

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ 8 MAI 1945 GUELMA

FACULTÉ DES SCIENCES ET DE L'INGÉNIEURIE

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE



NO/303

Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option: Biologie Moléculaire des Procarotes

**Thème : Etude de l'impact des rejets hospitaliers sur la
microflore locale (cas de l'Oued-Zénati).**

Présenté par:

AYACHI NABILA

GHILLIA AMEL

MESBAH NAIMA

Membre de jury :

Président : HOUCHE A. (M.A.S)

Examinateur : MERZOUG A. (M.A.B)

Encadreur : HOUHLAMDI M. (Pr)

BOUCHASSA L. (Postulant)

Université de Guelma

Université de Guelma

Université de Guelma

Université de Guelma

Junin 2010

Remerciement

L'éloge à Dieu qui nous a donné l'esprit, le courage pour surmonter toutes les difficultés durant cette étude ainsi que l'endurance pour terminer ce projet.

Nos remerciements vont à tous ceux qui ont contribué à la réussite de ce travail.

en particulier à :

Nos encadrants Mr. **HOUMAD MOUSSA** professeur au département de biologie à l'université de Guelma et Mr. **BOUCHAÏLA LAÏD** docteurant en biologie, de nous avoir aidé par leurs judicieux conseils durant l'élaboration de ce mémoire. Nous tenons à les remercier avec sincérité pour l'aide et le soutien qu'ils nous ont apporté pour guider ce travail et nous ont surtout aidé, éclairé pendant toutes les étapes de réalisation du mémoire.

Nous présentons aussi nos remerciements aux membres du jury le président Mr.

ROUBI ABD ELHAÏM et l'examinateur Mr **MERZOU, ABD**

ELHAÏM d'avoir accepté de juger ce travail. C'est avec un grand plaisir que seront reçues vos remarques et suggestions dans un but d'amélioration évidente.

Nous n'oublions pas tous nos collègues et amis de la première promotion de

«Master 2009-2010 » et ceux qui nous ont aidé.

Enfin, nous tenons à exprimer nos reconnaissances et vos profondes gratitude à

tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail

principalement M. le **DJOURJI HOUMRA** laborante au département de

biologie. A tous nos amis et ceux qui nous ont encouragé, nous ont soutenu et

soutenu dans les moments difficiles.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
 CHAPITRE I : LA POLLUTION DE L'EAU PAR LES REJETS HOSPITALIERS	
I. LA POLLUTION DES EAUX	3
1.1. Définition de la pollution.....	3
II. LES PRINCIPALES SOURCES DE POLLUTION D'EAU	4
II.1. Les effluents liquides hospitaliers	4
II.1.1. L'origine des effluents hospitaliers	4
A. Rejets de nature domestiques	5
B. Les rejets de nature spécifique à l'hôpital	5
II.2. Les effluents urbaines	9
II.3. Les effluents de nature industrielle	9
III. LES RISQUES PRESENTES PAR LES DIFFERENTES SOURCES DE POLLUTION DES EAUX.....	10
III.1. Le risque infectieux	11
III.2. Le risque toxique.....	11
III.3. Le risque radio-actif	11
IV. TRAITEMENT DES EFFLUENTS HOSPITALIERS	11
 CHAPITRE II : LA RESISTANCE DES BACTERIES AUX ANTIBIOTIQUES	
I. DEFINITION D'ANTIBIOTIQUE.....	13
I.1. Définition de l'antibiogramme.....	14
II. LA RESISTANCE ET LA SENSIBILITE DES BACTERIES AUX ANTIBIOTIQUES.....	14
II.1. La sensibilité.....	14
II.2. La résistance.....	14
III. LES MECANISMES DE RESISTANCE DES BACTERIES AUX ANTIBIOTIQUES.....	17
III.1. Les mécanismes biochimiques.....	17
A. l'imperméabilité.....	17
B. l'inactivation de l'antibiotique.....	18
C. l'altération de la cible cellulaire de l'antibiotique.....	19
D. Le reflux actif (efflux) de l'antibiotique	20

E. Augmentation de la synthèse du métabolite cible	20
III.2. Les mécanismes génétiques	21
A. La résistance chromosomique	21
B. La résistance extra chromosomique.....	22
III.3. Les principales caractéristiques de la résistance bactérienne aux antibiotiques	24
III.4. Les facteurs favorisant l'apparition de résistance aux antibiotiques chez les bactéries....	24
III.5. Les conséquences de la résistance aux antibiotiques.....	25
IV. VAINCRE LA RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES.....	25
V. LA RECHERCHE SUR LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES.....	26

CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES

I. DESCRIPTION DU SITE.....	27
I.1. Aperçu sur la zone d'étude (Oued-Zénati).....	27
I.1.1. La population.....	29
I.2. Le site d'étude.....	29
II. Matériel et méthodes.....	32
II.1. Matériel expérimental.....	32
II.2. Points de prélèvements.....	33
II.3. Echantillonnage.....	33
II.4. Les analyses bactériologiques effectuées.....	35
II.4.1. Recherche bactériologique.....	35
A. Isolement des bactéries (Méthode d'ensemencement sur gélose).....	35
B. Etude culturale.....	37
C. Examen microscopique.....	37
C.1. Coloration de Gram.....	37
D. Identification biochimique.....	40
D.1. Réalisation d'une galerie biochimique classique.....	40
D.2. Les testes complémentaires.....	46
D.3. Inoculation de la galerie API 20 E.....	48
E. Antibiogramme.....	51

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

I. RESULTATS ET DISCUSSION.....	53
I.1. Résultats de l'ensemencement.....	53
I.2. Observation macroscopique.....	54

I.3. Examen microscopique après coloration de Gram.....	55
I.3.1. Résultats de la galerie biochimique classique et de la galerie API 20 E.....	56
I.3.2. Résultat de l'antibiogramme.....	58
CONCLUSION.....	61

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RESUME

Produced with ScanTOPDF

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A.P.C : Assemblée Populaire Communale.	ONPG : Orthonitrophényl-bêta-D-galactopyranoside.
ADN : Acide désoxyribonucléique.	OZ : Oued-Zénati.
AMX : Amoxicillin.	PB : Polymixin.
AN : Amikacin.	PDA : Paraphénylène diamine.
ARA : Arabinose.	PH : Potentiel hydrogène.
ARN : Acide ribonucléique.	PLP : Les protéines de liaison à la pénicilline.
ATB : Antibiotique.	RA : Rifamrin.
AX : Amoxicilline.	Réactif NIT 1 : Acide parasulfanilique en milieu acétique.
BMR : Bactérie multi résistante.	Réactif NIT 2 : Alpha-naphtylamine en milieu acétique.
C : Chloramphénicol.	RM : Rouge de méthyle.
C : Dose maximale d'antibiotique.	RN : Route nationale.
c : Dose minimale d'antibiotique.	SAC : Saccharose.
CIP : Ciprofloxacine.	SOR : Sorbitol.
CIT : Citrate de Simmons.	SSS : Sulfamides.
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.	TDA : Tryptophane Désaminase.
CN : Cefalexin.	Tet : Gène codant pour la tétracycline.
DA : Clindamycine.	TIC : Ticarcilline.
E. coli : <i>Escherichia coli</i> .	TSI : Triple Sugar Iron Agar.
F : Nitrofurantoin.	UNESCO : Organisation des Nations unies pour l'éducation, la science et la culture.
GEL : Gélatinase.	VA : Vancomycine.
GLU : Glucose.	VP : Voges-Proskauer.
GN : Gélose Nutritive.	VPI : Alpha-naphtol.
H₂S : Thiosulfate de sodium.	VPII : Hydroxyde de potassium.
IND : Indole.	WC : Water closet (toilettes).
LDC : Lysine décarboxylase.	
MTR : Metronidazole.	
MAN : Mannitol.	
NI : Nitroxolin.	
NR : Nitrate réductase.	
ODC : Ornithine décarboxylase.	
OMS : Organisation mondiale de la santé.	

LISTE DES FIGURES

- Figure 01** : Le circuit d'élimination des médicaments.
- Figure 02** : Photo présente la résistance de *Serratia marcescens*.
- Figure 03** : Photo présente la résistance d'*E. Coli* aux ATB.
- Figure 04** : Schéma d'une Porine modifiée.
- Figure 05** : L'emplacement d'une B- lactamine (Gram -).
- Figure 06** : Schéma présente l'emplacement d'une PLP.
- Figure 07** : Le mécanisme d'efflux.
- Figure 08** : Situation géographique de la ville d'Oued-Zénati.
- Figure 09** : Photos présentant la situation de l'Oued-Zénati.
- Figure 10** : Situation géographique de l'Oued-Zénati.
- Figure 11** : Réseaux hydrographique du sous-bassin de l'Oued-Zénati.
- Figure 12** : Situation géographique des sites de prélèvement.
- Figure 13** : Méthode d'ensemencement par des stries.
- Figure 14** : La paroi des bactéries Gram-positives.
- Figure 15** : La paroi des bactéries Gram-négatives.
- Figure 16** : Coagulase négatif.
- Figure 17** : Coagulase positif.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01 : Evolution de la population de la ville d'Oued-Zénati.

Tableau 02 : Matériel expérimental utilisé.

Tableau 03 : Lecture et interprétation des résultats de test de nitrate réductase.

Tableau 04 : Lecture d'une galerie API 20 E.

Tableau 05 : Résultats de l'ensemencement des milieux de culture utilisés (après 24 heures d'incubation).

Tableau 06 : Résultats de l'observation macroscopique des colonies après une culture sur un milieu Mac-Conkey.

Tableau 07 : Résultats de l'observation macroscopique des colonies après une culture sur un milieu de Chapman.

Tableau 08 : Résultats de l'examen microscopique après coloration de Gram.

Tableau 09 : Résultats de la galerie biochimique classique du mois d'avril.

Tableau 10 : Résultat de la galerie biochimique classique de mois de mai.

Tableau 11 : Résultat des tests biochimiques complémentaires.

Tableau 12 : Résultats de la galerie API 20 E.

Tableau 13 : Résultat de l'antibiogramme des principales espèces isolées de premier prélèvement (Avril).

Tableau 14 : Résultat de l'antibiogramme des principales espèces isolées de premier prélèvement (Avril).

Tableau 15 : Résultat de l'antibiogramme des principales espèces isolées de deuxième prélèvement (mois de mai).

INTRODUCTION

Produced with ScanTopDF

L'eau constitue un élément indispensable pour la vie des êtres vivants et surtout à celle de l'homme, l'avoir à disposition en quantité suffisante, en qualité, contribue au maintien de la santé (Makoutode, 1999). Il est indispensable ainsi qu'au développement économique des nations, cependant elle peut être aussi une source de maladies.

Devant les besoins actuels en eau, besoins pressés par la croissance démographique, le développement industriel et agricole... (Rajonson *et al.*, 2005), de nombreux pays sont confrontés à de graves problèmes relatifs au manque de ressources en eau (Fournier, 2006) remarqué, avec un état plus grave, aux pays arides et semi-arides. Cette problématique ne se limite pas à la quantité des ressources en eau, mais porte également sur la qualité de ces ressources qu'il faut aujourd'hui plus que jamais bien gérer. Le plus souvent nos cours d'eau sont pollués par des déchets urbains, industriels et hospitaliers. Selon le ministère de ressources en eau (2007) la consommation minimal d'eau domestique est estimée à 100 litre par habitant et par jour, alors que la valeur généralement admise pour les hôpitaux varie de 400 à 1200 litres par lit et par jour, donc cette importante consommation en eau des hôpitaux donne naissance à de grands volumes de rejets liquides (Sellal, 2008). Les rejets liquides (les effluents) des établissements de santé ont des caractéristiques particulières par rapport aux effluents domestiques. Ces établissements utilisent une grande variété de produits (antibiotiques, solvants, métaux lourds, radio-éléments... et les médicaments en général) mais aussi des produits d'hygiène et d'entretien, qui se retrouvent dans les eaux usées. Ces eaux peuvent être chargées aussi en microorganismes (Champignons, virus, bactéries... parfois antibio-résistants) (Marchal, 2008).

Les différents problèmes résultants des rejets liquides des services de santé suscitent, chez les scientifiques, un questionnement sur le devenir des polluants hospitaliers dans l'environnement et sur la nécessité de développer des outils de gestion durable des eaux usées de ces établissements. La mise en œuvre d'essais d'écotoxicité montrent que les effluents hospitaliers ont souvent une toxicité élevée (Leprat *et al.*, 1998). Les résultats des tests de mutations géniques indiquent que les effluents des services cliniques et des laboratoires hospitaliers présentent un caractère génotoxique. Ces résultats confirment l'existence de substances dangereuses dans les effluents hospitaliers. Les risques liés à l'existence de ces substances deviennent un objet de recherche pertinent du fait du rejet d'énormes quantités d'eau usées hospitalières contenant ces produits. L'effet de ces produits est à craindre même a

de très faibles concentrations aient un impact sur la santé et lorsqu'ils sont présents en permanence provoquent une résistance des bactéries [15]. Lorsque des bactéries sont exposées à un antibiotique, celui-ci détruit les bactéries sensibles et épargne les bactéries résistantes, qui peuvent alors se multiplier, coloniser le milieu et se disséminer. Les bactéries qui survivent à l'exposition d'antibiotiques transmettent leurs caractéristiques de résistance à de nouvelles générations de bactéries. Il faut aussi être vigilant car les bactéries multi résistantes font déjà partie aussi bien des milieux hospitaliers, d'autant le nombre de molécules antibiotiques actives s'amenuise de jour en jour (Rahal, 2008).

L'objectif de cette étude est basé sur la surveillance de l'effet des rejets hospitaliers "surtout les antibiotiques" sur la résistance bactérienne et leur développement. Pour une meilleure compréhension de l'évolution de la résistance des bactéries contre les antibiotiques, nous avons fait des prélèvements au niveau de différents sites de l'Oued Zénati pour identifier des bactéries et réaliser des tests d'antibiogramme.

Dans cette optique nous avons structuré notre travail de la manière suivante :

- Le chapitre I est consacré à l'étude de la pollution des eaux par les différents effluents hospitaliers.
- Le chapitre II présente une étude bibliographique sur la résistance bactérienne aux antibiotiques.
- Le chapitre III aborde le matériel et les méthodes utilisés dans ce travail.
- Et le chapitre IV résultats et discussion.

Enfin une conclusion clôturant le mémoire.

CHAPITRE I : LA POLLUTION
DE L'EAU
PAR LES
REJETS HOSPITALIERS

Produced with ScantOPDF

L'eau est indispensable à la vie. Elle est au cœur des préoccupations de toutes les civilisations. Essentielle à de multiples activités humaines (énergétiques, domestiques, industrielles, agricoles...), elle est une priorité de santé publique et un miroir de notre avenir. Les causes majeures des menaces sur les ressources en eau et sur leur qualité ne sont-elles pas à chercher dans les comportements humains et dans la méconnaissance d'innombrables acteurs concernés, plus que dans l'absence de connaissances scientifiques et de solutions techniques ? (Zilliox, 2000)

La question de l'eau est l'une des principaux problèmes de l'environnement, en raison d'une part des conséquences sanitaires et économiques de sa pollution et des pressions exercées sur les ressources du fait de l'accroissement des besoins en eau et, d'autre part de l'insuffisance de l'assainissement surtout dans les pays en voie de développement (Derwich *et al.*, 2008).

I. LA POLLUTION DES EAUX :

I.1. Définition de la pollution :

Sous le terme général pollution sont regroupés à l'heure actuelle, les effets nocifs qui résultent de l'action de facteurs "altérage" qu'on qualifiée de polluants, quelle que soit la nature de ceux-ci. Ces polluants sont tous des sous-produits organiques et inorganiques des activités humaines. Cela dit, le terme polluant peut être défini comme une modification défavorable du milieu naturel qui apparaît en totalité ou en partie comme un sous-produit de l'action humaine. Ces modifications peuvent affecter l'homme directement ou au travers des ressources agricoles, en eau et autres produits biologiques. Ainsi le terme pollution désigne l'ensemble des rejets de composés toxiques que l'homme libère dans l'écosphère, mais aussi les substances qui, sans être vraiment dangereuses pour les organismes vivants, exercent une influence perturbatrice sur l'environnement (Koller, 2004).

- **Définition de Larousse :**

La pollution est une dégradation d'un milieu naturel par des substances chimiques et des déchets industriels.

- **Définition de la pollution d'eau admise par l'UNESCO :**

La pollution d'eau est tout rejet direct ou indirect, de substances ou d'énergie d'origine humaine qui a un effet nuisible sur les organismes vivants, dangereuse pour la santé humaine,

empêche l'utilisation de l'eau, altère leur qualité ou qui réduit les possibilités d'utilisation aux fins de loisirs [3].

- **Définition de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) :**

La pollution des milieux aquatiques est définie par l'OMS comme étant : toute modification des propriétés physiques, chimiques ou biologiques, ou tout rejet de substances liquides, gazeuses ou solides dans l'eau de façon à créer une nuisance ou à rendre cette eau dangereuse ou préjudiciable du point de vue, soit de la santé, de la sécurité et du bien être public, soit de ses usages destinés à des fins domestiques, commerciales, industrielles, agricoles, récréatives et autres, soit de la faune sauvage et aquatique (Galaf et Ghannam, 2003).

Nous pouvons alors considérer une eau comme " eau usée ou polluée " lorsque son état et sa composition, sont modifiés par les actions anthropiques dans une mesure telle qu'elle se prêle moins facilement à toutes ou certaines des utilisations auxquelles elle peut servir à l'état naturel (Mamadou, 2005). Généralement la pollution de l'eau se caractérise par la dégradation de l'aptitude de l'eau à un emploi déterminé (notamment pour la consommation humaine) [8].

II. LES PRINCIPALES SOURCES DE POLLUTION D'EAU :

II.1. Les effluents liquides hospitaliers :

Les rejets liquides (les effluents) des établissements de santé ont des caractéristiques particulières par rapport aux effluents domestiques. En effet ces établissements utilisent une grande variété de produits (antibiotiques, solvants, métaux lourds, radio-éléments... et les médicaments en général) mais aussi des produits d'hygiène et d'entretien, qui se retrouvent dans les eaux usées. Ces eaux peuvent être chargées aussi en microorganismes (bactéries, champignons... etc.) (Marchal, 2008).

II.1.1. L'origine des effluents hospitaliers :

L'hôpital est un grand utilisateur d'eau, alors qu'en milieu domestique la consommation est de 150 à 200 l par habitant et par jour, la valeur moyenne passe de 400 à 1200 l dans les hôpitaux. Se rajoutent également à cette consommation d'eau, les eaux à usage spécifique tel l'eau stérile (Darsy *et al.*, 2002).

Il existe cependant plusieurs types de rejets hospitaliers :

A. Rejets de nature domestiques :

Dans cette catégorie, on trouve :

- ✓ Les rejets des cuisines.
- ✓ Les rejets des produits détergents.
- ✓ Les rejets des garages et ateliers.
- ✓ Les rejets de la blanchisserie.
- ✓ Les rejets de la chaufferie et de la climatisation.

Les eaux grasses rejetées en cuisine ne posent pas de risque sanitaire mais peuvent provoquer un colmatage des réseaux et engendrer un développement bactérien. Ainsi La consommation de produits d'entretien (blanchisserie, nettoyage des surfaces...) dans un hôpital est considérable et les risques de pollution par ces rejets sont surtout liés à leur nature chimique et à leur utilisation intensive. Les garages et ateliers peuvent également provoquer une pollution chimique moindre car les quantités de détergents utilisées sont moins importantes (Darsy *et al.*, 2002).

B. Les rejets de nature spécifique à l'hôpital :

Ces rejets sont spécifiques d'une part de l'activité de soins concernant de nombreux services et d'autre part de l'activité de certains services

B.1. Les rejets spécifiques communs aux différents services de soins :

Nous retrouvons dans cette catégorie de rejet tout ce qui est relatif :

- ✓ Aux produits désinfectants et antiseptiques.
- ✓ Aux rejets de germes pathogènes.
- ✓ Aux médicaments.
- ✓ Aux métaux lourds.

• **Les rejets de produits désinfectants et antiseptiques :**

L'hôpital est un gros utilisateur de produits désinfectants et antiseptiques, compte tenu des problèmes d'hygiène que nous y rencontrons.

Les principaux produits désinfectants utilisés pour la désinfection des sols et des surfaces ou encore pour la désinfection des instruments et des matériels sont soit :

- ✚ Des produits chlorés, le plus courant étant l'eau de Javel.
- ✚ Des produits contenant des aldéhydes tels que par exemple le glutaraldéhyde pour la désinfection de certains matériels médico-chirurgicaux (endoscopes, fibroscopes...) ou encore le formaldéhyde sous forme liquide employé pour la désinfection des circuits d'hémodialyse.
- ✚ Des produits contenant des dérivés.

Les antiseptiques, produits chimiques utilisés pour lutter contre les infections bactériennes des peaux, des plaies sont principalement le soluté de Dakin (dérivé chloré), la Bétadine et la Chlorhexidine (Darsy *et al.*, 2002).

- **Les rejets contenant des éléments pathogènes :**

L'hôpital est un lieu où sont concentrées des personnes potentiellement porteuses de germes pathogènes et où peuvent se développer des infections nosocomiales. Il se pose alors la problématique de savoir si l'hôpital peut-être générateur d'une pollution bactériologique. En effet, il peut exister plusieurs sources de rejet d'éléments pathogènes à l'hôpital, des germes bactériologiques, viraux et/ou parasitaires peuvent être évacués avec les eaux vannes et avec les produits d'analyses des laboratoires s'il n'existe pas de systèmes de récupération ou de traitement spécifiques. De plus, du fait de l'utilisation quelque fois intensive d'antibiotiques à l'hôpital certaines souches bactériennes peuvent développer des facultés de polyrésistance aux antibiotiques. Le danger de pollution peut donc être accentué par la présence de ces germes dans le réseau d'assainissement public (Darsy *et al.*, 2002).

Cependant, il reste à démontrer que la composition bactérienne des eaux usées hospitalières est notablement différente de celle des eaux usées domestiques et que ses éléments pathogènes sont en concentration suffisante pour causer des maladies et donc parler de contamination (Darsy *et al.*, 2002).

- **Les rejets médicamenteux :**

Les médicaments utilisés dans les établissements de santé sont variés et représentent des quantités importantes. Nous pouvons citer à titre d'exemple : les analgésiques, les antipyrétiques, les antibiotiques, les antiviraux, les antifongiques, les immunodépresseurs et les anticancéreux.

Nous distinguons deux voies d'élimination des médicaments, la première et la plus conséquente concerne les excréta et les liquides biologiques, la seconde le circuit

d'élimination des médicaments non utilisés et du matériel souillé. Le circuit d'élimination des médicaments par les patients peut-être représenté par le schéma suivant :

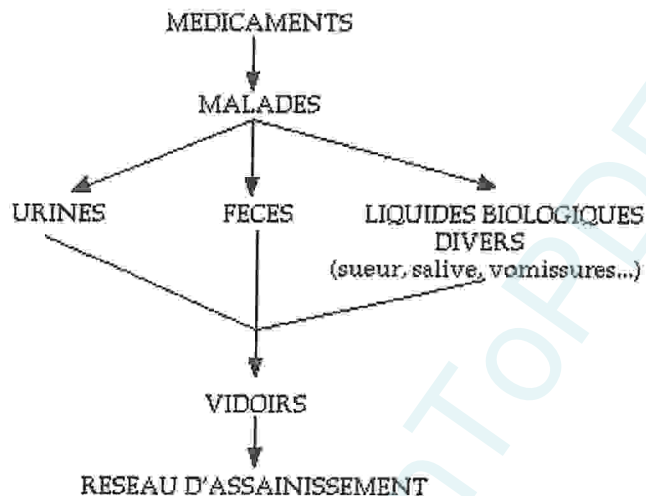


Fig.01 : Le circuit d'élimination des médicaments [4].

Suivant la voie d'administration du médicament, le médicament est plus ou moins métabolisé par l'organisme et nous retrouvons donc en partie les médicaments et les métabolites dans le réseau des eaux usés. Pour certains médicaments cela peut poser de graves problèmes de santé publique et d'environnement si aucune précaution n'est prise quant à leur rejet notamment pour les anticancéreux.

L'élimination des médicaments non utilisés ou périmés est faite, dans certain cas, via les éviers et les vidoirs des services. Cela est évidemment un cas extrême de négligence mais malheureusement il peut se rencontrer dans certains établissements (Darsy *et al.*, 2002).

- **Les rejets contenant des métaux lourds :**

Les métaux lourds pouvant être rencontrés à l'hôpital sont l'argent (service de radiologie) et le mercure. Le mercure métal très dangereux puisque très toxique, peut-être retrouvé accidentellement dans les eaux usées suite à des thermomètres cassés. Nous trouvons également du mercure dans certaines sondes gastriques, certains antiseptiques et dans la colonne des tensiomètres manuels... (Darsy *et al.*, 2002).

B.2. Les rejets spécifiques à certains services de soins :

Les services concernés sont :

- ✓ Hémodialyse.
- ✓ Radiologie.
- ✓ Médecine nucléaire.
- ✓ Laboratoires et Pharmacie.

- **Le service d'hémodialyse :**

Les rejets de ce service sont de deux types d'une part le rejet consécutif au traitement du malade et d'autre part les rejets de désinfection des appareils. En effet, le principe des appareils d'hémodialyse fonctionne par des procédés de transfert de toxines à travers une membrane depuis le sang du patient vers le circuit de dialysat. Des rejets liquides seront donc générés et qui dans la majorité des cas se déversent à l'égout. Or ils peuvent être chargés en produits chimiques (médicaments...) et facteurs infectieux. Le second paramètre à prendre en compte concerne les protocoles de désinfection du matériel utilisant des produits chimiques tels que le formol et l'eau de Javel dilués à de l'eau osmosée. Les rejets s'effectuant directement dans le réseau à l'égout [4].

- **Les laboratoires d'analyses et la pharmacie :**

Dans le cadre de leurs activités (travaux et analyses, nettoyage des appareils), les laboratoires utilisent différents produits chimiques (solvants, acides, bases, produits radio-actifs, des produits de rinçage...) et manipulent des liquides biologiques (sang, urines, selles, expectorations, cellules...) plus ou moins infectieux. Ces produits présentent des dangers pour l'environnement et pour l'homme rendant nécessaire des mesures particulières d'utilisation et d'élimination. En considérant que la plupart des produits les plus dangereux sont en principe récupérés dans des containers, il n'en reste pas moins que la plupart des lavages et rinçages ainsi que certains liquides biologiques négatifs en culture sont évacués au réseau d'égout. La pharmacie utilise également dans ses activités des produits chimiques dangereux pour l'environnement et la santé publique. Cependant, de part sa fonction de pharmacovigilance celle-ci est plus apte à évaluer les risques et par conséquent à prendre des mesures adaptées pour éviter ces risques de pollution [4].

- **Les services de Médecine nucléaire :**

Pour le diagnostic *in vivo* ou *in vitro* ou pour des finalités thérapeutiques, ce service manipule des éléments radio-actifs qui vont générer des déchets solides mais aussi des déchets liquides. Les éléments radio-actifs qui nous intéressent dans le cadre de cette étude

sont les produits radio-actifs en sources non scellées autrement dit susceptibles de dispersion. Une unité de médecine nucléaire peut rejeter des effluents radio-actifs provenant :

- Des laboratoires de préparation et de manipulation.
- Des sanitaires de l'unité.
- Des chambres protégées réservées à l'hospitalisation des patients faisant l'objet d'une thérapie anticancéreuse [4].

- **Les services de Radiologie-Imagerie médicale :**

Il s'agit dans ce cas des effluents photographiques générés lors du développement des films radiologiques sur support papier ou film. La technique utilise des produits chimiques de contraste et consomme une grande quantité d'eau en particulier pour les bains de rinçage. On retrouve donc les révélateurs, les fixateurs, les sels d'argent (en quantité variable suivant l'utilisation qui en est faite), dans les eaux usées. Or ces produits sont des sources de pollution importante [4].

II.2. Les effluents urbaines :

Le grand défi contemporain est celui de l'assainissement. Ainsi, dans toutes les agglomérations de plus de 2 000 habitants, les eaux usées rejetées par les utilisateurs devront être traitées dans des stations d'épuration et, dans les zones d'habitat peu denses, dans des installations d'assainissement autonome contrôlées par les communes.

Ces rejets urbains proviennent des différents usages domestiques de l'eau :

- ✚ Les eaux ménagères provenant des salles de bains, des cuisines, des eaux de lavages sont chargées de détergents, de graisses, de solvant et de débris organiques.
- ✚ Les eaux "vannes" provenant des WC sont chargées de matières organiques azotées et de germes fécaux.
- ✚ Les rejets commerciaux et artisanaux.
- ✚ Les eaux pluviales qui lessivent les toits et le bitume et sont chargées en produits minéraux et organiques [16].

II.3. Les effluents de nature industrielle :

L'industrie est responsable de la moitié des rejets polluants organiques et du quasi totalité des rejets toxiques : métaux lourds et polluants organiques persistants. En 1978, dans un rapport d'activité des agences de bassin, le ministère d'hydrauliques ensemble des services

de l'Etat (administration centrale et services déconcentrés) placés sous la responsabilité d'un ministre de l'environnement estimait que la pollution de l'eau était due pour 55 % à des rejets industriels. Ainsi l'attention s'est longtemps focalisée sur ce type de pollution, au détriment d'un autre type de pollution, liée à de nombreux changements dans les pratiques agricoles et le faire-valoir des terres [16].

En effet, Les principales sources de pollutions industrielles de l'eau sont dues à des rejets de matières en suspension, de matières organiques, des produits azotés ou phosphorés, des produits toxiques...etc. Elles émanent des industries agro-alimentaires, des industries papetières, des industries chimiques, des industries des cuirs et peaux, des industries extractives, des industries minérales, des industries mécaniques et de traitement de surfaces, des industries de production d'énergie, des industries sidérurgiques et métallurgiques, des industries textiles [16].

III. LES RISQUES PRESENTES PAR LES DIFFERENTES SOURCES DE POLLUTION DES EAUX :

Après avoir recensés les différents effluents (hospitaliers, urbains et industriels) il est possible maintenant de citer trois principaux types de risques accompagnant à ces effluents :

- un risque infectieux.
- un risque toxique.
- un risque radio-actif.

III.1. Le risque infectieux :

Il est théoriquement possible de retrouver dans les eaux usées hospitalières et domestiques des germes pathogènes dont l'origine a été précisée plus haut. Les germes pathogènes peuvent être :

- ✓ Des bactéries présentes dans les selles ou urines (*Salmonelles, Shigella, Coliformes, Vibrions, Streptocoques, Entérobactéries...*) ou encore des bactéries responsables d'infections nosocomiales (*Staphylocoques, Streptocoques, Pseudomonas...*). La particularité et le danger de ces bactéries sont qu'elles sont souvent polyrésistantes aux antibiotiques.
- ✓ Des virus (Hépatites, Entero-virus, Rotavirus...).
- ✓ Des parasites (amibes, taenia, ascaris, champignons...) [4].

III.2. Le risque toxique :

Le risque toxique est théoriquement réel, tant pour l'environnement que pour la santé publique, du fait d'une pollution possible par des métaux lourds (mercure, argent, chrome, nickel, cobalt...etc.) et par des molécules organiques (solvants, antibiotiques, désinfectants, détergents, médicaments...etc.). Ces produits solubles représentent donc un danger de pollution de l'eau puisqu'ils peuvent modifier les caractéristiques physico-chimiques de l'eau et nuire au bon fonctionnement de la station d'épuration en détruisant sa flore épuratrice. Le risque toxique concernant les rejets médicamenteux reste encore indéterminé car très peu d'études se sont intéressées au devenir des médicaments après leur élimination dans l'environnement [4].

III.3. Le risque radio-actif :

Les risques sont potentiellement élevés dès que nous utilisons des éléments radio-actifs. Cependant, à la vue de la réglementation très stricte sur les conditions d'utilisation et d'élimination, les risques sont minimisés. Il faut rester vigilant car il peut survenir des accidents ou des fuites. De plus, il subsiste un risque potentiel avec les patients injectés non soumis à un contrôle particulier après leur injection [4].

IV. TRAITEMENT DES EFFLUENTS HOSPITALIERS :

La plupart des stations de traitement dont étaient équipés les hôpitaux ont arrêté de fonctionner depuis plusieurs années déjà. Elles n'ont d'ailleurs, pour la plupart, jamais fonctionné de manière optimale. A ce jour, toutes les eaux hospitalières de la bande littorale sont rejetées sans aucun traitement et les hôpitaux n'ont toujours pas l'obligation de pré-traiter ou traiter les effluents hospitaliers. A titre d'exemple, nous pouvons citer l'hôpital Mustapha Bacha (1800 lits), l'un des plus importants en Algérie, spécialisé dans les traitements anti-cancéreux dont les déchets liquides sont directement rejetés sur les plages de Bab-El-Oued, ou dans les nappes phréatiques.

Pour nos interlocuteurs algériens, les besoins sont donc nombreux et concernent tous les maillons des filières :

- ❖ Mise à disposition de matériels normés de tri sélectif à la source.
- ❖ Mise à disposition de matériels normés de translation, de stockage et de transport interne (conteneurs de différentes capacités...).

CHAPITRE II : LA RESISTANCE
DES BACTERIES
AUX ANTIBIOTIQUES

Produced by Scantopdf

Chacun d'entre nous héberge sur sa peau, dans sa gorge, à la surface de son intestin...etc., 10 000 à 100 000 milliards de bactéries, appartenant à plus de 400 espèces différentes. Heureusement, la plupart de ces bactéries ne sont pas pathogènes (responsables d'infections), mais certains le sont. La découverte au XX^e siècle des médicaments antibiotiques pour lutter contre les bactéries pathogènes a constitué une révolution. Malheureusement, l'usage non raisonné de ces antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire a eu pour conséquence la sélection de souches bactériennes capables de fabriquer des substances empêchant leur action, modifier leur cible ou leur pénétration dans les cellules. Les bactéries gagnent cette aptitude lors de mutations spontanées ou d'échanges de matériel génétique. Leur pouvoir pathogène tient largement à leurs capacités d'adaptation et à leur pouvoir multiplicatif. Elles se dédoublent en quelques minutes. Chaque division est l'occasion de mutations, certaines conférant aux bactéries un pouvoir de résistance aux antibiotiques. Les résistances ainsi acquises se distinguent des résistances naturelles des bactéries à partir desquelles est déterminé le spectre d'activité des antibiotiques [17].

I. DEFINITION D'ANTIBIOTIQUE :

En 1942, Waksman a défini les antibiotiques comme des substances chimiques, produites par des micro-organismes et capables, à faible concentration, d'inhiber la croissance d'autres micro-organismes ou même de les détruire. Cette définition classique, permettant de différencier les antibiotiques des substances de synthèse dotées d'un pouvoir antibactérien, ne semble plus justifiée car de nombreuses substances, autrefois obtenues à partir de culture, sont actuellement synthétisées ou modifiées par synthèse [18].

Il existe des millions d'antibiotiques produits principalement par les bactéries de sol et des mycètes ; ils sont actifs contre des bactéries mais seulement peut d'entre eux peuvent être utilisés pour traiter des maladies bactérienne chez l'homme : ce sont ceux qui ont la propriété d'être toxiques vis -à- vis des bactéries et avoir un effet non significatif sur l'hôte humain (Nicklin *et al.*, 2000).

En bactériologie médicale, il est préférable de retenir une définition plus large : un antibiotique est toute substance chimique, quelle que soit son origine, agissant spécifiquement sur une étape essentielle du métabolisme des bactéries (antibiotiques antibactériens) ou des champignons (antibiotiques antifongiques), et dont l'activité spécifique se manifeste à dose faible sur les micro-organismes (Ferron, 1984).

I.1. Définition de l'antibiogramme :

L'antibiogramme est un examen de laboratoire de bactériologie indispensable dans bien des cas. Il permet de définir les antibiotiques vis à vis lesquels la souche bactérienne isolée est sensible. Il permet ainsi de guider la prescription et de surveiller la survenue et l'évolution des résistances acquises. Il est impliqué au préalable de pratiquer les prélèvements bactériologiques nécessaires, de façon impérative avant le début d'une antibiothérapie [19].

I.1.1. Principe :

L'antibiogramme a pour but de déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) d'une souche bactérienne vis-à-vis les divers antibiotiques. Selon l'O.M.S la CMI est la plus faible concentration d'antibiotique capable de provoquer une inhibition complète de la croissance d'une bactérie donnée, appréciable à l'œil nu, après une période d'incubation donnée (37°C pendant 24 heures). La détermination de cette valeur est peu précise mais elle est consacrée par l'usage [18].

II. LA RESISTANCE ET LA SENSIBILITE DES BACTERIES AUX ANTIBIOTIQUES :

De très nombreuses souches bactériennes ne sont pas en pratique aussi sensibles aux antibiotiques que le spectre théorique d'activité de chacun de ces produits pourrait le laisser croire. En effet, depuis l'introduction successive en thérapeutique des différents antibiotiques, la sensibilité des bactéries a beaucoup évaluée de sorte que la proportion des souches résistantes dans de nombreuses espèces est actuellement importante (Ferron, 1984).

II.1. La sensibilité :

Pour qu'un antibiotique soit actif sur une bactérie, un certain nombre de conditions doivent être remplies : il doit en premier lieu, pénétrer dans la cellule ; ensuite il doit rencontrer le récepteur ou la cible moléculaire de son action pour la modifier ou la perturber ; enfin au cours de son contact avec la cellule, il ne doit subir aucune transformation susceptible de l'inactiver (Leclerc *et al.*, 1983).

II.2. La résistance :

On dit d'une bactérie qu'elle est résistante lorsque, pour une des raisons évoquées, elle est capable de se développer en présence d'antibiotique avec un taux plus ou égale le taux habituel. La notion de résistance clinique, est donc corrélative à un échec thérapeutique ; elle

n'a qu'une signification arbitraire, par rapport au malade et elle n'a aucun sens à l'échelle bactérienne (Leclerc *et al.*, 1983). Nous notons ainsi que les résistances bactériennes aux antibiotiques peuvent être naturelles et/ou acquises.

A. La résistance naturelle :

Nous parlons de résistance naturelle lorsque toutes les souches d'une même espèce bactérienne sont résistantes à un antibiotique donné. Il s'agit des bactéries qui sont insensibles au mode d'action de l'antibiotique. Certaines bactéries sont naturellement résistantes à de nombreuses molécules : c'est le cas du bacille de la tuberculose qui n'est sensible qu'aux quelques antibiotiques bien précis. Pour un antibiotique donné, l'ensemble des espèces bactériennes qui y sont sensibles représente son spectre d'activité. Ces notions de résistance naturelle et de spectre sont importantes : elles expliquent pourquoi certains antibiotiques sont incapables de combattre certaines bactéries. Ainsi, la recherche pharmaceutique a très vite cherché à contourner ce phénomène de résistance naturelle et à élargir le spectre des antibiotiques en modifiant leur structure chimique. C'est le cas des pénicillines plus récentes, comme l'ampicilline, qui est active sur les bactéries Gram positif et négatif [11]. Au-delà de la résistance naturelle, il existe d'autres mécanismes par lesquels certaines bactéries peuvent devenir résistantes à un ou plusieurs antibiotiques.

Exemple : La résistance en cocarde à la colistine de *Serratia marcescens*.

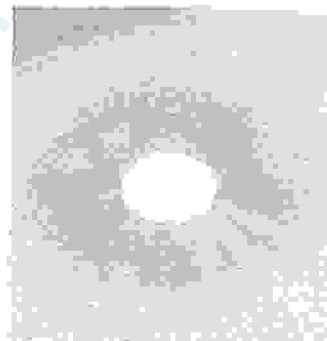


Fig. 02 : Photo présente la résistance de *Serratia marcescens* [20]

B. La résistance acquise :

La résistance acquise résulte d'une modification du capital génétique permettant à une bactérie de tolérer une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce. En effet la résistance acquise a été observée dès le début de l'antibiothérapie mais sa fréquence était faible. Ultérieurement, la généralisation de l'utilisation des antibiotiques a conduit à une sélection des souches résistantes. Nous constatons, quotidiennement, que de très nombreuses souches ne se comportent pas à l'égard des antibiotiques conformément à ce que les spectres d'activité permettraient de le supposer. Ce phénomène a atteint une telle ampleur que la seule identification bactérienne ne permet plus de prédire le comportement d'une souche isolée vis-à-vis des antibiotiques [18].

Exemple: la résistance acquise aux pénicillines ; Amoxicilline (AMX) et Ticarcilline (TIC) chez *E. coli* (à droite souche sauvage).

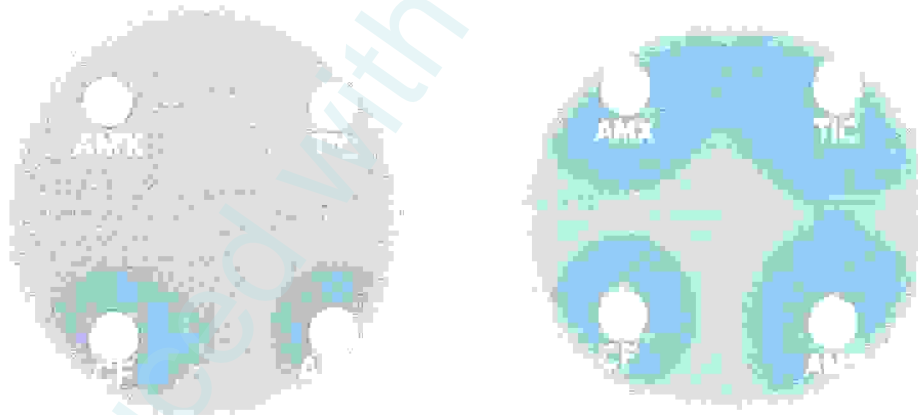


Fig. 03 : Photo présente la résistance d'*E. Coli* aux ATB [18]

III. LES MECANISMES DE RESISTANCE DES BACTERIES AUX ANTIBIOTIQUES :

Les mécanismes, génétiques et biochimiques, responsables de la résistance des bactéries aux antibiotiques, permettent de mieux comprendre l'épidémiologie de la résistance (apparition et diffusion des gènes de résistance et des souches résistantes) et de mieux appréhender les facteurs responsables de la sélection des souches résistantes [21].

III.1. Les mécanismes biochimiques :

Généralement cinq mécanismes peuvent être envisagés pour expliquer la résistance naturelle et surtout acquise des bactéries aux antibiotiques :

- ✓ L'imperméabilité.
- ✓ L'inactivation de l'antibiotique.
- ✓ L'altération de la cible cellulaire de l'antibiotique.
- ✓ Le reflux actif (efflux) de l'antibiotique.
- ✓ Et l'augmentation de la synthèse du métabolite cible [21].

A. L'imperméabilité :

La résistance par imperméabilité de l'enveloppe des bactéries est uniquement décrite chez les bactéries à Gram négatif, tout changement dans la composition de l'enveloppe, qui fait obstacle à l'absorption d'un antibiotique donné, aura pour résultat une augmentation de la CMI ou l'apparition d'un haut degré de résistance. Par exemple chez *Enterobacter aerogenes*, une amoindrie de perméabilité due à la fermeture des pores par lesquelles les antibiotiques pénètrent dans la cellule (Singleton, 2004). Ces pores sont constitués par des protéines qui forment des canaux (porines). Il peut s'agir d'une diminution quantitative d'un ou plusieurs types de porines ou d'une modification de leurs structures [22].

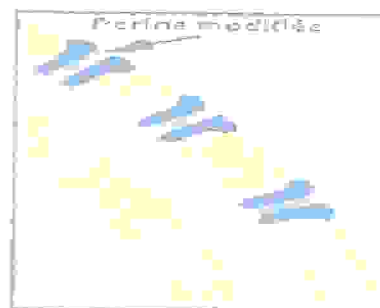


Fig.04 : Schéma d'une Porine modifiée [22]

B. L'inactivation de l'antibiotique :

De nombreuses enzymes encodées dans des gènes chromosomiques ou plasmidiques peuvent inactiver ou dégrader un ou plusieurs antibiotiques. Certains de ces enzymes sont inductibles en le modifiant ou l'hydrolysant (Singleton, 2004).

Ce mécanisme concerne particulièrement :

➤ La bêta-lactamine :

La résistance par inactivation de l'antibiotique peut être due à la synthèse d'une enzyme β -lactamase capable d'inactiver la β -lactamine par ouverture du cycle β -lactame :

- Chez les bactéries à Gram négatif, les β -lactamases sont localisées dans l'espace périplasmique.
- Chez les bactéries à Gram positif, ces enzymes sont sécrétées et libérées dans le milieu extracellulaire [21].

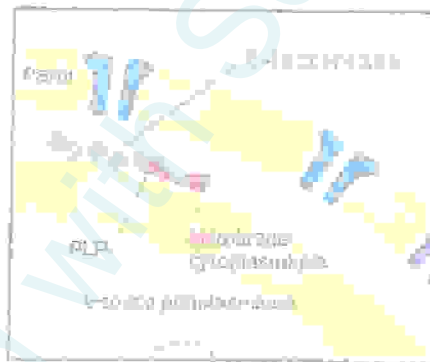


Fig. 05 : L'emplacement d'une B- lactamine (Gram -) [22]

➤ Les aminosides :

Les enzymes inactivant les aminosides sont des constitutives intracellulaire, non diffusibles, codées par un plasmide donc transférables. Elles ne modifient l'antibiotique qu'après pénétration de ce dernier dans la cellule bactérienne (Flandrois *et al.*, 1988).

➤ Les phénicoles :

Une résistance plasmidique due à la production d'un chloramphénicol acétyl transférase est décelable chez certaines entérobactéries et parmi différentes espèces appartenant au genre *Staphylococcus* et *Streptococcus* (Flandrois *et al.*, 1988).

C. L'altération de la cible cellulaire de l'antibiotique :

Pour qu'un antibiotique soit efficace, il faut qu'il se fixe à une cible dans la bactérie. Si cette cible est remplacée ou modifiée de telle manière que l'antibiotique ne puisse plus s'y fixer, la bactérie acquiert une résistance qui souvent s'étend à toute une famille d'antibiotique (Yahi, 1997).

➤ Modification de PLP :

Les protéines de liaison à la pénicilline (PLP) sont des enzymes qui interviennent dans l'assemblage du peptidoglycane de la paroi. La fixation des β -lactamines inactive leurs fonctions enzymatiques. La bactérie, privée de paroi, devient très sensible aux systèmes autolytiques. La résistance est due à la diminution d'affinité de ces PLP, soit par augmentation de leur production, soit par synthèse de nouvelles PLP de très faible affinité. Ce type de résistance est surtout observé chez les *Staphylocoques* « meti R », chez les *Pneumocoques* " de résistance anormale à la pénicilline " et plus rarement chez les *Entérocoques*. Il s'agit de résistances mutationnelles (*Staphylocoques*, *Entérocoques*) ou acquises par transformation (*Pneumocoques*) (Flandrois *et al.*, 1988).

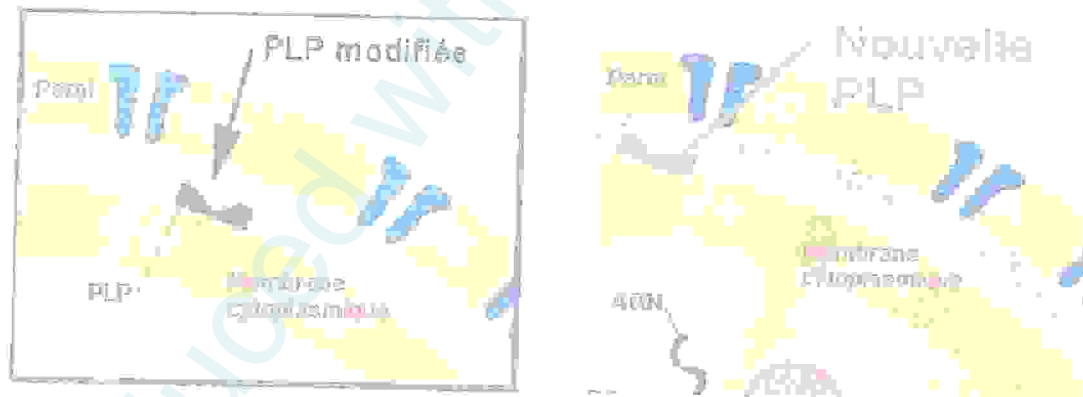


Fig. 06 : Schéma présente l'emplacement d'une PLP [22]

➤ Modification de la cible ribosomale :

Les ribosomes sont le lieu des synthèses. Ils peuvent être altérés dans leur structure et leur fonctionnement par la fixation d'un antibiotique. Une modification de la cible ribosomale acquise par mutation diminue l'affinité du site de fixation de l'antibiotique et rend la bactérie résistante. Ce mécanisme est responsable de résistances aux : tétracyclines, macrolides, lincosamides, phénicoles, fucidine et plus rarement aux aminosides (Flandrois *et al.*, 1988).

► **Altération de la synthèse des acides nucléiques :**

L'ADN gyrase est essentiel pour la réplication de l'ADN, en paralysant son activité, les antibiotiques de la famille des quinolones ont un effet bactéricide. Des mutations peuvent conduire à la production d'enzymes modifiées insensibles à ces antibiotiques.

L'ARN polymérase (transcriptase) est nécessaire à la synthèse des ARN messagers. Les rifamycines bloquent l'action de cette enzyme. Les résistances acquises par mutation sont dues à la production de transcriptase modifiée (Flandrois *et al.*, 1988).

D. **Le reflux actif (efflux) de l'antibiotique :**

Certains systèmes de transport (tous dépendant d'énergies) sont capables de pomper vers l'extérieur, à travers la membrane cytoplasmique ou l'enveloppe cellulaire, des antibiotiques particuliers. Certains de ces systèmes sont des exportateurs multi protéiques et d'autres sont des systèmes à une seule protéine, appartenant à la superfamille majeure des facilitateurs.

Exemple : La protéine inductible de la membrane cytoplasmique Tet assure l'efflux de tétracyclines chez certaines bactéries Gram négatives (Singleton, 2004).

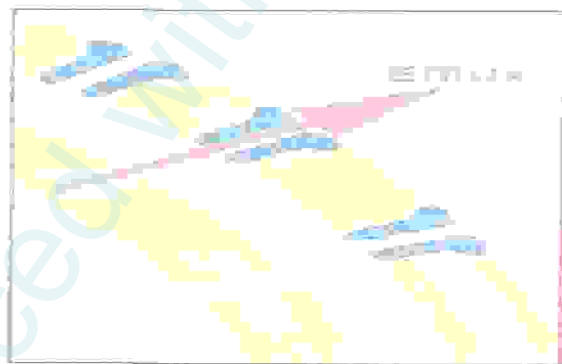


Fig. 07 : Le mécanisme d'efflux [22]

E. **Augmentation de la synthèse du métabolite cible :**

Consiste en une production accrue d'un métabolite particulier, de façon à surmonter l'inhibition compétitive exercée par l'antibiotique, une forme de résistance aux sulfamides et de se type (Singleton, 2004).

III.2. Les mécanismes génétiques :

Le potentiel génétique d'une bactérie est constitué d'une part d'un génophore obligatoire et un chromosome et d'autre part de un ou plusieurs génophores facultatifs et extra chromosomiques et des plasmides. Les gènes sont généralement portés par des éléments génétiques transposables et par des intégrons. Une bactérie peut ainsi acquérir une résistance aux antibiotiques par deux grands mécanismes génétiques. L'un a pour support le chromosome et définit une résistance chromosomique, l'autre a pour support les plasmides ou les éléments transposables ou les intégrons et ils définissent une résistance extra-chromosomique [18].

A. La résistance chromosomique :

Cette résistance résulte d'une mutation dont elle en présente tous les caractères suivants:

* Rareté :

Une mutation se produit en moyenne toutes les 10^5 à 10^{10} divisions mais compte tenu de l'importance des populations bactériennes dans un foyer infectieux la probabilité pour qu'il existe une bactérie résistante à un antibiotique n'est pas négligeable.

* Hasard :

L'antibiotique ne provoque pas la mutation qui se produit au hasard. Il se contente de révéler et de sélectionner les bactéries mutantes.

* Spécificité :

Une mutation n'affecte qu'un caractère et souvent la résistance ne concerne qu'un antibiotique ou qu'une famille d'antibiotiques ayant le même mode d'action. Il existe toutefois quelques exceptions notables à cette règle lorsque la mutation affecte les porines.

* Indépendance :

La probabilité de deux mutations simultanées est égale au produit du taux des mutations et elle est donc très faible. Cette indépendance des mutations constitue un des meilleurs arguments pour justifier l'association des antibiotiques.

*** Transmissibilité :**

Une mutation résulte de la modification d'un gène, elle est permanente (sauf mutation reverse) et elle a un caractère héréditaire (transmission sur un mode vertical de bactérie mère à bactéries filles).

Toutes les mutations ont pour conséquence la perte ou la modification d'une protéine structurale ou enzymatique et une bactérie mutée est souvent contre sélectionnée en l'absence d'antibiotique [18].

B. La résistance extra chromosomique :

La résistance extra chromosomique constitue le seul mode d'acquisition de résistance connu chez les mycobactéries et les brucelles et la résistance à la rifampicine et aux quinolones résultent toujours d'une mutation [18].

B.1. La résistance plasmidique :

Les bactéries ont la capacité de transférer l'information génétique contenue sur le plasmide. La plupart de ces cas de résistances se rencontrent à l'hôpital. C'est une information génétique exogène qui est récupérée par la bactérie. Les bactéries peuvent transférer des éléments mobiles de leur génome : plasmides et transposons.

Souvent les bactéries ont rassemblé plusieurs gènes de résistance sur leur plasmide et l'échangent par :

- ✓ Le transfert vertical est évident entre bactéries de même espèce.
- ✓ Le transfert horizontal intervient en revanche dans les échanges entre bactérie Gram+, Gram- ou dans le sens Gram+ vers Gram-. L'inverse, Gram- vers Gram+, n'est pas réalisable car les gènes de Gram- ne sont pas exprimés chez les Gram+.

En effet le premier cas de résistance fut observé en 1951 sur un patient japonais. Il souffrait d'une infection à Shigelle (une *Entérobactérie*, autrement dit un bacille Gram négatif, mobile). La Shigelle provoquait une dysenterie qui pouvait être soignée par des sulfamidés, mais elle était devenue résistante à ces sulfamidés. Les chercheurs ont démontré que cette résistance était accompagnée par des résistances *in vitro* à d'autres antibactériens.

Ils ont isolé dans le tube digestif d'autres malades, des souches d'*Escherichia coli* (une autre *Entérobactérie*, très répandue dans l'eau, le sol, le lait et les selles) qui avaient acquis une résistance aux sulfamidés par un transfert horizontal entre les deux espèces [13].

La dissémination de gènes de résistance chez les bactériens auparavant sensibles est un des principaux facteurs de l'évolution préoccupante de la résistance aux antibiotiques.

Ces gènes de résistance, comme n'importe quel gène bactérien, peuvent être transférés d'une bactérie à l'autre par plusieurs facteurs [21]:

➤ **La transduction :**

Le vecteur est un bactériophage. En se répliquant, le phage intègre une partie du génome bactérien. En quittant la cellule, il emporte des gènes supplémentaires (bactériens) qui pourront être transférés dans une autre bactérie. Ce système est efficace, mais les échanges sont limités en taille (le phage ne peut pas transférer un long morceau d'ADN bactérien) aux organismes proches phylogénétiquement pour la reconnaissance phage/bactérie [13].

➤ **La transformation :**

La bactérie acquiert et incorpore de l'ADN exogène nu présent dans son environnement. Cela peut être de l'ADN d'une bactérie morte qui, une fois capté, permet l'expression de ses gènes par la nouvelle bactérie. C'est un événement très rare qui existe chez les bactéries Gram- [13].

➤ **La conjugaison :**

L'ADN est transféré d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice au cours d'un contact cellulaire étroit (pili). C'est le mode de transmission de transfert horizontal [13].

B.2. Les éléments génétiques transposables et intégrons :

Des gènes spécifiant une résistance à un ou plusieurs antibiotiques peuvent être acquis par transformation conjugative ou transduction. Dans certains cas, une « cassette génétique » codant pour de la résistance aux antibiotiques s'insère pour recombinaison localisée dans une séquence spécifique de l'ADN (intégron) qu'on trouve dans les plasmides et les transposons. Un intégron comprend le site d'insertion et aussi l'intégrase (recombinase) requise (intégrons et cassette génétique) (Singleton, 2004).

III.3. Les principales caractéristiques de la résistance bactérienne aux antibiotiques :

La résistance bactérienne aux antibiotiques a souvent été rapportée dès l'usage d'un nouvel antibiotique en clinique. La résistance bactérienne est donc une fatalité mais d'importance variable selon les pays, l'espèce bactérienne et l'antibiotique, victime de son succès.

La résistance bactérienne dite acquise présente certaines caractéristiques ci-dessous évoquées:

- ✓ Emergence rapide de quelques souches résistantes après l'introduction d'un antibiotique.
- ✓ Fréquence de ce nouveau mécanisme rapidement en augmentation mais variable selon l'antibiotique.
- ✓ L'émergence de la résistance des pneumocoques à la pénicilline G constitue une exception, puisqu'elle est apparue en France en 1984, alors que la pénicilline G a été utilisée dès les années 45. Ce décalage, peu habituel, est en relation avec un déterminisme génétique plus complexe qu'à l'accoutumée.
- ✓ Résistance transférable, car liée à la présence de gènes transférables comme ceux intégrés dans un plasmide, un intégron ou plus récemment avec l'individualisation de gènes cassettes, Ces gènes transférables peuvent avoir une diffusion épidémique au sein du monde bactérien.
- ✓ L'addition de mécanismes de résistance est devenue monnaie courante dans le monde bactérien, aussi les bactéries deviennent de plus en plus résistantes, d'où l'appellation de BMR pour Bactéries Multi Résistantes [22].

La résistance acquise peut être donc, modulable permettant au monde bactérien, une adaptation possible aux thérapeutiques, mêmes les plus récentes.

III.4. Les facteurs favorisant l'apparition de résistance aux antibiotiques chez les bactéries :

L'utilisation massive et surtout anarchique des antibiotiques reste le premier facteur. Lorsque des bactéries sont exposées à un antibiotique, celui-ci détruit les bactéries sensibles et épargne les bactéries résistantes, qui peuvent alors se multiplier, coloniser le milieu et se disséminer. Les bactéries qui survivent à l'exposition d'antibiotiques transmettent leurs caractéristiques de résistance à de nouvelles générations de bactéries.

Quand le médecin choisit l'antibiotique le plus adéquat et quand il le prescrit avec une posologie et une durée suffisante, le risque d'apparition de résistance est minime.

Il est malheureux de constater que certains médecins prescrivent pour les infections courantes et banales telles que des angines ou des infections pulmonaires et des infections urinaires, des antibiotiques " nouveaux " et " forts ", alors qu'un grand nombre de ces infections peuvent être traitées avec efficacité par des antibiotiques découverts dans les années 60 [23].

Le comportement du malade peut être aussi un facteur favorisant. Le fait d'arrêter un traitement d'antibiotique a comme conséquence de favoriser la prolifération plus forte des bactéries qui n'ont pas été éliminées. Certaines bactéries qui développent une résistance à un antibiotique ont la capacité de résister à un autre antibiotique c'est ce que nous appelons la résistance métrisse (Neuman, 1979).

L'automédication ou la délivrance d'antibiotiques sans ordonnance médicale peuvent aussi générer des résistances.

L'utilisation des antibiotiques dans l'industrie agroalimentaire est un facteur aussi important que les autres facteurs déjà cités. Les antibiotiques ajoutés à la nourriture destinée au bétail ou pulvérisés sur les récoltes de fruits peuvent aussi participer à l'émergence de bactéries résistantes.

Les facteurs qui favorisent la diffusion des bactéries résistantes sont essentiellement le manque d'hygiène avec notamment le non-lavage des mains et les voyages à travers le monde [23].

III.5. Les conséquences de la résistance aux antibiotiques :

Les deux conséquences majeures sont l'augmentation de la mortalité et du coût des soins. Les bactéries résistantes entraînent des infections sévères souvent mortelles et qui nécessitent une prise en charge thérapeutique cent à mille fois plus coûteuse que le traitement d'une infection à germe sensible [23].

IV. VAINCRE LA RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES :

Il semble possible d'arrêter, ou même d'inverser, le développement de la résistance aux antibiotiques; une chose est sûre, on peut en ralentir la progression. Parmi les suggestions des experts du domaine, il y a l'abolition de l'usage non médical des antibiotiques en agriculture et dans l'élevage, et son remplacement par d'autres solutions abordables. Il est également suggéré que les médecins s'assurent que les antibiotiques ne sont prescrits que

lorsque leur nécessité s'est avérée. En outre, il faut insister sur l'usage et la posologie de ces médicaments, pour que les malades épuisent leur ordonnance. Parmi les autres mesures, il y a la sensibilisation du public à la nécessité de bien cuire la viande, de bien laver les fruits et les légumes crus, et de réduire ou éliminer le recours aux produits ménagers antimicrobiens. Les microbes pathogènes peuvent pénétrer dans l'organisme lorsque l'épiderme contaminé des mains touche le nez, la bouche, ou des blessures; par conséquent, se laver les mains, à la maison comme en clinique ou à l'hôpital, est une des façons les plus faciles, mais souvent négligée, de se prémunir contre l'infection bactérienne.

Certains ont affirmé que la résistance bactérienne aux antibiotiques durera jusqu'à ce que la perception que le public a des microbes se modifie. Les mesures visant à éliminer les infections pathogènes doivent s'accompagner d'efforts délibérés pour permettre la survie des lignées non pathogènes, puisque l'élimination des « bonnes » bactéries donne un avantage aux souches microbiennes résistantes [10].

V. LA RECHERCHE SUR LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES :

Face à l'augmentation des lignées bactériennes qui ont développé une résistance aux antibiotiques, l'industrie pharmaceutique a accéléré la recherche et le développement de nouvelles solutions. Certains résultats de la recherche indiquent que les antibiotiques fonctionnent en déclenchant une réaction chez les bactéries qui conduit à leur propre mort; cette réaction de suicide est maintenant confirmée. Les bactéries qui ne possèdent pas cette « technique » sont résistantes aux antibiotiques. En outre, on met au point de nouveaux médicaments qui interfèrent avec le mode de défense des cellules résistantes contre certains antibiotiques. Ainsi, on a trouvé que les bactéries qui résistent à la pénicilline produisent de la pénicillinase, enzyme qui fracture la pénicilline avant qu'elle puisse agir. Nous disposons maintenant d'un inhibiteur de cette enzyme. En fonction avec la pénicilline, l'inhibiteur permet à la pénicilline de faire son travail, et empêche en même temps la pénicillinase de détruire l'antibiotique. Certains de ces nouveaux produits sont à l'étape des essais cliniques et devraient être sur le marché d'ici deux ou trois ans; d'autres en sont encore au stade du développement et on espère les amener au stade clinique dans cinq ans environ [10].

CHAPITR III : MATERIEL
ET
METHODES

Produced with ScanTOPDF

I. DESCRIPTION DU SITE :

I.1. Aperçu sur la zone d'étude (Oued-Zénati) :

La daïra d'Oued-Zénati (OZ) appartient à la wilaya de Guelma, elle est distante de 40 km du chef lieu de la wilaya "Guelma". Elle se trouve sur la route nationale (RN) 20, à 70 km à l'Est de la wilaya de Constantine. Sa superficie de 484 km² en 1985 est actuellement de 143,77 km². La ville est limitée au Nord par les communes de Bordj Sabbat et de Ras El-Agba, à l'Est par les communes de Sellaoua Announa et d'Ain Makhoulouf, à l'Ouest par la commune d'Ain Regada, et au Sud par la commune de Tamlouka (Fig. 08). Elle présente une altitude moyenne de 640 m, qui se caractérise par une morphologie de collines et de piedmonts représentant près de 72 % de la surface communale, les plaines et les plateaux, n'occupent que 20 %, et le reste soit 3 % de la surface totale de la commune est montagneux (Bouchaâla, 2010).

Du point de vue géologique, la ville est caractérisée par des ensembles assez homogènes où l'érosion est plus active sur l'ensemble argileux-marneux au Nord et moins active sur les croûtes calcaires dans la région Sud. L'extension de la mono-culture céréalière est due notamment aux conditions favorables que présente le milieu physique homogène dans son ensemble.

La ville d'Oued-Zénati est connue comme étant un grand domaine où la céréaliculture est prédominante. L'agriculture occupe une part très importante soit 88 % des terres. Les meilleures terres sont cependant situées sur le long de la Vallée de l'Oued-Zénati et principalement vers le Sud de la commune sur les plaines d'Ain Trab. Les premières sont composées de vertisols, jouissant d'un profil homogène, d'une bonne cohésion et sont développées sur des terrasses. La faible pente rend le drainage difficile et la grande proportion des éléments fins rendent la porosité médiocre, la texture devient donc lourde et de ce fait, ces terres sont souvent utilisées pour les cultures annuelles tels les céréales et les légumes secs. La jachère ne représente qu'environ 20 % de la surface agricole totale et justifie la vocation agropastorale de la ville. Elle est surtout située sur les piedmonts des régions montagneuses. Les fourrages occupent cependant 10% de la surface totale, l'arboriculture et les cultures maraîchères n'occupent que 0.006% et 0.002% successivement [24].



Fig. 08 : Situation géographique de la ville d'Oued-Zenati
(Source : A.P.C d'Oued-Zenati)

I.1.1. La population :

La ville d'Oued-Zénati a connue une croissance démographique notable ces dernières années (Tab.01) qui risque de doubler l'effectif en 20 ans [1]:

Tab.01 : Evolution de la population de la ville d'Oued-Zénati (Source : A.P.C d'Oued-Zénati).

Année	Nombre d'habitants
1990	24.595
1995	28.445
2000	31.300
2004	32951
2007	37744
2010	40.000

I.2. Le site d'étude :

Le cours d'eau "Oued-Zénati", représente le plus important oued du réseau hydrographique de la ville qui porte d'ailleurs son nom, il comprend également plusieurs Chaâbats de moindres importances et qui se présentent comme des affluents de la ville (Fig. 11). Il vient de l'Ouest, et traverse de part en part la ville d'Oued-Zénati sur une distance de plus de 2 km. Ces sources prennent naissance à l'Ouest de Ain Regada près de la région d'Ain-Abid (Bouchaâla, 2010), de la confluence de l'Oued El M'leh qui prend sa source à Djebel Oum Settas (1326m), et chaâbet Touifsa qui prend sa source à Kef Eddeb (1142m) (Benchaba, 2006), et sa Vallée va de Constantine à Guelma (Fig. 10). Il reçoit sur sa rive gauche les oueds : Bou Skoum, Berneb, Kalech. chaabet Errassoul, Snoussi; et sur sa rive droite Chaâbet Guelt et Terba, Oued El Gloub, Chaâbet Mrassel (Fig. 11). Au delà de la ville d'Oued-Zénati l'oued passe par Bordj Sabbath, où il reçoit l'Oued El-Meridj qui vient des plateaux de Constantine (Niox, 2005). L'ensemble affluent à l'Oued Bou Hamdane et par conséquent finissent dans Oued Seybouse.

Les caractéristiques physiques et morphométriques selon une étude réalisée par la direction de l'hydraulique de la wilaya de Guelma sont comme suit :

La surface du bassin	= 592.15 km ²
Longueur de l'Oued	= 41.30 km
Longueur du rectangle équivalent ; "Lr"	= 1.36.2 km
Périmètre ; "P"	= 110 km
Longueur du talweg principal, " Lp"	= 45.5 km

L'indice de pente du bassin versant ; "Ip"	= 0.12%
Densité de drainage ; "Dd"	= 0.74 km/km ²
La pente de talweg le plus long ; "T"	= 0.81%
Les altitudes : "H max"	= 1266 m
"H min"	= 516 m
"H moy"	= 928 m (DHOZ, 2008)

Le grand problème de l'Oued-Zénati c'est qu'il est un cloaque à ciel ouvert. Sa position le rend le seul déversoir de tous les rejets, de la ville et de l'hôpital. Il est aussi une décharge publique ouverte utilisée par les habitants à proximité de son lit (Fig. 09). Ses eaux sont utilisées pour l'irrigation à grand échelle tout le long de sa Vallée (Fig. 09). Ainsi il est considéré comme une source de pollution et de maladies à transmission hydrique (bactériennes et parasitaires) et représente donc une plaie qui devrait être soignée (Bouchaâla, 2010).



Fig. 09 : Photos présentant la situation de l'Oued-Zénati (22/04/2010)

II. Matériel et méthodes :

II.1. Matériel expérimental :

Tab.02 : Matériel expérimental utilisé :

Appareilles	Objets	Milieux de culture et réactifs
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Four Pasteur, ➤ Autoclave, ➤ Etuve, ➤ Bec benzène, ➤ Centrifugeuse, ➤ Microscope optique, 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Loupe binoculaire, ➤ Micropipette, ➤ Anse de platine, ➤ Pince, ➤ Râteau ou un écouvillon, ➤ Tubes à essais de 30 ml, ➤ Boîtes de Pétri, ➤ Pipette pasteur, ➤ Lame, ➤ Distributeur d'antibiotiques, 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Les milieux gélosés : <ul style="list-style-type: none"> ✓ Gélose nutritif, ✓ Gélose Chapman, ✓ Gélose Mac Conkey, ✓ Gélose Muller -Hinton, ✓ Milieu TSI, ✓ Citrate de Simmons, ✓ Milieu Mannitol – Mobilité, ✓ Eau peptonée exempte d'indole. ➤ Bouillon nutritif, ➤ Bouillon nitraté, ➤ L'eau distillée stérile, ➤ Le sang (O positif), ➤ Les disques d'antibiotiques, ➤ Les disques d'oxydases, ➤ Les disques d'ONPG, ➤ L'API 20 E, ➤ Violet de Gentiane, Lugol, Ethanol, Fuchsine, ➤ Anticoagulase (Oxalate de sodium), ➤ L'huile de vaseline, ➤ Réactifs de: TDA, Kovacks, VP I et VP II, Nitrite I et Nitrite II

II.2. Points de prélèvements :

En raison de la complexité du lit de l'Oued-Zénati, de la multiplicité et de la diversité des rejets déversés dans ce dernier, il nous a été très difficile de faire un choix judicieux des points de prélèvements. De ce fait, trois points de prélèvement ont été aléatoirement choisis :

- ✓ Un premier pris comme témoins est réalisé avant l'entrée de la ville d'Oued-Zénati.
- ✓ Le deuxième est choisi après 1 km de l'entrée du cours d'eau à la ville (sortie de quelques effluents).
- ✓ Le dernier est réalisé juste à la sortie de la ville d'Oued-Zénati, où se collecte la somme de rejets urbains et hospitaliers.

II.3. Echantillonnage :

Deux campagnes de prélèvement, pour chaque site, ont été effectuées pendant les mois d'avril et de mai 2010. Ils sont réalisés, dans la même journée, de l'amont à l'aval à partir de 8 h du matin jusqu'à 10 h 30 min.

• Prélèvement pour les analyses bactériologiques :

Les échantillons ont été prélevés à l'aide des flacons en verre pyrex munis de bouchons à vis, stériles (Derwich *et al.*, 2008). Le flacon débouché et immergé complètement à une profondeur de 30 cm en position verticale renversée en le tenant par le fond, il est alors retourné jusqu'à ce que l'ouverture soit légèrement plus haute que le fond et dirigée dans le sens contraire du courant. Après le prélèvement, les flacons doivent être soigneusement rebouchés. De toutes façons, il faut éviter de heurter les rives, le fond, la proximité de la surface (Guiraud, 1998).

• Transport et conservation :

La teneur initial en germes des eaux risque de subir des modifications dans le flacon, après le prélèvement. C'est pour cela toutes analyses doit être effectuées le plus rapidement possible. Ainsi Il est admis que le délai maximum entre le prélèvement et le début de l'analyse ne doit excéder 24 heures (de préférence après une heure). L'échantillon étant maintenu à moins de 4°C (Rodier, 1984).

II.4. Les analyses bactériologiques effectuées :

II.4.1. Recherche bactériologique :

A. Isolement des bactéries (Méthode d'ensemencement sur gélose) :

Pour chercher et identifier les bactéries à partir de la solution mère (l'échantillon) nous avons utilisés la technique d'isolement par strie sur géloses coulées dans des boites de Pétri [9]. Les géloses employées sont :

✓ La gélose Nutritive (GN) :

C'est un milieu non sélectif utilisé pour l'observation macroscopique des différentes colonies de la semence. Toutes les colonies se développant hors des stries d'isolements seraient une contamination possible [9].

✓ Milieu de Chapman :

C'est un milieu sélectif, surtout utilisé en microbiologie médicale, permettant la croissance des germes halophiles (Gram+). Parmi ces germes figurent au premier rang les bactéries du genre *Staphylococcus*, mais aussi les *Micrococcus*, les *Enterococcus*, les *Bacillus*, et de rares bactéries à Gram négatif [25].

✓ Milieu de Mac Conkey :

C'est un milieu sélectif pour l'isolement des bacilles Gram⁻ *Salmonella* et *Shigella* ainsi que des bactéries coliformes dans les eaux, les produits alimentaires, les produits pharmaceutiques et biologiques [25].

L'inoculum a été prélevé directement à partir de l'eau à analyser et déposé sur un point périphérique de la gélose puis disséminé par stries sur toute la surface. Les boites sont codées puis incubées à 37°C pendant 24 - 48 heures (Fig. 13).

B. Etude culturelle :

Après 24h les colonies se développent et nous pouvons les différencier par :

- ✓ L'odeur.
- ✓ La couleur.
- ✓ Le contour.
- ✓ Le diamètre.
- ✓ L'élévation.

C. Examen microscopique:**C.1. Coloration de Gram :**

La coloration de Gram doit son nom au bactériologiste danois Hans Christian Gram qui mis-au point le protocole en 1884. C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. Son avantage est de donner une information rapide sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu tant sur le type que sur la forme [12].

C.1.1. Les étapes :**✓ Réalisation du frottis :**

Elle nécessite d'avoir un frottis fixé, soit par l'alcool durant 5 minutes (et rinçage à l'eau), soit plus classiquement en effectuant une fixation simple à l'eau et à la flamme selon les indications suivantes : sur une lame, déposer une goutte d'eau stérile. Ajouter à l'anse de platine stérilisée une goutte de la colonie isolée. Étaler et fixer à la chaleur à environ 40°C pendant 10 à 15 minutes. Poser la lame séchée sur le portoir reposant sur un bac de coloration [12].

✓ Réalisation de la coloration :

La lame est plongée dans un premier colorant : Le violet de Gentiane (ou un produit proche, le cristal violet). Le violet de Gentiane est un colorant puissant (toxique et cancérigène). Il va traverser les parois et les membranes des bactéries et se fixer dans leurs cytoplasmes. Ainsi à cette étape toutes les cellules sont colorées en violet.

La lame est ensuite traitée au Lugol iodo-ioduré en solution qui sert de mordant ; il va renforcer le violet de Gentiane contenu dans le cytoplasme des bactéries.

On chasse ensuite le violet avec une solution d'éthanol à 90°. Cette étape est cruciale car elle détermine quelle bactérie en Gram négatif d'autres en Gram positif selon le principe suivant : les bactéries Gram positif possèdent une paroi riche en peptidoglycane, composant qui empêche l'alcool d'emporter le violet de Gentiane, celui-ci restant dans le cytoplasme. La bactérie n'est donc pas décolorée. Le traitement du frottis avec un deuxième colorant, la Fuschine de couleur rose, celle-ci traverse la paroi de toutes les bactéries et colore le cytoplasme en rose [26].

Les bactéries violettes resteront violettes, car la couleur de la Fuschine n'est pas assez forte pour remplacer la couleur violette.

Les bactéries dont le cytoplasme a été décoloré par l'alcool vont elles être colorées par la Fuschine et elle apparaît en rose [27].

✓ Observation au microscope à immersion :

Les bactéries Gram (+) sont colorées en violet, par contre les Gram (-) en rose (Mamadou, 2005).

✚ Les bactéries Gram-positives :

Les parois des bactéries Gram-positives sont constituées d'une seule couche de peptidoglycane épaisse de 20-80 nanomètres d'épaisseur (Fig. 14). Le peptidoglycane est un énorme polymère contenant deux dérivés de sucre (la N-acétylglucosamine et l'acide N-acétylmuramique) et plusieurs acide aminés (D-glutamique, D-alanine). Ces parois contiennent aussi une grande quantité d'acide teichoïque qui est relié soit au peptidoglycane ou à la membrane plasmique (Prescott *et al.*, 2003), dans ce dernier cas, ils s'appellent des acides lipoteichoïque. Les acides teichoïques peuvent atteindre la surface et confèrent à la cellule une charge négative (Mamadou, 2005).

✚ Les bactéries Gram-négatives :

Les parois des bactéries Gram-négatives sont plus complexes (Fig. 15) en effet, elles sont constituées d'une fine couche de peptidoglycane de 2-7 nanomètres d'épaisseur et d'une membrane externe de 7-8 nanomètres (Prescott *et al.*, 2003).

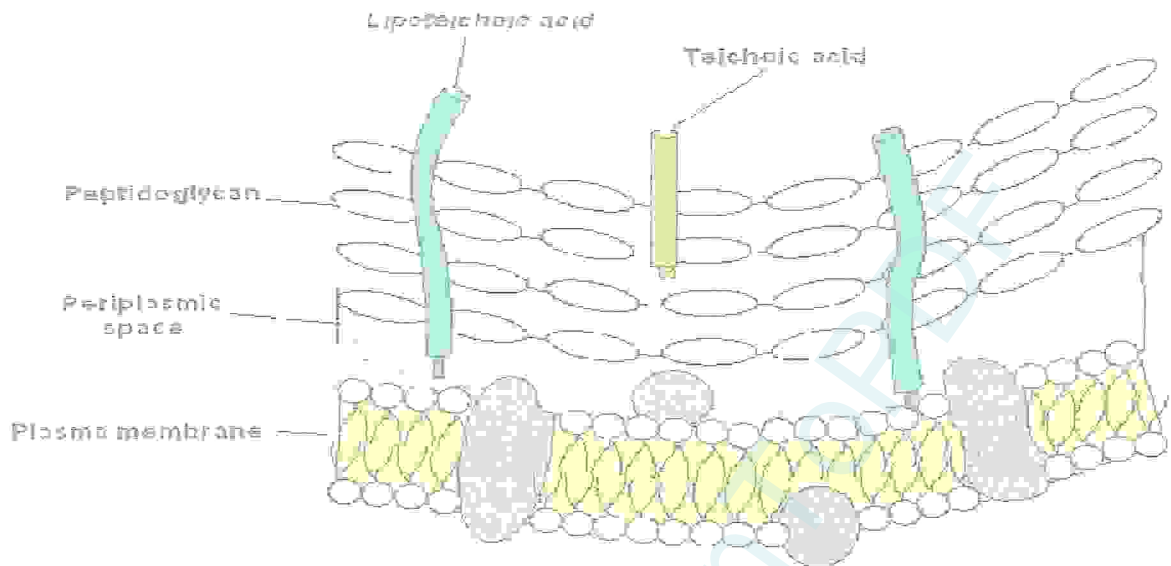


Fig. 14 : La paroi des bactéries Gram-positives [28]

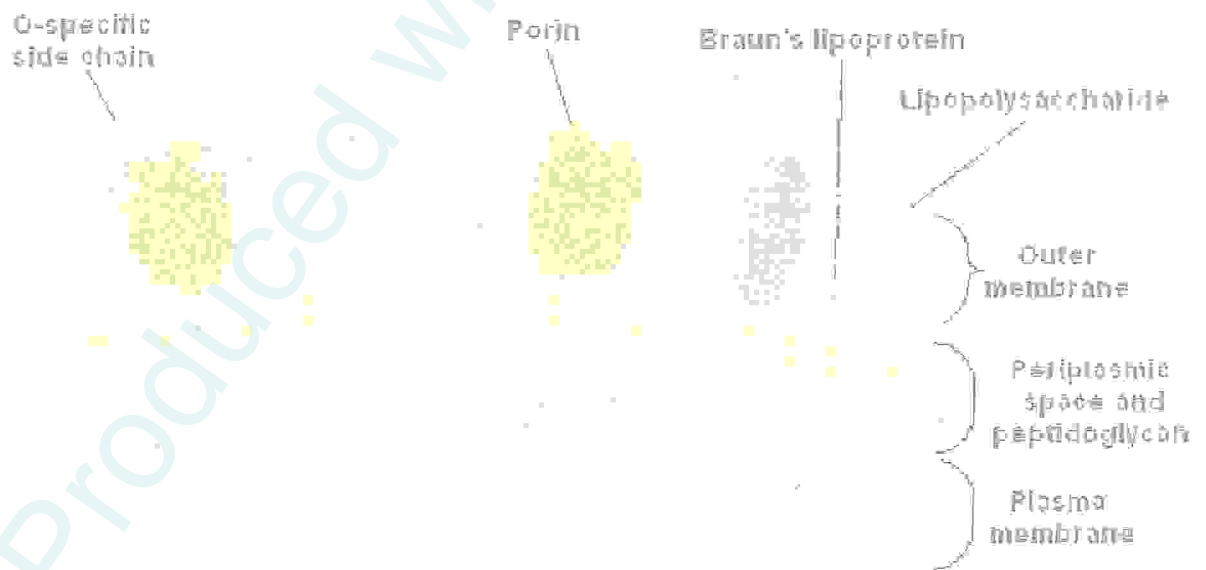


Fig. 15 : La paroi des bactéries Gram-négatives [28]

D. Identification biochimique :**D.1. Réalisation d'une galerie biochimique classique :**

L'identification et la classification des espèces, sont basées essentiellement sur l'étude des caractères suivants :

- Milieu Mannitol – Mobilité.
- Milieu TSI (Triple Sugar Iron Agar).
- Milieu au Citrate de Simmons.
- Recherche des VP – RM.
- Recherche de la Nitrate réductase.
- Eau Peptonée exempte d'indole.

• Milieu Mannitol-Mobilité :**➤ But :**

Ce milieu permet d'étudier :

- L'utilisation du mannitol (la fermentation).
- La mise en évidence de la mobilité.

La mise en évidence de ces caractères peut être un outil précieux pour discriminer les bactéries entre elles, donc un outil utile pour l'identification bactérienne.

Exemple : le milieu est utilisé dans l'identification de la famille des *Entérobactérieae* [29].

➤ Technique :

Ensemencer les tubes par piqûre centrale dans la gélose en culot avec les souches à tester.

Incuber à 37°C pendant 24 heures [7].

➤ Lecture :

La mobilité se caractérise par une migration des bactéries de la piqûre centrale vers le reste du milieu entraînant ainsi une turbidité.

La fermentation du mannitol se traduit par le virage de la couleur rouge du milieu au jaune [7].

• Milieu TSI (Triple Sugar Iron Agar) :

Le but de ce test est de mettre en évidence cinq caractères :

- ✓ Fermentation du Glucose.
- ✓ Fermentation du Lactose.
- ✓ Fermentation du Saccharose.
- ✓ Production de Gaz.
- ✓ Production d'H₂S (Lebres, 2004).

Le milieu de TSI est un milieu gélosé contenant du glucose, du lactose, du saccharose, de la peptone, un sel de fer et un indicateur de pH, le rouge de phénol. Ce milieu est reparti en tubes à essai sous forme semi-inclinée avec un haut culot et une petite tranche. Il est ensemencé par piqûre profonde du culot au fil droit et par ensemencement en stries de la tranche.

Après une période de 24 h à 37°C le milieu est examiné.

Dans le culot, l'anaérobiose relative favorise l'utilisation du glucose qui entraîne une acidification et le virage au jaune de l'indicateur. Sur la tranche l'aérobiose favorise l'utilisation du lactose qui entraîne le virage au jaune de l'indicateur. L'acidification due au glucose, qui est en faible quantité, est neutralisée rapidement à ce niveau par l'alcalinisation provenant de la dégradation des peptones. L'acidification de la tranche indique donc bien l'utilisation du lactose. L'apparition des bulles dans le culot traduit la production du gaz, un noircissement dû à la formation du sulfure de fer traduit celle de H₂S. Ce milieu sert aussi à la pratique des réactions à la β-galactosidase et la LDC (lysine décarboxylase). Ce milieu permet de différencier les *Salmonella* des *Shigella* [lactose(-), saccharose (-)] de la plupart des autres Entérobactéries (Guiraud, 1998).

- **Milieu au Citrate de Simmons :**

- **Principe :**

Certaines bactéries sont capables d'assimiler le citrate, autrement dit capables d'utiliser le citrate comme unique source de carbone et d'énergie. Ces bactéries possèdent un citrate perméase et les enzymes du catabolisme du citrate. De telles bactéries sont capables de croître sur un milieu synthétique, le milieu de citrate de Simmons, dont l'unique source de carbone est le citrate de sodium. Ce milieu contient également des sels d'ammonium comme unique source d'azote et du bleu de bromothymol comme indicateur de pH. Initialement, le pH du milieu est de 7 et à un tel pH, le bleu de bromothymol a une teinte verte. La croissance sur le milieu au citrate de Simmons s'accompagne généralement d'une alcalinisation provoquant le virage au bleu (bleu outre-mer) du bleu de bromothymol [6].

➤ **Technique :**

Ensemencer en surface le milieu au citrate de Simmons à partir d'une culture prélevée sur un milieu gélosé. Incuber à 37 °C pendant 24 heures.

➤ **Lecture :**

La majorité des auteurs considère qu'une bactérie est citrate positive lorsqu'elle utilise le citrate en provoquant une alcalinisation du milieu.

Présence d'une coloration bleue (même localisée uniquement en surface) : réaction positive.

La présence d'une coloration verte dans tout le milieu est considérée comme réaction négative (même en présence d'une culture) [6].

• **Recherche des VP – RM :**

✓ **Test au rouge de méthyle (RM) - Réaction de Voges-Proskauer (VP) :**

➤ **Principe :**

La mise en évidence des voies fermentaires est d'une grande utilité pour le diagnostic des micro-organismes. Beaucoup de bactéries empruntent la voie dite des acides mixtes, abaissant ainsi le pH vers 4,5 à 5 et certaines bactéries VP(+) empruntent surtout la voie dite du butylène glycol (Lebres, 2004).

La réaction de Voges-Proskauer (VP) permet l'étude des dérivés de l'acide pyruvique. Le glucose, utilisé par les bactéries, est dégradé en acide pyruvique qui est un intermédiaire clef du métabolisme des glucides. Selon les bactéries, l'acide pyruvique peut être complètement oxydé ou être le point de départ de diverses voies fermentaires conduisant à une très grande variété de composants finaux dont la nature est caractéristique du type fermentaire :

✓ La fermentation acide mixte conduit à la production d'acide formique, d'acide acétique, d'acide lactique, d'acide propionique, d'acide succinique, de dioxyde de carbone, d'hydrogène, d'éthanol, etc.

✓ La fermentation acide mixte provoque une acidification importante d'un milieu glucosé (Lebres, 2004).

La fermentation acide mixte est étudiée par le test au rouge de méthyle. La fermentation butylène glycolique (butanediolique) conduit à la production de 2-3-butanediol. La suite des réactions conduisant au 2-3-butanediol est la suivante :

1. Condensation de deux molécules de pyruvate avec décarboxylation et formation d'acide alpha-acétolactique ;
2. Décarboxylation de l'alpha-acétolactate et formation d'acétoïne (hydroxy-3-butanone) ;
3. Réduction de l'acétoïne en 2-3 butanediol.

Le test VP permet de caractériser l'acétoïne. En présence d'oxygène et d'une base forte, l'acétoïne est oxydée en diacétyle qui forme un complexe coloré en rose en réagissant avec une fonction amine d'un groupement guanidyle des protéines. La réaction est plus sensible et plus rapide en présence d'alpha-naphtol [6].

Cependant le RM est employé depuis 1915 par Clarck et Lubs comme indicateur de pH (rouge au dessus de 4.8 et jaune au dessus de 6.3) dans un milieu de culture glucosé pour différencier parmi les Entérobactéries. Les forts producteurs d'acide (RM^+) des faibles producteurs (RM^-).

Ce test, qui complète le précédent, permet de distinguer les Entérobactéries à fermentation butanediolique (RM^-) de celles qui ont simplement une fermentation acide mixte (RM^+) (Boukrouma, 2008).

➤ **Technique :**

Ensemencer un milieu de Clark et Lubs (peptone, phosphate bipotassique, glucose, pH 7,5). Incuber 48 heures à 37 °C.

Prélever 1 ml de milieu et ajouter 0,5 ml d'Alpha-naphtol (VPI) et 0,5 ml Hydroxyde de potassium (VPII).

Prélever ainsi 1 à 2 ml de culture en milieu Clark et Lubs dans un autre tube stérile et ajouté le réactif de RM.

➤ **Lecture :**

Attendre un temps maximum de 10-15 minutes.

✓ **Pour la réaction de VP :**

- ❖ La présence d'acétoïne (VP positive) se traduit par une coloration rose en surface mais pouvant diffuser dans tout le milieu.
- ❖ Milieu reste incolore VP (-).

✓ **Pour RM :**

- ❖ Coloration rouge réaction (+).

❖ Coloration jaune réaction (-) [6].

• **Recherche de la Nitrate réductase :**

Le bouillon nitraté est un bouillon de culture donnant la possibilité la recherche de l'utilisation de l'ion nitrate par certains micro-organismes, surtout par respiration nitrate [30].

➤ **Principe :**

Certaines bactéries peuvent utiliser comme accepteur final d'électrons des composés minéraux riches en oxygène (respiration anaérobie). C'est le cas particulier des nitrates qui sont alors réduits en nitrites. La réduction peut aller au-delà du stade nitrites et conduit à la formation d'azote gazeux (N_2).

La recherche d'une nitrate-réductase se fait par la mise en évidence des nitrites formés. Les nitrites en milieu acétique ou sulfurique donnent une coloration rose ou rouge en présence d'acide parasulfanilique et d'alpha-naphtylamine. Toutefois, comme certaines bactéries réduisent les nitrates au-delà du stade nitrites, toute réaction apparaissant négative (absence de coloration rose ou rouge) doit être contrôlée pour constater la présence ou la disparition des nitrates contenus à l'origine dans le milieu. Dans ce but, on ajoute au milieu de la poudre de zinc. Le zinc est un agent réducteur capable de réduire en quelques minutes les nitrates en nitrites.

Si la réaction est véritablement négative, les nitrates toujours présents dans le milieu sont réduits en nitrites sous l'action du zinc et une coloration rose ou rouge apparaît.

Si la réaction est faussement négative, les nitrates ont été réduits par les bactéries en azote gazeux.

Le milieu ne contient plus de nitrates et lorsque la poudre de zinc est ajoutée, la teinte du milieu n'est pas modifiée [6].

➤ **Technique :**

Cultiver la bactérie dans un bouillon nitraté.

Incuber à 37 °C jusqu'à l'obtention d'une culture abondante.

Ajouter une ou deux gouttes d'acide parasulfanilique en milieu acétique (réactif NIT 1) puis une à deux gouttes d'alpha-naphtylamine en milieu acétique (réactif NIT 2).

Agiter et faire la lecture immédiatement [7].

➤ **Lecture et interprétation des résultats :**

Tab 03: Lecture et interprétation des résultats de test de nitrate réductase [31]

1 ^{ère} observation	Interprétation et résultats	
Coloration rouge	Présence de nitrites	souche NR+
Incolore	Ajouter une pointe de spatule de poudre de zinc (le zinc réduit les nitrates en nitrites)	<p>Coloration rose :</p> <p>Le zinc a réduit les nitrates en nitrites qui font virer le milieu au rose en présence des 2 réactifs NR -</p> <p>Pas de coloration :</p> <p>La souche a réduit les nitrates au delà du stade nitrites ; elle est NR +</p>

• **Eau Peptonée exempte d'indole :**

L'eau Peptonée exempte d'indole permet la culture des germes ne présentant pas d'exigences particulières. Ce milieu est surtout employé au cours du test de Mackenzie pour l'identification d'*Escherichia coli* par la production d'indole.

➤ **Principes :**

En aérobiose, *Escherichia coli* dégrade le tryptophane en indole par l'intermédiaire d'une tryptophanase. L'indole produit est révélé par le réactif de Kowacks.

➤ **Technique :**

Pour l'identification d'*Escherichia coli* par le test de Mackenzie, cultiver la bactérie dans un tube d'eau Peptonée exempte d'indole pendant 24 heures à 37°C.

➤ **Lecture :**

Après incubation des tubes inoculés, la présence d'indole est indiquée par l'apparition d'une couleur rouge dans la phase alcoolique du réactif de Kowacks, ajouté à raison de 0,5 ml par tube.

D.2. Les tests complémentaires :

- Recherche de l'ONPG.
- Recherche de la coagulase.
- Recherche de l'Oxydase.

• Recherche de l'ONPG (Orthonitrophényl-bêta-D-galactopyranoside) :

➤ Principe :

Pour que le lactose soit utilisé par les bactéries, il doit être scindé par des enzymes intracellulaires, les bêta-galactosidases. Ces enzymes sont spécifiques de la liaison bêta-1,4-osidique et elles hydrolysent le lactose en glucose et galactose. Pour qu'une bactérie utilise le lactose, il faut que le lactose puisse pénétrer dans la cellule. Cette pénétration nécessite une autre enzyme, la bêta-galactoside perméase. Si cette enzyme est déficiente ou absente, une bactérie potentiellement capable d'utiliser le lactose (possédant une bêta-galactosidase) ne pourra exprimer ce caractère et paraîtra lactose négative.

L'objectif du test ONPG est d'étudier l'existence d'une bêta-galactosidase (et donc la possibilité d'acidifier le lactose), indépendamment de la présence ou de l'absence d'une bêta-galactoside perméase. La lecture est alors très rapide et on dispose ainsi d'une réaction complémentaire pour l'étude des germes apparaissant lactose négative après 24 à 48 heures d'incubation.

La bêta-galactosidase libérée de la cellule bactérienne (lyse théoriquement provoquée par le toluène) va agir sur un galactose substitué, l'orthonitrophényl-bêta-D-galactopyranoside ou ONPG. L'hydrolyse de l'ONPG libère de l'orthonitrophénol qui présente une coloration jaune très stable [6].

➤ Technique :

Réaliser une suspension du germe à étudier dans de l'eau physiologique contenant un disque d'ONPG. Incuber à 37 °C pendant 24 heures.

➤ Lecture :

- ❖ Apparition d'une coloration jaune : bactérie ONPG positive.
- ❖ Absence de coloration : bactérie ONPG négative [6].

➤ Remarque :

Toutes les bactéries possédant une bêta-galactosidase présentent un test ONPG positif. Toutefois, certaines bactéries dépourvues de bêta-galactosidase peuvent hydrolyser l'ONPG grâce à une autre enzyme appelée ONPG ase. La dénomination de "test ONPG" est donc plus correcte que la dénomination de "recherche de la bêta-galactosidase" ([6] ; [7]).

• Recherche de la coagulase :

➤ Principe :

Le principe de ce test est simple. Nous mettons en contact du plasma oxalé, incapable de se coaguler seul, avec le germe étudié. Si le fibrinogène, soluble dans le plasma, se transforme en fibrine solide, un caillot se formera au fond du tube.

Nous pouvons également réaliser ce test par une agglutination sur lame : Sur une lame propre et sèche, nous mettons en contact une goutte de plasma sanguin oxalé avec une goutte de bouillon ensemencé par le germe étudié (ou 1 colonie). Si le germe possède le récepteur au fibrinogène, il y' aura une agglutination visible à l'œil nu [5].

➤ Technique :

Dans un tube à hémolyse stérile:

- ✓ verser 0.5 ml de plasma oxalé.
- ✓ Introduire, Avec une pipette Pasteur, le germe à tester.
- ✓ Homogénéiser et incuber à 35 - 37 °C [5].

Si le test est effectué sur lame, il faut également vérifier le non autoagglutination de bouillon ou de la colonie testé [5].

➤ Lecture :

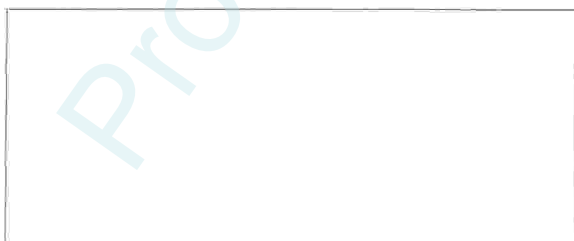


Fig.16: Coagulase négatif [32]

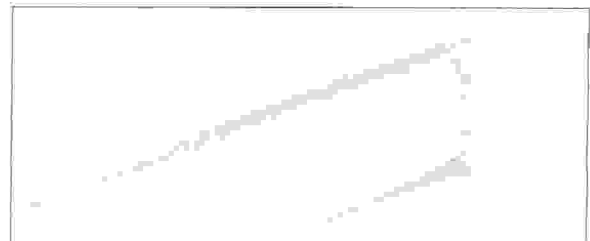


Fig.17: Coagulase positif [32]

- **Recherche de l'oxydase :**

La recherche de l'oxydase est un des critères les plus discriminatifs et les plus employés pour l'identification des bactéries, surtout celle des bacilles à Gram négatif. Cette recherche consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée à oxyder la forme réduite incolore de dérivés méthylés du paraphénylène diamine (PDA), en leur forme oxydée semi-quinonique rose violacé [32].

- **Technique :**

Nous utilisons le réactif de chlorhydrate ou le PDA, nous l'utilisons généralement avec des disques imprégnés de ce réactif (disques d'oxydases). Sur une lame, nous plaçons un disque imprégné du réactif, nous déposons ensuite, avec une pipette Pasteur une colonie. L'apparition d'une tache violette au bout de 30 secondes, signifié que la bactérie est oxydase+ et qu'elle possède le cytochrome oxydase. Et s'il n'y a rien qui apparaît ça veut dire que la bactérie est oxydase- et qu'elle ne possède pas l'enzyme respiratoire (cytochrome oxydase) [14].

D.3. Inoculation de la galerie API 20 E:

La galerie API 20E comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs. La lecture des réactions et l'identification se font à l'aide des tableaux de lecture et d'identification [28].

- **Technique :**

- ✓ **Préparation de la galerie :**

Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

- ✓ **Préparation de l'inoculum :**

Faire une suspension bactérienne, dans une ampoule de Suspension Medium ou dans un tube d'eau distillée stérile, d'opacité légère avec une seule colonie prélevée sur un milieu gélosé.

✓ Inoculation de la galerie :

- ❖ Lorsque le sigle du test est encadré, ce qui est le cas des tests CIT, VP et GEL, la suspension doit remplir le tube et la cupule.
- ❖ Lorsque que le sigle du test est souligné (ADH, LDC, ODC, URE, H2S), la suspension doit remplir uniquement le tube. Après ensemencement complet de la galerie, la cupule sera secondairement remplie d'huile de paraffine.
- ❖ Lorsque le sigle du test n'est ni encadré ni souligné (ONPG, TDA, IND, GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA), la suspension doit remplir uniquement le tube (Tab. 04).

Refermer la boîte d'incubation, écrire les références du prélèvement sur la languette du fond de la boîte et placer la boîte à 37°C durant 24 h [28].

➤ Lecture :

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture.

Réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs :

- ✓ TDA : ajouter une goutte du réactif TDA.
- ✓ IND : ajouter une goutte du réactif de Kowacks.
- ✓ VP : ajouter une goutte du réactif VP I et une goutte du réactif VP II
- ✓ Nitrate réductase : après avoir noté le résultat obtenu pour l'acidification du glucose, ajouter une goutte du réactif NIT 1 et une goutte du réactif NIT 2. Si aucune coloration rouge n'est obtenue (attendre deux à trois minutes), ajouter une petite quantité de poudre de zinc (Tab. 04) [28].

✓ Identification :

Chercher le germe, dans le tableau sur la fiche guide, qui correspond au code obtenu sur la fiche des réactions.

E. Antibiogramme :

L'antibiogramme est un test qui permet de mesurer la capacité d'un antibiotique à inhiber la croissance bactérienne *in vitro*. Il renseigne, par conséquent, sur la sensibilité des germes vis-à-vis des agents anti-infectieux. En plus de l'aide à la décision thérapeutique qu'il apporte, l'antibiogramme permet la surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne aux antibiotiques. Il oriente également l'identification bactérienne grâce aux phénotypes de résistance naturelle [2].

E.1. Les étapes :

✓ La réalisation d'une suspension bactérienne :

- Disposer de colonies pures sur un milieu de culture.
- Mettre stérilement de l'eau physiologique dans un tube à hémolyse.
- Prélever les colonies pures et les mettre en suspension [33].

✓ Préparation de la gélose :

- ❖ Prendre la gélose de Muller-Hinton, vérifier l'absence d'eau à la surface ; si il y en a, laisser sécher.
- ❖ Annoter où seront positionnés les disques d'antibiotiques sur le fond de la boîte (Il faut les éloigner de 1 cm du bord minimum).
- ❖ Diviser la boîte autant de fois (maximum 5 pour une boîte de 10 cm, ou 12 pour une boîte de 15 cm) que vous avez d'antibiotiques.
- ❖ Ensemencer la gélose par 1 ml de suspension.
- ❖ Etaler le volume avec le râteau du centre vers les bords; ou tremper l'écouvillon dans la suspension, enlever l'excès d'inoculum par pression sur les bords du tube ; écouvillonner régulièrement la gélose en tournant la plaque de 60° jusqu'à ensemencement de la totalité de la surface.
- ❖ Laisser sécher de 3 à 5 minutes.
- ❖ Déposer les disques d'antibiotiques.
- ❖ Incuber 16 à 18 h, à 37°C (au maximum 24 h) [2].

✓ **Lecture des résultats :**

Mesurer les diamètres des auréoles (zones d'inhibition de croissance de la souche microbienne).

Pour chaque souche microbienne, la sensibilité ou la résistance à un antibiotique est différente. Elle fait appel aux notions de concentration critique inférieure (c) et de concentration critique supérieure (C).

c : dose minimale d'antibiotique qu'un malade peut recevoir sans dangers et qui fait effet sur la souche bactérienne.

C : dose maximale d'antibiotique qu'un malade peut recevoir sans dangers et qui fait effet sur la souche bactérienne.

Pour chaque couple bactérie-antibiotique, on détermine une concentration minimale inhibitrice (ou concentration minimale inhibitrice, ou CMI). La CMI est la plus petite concentration d'antibiotique qui inhibe toute croissance visible. En comparant la CMI aux concentrations critiques, on détermine la sensibilité ou la résistance de la bactérie à l'antibiotique.

- ❖ **La bactérie est sensible** à l'antibiotique quand la CMI est inférieure à la concentration critique inférieure.
- ❖ **La bactérie est résistante** à l'antibiotique quand la CMI est supérieure à la concentration critique supérieure.
- ❖ **La bactérie est intermédiaire** à l'antibiotique quand la CMI est comprise entre les deux concentrations critiques [33].

Produced with ScanTopDF

CHAPITR IV : RESULTATS ET DISCUSSION

I. RESULTATS ET DISCUSSION :

I.1. Résultats de l'ensemencement :

Tab. 05. Résultats de l'ensemencement des milieux de culture utilisés (après 24 heures d'incubation)

Mois de prélèvement	Milieu de culture sites	Gélose nutritive	Mac Conkey	Chapman
Avril	Site I	+	+	+
	Site II	+	+	+
	Site III	+	+	+
Mai	Site I	+	+	-
	Site II	+	+	-
	Site III	+	+	+

(+) : Culture positive ; (-) : Culture négative.

Remarque : pour les cultures sur le milieu de Chapman des sites I et II (mois d'avril) après 24 h, nous n'avons trouvé aucune pousse de bactéries, la culture est alors laissée pendant 48 h.

Ainsi, ce tableau montre que la gélose nutritive a permis la prolifération des bactéries pour l'ensemble des sites de prélèvement (milieu non sélectif), alors que le milieu Mac-Conkey est marqué par la présence de quelques colonies, pour l'ensemble des sites et pour les deux mois, ses colonies sont toutes des bactéries Gram négatif. Dans le milieu Chapman, la prolifération des bactéries n'est notée que durant le mois d'avril dans les trois sites.

I.2. Observation macroscopique :

Tab. 06. Résultats de l'observation macroscopique des colonies après une culture sur un milieu Mac-Conkey

Mois	Sites		Colonies	Odeur	Couleur	Contour	Diamètre	Élévation
	Caractère							
Avril	Mc I	Colonie N°:01	Fermentation	transparente	Régulière - Smooth- (S)	2mm	plate	
		Colonie N°:02	Fermentation	Colonies à centre rouge	S	2mm	bombée	
	Mc II	Colonie N°: 01	Fermentation	transparente	S	1-2mm	plate	
		Colonie N°:02	Fermentation	Colonie à centre rouge	S	1-2mm	bombée	
	Mc III	Colonie N°:01	Fermentation	transparente	S	1-3mm	plate	
		Colonie N°:02	Fermentation	Colonie à centre rouge	S	1-3mm	bombée	
Mai	Mc I	Colonie N°:01	Fermentation	orangée	S	1-3mm	bombée	
		Colonie N°:02	Fermentation	transparente	S	1-3mm	bombée	
	Mc II	Colonie N°:01	Fermentation	orangée	S	1-3mm	bombée	
		Colonie N°:02	Fermentation	transparente	S	1-3mm	bombée	
	Mc III	colonie	Fermentation	orangée	S	1-3mm	bombée	

Les résultats nous montrent que la majorité des bactéries ont un contour régulier (smooth), avec un diamètre compris entre 1 et 3 mm. Toutes les cellules sont soit transparentes, rouges ou orangées. La dominance des colonies de couleur transparent est très nette. Aussi, presque la totalité des bactéries observées se caractérisent par une élévation bombée (72%) et pour le reste elle est plate. Toutes les bactéries de culture donnent une odeur de fermentation.

Tab. 07. Résultats de l'observation macroscopique des colonies après une culture sur un milieu de Chapman

mois	Sites	Odeur	Couleur	Contour	Diamètre	Elévation
	Caractère					
Avril	Ch I	Fermentation	transparente	Régulière - Smooth-(S)	01mm	plate
	Ch II	Fermentation	jaune	S	01mm	plate
	Ch III	Fermentation	transparente	S	01mm	plate

Le tableau nous montre que toutes les colonies observées sur le milieu Chapman sont plates avec un diamètre de 1mm et un contour régulier. La couleur est soit transparente soit jaune. Une odeur de fermentation caractérise tous les colonies.

I.3. Examen microscopique après coloration de Gram :

Pour toutes les cultures positives, nous avons réalisé des colorations différentielles de Gram où nous avons obtenues seulement deux types de cellules bactériennes.

Tab.08. Résultats de l'examen microscopique après coloration de Gram

Prélèvement	Site	Gélose nutritive	Mac Conkey	Chapman
	Milieu			
1 ^{ier} prélèvement	N° :01	/	Bâtonnet court de couleur rose	Cocci de couleur violette
	N° :02	/	Bâtonnet court de couleur rose	Cocci de couleur violette
	N° : 03	/	Bâtonnet court de couleur rose	Cocci de couleur violette
2 ^{ème} prélèvement	N° :01	/	Bâtonnet court de couleur rose	/
	N° :02	/	Bâtonnet court de couleur rose	/
	N° :03	/	Bâtonnet court de couleur rose	/

/ : Analyse non effectuée.

Sur le milieu Chapman, nous avons obtenu des bactéries cocci regroupés soit en diplocoque soit en chaînette ou en amas avec une couleur violette indiquant des *Streptocoques* ou des *Staphylocoques*.

Sur le milieu Mac conkey, nous avons obtenu des bactéries bâtonnets avec une couleur rose qui sont généralement des *Entérobactéries* (bacilles ou coccobacilles Gram négatif).

I.3.1. Résultats de la galerie biochimique classique et de la galerie API 20 E :

Tab. 09. Résultats de la galerie biochimique classique du mois d'avril

Milieu de Chapman	Test de Mannitol	Test de Coagulase	Espèce
Ch1	+	-	<i>Staphylococcus intermedius</i>
Ch2	+	+	<i>Staphylococcus aureus</i>
Ch3	+	-	<i>Staphylococcus intermedius</i>

(+) : Culture positive ; (-) : Culture négative.

Le genre *Staphylococcus aureus* possède des récepteurs au fibrinogène qui sont solubles, dans le plasma, se transforme en fibrine solide, un caillot se formera donc au fond du tube (résultat positive). Le genre *Staphylococcus intermedius* ne synthétise pas ces récepteurs (résultat négative).

Tab.10. Résultat de la galerie biochimique classique de mois de mai

Teste	Site I	
TSI	Glucose	+
	Saccharose	+
	Lactose	+
	H ₂ S	-
	CO ₂	+
Citrate Simmons	Citrate	-
Milieu Manitol Mobilité	Manitol	+
	Mobilité	+
Bouillon Clarck et Lubs	VP	-
	RM	+
Bouillon de nitrate	Nitrate réductase	+
Eau Peptonée exempte d'indole	Indole	+
Bactérie	<i>Escherichia coli</i>	

(+) : Résultat positive ; (-) : Résultat négative.

Tab.11. Résultat des tests biochimiques complémentaires:

Test	Site 1
ONPG	+
Oxydase	-

Tab. 12. Résultats de la galerie API 20 E

Mois	Milieu	Code	Espèce
Avril	Mc1	530.776.33	<i>Serratia liquefaciens</i>
	Mc2	330.457.33	<i>Enterobacter cloacae</i>
	Mc3	530.676.33	<i>Serratia liquefaciens</i>
Mai	Mc1	/	/
	Mc2	/	/
	Mc3	704.411.25	<i>Escherichia coli</i> 1

/ : Analyse non effectuée.

D'après les résultats des examens microscopiques (Tabs. 9, 10, 11 et 12) les principales espèces identifiées sont comme suit :

- *Staphylococcus intermedius*.
- *Staphylococcus aureus*.
- *Escherichia coli*.
- *Serratia liquefaciens*.
- *Enterobacter cloacae*.

I.3.2. Résultat de l'antibiogramme :

Tab. 13. Résultat de l'antibiogramme des principales espèces isolées de premier prélèvement (Avril)

Milieu de culture	Site de prélèvement : espèce		Sigle de l'antibiotique	Charge (mcg)	Zone d'inhibition (mm)	S	I	R
Mac Conkey	S1	<i>Serratia liquefaciens</i>	CIP	5	32	+		
			F	300	24	+		
			DA	2	06			+
			VA	30	06			+
			RA	5	08			+
			C	30	32	+		
	S2	<i>Enterobacter cloacae</i>	CIP	5	28	+		
			F	300	24	+		
			DA	2	06			+
			VA	30	06			+
			RA	5	06			+
			C	30	28	+		
	S3	<i>Serratia liquefaciens</i>	CIP	5	19			+
			F	300	18	+		
			DA	2	06			+
			VA	30	06			+
			RA	5	06			+
			C	30	24			+

Nous avons isolés *Serratia liquefaciens* à partir de site I, telle est sensible aux antibiotiques (CIP, F, C) et résistante aux VA, DA et RA, mais dans le 2^{ème} site cette espèce a disparue soit sous l'effet probable de la présence des substances toxiques rapportés par les rejets urbaines qui ont agit négativement sur sa croissance ou peut être due aux moyens utilisées dans notre études, n'ont pas été suffisantes pour l'identification d'un grand nombre d'espèce, de plus, nous avons marqué la présence d'une nouvelle espèce (*Enterobacter cloacae*) caractérisée aussi par une résistance vis-à-vis les antibiotiques: DA, VA, et RA. Dans le 3^{ème} site, la réapparition de l'espèce *Serratia liquefaciens* plus résistante aux antibiotiques où elle a été isolée une seconde fois. Cette espèce a développé une résistance vis-à-vis des CIP et C.

Tab. 14. Résultat de l'antibiogramme des principales espèces isolées de premier prélèvement (Avril)

Milieu de culture	Site de prélèvement : espèce		Sigle de l'antibiotique	Charge (mcg)	Zone d'inhibition (mm)	S	I	R
Chapman	S1	<i>Staphylococcus intermedius</i>	CIP	5	30	+		
			F	300	28	+		
			DA	2	24	+		
			VA	30	22	+		
			RA	5	28	+		
			C	30	38	+		
	S2	<i>Staphylococcus aureus</i>	CIP	5	28	+		
			F	300	12		+	
			DA	2	08			+
			VA	30	20	+		
			RA	5	16	+		
			C	30	14			+
	S3	<i>Staphylococcus intermedius</i>	CIP	5	22			+
			F	300	20	+		
			DA	2	12			+
			VA	30	16			+
			RA	5	08			+
			C	30	06			+

A partir du milieu de Chapman, dans le site I, nous avons identifié *Staphylococcus intermedius* qui présente une sensibilité vis-à-vis de tous les antibiotiques. Dans le site II, nous avons identifié une autre espèce *Staphylococcus aureus* qui est sensible aux CIP, VA et RA et résistante aux DA et C. Nous avons trouvé dans le dernier site la même espèce isolée du 1er site, soit *Staphylococcus intermedius* qui cette fois à développer une résistance vis-à-vis de la majorité des antibiotiques exceptions faite pour F.

Tab. 15. Résultat de l'antibiogramme des principales espèces isolées de deuxième prélèvement (mois de mai)

Milieu de culture	Site de prélèvement : espèce	Sigle de l'antibiotique	Charge (mcg)	Zone d'inhibition (mm)	S	I	R
Mac Conkey	<i>Escherichia coli</i> S1	NI	20	26	+		
		CN	30	16	+		
		PB	300	16	+		
		AN	30	30	+		
		AMX	25	06			+
		MTR	4	06			+
		SSS	200	22	+		
	<i>Escherichia coli</i> 1 S3	NI	20	08			+
		CN	30	06			+
		PB	300	16	+		
		AN	30	22	+		
		AMX	25	06			+
		MTR	4	06			+
		SSS	200	18	+		

L'espèce *E.coli* identifié à partir de la gélose Mac Conkey dans le site I présente un caractère de sensibilité plus ou moins nette vis-à-vis de tous les antibiotiques, soit 5 sur 7 des antibiotiques utilisées. La même espèce isolée dans le site III, a développé une résistance plus ou moins flagrante vis-à-vis de deux antibiotiques (NI et CN). Il est noté que le diamètre de la zone d'inhibition a aussi diminué pour deux antibiotiques (SSS et AN).

La cause majeure de cette résistance développée chez ces bactéries est le contact direct avec les rejets hospitaliers. Ces derniers renfermant des taux élevés de substances chimiques (médicaments, antibiotiques, déchets hospitaliers...) favorisent l'apparition de résistances bactériennes vis-à-vis des antibiotiques (Eurin *et al.*, 2004).

CONCLUSION

Produced with Scantopdf

Cette étude a permis de déterminer les effets graves et les différents dangers provenant à partir des différentes substances générées par les effluents hospitaliers rejetés dans l'Oued Zénati, en vue d'évaluer l'impact de ces effluents sur la microflore lotique et leur risque sanitaire.

L'étude microbiologique (identification de la microflore existante) a révélée une apparition et un développement de la résistance de certaines espèces de bactéries vis-à-vis aux différents antibiotiques utilisées d'où l'apparition d'une nouvelle situation qui se traduit par l'adaptation de ces bactéries aux changements brusques de l'environnement par l'utilisation des taux élevés d'agents antibactérien, qui constitue sans doute une menace pour les habitants qui utilisent quotidiennement l'eau de l'oued.

En recommandation et pour faire obstacle à cette situation et à fin de maintenir l'équilibre de cette écosystème aquatique, il faut veiller à certaines points dont les principaux sont :

- Réaliser en traitement préalable des rejets avant qu'il atteigne l'oued.
- Réaliser des suivis réguliers de la qualité de l'eau.
- Pour l'agriculture, il est conseillé de ne plus utiliser l'eau de l'oued en irrigation.
- En fin, installer une station de traitement biologique et physicochimique des eaux rejets dans cet écosystème.

LES REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Produced with
www.scantopdf.eu

LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES


- **Benchaïba L. (2006).** *Condition d'écoulement et impact sur la mobilisation des ressources en eau : Bassin versant de l'oued Bouhamdene (W. de Guelma, Est Algérien).* Mémoire Présenté pour l'obtention du diplôme de : Magister en Hydraulique. Université El Hadj Lakhder, Batna. 213p.
- **Boukrouma N. (2008).** *Contribution à l'étude de la qualité microbiologique de l'eau d'un écosystème aquatique artificiel : Cas de la retenue collinaire d'Ain- Fakroune (W. d' Oum-El-Bouaghi).* Mémoire de magister, Université de Guelma. 63 p.
- **Bouchaâla L. (2009).** *Contribution à l'étude de la qualité microbiologique et physicochimique de l'eau de l'Oued-Zénati (Guelma).* Mémoire de magistère. Université de Guelma. 136 p.
- **Darsy C., Lescure I., Payot V. et Rouland G. (2002).** Effluents des établissements hospitaliers : teneur en microorganismes pathogènes, risques sanitaires, procédures particulières d'épuration et de gestion des boues. *Office International de l'Eau. Service National d'Information et de Documentation sur l'Eau.* 15-30.
- **Derwich E., Beziane Z., Benaabidate L. et Belghyti D. (2008).** Evaluation de la qualité des eaux de surface des oueds Fès et Sebou utilisées en agriculture maraichère au Maroc. *Larhyss Journal.* (7). 59-77.
- **Eurin J., Ollivon D., Tiphagne K. et Chevreuil M. (2004).** Contamination des eaux superficielles par les substances pharmaceutiques : Diffusion d'antibiotiques par la médecine humaine et les activités d'élevage. *Laboratoire Hydrologie et Environnement EPHE/UMR Sisyphe.* (4), 1-7.
- **Ferron A. (1984).** *Bactériologie médicale.* 12ème édition. HRW. 376 p.
- **Flandrois J., Chomrat M. et Pager. K. (1988).** *Bactériologie médicale.* Doim. 362 p.
- **Fournier J.P. (2006).** Evaluation d'une technologie compacte de production d'eau potable. Mémoire présenté comme exigence partielle de la maîtrise en sciences de l'environnement. Université du Québec à Montréal. 92p.
- **Galaf F. et Ghannam S. (2003).** *Contribution à l'élaboration d'un manuel et d'un site web sur la pollution du milieu marin.* Mémoire d'Ingénieur d'Etat en Agronomie. Institut agronomique et Vétérinaire Hassan II. 22 p.
- **Guiraud J.P. (1998).** *Microbiologie alimentaire.* Dunod. 615p.
- **Koller E. (2004).** *Traitement des pollutions industrielles Eau, Air, Déchets, Sols, Boues.* DUNOD. 424 p.

- **Lebres E. (2004).** *Identification biochimique des micro-organismes*, Institut Pasteur d'Algerie. 105p.
- **Leclerc H., Izard D., Husson M-O., Water P. et Jakubczak E. (1983).** *Microbiologie médicale*. Doin. 369 p.
- **Leprat P. (1998).** Les rejets liquides hospitaliers, quels agents et quelles solutions techniques? *Caen. (5)*. 10-13.
- **Makoutode M., Assani A.K., Ouendo E-M., Agueh V. D. et Diallo P. (1999).** Qualité et mode de gestion de l'eau de puits en milieu rural au BENIN : cas de la sous-préfecture de Grand-Popo. *Médecine d'Afrique Noire. (24)*. 528-534.
- **Mamadou L-N. (2005).** Impacts des eaux usées sur l'évolution chimique et microbiologique des sols : étude de cas à Pikine (Dakar-Sénégal). Diplôme d'étude supérieure en sciences naturel de l'environnement. 120p.
- **Marchal M. (2008).** Les effluents liquides des établissements de santé : Etat des lieux et perspectives de gestion. 10-20.
- **Neuman H.M. (1979).** *Vade mecum des antibiotiques et agent chimiothérapique anti-infectieux* 4^{ème} ed. Maloine S.A. 670 p.
- **Nicklin J., Graeme C., Paget T .et Killington R. (2000).** *L'essentiel en microbiologie*. Berti. 365 P.
- **Niox (2005).** *ALGÉRIE et TUNISIE 2^{ème} édition. Région de l'est (province de Constantine)*. Géographie militaire. 47p.
- **Prescott H. (2003).** *Microbiologie*. De Book & Larcier s. a. 842p.
- **Rajonson J., Rasolofonirina N., Ratoaveloson J., Ravaonindriana N. (2005).** Qualité des eaux. 1-96 p
- **Rahal. (2008).** *standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale, selon la recommandation de l'OMS 5^{ème} édition*. Institut Pasteur. 106 p.
- **Rodier J. (1984).** *L'analyse de l'eau, eau naturelles, eau résiduaires, eau de mer*. Dunod. 1356 p.
- **Sellal. (2008).** Le prix de l'eau en Algérie. Le Quotidien d'Oran. 24p.
- **Singleton P. (2004).** *Bactériologie*. Dunod. 542 p.
- **Yahi M. (1997).** L'antibiothérapie spécifique adaptée. *BERTI*. 36-44 p.
- **Zilliox L. (2000).** Pollution et épuration des eaux. *Texte de la 287e conférence de l'Université de tous les savoirs donnée la qualité de l'eau, un enjeu durable*. 150-201.

LES SITES WEB

- [1] **Anonyme (2007)**. Géographie et ressources d'Oued-zénati
<http://www.membres.lycos.fr> consultation le 05/01/2010.
- [2] **Benouda A. et Tagajdid M. R.**
<http://www.technolabo.ma.fr> consultation le 12/02/2010.
- [3] **Bernard G. et Vincent G. (2006)**. Pollutions marines : les définitions.
<http://www.com.univ-mrs.fr> consultation le 20/03/2010.
- [4] **Dremont C. et Hadjali R. (1997)**. La Gestion des Effluents Liquides en Milieu Hospitalier, Projet DESS "TBH", UTC, URL.
<http://www.utc.fr> consultation le 10/03/2010.
- [5] **Euzéby J.P. (2008)**. Abrégé de bactériologie générale et médicale à l'usage des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.
<http://www.bacteriologie.net> consultation le 10/03/2010.
- [6] **Euzéby J.P. (2008)**. Abrégé de bactériologie générale et médicale à l'usage des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.
<http://www.bacteriologie.net> consultation le 10/03/2010.
- [7] **Kaidi A. (2005)**. Identification biochimique des espèces d'entérobactéries.
<http://www.Scribd.com> consultation le 15/03/2010.
- [8] **Laboratoire d'analyse (2008)**. Pollution des eaux.
<http://www.laboratoire-defrance.com> consultation le 16/03/2010.
- [9] **Lacaille S. (2005)**. Microbiologie.
<http://www.io-one.fr> consultation le 15/04/2010.
- [10] **Norris S. (1999)**. La résistance aux antibiotiques.
<http://www.dsp-psd.pwgsc.gc.ca> consultation le 15/04/2010.
- [11] **Vidal. (2008)**. La résistance aux antibiotiques.
<http://www.eurekasante.fr> consultation le 18/02/2010.
- [12] **Wikipédia L'encyclopédie Libre (2010)**. Coloration de Gram.
<http://www.wikipedia.fr> consultation le 10/02/2010.
- [13] **Wikipédia L'encyclopédie Libre (2010)**. Antibiotique.
<http://www.wikipedia.fr> consultation le 08/04/2010.
- [14] **Wikipédia L'encyclopédie Libre (2010)**. Coagulase.
<http://www.wikipedia.fr> consultation le 17/04/2010.

- [15] <http://www.sboisse.free.fr> consultation le 20/03/2010.
- [16] <http://www.vie-publique.fr> consultation le 10/04/2010.
- [17] <http://www.cite-sciences.fr> consultation le 26/04/2010.
- [18] <http://www.bacteriologie.net> consultation le 01/05/2010.
- [19] <http://www.infirmiers.com> consultation le 10/05/2010.
- [20] <http://www.sfm.asso.fr> consultation le 05/05/2010.
- [21] <http://www.lifeorigin.over-blog.net> consultation le 11/03/2010.
- [22] <http://www.microbe-edu.org> consultation le 17/05/2010.
- [23] <http://www.santetropicale.com> consultation le 10/05/2010.
- [24] <http://www.membres.lycos.fr> consultation le 05/05/2010.
- [25] <http://biotechnologie.over-blog.com> consultation le 10/04/2010.
- [26] <http://www.wapedia.mobi.fr> consultation le 13/04/2010.
- [27] <http://www.commentfaiton.com> consultation le 10/04/2010.
- [28] <http://www.conceptdraw.com> consultation le 25/04/2010.
- [29] <http://www.pagesperso-orange.fr> consultation le 09/04/2010.
- [30] <http://www.bacteriologie.wikibis.com> consultation le 10/05/2010.
- [31] <http://www.biotechno.site2.ac-strasbourg.fr> consultation le 03/05/2010.
- [32] <http://www.arnobio2.com> consultation le 16/04/2010.
- [33] <http://www.2.ac-lyon.fr> consultation le 16/04/2010.

Produced with  Scantopdf

المخلص

يعتبر وادي الزناتي مصبا لمختلف مياه المصارف القذرة (المياه المنزلية والصرف الصحي للمستشفيات) التي تحتوي على كميات مختلفة من النفايات السائلة و مياه الصرف الصحي على وجه التحديد الغنية بالمواد الكيميائية خاصة المضادات الحيوية. هذه المياه تتسبب في مزيد من التلوث ، بحيث يمكنها أن تكون مصدرا للعدوى وتساهم في انتشار الأمراض المنقولة عن طريق المياه والمتسببة في مشاكل كبيرة ، ولذلك فمن الضروري معرفة الخصائص الميكروبيولوجية لهذه المياه.

الهدف من هذه الدراسة هي معرفة تأثير المواد الكيميائية (المضادات الحيوية والأدوية...) الموجودة في إفرات المستشفيات على البكتيريا ، وتحديدًا على تطوير مقاومة هذه الأخيرة للمضادات الحيوية.

من اجل ذلك قمنا بمتابعة ولمدة شهرين (أفريل و ماي 2010) تطور مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية التي يتم إطلاقها في مياه الوادي بحيث أظهرت النتائج أنه في حالة وجود جرعة قوية من المضادات الحيوية يؤدي هذا إلي تطور وظهور البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية.

الكلمات المفاتيح : المضادات الحيوية - المقاومة البكتيرية - وادي الزناتي -الصرف الصحي للمستشفيات - النوعية الميكروبيولوجية للمياه.

ABSTRACT

The river of Oued-Zenati is considered as a place where they throw household water and sanitation and often variable amounts of effluent that specifically hospital sewage which is rich in chemicals especially antibiotics. These waters are causing more pollution, they can be a source of infection, contributing in the spread of diseases transmitted through water which contains chemicals is a major problem, so it is necessary to know the microbiological characteristics of water.

The objective of this study is that the effect of chemicals (antibiotics, drugs ...) in this hospital discharges on bacteria and specifically on the development of resistance to these antibiotics.

We realized during two months (April and May 2010), the evolution of bacterial resistance to antibiotics released into of Oued-Zenati and results show that the presence of a strong dose of antibiotics resulted by evolution and the emergence of bacterial resistance to antibiotics.

Keywords: antibiotics, bacterial resistance, Oued-Zenati, hospital sewage, pollution, microbiological quality of water.

Produced with Scantopdf