, 2004).

Diverses analyses rapportent que les effluents hospitaliers présentent des concentrations bactériennes plus faibles que les effluents urbains. Cette faible proportion de bactéries est due à la présence de désinfectants et d'antibiotiques à forte concentration. Cependant, certains micro-organismes pathogènes tels que *Pseudomonas* spp, *Staphylococcus aureus* et les micro-organismes antibiorésistants ont une concentration 2 à 10 fois supérieure à celle des effluents urbains. Dans notre étude, nous nous concentrons sur la résistance aux antibiotiques des bactéries suivantes : *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis*, *Providencia rettgi*, *Citrobacter koseri* , *Proteus vulgaris* , et *Enterococcus* sp .

Des marqueurs viraux de pollution fécale tels que le rotavirus, l'adénovirus, l'hépatite A et les entérovirus sont également présents dans les effluents hospitaliers. Ces derniers présentent une concentration élevée de virus, supérieure à celle des effluents urbains (Oliveira, Al Aukidy and Verlicchi, 2017).

II.2.4. Le rejet des médicaments

Les résidus de médicaments font partie des polluants émergents, et les établissements hospitaliers sont les principaux consommateurs de ces

substances. L'une des dépenses les plus importantes concerne les médicaments pour le sang et les organes hématopoïétiques, ainsi que les médicaments anti-infectieux.

La différence entre les effluents urbains et les effluents hospitaliers réside dans la présence de résidus de médicaments, tant en termes de concentration que de types de molécules. La majorité des maladies graves sont liées au cancer et à l'infection par le VIH, ce qui a entraîné une augmentation des achats de médicaments par les hôpitaux. Ces résidus peuvent inclure des analgésiques, des antibiotiques, des bêtabloquants, des médicaments anti-cholestérol et des agents anticancéreux (Emmanuel, 2004).

II.3. La contamination des effluents par les résidus des médicaments et les produits toxiques

La contamination des effluents hospitaliers par les produits pharmaceutiques est connue sous le nom de contaminants émergents. Ces contaminants comprennent une large gamme de composés ayant différentes propriétés physico-chimiques en termes de solubilité, adsorption, absorption, biodégradation, polarité et stabilité (Oliveira, Al Aukidy and Verlicchi, 2017).

Ces produits pharmaceutiques sont principalement éliminés par les urines et partiellement par les selles, qui sont évacuées dans les effluents hospitaliers. On les retrouve à des concentrations allant de quelques nanogrammes par litre (ng/l) à quelques milligrammes par litre (mg/l) pour les antibiotiques (ATB), les agents cytostatiques, les anesthésiques, les désinfectants, ainsi que certains métaux lourds.

Ces contaminants suscitent l'attention des chercheurs, notamment en ce qui concerne les antibiotiques (ATB) qui sont la principale cause du développement de bactéries multi résistantes (BMR). Une deuxième raison est la présence de certains agents cytostatiques ainsi que d'antibiotiques tels que les fluoroquinolones, qui confèrent aux effluents hospitaliers une mutagénicité et une toxicité vis-à-vis des bactéries.

Selon Oliveira et al. (2017), La présence d'antibiotiques varie d'un hôpital à l'autre en raison des critères hospitaliers mentionnés précédemment. Les fluoroquinolones, les bêta-lactamines, les macrolides, les sulfamides et les lincosamides sont parmi les antibiotiques les plus fréquemment identifiés dans les effluents hospitaliers.

II.4. La microbiologie des effluents hospitaliers

Notre premier objectif dans cette recherche est de déterminer la microbiologie présente dans les effluents hospitaliers, en se basant principalement sur une étude qualitative et quantitative. Nous cherchons à identifier les différentes espèces bactériennes présentes dans ces effluents et à évaluer leur abondance.

De plus, nous avons pour objectif de déterminer la présence ou l'absence de bactéries multi résistantes aux antibiotiques administrés au niveau de l'hôpital. Nous souhaitons évaluer la résistance de ces bactéries aux différents antibiotiques utilisés, en nous concentrant sur les antibiotiques fréquemment prescrits dans un contexte hospitalier.

Cette recherche nous permettra de mieux comprendre la composition bactérienne des effluents hospitaliers et d'identifier les souches bactériennes présentant une résistance aux antibiotiques. Ces informations sont essentielles pour évaluer les risques pour l'environnement et la santé publique liés à la présence de bactéries multi résistantes dans les effluents hospitaliers.

II.4.1. Les bactéries bacilles à Gram négatifs

Effectivement, les bactéries à Gram négatif constituent une vaste catégorie de micro-organismes qui ne se colorent pas en violet de gentiane en raison de leur structure de paroi cellulaire. Parmi les bactéries à Gram négatif, les entérobactéries sont l'une des catégories les plus répandues.

Les entérobactéries sont un groupe de bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, qui comprend plusieurs genres tels que *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, et bien d'autres encore. Ces bactéries sont souvent associées à l'intestin des

humains et des animaux, et certaines espèces peuvent causer des infections intestinales, des infections urinaires, des infections respiratoires et d'autres infections opportunistes.

Ces bactéries présentent une résistance à de nombreux antibiotiques, ce qui limite les options thérapeutiques et représente un défi majeur en matière de traitement des infections.

II.4.1.1. Les genre *Aeromonas*

Effectivement, le genre *Aeromonas* fait partie de la famille des *Aeromonadaceae* (Clave, 2010). IL comprend les *Aeromonas* mobiles, notamment *Aeromonas hydrophila*. Ces bactéries sont capables de se déplacer et sont connues pour provoquer des infections chez l'homme (Semwal and Kumar, 2023). *A. hydrophila* peut causer des infections gastro-intestinales, des infections de la peau et des tissus mous, ainsi que d'autres types d'infections, en particulier chez les personnes immunodéprimées. D'autres peuvent être des pathogènes opportunistes chez l'homme. La classification et l'étude des différentes espèces d'*Aeromonas* sont essentielles pour comprendre leur diversité, leur rôle dans les infections et leur impact sur la santé humaine et animale (Cipriano, 1984).

II.4.1.1.1. Caractères bactériologiques de *Aeromonas*

II.4.1.1.1.1. Caractères morphologiques:

A. hydrophila présente une morphologie de bacille Gram négatif avec des extrémités arrondies ou une forme de coccobacille, parfois avec une capsule. Cette bactérie est mobile grâce à des flagelles latéraux, ce qui lui permet de se déplacer à la surface et dans des conditions de réchauffement. Elle se trouve principalement dans des milieux aquatiques, notamment dans les eaux usées et souillées (Semwal and Kumar, 2023).

Ces caractéristiques morphologiques et physiologiques sont importantes pour identifier et différencier les différentes espèces d'*Aeromonas* et comprendre leur rôle dans les infections et les environnements spécifiques dans lesquels elles se trouvent.

II.4.1.1.2. Caractères culturels et biochimiques

A. hydrophila est oxydase positives, ce qui signifie qu'elles produisent l'enzyme oxydase. Cette caractéristique peut être utilisée pour les différencier d'autres bactéries qui sont oxydase négatives (Garrity, 2006).

En ce qui concerne leur croissance, ayant une meilleure croissance sur un milieu sélectif comme le MacConkey.

La plage de température optimale de croissance pour *A. hydrophila* est généralement de 30°C à 37°C, ce qui correspond à la température corporelle humaine (Semwal and Kumar, 2023).

II.4.1.2. Pouvoir pathogène

A. hydrophila produit des enterotoxines cytotoxiques qui peuvent causer diverses manifestations cliniques. Cela comprend des diarrhées et des gastro-entérites (Vilches et al., 2004). Qui peuvent être sévères. Les toxico-infections alimentaires peuvent également survenir, en particulier en milieu hospitalier. De plus, *A. hydrophila* est associée à des infections extra-digestives, telles que des infections de plaies, de brûlures ou de fractures ouvertes, qui peuvent survenir suite à un contact avec l'eau contaminée. Dans certains cas, des bactériémies peuvent se développer après un traumatisme cutané ou une pénétration digestive (Wu et al., 2007).

Il convient également de mentionner que *A. hydrophila* produit des hémolysines, qui sont des substances capables de créer des pores au niveau de la membrane des cellules cibles. Ces hémolysines peuvent contribuer à la virulence de la bactérie et à la progression des infections (Semwal and Kumar, 2023).

II.4.2. Le genre *Citrobacter*

II.4.2.1. Taxonomie

Le genre bactérien *Citrobacter* fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Parmi les espèces fréquemment rencontrées, on retrouve *Citrobacter koseri* (Schwartz, 1997).

Les bactéries du genre *Citrobacter* sont ubiquitaires, ce qui signifie qu'elles sont largement répandues dans l'environnement. On peut les trouver dans le sol, l'eau, ainsi que dans les tractus intestinaux des humains et des animaux (Balows, 1998).

C. koseri est une bactérie opportuniste, ce qui signifie qu'elles peuvent provoquer des infections chez les individus présentant une vulnérabilité accrue, tels que les personnes immunodéprimées, les nouveau-nés et les patients hospitalisés. Ces infections peuvent affecter différents sites du corps, tels que les voies urinaires, les poumons, le sang, le système nerveux central et les plaies.

II.4.3. Caractères morphologique, biochimique et culturels de *Citrobacter*

Citrobacter est un genre de bacilles à Gram négatif qui sont mobiles. Ils sont des aéro-anaérobies facultatifs, ce qui signifie qu'ils peuvent se développer en présence ou en absence d'oxygène. Ils peuvent être cultivés sur des milieux de culture usuels ou sélectifs tels que le Mac Conkey (MC) et produisent généralement de grosses colonies blanches (Delmas, 2001).

En ce qui concerne les tests biochimiques, le genre *Citrobacter* est généralement positif pour la plupart des tests utilisés pour l'identification bactérienne. Ces tests biochimiques peuvent inclure des tests tels que la fermentation des glucides, la production d'enzymes spécifiques, la réduction de nitrates, entre autres. Ces tests aident à différencier *Citrobacter* des autres genres de bactéries et à confirmer son identification.

Il est important de réaliser des tests biochimiques pour caractériser et identifier les bactéries du genre *Citrobacter*, ce qui peut être utile dans le cadre de la recherche clinique, du diagnostic des infections et de la mise en place de mesures de prévention et de traitement appropriées.

II.4.4. Pouvoir pathogène

Citrobacter peut être impliqué dans les infections nosocomiales, qui sont des infections contractées à l'hôpital. Ces infections nosocomiales peuvent inclure des infections au niveau des plaies, des infections urinaires, des infections pulmonaires et des méningites (Bouskraoui et al., 2017).

Citrobacter peut causer des infections de la peau et des tissus mous, y compris des abcès. Les abcès sont des accumulations de pus dans les tissus, généralement causées par une infection bactérienne.

Les infections urinaires causées par *Citrobacter* sont également fréquentes, en particulier chez les patients cathétérismes ou présentant des facteurs de risque d'infections urinaires.

Citrobacter peut également être responsable d'infections pulmonaires, telles que la pneumonie, qui peuvent se développer chez les patients hospitalisés ou ventilés.

II.5. Le genre *Proteus*

II.5.1. Historique

Le genre *Proteus* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* et a été découvert par le pathologiste allemand Gustav Hauser en 1885. Hauser a choisi le nom *Proteus* pour ce genre en raison de la capacité des bactéries à se propager et à envahir la gélose de culture (Hauser, 1985).

Aujourd'hui, le genre *Proteus* comprend sept espèces distinctes : *P. cibarius*, *P. columbae*, *P. hauseri*, *P. mirabilis*, *P. penneri*, *P. terrae* et *P. vulgaris*. Parmi ces espèces, *Proteus mirabilis* et *Proteus vulgaris* sont les plus couramment rencontrées et sont considérées comme les principaux agents pathogènes responsables des infections des voies urinaires (Armbruster and Mobley, 2012). Les bactéries du genre *Proteus* sont ubiquitaires et se retrouvent dans divers environnements tels que le sol, les eaux usées et le tractus intestinal des humains et des animaux.

II.6. Caractères bactériologiques

II.6.1. Caractère morphologique

P. vulgaris est une bactérie de petite taille qui se présente sous la forme de bacilles à Gram négatif. Ces bacilles sont des bactéries en forme de bâtonnets qui peuvent avoir une apparence polymorphe, ce qui signifie qu'ils peuvent adopter différentes formes et tailles (Maryse and Danielle, 2004).

P. vulgaris est mobile grâce à la présence de flagelles, ce qui lui confère la capacité de se déplacer dans son environnement (Belas, 1996). Cependant, il convient de noter que la mobilité de *P. vulgaris* peut varier selon les conditions de culture.

Cette bactérie est asporulée, ce qui signifie qu'elle ne forme pas de spores. Les spores sont des structures de survie produites par certaines bactéries pour résister à des conditions défavorables.

II.6.2. Caractères cultureux

Se pousse dans un milieu ordinaire à 37°C, ce sont des aéro-anaérobie facultatifs. Les colonies grosses, envahissant la surface de la gélose en ondes concentriques grâce à leur mobilité importante (Hauser, 1985).

II.6.3. Caractères biochimiques

P. vulgaris est caractérisé par sa capacité à fermenter le glucose avec la production de gaz. Lorsqu'il métabolise le glucose, il libère du gaz, généralement du dioxyde de carbone (CO₂) ou de l'hydrogène (H₂), ce qui peut être observé dans des tubes de culture spécifiques (Schultz-Ascensio, 2018).

P. vulgaris est également négatif pour l'enzyme ornithine décarboxylase (ODC), ce qui signifie qu'il ne produit pas d'activité décarboxylase lorsqu'il est cultivé en présence d'ornithine.

II.7. Le genre *Providencia*

II.7.1. Définition

Le genre *Providencia* fait partie de la famille des Enterobacteriaceae, et non des Morganellaceae. *Providencia rettgeri* est en effet une bactérie à Gram négatif appartenant à ce genre.

P. rettgeri est considérée comme une bactérie opportuniste, ce qui signifie qu'elle peut causer des infections chez des personnes ayant un système immunitaire affaibli ou dans des conditions favorables à son développement. Elle est souvent associée à des infections nosocomiales, c'est-à-dire des infections contractées dans un cadre hospitalier.

Il est important de noter que *P. rettgeri* est distincte de *P. mirabilis*, bien qu'elles partagent certaines caractéristiques en tant que bacilles à Gram négatif. Chaque espèce a ses propres caractéristiques, capacités métaboliques et comportements pathogènes spécifiques (Clave and Floch, 1973).

II.7.2. Habitat

Les bactéries du genre *Providencia* sont ubiquitaires dans l'environnement, ce qui signifie qu'elles se trouvent largement répandues dans différents milieux tels que l'eau, les eaux usées et les sols. Elles peuvent également être présentes dans divers réservoirs biologiques tels que les mouches, les oiseaux, les chats, les chiens, les bovins, les ovins et même les reptiles tels que les serpents et les vipères.

Dans le cas de *P. rettgeri*, cette espèce est naturellement présente dans le tube digestif humain, ce qui peut contribuer à sa transmission et à sa colonisation chez les individus. Elle est également capable de former des biofilms, ce qui signifie qu'elle peut se regrouper avec d'autres bactéries pour former des communautés structurées et adhérer à des surfaces, ce qui peut favoriser sa persistance et sa résistance aux traitements.

Il est important de noter que la présence naturelle de *P. rettgeri* dans l'environnement et dans certains hôtes ne signifie pas nécessairement qu'elle entraînera systématiquement des infections ou des problèmes de santé. Cependant, dans des conditions particulières, notamment chez les individus immunodéprimés ou dans des environnements hospitaliers, cette bactérie opportuniste peut causer des infections et nécessiter une attention médicale appropriée (Clave and Floch, 1973).

II.7.3. Caractéristiques bactériologiques

II.7.3.1. Caractères Morphologique et culturaux

P. rettgeri, ainsi que d'autres bactéries du genre *Providencia*, sont des bacilles à Gram négatif. Elles ont la capacité d'être aéro-anaérobies facultatives, ce qui signifie qu'elles peuvent survivre et se développer en présence ou en l'absence d'oxygène.

La mobilité des bactéries du genre *Providencia*, y compris *P. rettgeri*, est assurée par des flagelles qui sont répartis sur toute la périphérie de la cellule bactérienne. Ces flagelles leur permettent de se déplacer dans leur environnement.

En ce qui concerne la culture de *P. rettgeri*, comme pour d'autres entérobactéries, elle peut être réalisée facilement sur des milieux de culture ordinaires à une température de 37°C. Cela inclut des milieux tels que l'agar nutritif, l'agar MC ou l'agar EMB (Eosine Méthylène Bleu) (Clave and Floch, 1973).

II.7.3.2. Caractères enzymatiques et biochimique

Les bactéries du genre *Providencia*, y compris *P. rettgeri*, sont des bacilles à Gram négatif. Elles sont oxydase négatives et catalase positives. Sur les milieux de culture standard à 37°C, elles montrent une fermentation positive du glucose, des nitrites, une production d'indole, une utilisation du citrate, une décarboxylation de l'ornithine et sont négatives aux tests du lactose, ONPG, LDC et ODC. Elles ne produisent pas d'uréase, d'H₂S ni de gélatinase.

II.8. Le genre *Vibrion*

II.8.1. Historique

Vibrio fluvialis est une espèce de bactéries appartenant à la famille des *Vibrionaceae*. Elle a été découverte pour la première fois par Furniss et al en 1977, lorsqu'elle a été isolée à partir des selles de patients atteints de diarrhée à Bahreïn et au Bangladesh (Lee et al., 1978).

II.8.2. Caractères bactériologiques

II.8.2.1. Caractère morphologique, culturaux et biochimique

V. fluvialis est une bactérie à Gram négatif qui peut avoir une forme droite ou incurvée. Elle est mobile grâce à la présence d'un flagelle polaire. Cette bactérie est naturellement présente dans l'environnement marin, ce qui en fait une bactérie halophile (Lee et al., 1978). Elle peut être isolée à partir de l'eau, des matières fécales humaines et des eaux usées.

V. fluvialis est capable de respirer aussi bien en présence qu'en absence d'oxygène, ce qui en fait une bactérie aéro-anaérobie facultative. Elle peut se développer à une température de 37°C, qui est la température corporelle humaine.

Au niveau des tests biochimiques, *V. fluvialis* est positif pour l'oxydase et la catalase. Elle est également positive pour le test ONPG (ortho-nitrophényl-β-D-galactopyranoside) et les tests ADH (arginine dihydrolase), glucose et gélatine. En revanche, elle est négative pour d'autres tests tels que le TDA (tryptophane désaminase) et l'uréase (Lee et al., 1978).

II.9. Le genre *Enterococcus*

Selon (Thiercelin and E., 1899) En effet, la première observation d'un nouveau diplocoque à Gram positif d'origine intestinale a été réalisée par Thiercelin en 1899. Il a été appelé *Streptococcus faecalis*, et une autre espèce présentant des caractéristiques similaires est *Streptococcus faecium*. Pendant de nombreuses années, ces bactéries ont été classées avec les *Streptococcus* en raison de leur formation de chaînes courtes.

Cependant, avec le développement de la biologie moléculaire et l'utilisation de nouvelles techniques telles que le pourcentage C+G, le séquençage et l'ARNr 16S, il a été démontré que *Streptococcus faecium* et *Streptococcus faecalis* sont distincts des *Streptococcus* et sont classés individuellement dans le genre *Entérocoques* (Schleifer and Kilpper-Bälz, 1984).

Cette reclassification a été soutenue par la classification de Lancefield, qui est basée sur la présence d'antigènes de paroi. Les entérocoques font donc partie du groupe des streptocoques de groupe D, mais sont désormais reconnus comme un genre distinct appelé *Entérocoques* (Figure 1) (Thiercelin and E., 1899).

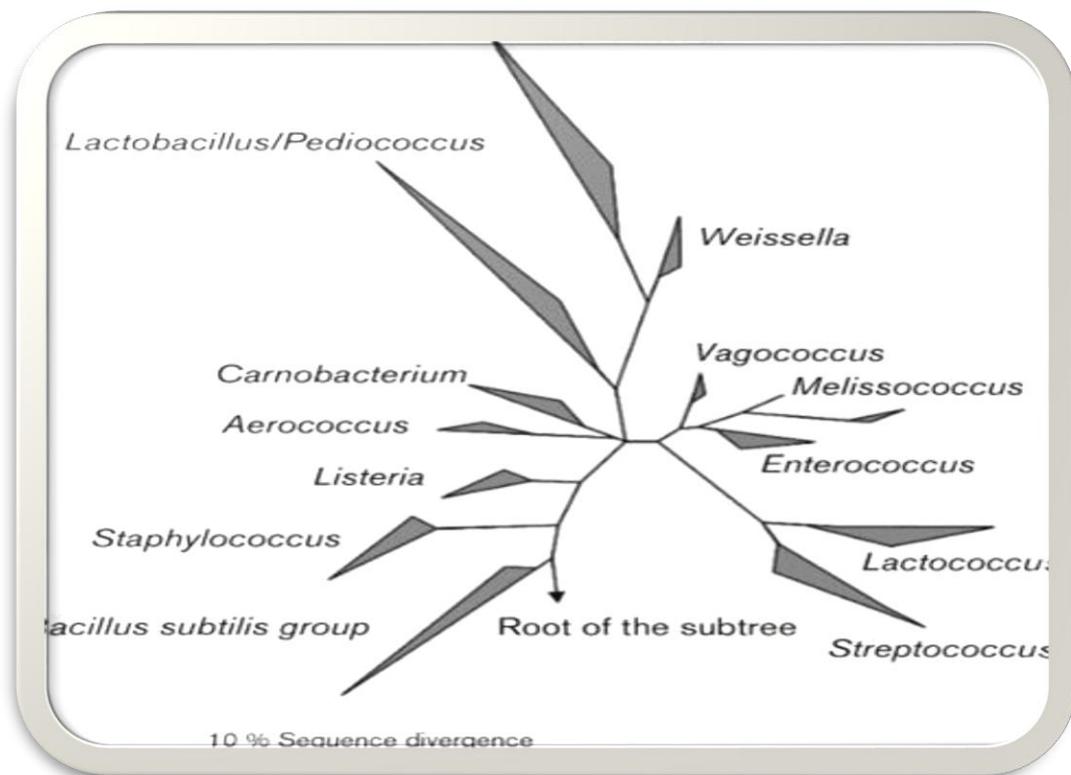


Figure 1 : Dendrogramme ARNr16s de la position phylogénétique de genre *Enterococcus* (Thiercelin and E., 1899)

II.9.1. La taxonomie

Le genre *Enterococcus* a connu une expansion significative en termes de nombre d'espèces identifiées au fil du temps. Initialement, le genre comprenait les deux espèces que vous avez mentionnées, *Streptococcus*

faecalis et *Streptococcus faecium*. Cependant, au fil des avancées scientifiques et de la recherche, de nombreuses autres espèces ont été découvertes et ajoutées au genre *Enterococcus* (Tableau 1).

Tableau 1: Classification des entérocoques (Thiercelin and E., 1899).

Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Frimicutes</i>
Classe	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Lactobacilles</i>
Famille	<i>Enterococcaceae</i>
Genre	<i>Enterococcus</i>

En 2011, le genre *Enterococcus* comptait 37 espèces identifiées. Ce nombre a ensuite augmenté à 48 espèces en 2013, puis à 55 espèces en 2017. Ces découvertes ont été possibles grâce à l'utilisation de techniques de séquençage génétique avancées et à une meilleure compréhension de la diversité microbienne (Figure 2) (Euzéby, 2008).

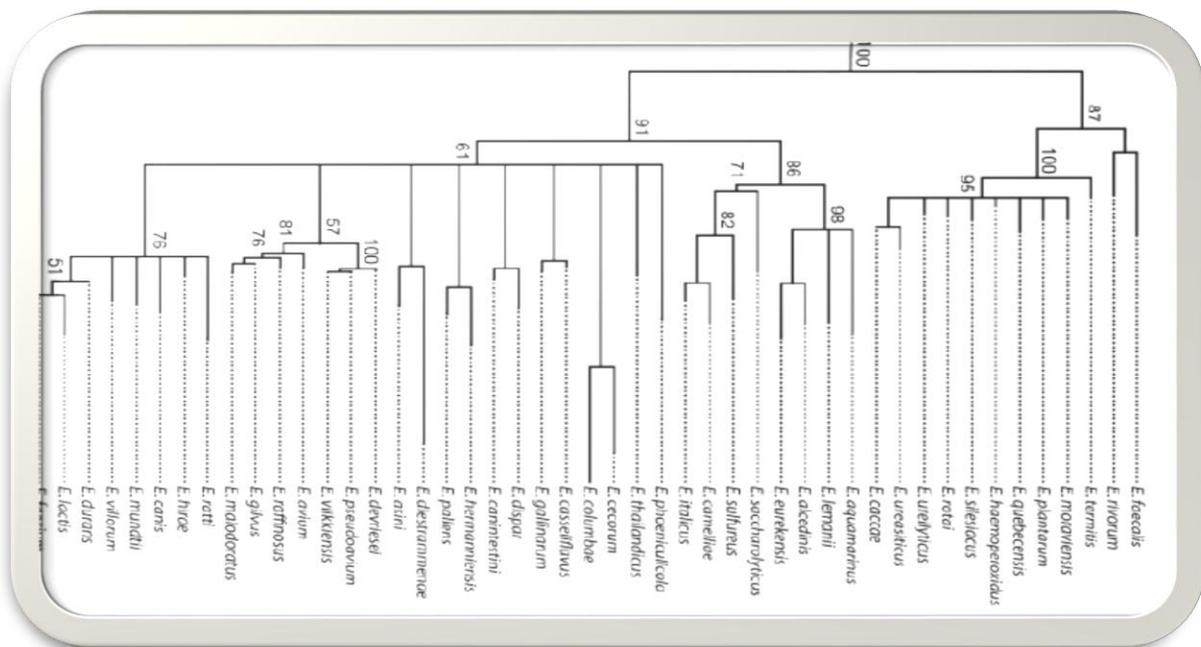


Figure 2: Arbre phylogénétique du genre *Enterococcus* reposant sur le séquençage par ARNr16s (Van Tyne and Gilmore, 2014).

II.9.2. Les Caractères bactériologiques

II.9.2.1. Caractère morphologique

Les *Enterococcus* sont des Cocci ovoïdes ou sphériques, à Gram positif, qui se disposent en paires ou en chaînettes. Ils sont généralement acapsulés, asporulés et immobiles.

Les *Enterococcus* sont considérés comme ubiquitaires, ce qui signifie qu'ils sont présents chez les humains et les animaux, ainsi que dans l'environnement. On les retrouve dans divers habitats tels que la poussière, les végétaux et l'eau. Leur présence dans ces environnements est souvent associée à une contamination fécale, étant donné qu'ils font partie de la flore intestinale des humains et des animaux.

Une caractéristique importante des entérocoques est leur capacité à résister à des conditions hostiles, notamment aux agents antimicrobiens et aux environnements défavorables. Cette résistance accrue contribue à leur survie et à leur adaptation dans différents milieux (Avril et al., 2000).

Il convient de noter que les entérocoques peuvent également être des agents pathogènes opportunistes, capables de causer des infections chez les individus affaiblis, notamment des infections des voies urinaires, des infections sanguines et des infections intra-abdominales (Arias and Murray, 2012).

II.9.2.2. Caractères cultureux

Ce sont des bactéries aérobies tolérantes, c'est-à-dire qu'elles peuvent se développer dans toutes les conditions respiratoires aérobies, aero-anaérobie facultatives et anaérobies avec adjonction de CO₂ (Van Tyne and Gilmore, 2014).

Elles se développent à une température de croissance de 35 °C, et certaines espèces peuvent se développer dans une plage de température allant de 10 à 45 °C. Par exemple, *E. faecalis* et *E. faecium* sont capables de survivre à une température de 60 °C pendant 30 minutes (Moreno, 2006). Ces

bactéries peuvent également croître dans un milieu hyper salé contenant 6,5 % de NaCl, en présence de 40 % de bile, et à un pH alcalin de 9,6 (Aguilar Galvez et al., 2012).

Leur croissance est légèrement exigeante en termes de facteurs de croissance, ce qui signifie qu'elles se multiplient sur un milieu de culture ordinaire à une température de 35 °C pendant 18 à 24 heures (Van Tyne and Gilmore, 2014). L'aspect microscopique de ce genre est illustré dans la figure 3.

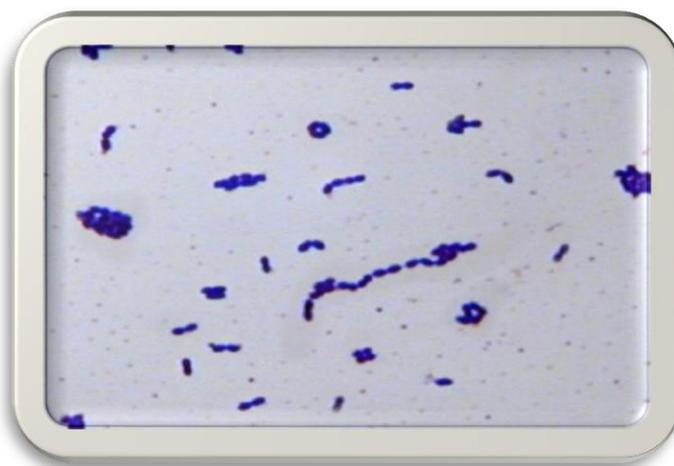


Figure 3: Aspect microscopique optique (x 1000) de *E. faecium* après coloration de Gram (Van Tyne and Gilmore, 2014).

II.9.2.3. Les caractères biochimiques et antigéniques

La dégradation de certains sucres présents dans les milieux sélectifs pour les entérocoques, tels que le milieu BEA, se caractérise par une négativité aux tests de catalase et d'oxydase. Les entérocoques ont un métabolisme chimioorganotrophe fermentaire obligatoire.

Généralement, les espèces d'entérocoques sont partiellement hémolytiques (hydrolyse partielle) ou non hémolytiques (absence d'hydrolyse) lorsqu'elles sont cultivées sur gélose au sang. Cependant, *E. faecalis* se distingue en étant complètement hémolytique (hydrolyse complète) sur gélose au sang.

La paroi des entérocoques est constituée d'un glycocalyx, une structure réticulée, ainsi que de peptidoglycane, une structure rigide (Shrestha et al., 2021). Le peptidoglycane forme des chaînes polysaccharidiques reliées entre elles par de courts peptides, et est composé d'une alternance de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (Escout et al., 2009). Selon (Thiercelin and E., 1899) d'autres composants sont fixés à la paroi, tels que l'acide lipotéichoïque (l'antigène de groupe des entérocoques), des protéines, des polysaccharides et des acides téichoïques (Figure 4).

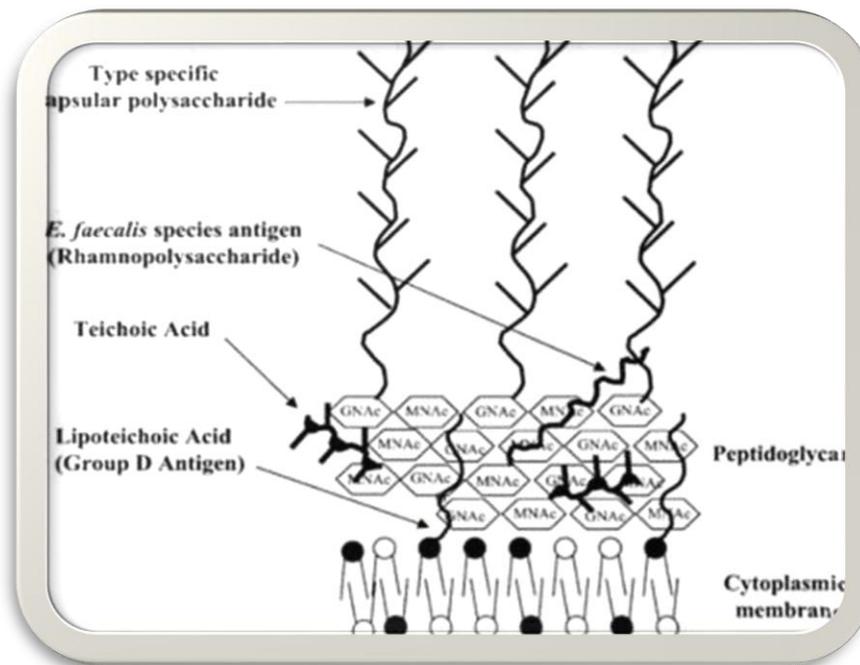


Figure 4: Paroi bactérienne du *E. faecalis* (Thiercelin and E., 1899).

II.10. La résistance aux antibiotiques

II.10.1. Définition des antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances naturelles considérées comme des médicaments importants utilisés en médecine. Ils agissent sur les bactéries présentes chez les patients traités. Ces composés, d'origine biologique, ont pour fonction d'empêcher la croissance des microorganismes. L'une de leurs caractéristiques les plus importantes est leur capacité à combattre les infections bactériennes chez l'homme, ainsi qu'à interférer directement avec ces bactérie (Bentley and Bennett, 2003).

Les antibiotiques peuvent être produits par des microorganismes ou être fabriqués à partir de produits chimiques par synthèse ou semi-synthèse. Ils sont également utilisés en médecine vétérinaire (Sanders et al., 2011).

II.10.2. Classification des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères :

- **L'origine**, Ils peuvent être élaborés par des organismes tels que des champignons, des bacilles ou des *Streptomyces*, ou bien être produits de manière synthétique ou semi-synthétique (Agregé, Belguith and Hadiji, 2015).
- **Le mode d'action**, Les antibiotiques peuvent agir sur différents éléments tels que la paroi cellulaire, la membrane cytoplasmique, la synthèse des protéines ou la synthèse des acides nucléiques.
- **Le spectre d'activité**, Le spectre d'activité antibactérienne d'un antibiotique fait référence à sa capacité à cibler différentes espèces bactériennes. Il peut être étroit (agissant sur un nombre limité de bactéries) ou large (agissant sur un large éventail de bactéries), en prenant en compte les résistances naturelles et acquises (Agregé, Belguith and Hadiji, 2015).
- **La Nature Chimique**, Les antibiotiques présentent une grande variabilité en termes de structure chimique. Certains ont une structure de base commune, telle que les bêta-lactames, qui peuvent subir des modifications en utilisant des méthodes de semi-synthèse.

II.10.3. Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques agissent sur la cellule bactérienne de deux manières :

A. Bactéricides, ce sont des ATB qui provoquent la mort de la bactérie en agissant sur :

La paroi bactérienne : les ATB inhibent la biosynthèse de la paroi en ciblant les protéines liant les pénicillines (PLP). Lorsque la paroi est dégradée,

la bactérie subit une lyse. Parmi les antibiotiques qui perturbent cette voie, on trouve la pénicilline, la bacitracine et les céphalosporines (Zeba, 2005).

La membrane cellulaire, en désorganisant sa structure et son fonctionnement, ce qui entraîne de graves perturbations des échanges électrolytiques avec le milieu extérieur.

L'ADN, les quinolones et fluoroquinolones inhibent l'ADN gyrase, tandis que certaines inhibent la réplication de l'ADN en bloquant la progression de l'ADN polymérase (Chopra et al., 1997). L'actinomycine bloque l'ARN polymérase. Les sulfamides inhibent la synthèse des bases nucléiques (J.C et al., 1997).

B. Bactériostatiques, ces ATB agissent en inhibant la croissance bactérienne :

La synthèse protéique, Ils agissent sur les ribosomes en arrêtant la biosynthèse des protéines ou en entraînant la formation de protéines anormales. Les aminoglycosides ou aminosides (streptomycine, gentamicine, amikacine) empêchent la traduction de l'ARNm en se fixant sur la petite sous-unité des ribosomes (Hermann, 2005).

Les voies métaboliques, certains ATB agissent sur les métabolites bactériens en inhibant la formation de l'acide folique et de l'acide mycolique.

La figure 5 illustre le mode d'action des antibiotiques.

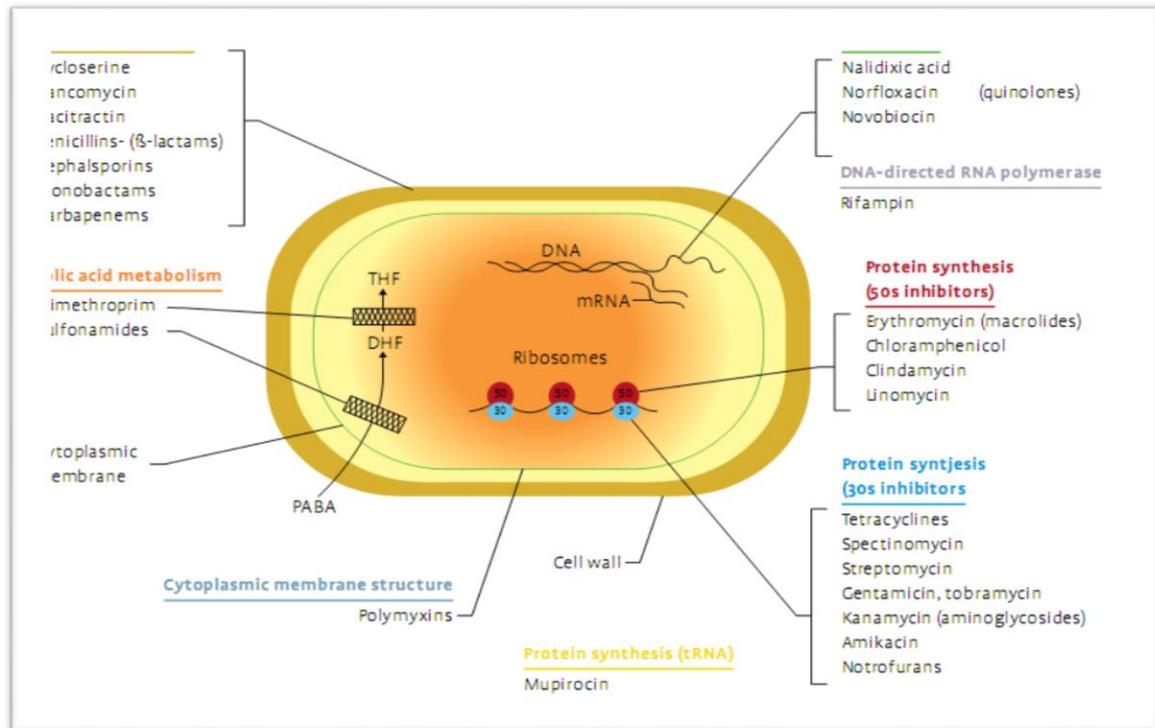


Figure 5: Mode d'action des antibiotiques (Madigan, Martinko and Parker, 2000).

II.10.4. Mécanisme générale de la résistance aux antibiotiques

La résistance intrinsèque (naturelle) est définie comme une caractéristique fonctionnelle ou structurelle conférant une certaine tolérance (Saidou et al., 2020). Les bactéries résistent aux molécules auxquelles elles sont naturellement confrontées dans leur environnement. Certaines plantes, bactéries et champignons sécrètent des antibiotiques qui conduisent à une résistance. C'est également une stratégie pour éliminer certaines bactéries inhibitrices (Mandell et al., 2009).

L'utilisation imprudente des ATB peut entraîner une résistance acquise grâce à des mutations génétiques aléatoires qui sont transmises à leur descendance par une transmission verticale, ou par l'échange de gènes entre des bactéries qui habitent différents écosystèmes par une transmission horizontale (conjugaison, transduction) (Khachatourians, 1998).

Il existe quatre mécanismes par lesquels les bactéries résistent aux antibiotiques :

- L'imperméabilité bactérienne, qui établit que les grosses molécules d'antibiotiques ne peuvent pas pénétrer dans les porines de la membrane externe de ces bactéries. (Cardot martin, 2019)
- La modification de la cible des ATB, ce qui entraîne une perte d'activité de ces molécules.
- L'inactivation enzymatique des ATB, par exemple, certaines bactéries produisent des enzymes appelées bêta-lactamases qui hydrolysent les bêta-lactamines (Cardot martin, 2019).
- Les systèmes de pompe à efflux, permettent d'éliminer les antibiotiques en dehors de la bactérie.

II.11. Antibiorésistances

II.11.1. Définition de l'antibiorésistance

C'est la capacité de la bactérie de se développe en présence des concentrations d'ATB notamment plus élevé qui inhibe le développement de la plupart des autres souches de la même espèce (Bouakka and Zouaouia, 2019).

II.11.2. L'antibiorésistance chez le genre *Aeromonas*

Le genre bactérien *Aeromonas* présente une sensibilité aux antibiotiques suivants : streptomycine, chloramphénicol, norfloxacine, acide nalidixique et ceftazidime. En revanche, il présente une résistance aux antibiotiques tels que l'ampicilline, la bacitracine, la pénicilline et la tétracycline (Daskalov, 2006). On observe également une résistance fréquente aux antibiotiques méthicilline, rifampicine, bacitracine et novobiocine, bien que la sensibilité au chloramphénicol soit fréquente (Krovacek et al., 1989).

La résistance à la colistine a été découverte en 2016 et peut être codée par le gène *mrc* présent dans le plasmide. Cette résistance est fréquemment observée et réapparaît dans plusieurs régions du monde (Tansarli et al., 2018).

II.11.3. L'antibiorésistance chez *Citrobacter*

On observe une sensibilité aux aminosides et aux quinolones. En revanche, il présente une résistance aux Bêta-lactamines en raison de la production de céphalosporinases (Delmas, 2001).

II.11.4. L'antibiorésistance chez *Proteus* et *Providencia*

Proteus et *Providencia* sont sensibles aux céphalosporines, aux aminoglycosides et à l'imipenème. En revanche, ils présentent une résistance à la pénicilline, à l'amoxicilline, à l'ampicilline et à la céfazoline (Cardot martin, 2019). De plus, *Providencia* présente une résistance à la colistine.

II.11.5. La résistance chez vibrion

Ce genre bactérien présente une résistance au chloramphénicol, à la streptomycine et à l'ampicilline. Cette résistance est due à la modification du site cible de ces molécules, ainsi qu'à un mécanisme de transport qui réduit l'action des antibiotiques à l'intérieur de la cellule (Igbinosa, 2010).

II.11.6. L'antibiorésistance chez *Enterococcus*

Enterococcus présente une faible résistance aux Bêta-lactamines telles que la pénicilline, l'ampicilline et l'imipenème, qui exercent un effet bactériostatique. Par exemple, *E. faecalis* est entre 10 et 100 fois moins sensible à la pénicilline que d'autres bactéries, tandis que *E. faecium* est de 4 à 16 fois moins sensible que *E. faecalis*. Cette faible résistance est due à la production constitutive de la bêta-lactamase, qui n'est pas inductible, et peut être présente sur les plasmides ou le chromosome (Mainardi et al., 2000).

Enterococcus présente également une résistance aux aminoglycosides par la production d'enzymes qui modifient ces molécules, entraînant leur inactivation (Chow, 2000).

Une résistance acquise aux glycopeptides est observée, qui est due à la modification de la cible des antibiotiques, par la synthèse de précurseurs des motifs di peptidiques D-Ala-D-Lac ou D-Ala-D-Ser (ce qui diminue l'affinité).

Cette résistance est associée aux gènes Van A, Van B, Van C, Van D, Van E, Van G, Van L et Van M (Euzéby, 2008).

Le linézolide est un antibiotique ayant un effet bactériostatique, et la bactérie peut lui résister par deux mécanismes. Premièrement, des mutations peuvent apparaître dans les séquences d'ARNr23S, et deuxièmement, la bactérie peut acquérir des gènes portés par un plasmide appelé cfr, qui induit la méthylation de l'ARNr23S (Luna et al., 1999).

La résistance aux streptogramines est portée par un plasmide et forme une résistance silencieuse.

En ce qui concerne la daptomycine, *E. faecium* est l'espèce la plus résistante à cet antibiotique par rapport aux autres espèces de ce genre. Cette résistance est due à la présence d'une mutation génétique au sein de l'opéron *liaFSR* (Van Tyne and Gilmore, 2014).

Des mutations au niveau des gènes codant la gyrase et la topoisomérase IV sont également responsables de la résistance aux quinolones.

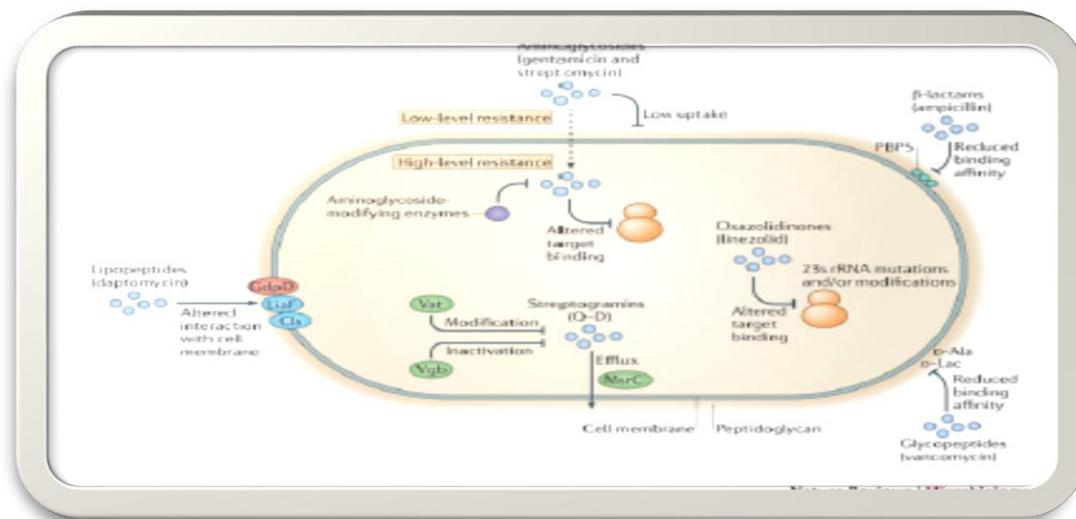


Figure 6: Les différents mécanismes de résistance chez les bactéries du genre *Enterococcus* (Van Tyne and Gilmore, 2014).

PARTIE III. MATERIEL ET METHODES

Les effluents hospitaliers, lorsqu'ils ne sont pas correctement traités, peuvent être rejetés dans l'environnement, ce qui représente un risque pour la santé humaine et la qualité des eaux de surface. L'objectif de cette étude est d'investiguer la présence de bactéries multi-résistantes dans les effluents hospitaliers non traités de l'établissement hospitalier HAMDANE Bakhta à Saida et d'évaluer leur niveau de résistance vis-à-vis de certains antibiotiques.

III.1. Provenance des échantillons

Le 1er mars 2023 à 08h43, des échantillons ont été prélevés à partir du regard principal collecteur des eaux usées de tous les services cliniques, des laboratoires et de la cuisine. Les échantillons ont été collectés dans des flacons de 250 ml (Figure 7). Une fois les prélèvements réalisés, ils ont été immédiatement transportés au laboratoire de microbiologie de l'Université de Saida Dr Moulay Tahar, où les analyses nécessaires ont été effectuées.



Figure 8: Site de prélèvement



Figure 7: Échantillon d'eau d'effluents hospitaliers de l'hôpital HAMDANE Bakhta

III.2. Dénombrement de la flore totale et la flore résistante

Des dilutions décimales, allant de 10^{-1} à 10^{-6} , ont été réalisées à partir des échantillons d'eaux usées en utilisant une solution stérile d'eau physiologique ou TSE. Ensuite, 100 μ L de chaque dilution a été soigneusement étalé sur la surface de milieux sélectifs appropriés. Pour le dénombrement de la flore totale, le milieu Slanetz et Burtely a été utilisé pour les *Enterococcaceae*, tandis que le milieu Mac Conkey a été utilisé pour les *Enterobacteriaceae* et les non-entérobactéries comme *Aeromonadaceae* ainsi que *Vibrionaceae*. Pour la

recherche des Entérocoques résistants à la vancomycine, le milieu Slanetz et Burtely contenait 6µg/mL de vancomycine. De plus, le milieu Mac Conkey contenait soit 2µg/mL de ceftazidime, soit 4µg/mL de colistine pour la recherche de la flore résistante. Les boîtes sont incubées à une température de 37°C pendant une période de 24 à 48 heures, le laps de temps nécessaire pour permettre le développement et l'apparition des colonies bactériennes.

III.3. La purification des isolats bactériens

Après incubation, quatre à cinq colonies isolées de la flore résistante ont été prélevées au hasard de chaque boîte Petri. Chaque colonie prélevée est ensuite repiquée en bouillon nutritif. Après incubation à température souhaité, l'apparition des cultures en milieu liquide a été constatée. À ce stade les isolats bactériens peuvent être purifiés par isolement par la méthode des stries. L'opération de purification a été renouvelée à deux reprises en prenant chaque fois une colonie bien isolée dans la gélose. On obtient ainsi une culture dont la pureté est estimée par observation macroscopique et microscopique. Après purification, des répliques de ces isolats ont été conservées.

III.4. Observation microscopique

La coloration de Gram est une étape clé dans l'identification des souches bactériennes. Elle permet de différencier les bactéries en Gram positif, qui apparaissent en violet, des bactéries en Gram négatif, qui apparaissent en rose. Cette coloration permet également de déterminer la forme des bactéries (bâtonnets, coques, etc.) et d'évaluer leur mode de regroupement selon la méthode classique. La coloration de Gram constitue donc une étape importante dans la caractérisation des bactéries (Boutadjine and Boultif, 2019) (Annexe 2).

III.5. La conservation des isolats

III.5.1. La conservation à court durée

Les bactéries ont étéensemencées dans des tubes de gélose nutritif inclinés qui ont ensuite été incubés à 37°C. Lorsque la croissance était visible, les tubes étaient placés à +4°C où ils ont été conservés durant plusieurs

semaines. Cette méthode permet de maintenir les souches bactériennes viables pendant une période limitée.

III.5.2. La conservation a longue durée

Les bactéries ont étéensemencées dans du BN; après 18h d'incubation à 37 °C, les cellules ont été récupérées par centrifugation à 4000 t/min pendant 10 min. Une fois le surnageant éliminé, le milieu de culture de conservation a été ajouté au culot, qui contenait 60% de BN et 40% de glycérol. Les cellules ont été conservées en suspension dense et en tubes Eppendorf à -20 °C.

Cette méthode permet de préserver les souches bactériennes pendant une période prolongée en maintenant leur viabilité et leurs caractéristiques génétiques.

III.6. Critères biochimiques des isolats

Pour parvenir à une identification précise du genre et de l'espèce d'une souche bactérienne, il est nécessaire de poursuivre avec des tests biochimiques visant à étudier son métabolisme glucidique et protidique.

Ces tests biochimiques permettent d'analyser comment la souche bactérienne métabolise les glucides et les protéines. Ils comprennent généralement des réactions enzymatiques, des tests de fermentation des glucides, des tests de dégradation des protéines, ainsi que d'autres tests spécifiques pour évaluer les caractéristiques métaboliques de la souche.

III.6.1. Recherche de la catalase

Cette enzyme a été démontrée en mettant en contact la culture à étudier avec une goutte de peroxyde d'hydrogène (10 %) sur une lame. La présence de l'enzyme se manifestait par l'apparition de bulles gazeuses (d'oxygène). Pendant leur respiration aérobie certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), qui est très toxique et certaines bactéries sont capable de le dégrader grâce aux enzymes qu'elles synthétisent, notamment la catalase.

III.6.2. Identification par la galerie API20E

La galerie API20E (Appareillage et Procédé d'Identification) est un ensemble de tests biochimiques miniaturisés et standardisés permettant l'identification rapide des différentes souches isolées.

III.6.2.1. Préparation de la galerie

Réunir le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Ensuite, déposer la galerie de manière stérile dans la boîte d'incubation.

III.6.2.2. Préparation de l'inoculum

Dans un tube stérile contenant 5 ml d'eau physiologique, prélevez une seule colonie de la bactérie bien isolée sur le milieu gélosé. Réalisez ensuite une suspension bactérienne de 0.5 sur l'échelle de MacFarland.

III.6.2.3. Inoculation de la galerie

Introduisez la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide d'une pipette paster ou de micropipette (afin d'éviter la formation de bulles au fond des tubes, posez la pointe de la pipette sur le côté de la cupule en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant).

Pour les tests CIT, VP et GEL, remplissez le tube et la cupule.

Pour les tests ADH, LDC, ODC, H₂S et URE, créez une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.

Pour les autres tests, remplissez uniquement les tubes.

Refermez la boîte d'incubation et incubez à 37 °C pendant 18 à 24 heures.

III.6.2.4. Lecture et interprétation des résultats

Les réactifs pour les tests indirects TDA, VP, IND ont été ajoutés. Les lectures ont été réalisées après 24 et 48 heures. Les résultats obtenus ont été interprétés en utilisant le site <https://lab.upbm.org>.



Figure 9: Aspect de la galerie API20E avant incubation

III.7. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est définie comme la concentration minimale d'un antibiotique qui inhibe la croissance in vitro de 99% de la population bactérienne testée. En pratique, la CMI est la plus faible concentration d'une gamme de dilutions d'antibiotique de demi en demi qui entraîne l'inhibition de toute croissance bactérienne visible.

La CMI a été mesurée pour cinq antibiotiques : ampicilline, colistine, ceftazidime, gentamicine et vancomycine.

III.7.1. Préparation de l'inoculum pour la mesure de la CMI

III.7.1.1. Norme de turbidité pour la préparation de l'inoculum

Pour standardiser la densité de l'inoculum pour un test de sensibilité, une norme de turbidité de 0,5 McFarland a été utilisée. Cette norme de McFarland originale est obtenue en mélangeant des quantités spécifiées de chlorure de baryum et d'acide sulfurique, ce qui provoque la formation d'un précipité de sulfate de baryum et rend la solution trouble.

Pour préparer un étalon de standard 0,5 McFarland, il faut mélanger 0,05 ml de chlorure de baryum dihydraté à 1,175% ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) avec 9,95 ml d'acide sulfurique à 1% (H_2SO_4). Ce mélange donne une suspension contenant approximativement $1 \text{ à } 2 \times 10^8$ unités formant des colonies (UFC)/mL pour *Escherichia coli* ATCC 25922.

L'évaluation visuelle a été utilisée pour ajuster la densité de l'inoculum. Une source de lumière appropriée a été utilisée pour comparer visuellement le tube d'inoculum avec le standard McFarland de 0,5.

III.7.1.2. Préparation des solutions mère d'antibiotiques

Pour réaliser une série de dilutions logarithmiques d'antibiotiques, la méthode consiste à préparer une solution mère initiale de 5120 µg/mL. Cette concentration est ensuite soumise à des dilutions successives de 1/2 en utilisant de l'eau distillée stérile, afin d'obtenir une série de concentrations allant de 1,25 µg/mL à 5120 µg/mL. Les solutions d'antibiotiques ainsi préparées sont ensuite conservées à 4 °C, à l'abri de la lumière, et doivent être utilisées dans un délai ne dépassant pas 7 jours afin d'éviter toute perte d'activité antibiotique.

III.7.2. Méthode de la microdilution

L'inoculum a été préparé en suspendant des colonies isolées choisies parmi une culture en boîte de Petri pendant 16 à 24 heures dans une solution physiologique. La suspension a été ajustée pour correspondre à la norme de turbidité de 0,5 McFarland en utilisant de l'eau physiologique et en agitant vigoureusement. Pour la méthode de microdilution, une dilution de 1/200 est souhaitable pour obtenir une concentration finale d'environ 5×10^4 UFC/puits. Pour cela, 5 µL de la suspension ont été dilués dans 0,1 mL de milieu MH additionnés d'antibiotique. La croissance des bactéries a été observée à l'œil nu après 24 h d'exposition à l'antibiotique à 37 °C. La concentration minimale inhibitrice, est la plus faible concentration d'antibiotique où il n'y a pas de croissance bactérienne visible.

III.7.3. Méthode de dilution en gélose

La méthode de dilution en gélose nécessite une dilution de 1:10 de la suspension de McFarland 0,5 dans de l'eau physiologique afin d'obtenir une concentration de 10^7 UFC/mL. L'inoculum final sur MH agar additionnés d'antibiotique sera d'environ 10^4 UFC par spot de 3 mm de diamètre, en utilisant 2 µL d'inoculum. Les spots sont mis à sécher à température ambiante durant 15 à 30 min, ensuite les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 24 heures. La CMI est définie à partir de la première boîte de la série dépourvue de croissance microbienne.

III.8. Procédure pour effectuer le test de diffusion de disque (Antibiogramme)

III.8.1. Inoculation de boîtes de test

L'inoculation des boîtes a été réalisée à l'aide d'un écouvillon stérile, la procédure a consisté de plonger l'écouvillon dans la suspension ajusté 15 minutes suivant l'étalonnage de la turbidité de l'inoculum à 0,5 MacFarland. L'écouvillon devait être tourné et pressé fortement contre la paroi interne du tube au-dessus du niveau de liquide, pour éliminer l'excès de l'inoculum.

La surface séchée d'une boîte de gélose MH a été inoculée en étalant l'écouvillon sur toute la surface de la gélose stérile. Cette procédure a été répétée en stries deux fois, en faisant tourner la boîte d'environ 60° à chaque fois pour assurer une distribution uniforme de l'inoculum.

Le couvercle peut être laissé entrouvert pendant 3 à 5 minutes, mais pas plus de 15 minutes, afin de permettre l'absorption de l'excès d'humidité superficielle avant l'application des disques imprégnés d'antibiotiques.

III.8.2. Application de disques sur des boîtes d'agar inoculées

Les disques d'antibiotiques (Tableau 3) ont ensuite été distribués à la surface de la boîte inoculée. Chaque disque a été enfoncé pour assurer un contact complet avec la surface de la gélose. Que les disques aient été placés individuellement ou avec un dispositif de distribution, ils ont été répartis uniformément de manière qu'ils ne soient pas inférieurs à 24 mm de centre à centre. Normalement, il ne faut pas placer plus de 5 à 6 disques sur une boîte de 100 mm.

Les boîtes ont été inversées (couvercle vers le bas) et placées dans un incubateur réglé à 37°C dans les 15 minutes suivant l'application des disques.

III.8.3. Lecture de boîtes et interprétation des résultats

Après 16 à 18 heures d'incubation, les zones d'inhibitions ont été mesurées au millimètre près, à l'aide d'une règle.

Les diamètres des zones d'inhibition ont été interprétés en se référant aux diamètres discriminants fixés par CLSI M100-S (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI, 2012).

Tableau 2: Les antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme

Symbole	Antibiotique	Famille	La charge de disque par mg
AUG	Amoxicilline +acide clavulanique	Bêta-lactamines	30
CAZ	Ceftazidime	Bêta-lactamines	30
IMP	Imipenème	Bêta-lactamines	10
C	Chloramphénicol	Phénicoles	30
CN	Gentamicine	Aminoglycosides	10
SXT	Sulfaméthoxazole/Triméthopri me	Sulfamides	25
TE	Tétracycline	Cycline	30

III.8.4. Recherche des BLSE (Bêta-lactamases à spectre étendu)

La production d'une β -lactamase à spectre étendue (BLSE) a été étudiée en utilisant des tests de synergie sur gélose MRS ou MH. Des disques de céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) (céftazidime) ont été placés à 2 ou 3 cm d'un disque d'amoxicilline + acide clavulanique (Jarlier et al., 1988). La présence d'une BLSE a été caractérisée par la description d'une image de synergie en « bouchon de champagne » en raison de l'effet inhibiteur de l'acide clavulanique (Siu et al., 2003).

III.9. Recherche de bactériophages

Les bactériophages capables d'infecter diverses espèces de bactéries et de mettre en évidence leur effet antibactérien naturel comparable à celui d'un antibiotique. Les bactériophages sont isolés à partir d'échantillons d'eaux usées, incubés avec la bactérie cible pour être ensuite sélectionnés selon leur capacité d'amplification.

III.9.1. Culture bactérienne

Les bactéries ciblées dans le cadre cette étude sont des souches de référence *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella oxytoca*, *Listeria innocua* et *Acinetobacter baumannii*. Toutes les souches bactériennes sont cultivées à 37°C dans le milieu de culture Luria-Bertani (LB).

III.9.2. Isolement des bactériophages

Les bactériophages sont isolés à partir d'échantillons d'eaux usées. Tout d'abord, 100 µL d'échantillon sont mis en contact avec la bactérie cible (500 µL) dans 5 mL de milieu LB à 37°C pendant toute la nuit. Ensuite, l'échantillon amplifié est centrifugé pendant 30 minutes à 4500 tours/minute. Le surnageant est filtré à l'aide d'un filtre de porosité de 0,45 µm. Une série de dilutions à moitié allant jusqu'à une dilution de 10⁷ des bactériophages isolés est préparée dans du CaCl₂ à une concentration de 11 g/L. 100 µL de chaque dilution sont prélevés et étalés sur un secteur (comme illustré dans la figure ci-dessous) d'un tapis bactérien composé de la bactérie cible. Les boîtes de Petri contenant les dilutions sont ensuite incubées à 37°C pendant toute la nuit.

III.9.3. Synergie phages / Antibiotique

La synergie entre les bactériophages et les antibiotiques désigne l'effet bénéfique obtenu grâce à l'utilisation combinée de ces deux approches pour traiter les infections bactériennes. Cette combinaison permet de tirer parti des avantages distincts des bactériophages, qui ciblent spécifiquement les bactéries, et des antibiotiques, qui agissent directement sur les bactéries, afin d'améliorer l'efficacité du traitement. Dans notre étude, nous avons évalué la synergie entre la ceftazidime, un antibiotique de la classe des céphalosporines, et un mélange de bactériophages isolés, dans le but de déterminer les effets conjoints de ces deux approches sur l'inhibition bactérienne.

Le protocole consistait à étaler la souche à tester sur milieu LB. Deux disques ont été déposés sur la surface de la boîte de Pétri. Le premier disque

contenait uniquement de la ceftazidime, tandis que le deuxième disque était chargé avec 10 µL d'un mélange de bactériophages dilué 1/2 dans du CaCl₂. À titre de témoin, 10 µL de CaCl₂ seul a été ajouté seule sur la gélose LB. Après 15 min, les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 24 heures.

III.10. Extraction de l'ADN plasmidique

La résistance aux bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) est couramment associée à l'acquisition de plasmides portant les gènes codant pour ces enzymes chez les bactéries. Afin d'explorer cette acquisition de résistance, nous avons réalisé des recherches pour déterminer la présence de plasmides dans les souches productrices de BLSE. La détection de plasmides dans ces souches peut indiquer qu'elles ont acquis la capacité de produire des BLSE par transfert horizontal. Pour confirmer cette hypothèse, nous pouvons procéder à un curage des plasmides, c'est-à-dire à l'élimination des plasmides de la bactérie. Si la souche de bactérie perd la production de BLSE après le curage, cela soutiendrait l'idée que la présence des plasmides était liée à l'acquisition de la production de BLSE. L'analyse de l'effet du curage des plasmides sur la production de BLSE permettrait de mieux comprendre le rôle des plasmides dans le développement de la résistance aux bêta-lactamases à spectre étendu.

III.11. Protocol d'extraction d'ADN plasmidique

III.11.1. Récupération et lavage des cellules

Une centrifugation à 4000 tours pendant 12 minutes est réalisée sur 1,5 mL de chaque suspension bactérienne préparée précédemment. Ensuite, le même volume est prélevé et soumis à une deuxième centrifugation afin d'obtenir un culot bactérien dense et cohérent. Enfin, le culot est suspendu dans 150 µl de tampon Tris-HCl 20 mM à pH 8, contenant 10 mM d'EDTA.

III.11.2. Lyse bactérienne

On ajoute 300 µl d'une solution extemporanée de NaOH 0,2 M et de SDS à 1 % à la suspension préparée précédemment, et on laisse agir pendant 5 minutes.

III.11.3. Purification de l'ADN plasmidique

Un volume de 225 μL d'acétate de potassium (KAc) 3 M, à pH 5,2, est ajouté au lysat bactérien puis la suspension est mélangée par retournements successifs 6 à 10 fois, ensuite les tubes sont placés dans de la glace pendant 10 minutes.

Après centrifugation pendant 10 min à 12 000 g à température ambiante, un volume v de surnageant (400 μL) est additionné de 2v d'éthanol absolu (800 μL) à -20°C et placé à -20°C pendant 30 minutes pour précipiter l'ADN plasmidique. Les tubes sont centrifugés 15 minutes à 12 000 g à 4°C . Le culot est remis en suspension dans 300 μL d'éthanol à 75%, recentrifugée 15 min à 12 000 g à 4°C . Le culot est séché quelques minutes à 37°C pour éliminer l'éthanol puis remis en suspension dans 20 μL du tampon TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8, avec EDTA 1 mM).

III.11.4. Électrophorèse sur gel d'agarose

III.11.4.1. Préparation du gel

Dans un erlenmeyer dissolvez 0,2 g d'agarose dans 20 mL du tampon TEA 1X (Tris base 40 mM, Acétate de sodium 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3) en utilisant un bain-marie jusqu'à ce que l'agarose soit complètement dissous. Versez le mélange dans le moule à gel en présence des peignes, puis laissez le gel solidifier pendant environ 30 minutes (Figure 10).



Figure 10: Préparation de gel d'agarose pour électrophorèse.

III.11.5. Chargement d'échantillons

Retirez les peignes du gel et placez le gel dans la chambre d'électrophorèse. Ajoutez suffisamment de tampon TAE pour recouvrir le gel, puis chargez les échantillons dans les puits de gel (Figure 11), en utilisant 10 μL d'échantillon par puits et mélangez-les avec 10 μL du tampon de charge (bleu de bromophénol 0,25% (p/v), glycérol 40%, EDTA 1 mM, pH 8).



Figure 11: Chargement des échantillons d'ADN dans les puits du gel d'agarose

III.11.6. Électrophorèse

Sous l'application d'une tension constante de 80 volts, la migration s'effectue de la cathode vers l'anode. Le déplacement du colorant bleu de bromophénol est utilisé pour suivre cette migration. Pour la visualisation des bandes d'ADN, une solution de bromure d'éthidium (BET) est préparée avec une concentration appropriée, telle que 0,5 à 1 $\mu\text{g/ml}$. Le gel est ensuite immergé dans cette solution de BET et laissé à incuber pendant environ 15 minutes. Après l'incubation, le gel est placé sur une source de lumière ultraviolette (UV) afin de visualiser les bandes d'ADN. Sous l'illumination UV, les bandes d'ADN plasmidiques apparaîtront comme des bandes fluorescentes, permettant leur observation et leur analyse ultérieure.



Figure 12: Configuration du générateur d'électrophorèse et du système d'électrophorèse

PARTIE IV. RESULTATS ET DISCUSSION

L'objectif de cette étude est de mener une investigation sur la présence de bactéries multi-résistantes dans les effluents hospitaliers non traités de l'établissement hospitalier HAMDANE Bakhta à Saida. La première étape essentielle de cette étude consiste à effectuer un dénombrement précis de la flore résistante présente dans ces effluents. Cette évaluation quantitative permettra d'obtenir des informations cruciales sur l'ampleur de la contamination par des bactéries résistantes, en particulier celles présentant une résistance aux antibiotiques de dernier recours tels que la ceftazidime, la colistine et la vancomycine. L'identification et la quantification précises de ces bactéries multi-résistantes joueront un rôle clé dans l'évaluation du risque potentiel pour la santé publique et dans la mise en place de mesures appropriées pour prévenir la propagation de ces souches résistantes dans l'environnement hospitalier.

IV.1. Dénombrement de la flore totale et la flore résistantes

Dans cette étude, nous avons procédé au dénombrement de la flore totale ainsi que de la flore résistante présente dans les échantillons d'eaux usées. Pour ce faire, nous avons utilisé la formule suivante, basée sur la loi :

$$N = \sum C / (V \times 1.1d)$$

N représente le nombre d'unités formant colonies (UFC) par gramme ou par millilitre de produit initial,

$\sum C$ correspond à la somme totale des colonies comptées,

d est le taux de dilution à partir duquel les premiers comptages ont été obtenus,

et V représente le volume de solution déposée.

L'objectif principal de notre étude était d'isoler et de caractériser les espèces bactériennes résistantes présentes dans les eaux usées. Les résultats ont révélé une concentration moyenne de 1×10^7 UFC/mL pour la flore totale sur le milieu Mac Conkey. En revanche, nous avons dénombré $2,6 \times 10^6$ UFC/mL pour la flore résistante à la ceftazidime et $1,4 \times 10^5$ UFC/mL pour la

flore résistante à la colistine. Sur le milieu Slanetz et Bartley, la flore totale a été dénombrée à 10^4 UFC/mL, tandis que la flore résistante à la vancomycine était présente à une concentration de $2,4 \times 10^2$ UFC/mL.

Ces résultats indiquent clairement que les eaux usées sont fortement contaminées par des bactéries. Nos observations rejoignent celles de Ekhaïse et Omavwoya, qui a constaté une moyenne de 10^7 à 10^8 UFC/mL de bactéries à Gram négatif, principalement représentées par les entérobactéries, dans les eaux usées hospitaliers (Ekhaïse and Omavwoya, 2008). Il a également noté que le nombre de micro-organismes pouvait être multiplié par 1000 dans les eaux de rivière après le rejet des eaux usées urbaines (Baumont, 2004). En ce qui concerne les entérocoques, correspondant à des colonies noires sur le milieu Slanetz et donc présumées être des entérocoques, le dénombrement a révélé 10^4 UFC/mL pour la flore totale et $2,4 \times 10^2$ UFC/mL pour la flore résistante, ce qui est conforme aux travaux de Varela et al. (2013) qui ont estimé un nombre total compris entre 10^2 et 10^4 UFC/mL et entre 10^1 et 10^3 UFC/mL pour la flore résistante à la vancomycine.

La résistance observée dans cette étude peut être attribuée à la présence de résidus d'antibiotiques non métabolisés dans les effluents hospitaliers, ce qui contribue largement à la sélection de bactéries multirésistantes dans les eaux usées. Cette hypothèse est soutenue par le travail Islam (2008).

Ces constatations soulignent l'importance de surveiller et de traiter correctement les effluents hospitaliers afin de prévenir la propagation de bactéries résistantes dans l'environnement.

IV.2. Isolement et identification des isolats

Sur le milieu MacConkey, les colonies présentent une variété de formes (rondes), de tailles (petites, moyennes et grandes) et de couleurs (rose clair, rose foncé, blanc). En revanche, sur le milieu Slanetz et Bartley, les colonies sont de petite taille et ont une couleur noire.

À partir de ces colonies, nous avons procédé à l'isolement et à l'identification des isolats bactériens résistants à la colistine (Figure 13 A), à la ceftazidime (Figure 13 B) et à la vancomycine (Figure 14). Pour ce faire, nous avons choisi aléatoirement quatre à cinq colonies isolées de la flore résistante à partir de chaque boîte de Petri contenant les échantillons. Chaque colonie prélevée a ensuite été inoculée dans un bouillon nutritif puis sur GN.

La pureté des cultures a été vérifiée en effectuant des repiquages successifs sur gélose GN, suivis d'une incubation à 37 °C pendant 24 heures. Cette étape a été répétée jusqu'à ce que des colonies présentant une taille, une forme et une couleur identiques soient obtenues, ce qui témoigne de la pureté des souches bactériennes isolées (Idoui et al., 2009).

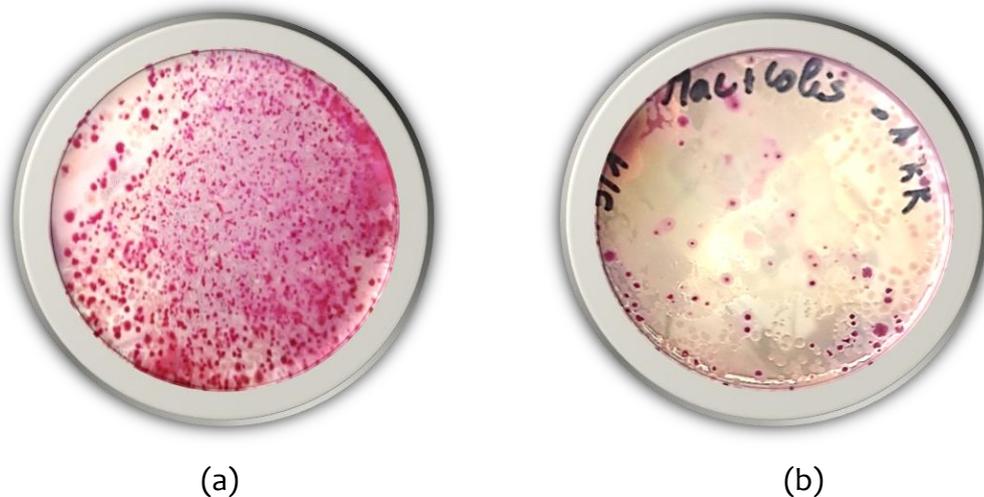


Figure 13: Aspect des colonies sur le milieu MacConkey :(a) avec la Ceftazidime et (b) avec la Colistine



Figure 14: Aspect des colonies sur le milieu Slantez et Bartely en présence de la Vancomycine

IV.2.1. Examen microscopique des isolats

Les isolats bactériens obtenus à partir du milieu MacConkey ont été examinés au microscope optique après coloration de Gram avec un grossissement X 1000. Les bactéries observées étaient de couleur rose, ce qui indique qu'elles ne retiennent pas la coloration de Gram. Elles étaient parfois isolées et parfois regroupées, et présentaient des formes de coccobacilles ou de bacilles. En revanche, les bactéries isolées à partir du milieu Slanetz et Bartley étaient de couleur violette et retenaient la coloration de Gram. Elles avaient une forme cocci ou ovoïde. Un exemple d'aspect microscopique des souches Co3 et V1 est présenté dans la figure 15.



Figure 15: Aspect microscopique de la souche Co3 (coccobacille) et V1 (cocci) au grossissement X 1000

IV.3. Critères biochimiques

IV.3.1. Recherche de l'activité catalase

Les résultats du test de catalase, réalisé dans le cadre de l'étude du type respiratoire des bactéries Gram négatif, ont révélé que la plupart des souches de ce groupe présentaient un dégagement gazeux, témoignant de la présence de l'enzyme catalase. Il convient de noter que certaines familles de bactéries Gram négatif, telles que les *Enterobacteriaceae*, ont été rapportées comme étant catalase positives (Taylor and Achanzar, 1972), ce qui signifie qu'elles produisent l'enzyme catalase. En revanche, toutes les souches de bactéries Gram positif ont été identifiées comme catalase négatives, ne

produisant aucun dégagement gazeux, ce qui suggère l'absence de l'enzyme catalase. Il a été rapporté que certaines familles Gram positif, comme les *Enterococaceae*, sont catalase négatives (Facklam and Elliott, 1995).

La catalase joue un rôle crucial en neutralisant les effets bactéricides du peroxyde d'hydrogène, et sa présence dans les bactéries est souvent associée à leur potentiel pathogène (Reiner, 2010).



Figure 16: Résultat du test de catalase pour la souche Co3

IV.4. Identification biochimique

La galerie API 20 E a été utilisée pour affiner nos résultats dans l'identification des souches bactériennes isolées sur milieu MacConkey. Au total, 20 souches présomptives ont été sélectionnées pour l'analyse approfondie.

Voici quelques exemples de résultats d'identification pour chaque genre identifié

Souches Co3

Le tableau et la figure suivants présentent les résultats de l'inoculation de la souche Co3 dans la galerie API 20 E après une incubation de 24 heures à 37°C.

Tableau 3 : Résultats de la galerie API 20 E de la souche Co3

Test	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP
Résultat	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+
Test	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
Résultat	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-



Figure 17: Résultat de la galerie API20E de la souche Co3

Les résultats biochimiques obtenus à partir de l'inoculation des galeries API ont été remplis dans la grille des résultats dans le site web <https://lab.upbm.org>

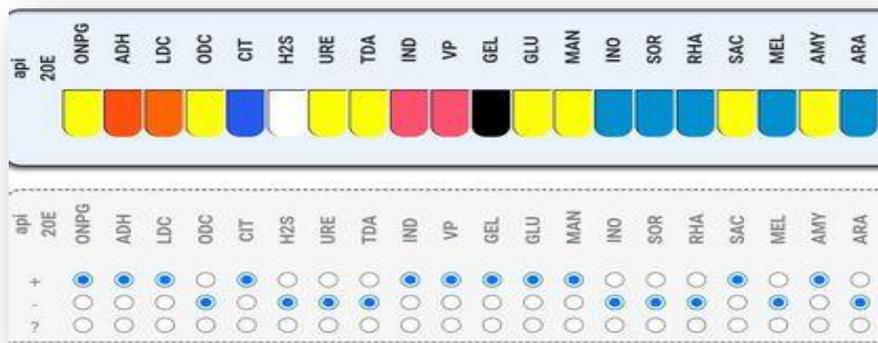


Figure 18: Capture d'écran de l'affichage de grille d'identification de la souche Co3 par le site web <https://lab.upbm.org>.

À partir du catalogue analytique, il s'avère que la souche Co3 correspond à *Aeromonas hydrophila* Gr2

Souche Ce11

Le tableau et la figure suivants présentent les résultats de l'inoculation de la souche Co11 dans la galerie API 20 E après une incubation de 24 heures à 37°C.

Tableau 4: Résultat de la galerie API20E de la souche Ce11

Test	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP
Résultat	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
Test	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
Résultat	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+

A partir du catalogue analytique, il s'avère que la souche Ce11 correspond à *Vibrio fluvialis*.



Figure 19: Résultat de la galerie API20E de la souche Ce 11

Les résultats biochimiques obtenus à partir de l'inoculation des galeries API ont été remplis dans la grille des résultats dans le site web <https://lab.upbm.org>

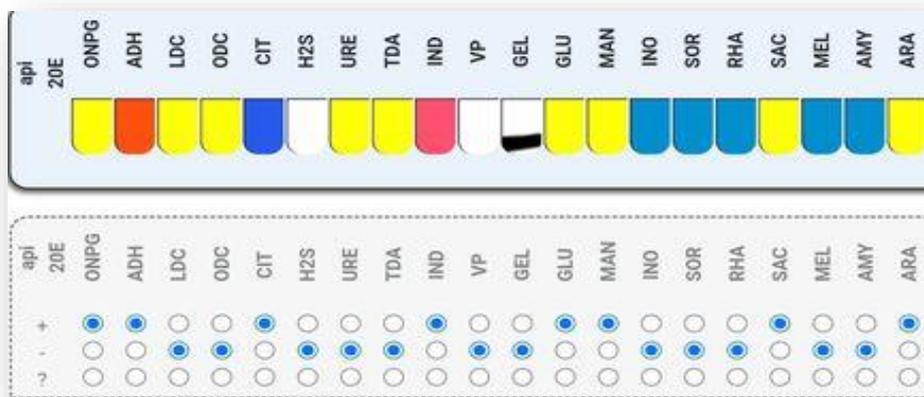


Figure 20: Capture d'écran de l'affichage de grille d'identification de la souche Ce11 par le site web <https://lab.upbm.org>.

Souche Ce13

Le tableau et la figure suivants présentent les résultats de l'inoculation de la souche Ce13 dans la galerie API 20 E après une incubation de 24 heures à 37°C.

Tableau 5: Résultat de la galerie API20E de la souche Ce13

Test	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP
Résultat	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Test	GLE	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
Résultat	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+



Figure 21: Résultat de la galerie API20E de la souche Ce13

Les résultats biochimiques obtenus à partir de l'inoculation des galeries API ont été remplis dans la grille des résultats dans le site web <https://lab.upbm.org>

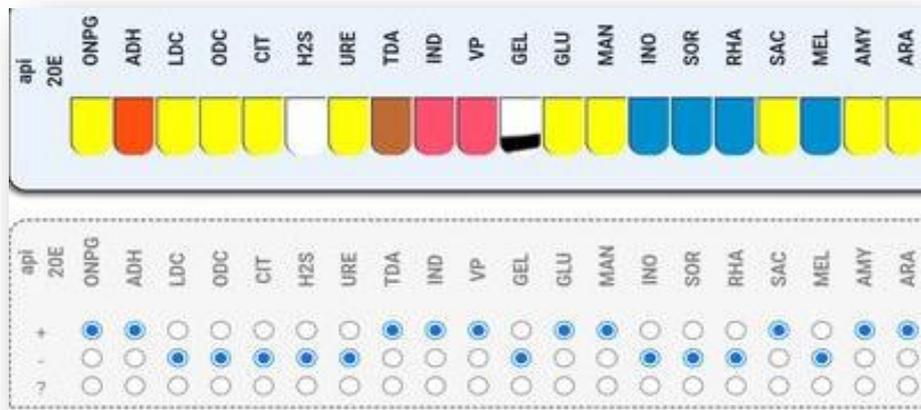


Figure 22: Capture d'écran de l'affichage de grille d'identification de la souche Ce13 par le site web <https://lab.upbm.org>.

A partir du catalogue analytique, il s'avère que la souche Ce13 correspond à *Providencia rettgi*.

Souche Ce14

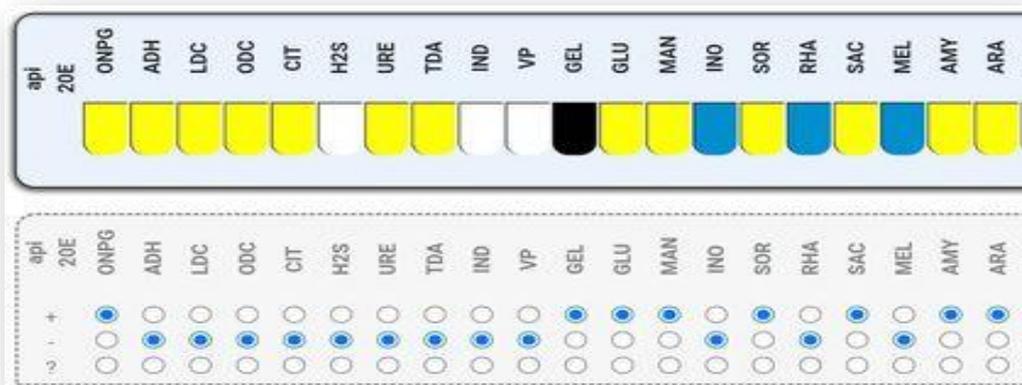
Le tableau et la figure suivants présentent les résultats de l'inoculation de la souche Co11 dans la galerie API 20 E après une incubation de 24 heures à 37°C.

Tableau 6 : Résultat de la galerie API20E de la souche Ce 14

Test	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP
Résultat	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Test	GLE	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
Résultat	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+

**Figure 23:** Résultat de la galerie API20E de la souche Ce 14

Les résultats biochimiques obtenus à partir de l'inoculation des galeries API ont été remplis dans la grille des résultats dans le site web <https://lab.upbm.org>

**Figure 24:** Capture d'écran de l'affichage de grille d'identification de la souche Ce14 par le site web <https://lab.upbm.org>.

A partir du catalogue analytique, il s'avère que la souche Ce14 correspond à ***Proteus Vulgaris***.

Souche Co8

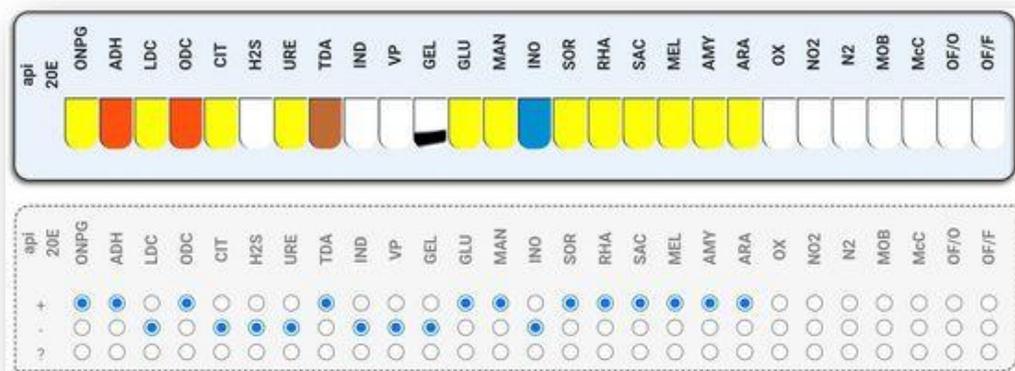
Le tableau et la figure suivants présentent les résultats de l'inoculation de la souche Co3 dans la galerie API 20 E après une incubation de 24 heures à 37°C.

Tableau 7 : Résultat de la galerie API20E de la souche Co8

Test	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP
Résultat	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
Test	GLE	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
Résultat	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+

**Figure 25:** Résultat de la galerie API20E de la souche Co8

Les résultats biochimiques obtenus à partir de l'inoculation des galeries API ont été remplis dans la grille des résultats dans le site web <https://lab.upbm.org>

**Figure 26:** Capture d'écran de l'affichage de grille d'identification de la souche Co8 par le site web <https://lab.upbm.org>

A partir du catalogue analytique, il s'avère que la souche Co8 correspond à *Citrobacter koseri*

Pour les autres souches les résultats obtenus après identification par galerie API 20E sont représentées dans le tableau 9.

Tableau 8 : Résultats de l'identification des souches par galerie API 20E.

Souches	Co2	Co3	Co4	Co5	Co7	Co8	Co9	Co12	Co19	Co20	Ce9	Ce10	Ce11	Ce12	Ce13	Ce14	Ce15	Ce16
Forme	Coccobacille	Coccobacille	Coccobacille	Coccobacille	Coccobacille	Bacille	Coccobacille	Coccobacille	Coccobacille	Coccobacille	Bacille	Coccobacille	Bacille	Bacille	Bacille	Bacille	Coccobacille	Coccobacille
Type de Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
% d'identification	86.6	99.1	86.6	86.6	99.9	89.8	99.8	91.9	91.8	81.2	72.5	65.1	88.7	88.7	100	100	91.3	98.8
Identification Genre/espèce	<i>Aeromonas hydrophila</i> Gr1	<i>Aeromonas hydrophila</i> Gr2	<i>Aeromonas hydrophila</i> Gr1	<i>Aeromonas hydrophila</i> Gr1	<i>Aeromonas hydrophila</i> Gr1	<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> Gr2	<i>Aeromonas hydrophila</i> Gr2	<i>Aeromonas hydrophila</i> Gr2	<i>Aeromonas hydrophila</i> Gr2	<i>Vibrio flavutis</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> Gr2	<i>Vibrio flavutis</i>	<i>Vibrio flavutis</i>	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> Gr1	<i>Aeromonas hydrophila</i> Gr1

L'identification des souches bactériennes à Gram négatif isolées des effluents hospitaliers a été réalisée à l'aide de la galerie API 20E. Cette analyse a permis de sélectionner 18 souches différentes, dont 12 souches d'*Aeromonas hydrophila*. La distinction entre ces souches s'est basée sur leurs utilisations et leurs fermentations des sucres. Parmi ces souches, les souches Co13 et Co19 ont montré une fermentation positive pour tous les sucres testés, tandis que la souche Ce17 n'a fermenté que le glucose. Cette dernière a donné des résultats négatifs pour tous les autres tests, à l'exception des tests de gélatine, de citrate et de VP, qui se sont révélés positifs.

En outre, trois souches de *Vibrio fluvialis* ont été identifiées, parmi lesquelles la souche Co9 a présenté un test de gélatine positif, tandis que les souches Ce11 et Ce12 étaient négatives. De plus, une souche de *Citrobacter koseri*, *Proteus rettgeri* et *Proteus vulgaris* a également été identifiée.

Il convient de noter que ces résultats d'identification sont basés sur les caractéristiques biochimiques observées dans la galerie API 20E et qu'ils fournissent des indications préliminaires sur les espèces bactériennes présentes dans les échantillons d'effluents hospitaliers. Des méthodes supplémentaires, telles que la confirmation par des tests supplémentaires ou

l'utilisation de techniques moléculaires, peuvent être nécessaires pour une identification plus précise des souches bactériennes.

Plusieurs études ont démontré la présence de bactéries appartenant aux genres *Aeromonas* (Janda and Abbott, 2010), *Citrobacter*, *Proteus* (Mutuku et al., 2022), *Vibrio* (Osuolale and Okoh, 2018), *Providencia* (Ojer-Usoz et al., 2014) dans les effluents hospitaliers. Ces genres bactériens sont d'intérêt en raison de leur potentiel pathogène et de leur capacité à survivre et se propager dans les environnements hospitaliers.

Un total de 12 souches à Gram positif ont été isolées à partir du milieu Slanetz et Bertelay. Ces souches ont été numérotées de Vo1 à Vo12 pour faciliter leur référencement ultérieur. Les colonies isolées présentent un aspect macroscopique distinctif, se caractérisant par une coloration noire. Cette observation suggère une possible réaction positive à l'esculine, ce qui présume la présence d'*Enterococcus* spp. dans les échantillons d'eau des effluents.

Cependant, il est primordial de souligner que cette présomption nécessite une confirmation ultérieure par le biais de tests biochimiques spécifiques, tels que ceux disponibles dans les galeries API 20 Strep, ou d'autres méthodes d'identification appropriées. Ces tests permettront de confirmer de manière concluante l'identification de ces souches présumées comme étant des *Enterococcus* spp.

Il est important de noter que la coloration noire des colonies, associée à une réaction positive à l'esculine, est souvent observée chez les espèces d'*Enterococcus*, en particulier *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*. Cependant, d'autres espèces ou genres bactériens pourraient également présenter des caractéristiques similaires. Par conséquent, il est essentiel de procéder à des tests de confirmation supplémentaires pour établir de manière définitive l'identification des souches isolées.

Pour confirmer l'identité des souches présumées comme *Enterococcus* spp., il est recommandé de réaliser des tests biochimiques plus spécifiques,

tels que ceux inclus dans les galeries API 20 Strep, qui permettront de déterminer les caractéristiques métaboliques et phénotypiques des souches isolées. Ces analyses supplémentaires permettront de fournir des informations plus détaillées sur l'identité et les propriétés des souches d'*Enterococcus* spp présentes dans les échantillons d'eau des effluents.

Il a également été rapporté que les entérocoques peuvent être présents dans les effluents hospitaliers. Les entérocoques appartiennent principalement aux espèces *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* sont souvent considérées comme des indicateurs de contamination fécale et peuvent être trouvées dans l'environnement hospitalier en raison de la présence de patients infectés ou colonisés (Varela et al., 2013).

IV.5. Mesure de la concentration minimale inhibitrice

La CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique capable d'inhiber la croissance bactérienne. Dans notre étude, la détermination de la CMI a été réalisée en utilisant deux techniques différentes. La première technique repose sur l'utilisation d'un milieu solide, tandis que la deuxième technique utilise la micro-méthode en milieu liquide.

La CMI en milieu solide

La détermination de la CMI en milieu solide présente plusieurs avantages. Tout d'abord, elle permet d'évaluer la sensibilité de plusieurs souches bactériennes simultanément, ce qui est particulièrement utile dans les études comparatives. De plus, cette méthode offre une grande précision, ce qui permet même de détecter visiblement une légère croissance bactérienne sur le milieu solide, facilitant ainsi l'interprétation des résultats.

Un exemple des résultats obtenus dans notre étude est présenté dans la Figure 27. Les résultats montrent que les souches bactériennes ont été capables de se développer jusqu'à une concentration de 8 µg/mL d'antibiotique. Au-delà de cette concentration, la plupart des souches ont cessé de croître, ce qui suggère une CMI d'environ 16 µg/mL pour ces souches.

Cependant, il convient de noter que les souches Co7 et Ce16 ont montré une résistance plus élevée, survivant jusqu'à une concentration de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ce qui suggère une CMI plus élevée pour ces souches spécifiques.

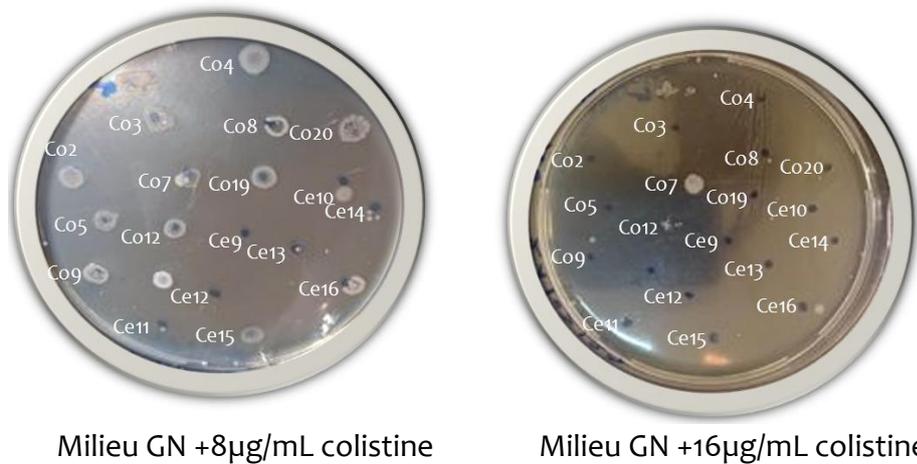


Figure 27: Détermination de la CMI des souches vis-à-vis de la colistine par la méthode de dilution en milieu solide.

La micro-méthode

La micro-méthode consiste à utiliser une seule plaque de 96 puits pour mesurer la CMI de 8 souches simultanément. Cette méthode utilise une petite quantité de milieu de culture (quelques dizaines de microlitres par puits). Un exemple des résultats obtenus est présenté dans la figure 28 où la CMI de la souche Ceg est de l'ordre de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ envers la colistine.

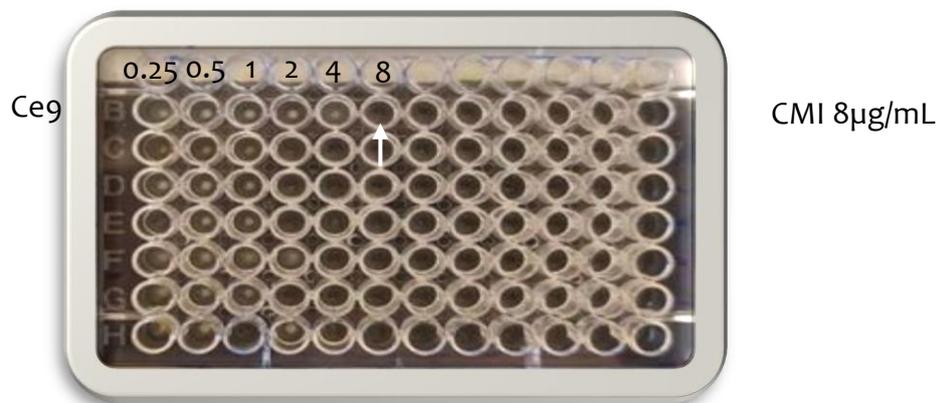


Figure 28: Détermination de la CMI de la souche Ceg vis-à-vis la colistine par la méthode de dilution en milieu liquide (micro-dilution).

Les résultats de la CMI obtenus sont présentés dans les tableaux 9 et 10.

Tableau 9: Concentration minimale inhibitrice ($\mu\text{g}/\text{mL}$) des souches à Gram négatif vis-à-vis des différents antibiotiques.

(S) : Sensible, (R) : Résistante, (I) : Intermédiaire.

Souches	Colistine	Ceftazidime	Ampicilline	Gentamycine	Vancomycine	
<i>A. hydrophila</i>	Co2	16(R)	>128(R)	>512(R)	256(R)	512(R)
	Co3	16(R)	8(I)	>512(R)	4(S)	4(S)
	Co4	16(R)	325(R)	>512(R)	128(R)	256(R)
	Co5	16(R)	4(S)	>512(R)	64(R)	512(R)
	Co7	>16(R)	4(S)	>512(R)	64(R)	512(R)
	Co9	16(R)	>128(R)	>512(R)	64(R)	512(R)
	Co12	>16(R)	>128(R)	>512(R)	>512(R)	>512(R)
	Co19	16(R)	64(R)	>512(R)	>512(R)	>512(R)
	Co20	16(R)	32(R)	>512(R)	64(R)	>512(R)
	Ce10	16(R)	>128(R)	>512(R)	64(R)	512(R)
	Ce15	16(R)	8(I)	>512(R)	128(R)	512(R)
	Ce16	>16(R)	>128(R)	>512(R)	64(R)	512(R)
<i>C. koseri</i>	Co8	16(R)	64(R)	>512(R)	256(R)	512(R)
<i>V. fluvialis</i>	Ce9	8(R)	>128(R)	>512(R)	256(R)	512(R)
	Ce11	8(R)	16(R)	>512(R)	4(S)	512(R)
	Ce12	8(R)	16(R)	>512(R)	16(R)	512(R)
<i>P. rettgi</i>	Ce13	8(R)	4(S)	>512(R)	16(R)	512(R)
<i>P. vulgaris</i>	Ce14	16(R)	16(R)	512(R)	256(R)	256(R)

Tableau 10: Concentration minimale inhibitrice ($\mu\text{g}/\text{mL}$) des souches à Gram positif de *Enterococcus spp* vis-à-vis des différents antibiotiques.

(S) : Sensible, (R) : Résistante, (I) : Intermédiaire.

Souche	Vancomycine	Ampicilline	Gentamycine	
<i>Enterococcus sp</i>	Vo1	>1024(R)	0.5(S)	128(R)
	Vo2	>1024(R)	0.5(S)	512(R)
	Vo3	>1024(R)	0.5(S)	128(R)
	Vo4	>1024(R)	1(S)	128(R)
	Vo5	>1024(R)	64(R)	>512(R)
	Vo6	>1024(R)	1(S)	128(R)
	Vo7	>1024(R)	0.5(S)	128(R)
	Vo8	>1024(R)	64(R)	>512(R)
	Vo9	>1024(R)	32(R)	256(R)
	Vo10	>1024(R)	1(S)	128(R)
	Vo11	>1024(R)	1(S)	128(R)
	Vo12	>1024(R)	1(S)	128(R)

IV.5.1. CMI de la colistine

Les souches de l'espèce *A. hydrophila* ont présenté des valeurs de CMI pour la colistine \geq à 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ce qui indique une résistance à cet antibiotique. Traditionnellement, cette espèce était considérée comme sensible à la colistine, cependant, il a été observé récemment qu'elle a développé une résistance à cet antibiotique. Des rapports antérieurs ont souligné que cette résistance à la colistine peut être attribuée à la présence de gènes *mcr*, qui ont

été détectés sur un plasmide (Esteve, 2015). Ces gènes *mcr* présentent différentes variantes qui ont montré une augmentation chez *A. hydrophila* (Tansarli, 2018). Des études menées par un groupe de scientifiques ont révélé que *A. hydrophila* présentait une résistance aux variantes *mcr3-8* et *mcr3-9*. Ces gènes sont régulés par des protéines MCR localisées dans la membrane interne (Venter, 2017), qui modifient les lipopolysaccharides (LPS). Cette modification des LPS confère une résistance à la colistine en altérant la charge négative à laquelle la colistine se lie normalement (Anyanwu, Jaja and Nwobi, 2020).

Concernant *P. vulgaris* et *P. rettgi*, ces espèces sont naturellement résistantes à la colistine (Talkit, 2014). En revanche, *C. koseri* est naturellement sensible à la colistine (Vu-Thien, 1998). Cependant, il a été rapporté que des cas de résistance à cet antibiotique pourraient être associés à des mutations et à l'émergence de nouveaux mécanismes d'adaptation. De plus, il a été démontré dans plusieurs études que *V. fluvialis* présente également une résistance à la colistine. Les résultats de ces études ont mis en évidence la présence de mécanismes de résistance chez cette espèce bactérienne envers cet antibiotique (Fosse, Giraud-Morin and Madinier, 2003).

IV.5.2. CMI de la ceftazidime

Toutes les souches d'*A. hydrophila* ont été observées comme résistantes à la ceftazidime, avec des valeurs de CMI variant entre 8 et plus de 128 µg/mL, à l'exception des souches Co5 et Co7 qui se sont révélées sensibles avec une CMI de 4 µg/mL. Selon la littérature, la résistance naturelle d'*A. hydrophila* à la ceftazidime est médiée par des mécanismes chromosomiques (Aravena-Román et al., 2012), Cependant, la sensibilité à la ceftazidime observée dans ces deux souches spécifiques pourrait être due à des mutations acquises.

Pour *P. vulgaris* et *P. rettgi*, les valeurs de CMI affichées sont respectivement de 16 µg/mL et 4 µg/mL pour la ceftazidime. Le genre *Providencia* est naturellement sensible à la ceftazidime. Cependant, pour le genre *Proteus*, il a été rapporté que la résistance aux céphalosporines de type

est souvent due à la présence de céphalosporinases chromosomiques chez ces bactéries (Bertrand, 2006). De même, pour *C. koseri*, une CMI de 64 µg/mL a été observée, ce qui indique une résistance à la ceftazidime. Cette résistance peut être justifiée par sa capacité à produire des céphalosporinases inductibles, comme rapporté dans certaines études (Vora and Auckenthaler, 2005). Pour les souches de l'espèce *V. fluvialis*, les CMI ont été comprises entre 16 µg/mL et 128 µg/mL. Selon une étude réalisée par Srinivasan et al. (2006) la résistance peut être acquise portée par un élément intégratif et conjugué.

IV.5.3. CMI de l'ampicilline

Toutes les souches à Gram négatif sont caractérisées comme résistantes avec une CMI \geq à 512 µg/mL. Le profil de résistance chez *A. hydrophila* à l'ampicilline est corrélé aux phénotypes naturels de production de bêta-lactamase (Fosse, Giraud-Morin and Madinier, 2003). Pour *P. vulgaris*, les souches sont naturellement sensibles à l'ampicilline. Cependant, dans notre étude, nous avons observé l'acquisition d'une résistance à cet antibiotique, qui peut être attribuée à des mutations génétiques ou au transfert de gènes (Orrett and Davis, 2006). Cette résistance peut également être associée à l'émergence et à la propagation de nouveaux mécanismes de résistance, tels que les bêta-lactamases, capables de sécréter une grande diversité de bêta-lactamines plasmidiques. Ces mécanismes de résistance confèrent aux souches de *P. vulgaris* la capacité de dégrader et d'inactiver l'ampicilline, rendant ainsi l'antibiotique inefficace contre ces souches (Mahamat et al., 2006).

Concernant la résistance à l'ampicilline des autres espèces, des études ont rapporté que *V. fluvialis* présente une résistance grâce à la production de pénicillinases codées par le gène blaTEM (Jiang et al., 2014). En revanche, chez *C. koseri* et *Providencia*, la résistance à l'ampicilline est intrinsèque et due à la production d'ampicillinases de type C (Vu-Thien, 1998). Ces enzymes

permettent à ces espèces de dégrader et d'inactiver l'ampicilline, conférant ainsi une résistance naturelle à cet antibiotique.

Parmi les entérocoques, seules trois souches sur douze sont résistantes, à savoir Vo5, Vo8 et Vo9, tandis que les autres sont sensibles. Cette résistance peut être due à la modification des protéines de liaison aux pénicillines (PLP5) (Lee et al., 1978). De plus, il a été rapporté que la résistance à l'ampicilline peut être également due à la production d'une enzyme bêta-lactamase qui inactive l'antibiotique en clivant le cycle du bêta-lactame, ce mécanisme a été décrit à la fois chez *E. faecalis* et *E. faecium* (Bryskier, 1999). Des mutations proches du site catalytique seraient responsables de l'augmentation des valeurs de CMI (Rice et al., 2004).

IV.5.4. CMI de la vancomycine

Toutes les souches d'*A. hydrophila*, à l'exception des souches Co3 et Ce7, sont résistantes à la vancomycine. Des études ont rapporté que cette résistance peut être attribuée à la présence de plasmides jouant un rôle dans la résistance aux antibiotiques (Del Castillo et al., 2013). Quant aux autres souches, telles que *C. koseri*, *P. vulgaris*, *V. fluvialis* et *P. rettgi*, elles présentent une résistance naturelle à la vancomycine.

Les entérocoques sont naturellement sensibles à la vancomycine (Maryse and Danielle, 2007). Cependant, nos souches présentent une résistance notable avec une CMI qui peut atteindre ou dépasser 512 µg/mL. Cette résistance peut être attribuée à la modification de leur cible, où le D-Alanine-D-Alanine est remplacé par le D-Alanine-D-Lactate. Cette substitution élimine l'une des cinq liaisons hydrogène nécessaires pour la liaison de la vancomycine à la chaîne de peptidoglycane (Guardabassi and Agersø, 2006). Ainsi, cette modification structurelle altère l'efficacité de la vancomycine contre nos souches d'entérocoques résistantes.

IV.5.5. CMI de la gentamicine

Les résultats de la CMI pour la gentamicine varient de 4 à 512 µg/mL. Toutes les souches, à l'exception de la souche Co3 d'*A. hydrophila* et de la

souche Ce11 de *V. fluvialis*, ont été caractérisées comme résistantes à cet antibiotique. Normalement, les souches d'*A. hydrophila* sont sensibles à la gentamicine, cependant, des cas de résistance acquise à cet antibiotique ont été rapportés récemment pour cette espèce (Moellering Jr, 1977; Odeyemi and Ahmad, 2017).

Les *Proteus* sont naturellement sensibles à la gentamicine, mais une résistance significative a été détectée dans notre étude. Des recherches antérieures ont également souligné que cette résistance peut résulter de mutations génétiques spécifiques (Feglo et al., 2010). En ce qui concerne les *Vibrio*, ils présentent une résistance multiple à la gentamicine, comme l'ont démontré plusieurs études (Elexson et al., 2014). Cette résistance est le résultat de mécanismes complexes, tels que l'acquisition de gènes de résistance ou des modifications au niveau des cibles de l'antibiotique. Normalement sensibles à la gentamicine, les *Citrobacter* ont montré, contrairement aux attentes, une résistance lors de cette étude. Bien que les études antérieures aient généralement indiqué leur sensibilité à cet antibiotique (Delmas, 2005), nos résultats révèlent une situation différente. La résistance observée chez les *Citrobacter* peut être attribuée à divers facteurs, tels que la présence de gènes de résistance ou des mécanismes d'inactivation enzymatique.

En revanche, *Providencia* présente une résistance acquise à la gentamicine, comme cela a été rapporté dans une étude antérieure (Clave and Floch, 1973). Cette résistance est le résultat de l'acquisition de gènes de résistance par transfert horizontal, permettant à la bactérie de produire des enzymes qui inactivent la gentamicine.

En ce qui concerne les *Enterococcus*, ils présentent une tolérance intrinsèque à la gentamicine, qui est gérée par deux phénomènes principaux : une faible absorption de l'antibiotique nécessitant des concentrations plus élevées pour pénétrer à l'intérieur de la cellule, et une activation par modification covalente des groupes hydroxyle ou amino de la molécule de

gentamicine, réalisée par des enzymes naturelles des entérocoques (Galimand et al., 2011).

IV.6. Détermination des profils de résistance aux antibiotiques (Antibiogramme)

Après 24 heures d'incubation, le diamètre de la zone d'inhibition de croissance bactérienne est mesuré pour chaque antibiotique. Cela permet de déterminer la sensibilité des germes aux antibiotiques. Les résultats obtenus sont ensuite comparés aux valeurs critiques pour classer les souches en trois catégories : Sensible (S), Résistante (R) et Intermédiaire (I). Cette classification est basée sur la taille de la zone d'inhibition et permet d'indiquer si les germes sont sensibles, résistants ou ont une sensibilité intermédiaire à l'antibiotique testé.

Selon les résultats de l'antibiogramme, nous avons calculé les taux de résistance aux différents antibiotiques (figure 29). Sur la base de ce résultat, nous avons constaté que :

Amoxicilline plus acide clavulanique (AUG) : Les résultats montrent une résistance élevée chez les *Enterobacteriaceae* (100%), les *Aeromonadaceae* (92%) et les *Vibrionaceae* (67%). Cependant, les *Enterococcaceae* présentent un taux de résistance plus faible (16%). Cela suggère que l'amoxicilline plus acide clavulanique est moins efficace contre ces bactéries, en particulier chez les *Enterobacteriaceae* et les *Aeromonadaceae*. Chez *A. hydrophila*, plusieurs études ont montré que cette souche peut développer une forte résistance acquise aux bêta-lactamines. De même, des souches de *P. vulgaris* et *P. rettgeri* ont été identifiées comme pouvant acquérir cette résistance. Il est important de noter que la résistance acquise aux bêta-lactamines peut être due à divers mécanismes, tels que des mutations génétiques ou le transfert de gènes de résistance (Clave, 2010).

En ce qui concerne *C. rettgeri*, cette espèce présente une résistance naturelle à l'amoxicilline plus acide clavulanique (AUG). Cela signifie que les

souches de *C. rettgi* sont intrinsèquement résistantes à cet antibiotique et ne nécessitent pas de mécanismes d'acquisition de résistance supplémentaires.

D'autre part, des études ont rapporté que certaines souches de *V. fluvialis* peuvent acquérir une résistance à l'amoxicilline plus acide clavulanique grâce à des mutations dans les gènes QRDR de GyrA à la position 83 (Chowdhury et al., 2009). Ces mutations peuvent altérer la cible de l'antibiotique, rendant la souche moins sensible à son action. Il est important de souligner que toutes les souches de *V. fluvialis* ne présentent pas nécessairement cette résistance et que sa présence peut varier selon les souches isolées.

En ce qui concerne les entérocoques, ils montrent une sensibilité à l'amoxicilline plus acide clavulanique (AUG), ce qui peut être attribué à des mutations génétiques spécifiques. Initialement, les entérocoques sont résistants à de nombreux antibiotiques, y compris les bêta-lactamines, mais des mutations génétiques peuvent entraîner une sensibilité à l'amoxicilline plus acide clavulanique. Cependant, il convient de noter que les mécanismes précis de cette sensibilité et les types de mutations impliquées nécessitent des études plus approfondies.

Imipénème (IMP) : La résistance à l'imipénème est relativement faible dans l'ensemble des familles bactériennes étudiées, allant de 17% à 33%. Les *Enterobacteriaceae* ayant une résistance de 33% et les *Vibrionaceae* ne montre aucune résistance aux imipénème, tandis que les *Aeromonadaceae* ont un taux de résistance de 17%. Les *Enterococcaceae* montrent une résistance allant à 16%.

La résistance aux carbapénèmes chez les entérobactéries est rarement détectée chez *A. hydrophila* (Clave, 2010), ce qui est en accord avec les résultats de cette étude. Cela suggère que les souches d'*A. hydrophila* ont une sensibilité conservée aux carbapénèmes, ce qui en fait une option thérapeutique efficace pour traiter les infections causées par cette bactérie.

En ce qui concerne *C. koseri*, ces souches peuvent développer une résistance aux carbapénèmes en produisant des bêta-lactamases qui hydrolysent ces antibiotiques. Cette résistance peut être médiée par des plasmides ou être d'origine chromosomique (Naas et al., 1994). Il est important de noter que la production de bêta-lactamases est un mécanisme courant de résistance aux carbapénèmes chez de nombreuses espèces bactériennes.

Quant à *P. vulgaris* et *P. rettgi*, ces souches ont montré une sensibilité réduite aux carbapénèmes par rapport aux autres entérobactéries (Clave and Floch, 1973). Cela suggère que ces deux espèces ont une tendance naturelle à être moins sensibles à ces antibiotiques. Il est possible que des mécanismes spécifiques de résistance ou des variations dans les cibles des carbapénèmes contribuent à cette sensibilité réduite.

Chez *V. fluvialis*, des études ont révélé que les *Vibrio* peuvent développer une résistance aux carbapénèmes grâce à un transfert horizontal de plasmides ou de transposons contenant des gènes de résistance (Elexson et al., 2014). Cela implique que les *Vibrio* ont une sensibilité intrinsèque aux carbapénèmes, mais qu'ils peuvent acquérir des mécanismes de résistance par échange de matériel génétique. Il est donc important de surveiller attentivement l'émergence de ces mécanismes de résistance chez les *Vibrio*.

Chez *Enterococcus* spp., on observe une sensibilité naturelle aux carbapénèmes (Maryse and Danielle, 2007). Cela signifie que les entérocoques sont généralement sensibles à ces antibiotiques, ce qui en fait une option thérapeutique efficace pour les infections causées par ces bactéries. Cependant, il est toujours essentiel de surveiller l'apparition de nouvelles souches résistantes dans les environnements hospitaliers.

En conclusion, la résistance aux carbapénèmes peut varier selon les espèces bactériennes. Les souches d'*A. hydrophila* et d'*Enterococcus* spp. conservent généralement leur sensibilité aux carbapénèmes, tandis que certaines souches de *C. koseri*, *P. vulgaris*, *P. rettgi* et *V. fluvialis* peuvent

présenter une résistance acquise ou naturelle à ces antibiotiques. La compréhension des mécanismes de résistance spécifiques de chaque espèce est cruciale pour guider le choix des traitements antibiotiques et pour mettre en place des stratégies de prévention et de contrôle appropriées.

Triméthoprim-sulfaméthoxazole (SXT) : Les taux de résistance au triméthoprim-sulfaméthoxazole varient entre 0% et 67% selon les familles bactériennes. Les *Enterobacteriaceae* ne montre aucune résistance à Triméthoprim-sulfaméthoxazole, tandis que les *Aeromonadaceae* et les *Vibrionaceae* ont des taux de résistance de 42% et 67% respectivement. Les *Enterococcaceae* montrent une résistance plus faible de 0%.

Le triméthoprim-sulfaméthoxazole (SXT) est un antibiotique auquel toutes les souches analysées., à l'exception des *Enterobacteriaceae* dans notre étude, ont montré une sensibilité naturelle. Cependant, il convient de noter que *V. vulgaris* est une exception, car cette espèce présente une résistance innée aux SXT (Laganà, 2011). Cette résistance peut être due à des mécanismes spécifiques de la bactérie qui contrent l'action de cet antibiotique.

Ceftazidime (CAZ) : Les *Enterobacteriaceae* et les *Vibrionaceae* présentent un taux de résistance élevé de 100% et 33% pour les *Vibrionaceae*, indiquant une faible efficacité de cet antibiotique contre ces bactéries. Les *Aeromonadaceae* montrent un taux de résistance de 25%, tandis que les *Enterococcaceae* ont un taux de résistance de 16%.

La littérature indique que *A. hydrophila* présente une résistance naturelle au ceftazidime, principalement médiée par des mécanismes chromosomiques. Cependant, nous avons trouvé une sensibilité à la ceftazidime dans deux souches distinctes ; cela pourrait être dû à des mutations présentes dans ces isolats. Selon les données de la littérature, le genre *Proteus* est naturellement sensible au ceftazidime. Cependant, des recherches antérieures sur le genre *Providencia* ont révélé que la présence de céphalosporinases chromosomiques chez ces bactéries est souvent liée à la résistance aux

céphalosporines de type (Bertrand, 2006). De même, une résistance a été observée à *C. koseri*. Selon certaines études, cette résistance peut être attribuée à sa capacité à produire des céphalosporinases inducibles (Vora and Auckenthaler, 2005).

Une étude menée par Srinivasan et al. (2006) a démontré que les souches de *V. fluvialis* peuvent développer une résistance au ceftazidime en utilisant des éléments intégratifs et conjugués. Selon Rice et al. (2009), les entérocoques ont une résistance naturelle aux céphalosporines de type ceftazidime. Cependant, dans notre étude, nous avons constaté une sensibilité des souches d'entérocoques à la ceftazidime, ce qui pourrait être dû à des mutations particulières. Il est important de garder à l'esprit que bien que ces souches soient sensibles, leur croissance peut être altérée. Il convient également de noter que l'enzyme responsable de l'activité de transglycosylase en l'absence de PBP de la classe A n'a pas encore été identifiée.

Chloramphénicol (C) : Les taux de résistance au chloramphénicol sont relativement faibles, allant de 0% à 8%. Les *Enterobacteriaceae* et les *Vibrionaceae* présentent un taux de résistance de 0%, tandis que les *Aeromonadaceae* ont un taux de résistance de 0%. Les *Enterococcaceae* montrent un taux de résistance plus élevé de 8%.

Pour le chloramphénicol (C), les souches étudiées ont montré une sensibilité. Cet antibiotique agit en interférant avec la synthèse des protéines bactériennes, ce qui entraîne l'arrêt de la croissance et la mort des bactéries. Cette sensibilité généralisée au chloramphénicol a été rapportée dans différentes études (Palú et al., 2006; Ngbede et al., 2017).

Tétracycline (TE) : Les taux de résistance à la tétracycline varient entre 13% et 100%. Les *Enterobacteriaceae* et les *Vibrionaceae* ont des taux de résistance de 100% et 33% respectivement, tandis que les *Aeromonadaceae* ont un taux de résistance de 17%. Les *Enterococcaceae* montrent un taux de résistance 42%.

En ce qui concerne la tétracycline (TE), *A. hydrophila* a montré une sensibilité à cet antibiotique, ce qui indique qu'un traitement à la TE pourrait être efficace contre ces bactéries (Fahrenfeld et al., 2014). Les *Citrobacter* sont également sensibles à la TE, comme indiqué dans une étude menée par DePaola et al. (1988). En revanche, *P. vulgaris* et *P. rettgi* présentent une résistance naturelle à la tétracycline. Concernant *V. fluvialis*, cette espèce est sensible à la tétracycline. Des études antérieures ont montré que les *Enterococcus* sont généralement sensibles à la tétracycline, et la résistance observée dans notre étude peut être le résultat d'une résistance acquise chez les souches qui ont manifesté une résistance (Aarestrup et al., 2000).

Gentamicine (CN) : Les taux de résistance à la gentamicine varient de 0% à 67%. Les *Enterobacteriaceae* et les *Vibrionaceae* présentent un taux de résistance de 67%, tandis que les *Aeromonadaceae* ont un taux de résistance de 33%. Les *Enterococcaceae* montrent un taux résistance 33%.

Pour la gentamicine (CN), différentes réponses de sensibilité ont été observées chez les *Aeromonas*. Certaines souches sont naturellement résistantes, tandis que d'autres sont sensibles, ce qui peut être dû à des mutations spécifiques. Pour *P. rettgi*, la sensibilité à la gentamicine est naturelle, tandis que *P. vulgaris* présente également une sensibilité naturelle. Cependant, nos souches de *P. vulgaris* montrent une résistance, qui peut être attribuée à des mutations acquises. En ce qui concerne *C. koseri*, cette souche est normalement sensible à la gentamicine, mais notre souche présente une résistance, qui peut également être due à des mutations génétiques. Pour *V. fluvialis*, une résistance acquise à la gentamicine a été observée. Cette résistance peut être conférée par plusieurs mécanismes, notamment la diminution de l'absorption et de l'accumulation des antibiotiques, la modification de la cible ribosomale, l'efflux des antibiotiques et la modification enzymatique des aminoglycosides (Ahmed, 2004).

En ce qui concerne les entérocoques, ils présentent naturellement une résistance à la gentamicine grâce à des modifications de leur ribosome.

Cependant, dans notre étude, nos souches d'entérocoques se sont révélées sensibles à la gentamicine, ce qui est en contradiction avec les résultats de la mesure de la CMI pour cet antibiotique. Cette discordance entre les tests d'antibiogramme et les tests de CMI pour la résistance à la gentamicine peuvent être surprenants, en particulier en ce qui concerne le genre *Enterococcus*, qui est connu pour présenter une résistance naturelle à cet antibiotique. Cette discordance peut être attribuée à plusieurs facteurs.

Tout d'abord, il est important de noter que les tests d'antibiogramme et les tests de CMI sont des méthodes différentes pour évaluer la sensibilité ou la résistance aux antibiotiques. Les tests d'antibiogramme utilisent des disques contenant des concentrations standardisées d'antibiotiques pour évaluer la croissance ou l'inhibition des bactéries, tandis que les tests de CMI mesurent directement la concentration minimale d'antibiotique nécessaire pour inhiber la croissance bactérienne. Les résultats peuvent varier en fonction des protocoles utilisés, de la méthode de mesure de la croissance bactérienne et de la sensibilité des souches de bactéries testées.

Dans le cas spécifique des entérocoques, il est possible que les souches testées dans notre étude présentent des caractéristiques différentes de celles généralement observées. Les entérocoques sont connus pour leur résistance naturelle à la gentamicine, principalement en raison de la présence de mécanismes de modification de la cible ribosomale, qui empêchent la liaison de l'antibiotique à sa cible. Cependant, il existe des souches d'entérocoques qui peuvent présenter des mutations génétiques spécifiques, ce qui peut affecter leur sensibilité à la gentamicine. Il est possible que les souches testées dans notre étude présentent de telles mutations, ce qui expliquerait la sensibilité observée dans les tests d'antibiogramme.

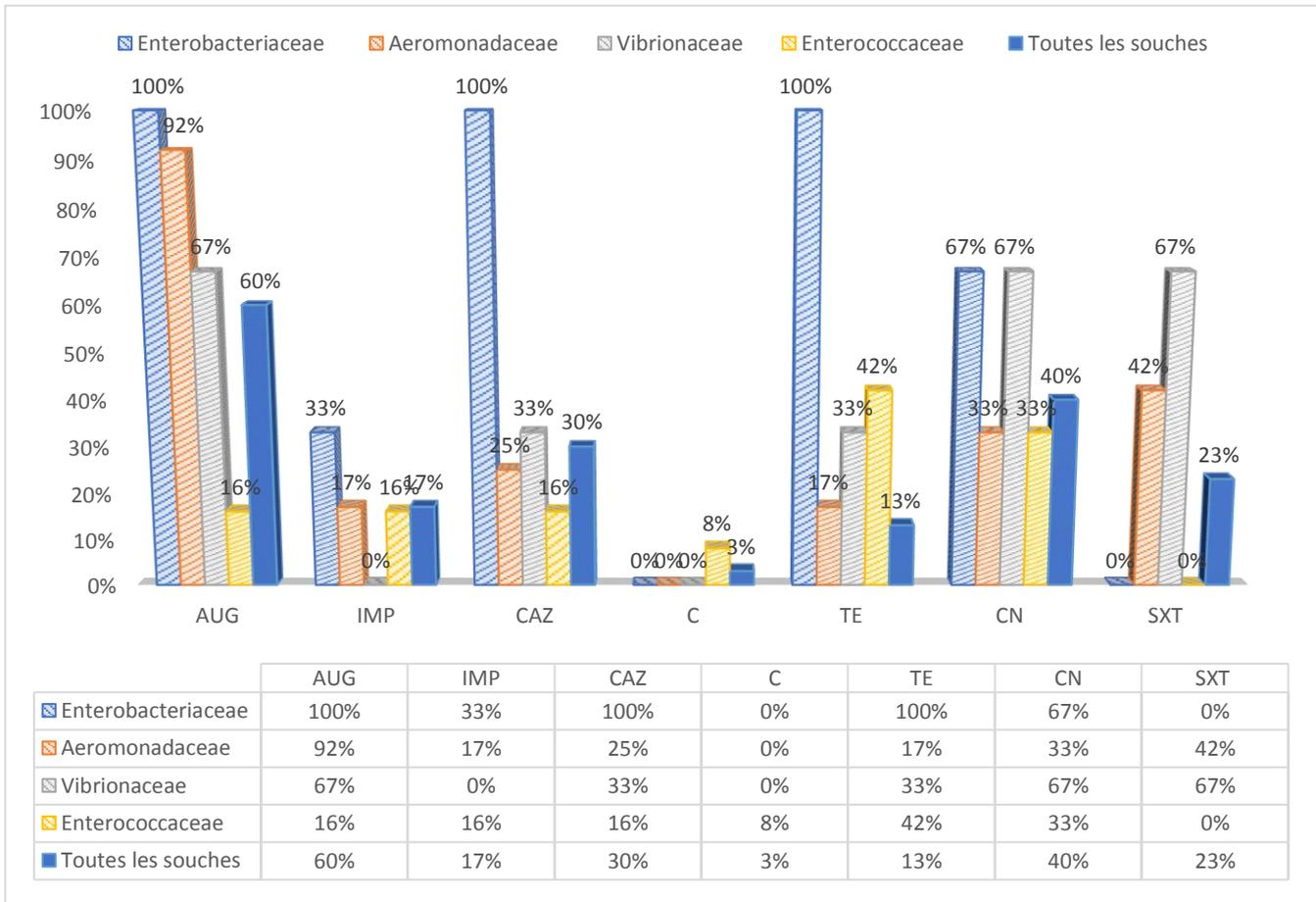


Figure 29: Taux de résistances des souches aux différents antibiotiques

IV.7. Recherche des bêta – lactamase a spectre large (BLSE)

Il semble que la méthode de diffusion en gélose avec des disques contenant des antibiotiques inhibiteurs ait été utilisée pour détecter la production de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE). Cette méthode permet de détecter l'inhibition de l'activité des BLSE par les inhibiteurs d'enzymes, ce qui se traduit par la formation d'un bouchon de champagne sur la gélose.

La figure fournie confirme la formation de BLSE chez trois souches d'*A. hydrophila* (Ce10, Ce15 et Ce16), sous la forme d'un bouchon de champagne. Ces BLSE appartiennent à la classe A et B des bêta-lactamases, selon la classification d'Ambler. Les BLSE de classe A confèrent une résistance à toutes les pénicillines et céphalosporines, mais pas aux céphamycines ni aux carbapénèmes. Elles sont inhibées par les inhibiteurs de bêta-lactamase (Bradford, 2001). Les BLSE de classe B sont actives sur les carbapénèmes et les

céphalosporines. Elles sont insensibles à l'acide clavulanique et leur médiation peut être chromosomique ou plasmidique (Parveau, 2011). Il est également mentionné que la production de BLSE chez *Aeromonas* est de plus en plus signalée ces dernières années (Rodríguez et al., 2005).

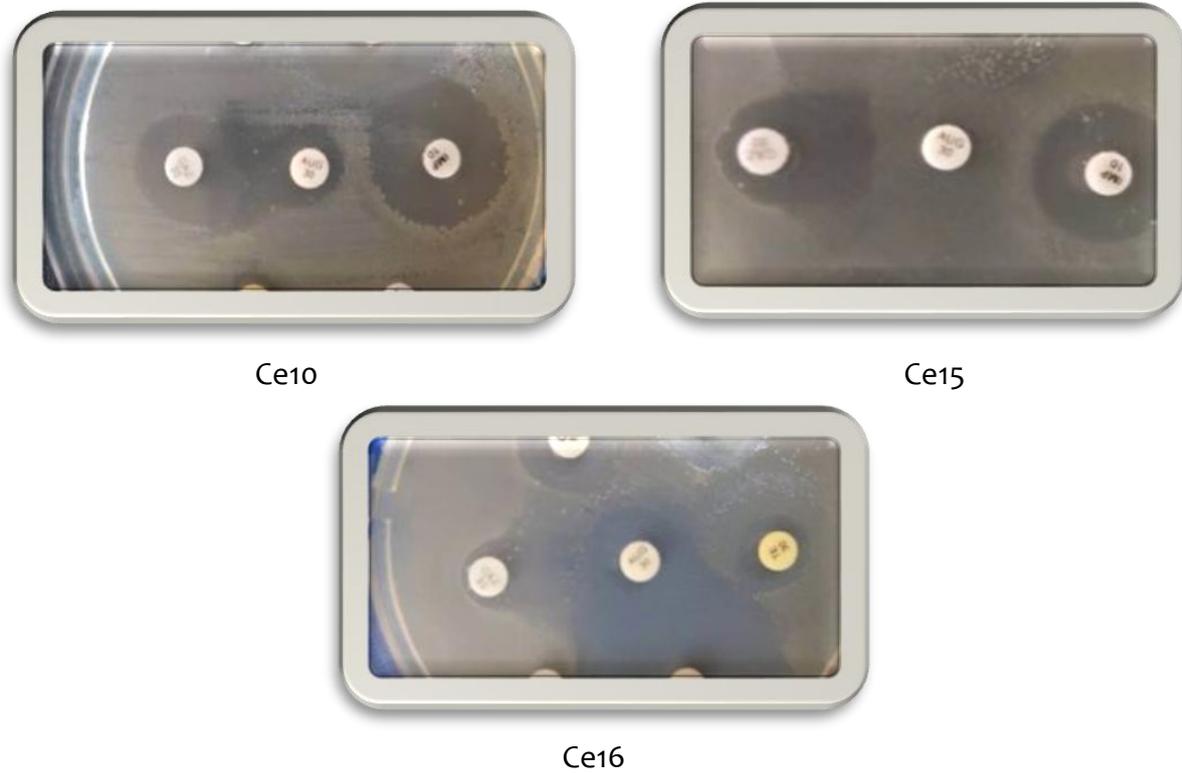


Figure 30: Production des BLSE par *A. hydrophila*

IV.8. La recherche de bactériophages

Les bactériophages sont des agents antimicrobiens naturels qui peuvent être utilisés dans le cadre de thérapies phagiques pour cibler spécifiquement certaines souches bactériennes. Les résultats obtenus dans cette étude soutiennent l'idée que les bactériophages ont un potentiel d'efficacité contre cette souche bactérienne.

Les bactériophages ont été isolés à partir d'échantillons d'eaux usées et ont été utilisés dans cette étude pour cibler différentes souches bactériennes de référence, notamment *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella oxytoca*, *Listeria innocua* et *Acinetobacter baumannii*, ainsi que *Micrococcus*.

La figure présentée ci-dessous illustre les résultats des tests de lyse des bactériophages spécifiques à *Micrococcus*, *Listeria* et *Enterococcus*. Dans cette figure, il est observé que plus la dilution dans le CaCl₂ est élevée, plus la zone d'inhibition de la croissance bactérienne est rétrécie et cela était également observé pour le reste des souches. Ces résultats indiquent que les bactériophages ont la capacité de lyser efficacement les cellules bactériennes. La diminution de la zone d'inhibition observée avec l'augmentation de la dilution dans le CaCl₂ peut être expliquée par la diminution de la concentration des bactériophages actifs.

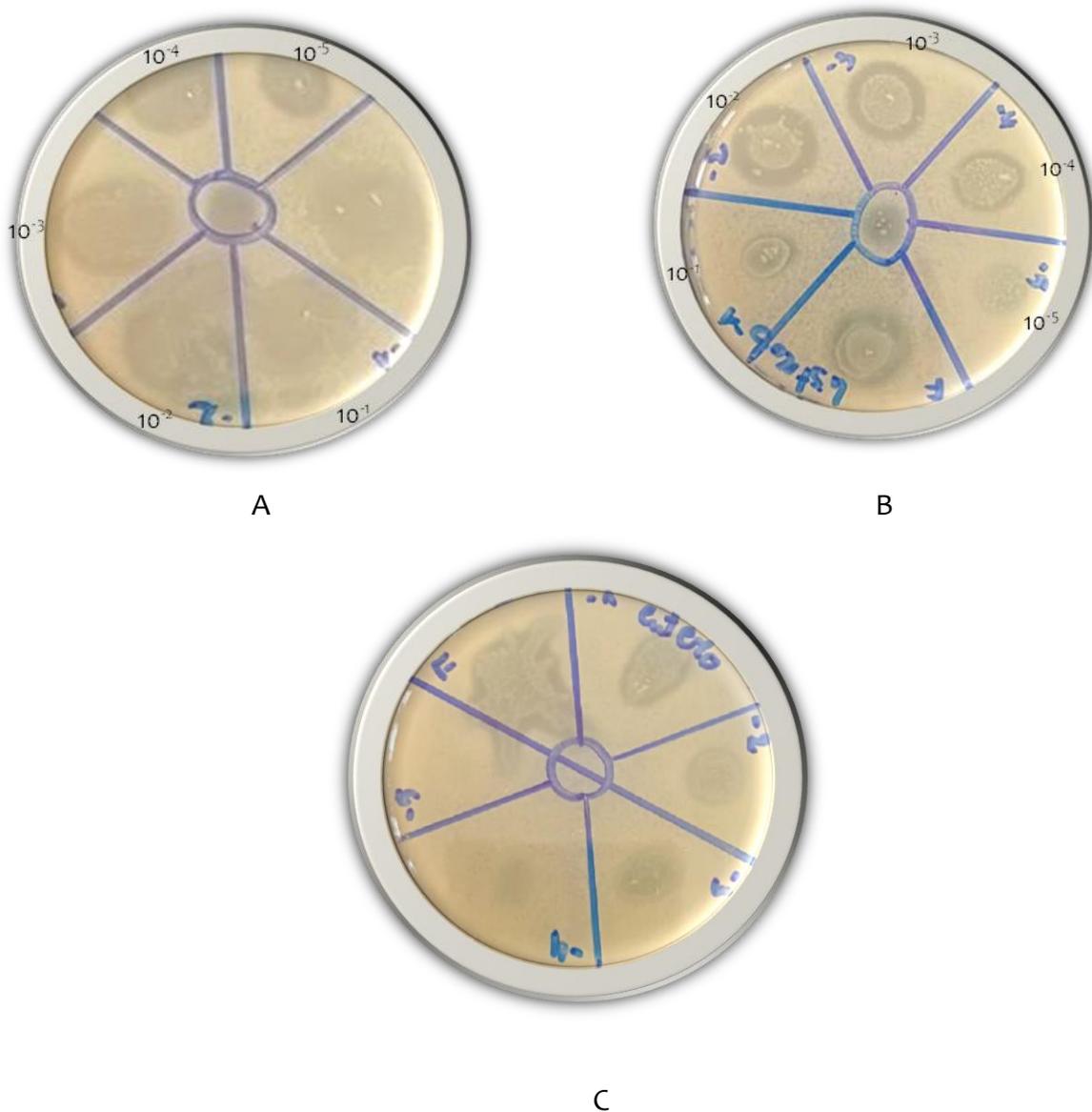


Figure 31: Résultats de la lyse des bactériophages spécifiques à : *Micrococcus* (A), *Listeria* (B), *Enterococcus* (C)

IV.8.1. Résultat de la synergie phages / Antibiotique

Dans cette partie de l'étude, notre objectif était de tester la synergie entre les bactériophages et la ceftazidime sur des souches résistantes d'*Enterococcus*. Nous avons appliqué le mélange de bactériophages isolés précédemment aux souches bactériennes, puis avons évalué l'effet combiné avec l'ajout de ceftazidime. Cependant, nos résultats n'ont pas montré de synergie entre les bactériophages et la ceftazidime.

Malgré l'application des bactériophages spécifiques à *Enterococcus*, qui sont connus pour leur capacité à lyser les cellules bactériennes, l'ajout de ceftazidime n'a pas entraîné d'effet supplémentaire sur la croissance ou la survie des souches résistantes. Ces résultats indiquent que, dans notre système expérimental, l'association entre les bactériophages et la ceftazidime n'a pas conduit à une augmentation significative de l'efficacité de l'antibiotique contre les souches résistantes d'*Enterococcus*.

Cependant, il est important de noter que cette absence de synergie peut être spécifique aux souches et aux conditions expérimentales utilisées dans notre étude. D'autres facteurs, tels que la concentration des bactériophages, le temps d'incubation, ou encore la présence d'autres composés dans le milieu de culture, pourraient influencer l'interaction entre les bactériophages et les antibiotiques. Il est tout à fait possible que les souches testées soient résistantes à ces bactériophages spécifiques. La résistance aux bactériophages peut être due à plusieurs facteurs, tels que des modifications de la surface cellulaire de la bactérie cible qui empêchent l'attachement des bactériophages, des systèmes de restriction-modification présents dans la bactérie qui dégradent les génomes des bactériophages, ou encore des mécanismes de défense bactérienne tels que l'immunité CRISPR-Cas (Labrie, Samson and Moineau, 2010; Baltz, 2018).

IV.9. Extraction d'ADN plasmidique

Dans cette expérience, nous avons réussi à extraire les ADN plasmidiques et à les conserver dans le tampon TE pour une utilisation

ultérieure. Cependant, lors de la migration sur gel d'agarose, nous n'avons pas utilisé de colorant bleu d'éthidium, ce qui a empêché l'observation visuelle des fragments d'ADN en migration. Cette situation a limité notre capacité à visualiser les résultats de l'extraction d'ADN plasmidique.

L'utilisation du colorant bleu d'éthidium dans la migration sur gel d'agarose est couramment pratiquée pour visualiser les fragments d'ADN. Ce colorant se lie à l'ADN et émet une fluorescence lorsqu'il est exposé à une lumière ultraviolette, permettant ainsi une détection facile des bandes d'ADN sur le gel. En l'absence de ce colorant, il devient difficile d'observer et d'interpréter les résultats de migration. L'incapacité à visualiser les fragments d'ADN lors de la migration sur gel d'agarose constitue une limitation importante de notre étude. En effet, l'observation visuelle des bandes d'ADN aurait permis d'évaluer la qualité et la quantité de l'ADN plasmidique extrait, ainsi que de détecter d'éventuels contaminants ou des modifications dans la structure de l'ADN. Sans cette visualisation, il devient plus difficile d'interpréter les résultats obtenus et de tirer des conclusions précises.

Malgré cette limitation, il est important de souligner que notre étude a pu progresser jusqu'à l'étape de conservation des ADN plasmidiques dans le tampon TE. Cette étape est cruciale pour permettre une utilisation ultérieure des échantillons d'ADN plasmidique dans d'autres expériences ou analyses complémentaires.

PARTIE V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

Les effluents hospitaliers représentent une source majeure de contamination par des antibiotiques et des bactéries multi-résistantes, ce qui soulève des préoccupations importantes en matière de santé publique. Ces eaux usées hospitalières, riches en matières organiques, créent un environnement aquatique propice à la prolifération bactérienne. Parmi ces micro-organismes, les bacilles à Gram négatif tels que les *Enterobacteriaceae*, les *Vibrionaceae* et les *Aeromonadaceae*, ainsi que les coques à Gram positif comme les *Enterococcaceae*, jouent un rôle considérable dans les maladies infectieuses humaines en raison de leur résistance aux antibiotiques.

Dans notre étude, nous nous sommes concentrés sur la recherche de bactéries multi-résistantes dans les effluents de l'hôpital HAMDANE Bakhta, situé dans la wilaya de Saida. Parmi les différentes espèces bactériennes identifiées, nous avons observé une fréquence élevée de présence d'*A. hydrophila* dans ces effluents, suggérant une origine probable de ces micro-organismes dans le milieu hospitalier. Nous avons également détecté d'autres espèces telles que, *P. rettgeri*, *P. vulgaris*, *C. koseri*, *V. fluvialis* et *Enterococcus spp.*

Les résultats obtenus révèlent une résistance élevée à plusieurs antibiotiques, en particulier à l'amoxicilline plus acide clavulanique (AUG) et aux antibiotiques à usage hospitalier tels que la ceftazidime, la colistine et la vancomycine, avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) extrêmement élevées. En revanche, l'imipénème semble présenter une certaine efficacité contre ces souches bactériennes. Par exemple, la résistance aux bêta-lactamines peut être attribuée à la production d'enzymes, comme les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) produites par les souches d'*A. hydrophila*.

La sensibilité aux autres antibiotiques varie en fonction de chaque famille bactérienne. Il est important de souligner que ces résultats sont basés sur les données disponibles et qu'une analyse plus approfondie nécessiterait une meilleure compréhension des souches bactériennes, de leurs mécanismes

de résistance et de l'historique de l'utilisation des antibiotiques dans l'environnement hospitalier.

Face à cette situation préoccupante, il est essentiel de mettre en place des mesures préventives et de contrôle efficaces. Une approche prometteuse que nous avons explorée est l'utilisation combinée de phages et d'antibiotiques pour lutter contre les bactéries multi-résistantes. Les phages sont des virus spécifiques aux bactéries capables de cibler et d'éliminer sélectivement ces micro-organismes. En combinant les phages avec des antibiotiques, nous pourrions améliorer l'efficacité des traitements et réduire la propagation des bactéries résistantes.

Les résultats préliminaires obtenus dans le cadre de cette étude nous ouvrent plusieurs perspectives de recherche. Il serait pertinent d'étendre notre étude à une zone géographique plus étendue sur une période prolongée, d'effectuer l'identification des souches isolées par des techniques moléculaires et sérologiques, de caractériser la présence de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) par PCR, et d'étudier l'impact de ces effluents à l'échelle nationale sur l'environnement.

PARTIE VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références

Aarestrup, F.M., Agerso, Y., Gerner–Smidt, P., Madsen, M. and Jensen, L.B. (2000) 'Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark', *Diagnostic microbiology and infectious disease*, vol. 37, no. 2, pp. 127-137.

Agregé, S., Belguith, J. and Hadiji, R. (2015) *Généralités sur les Anti-infectieux, en médecine vétérinaire*, Sidi thabet: Ecole Nationale de médecine vétérinaire.

Aguilar Galvez, A.C., Dubois Dauphin, R., Destain, J., Campos, D. and Thonart, P. (2012) 'Les entérocoques: avantages et inconvénients en biotechnologie (synthèse bibliographique)', *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, vol. 16, no. 1.

Ahmed, A.M..N.T..A.E..R.T..S.S..&.S.T. (2004) 'New aminoglycoside acetyltransferase gene, aac (3)-Id, in a class 1 integron from a multiresistant strain of *Vibrio fluvialis* isolated from an infant aged 6 months', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 53, no. 6, pp. 947-951.

Al Aukidy, M., Al Chalabi, S. and Verlicchi, P. (2018) 'Hospital wastewater treatments adopted in Asia, Africa, and Australia', *Hospital wastewaters: characteristics, management, treatment and environmental risks*, pp. 171-188.

Anyanwu, M.U., Jaja, I.F. and Nwobi, O.C. (2020) 'Occurrence and characteristics of mobile colistin resistance (mcr) gene-containing isolates from the environment: a review.', *International journal of environmental research and public health*, vol. 17, no. 3, p. 1028.

Aravena-Román, M., Inglis, T.J., Henderson, B..R.T.V. and Chang, B.J. (2012) 'Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* strains isolated from clinical and environmental sources to 26 antimicrobial agents', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 56, no. 2, pp. 1110-1112.

Arias, C.A. and Murray, B.E. (2012) 'The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance', *Nature Reviews Microbiology*, vol. 10, no. 4, pp. 266-278.

Armbruster, C.E. and Mobley, H.L. (2012) 'Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*.', *Nature Reviews Microbiology*, vol. 10, no. 11, pp. 743-754.

Avril, J.L., Daberant, H., Denis, F. and Monteil, H. (2000) *Bacteriologie clinique*, 3rd edition, France: ellipses.

Balows, A. (1998) 'Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Serratia and other members of the Enterobacteriaceae.', *Topley & Wilson's Microbiology and microbial infections*, vol. 2, pp. 1013-1016.

Baltz, R.H. (2018) 'Bacteriophage-resistant industrial fermentation strains: from the cradle to CRISPR/Cas9', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 45, no. 11, pp. 1003-1006.

Baumont, S. (2004) *Réutilisation des eaux usées épurées : risques et faisabilité en Ile de France*, Toulouse.

Belas, R. (1996) *Proteus mirabilis swarmer cell differentiation and urinary tract infection. Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management.*, Washington: ASM Press.

Bentley, R. and Bennett, J.W. (2003) 'What is an antibiotic? Revisited.', *Advances in applied microbiology*, vol. 52, pp. 303-332.

Bertrand, x. (2006) *Résistance associée chez les bacilles Gram-négatifs*, France: ONERBA.

Bouakka, A. and Zouaouia, M. (2019) *Antibiorésistance chez les bactéries lactiques*, SAIDA.

Bouskraoui, M., Zouair, S., Soraa, N., Benaouda, A., Zerouali, K. and Mohmoud, M. (2017) *Guide pratique des bactéries pathogènes.*, Marrakech: Société Marocaine d'infectiologie pédiatrie et de vaccinologie.

Boutadjine, H. and Boultif, A. (2019) 'Identification de 24 souches bactériennes isolées à partir des effluents hospitaliers du CHU Constantine, et essai de l'activité antibactérienne des extraits de *Cynara cardunculus* sur deux de ces isolats.' costantine.

Bradford, P.A. (2001) 'Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat', *Clinical microbiology reviews*, vol. 14, no. 1, pp. 933-951.

Bryskier, A. (1999) 'Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques', *Ellipses*.

Buller, N., Carson, J. and Keeling., S. (2021) 'Australian and New Zealand Standard Diagnostic Procedures (ANZSDP) for *Aeromonas salmonicida*' Australia et New Zealand.

Cardot martin, E. (2019) 'Cibles bactériennes et mécanisme de résistance aux antibiotiques.'

Chopra, I., Hodgson, J., Metcalf, B. and Poste, G. (1997) 'The search for antimicrobial agents effective against bacteria resistant to multiple antibiotics.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 41, no. 3, pp. 497-503.

Chow, J.W. (2000) ' Aminoglycoside resistance in enterococci', *Clinical Infectious Diseases*, vol. 31, no. 2, pp. 586-589.

Chowdhury, G., Pazhani, G.P., Nair, G.B..G.A. and Ramamurthy, T. (2009) 'Transferable plasmid-mediated quinolone resistance in association with extended-spectrum β -lactamases and fluoroquinolone-acetylating aminoglycoside-6'-N-acetyltransferase in clinical isolates of *Vibrio fluvialis*.', *International journal of antimicrobial agents*, vol. 38, no. 2, pp. 169-173.

Cipriano, R.C. (1984) *Aeromonas hydrophila and motile aeromonad septicemias of fish*, US Department of the Interior.

Clave, D. (2010) *FICHE TECHNIQUE : Aeromonas hydrophila*, TOULOUSE: Laboratoire de Bactériologie Hygiène.

Clave, D. and Floch, P. (1973) *fiche technique : Providencia rettgeri*, Toulouse: Institut Fédératif de Biologie.

CLSI (2012) 'Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing', Clinical and Laboratory Standards Institute. 26th Edition, M100S, Wayne, USA.

Daskalov, H. (2006) 'The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety', *Food control*, vol. 17, no. 6, pp. 474-483.

Del Castillo, C.S., Hikima, J.I., Jang, H.B., Nho, S.W., Jung, T.S., Wongtavatchai, J. and Aoki, T. (2013) 'Comparative sequence analysis of a multidrug-resistant plasmid from *Aeromonas hydrophila*', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 57, no. 1, pp. 120-129.

Delmas, C. (2001) *Fiche technique : Citrobacter braakii*, Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité.

Delmas, C. (2005) 'Fiche technique : *Citrobacter braakii*', Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique, novembre.

Deloffre-Bonnamour, N. (1995) *Les rejets des établissements de santé: des effluents liquides aux déchets solides*, Université Claude Bernard-Lyon: Mémoire de maîtrise-IUP Génie de l'Environnement-Ecodéveloppement-.

DePaola, A., Flynn, P.A., McPhearson, R.M. and Levy, S. (1988) 'Phenotypic and genotypic characterization of tetracycline-and oxytetracycline-resistant *Aeromonas hydrophila* from cultured channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and their environments.', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 54, no. 7, pp. 1861-1863.

Ekhaise, F. and Omavwoya, B.P. (2008) 'Influence of hospital wastewater discharged from University of Benin Teaching Hospital (UBTH), Benin City on its receiving environment', *American-Eurasian J Agric Environ Sci*, vol. 4, no. 4, pp. 484-488.

Elxson, N..A.-H.L., Rukayadi, Y., Soopna, P., Lee, H.Y., Zainazor, T.T. and Son, R. (2014) 'Effect of detergents as antibacterial agents on biofilm of

antibiotics-resistant *Vibrio parahaemolyticus* isolates', *Food control*, vol. 35, no. 1, pp. 378-385.

Emmanuel, E. (2004) 'Évaluation des risques sanitaires et écotoxicologiques liés aux effluents hospitaliers' Lyon: Thèse INSA de Lyon.

Escaut, L., Kassis-Chikhani, N., Rudant, E., Ichai, P., Couzigou, C., Wyplosz, B. and Vittecoq, D. (2009) 'Évaluation de l'impact économique d'une épidémie d'*Enterococcus faecium* résistants aux glycopeptides (ERG) dans un service d'infectiologie', *Médecine et Maladies Infectieuses*, vol. 39.

Esteve, C..A.E.&.G.M.J. (2015) 'Multidrug-resistant (MDR) *Aeromonas* recovered from the metropolitan area of Valencia (Spain): diseases spectrum and prevalence in the environment', *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, vol. 34, pp. 137-145.

Euzéby, J. (2008) 'Notification of changes in taxonomic opinion previously published outside the IJSEM', *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, vol. 58, no. Pt 7, pp. 1515-1515.

Facklam, R. and Elliott, J.A. (1995) 'Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci', *Clinical microbiology reviews*, vol. 8, no. 4, pp. 479-495.

Fahrenfeld, N., Knowlton, K., Krometis, L.A., Hession, W.C., Xia, K., Lipscomb, E. and Pruden, A. (2014) 'Effect of manure application on abundance of antibiotic resistance genes and their attenuation rates in soil: field-scale mass balance approach.', *Environmental science & technology*, vol. 48, no. 5, pp. 2643-2650.

Feglo, P.K., Gbedema, S.Y., Quay, S.N.A., Adu-Sarkodie, Y. and Opoku-Okrah, C. (2010) 'Occurrence, species distribution and antibiotic resistance of *Proteus* isolates: A case study at the Komfo Anokye Teaching Hospital (KATH) in Ghana', *Int J Pharm Sci Res*, vol. 1, no. 9, pp. 347-52.

'FICHE TECHNIQUE : *Aeromonas hydrophila*' Centre Toulousain.

Fosse, T., Giraud-Morin, C. and Madinier, I. (2003) 'Induced colistin resistance as an identifying marker for *Aeromonas* phenospecies groups.', *Letters in applied microbiology*, vol. 36, no. 1, pp. 25-29.

Fosse, T., Giraud-Morin, C. and Madinier, I. (2003) 'Phénotypes de résistance aux β -lactamines dans le genre *Aeromonas*', *Pathologie Biologie*, vol. 51, no. 5, pp. 290-296.

Galimand, M., Schmitt, E., Panvert, M., Desmolaize, B., Douthwaite, S., Mechulam, Y. and Courvalin, P. (2011) 'Intrinsic resistance to aminoglycosides in *Enterococcus faecium* is conferred by the 16S rRNA m5C1404-specific methyltransferase EfmM', *Rna*, vol. 17, no. 2, pp. 251-262.

Garrido, A.M..G.A.&.P.R.P. (2014) 'Antimicrobial resistance in enterococci.', *Journal of Infectious Diseases and Therapy*.

Garrity, G..T..R....A.. (2006) *Bergey's Manual*, Berlin: SpringerScience&BusinessMedia.

Gonzalez-Avila, L.U..L.-C.M.A..H.-C.C..B.-L.J.M..&.C.-E.G. (2021) 'Colistin resistance in *aeromonas* spp', *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 11, p. 5974.

Guardabassi, L. and Agersø, Y. (2006) 'Genes homologous to glycopeptide resistance van A are widespread in soil microbial communities.', *FEMS microbiology letters*, vol. 259, no. 2, pp. 221-225.

Guessennd, N.K., Ouattara, M.B.O.N.D., Nevry, R.K., Gbanon, V., Tiekoura, K.B. and Ger, B.M.R. (2013) 'Étude des bactéries multirésistantes des effluents hospitaliers d'un centre hospitalier et universitaire (CHU) de la ville d'Abidjan (Côte d'Ivoire)', *Journal of Applied Biosciences*, vol. 69, pp. 5456-5464.

Hamza, B. and elsamed, M.A. (2016) 'Contribution à l'étude de l'inhibition de l'activité enzymatique relative des Métallo-Bêta-Lactamases par des extraits des feuilles d'*Olea europaea* chez *Pseudomonas aeruginosa*'
saida.

Hauser, G. (1985) *About not bacteria and their relationship to Septicemia*, Vogel Leipzig.

Hermann, T. (2005) 'Drugs targeting the ribosome', *Current opinion in structural biology*, vol. 15, no. 3, pp. 355-366.

Igbinosa, E.O.&O.A.I. (2010) 'Vibrio fluvialis: an unusual enteric pathogen of increasing public health concern', *International journal of environmental research and public health*, vol. 7, no. 10, pp. 3628-3643.

Islam, M.J., Uddin, M.S., Hakim, M.A., Das, K.K. and Hasan, M.N. (2008) 'Role of untreated liquid hospital waste to the development of antibiotic resistant bacteria', *J Innov Dev Strategy*, vol. 2, no. 2, pp. 17-21.

J.C, F., R, C., J.F, L., M, R. and C.J, S.J.e.S. (1997) *Bactériologie médicale*, Presses Universitaire de Lyon.

Janda, J.M. and Abbott, S.L. (2010) 'The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection', *Clinical microbiology reviews*, vol. 23, no. 1, pp. 35-73.

Jarlier, V., Nicolas, M.H., Fournier, G. and Philippon, A. (1988) 'Extended-broad spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns.', *Rev Infect Dis*, vol. 10, no. 4, pp. 867-78.

Jiang, Y., Yao, L.L.F., Tan, Z.Z.Y. and Wang, L. (2014) 'Characterization of antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* from cultured sea cucumbers (*Apostichopus japonicas*)', *Letters in applied microbiology*, vol. 59, no. 2, pp. 147-154.

Khachatourians, G.G. (1998) 'Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria', *Cmaj*, vol. 159, no. 9, pp. 1129-1136.

Kooli, I., Kadri, Y., Abdallah, H.B., Mhalla, S., Haddad, O., Noomen, S. and Mastouri, M. (2014) 'Épidémiologie des bactéries multi-résistantes dans une

unité néonatale tunisienne', *Journal de pédiatrie et de puériculture*, vol. 27, no. 5, pp. 236-242.

Krovacek, K., Peterz, M., Faris, A. and Månsson, I. (1989) 'Enterotoxigenicity and drug sensitivity of *Aeromonas hydrophila* isolated from well water in Sweden: a case study', *International Journal of Food Microbiology*, vol. 8, no. 2, pp. 149-154.

Labrie, S.J., Samson, J.E. and Moineau, S. (2010) 'Bacteriophage resistance mechanisms', *Nature Reviews Microbiology*, vol. 8, no. 5, pp. 317-327.

Laganà, P..C.G..M.E..Z.R..&.D.S. (2011) 'Susceptibility to antibiotics of *Vibrio* spp. and *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* strains isolated from Italian aquaculture farms', *New microbiologica*, vol. 34, no. 1, pp. 53-63.

Lee, J., V, Donovan, T.J. and Furniss, A.L. (1978) 'Characterization, taxonomy, and emended description of *Vibrio metschnikovii*', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 28, no. 1, pp. 99-111.

Lee, J., V, Shread, P. and Furniss, A.L. (1978) 'The taxonomy of group F organisms: relationships to *Vibrio* and *Aeromonas*'.

Li, S., Ondon, B.S., Ho, S.H., Jiang, J. and Li, F. (2022) 'Antibiotic resistant bacteria and genes in wastewater treatment plants: From occurrence to treatment strategies', *Science of The Total Environment*, p. 156544.

Lossouarn, J., Briet, A., Moncaut, E., Furlan, S., Bouteau, A., Son, O. and Petit, M.A. (2019) 'Enterococcus faecalis countermeasures defeat a virulent Picovirinae bacteriophage.', *Viruses*, vol. 11, no. 1, p. 48.

Luna, V.A., Coates, P., Eady, E.A., Cove, J.H., Nguyen, T.T. and Roberts, M.C. (1999) 'A variety of gram-positive bacteria carry mobile *mef* genes.', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 44, no. 1, pp. 19-25.

Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. (2000). *Brock biology of microorganisms prentice hal*, Upper Saddle River New Jersey.

Mahamat, A., Lavigne, J.P., Bouziges, N., Daurès, J.P. and Sotto, A. (2006) 'Profils de résistance des souches urinaires de *Proteus mirabilis* de 1999 à 2005 au CHU de Nîmes.', *Pathologie biologique*, vol. 54, no. 8-9.

Mainardi, J.L., Legrand, R., Arthur, M., Schoot, B., van Heijenoort, J. and Gutmann, L. (2000) 'Novel mechanism of β -lactam resistance due to bypass of DD-transpeptidation in *Enterococcus faecium*.', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 22, pp. 16490-16496.

Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R. and Mandell, D.B.. (2009) *Principles and practice of infectious*, Édition en ligne.<http://www.ppidon-line.com>. edition, USA: Elsevier.

Maryse, A. and Danielle, C. (2004) *Fiche technique : Bactériologie 051 en ftbac*, TOULOUSE: Laboratoire de Bactériologie, Hygiène CHU Toulouse Rangueil.

Maryse, A. and Danielle, C. (2007) 'FICHE TECHNIQUE : *Enterococcus faecalis*', *Laboratoire de Bactériologie Hygiène*, juin.

Mebdaci.A and Mihoubi.S (2015) 'profil de sensibilité aux antibiotiques des Entérobactéries uropathogènes (*Escherchia coli*, *Proteus mirabilis* , *Klebsiella pneumoniae*)'.

Moellering Jr, R.C..W.C..K.L.J..&.P.J.W. (1977) 'Resistance to gentamicin, tobramycin and amikacin among clinical isolates of bacteria', *The American journal of medicine*, vol. 62, no. 6, pp. 873-881.

Moelling, K..B.F..&.W.C. (2018) 'A wake-up call: we need phage therapy now', *Viruses*, vol. 10, no. 12, p. 688.

Moreno, M.F..S.P..T.E..&.D.V.L. (2006) 'The role and application of enterococci in food and health.', *International journal of food microbiology*, vol. 106, no. 1, pp. 1-24.

Mutuku, C., Melegh, S., Kovacs, K., Urban, P., Virág, E., Heninger, R. and Gazdag, Z. (2022) 'Characterization of β -lactamases and multidrug resistance

mechanisms in enterobacterales from hospital effluents and wastewater treatment plant', *Antibiotics*, vol. 11, no. 6, p. 776.

Naas, T., Vandell, L., Sougakoff, W., Livermore, D.M. and Nordmann, P. (1994) 'Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 38, no. 6, pp. 1262-1270.

Nadella, R.K., Panda, S.K., Badireddy, M.R., Kurcheti, P.P., Raman, R.P. and Mothadaka, M.P. (2022) 'Multi-drug resistance, integron and transposon-mediated gene transfer in heterotrophic bacteria from *Penaeus vannamei* and its culture environment', *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 29, no. 25, pp. 37527-37542.

Ngbede, E.O., Raji, M.A., Kwanashie, C.N. and Kwaga, J.K.P. (2017) 'Antimicrobial resistance and virulence profile of enterococci isolated from poultry and cattle sources in Nigeria.', *Tropical animal health and production*, vol. 49, pp. 451-458.

O'Neill, J. (2019) *AMR Review Paper-Tackling a crisis for the health and wealth of nations.*

Odeyemi, O.A. and Ahmad, A. (2017) 'Antibiotic resistance profiling and phenotyping of *Aeromonas* species isolated from aquatic sources', *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 24, no. 1, pp. 65-70.

Ojer-Usoz, E., González, D., García-Jalón, I. and Vitas, A.I. (2014) 'High dissemination of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in effluents from wastewater treatment plants', *Water research*, vol. 56, pp. 37-47.

Oliveira, T.S., Al Aukidy, M. and Verlicchi, P. (2017) 'Occurrence of common pollutants and pharmaceuticals in hospital effluents. Hospital wastewaters: characteristics, management, treatment and environmental risks,'.

Orrett, F.A. and Davis, G.K. (2006) 'A comparison of antimicrobial susceptibility profile of urinary pathogens for the years, 1999 and 2003', *West Indian Medical Journal*, vol. 55, no. 2, p. 95.

Osuolale, O. and Okoh, A. (2018) 'Isolation and antibiotic profile of *Vibrio* spp. in final effluents of two wastewater treatment plants in the Eastern Cape of South Africa', *BioRxiv*, p. 330456.

Palú, A.P., Gomes, L.M., Miguel, M.A.L., Balassiano, I.T., Queiroz, M.L.P., Freitas-Almeida, A.C. and de Oliveira, S.S. (2006) 'Antimicrobial resistance in food and clinical *Aeromonas* isolates', *Food microbiology*, vol. 23, no. 5, pp. 504-509.

Parveau, P. (2011) *BACTERIES MULTIRESISTANTES DANS L'ENVIRONNEMENT :RECHERCHE DANS LES EFFLUENTS DE LA VILLE DE TOULOUSE, TOULOUSE.*

Reiner, K. (2010) *Catalase test protocol*, American Society for Microbiology..

Rice, L.B., Bellais, S., Carias, L.L., Hutton-Thomas, R., Bonomo, R.A..C.P. and Gutmann, L. (2004) 'Impact of specific *pbp5* mutations on expression of β -lactam resistance in *Enterococcus faecium*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 48, no. 8, pp. 3028-3032.

Rice, L.B., Carias, L.L., Rudin, S., Hutton, R., Marshall, S., Hassan, M. and Arthur, M. (2009) 'Role of class A penicillin-binding proteins in the expression of β -lactam resistance in *Enterococcus faecium*', *Journal of bacteriology*, vol. 191, no. 9, pp. 3649-3656.

Rodríguez, C.N., Campos, R., Pastran, B., Jimenez, I., Garcia, A., Meijomil, P. and Rodríguez-Morales, A.J. (2005) 'Sepsis due to extended-spectrum β -lactamase-producing *aeromonas hydrophila* in a pediatric patient with diarrhea and pneumonia', *Clinical infectious diseases*, vol. 41, no. 3, pp. 421-422.

Saidou, S.O., Azonbakin, S., Dougnon, V.T., Yadouletion, A. and Koudokpon, H. (2020) *DETECTION DE QUELQUES GENES resistance aux*

antibiotiques des bactéries isolées des effluents du centre de santé Kraké, EPCA/UAC.

Sanders, P., Bousquet-Mélou, A., Chauvin, C. and Toutain, P.L. (2011) 'Utilisation des antibiotiques en élevage et enjeux de santé publique', *INRAE Productions Animales*, vol. 24, no. 2, pp. 199-204.

Schleifer, K.H. and Kilpper-Bälz, R. (1984) 'Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov.', *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 34, no. 1, pp. 31-34.

Schultz-Ascensio, E. (2018). *Diffusion d'îlots génomiques de multirésistance aux antibiotiques chez Proteus mirabilis*, Rabelais de tours.

Schwartz, D. (1997) *Citrobacter infections*. In: *Pathology of Infectious*, 1st edition, New York.

Seddik, H. (2011) 'caracterisation physico chimique et microbiologique des effluents liquides de l'hopital Frantz -Fanon (BLIDA)'.
Heliyon.

Semwal, A., Kuma, A. and Kumar., N. (2023) 'A review on pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and their', *Heliyon*.

Semwal, A. and Kumar, D. (2023) *A review on pathogenicity of Aeromonas hydrophila and their Mitigation Through Medicinal Herbs in Aquaculture.*, India: Heliyon.

Shrestha, S., Kharel, S., Homagain, S., Aryal, R. and Mishra, S.K. (2021) 'Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Asia—A systematic review and meta-analysis', *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, vol. 46, no. 5, pp. 1226-1237.

SIHEM, M. (2015) *Profil de sensibilité aux antibiotiques des Entérobactéries uropathogènes (Escherichia coli, Proteus mirabilis, Klebsiella pneumoniae)*.

Siu, L.K., Lu, P.L., Chen, J.Y., Lin, F.M. and Chang, S.C. (2003) 'High-level expression of AmpC β -lactamase due to insertion of nucleotides between 10

and 35 promoter sequences in *Escherichia coli* clinical isolates: cases not responsive to extended-spectrum cephalosporin treatment', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 47, no. 7, pp. 2138-44.

Srinivasan, V.B., Virk, R.K., Kaundal, A.C.R., Datta, B.R.T. and Ghosh, A. (2006) 'Mechanism of drug resistance in clonally related clinical isolates of *Vibrio fluvialis* isolated in Kolkata, India', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 50, no. 7, pp. 2428-2432.

Talkit, N.T. (2014) *Profil epidemiologie des infections urinaires avec étude de résistance des bactéries multirésistantes au CHU , "Nedirmohamed" de TIZI OUZOU*, TIZI OUZOU: memoire master recherche.

Tansarli, G.S..P.J..B.M..S.M..P.A..M.A..&.D.G.L. (2018) 'Colistin resistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates: evolution over 15 years and temporal association with colistin use by time series analysis', *International journal of antimicrobial agents*, vol. 52, no. 3, pp. 397-403.

Tansarli, G.S., Papaparaskevas, J., Balaska, M., Samarkos, M., Pantazatou, A., Markogiannakis, A. and Daikos, G.L. (2018) 'Colistin resistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates: evolution over 15 years and temporal association with colistin use by time series analysis', *International journal of antimicrobial agents*, vol. 52, no. 3, pp. 397-403.

Taylor, W.I. and Achanzar, D. (1972) 'Catalase test as an aid to the identification of Enterobacteriaceae', *Applied microbiology*, vol. 24, no. 1, pp. 58-61.

Thiercelin, M. and E. (1899) 'Morphologie et modes de reproduction de l'enterocoque.', *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et des ses Filiales*, vol. 11, no. 11, pp. 551-553.

Todedji, J.N., Degbey, C.C., Soclo, E..Y.A., Goudjo, F., Hounfodji, J.W. and Mama (2020) 'Caractérisation physico-chimique et toxicologique des effluents des Centres Hospitaliers et Universitaires du département du Littoral du

Bénin', *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, vol. 14, no. 3, pp. 1118-1132.

Toulousain, C. (1973) 'FICHE TECHNIQUE : Pseudomonas aeruginosa' TOULOUSE.

Van Tyne, D. and Gilmore, M.S. (2014) 'Friend turned foe: evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance.', *Annual review of microbiology*, vol. 68, pp. 337-356.

Varela, A.R., Ferro, G., Vredenburg, J., Yanık, M., Vieira, L., Rizzo, L. and Manaia, C.M. (2013) 'Vancomycin resistant enterococci: from the hospital effluent to the urban wastewater treatment plant', *Science of the Total Environment*, no. 450, pp. 155-161.

Varela, A.R., Ferro, G., Vredenburg, J., Yanık, M., Vieira, L., Rizzo, L. and Manaia, C.M. (2013) 'Vancomycin resistant enterococci: from the hospital effluent to the urban wastewater treatment plant', *Science of the Total Environment*, vol. 450, pp. 155-161.

Venter, H..H.M.L.&.B.S.L. (2017) 'Antimicrobial resistance in healthcare, agriculture and the environment: the biochemistry behind the headlines', *Essays in biochemistry*, vol. 61, no. 1, pp. 1-10.

Vilches, S., Urgell, C., Merino, S., Chacón, M.R., Soler, L., Castro-Escarpulli, G. and Tomás, J.M. (2004) 'Complete type III secretion system of a mesophilic *Aeromonas hydrophila* strain', *Applied and environmental microbiology*, vol. 70, no. 11, pp. 6914-6919.

Vlková, E., Rada, V., Popelářová, P., Trojanová, I. and Killer, J. (2006) 'Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria isolated from gastrointestinal tract of calves', *Livestock Science*, vol. 105, no. 1-3, pp. 253-259.

Vora, S. and Auckenthaler, R. (2005) 'Que signifie «bêtalactamases à spectre élargi» en pratique', *Rev Med Suisse*, vol. 5, pp. 1991-4.

Vu-Thien, H. (1998) 'Sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées dans les infections urinaires en pédiatrie', *Archives de pédiatrie*, vol. 5, pp. 266S-268S.

Wu, C.J., Wu, J.J., Yan, J.J., Lee, H.C., Lee, N.Y., Chang, C.M. and Ko, W.C. (2007) 'Clinical significance and distribution of putative virulence markers of 116 consecutive clinical *Aeromonas* isolates in southern Taiwan.', *Journal of Infection*, vol. 54, no. 2, pp. 151-158.

YOUNES, A., RAMZI, K. and CHANEZ, T. (2022) 'Portage intestinal des Entérocoques chez le poulet'.

Zeba, B.O.U.K.A.R.É. (2005) 'Overview of β -lactamase incidence on bacterial drug resistance', *African journal of biotechnology*, vol. 4, no. 13, pp. 1559 – 1562.

PARTIE VII. ANNEXES

VII.1. Annexe 1 : Milieu de culture

Milieu Mac conkey

Ingrédient	g/l	Ingrédient	g/l
Peptone pancréatique de gélatine	17	Chlorure de sodium	5
Peptone pancréatique de caséine	1.5	Sels biliaires	1.5
Peptone peptique de viande	1.5	Rouge neutre	0.03
Lactose	10	Violet de gentiane	0.01
Agar	13.5	Eau distillé	1l

Milieu Slantez et Bartly

Ingrédient	g/l
Peptone	20
Azide de sodium	0.4
glucose	2
Chlorure de 2-3-5-triphenyltetrazolime	0.1
Agar	10
Eau distillé	1l

Milieu gélose nutritif

Ingrédient	g/l
Tryptone	5
Extrait de viande	1
Extrait de levure	2
Chlorure de sodium	5
Agar	12
Eau distille	1 l

Milieu bouillon nutritif

Ingrédient	g/l
Peptone	10
Extrait de viande	1
Extrait de levure	2
Chlorure de sodium	5
Eau distille	1 l

Milieu de conservation

18ml de BN+12 ml de Glycérol 40%

Milieu Luria –Bertani(LB)

Ingrédient	g/l
Peptone	10
Extrait de levure	5
NaCL	10
Eau distille	1 l

TSE

Ingrédient	g/l
Tryptone	1
NaCl	8.5
Eau distille	1

Eau physiologie

Ingrédient	g/l
NaCl	9
Eau distille	1 l

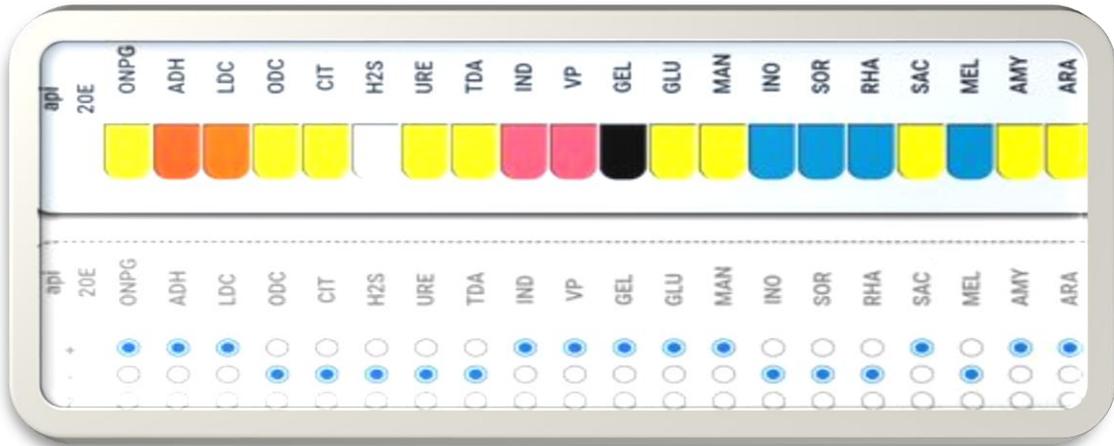
VII.2. Annexes 2 : Les étapes de coloration de Gram

Déposer une goutte d'ED sur une lame stérile puis étaler une colonie sur la lame puis on fait la coloration :

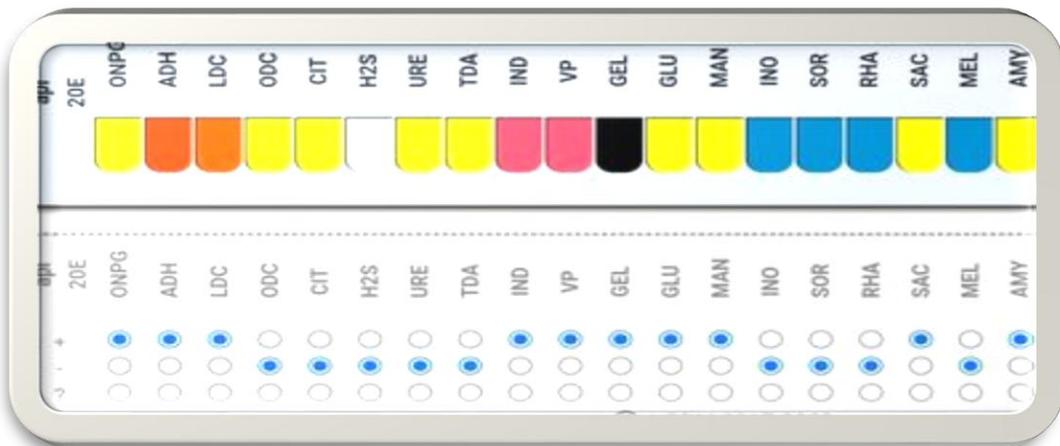
- Coloration par le violet de gentiane ou cristal violet. Laissez agir de 30 secondes à 1 minute, puis rincez à l'eau ;
- Mordançage au lugol : recouvrez de lugol et laissez agir le même temps que le violet de gentiane ; rincez à l'eau déminéralisée ;
- Décoloration (rapide) à l'alcool. Cette l'étape est la plus importante de la coloration. Versez goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement, et surveillez la décoloration qui doit être rapide. Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincez abondamment avec de l'eau déminéralisée pour stopper la décoloration. Attention, l'utilisation abusive de l'alcool aura pour conséquence de rendre toutes les bactéries Gram négatif ;
- Recoloration à la safranine ou à la fuchsine. Mettez de l'eau distillée sur la lame et quelques gouttes de fuchsine. Laissez agir de 30 secondes à 1 minute. Lavez doucement à l'eau déminéralisée. Séchez la lame.
- Observez avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 (grossissement $\times 1000$).

VII.3. Annexes 3 : Figure d'identification de la galerie API20E

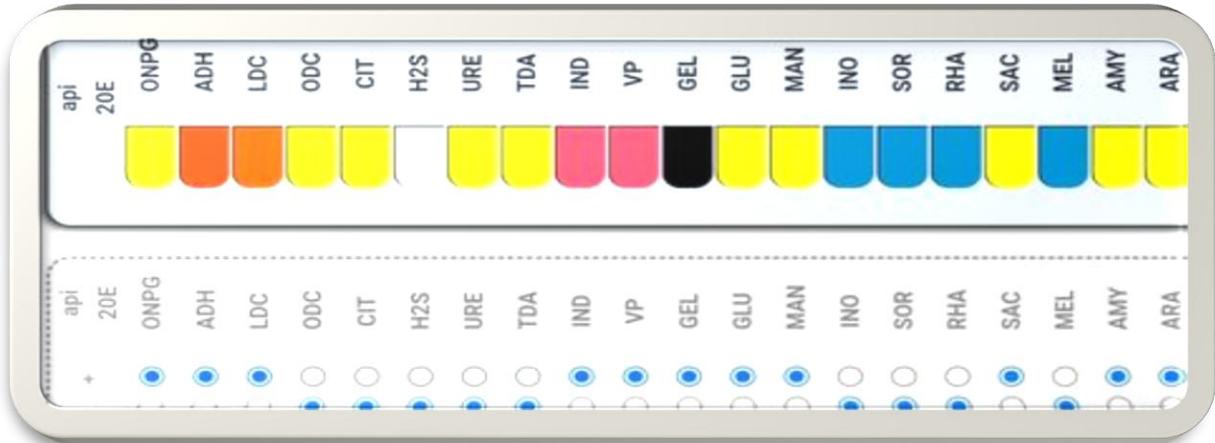
Souche Co2



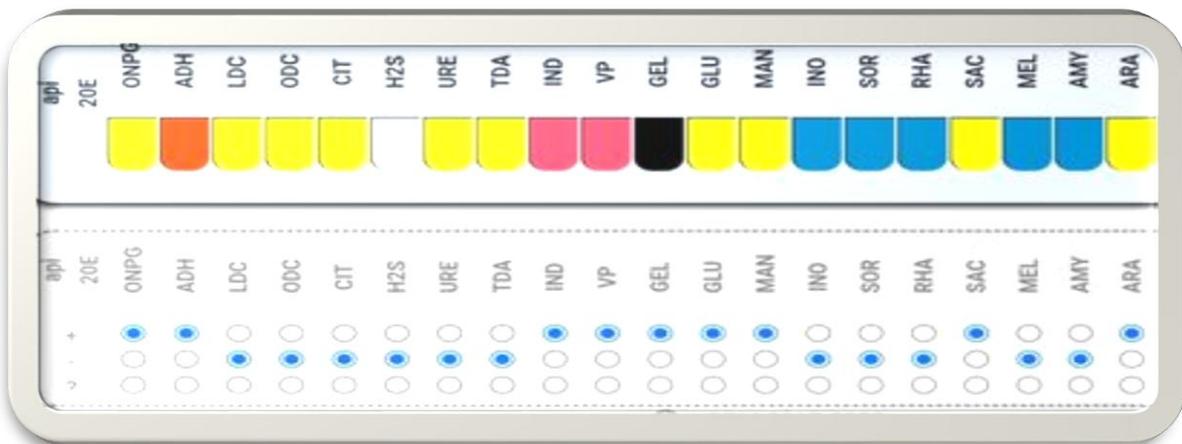
Souche Co4



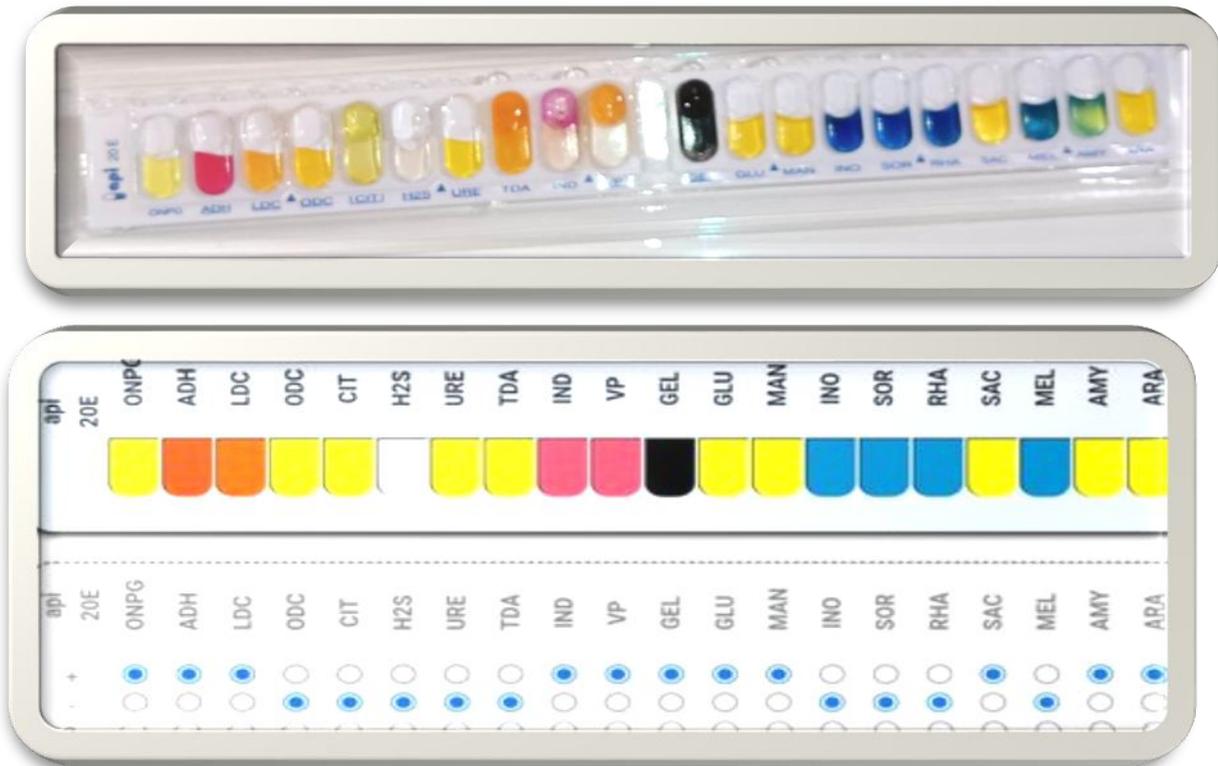
Souche Co5



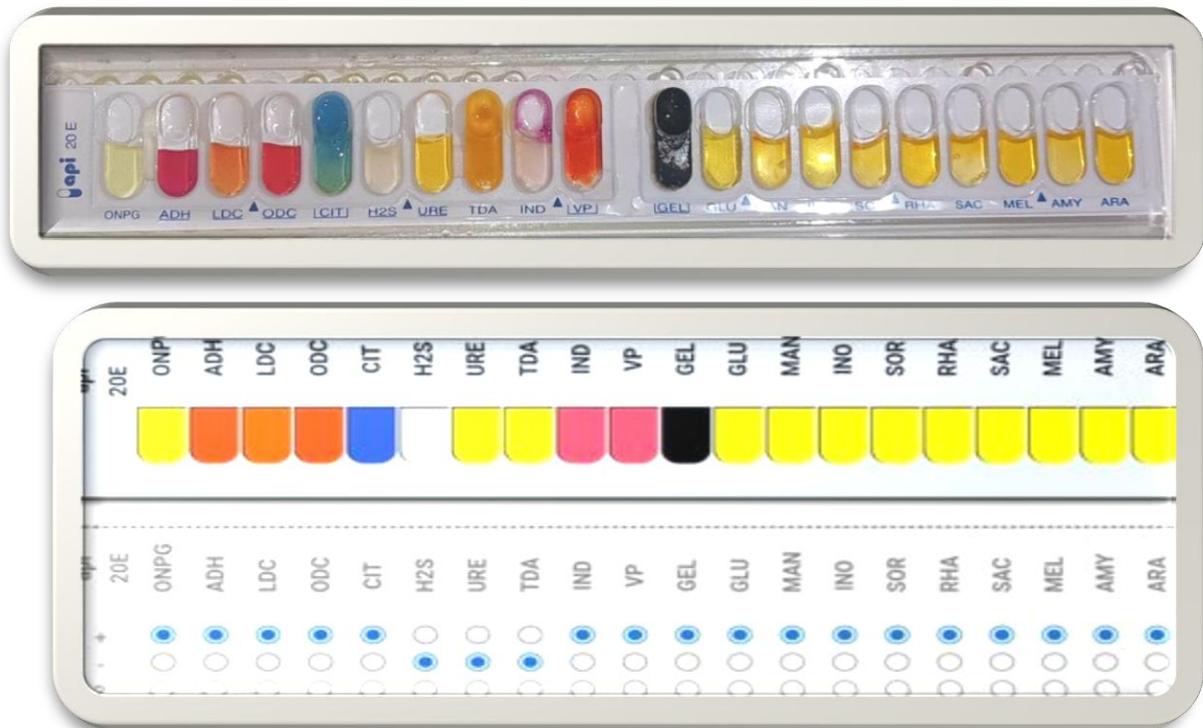
Souche Co7



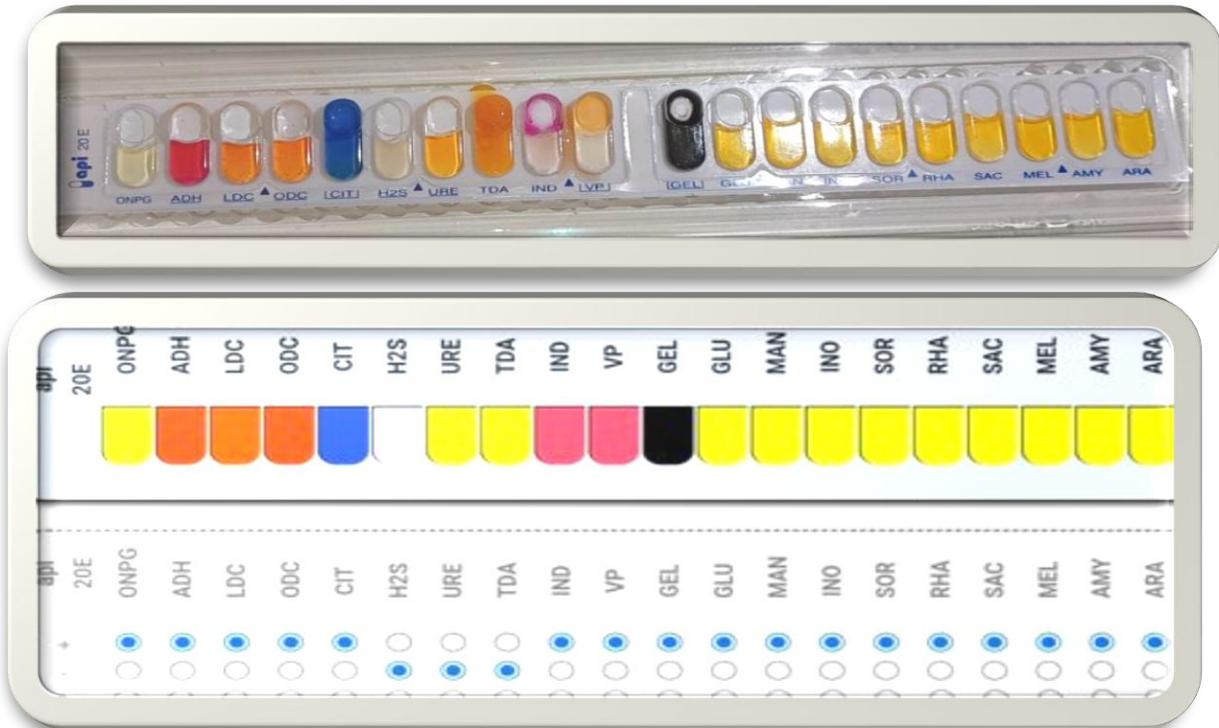
Souche Co9



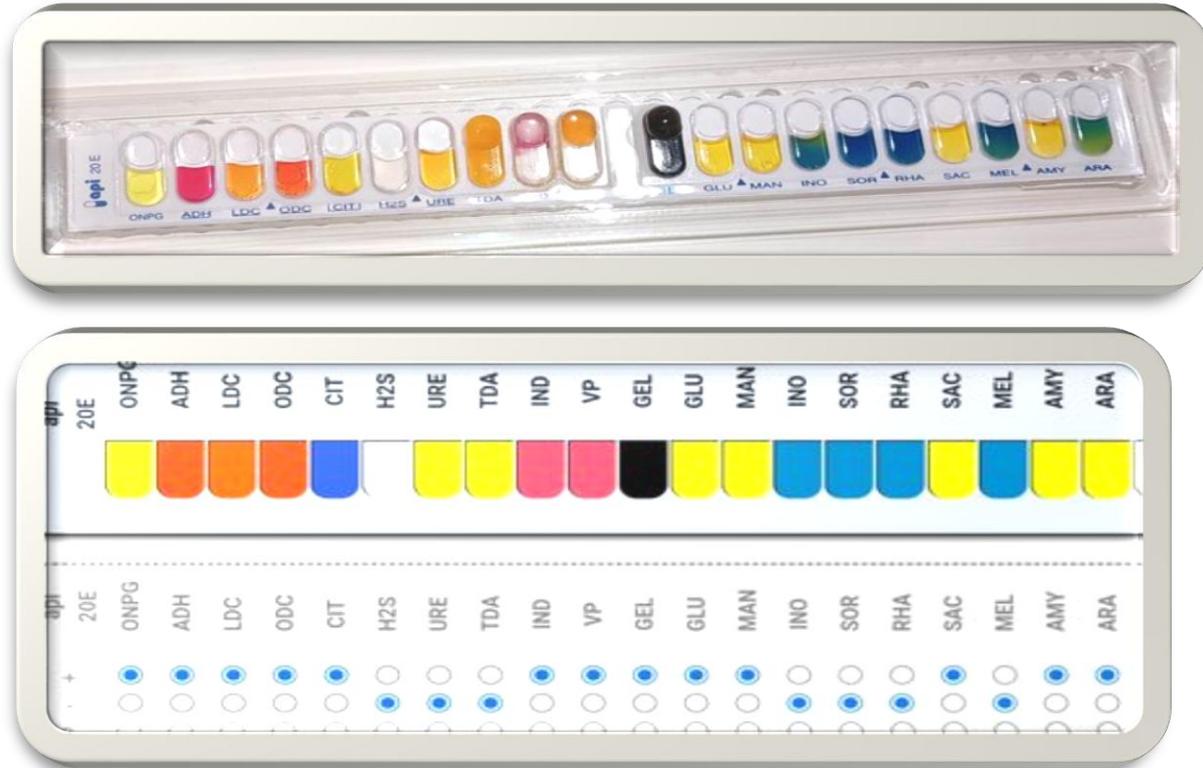
Souche Co12



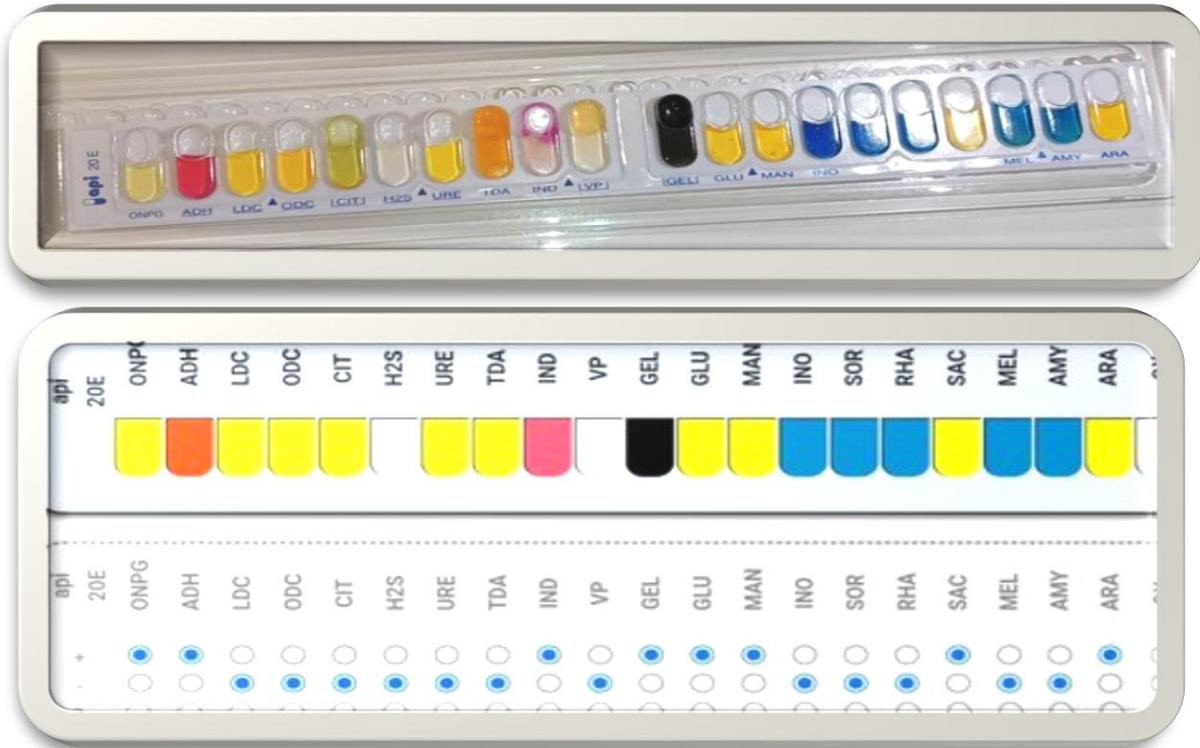
Souche Co19



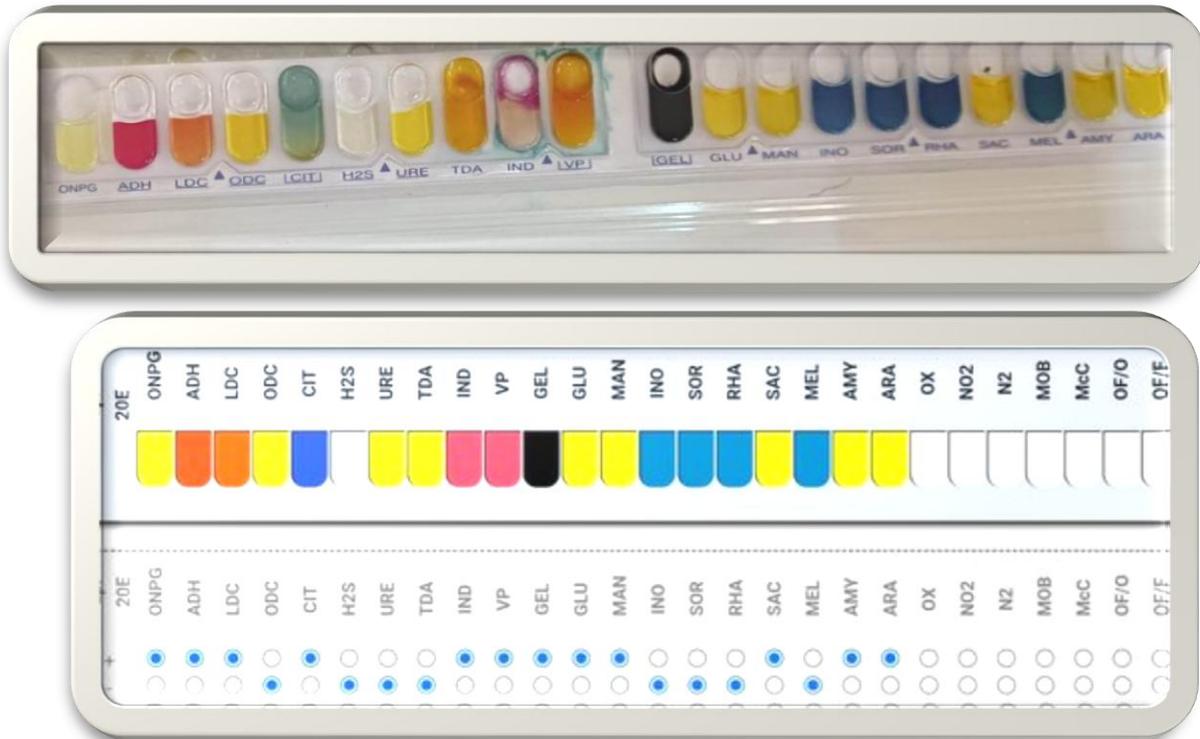
Souche Co20



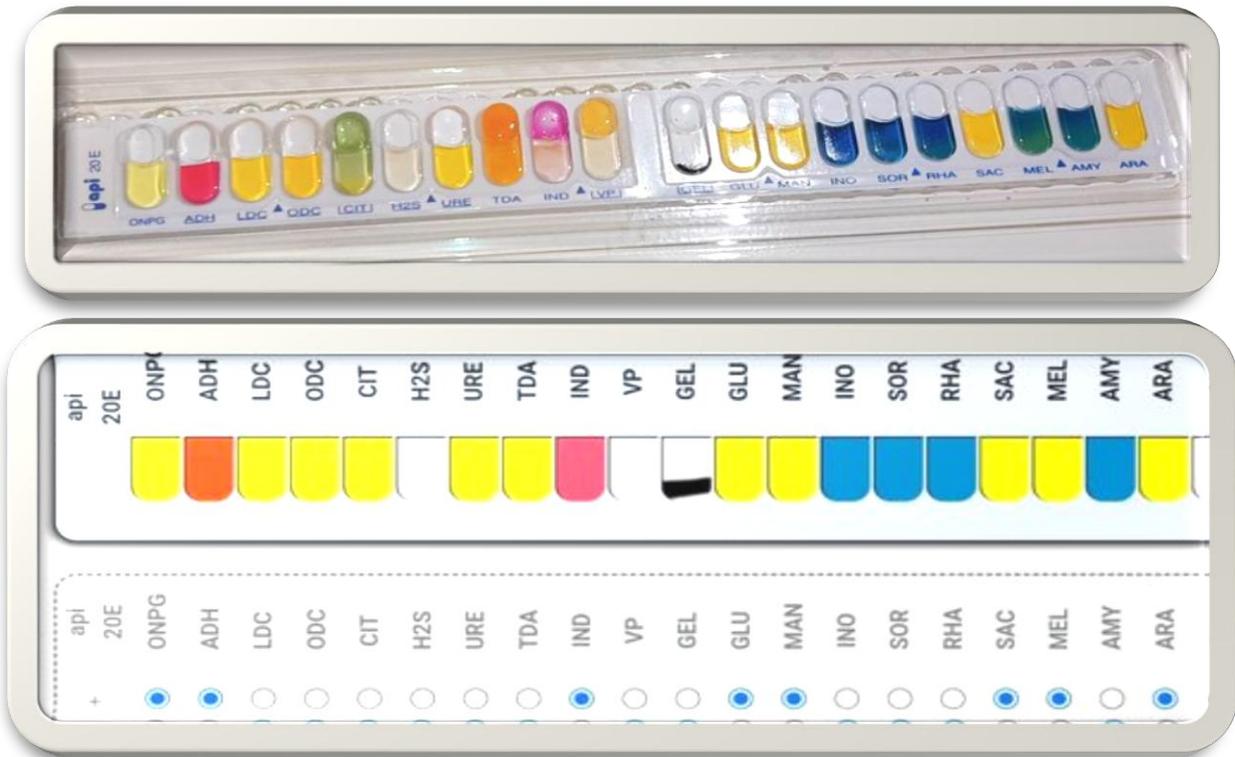
Souche Ce9



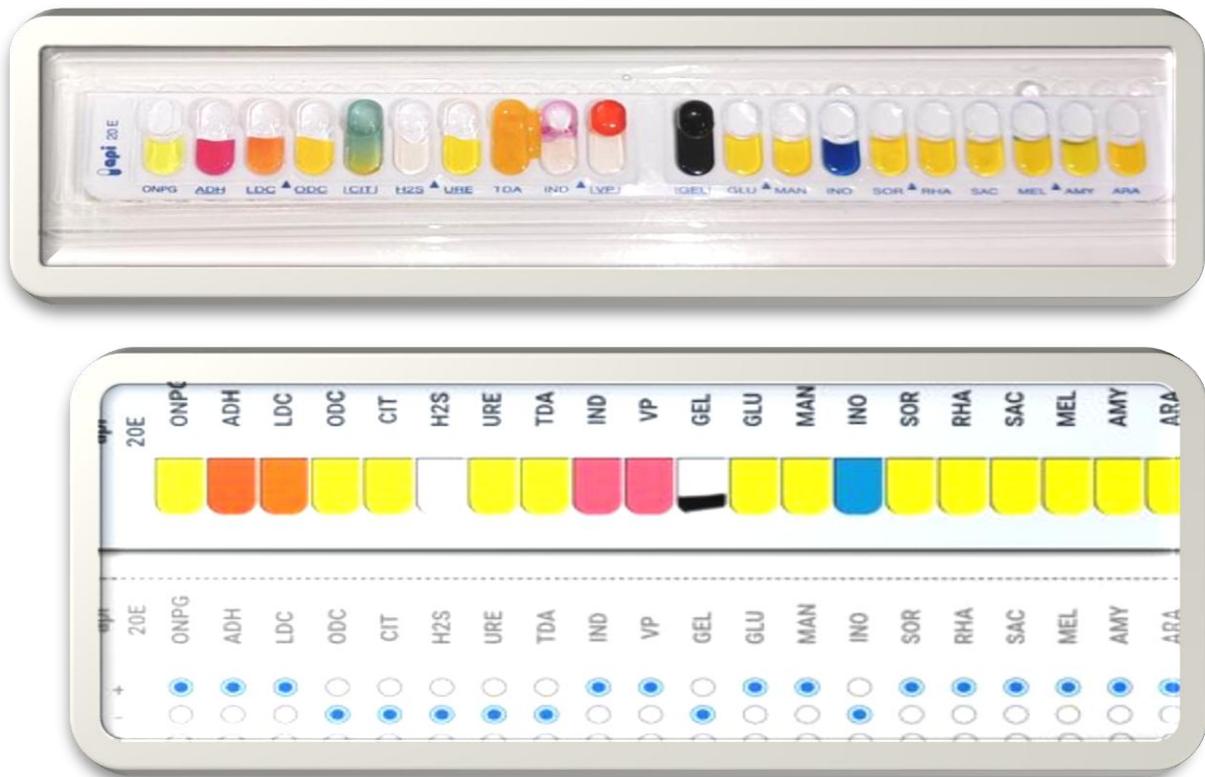
Souche Ce10



Souche Ce12



Souche Ce15



VII.4. Annexe 4 : Préparation des solutions pour extraction D'ADN

Tris-HCL 0.1M

PM=121.1 g/mole, dissoudre 2.42 g de Tris dans 160ml d'ED

Ajouter le HCL jusqu'à l'obtention de PH=8. Volume finale 200 ml

EDTA 20mM

PM=372.24 g/mole, dissoudre 1.49 g d'EDTA dans 160 ml d'ED, la solution obtenue est de PH=3.8

Ajuster le PH en utilisant les pastilles de NaOH jusqu'à obtention du PH=8. Volume finale 200 ml

Tris -HCL 25mM PH :8, EDTA 10Mm

Dans une éprouvette mélanger 25 ml de la solution Tris-HCL avec 50 ml EDTA ajuster la solution avec l'ED jusqu'à 100 ml

NaOH 0.2M SDS 1%

PM=40 g/mole, peser 1 g de SDS et 0.8 g de NaOH ajuster la solution avec l'ED jusqu'à 100 ml

Acétate de potassium 3M

PM=98.14 g/mole, dissoudre 2.94 g de KAc dans 10 ml d'ED

TE

Tris-HCL 10mM PH8 ; EDTA 1 mM

Dans une éprouvette mélanger 10 ml de la solution Tris-HCL avec 5 ml d'EDTA ajuster la solution avec l'ED jusqu'à 100 ml

EDTA disodique

- 9.3g d'EDTA disodique (poudre).
- 80ml d'ED.
- NaOH (ou HCL) pour ajuster le PH.
- ED pour ajuster le volume total à 100ml.

Tampon TAE (Tris-acétate-EDTA)

Ingrédient	g/ml
Tris (hydroxyméthyl)	40
Acide acétique glacial	20 ml
EDTA disodique	10ml
Eau distillé	1000ml

Colorant de charge avec du bleu de bromophénol

- 0.025g de bleu de bromophénol.
- 10ml de tampon TAE.
- Glycérol 40%.

VII.5. Annexe 5 : Profil de résistances des isolats à Gram négatifs et à Gram positifs

Profil de résistance d'*A. hydrophila* (N=12)

Antibiotique	R		S		I	
	Souches	pourcentage	Souches	pourcentage	Souches	Pourcentage
AUG	11	92%	1	8%	0	0%
IMP	2	17%	6	50%	4	33%
SXT	5	42%	6	50%	1	8%
CN	4	33%	4	33%	4	33%
CAZ	3	25%	8	67%	1	8%
C	0	0%	12	100%	0	0%
TE	2	17%	9	75%	1	7%

Profil de résistance de *V. fluvialis* (N=3)

Antibiotique	R		S		I	
	Souches	pourcentage	Souches	pourcentage	Souches	Pourcentage
AUG	2	67%	1	33%	0	0%
IMP	0	0%	3	100%	0	0%
SXT	2	67%	1	33%	0	0%
CN	2	67%	1	33%	0	0%
CAZ	1	33%	1	33%	1	33%
C	0	0%	3	100%	0	0%
TE	0	0%	2	67%	1	33%

Profil de résistance de *C. koseri*

Antibiotiques	R		S		I	
	souches	Pourcentage	Souches	pourcentage	souches	pourcentage
AUG	1	100%	0	0%	0	0%
IMP	1	100%	0	0%	0	0%
SXT	0	0%	1	100%	0	0%
CN	1	100%	0	0%	0	0%
CAZ	1	100%	0	0%	0	0%
C	0	0%	1	100%	0	0%
TE	0	0%	0	0%	1	100%

Profil de résistance de *P. rettgeri*

Antibiotiques	R		S		I	
	Souches	Pourcentages	Souches	pourcentage	souches	pourcentage
AUG	1	100	0	0%	0	0%
IMP	0	0%	1	100%	0	0%
SXT	0	0%	1	100%	0	0%
CN	0	0%	1	100%	0	0%
CAZ	1	100%	0	0%	0	0%
C	0	0%	1	100%	0	0%
TE	1	100%	0	0%	0	0%

Profil de résistances de *P. vulgaris*

Antibiotiques	R		S		I	
	Souches	Pourcentage	Souches	pourcentage	Souches	pourcentage
AUG	1	100	0	0%	0	0%
IMP	0	0%	1	100%	0	0%
SXT	0	0%	1	100%	0	0%
CN	1	100%	0	0%	0	0%
CAZ	1	100%	0	0%	0	0%
C	0	0%	1	100%	0	0%
TE	1	100%	0	0%	0	0%

Profil de résistance d'*Enterococcus sp* (N=12)

Antibiotiques	R		S		I	
	Souches	Pourcentages	Souches	pourcentage	souches	pourcentage
AUG	2	16%	10	83%	0	0%
IMP	2	16%	10	83%	0	0%
CN	4	33%	8	67%	0	0%
CAZ	2	16%	10	83%	0	0%
C	1	8%	11	92%	0	0%
TE	0	0%	7	58%	5	42%