



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



Université de Larbi Tébessi –Tébessa-

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : des Sciences de la Nature et de la Vie

## MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Science Biologie

Option : Microbiologie Appliquée à la Santé et l'Environnement

Thème :

# CARACTERISATION BIOCHIMIQUE ET EVALUATION DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DE DIFFERENTS ISOLATS CLINIQUES

**PRÉSENTÉ PAR :**

**MELLE**

**OUANADI YOUSRA**

**DEVANT LE JURY**

<b>Mr Mechai A.</b>	<b>MCA Université de Tébessa</b>	<b>Président</b>
<b>Mme Benhadj M.</b>	<b>MAA Université de Tébessa</b>	<b>Promotrice</b>
<b>M<sup>elle</sup> SmaaliS.</b>	<b>MAA Université de Tébessa</b>	<b>Examinatrice</b>

**Date de soutenance : 25 mai 2017**

## ملخص

الهدف من هذا العمل التمييز البيوكيميائي لمختلف العينات البكتيرية المأخوذة من أصل سريري و كذا تقييم مقاومتهم للمضادات الحيوية بمختلف أسرها تم أخذ هذه العينات من أصول مختلفة و ذلك من خبر براهيمي للتحاليل الطبية الواقع بمدينة تبسة خلال مدة مقدرة بثلاثة أشهر 3 شهر.

عصيات جرام السلبية هم الكائنات الدقيقة الأكثر تسببا في مختلف أنواع الإصابات الجرثومية ، هذه الدراسة تستهدف عصيات جرام السلبية من أصول سريرية ؛ تم تجميع هذه العصيات إلى مجموعتين التخمرية أي *Enterobacteriaceae* ولا تخميرية تضم (*Pseudomonas aeruginosa* و *Acinetobacter baumannii*) مجموع العينات عصيات جرام السلبية هو 211 عينة حيث تم عزلها باستعمال وسط الزرع التوجيهي CHROMagar ، من بين هذا المخزون 189 عينة بكتيرية منهم تصنف ضمن مجموعة

؛ *Enterobacteriaceae (E.coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Providencia stuartii)* بالترتيب التنازلي، و 18 عينة بين (*Pseudomonas* و *Acinetobacter*) تبدي النتيجة أنّ البول مصدر أغلبية المعازيل بنسبة مئوية مقدرة ب 92% بعد ذلك القبح ب 3% و 5% مما تبقى من مصادر أخرى

تبدي نتيجة تقييم مقاومة المضادات الحيوية للجراثيم أنّ مع مجموعة ال *Enterobacteriaceae* لا تتضمن أي عينة BLSE، حيث أنّ 50% من المخزون كان مقاوم إلى مجموعة السلفاميدات من المضادات الحيوية و يليه 37% من مقاومة ضد مجموعة الكينولون ، وحساسية ملحوظة إلى الأسر الأخرى للمضادات الحيوية للجراثيم التي تم اختبارها بالإضافة إلى ذلك ، كشفت هذه الدراسة عن مقاومة من *Pseudomonas aeruginosa* للسيفالوسبورين من الجيل الثالث بنسبة 77% من العينات لل *céfoxitine* و 30% لل *céfotaxime* ، بعد ذلك مقاومة لل *fosfomycine* بنسبة 100% و *furane* بنسبة 60% على التوالي. هذا ما يحفز على المراقبة المتواصلة للحماية من مقاومة الجراثيم للمضادات الحيوية.

كلمات مفتاحية : مضاد للجراثيم، مقاومة، معزول سريري، هوية ، عصية جرام سلبية

## Abstract

The objective of this work is the biochemical characterization of various clinical isolates thus to evaluate their resistance to the various families of antibiotic. These isolates of various origins are obtained from a medical analysis laboratory at the town of Tébessa on a 3 months period.

The bacilli with negative Gram are major micro-organisms in question of various types of infections, this study aims at negative the Gram bacilli of clinical origin; these bacilli gathered in two groups fermenting which are the *Enterobacteriaceae* and not fermenting (*Pseudomonasaeruginosa* and *Acinetobacterbaumannii*). On the whole 211 stocks of negative Gram bacilli that was isolated by using an agar from orientation CHROMagar, 189 stocks of them are Enterobacteriaceae (*E.coli*; *Klebsiellapneumoniae*, *Proteusmirabilis*, *Providencia stuartii*) in decreasing order, and 18 stocks between *Pseudomonas* and *Aacinetobacter*

The results show that the urine is the origin of the majority of the isolates with a percentage of 92% then the pus of 3% and 5% moreover other samples.

The results evaluating its resistance to antibiotics show that with the total of the *Enterobacteriaceae* none of the isolated stocks were producing of a BLSE, whereas 50% of the stocks were resistant to sulphamides and associated and 37% of resistances to the quinolones, and a remarkable sensitivity to the other families of antibiotics tested.

In addition, this study revealed a resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to 3rd generation cephalosporines with the rates 77% to the céfoxitine and 30% to the céfotaxime, then with furan and fosfomycine with rates of 100% and 60% respectively

This forces a continuous monitoring on end to prevent evolution of resistance.

**Key words:** Antibiotic, résistance, clinical isolates, identification, Bacilli Gram negative

## Résumé

L'objectif de ce travail est la caractérisation biochimique de différents isolats d'origine clinique ainsi d'évaluer leurs résistances aux différentes familles d'antibiotique. Ces isolats de différentes origines sont obtenus d'un laboratoire d'analyse médicale à la ville de Tébessa pendant une période de 3 mois.

Les bacilles à Gram négatif sont des microorganismes en cause majeurs de différents types d'infections, cette étude vise les bacilles Gram négatif d'origine clinique ; ces bacilles regroupés en deux groupes fermentant qui sont les entérobactéries et les non fermentant (*Pseudomonasaeruginosa* et *acinetobacter baumannii*). Au total 211 souches de bacilles Gram négatif ont été isolées en utilisant une gélose d'orientation CHROMagar, 189 souches d'entre eux sont des entérobactéries (*E.coli* ; *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* , *Providencia stuartii*) en ordre décroissant , et 18 souches entre *Pseudomonas* et *Aacinetobacter*

Les résultats montrent que les urines sont l'origine de la plupart des isolats avec un pourcentage de 92% ensuite les pus de 3% et 5% du reste d'autres prélèvements.

Les résultats de l'évaluer de la résistance aux antibiotiques montrent qu'aux total des entérobactéries aucune des souches isolées était productrice d'une BLSE, alors que 50% des souches étaient résistantes aux sulfamides et associés et 37% de résistances aux quinolones, et une sensibilité remarquable aux autres familles d'antibiotiques testés.

Par ailleurs cette étude a révélé une résistance des souches de *Pseudomonas aeruginosa* aux céphalosporines de 3ème génération avec des taux de 77 % des souches à la céfoxitine et 30% des souches à la céfotaxime, ensuite aux furane et fosfomycine avec des taux de 100% et 60% respectivement

Ceci impose une surveillance continue afin de prévenir de l'évolution de résistance.

**Mots clés** : résistance, antibiotique, isolats cliniques, Identification, bacilles Gram négatif

## Remerciements

*Je tiens tout d'abord à remercier dieu le tout puissant et miséricordieux, qui ma a donner la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.*

*Ce travail a été effectué au sein de deux laboratoires : Laboratoire de « Microbiologie », Université de Tébessa Algérie ; et Laboratoire d'analyse médicale « Brahimi » Tébessa, Algérie.*

*Je remercie chaleureusement, ma promotrice, Madame Mabrouka Benhadj pour ses précieux conseils, son soutien, son oreille attentive, sa gentillesse, son dynamisme et son amitié. Merci de m'avoir fait confiance et m'a encouragé pour la réalisation de ce projet de recherche.*

*C'est avec un grand plaisir que je remercie le Docteur Mechai Abd El Basset, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire, que ce travail constitue le témoignage de notre respect.*

*Je tiens également à exprimer mes plus profonds remerciements à Mademoiselle Saoussen Smaali, pour sa disponibilité, et pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant d'examiner ce travail.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Docteur Brahimi Mohamed Cherif, Médecin biologiste spécialité « Microbiologie » ; de m'avoir accueillie dans son laboratoire et a mis à ma disposition tout le matériel nécessaire pour la recherche.*

*Je le remercie pour le temps qu'il m'a consacré malgré ses obligations et ses responsabilités. Merci pour sa collaboration sans laquelle ce travail n'aurait pu être réalisé.*

*Je tiens à remercier particulièrement mes parents de m'avoir permis de réaliser se travail grâce à leurs financements et leurs encouragements, leurs disponibilités, leurs patiences et leurs conseils avisés et leurs soutiens qui m'ont été très précieux.*

*Je souhaite remercier aussi tous le personnel, de laboratoire Brahimi, pour leur sympathie, leur disponibilité, mais surtout pour m'avoir facilité le recueil des souches bactériennes.*

*Je remercie aussi tous mes collègues, enseignants et responsables.*

*Merci enfin à l'ensemble des personnes qui m'ont aidé de près ou de loin dans l'élaboration de mon mémoire.*

## *Table des matières*

*ملخص*

*Abstract*

*Résumé*

*Remerciements*

*Liste des figures*

*Liste des tableaux*

*Liste des abréviations*

<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>I. Les antibiotiques et la résistance bactérienne .....</b>	<b>4</b>
<b>1. Introduction aux antibiotiques .....</b>	<b>4</b>
<b>2. Histoire des antibiotiques .....</b>	<b>4</b>
<b>3. Classification des antibiotiques selon leurs modes d'action.....</b>	<b>6</b>
<b>3.1 Les antibiotiques qui ciblent la paroi bactérienne.....</b>	<b>6</b>
<b>3.2 Les antibiotiques qui ciblent la membrane plasmique.....</b>	<b>8</b>
<b>3.3 Les antibiotiques qui ciblent les ribosomes .....</b>	<b>9</b>
<b>3.5 Les antibiotiques qui ciblent l'ADN.....</b>	<b>11</b>
<b>4. Les résistances aux antibiotiques.....</b>	<b>13</b>
<b>4.1 Résistance naturelle .....</b>	<b>14</b>
<b>4.2 Résistance acquise.....</b>	<b>14</b>
<b>4.2.1 Les éléments génétiques mobiles .....</b>	<b>15</b>
<b>4.2.1.1 Les plasmides .....</b>	<b>16</b>
<b>4.2.1.2 Séquences d'insertion et transposons .....</b>	<b>16</b>
<b>4.3 Mécanisme biochimique des résistances.....</b>	<b>18</b>
<b>4.3.1 L'inactivation enzymatique .....</b>	<b>18</b>
<b>4.3.2 Le mécanisme d'Efflux actif.....</b>	<b>20</b>
<b>5. Les bactéries pathogènes potentiellement résistantes.....</b>	<b>21</b>
<b>6. Evolution des bactéries résistantes aux antibiotiques.....</b>	<b>22</b>
<b>II. Les types d'infections et les bactéries en causes .....</b>	<b>25</b>
<b>1. L'infection urinaire.....</b>	<b>25</b>
<b>1.2. Différents facteurs de risque de l'infection urinaire .....</b>	<b>26</b>
<b>2. Physiopathologies des pus .....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Pathogenèse .....</b>	<b>27</b>
<b>3. Pathologies des liquides d'épanchement.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Pathogenèse .....</b>	<b>29</b>

4.	Physiopathologies de l'appareil génital féminin.....	31
4.1	Vaginoses bactériennes.....	33
5.	Physiopathologies de l'appareil génital masculin .....	33
5.1	Urétrites et prostatites.....	33
6.	Germes pathogènes des selles.....	34
7.	Les infections de la sphère oropharyngée.....	36
III.	Matériels et méthodes .....	39
1.	Objectif du travail.....	39
2.	Matériels .....	39
2.1	Instrument et appareillages .....	39
2.2	Réactifs et produits utilisés .....	40
2.3	Les antibiotiques .....	40
2.4	Milieus de culture.....	40
3.	Méthodes.....	41
3.1	Origine de prélèvements et la recherche des souches bactériennes .....	41
3.1.1	Recherche et isolement des germes.....	41
3.1.2	Lecture.....	41
3.2	Coloration de Gram .....	42
3.2.1	Méthode.....	42
3.2.2	Lecture.....	43
3.3	Méthodes d'identification .....	43
3.3.1	Galerie API 20E.....	43
3.3.1.3	Lecture.....	44
3.3.2	Système automatisé Vitek 2 (Biomerieux) .....	35
4.	Etude de la résistance aux antibiotiques.....	37
4.1	Principe.....	37
4.2	Technique .....	37
4.3	Lecture.....	38
5.	Tests de détection de Beta lactamase à spectre étendu (BLSE).....	38
5.1	Test de synergie.....	38
5.1.1	Principe .....	38
5.1.2	Technique.....	38
5.1.3	Lecture.....	39
IV.	Résultats et discussion.....	41
1.	Souches bactériennes .....	41

2. Répartition des souches selon l'orientation de milieu .....	41
3. Coloration de Gram :.....	43
4. Identification .....	43
4.1 Galerie biochimiques Api20 E.....	43
4.2 Système automatisé vitek2 .....	44
5. Répartition des Bacilles Gram négatif fermentaire .....	46
6. Répartition des bacilles Gram négatif non fermentaire .....	47
7. Répartition des espèces bacilles Gram négatif selon l'origine .....	47
8. Répartition des isolats selon le sexe .....	49
9. Evaluation de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries .....	50
10. Bacilles Gram négatif non fermentaire .....	51
10.1 Evaluation de la Résistance aux antibiotiques des <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	51
10.2 Evaluation de résistance des <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	52
11. Recherche des $\beta$ -lactamases à spectre étendues (BLSE) .....	53

*Conclusion et perspective*

*Références*

*Annexes.*

## Liste des figures

Figure 1: Chronologie de découverte des antibiotiques .....	5
Figure 2: Structure de la polymyxine M .....	8
Figure 3: Structure de la Gramicidine .....	8
Figure 4: Structure de la rifampicine.....	11
Figure 5: Structure de quelques quinolones de différentes générations.....	12
Figure 6: Régions fonctionnelles des quinolones.....	13
Figure 7: Les trois modes de transmission du matériel génétique .....	16
Figure 8: Les 5 grandes familles de pompes d'efflux ..	21
Figure 9: représentation des multirésistants de type PDR, XDR et MDR .....	23
Figure 10 : L'aspect des colonies sur CHROMagar orientation .....	42
Figure 11: Galerie Api 20 E .....	43
Figure 12 : la feuille après lecture de code à 7 chiffres.....	35
Figure 13 : l'automate Vitek2 avec ses périphériques .....	36
Figure 14 : la carte utilisée après l'incubation et lecture des résultats .....	37
Figure 15 : Disposition des disques d'antibiotiques pour le test de synergie.....	39
Figure 16 : réparation des isolats clinique selon l'origine .....	41
Figure 17 : forme typique des clones obtenues .....	42
Figure 18 : Coloration de Gram pour quelques espèces.....	43
Figure 19 : une espèce <i>Proteus mirabilis</i> identifié par Api 20 E (ICY83).....	44
Figure 20 : le Rapport des résultats obtenus par le système automatisé vitek2 .....	45
Figure 21 : Répartition des entérobactéries.....	46
Figure 22 : Répartition des bacilles Gram négatif non fermentaire .....	47
Figure 23 : Présentation des espèces selon leurs l'origine .....	48
Figure 24 : répartition des espèces selon le sexe.....	49
Figure 25 : profil de résistance aux antibiotiques des entérobactéries .....	51
Figure 26 : Profil de résistance des <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	52
Figure 27 : Profil de résistance aux antibiotiques des <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	53
Figure 28 : Tests de synergie de quelques isolats d'entérobactéries.....	53

## *Liste des tableaux*

Tableau 1: Classification des antibiotiques qui ciblent la paroi bactérienne .....	7
Tableau 2: Classification des antibiotiques qui ont pour cible les ribosomes .....	10
Tableau 3 : Espèces responsables d'infections urinaires (proportion en %). .....	26
Tableau 4 : Microbiologie des infections de la peau.....	28
Tableau 5 : Principaux germes retrouvés en fonction des différents épanchements.....	31
Tableau 6 : Les bactéries d'intérêt médical.....	32
Tableau 7 : Principales bactéries de la flore vaginale normale retrouvées en grande quantité dans les tableaux de vaginose bactérienne et prévalence .....	33
Tableau 8 : Mécanismes pathogéniques des bactéries entéropathogènes. ....	35
Tableau 9 : Germes les plus fréquents au niveau des sinus et des fosses nasale dans un contexte infectieux.....	37
Tableau 10 : Tableau des différents antibiotiques utilisé.....	40
Tableau 11 : Tableau de lecture de la galerie Api 20 E .....	34
Tableau 12 : répartition des isolats.....	42
Tableau 13 : Les espèces identifiées par Api 20 E.....	44

## Liste des abréviations

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique

**ARN** : Acide RiboNucléique

**ATB**: Antibiotiques

**ATP**: Adénosine-Triphosphate

**Azt** : Aztreonam

**BL**:  $\beta$ -lactamine

**BLSE** : Enterobactérie productrice de  $\beta$ -Lactamase à Spectre Étendu

**BMR**: bactéries multirésistantes

**C°**: degré Celsius.

**C3G** : Céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération.

**CMB** : concentration minimale bactéricide

**CMI** : concentration minimale inhibitrice

**CMP**: Chloramphénicol

**DAEC**: diffusely adhering *E.coli*

**EAggEC**: *E.coli* entéroagréatifs

**ECBU**: Examen cyto bactériologique des urines

**EHEC**: *E.coli* entérohémorragiques

**EIEC**: Les *E.coli* entéroinvasifs

**EPEC**: *E.coli* entéro pathogènes

**ETEC**: *E.coli* entérotoxinogènes

**EVR**: *Enterococcus* résistants aux glycopeptides

**FQ**: Fluoroquinolone

**g** : gramme.

**h** : heure.

**IS**: séquences d'insertion

**ITU**: infection du tractus urinaire

**kb** : kilobase.

**M** : molaire.

**MATE**: multi drug and toxic exclusion

**MDR**: Multi Drug resistant

**MFS / MF**: major facilitator super family

**MH** : Muller – Hinton .

**min** : minute.

**ml** : millilitre.

**MLS** : Macrolides, Lincosamides Synergistines

**mm** : millimètre .

**NAG** : Nacetylglucosamine

**NAM** : acide N-acétylmuramique

**ORL**:L'Oto-Rhino-Laryngologie

**pb** : paire de bases.

**PCR** : Polymerase Chain Reaction.

**PDR**: Pan drug resistant

**RND**: resistance / nodulation / cell division

**SAMR**: Staphylococcal Multiresistance

**SGA**: $\beta$ -hémolytique du groupe A

**SHU**: syndrome hémolytique et urémique

**SMR**: small multidrug resistance

**TIAC**: toxi-infection alimentaire collective

**Tic** : Ticarcilline

**VIH**: virus de l'immuno déficience humaine

**XDR**: Extensively Drug resistant

**$\mu$ g** : microgramme.

**$\mu$ l** : microlitre.

# INTRODUCTION

## Introduction générale

---

Tout au long de l'histoire, il y a eu une bataille continuelle entre l'homme et la multitude de micro-organismes qui causent l'infection et la maladie. La peste bubonique, la tuberculose, le paludisme, et plus récemment, le virus de l'immunodéficience acquise humaine, ont affecté une partie substantielle de la population humaine provoquant une morbidité et une mortalité importante. A partir de milieu du 20<sup>ème</sup> siècle, des avancées majeures dans le développement des médicaments antibactériens et autres moyens de lutte contre les infections ont aidé à renverser la tendance en faveur de l'homme. En ce qui concerne les infections bactériennes, la situation s'est considérablement améliorée lorsque la pénicilline est devenue disponible au début des années 1940. Cependant, cette révolution n'a pas duré longtemps. Presque aussitôt de l'utilisation de médicaments antibactériens, les bactéries ont répondu en manifestant diverses formes de résistance, notamment, en raison de l'utilisation massive et parfois inadéquate des antibiotiques. La multirésistance aux antibiotiques concerne principalement les bactéries à Gram négatif (Frasa et al., 2008).

Les bacilles à Gram négatif représentent un groupe bactérien hétérogène qui comprend les entérobactéries et d'autres genres comme *pseudomonas*. et *Acinetobacter*

Les infections dues aux bacilles à Gram négatif sont devenues de plus en plus fréquentes surtout en milieu hospitalier que communautaire.

Les entérobactéries forment une vaste famille de bactéries à Gram négatif, et sont à l'origine de maladies de gravité très variable, en raison de mécanismes pathogéniques distincts. Parmi ces bactéries, les genres *Proteus*, *Morganella* et *Providencia* sont souvent considérés comme responsables des contaminations et/ou des colonisations, mais sont fréquemment impliqués dans les infections hospitalières et même au cours des infections communautaires (O'Hara et al., 2000).

Les germes appartenant *E.coli*, *Klebsiella*, *Proteus* et *Providencia* sont des composants de la flore bactérienne normale de l'intestin de l'homme et des animaux et sont très répandus dans l'environnement (O'Hara et al., 2000). En raison de leurs habitats variés, ils ont plusieurs voies possibles d'infection humaine. Les modes de transmission peuvent inclure des sources nosocomiales, comme la nourriture et l'équipement hospitaliers, des solutions intraveineuses et le contact humain à travers des surfaces de la peau contaminées (Manos et al., 2006) provoquant des infections primaires et secondaires (O'Hara et al., 2000).

Ces organismes sont intrinsèquement résistants à la nitrofurantoïne et la tétracycline, mais sont naturellement sensibles aux  $\beta$ -lactamines, aux aminosides, aux fluoroquinolones, et aux triméthoprime/sulfaméthoxazole (O'Hara et al., 2000) (Manos et al., 2006).

Les bacilles à Gram négatif non fermentants sont de plus en plus incriminés dans les infections nosocomiales ou autres, notamment les espèces *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* qui sont considérées comme des bactéries opportunistes. (Touati, 2013)

## *Introduction générale*

---

Ces deux espèces, autrefois sensibles à la quasi-totalité des antibiotiques sont aujourd'hui responsables d'infections

En Algérie, et dans de nombreux pays, les souches *A. baumannii* et *P. aeruginosa* sont parmi les espèces les plus fréquentes après *Staphylococcus aureus*, responsables d'infections (Touati, 2013)

Au cours des dernières décennies, la résistance des bactéries vis-à-vis des agents anti-infectieux a été croissante, notamment en raison de l'utilisation fréquente et parfois inadéquate des antibiotiques à large spectre. Les bactéries responsables d'infection sont le plus souvent, le staphylocoque, les entérobactéries (*Klebsiella* et *E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*.

Par le présent travail, nous nous sommes intéressés aux bacilles à Gram négatifs groupe des entérobactéries et les bacilles Gram négatifs non fermentant au niveau des produits pathologiques, au niveau de la région de Tébessa. En utilisant divers outils d'identification et d'antibiogramme, l'ensemble de nos travaux avait pour but d'établir une caractérisation biochimique des germes en cause afin d'évaluer leurs résistances et sensibilité aux antibiotiques.

La première partie de ce document présentera une synthèse bibliographique sur les différentes familles d'antibiotiques et les différents mécanismes de résistance aux antibiotiques et sur les types d'infections et les germes en cause.

Puis, dans une seconde partie, nous détaillerons les outils méthodologiques utilisés avant d'exposer les résultats de notre travail.

# Chapitre I

## **I. Les antibiotiques et la résistance bactérienne**

### **1. Introduction aux antibiotiques**

Selon Waksman, inventeur de la Streptomycine en 1943, on désigne sous le vocable d'antibiotique « toutes les substances chimiques produites par des micro-organismes, capables d'inhiber le développement et de détruire les bactéries et d'autres organismes ». Cette définition est considérée actuellement comme un peu trop stricte et on lui préfère l'énoncé suivant: on appelle antibiotique « tout composé chimique, élaboré par un organisme vivant ou produit par synthèse, à coefficient chimiothérapeutique élevé dont l'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose, d'une manière spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux, à l'égard des virus, des micro-organismes ou même de certaines cellules des êtres pluricellulaires » (Turpin et Velu).

Dès 1877 Pasteur et Joubert mettaient en évidence l'inhibition du développement d'une culture bactérienne par une autre culture microbienne. En 1935 les sulfamides sont inventés et étudiés par Trefouel et l'équipe de Bovet à l'Institut Pasteur. La pénicilline est découverte en 1929 par Fleming et préparée en grande quantité en 1941 par Chain et Florey. L'ère de l'antibiothérapie commence.

Les antibiotiques se distinguent des antiseptiques en ce que leur action sur l'homme, par voie générale, n'est pas toxique, en première analyse. Les antiseptiques ne peuvent être administrés que par voie locale. Cependant certains produits appelés antiseptiques urinaires sont administrés par voie générale (nitrofurannes, oxyquinoléines, acide nalidixique, etc.), certains antibiotiques sont toxiques pour l'hôte. Les antiseptiques sont considérés comme bactéricides, c'est-à-dire qu'ils tuent les bactéries.

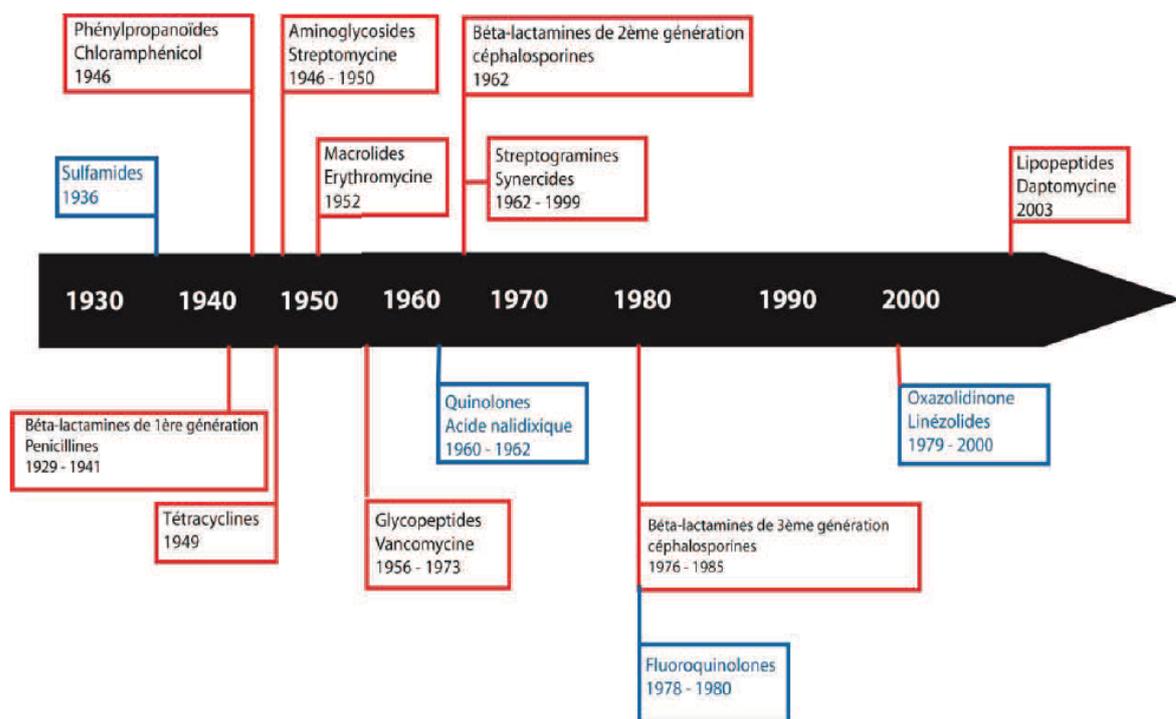
### **2. Histoire des antibiotiques**

Les travaux sur la microbiologie par plusieurs auteurs après la deuxième guerre mondiale ont connu une évolution rapide, marquant un progrès par l'application des antibiotiques en milieu médical, et la lutte contre les maladies infectieuses. Cette histoire a commencé en 1877. Après les travaux sur la cristallographie, la fermentation, la soie et la bière (Rosset, 2003), Pasteur et Joubert (1877), ont remarqué que les bactéries se développent moins à la présence des moisissures dans le milieu. Ces observations impliquent l'utilisation des moisissures grâce à leurs actions anti microbienne pour lutter contre les infections. Pour cela Ernest Duchesne en 1897 a rapporté dans sa thèse que les palefreniers enduisent les plaies des chevaux avec de la moisissure pour éviter qu'elles ne s'infectent. Il s'agit des moisissures qui recouvrent le cuir placé dans les endroits chauds, humides et sombres des écuries (Duchesne, 1897).

Après cette intéressante remarque, une découverte par Fleming en 1929 qui a dévoilé et d'une façon inattendue, une inhibition de staphylocoque par un *Penicillium notatum* développé dans une boîte de pétri. La molécule produite par cette moisissure qui empêche la croissance du microorganisme a été étudié, il s'agit de la pénicilline. La forme stable de ce premier antibiotique et utilisable *in-vivo* sur des souris a été élaborée en 1940 par Chain et ses collaborateurs (Chain et al., 1940).

Pendant la même période c'était la première utilisation de cette substance antimicrobienne sur Albert Alexander comme premier patient, un policier de 43 ans qui a eut la joue infectée par un staphylocoque lors d'une blessure accidentelle, après divers traitements inefficaces de l'infirmerie Radcliff, le patient a reçu sa première dose de pénicilline avec succès thérapeutique au bout de 4 jours (Andremont et Tibon-Cornillot, 2007).

La production industrielle de la pénicilline a commencé en 1942 avec les compagnies pharmaceutiques Merck, Lederle, Squibb et Pfizer (Lerner, 2004). C'est le point départ des antibiotiques, ces molécules et leurs applications dans le domaine médical, ont inspiré de nombreuses études vers des substances naturelles et synthétique pour lutter contre les infections microbiennes dont la chronologie est présentée par la Figure 1.



□ Antibiotiques d'origine naturelle □ Antibiotiques d'origine synthétique ou semi Synthétique

**Figure 1: Chronologie de découverte des antibiotiques (Singh et Barrett, 2006)**

### **3. Classification des antibiotiques selon leurs modes d'action**

Les antibiotiques sont soit bactériostatiques, soit bactéricides, en fonction de leur concentration dans le milieu intérieur, ou expérimentalement, dans le milieu de culture.

– La bactériostase : est un phénomène de ralentissement ou d'inhibition de la multiplication des germes dans un milieu donné. Au bout d'un temps donné, en présence d'antibiotique, le nombre de germes bactériens vivants est inférieur au nombre de germes qui seraient vivants dans un milieu et des conditions de culture identiques mais en absence d'antibiotiques. On définit une concentration minimale inhibitrice (CMI).

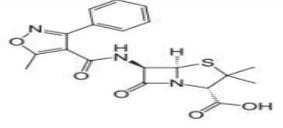
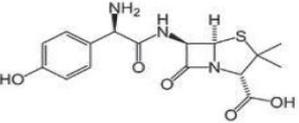
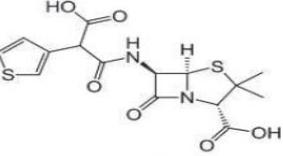
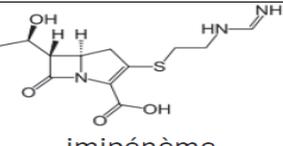
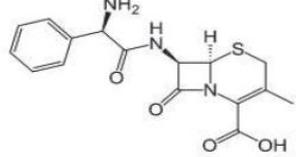
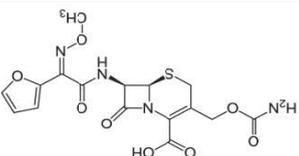
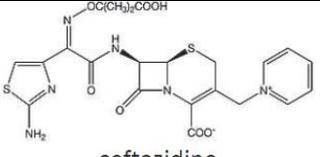
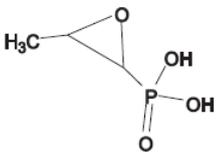
– Action bactéricide. Certains antibiotiques manifestent une action bactéricide. Ils tuent les germes dans le milieu de culture. Au bout d'un certain temps, le nombre de germes viables a diminué par rapport à leur nombre avant incubation. On définit une concentration minimale bactéricide (CMB). Lorsque la CMB est beaucoup plus élevée que la CMI on dit qu'il est bactériostatique.

De ce fait, jusqu'aujourd'hui, sur les 10 000 antibiotiques découverts, seulement 150 sont utilisés en médecine thérapeutique (Walsh, 2003). Environ 80% de ces antibiotiques naturels sont produits par des bactéries et 20% par des moisissures. Les différents antibiotiques exploités en médecine thérapeutique peuvent être classés par leurs structures chimiques et par leurs modes d'action. Les cibles décrites jusqu'à présent sont la paroi, la membrane, l'acide nucléique et les ribosomes des micro-organismes.

#### **3.1 Les antibiotiques qui ciblent la paroi bactérienne**

La paroi bactérienne est une structure rigide composée de peptidoglycane. Il s'agit d'un réseau tridimensionnel d'acides aminés et de chaînes polysaccharidiques, constituées de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM). Trois modes d'action sont utilisés par les antibiotiques présentés par le Tableau 1.

Tableau 1: Classification des antibiotiques qui ciblent la paroi bactérienne (Bégué et Astruc, 1999; Perronne,1999)

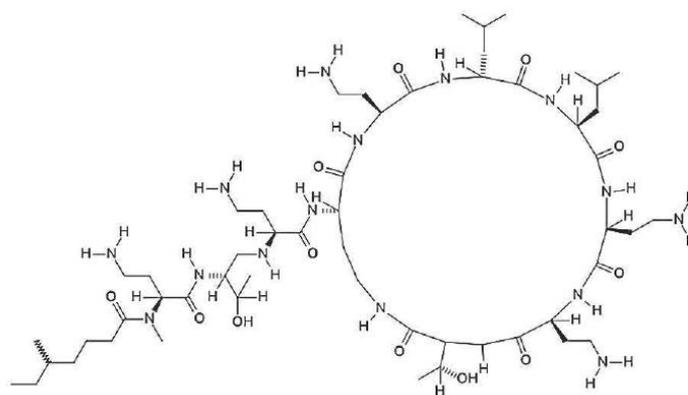
Mode d'action	Famille	Sous-famille	Exemple	Spectre d'action
inhibiteurs de la transpeptidase	Pénicillines	pénicilline G		Germe à Gram Positif
		pénicillines M	 oxacilline	Germes à Gram positif
		pénicillines A	 amoxicilline	Germe à Gram positif et Gram négatif
		Carboxypénicillines Uréidopénicillines Amidopénicillines	 Ticarcilline	Germes à Gram positif et à Gram négatif y compris <i>Pseudomonas</i>
		Carbapénèmes	 imipénème	Germes à Gram positif et à Gram négatif y compris <i>Pseudomonas</i> , entérocoques et anaérobies
inhibiteurs de la formation d'acide N-AcétyleMuramique	Céphalosporines	Première Génération	 cefalexine	Germes à Gram positif et à Gram négatif
		Deuxième Génération	 cefuroxime	Germes à Gram positif et à Gram négatif
		Troisième Génération	 ceftazidime	Germes à Gram positif et à Gram négatif y compris <i>Pseudomonas</i>
inhibiteurs de la polymérisation du peptidoglycane	Glycopeptides		Vancomycine	Germes à Gram positif
	Fosfomycine		 fosfomycine	

### 3.2 Les antibiotiques qui ciblent la membrane plasmique

Certains antibiotiques ont pour cible la membrane plasmique bactérienne avec une action bactéricide. Ces antibiotiques de type polypeptidique présentent une toxicité lors de leur administration. Ce sont des molécules naturelles produites par des bactéries du genre *Bacillus*. On peut les diviser en deux sous familles.

- **Les polypeptides tensio-actifs**

Il s'agit des polymyxines ou colistines qui sont des antibiotiques cycliques (Figure 2) isolés de *Bacillus polymyxa*. On dénombre les polymyxines A, B, C, D, E, F, K, M, P, S, et T, mais seulement les polymyxines B et E sont exploitées en thérapeutique.

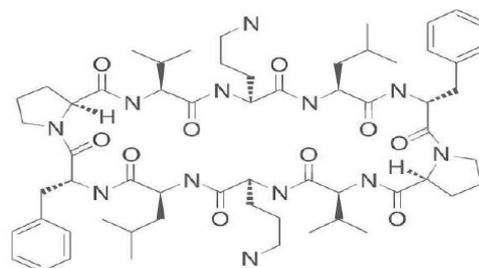


**Figure 2: Structure de la polymyxine M (Kipnis et Guery, 2010)**

Ces antibiotiques agissent comme des détergents de par leur caractère amphiphile et s'insèrent parmi les phospholipides membranaires. Cette insertion perturbe la perméabilité de la membrane bactérienne entraînant la mort cellulaire.

- **Les polypeptides non tensio-actifs**

Dans ce groupe, on note la tyrocidine, la bacitracine et la gramicidine (Figure 3). Ce dernier est un mélange d'antibiotiques composé de gramicidine A (environ 80%), de gramicidine B (6%) et gramicidine C (14%) qui sont produits par *Bacillus bevis*.



**Figure 3: Structure de la Gramicidine**

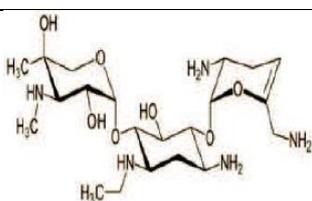
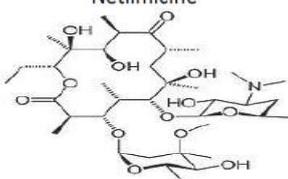
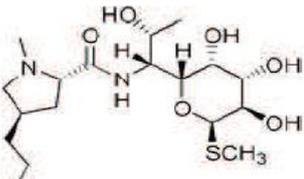
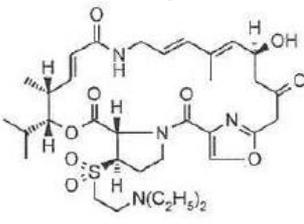
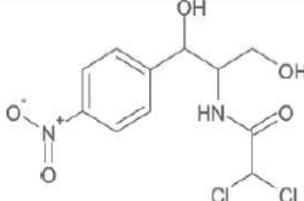
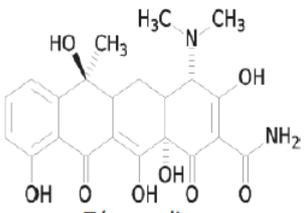
La structure primaire de la gramicidine est composée d'un ensemble d'acides aminés qui alternent les conformations L- et D- (Sarges et Witkop, 1965). Cette alternance va entraîner une variété de conformations pour sa structure secondaire en fonction de son environnement. Deux formes existent dont la forme double hélice (ou forme poreuse) et la forme simple hélice (ou forme canal) (Wallace, 1998). En s'insérant dans la membrane plasmique, la gramicidine forme des canaux et augmente la perméabilité de la membrane (Bourinbaïar et Coleman, 1997).

### **3.3 Les antibiotiques qui ciblent les ribosomes**

Les ribosomes sont des organites présents dans les cellules eucaryotes et procaryotes (cellule bactérienne). Leur structure se compose de protéines et d'ARN. Ils synthétisent les protéines en décodant l'information contenue dans l'ARN messager. Ces organites comportent une petite sous-unité (qui se charge de lire l'information portée par l'ARN messager) et d'une grande sous-unité qui se charge d'intégrer les acides aminés.

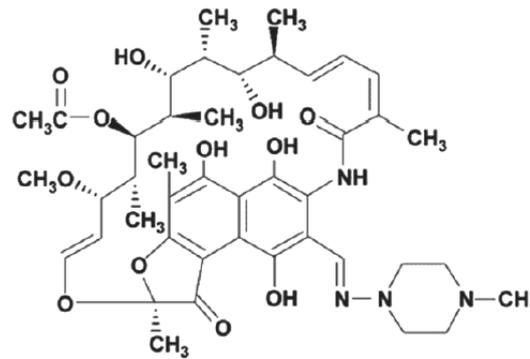
La plupart des antibiotiques qui ont pour cible les ribosomes interfèrent avec la synthèse protéique en induisant des erreurs de synthèse ou en inhibant cette synthèse. La cellule bactérienne est ainsi dans une incapacité de synthétiser des protéines qui lui sont vitales. Les familles des antibiotiques concernées ainsi que leur mode d'actions sont présentées par le Tableau 2

Tableau 2: Classification des antibiotiques qui ont pour cible les ribosomes (Le Minor et Véron, 1989; Houvenaeghel, 1992; Thévenot, 2003)

Mode d'action	Famille	Sous famille	Exemple	Spectre d'activité
Inducteur d'erreurs de decodage	Aminosides		 <p>Netilmicine</p>	Germes à Gram positif (sauf streptocoques) et à Gram négatif
Inhibition de l'elongation par lesite P	Macrolides, Lincosamides Synergistines (MLS)	Macrolides	 <p>Erythromycine</p>	Germe à Gram positif et négatif sauf <i>Enterobacter</i> et <i>Pseudomonas</i>
		Lincosamides	 <p>Lincomycine</p>	
		Synergistines	 <p>Dalfapristine</p>	
Inhibition de l'activité de la peptidyl transferase	Phénicoles		 <p>Chloramphénicol</p>	Germe à Gram positif et négatif y compris <i>Neisseria</i> , streptocoque, <i>Haemophilus</i> et <i>Salmonelle</i>
Inhibition de la fixation de l'AR de transfert	Cyclines		 <p>Tétracycline</p>	

### 3.4 Les antibiotiques qui ciblent l'ARN

Pour ce mode d'action, on dénombre la famille des rifamycines, composée des rifamycines A, B, C, D, E, S et SV. Ces antibiotiques ont une structure chimique macrocyclique et sont isolés de *Streptomyces nordia mediterranei*. La rifampicine (Figure 4) et la rifabutine sont des molécules hémisynthétisées à partir de la rifamycine B.



**Figure 4: Structure de la rifampicine**

En se liant à l'ARN polymérase, ces antibiotiques bloquent la formation de la chaîne d'ARN messager et par conséquent on assiste à un arrêt de la synthèse protéique. Les rifamycines sont des antibiotiques actifs sur les bactéries à Gram positif, sur *Mycobacterium*, quelques bactéries à Gram négatif et surtout les *Neisseria meningitidis* (Méningocoque) (Tenstet, 2010).

### 3.5 Les antibiotiques qui ciblent l'ADN

L'ADN est la cible des quinolones, qui forment une large famille d'antibiotiques de synthèse et dérivent de l'acide nalidixique. Ils sont caractérisés par un large spectre d'activité, une bonne biodisponibilité orale, et une bonne diffusibilité dans les tissus. Les molécules de cette famille sont classées par génération (Figure 5) à l'instar des céphalosporines (Andriole, 2000; Hooper et Rubinstein, 2003).

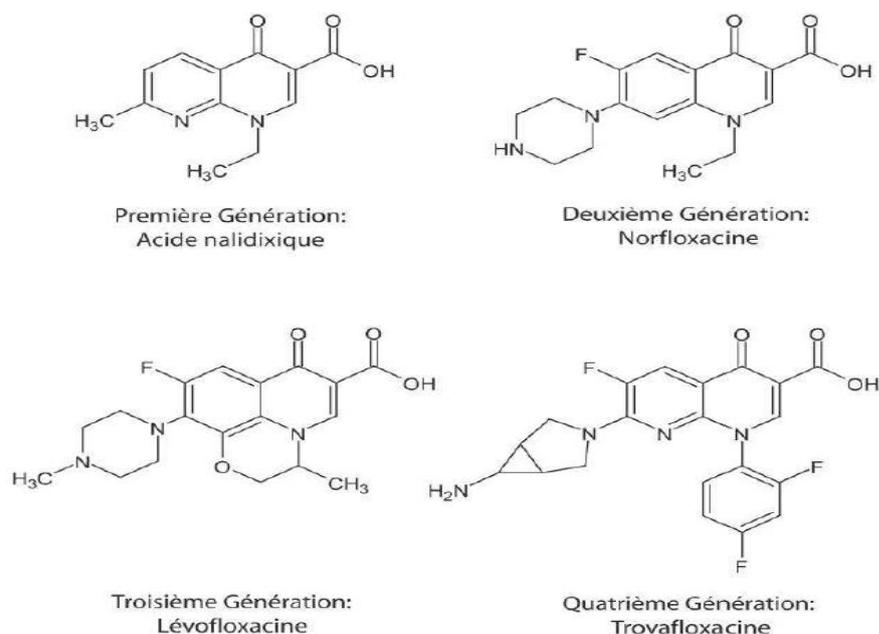


Figure 5: Structure de quelques quinolones de différentes générations

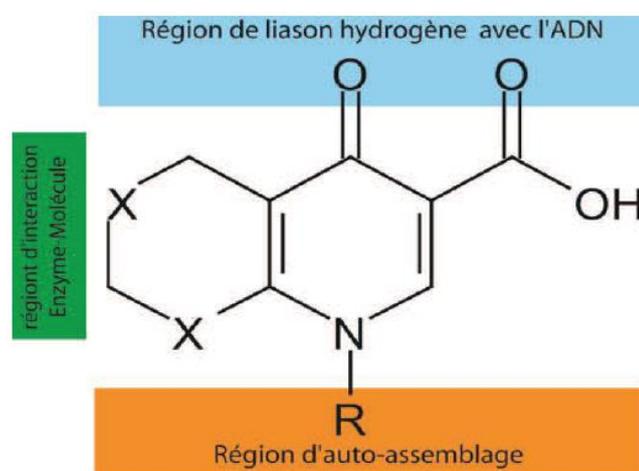
Les quinolones de la première génération regroupent l'acide nalidixique, l'acide pipemidique et la fluméquine. Ils sont actifs sur les bactéries à Gram négatif et leurs utilisations se limitent principalement dans le traitement des infections urinaires du fait de leur mauvaise diffusion dans les tissus.

Dans le groupe de la seconde génération, la norfloxacine est caractérisée entre autres, par l'ajout d'un atome de fluor à l'acide nalidixique en position C<sub>6</sub> et de la pipérazine en position C<sub>7</sub>, renforçant l'activité antibactérienne. L'ajout du fluor caractérise les fluoroquinolones. L'aciprofloxacine dérive de la norfloxacine avec l'apport d'un radical (cyclopropyl) sur l'azote N<sub>1</sub>. C'est un groupement qui améliore la biodisponibilité de la molécule. Toutes ces modifications chimiques à partir des quinolones de la première génération ont permis d'élargir leur spectre sur les bactéries à Gram négatif et avec une activité sur *Pseudomonas aeruginosa*. Leur spectre d'action s'étend sur les bactéries à Gram positif excluant *Streptococcus pneumoniae*. Certains antibiotiques de ce groupe comme la norfloxacine, la loméfloxacin et l'énoxacin, par leur biodisponibilité insuffisante, sont exploités uniquement dans le traitement des infections urinaires. Les autres antibiotiques tels que l'aciprofloxacine, l'ofloxacine sont utilisés pour le traitement d'une grande gamme d'infections.

Concernant les quinolones de la troisième génération, on note une activité sur les bactéries à Gram positif y compris le genre *Streptococcus* et les espèces *Klebsiella pneumoniae* et *Moraxella catarrhalis* (anciennement *Branhanella catarrhalis*). Cette dernière activité les qualifie de « quinolones des infections respiratoires ». Ce groupe renferme la balofloxacine, la grépafloracine, la lévofloxacine, la pazufloxacine, la sparfloxacine et la tosufloxacine. Les nouvelles quinolones dites

« de quatrième génération », en complément du spectre d'activité des quinolones de troisième génération, ont une activité qui s'étend aux bactéries anaérobies.

Les quinolones sont des antibiotiques qui se présentent avec deux cibles moléculaires dont l'ADN et la topoisomérase. Ces antibiotiques possèdent une région qui se lie par liaison hydrogène à l'ADN bactérien. Il s'agit de la région de la molécule qui comporte le groupe carbonyle de la quinone. Cette molécule établit également une interaction spécifique avec les enzymes de type topoisomérase (Figure 6). Ce sont des enzymes qui permettent le déroulement de l'ADN pour sa transcription ou l'enroulement de l'ADN après sa transcription. Elles contrôlent donc plus loin la synthèse des protéines ou encore la division cellulaire de la bactérie. L'interaction des quinolones avec ces enzymes se fait par les radicaux qui jouxtent la quinone.



**Figure 6: Régions fonctionnelles des quinolones**

Selon plusieurs auteurs, les interactions entre ces antibiotiques avec l'ADN et les topoisomérases induisent la formation d'un complexe ternaire qui inhibe l'activité de l'enzyme impliquée dans cette réaction. Une cartographie de la structure chimique des quinolones qui met en évidence la relation structure-activité de ces antibiotiques a été donc établie (Figure 6) (Yoshida *et al.*, 1991; Mitscher *et al.*, 2003; Shen, 2003).

#### 4. Les résistances aux antibiotiques

La découverte des antibiotiques a constitué un progrès médical extraordinaire, qui a permis d'améliorer le pronostic des infections. Cependant, une résistance à ces produits s'est rapidement développée et a évolué jusqu'à constituer un problème de santé important à l'échelle mondiale. Les conséquences en sont très nombreuses, dont une augmentation de la morbidité et de la mortalité, un accroissement des coûts des soins de santé, causé par des hospitalisations plus longues, et la

nécessite d'utiliser des médicaments plus coûteux et souvent plus toxiques. Certaines infections résistent même à tous les antibiotiques actuellement disponibles sur le marché. (Diallon,2013)

La résistance bactérienne se définit comme la capacité de continuer à croître ou à survivre en présence de l'antibiotique. Les conditions d'activité d'un antibiotique sont de posséder une cible spécifique, de demeurer sous forme active, d'accéder à la cible et d'interagir efficacement avec elle en la désactivant. Il existe de nombreux mécanismes aboutissant à l'expression de la résistance et suivant son caractère inné ou acquis : la résistance naturelle et la résistance acquise.

La résistance naturelle est programmée sur le génome et constante à l'intérieur du taxon ; elle constitue un critère d'identification stable d'une espèce. Les résistances acquises sont quant à elles consécutives à des modifications de l'équipement génétique (Diallo,2013)

### **4.1 Résistance naturelle**

La résistance naturelle ou intrinsèque à un antibiotique est essentiellement due à la présence de gènes chromosomiques ; elle est donc commune à toutes les bactéries d'une même espèce. Elle peut être due à des particularités structurales s'opposant à l'action de l'antibiotique sur sa cible comme la présence d'une membrane externe chez les bactéries à Gram négatif les rendant naturellement résistantes aux antibiotiques de poids moléculaire élevé comme les glycopeptides. Elle peut être aussi due à des particularités métaboliques spécifiques : le bacille de la tuberculose par exemple n'est sensible qu'à un nombre restreint d'antibiotiques en raison de son métabolisme original. La résistance naturelle peut enfin être médiée par l'expression constitutive ou induite d'une enzyme d'inactivation ou par la mise en œuvre d'un processus d'échappement vis à vis de l'antibiotique (Gansmandel, 2011)

Dans tous les cas, la résistance naturelle fait partie des caractères normaux de l'espèce ; elle détermine le niveau de sensibilité « basal » des bactéries et définit le phénotype sauvage d'une espèce. C'est la résistance de classe. Elle est constitutive et touche toute une famille d'antibiotiques (Gansmandel, 2011)

### **4.2 Résistance acquise**

Ce terme est utilisé pour désigner le résultat d'un processus permettant à des bactéries d'une espèce originellement sensible de devenir résistante à un ou plusieurs antibiotiques L'acquisition de ces résistances est déterminée par des modifications génétiques consécutives à des mutations ponctuelles ou à l'acquisition « de novo » de gènes de résistance exogènes.

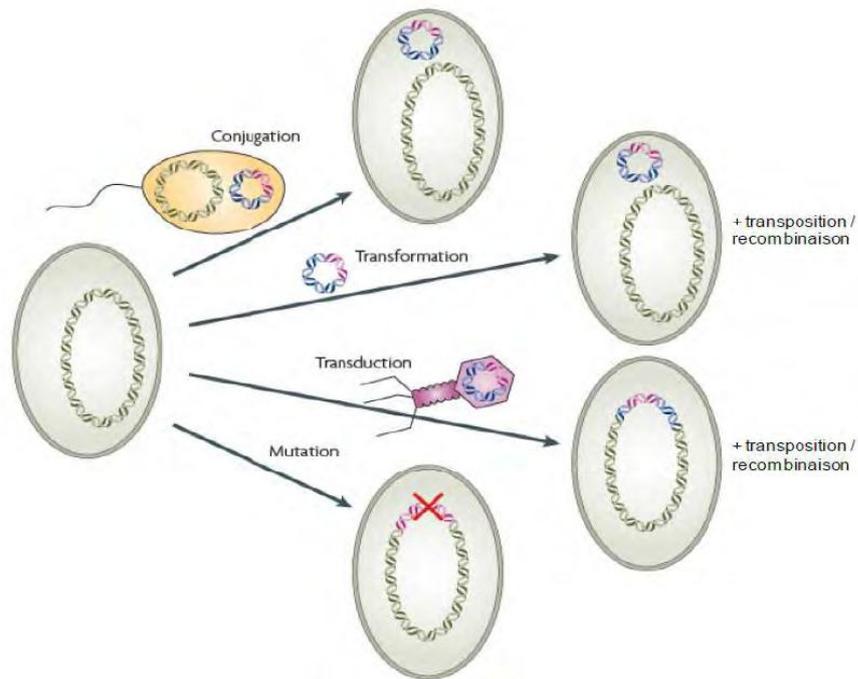
La capacité de multiplication très rapide des bactéries favorise la sélection d'évènements génétiques favorables et la possibilité d'échange d'information même entre espèces lointaines leur conférant un très grand pouvoir d'adaptation aux contraintes du milieu. L'évolution des mécanismes de résistance aux antibiotiques, et notamment aux  $\beta$ -lactamines illustre parfaitement ce phénomène.

La résistance chromosomique acquise résulte d'une mutation. La fréquence de ces mutations est faible et variable ( $10^{-6}$  à  $10^{-9}$ ) mais la mutation est stable et transmissible à la descendance. La résistance apparaît dans ce cas au hasard et n'est donc pas influencée par l'antibiotique qui ne fait que la révéler.

La mutation du gène peut entraîner l'apparition d'une protéine particulière ou d'une variabilité structurelle responsable de la résistance ; elle peut aussi entraîner la disparition ou la modification d'une protéine structurale ou enzymatique normale. En absence d'antibiotiques dans le milieu exerçant une pression de sélection, la plupart des mutants naturels vont disparaître.

### **4.2.1 Les éléments génétiques mobiles**

La résistance aux antibiotiques acquise par les bactéries est principalement due à la présence de trois types d'éléments extra-chromosomiques portant des gènes de résistance : les plasmides, les transposons et des cassettes de résistances insérées sur un intégron (Bennett, 2008 ; Matinez, 2009 ; Walsh, 2006). Ce type de résistance est transmissible d'une souche ou d'une espèce à une autre selon trois modes de transmission, à savoir la conjugaison (transfert direct entre deux bactéries ayant établi temporairement un contact physique), la transformation (transfert d'ADN nu) et la transduction (transport d'ADN bactérien par des bacteriophages) (**Figure 7**).



**Figure 7: Les trois modes de transmission du matériel génétique : la conjugaison, la transformation et la transduction chez les bactéries. Modifiée de (Andersson *et al.*, 2010)**

#### 4.2.1.1 Les plasmides

Les plasmides bactériens revêtent une importance toute particulière dans l'étude des phénomènes de résistance car ils constituent à la fois un vecteur de premier plan pour la dissémination des résistances et un immense réservoir génétique. Comme les chromosomes, les plasmides codent pour des protéines et des molécules d'ARN et se répliquent durant la croissance bactérienne (Synderet *al.*, 2007). Les plasmides partagent certaines fonctions de partition et quelques recombinaisons spécifiques de site avec le chromosome de l'hôte (Synderet *al.*, 2007). Contrairement aux chromosomes, les plasmides ne portent toutefois pas de gènes essentiels à la croissance bactérienne. Ils codent plutôt pour des protéines dont la fonction est de conférer un avantage sélectif comme la résistance aux antibiotiques ou encore des facteurs de virulence.

#### 4.2.1.2 Séquences d'insertion et transposons

Les séquences d'insertion, aussi appelées éléments IS, sont de courtes séquences d'ADN (0,2 à 6 kpb) qui portent uniquement le gène codant pour la protéine responsable de la transposition, la transposase, et les sites reconnus par cette enzyme. Ces sites sont des séquences inversées répétées situées à chaque extrémité de la séquence d'insertion. Généralement d'une taille de 15 à 25 pb, elles varient de manière à ce que chaque type d'IS ait des séquences inversées répétées caractéristiques. Contrairement à d'autres mécanismes qui réorganisent l'ADN, la transposition de ces éléments

génétiques ne requiert pas de régions d'homologie étendues pour que la recombinaison puisse s'effectuer. Ces éléments transposables jouent un rôle très important dans l'évolution des bactéries puisqu'ils sont à l'origine de multiples réarrangements de leur génome.

Les transposons (2-20 kpb) sont composés de séquences d'ADN qui fonctionnent comme des sites de recombinaison et de gènes codants pour des protéines qui participent à la réaction de recombinaison. Les sites de recombinaison sont situés aux deux extrémités du transposon et organisés en séquences inversées répétées. La taille de ces répétitions inversées terminales varie entre ~25 et quelques centaines de paires de bases. Les sites de recombinaison ne sont pas des répétitions exactes et portent les séquences de reconnaissance des transposases.

### 4.2.1.3 Les intégrons

Les intégrons, plus récemment décrits vers la fin des années 80, jouent un rôle majeur dans l'acquisition et l'expression de gènes de résistance aux antibiotiques, notamment chez les bactéries à coloration de Gram négative. Aujourd'hui, alors que l'implication des intégrons dans l'adaptation bactérienne au-delà de la résistance aux antibiotiques est avérée, le rôle d'une partie de ces intégrons, parfois nommés intégrons de résistance (IR), est majeur dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques et notamment chez des souches d'intérêt clinique.

Les intégrons ont une organisation commune et sont composés par trois éléments clés : un gène *intI*, un site primaire de recombinaison (*attI*) et un promoteur (Pc) permettant la transcription des gènes capturés ou cassettes. Les intégrons, supports majeurs de la multirésistance aux antibiotiques, peuvent contenir jusqu'à 8 cassettes (Cambray et al., 2010, Nass et al., 2001). Toutefois, des intégrons sans cassette ont également été retrouvés (Soto et al., 2003). Pour les intégrons de classe 1, 2 et 3, il a été montré que les cassettes étaient majoritairement composées de gènes de résistance aux  $\beta$ -lactamines, aminosides (gènes *aad*) et au triméthoprim (gènes *dfr*) (Partridge et al., 2009, Van Hoek et al., 2011). Plusieurs intégrases d'intégrons (IntI) ont été décrites chez des souches bactériennes cliniques et environnementales. Les intégrases des souches cliniques sont généralement codées par des gènes portés par des plasmides alors que celles des souches environnementales sont codées par des gènes situés sur des chromosomes. Les intégrases appartenant aux intégrons de classe 1, 2 et 3 (Arakawa et al., 1995; Hall et al., 1999; Hansson et al., 2002) de même que les intégrases VchIntIA (Mazel et al., 1998) et IntI9 (Hochhut et al., 2001) sont les seules à être associées à des gènes de résistance aux antibiotiques.

### 4.3 Mécanisme biochimique des résistances

Les modes de résistance connus actuellement qui résultent de la pression de sélection exercée par les ATB sont au nombre de quatre :

- \_ L'inactivation enzymatique par la sécrétion d'une enzyme
- \_ L'efflux actif
- \_ La modification de la cible
- \_ La diminution de la perméabilité (porines) à l'antibiotique

Une même bactérie peut présenter plusieurs de ces mécanismes de résistance

#### 4.3.1 L'inactivation enzymatique

Par ce mécanisme, la bactérie acquiert la capacité d'inactiver l'action des ATB par la sécrétion d'enzymes avant même qu'ils n'aient pénétré au sein du microorganisme (Babic et *al.*, 2006). Les classes d'antibiotiques visées par ces enzymes sont les  $\beta$ -lactamines, les macrolides, les lincosamides, les streptogramines (MLS), les aminosides et les phénicolés.

- **Les  $\beta$ -lactamases**

La production de  $\beta$ -lactamase est un mécanisme que l'on retrouve aussi bien chez les bactéries Gram positives que Gram négative, il s'agit du mode de résistance le plus courant. Le support génétique qui code pour ces enzymes est soit d'origine plasmidique soit chromosomique. Les  $\beta$ -lactamases sont des **enzymes d'inactivation** de type sérine (classes A, C et D) ou métalloenzymes (classe B) dont les substrats sont des  $\beta$ -lactamines et qui peuvent être classées en sous-groupe selon la structure du noyau de base (pénème, oxapénème, pénème, céphème, oxacéphème, azétididone). Compte tenu de l'extrême diversité de ce groupe enzymatique, les besoins d'une classification sont anciens. La première classification basée sur des critères scientifiques a été proposée dans les années 70 par Ambler. Elle prend en compte les analogies de séquence peptidique, en particulier celles du site enzymatique. Ainsi, quatre classes (A, B, C, et D) ont été identifiées.

La classification fonctionnelle de Bush, Jacoby, Medeiros reflète mieux le spectre exact des enzymes, prenant en compte le profil de substrat (pénicilline, oxacilline, carbénicilline, céphaloridine, C3G, imipénème), ainsi que le profil d'inhibition. Ainsi apparaît la notion de groupe fonctionnel tel le groupe 2b qui se subdivise en sous-groupes 2ba, 2bc..... Mais ce type d'enzyme a un potentiel évolutif et une seule mutation (ponctuelle) peut changer le profil d'inactivation et celui d'inhibition : groupe 2b se subdivise alors en 2be. Néanmoins, elle est peu utilisée en pratique médicale. (Jacoby et *al.*, 2005 ; Bush et *al.*, 1995 ; Philippon et *al.*, 2006).

- **Les aminosides**

L'inactivation enzymatique des aminosides est le mécanisme de résistance le plus souvent observé. Il permet d'expliquer la résistance de plus de 95% des souches d'entérobactéries résistantes aux aminosides, de 95% des souches de *Acinetobacter* spp., de 50% des souches de *Pseudomonas aeruginosa* et de 95% des souches de bactéries à Gram positif (Janna et al., 2006 ; Wright, 2003)

Tous les aminosides possèdent des groupements aminés et des groupements hydroxyles nécessaires à leur activité et ces groupements peuvent être la cible de trois classes d'enzymes. (Azucena et al., 2001 ; Janna et al., 2006; Lambert, 1997 ; Wright, 1999).

Les phosphotransférases ou APH transfèrent, un groupement phosphate sur les groupements hydroxyles. Les nucléotidyltransférases ou O-adénylyl (ANT ou AAD) agissent par adénylation des groupements hydroxyles. Les acétyltransférases ou AAC catalysent l'acétylation des groupements aminés. Il convient de noter les points suivants :

- Un seul aminoside peut être inactivé par plusieurs enzymes
- Une seule enzyme peut inactiver plusieurs antibiotiques.
- Une seule souche peut produire plusieurs enzymes.

Toutes ces enzymes ont une localisation intracellulaire et elles peuvent être codées par des gènes chromosomiques ou par des plasmides ou par des éléments génétiques transposables ou par des intégrons.

La résistance d'origine chromosomique est peu importante, car les gènes sont soit peu exprimés et les souches qui les portent sont faiblement résistantes, soit ils sont non exprimés et les souches sont parfaitement sensibles. Un codage par des plasmides ou des éléments génétiques transposables ou des intégrons est plus fréquent. Il explique la diffusion importante des gènes de résistance aux aminosides parmi les souches bactériennes.

Le gène majeur de résistance aux aminosides, rencontré chez les bactéries à Gram positif, code pour une enzyme qui inactive la kanamycine, la gentamicine, la sisomycine, la tobramycine et la dibécacine. Ce gène est porté par des transposons composites ce qui aurait permis sa dissémination chez de nombreuses espèces de bactéries à Gram positif. Le gène codant pour l'APH(3')-III présent, notamment, chez *Staphylococcus aureus*, a été également retrouvé chez *Campylobacter jejuni*.

- **Les phénicolés**

Pour le chloramphénicol et le thiamphénicol, l'inactivation enzymatique est le mécanisme de résistance le plus fréquent. Elle agit par acétylation par une chloramphénicol acétyltransférase du groupement hydroxyle de la molécule. On a identifié 3 enzymes chez les bactéries à Gram négatif et

cinq chez les bactéries à Gram positif (Wright,2005;Babic *et al.*,2006). A l'exception de *Streptococcus pneumoniae*, ces enzymes sont codées par des plasmides. Les chloramphénicol acétyltransférases sont cependant inactifs sur le florfénicol.

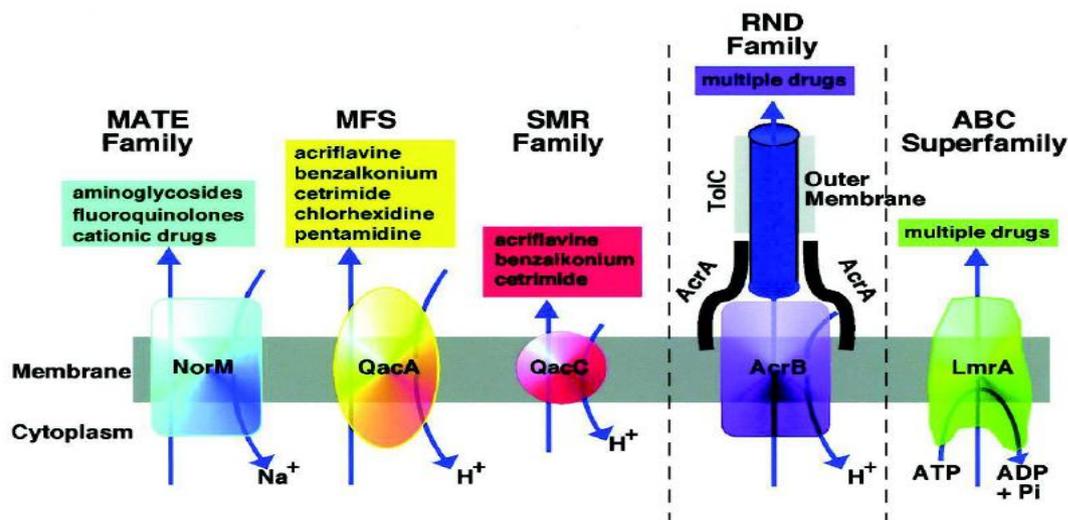
### **4.3.2 Le mécanisme d'Efflux actif**

Ce sont des mécanismes de transport membranaire universellement répandus chez des organismes vivants. Ils ont un rôle clé dans la physiologie bactérienne : préserver l'équilibre physico-chimique du milieu intracellulaire en s'opposant à l'accumulation de substances naturelles ou synthétiques toxiques transport de substances nutritives et export de substances toxiques. On différencie les pompes à efflux par :

- Spécificité ou non des molécules exportées
- Structure : une à trois protéines
- Type d'énergie nécessaire : ATP ou force proton-motrice
- Mode expression : inductible ou constitutif

#### **Il existe cinq grandes familles des systèmes d'efflux actif (figure 08)**

- **ABC** : ATP binding cassette transporter : 12 domaines transmembranaires et un domaine de fixation de ATP
- **RND** : resistance / nodulation / cell division avec trois composants :
  - Protéine de transport dans la membrane cytoplasmique
  - Protéine dans le périplasma formant un canal reliant les deux membranes
  - Protéine dans la membrane externe type porine expulsant le substrat
- **MFS ou MF**: major facilitator superfamily avec 12 ou 14 domaines transmembranaires
- **SMR** : small multidrug resistance avec 4 domaines transmembranaires
- **MATE** : multidrug and toxic exclusion



**Figure 8: Les 5 grandes familles de pompes d'efflux (Blanco *et al.*, 2013).** Chaque famille de pompes est représentée par un de ses membres. Les principaux substrats efflués et la source d'énergie utilisée pour le transport sont mentionnés. MATE, Multidrug and Toxic Compound Extrusion ; MFS, Major Facilitator Superfamily ; SMR, Staphylococcal Multiresistance ; RND, Resistance Nodulation Division ; ABC, ATP Binding Cassette.

Chez les bactéries, il existe des pompes présentes uniquement chez les Gram négatif c'est le cas de la Pompe RND, alors que chez les Gram positifs ce sont les pompes MFS et ABC qui sont les plus répandues.

Le mécanisme de résistance par le système des Efflux réside dans l'excrétion active de l'ATB par les pompes à protons, il s'agit là d'un mode de résistance intrinsèque des bactéries, toutefois l'exposition aux antibiotiques entraîne la surexpression par mutation de transporteurs, ce qui entraîne une hausse des résistances bactériennes qui peut être simultanée à des ATB non reliés structuralement (Chevalier *et al.*, 2008; Shaumacher *et al.*, 2006). Exemples de résistances acquises dues aux pompes à efflux chez les Gram positifs :

**Surproduction d'un système existant, par mutation** (Folster *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011)

- CMI augmentées modérément : de 4 à 8 fois
- Exemples E. coli et Gonocoque AcrAB-TolC et MtrCDE : résistance bas niveau Tét, Macro et CMP et sensibilité conservée de FQ et BL
- Exemple Pyo : surexpression de MexAB-OprM : résistance à Tic et Azt et certaines FQ

## 5. Les bactéries pathogènes potentiellement résistantes

Actuellement, on compte un peu moins d'une dizaine d'espèces bactériennes concernées par la résistance aux ATB. Ces bactéries sévissent pour la grande majorité en milieu hospitalier et en milieu institutionnel ; c'est le cas pour *Staphylococcus aureus* métricilline Résistant (SAMR), *Pseudomonas*

*aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Clostridium difficile*, *Enterococcus* résistants aux glycopeptides (EVR) et plus récemment l'émergence de bactéries « super résistantes » entérobactéries BLSE ( $\beta$ -lactamases Spectre Etendue) principalement impliquées dans des infections nosocomiales (Royce et al., 1994 ; Hocquet et al., 2010 ; Dulong et al., 2011). D'autres bactéries sont plutôt communautaires ; c'est le cas du *Streptococcus pneumoniae* résistant à la pénicilline et d'*Escherichia coli* BLSE (Coque et al., 2008 ; Dunais et al., 2011). Certaines de ces bactéries évoluent soit sur un mode pandémique se propageant de façon certaine sur tous les continents ; c'est le cas du SAMR que l'on retrouve également en milieu communautaire depuis quelques années (Frei et al., 2010). D'autres, en revanche évoluent sur un mode plutôt épidémique ; c'est le cas de *Clostridium difficile* (Clements et al., 2010), des ERV (Dekeyser et al., 2010) et des entérobactéries BLSE KP oxa 48 (Cuzon et al., 2010).

### 6. Evolution des bactéries résistantes aux antibiotiques

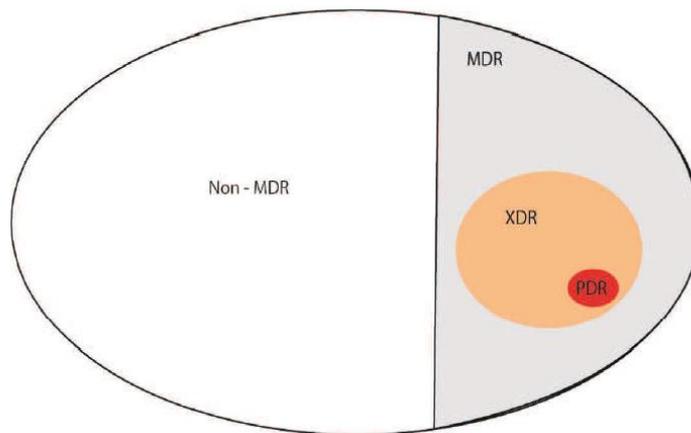
Les différents modes d'acquisition des résistances donnent une idée de la fréquence de leurs apparitions ainsi que des activités qui les favorisent. L'acquisition de la résistance par le transfert des gènes est celle qui présente la fréquence la plus élevée. Les résistances bactériennes acquises par mutation chromosomique concernent 10 à 20% des souches isolées en clinique (Courvalin et al., 2001).

D'un pourcentage d'apparition de moins de 10% en 1945, cette valeur atteint environ 80% en 1955. Du fait de l'inefficacité des pénicillines sur les *Staphylococcus aureus*, d'autres familles d'antibiotiques ont dû être utilisées. Par conséquent, à côté de l'acquisition de cette résistance aux pénicillines, ces souches de *Staphylococcus aureus* ont acquis de nouvelles résistances aux antibiotiques, et sont devenues progressivement des souches multi résistantes.

L'addition des résistances des bactéries est de plus en plus observée et ce phénomène constitue une véritable inquiétude. Les bactéries résistantes à plusieurs antibiotiques sont classées en fonction du nombre de familles d'antibiotiques n'ayant plus d'activité sur elles. Par ce mode de classification basé sur le phénotype des bactéries, on distingue les multirésistances de type MDR (Multi Drug resistant), XDR (Extensively Drug resistant) et PDR (Pandrug resistant). Selon l'ECDC (European Center for Disease prevention and Control) (2011), les bactéries multirésistantes de type MDR se définissent comme résistantes à au moins trois familles différentes d'antibiotiques. Les multirésistants de type XDR se caractérisent par leur sensibilité à une seule famille d'antibiotique préconisée pour leur traitement.

Enfin, les bactéries multirésistantes de type PDR sont résistantes à toutes familles d'antibiotiques disponibles (Magiorakos et al., 2011). Toute bactérie multirésistante de type PDR est aussi une

bactérie qui remplit les critères des multirésistances de type XDR qui elles-mêmes font partie des MDR comme l'indique la Figure 11.



**Figure 9: représentation des multirésistants de type PDR, XDR et MDR (Magiorakos et al., 2011)**

L'acquisition des gènes de multirésistance se fait majoritairement par transferts plasmidiques. Par ailleurs, il arrive que dans le cas d'une mutation chromosomique, la mutation affecte les porines et cela induit des résistances simultanées comme par exemple celles aux  $\beta$ -lactamines et aux aminosides chez des souches de *Pseudomonas aeruginosa*. On note aussi par ce même mécanisme des résistances simultanées aux  $\beta$ -lactamines, aux quinolones, au chloramphénicol et au triméthoprime au niveau des souches de *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp. Et *Serratia* spp.

# Chapitre II

## II. Les types d'infections et les bactéries en causes

### 1. L'infection urinaire

L'infection du tractus urinaire (ITU) se caractérise par la multiplication de microorganismes au sein de l'arbre urinaire (bactériurie) s'accompagnant d'une réaction inflammatoire avec afflux de leucocytes dans l'urine ou leucocyturie. L'ITU se fait quasi exclusivement par voie ascendante et les bactéries responsables d'ITU sont presque toujours d'origine digestive. L'appareil urinaire est normalement stérile, bien que s'ouvrant vers l'extérieur, et la présence de bactéries dans l'urine suffirait donc à définir l'ITU. Mais l'urine est contaminée physiologiquement lors de son émission par les germes du méat et du tiers inférieur de l'urètre ou du périnée. Aussi, l'examen cyto bactériologique des urines (ECBU) se caractérise par une analyse quantitative de la culture de l'urine associée à une analyse quantitative de la leucocyturie (Wilson et Gaido 1968)

En outre, l'urine constitue un bon milieu de culture. Aussi, la réalisation et le transport du prélèvement doivent répondre à des règles strictes qui conditionnent l'interprétation de cet examen. L'ITU est plus particulièrement fréquente chez la femme et la jeune fille en raison d'un urètre court, s'ouvrant à la vulve au voisinage du vagin et de l'anus. Chez le jeune nourrisson avant 3 mois, le sexe ratio est inversé. Cette plus forte proportion de garçons serait expliquée par une forte colonisation bactérienne du prépuce à cet âge. Cette colonisation rend compte de la difficulté du prélèvement chez le jeune nourrisson mâle. Le risque d'infection serait moindre chez les garçons circoncis. (Kass, 1957)

La très grande majorité des bactéries responsables d'infections urinaires ne sont pas exigeantes et sont cultivées sur géloses ordinaires (tableau 03). (François et *al.*, 2011)

Tableau 3 : Espèces responsables d'infections urinaires (proportion en %).

<b>Espèces bactériennes</b>	<b>Infections communautaires Réseau AFORCOPI-810 Rapport Onerba 2002 (n=417)</b>	<b>Infections nosocomiales Groupe d'étude ESCMID Europe c000 (n=421)</b>	<b>Infections SAU d'un hôpital pédiatrique 2005 (n=221)</b>
<b>Gram négatif</b>			
<i>Escherichia coli</i>	68	38	79
<i>Proteus mirabilis</i>	8	7	9
<i>Klebsiella spp.</i>	5	9	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	6	0,5
<b>Autres entérobactéries</b>	3	7	1
<i>Acinetobacter spp.</i>		2	
<b>Gram positif</b>			
<i>Enterococcus spp.</i>	5	17	3
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	3		0,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	2	2
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3		1
<b>Autres</b>	1	2	1
<b>Levures</b>		10	

### 1.2. Différents facteurs de risque de l'infection urinaire ont été identifiés

- les anomalies anatomiques : chez l'adulte, il pourra s'agir de tout obstacle présent sur les voies excrétrices (lithiase, hypertrophie prostatique, etc.), et chez l'enfant, de malformations favorisant la stase urinaire avec en particulier le reflux vésico-urétéral ;

- les anomalies fonctionnelles rencontrées notamment chez le patient diabétique, au cours de la grossesse ou chez la personne âgée ;

- enfin, les facteurs iatrogènes, liés à toute intervention sur les voies urinaires, avec en particulier le sondage urinaire, pour lequel le risque cumulé d'infection urinaire est de 100 % après 30 jours de sondage.

L'ITU peut être limitée à la vessie (cystite) ou se compliquer d'une atteinte rénale (pyélonéphrite) caractérisée par la survenue de fièvre et de douleurs lombaires.

L'atteinte du parenchyme rénal fait toute la gravité potentielle de l'infection urinaire. À court terme, elle peut se compliquer de bactériémie avec localisation secondaire ou de choc infectieux. À long terme et en cas de répétition, la pyélonéphrite peut être responsable d'insuffisance rénale et/ou d'hypertension artérielle.(Wilson et Gaido 1968)

### 2. Physiopathologies des pus

Les prélèvements appelés « pus » englobent toutes les suppurations, qu'elles soient superficielles (escarre, ulcère, furoncle, etc.) ou profondes (ostéomyélite, spondylodiscite, d'origine digestive, etc.). À côté de ces suppurations primitives, on distingue aussi les suppurations secondaires post-chirurgicales ou post-traumatiques. Ces prélèvements de pus sont très fréquents et constituent une grosse part de l'activité d'un laboratoire de bactériologie (Denis et *al.*, 2000)

#### 2.1 Pathogénèse

Les localisations purulentes sont variées et la nature des agents infectieux impliqués sera aussi très diverse. On distingue trois classes :

- **classe I** : les prélèvements proviennent de localisations normalement stériles (cerveau, adénopathie, bile, os, etc.) et, dans ce cas, si les prélèvements ont été effectués dans de bonnes conditions d'asepsie, les bactéries isolées sont directement impliquées dans le processus infectieux ;
- **classes II et III** : les prélèvements peuvent être effectués soit au niveau de zones profondes communiquant avec des flores commensales qui peuvent contaminer le prélèvement (c'est le cas des prélèvements d'origine digestive) – ce sont les prélèvements de classe II – ; soit dans des zones superficielles, et ils seront donc contaminés directement par la flore commensale, surtout s'ils sont effectués par écouvillonnage (c'est le cas des prélèvements cutanés à type d'escarre, de brûlures, de morsures, de plaies, etc.) – ce sont les prélèvements de classe III. Les bactéries recherchées seront différentes selon la localisation de la suppuration, le mode de prélèvement (seringue, biopsie, écouvillon) et le mode de transport (surtout pour la recherche d'anaérobies). Étant donné la diversité des localisations, tout prélèvement de « pus » la nature des agents infectieux impliqués sera aussi très diverse (tableau 4) (Dbreuil, 1997)

Tableau 4 : Microbiologie des infections de la peau.

Tableau 4 : Microbiologie des infections de la peau.				
Tissus non nécrosés			Tissus nécrosés	
	Germes			Germes
Tableau	Les plus fréquents	Moins fréquents	Tableau	Usuels
<b>Impétigo</b>	<i>S. pyogenes</i> <i>S. aureus</i>		Gangrène gazeuse	<i>Clostridium perfringens</i> , <i>C. septicum</i> (etc.)
<b>Érysipèle</b>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. aureus</i>	Fasciite nécrosante	Mélange aérobie-anaérobies <i>S. pyogenes</i>
<b>Ecthyma</b>	<i>S. aureus</i> <i>S. pyogenes</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Progressif	<i>Streptococcus</i> spp. + <i>S. aureus</i> (voire <i>Proteus</i> spp.)
<b>Cellulite</b>	<i>S. aureus</i> <i>S. pyogenes</i>	<i>H. influenzae</i> <i>P. multocida</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Aeromonas</i> spp.	Cellulite anaérobie	<i>C. perfringens</i> Mélanges aéro-anaérobies
<b>Abcès cutanés</b>	<i>S. aureus</i>			
<b>Furoncles</b>	<i>S. aureus</i>			
<b>Folliculites</b>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>		

### 3. Pathologies des liquides d'épanchement

Les liquides d'épanchement correspondent à une quantité anormale de liquide dans les séreuses.

Cette catégorie regroupe :

Les liquides pleuraux ;

Les liquides d'ascite ;

Les liquides péricardiques ;

Les liquides articulaires ;

Les liquides de dialyse péritonéale.

Les liquides d'épanchement peuvent avoir différentes étiologies. Ce sont soit des transsudats purement mécaniques (cirrhose, insuffisance cardiaque, syndrome néphrotique, etc.), soit des exsudats consécutifs à une infection ou à un cancer.

Les patients en dialyse péritonéale sont des patients à haut risque infectieux. Les cathéters de dialyse constituent une porte d'entrée potentielle de bactéries pouvant envahir la cavité péritonéale, très fréquemment des staphylocoques. L'analyse du liquide de dialyse péritonéale permet d'identifier la ou les bactéries en cause (François et *al.*, 2011)

### 3.1 Pathogénèse

Les liquides d'épanchement sont des prélèvements précieux à traiter en urgence car l'infection de ces liquides conduit parfois à des pathologies infectieuses graves, difficiles à traiter, pouvant entraîner des morbidités et mortalités élevées.

**Les arthrites septiques** sont des infections sévères qui peuvent avoir des conséquences fonctionnelles importantes jusqu'à être invalidantes. Elles nécessitent un diagnostic d'urgence. Ces infections sont la conséquence de l'extension d'une infection locale (ostéite, infection des parties molles) ou d'un traumatisme (injection, piqûre, etc.), ou encore d'une dissémination bactérienne par voie hématogène à partir d'un foyer primitif (cutané, ORL, respiratoire, urinaire, etc.). Certains facteurs favorisent ces infections, parmi lesquels le diabète, un âge > 80 ans, une polyarthrite chronique, une prothèse (Grenchert et Jeanne, 2006)

Les bactéries responsables d'arthrites purulentes varient selon l'âge et le mécanisme physiopathologique de l'infection : chez le nouveau-né et le nourrisson : streptocoque du groupe B, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* ; chez l'enfant : *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* (groupe A), *Kingella kingae*, pneumocoque ; chez l'adulte : *Staphylococcus aureus*, pneumocoque, *Streptococcus pyogenes* (groupe A), entérobactéries, entérocoques, streptocoques non groupables, méningocoques et gonocoques.

Après traumatisme, *Pseudomonas aeruginosa*, les bactéries anaérobies et *Borrelia burgdorferi* (morsures de tiques) peuvent être impliqués (Grenchert et Jeanne, 2006)

*Mycobacterium tuberculosis* provoque une ostéoarthrite du genou ou de la hanche, le plus souvent paucibacillaire (Grenchert et Jeanne, 2006)

Dans les infections sur prothèse, les bactéries les plus fréquemment isolées sont : *S. aureus*, *S. epidermidis*, streptocoques, *Propionibacterium acnes*, entérobactéries, *Pseudomonas*. Elles peuvent être polybactériennes (Grenchert et Jeanne, 2006)

**Les pleurésies purulentes** sont des infections secondaires de la cavité pleurale, le plus souvent consécutives à une pneumonie aiguë (notamment les pneumopathies d'inhalation) ou à un abcès pulmonaire. Une inoculation directe postchirurgicale est aussi possible (après chirurgie thoracique). Certains facteurs sont favorisants tels que le diabète, l'éthylisme, le cancer du poumon, les facteurs à risque de pneumonies d'inhalation. Une pleurésie correspond à une accumulation de liquide entre les deux feuillets de la plèvre. (Grenchert et Jeanne, 2006)

Les bactéries les plus souvent rencontrées chez l'adulte sont les streptocoques oraux, le pneumocoque, *Staphylococcus aureus*, les entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et des bactéries anaérobies. Chez les enfants, les bactéries les plus fréquemment isolées sont : *S. aureus*,

le pneumocoque, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes* (groupe A) et les bactéries anaérobies.

Un épanchement pleural est retrouvé dans 20 à 30 % des tuberculoses pulmonaires, avec plus rarement un empyème. Les liquides pleuraux non purulents correspondent le plus souvent à une insuffisance cardiaque, à une réaction inflammatoire ou à un processus néoplasique (Grenchert et Jeanne, 2006)

**L'ascite** correspond à un épanchement intrapéritonéal, le plus souvent abondant, alors que la péritonite est souvent limitée par une lame liquidienne.

Le liquide d'ascite est souvent stérile. Cette accumulation de liquide dans le péritoine est retrouvée chez des malades cirrhotiques, insuffisants cardiaques, néphrotiques ou cancéreux. L'infection du liquide d'ascite fait suite à une bactériémie ou à l'introduction de bactérie lors de ponction évacuatrice. L'infection du liquide d'ascite chez le cirrhotique intervient dans 10 à 30 % des cas, dont l'étiologie la plus fréquente est la translocation bactérienne à partir de la flore digestive ou secondaire à une bactériémie dans le cas d'hémorragies digestives. D'autres étiologies sont plus rares (origine pulmonaire, urinaire).

Les bactéries les plus fréquemment retrouvées sont majoritairement les entérobactéries, puis les entérocoques, le pneumocoque, les staphylocoques et des bactéries anaérobies. *Mycobacterium tuberculosis* peut aussi être à l'origine d'épanchement d'ascite lors de tuberculose péritonéale (Grenchert et Jeanne, 2006)

**La dialyse péritonéale** ambulatoire constitue un facteur de risque d'infection. Les sujets en cours de dialyse font une infection tous les 6 mois environ. Il s'agit d'une urgence. Le liquide de la poche de dialyse sera analysé dans les mêmes conditions qu'un liquide d'épanchement. Le plus souvent, la bactérie en cause est un staphylocoque fréquemment multirésistant aux antibiotiques à la suite d'une pression de sélection constante chez ces patients en dialyse.

**Le liquide péricardique** correspond à une accumulation de liquide dans la cavité péricardique. Ils sont le plus souvent secondaires à une pneumonie et sont favorisées par l'immunodépression. Les espèces bactériennes les plus fréquemment isolées sont : *S. aureus*, pneumocoque, streptocoques oraux, entérobactéries, *Coxiella burnetii* et les anaérobies. *Mycobacterium tuberculosis* peut aussi être responsable d'une péricardite, avec un épanchement liquidien important. Une synthèse des principaux germes retrouvés dans ces liquides d'épanchements est présentée dans le tableau 5 (François et al., 2011)

Tableau 5 : Principaux germes retrouvés en fonction des différents épanchements.	
Tableau clinique	Principaux germes en cause
Pleurésies infectieuses	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Mycobacterium tuberculosis</i></li> <li>• Parmi les non-tuberculeux :               <ul style="list-style-type: none"> <li>— aérobies :                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- streptocoques dont <i>S. pneumoniae</i></li> <li>- staphylocoques</li> <li>- bacilles à Gram négatif</li> </ul> </li> <li>— anaérobies :                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- cocci : <i>Veillonella, Prevotella, Peptococcus, Peptostreptococcus</i> -</li> <li>- bacilles : <i>Bacteroides, Fusobacterium</i></li> <li>- <i>Actinomyces, Nocardia</i></li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>
Infections abdominales	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bacilles à Gram négatif :               <ul style="list-style-type: none"> <li>— aérobies :                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Escherichia coli</i> : 60 %</li> <li>- <i>Klebsiella</i> spp. : 20 %</li> </ul> </li> <li>— anaérobies :                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Bacteroides</i></li> </ul> </li> </ul> </li> <li>• Cocci à Gram positif : <i>Enterococcus</i></li> </ul>
Péricardites	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Pneumocoques, Streptococcus, Staphylococcus aureus</i>, entérobactéries</li> <li>• Recherches particulières : <i>Rhodococcus equi, Legionella, Borrelia, Rickettsia, Mycoplasma, Mycobacterium tuberculosis</i> et mycobactéries atypiques, <i>Bartonella, Coxiella burnetii, Borrelia burgdorferi</i></li> <li>• Sans oublier : virus, champignons, parasites</li> </ul>
Infections ostéoarticulaires	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nourrisson/enfant : <i>S. pyogenes</i> (groupe A), <i>staphylococcus aureus</i>, pneumocoque, <i>Neisseria meningitidis</i> et <i>Haemophilus influenzae</i>, <i>Kingella kingae</i></li> <li>• Adulte : staphylocoques, streptocoques pneumocoques entérocoques, <i>Neisseria meningitidis gonorrhoeae, Pseudomonas</i> spp., Entérobactéries anaérobies</li> <li>• Recherches particulières : <i>M. tuberculosis</i> et mycobactéries atypiques, mais aussi <i>Brucella, Borrelia burgdorfer, Mycoplasma</i>, etc.</li> </ul>

#### 4. Physiopathologies de l'appareil génital féminin

Les nombreux antibiogrammes réalisés par excès sur des bactéries commensales vaginales conduisent à des dépenses de santé inutiles et à des traitements inadaptés finalement préjudiciables à l'état de santé des patientes. En effet, ces antibiothérapies ne soulagent pas les patientes, et induisent des pathologies vulvo-vaginales et des troubles digestifs parfois majeurs. En outre, elles favorisent l'émergence dans les flores vaginales, comme dans les autres flores naturelles, de bactéries résistantes aux antibiotiques, en particulier actuellement des entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE) (Nugent et al., 1991)

La concentration bactérienne varie de  $10^5$  à  $10^{12}$  bactéries par gramme de sécrétion vaginale selon la nature de la flore. La flore bactérienne dominante est composée d'une diversité de lactobacilles.

Les espèces les plus souvent retrouvées sont *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii* et *Lactobacillus iners*, mais de très nombreuses espèces différentes continuent à être décrites. La concentration usuelle des lactobacilles en l'absence de pathologie est située entre  $10^5$  et  $10^8$  bactéries par gramme de sécrétions vaginales. La flore vaginale normale est très diverse. Elle est constituée de  $10^5$  à  $10^8$  bactéries par gramme de sécrétions vaginales. Les bactéries d'intérêt médical peuvent être groupées en trois populations de bactéries définies en fonction de leur origine écologique (François et al., 2011) (Tableau 6)

Tableau 6 : Les bactéries d'intérêt médical

**Groupe I – La flore bactérienne de portage habituel (flore dominante) est spécifiquement adaptée à la cavité vaginale : elle est essentiellement constituée de lactobacilles (flore de Doderlein) de 1 à 4 espèces/femme.**

**Classiquement observables à la coloration de Gram sous la forme de gros bacilles à Gram positif, certaines espèces ont une apparence de bacilles à Gram positif plus fins voire coccoïdes en courtes chaînettes faisant penser à tort à des corynébactéries et des streptocoques.**

**Groupe II – La flore bactérienne issue de la flore digestive colonise souvent les voies génitales maternelles. Elle est observée chez 2 à 80 % des femmes selon les bactéries impliquées. Elle est constituée des éléments suivants :**

- *Streptococcus agalactiae* et *Enterococcus*
- enterobactéries ( *Escherichia coli* +++), mais aussi *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* et *Serratia* en particulier chez les patientes ayant reçu de multiples antibiothérapies
- bacilles à Gram négatif aérobies strictes chez les patientes ayant reçu de multiples antibiothérapies ou ayant été colonisées par des produits contaminés : *Pseudomonas*, *Acinetobacter* , etc.
- staphylocoques coagulase + et –
- bactéries anaérobies ( *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Fusobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Veillonella* spp., *Mobiluncus* , etc.)
- *Gardnerella vaginalis*
- *Atopobium vaginae*
- mycoplasmes, en particulier *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* ,
- streptocoques viridans (*S. acidominimus*, *S. intermedius*, *S. morbillorum* )
- *Candida albicans*

**Groupe III : Des hôtes usuels de la flore oropharyngée colonisent plus exceptionnellement la cavité vaginale. Cela est observé chez 0,1 à 2 % des femmes selon les bactéries en cause. Toutes les bactéries oropharyngées peuvent être isolées de la cavité vaginale, mais le plus souvent il s'agit de :**

- *Haemophilus influenzae* et *parainfluenzae*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Streptococcus pneumoniae*
- méningocoque et autres *Neisseria*, *Branhamella*, *Capnocytophaga*

#### 4.1 Vaginoses bactériennes

Des syndromes et des tableaux microbiologiques comparables à ce que l'on appelle actuellement « vaginoses bactériennes » ont été publiés dès la fin du XIX e siècle et au début du XX e siècle. Il s'agit de perturbation de l'écologie microbienne du milieu vaginal qui induit une prolifération bactérienne polymorphe ( $>10^8$  /g de sécrétions vaginales) de bactéries usuellement présentes dans le vagin (tableau 7). Le nombre de bactéries est 100 à 100 000 fois plus élevé que ce que l'on observe lorsque la flore vaginale est normale. (Gardner et *al.*, 1955)

**Tableau 7 : Principales bactéries de la flore vaginale normale retrouvées en grande quantité dans les tableaux de vaginose bactérienne et prévalence**

Bactéries	Flore normale	Vaginoses
<i>Prevotella</i>	40%	91%
<i>Peptostreptococcus</i>	60%	80%
<i>G. vaginalis</i>	11-69 %	90%
<i>M. curtisii et mulieris</i>	<6 %	14-96 %
<i>M. hominis</i>	0-22 %	24-75 %
<i>U. urealyticum</i>	50%	50%
<i>M. genitalium</i>	10%	<10 %
<i>Atopobium vaginae</i>	0-8 %	40-70 %
Mais aussi : <i>Streptococcus acidominus</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. morbillorum</i> , <i>Atopobium rimae</i> , <i>Bifidobacterium urinalis</i> , <i>Leptotrichia amnionii</i> , <i>Sneathia sanguinegens</i> , etc.		

#### 5. Physiopathologies de l'appareil génital masculin

Les pathologies génitales infectieuses sont relativement courantes chez l'homme. Trois entités nosologiques doivent être distinguées : les ulcérations génitales, les urétrites et les infections plus profondes (prostatites, épидидymites, etc.)

##### 5.1 Urétrites et prostatites

Il est classique de distinguer les urétrites gonococciques, dues à *Neisseria gonorrhoeae*, et les urétrites non gonococciques dues à *Chlamydia trachomatis*, à certains mycoplasmes génitaux (*Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma* spp.), et à *Trichomonas vaginalis*.

- *Neisseria gonorrhoeae* est responsable d'urétrite aiguë symptomatique, survenant 2 à 5 jours après le contact contaminant. L'urétrite se manifeste par un écoulement purulent dans 90 % des cas ; plus rarement, la symptomatologie peut être fruste.

- *Chlamydia trachomatis* (sérotypes D à K) est le principal agent des urétrites non gonococciques. La symptomatologie apparaît en moyenne dans les 10 à 20 jours suivant le contact contaminant. Dans la moitié des cas, l'urétrite est symptomatique, soit à type d'écoulement clair, soit à type de dysurie, pollakiurie ou brûlures mictionnelles ; plus rarement, il existe un écoulement purulent ; parfois, l'infection est asymptomatique (CLYTI E et *al.*,2004)

- *Mycoplasma genitalium* serait responsable d'environ 15 à 25 % des urétrites non gonococciques, et serait surtout impliqué dans les urétrites récidivantes et les urétrites chroniques, en particulier chez les homosexuels. L'écoulement est souvent présent, plus volontiers mucopurulent.

- *Ureaplasma* spp. Est également responsable d'urétrite, mais son implication est plus discutée, en raison d'un portage génital féminin et masculin totalement L'association *Mycoplasma hominis* urétrite masculine, que l'urétrite soit aiguë ou chronique, n'a pas été clairement démontrée.

- *Trichomonas vaginalis* est un protozoaire flagellé responsable de 5 à 15 % des urétrites non gonococciques.

- Les autres germes sont plus rarement à l'origine d'urétrites : *Haemophilus* spp., streptocoques, entérobactéries, etc.

Le principal mode de contamination est la voie canalaire, soit par voie descendante à partir de la vessie, soit par voie ascendante à partir de l'urètre. Les manœuvres instrumentales (sondage vésical, endoscopie, biopsie, chirurgie, etc.) sont des facteurs favorisant l'infection.

Les étiologies bactériennes varient en fonction du caractère nosocomial et/ou iatrogène de la prostatite : *Escherichia coli* est la première cause ; les autres entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa* sont plus rarement en cause, de même que les entérocoques et les mycoplasmes génitaux (*Ureaplasma* spp., *Mycoplasma genitalium* ) (Dominique et *al.*,2004)

## 6. Germes pathogènes des selles

Les diarrhées aiguës infectieuses sont responsables, dans les pays en voie de développement du tiers des décès par déshydratation. Elles restent fréquentes dans nos régions comme en témoigne la fréquence des toxi-infections alimentaires familiales ou des collectivités (crèches, etc.).

Tous les épisodes diarrhéiques (selles fécales) ou dysentériques (selles aqueuses, non fécales) ne sont pas infectieux. Toutes les diarrhées infectieuses ne sont pas bactériennes (parasites, levures, virus). Toutes les diarrhées bactériennes ne sont pas dues à des bactéries spécifiques (diarrhées par dysmicrobisme, c'est-à-dire par modification dans l'équilibre des flores intestinales). La prescription d'une coproculture doit être envisagée après avoir éliminé une cause non infectieuse de diarrhée grâce à l'examen clinique et l'interrogatoire.

De nombreuses bactéries sont incriminées dans l'étiologie des diarrhées infectieuses aiguës. Certaines d'entre elles ont un pouvoir entéropathogène bien établi (*Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Campylobacter* sp., *Yersinia* sp., etc.) (Tableau 8) (François et al., 2011)

Tableau 8 : Mécanismes pathogéniques des bactéries entéropathogènes.

Entéro-invasif	Cytotoxique	Toxigénique	Adhérent
<i>Salmonella</i>	<i>C difficile</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	EPEC
<i>Shigella</i>	<i>Shigella</i>	<i>Shigella</i>	EHEC
<i>Y. enterocolitica</i>	EPEC	<i>Y. enterocolitica</i>	
<i>Campylobacter</i>	EHEC	ETEC	

D'autres bactéries sont devenues pathogènes après acquisition de facteurs de virulence. C'est le cas en particulier d'*Escherichia coli*, espèce représentant 80 % de la flore intestinale aérobie de l'homme. *E.coli* est à la fois une bactérie commensale et une bactérie entéropathogène par l'expression de facteurs de virulence acquis et/ou constitutifs. Ainsi, un pouvoir entéropathogène est actuellement reconnu pour six pathovars d'*E. coli* :

- Les *E.coli* entérotoxigènes (ETEC) sont responsables de diarrhées infantiles dans les pays en voie de développement et de la diarrhée du voyageur.
- Les *E.coli* entéroinvasifs (EIEC) sont responsables de dysenteries proches de la shigellose.
- Les *E.coli* entérohémorragiques (EHEC) sont retrouvés au cours des colites hémorragiques et du syndrome hémolytique et urémique (SHU) typique.
- Les *E.coli* entéropathogènes (EPEC) sont la cause de diarrhées infantiles persistantes souvent épidémiques dans les pays en voies de développement. Certains sérotypes d'EPEC ont également été incriminés au cours du SHU.
- Les *E.coli* à adhésion diffuse (diffuselyadhering *E.coli* [DAEC]) et les *E.coli* entéroagrégatifs (EAggEC) sont à l'origine de diarrhées aqueuses persistantes chez l'enfant.

Le but essentiel de la coproculture est de rechercher, parmi une flore commensale très abondante, des bactéries habituellement absentes et réputées pour leur pouvoir pathogène. On peut également, en plus de la recherche de ces bactéries, mettre en évidence des toxines ou des gènes codant pour les toxines dans les selles (*Clostridium difficile*, EHEC).

Les recherches sont fonction des différents contextes cliniques ; adulte ou enfant de plus de 2 ans et contexte par défaut :

- Réalisation d'une coproculture standard comprenant la recherche de *Salmonella* spp., de *Shigella* spp. Et de *Campylobacter* spp. (Voire *Yersinia enterocolitica* si le sujet est diarrhéique).

Enfant de moins de 2 ans :

- Réalisation d'une coproculture standard en sachant que l'étiologie virale prédomine dans cette tranche d'âge.

Contextes cliniques particuliers :

- Notion de voyage récent en « pays tropical » ;
- Malade sous traitement antibiotique ;
- Toxi-infection alimentaire collective (TIAC) ;
- Patients infectés par le VIH ;
- Syndrome hémolytique et urémique (SHU) ;
- Intoxication alimentaire ;
- Syndrome cholériforme ;
- Détection de colonisation par des bactéries multirésistantes (BMR) ; détection de portage chez le personnel de restauration (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella*). (François et al., 2011)

### 7. Les infections de la sphère oropharyngée

Les infections de la sphère ORL regroupent les atteintes des voies aériennes supérieures, c'est-à-dire le nez, la gorge et les oreilles.

L'oropharynx est colonisé par de nombreuses populations bactériennes commensales voisines de celles de la bouche ou du nez. La présence des formations lymphoïdes des amygdales et du pharynx (végétations), constituant l'anneau de Waldeyer, augmente les moyens de défense locaux antibactériens.

L'angine est une infection douloureuse et fébrile des amygdales voire de l'ensemble du pharynx. La majorité des angines est d'origine virale. L'angine peut être isolée ou peut accompagner une pathologie dont elle constitue l'un des symptômes, souvent le premier (grippe, rougeole, oreillons, mononucléose infectieuse, scarlatine, rhumatisme articulaire aigu, etc.).

On distingue trois types d'angines à germes spécifiques :

- l'angine érythémateuse ou érythématopultacée due aux streptocoques  $\beta$ -hémolytiques (le plus fréquent étant le streptocoque du groupe A) ;
- l'angine pseudomembraneuse due au bacille de la diphtérie (*Corynebacterium diphtheriae*), très rare dans nos régions ;
- l'angine ulcéronécrotique de Vincent due à l'association fusospirillaire.

Le streptocoque  $\beta$ -hémolytique du groupe A (SGA) est le premier agent bactérien en cause dans l'angine, mais l'angine streptococcique ne représente que 25 à 40 % des angines de l'enfant et 10 à 25 % des angines de l'adulte.

La sinusite aiguë purulente correspond à une infection d'une ou de plusieurs cavités sinusiennes par des bactéries. Les germes les plus souvent rencontrés figurent dans le tableau 9 (François et *al.*, 2011)

Tableau 9 : Germes les plus fréquents au niveau des sinus et des fosses nasales dans un contexte infectieux	
<b>Pus de fosses nasales (sinusite, parfois rhinopharyngite)</b>	<i>H. influenzae</i> <i>S. pneumoniae</i> , <i>Moraxella</i> ( <i>Branhamella</i> ) <i>catarrhalis</i> <i>S. aureus</i>
<b>Prélèvement de fosses nasales dans le bilan d'une staphylococcie récidivante</b>	<i>S. aureus</i>
<b>Sinusite aiguë</b>	— Chez l'enfant : <i>H. influenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i> — Chez l'adulte : <i>H. influenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>M. catarrhalis</i> , <i>S. aureus</i> , anaérobies, <i>Streptococcus pyogenes</i> (groupe A)
<b>Sinusite chronique</b>	Idem sinusite aiguë + bacilles à Gram négatif aérobies + anaérobies ( <i>Fusobacterium</i> spp., <i>Prevotella</i> spp.) + <i>Aspergillus</i> spp.
<b>Suspicion de coqueluche</b>	<i>Bordetella pertussis</i>

# Matériels et méthodes

### **III. Matériels et méthodes**

#### **1. Objectif du travail**

Ce travail représente une étude qui porte une caractérisation biochimique et l'évaluation de la résistance aux antibiotiques d'isolats d'origine clinique. Cette étude a été réalisée dans une période de 3 mois, à partir de janvier 2017 jusqu'au 30 Mars 2017. Plusieurs types de prélèvements et de produits pathologiques ont été étudiés afin d'isoler différents isolats de type bacilles Gram négatif. L'objectif est d'évaluer la résistance des souches pathogènes et l'émergence de résistance aux antibiotiques chez ces isolats dans la région de Tébessa ce qui a pour but de mettre en évidence les types des souches bactériennes des différents isolats cliniques dominants de les caractériser et les identifier.

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire « Dr Brahimi » à Tébessa, ce dernier est un laboratoire d'analyse médicale dont plusieurs spécialités, biochimie, microbiologie, immunologie et hormonologie ; accueillant plus de centaine de patients en moyenne par jour, de différents âges, construit en 2009.

#### **2. Matériels**

##### **2.1 Instrument et appareillages**

- Boîte Pétri ;
- Gants ;
- Anse de platine ;
- Écouvillons ;
- Pince ;
- Bec Bunsen ;
- Étuve ;
- Réfrigérateur ;
- Portoir ;
- Tubes à essai ;
- Pied à coulisse ;
- Lames et lamelles ;
- Microscope ;
- Vitek2 ;

## 2.2 Réactifs et produits utilisés

- Galerie Api 20 E (Biomérieux) ;
- KOVACS ;
- VPI
- VPII
- TDA
- Huile de vaseline ;
- Lugol ;
- Violet de Gentiane ;
- Alcool ;
- Fuchsine basique.

## 2.3 Les antibiotiques

**Tableau 10 : Tableau des différents antibiotiques utilisé**

Famille	Les Antibiotiques testé
$\beta$ -lactamines	Céfotaxime (CTX) Cefoxitine (FOX)
Aminosides	Gentamycine (CN) Amikacine (AK)
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine (CIP)
Quinolones	Acide.nalidixique (NA)
Sulfamides et associés	Sulfamethoxazole+trimet hroprime (SXT)
Autres	Furane (F) Fosfomycine (FF) Rofampicine

## 2.4 Milieux de culture (Annexe 05)

- ✓ Gélose CHROMagar orientation ;
- ✓ Milieu Muller-Hinton;

### **3. Méthodes**

#### **3.1 Origine de prélèvements et la recherche des souches bactériennes**

Les prélèvements sont de diverses origines, chacun est prélevé avec des précautions données, les prélèvements provenant de divers produits pathologiques recueilli par le personnel de laboratoire. Ainsi, des informations concernant chaque prélèvement effectué ont été notées à la réception des prélèvements : type du prélèvement, la date, l'âge et le sexe du patient.

##### **3.1.1 Recherche et isolement des germes**

On procède directement à une recherche de germes et cela avec un ensemencement en déchargeant en stries condensées l'anse de platine du prélèvement de produits pathologiques (urine, pus, prélèvement vaginal, sperme, liquides d'épanchement, prélèvement de gorge) sur la surface de milieu sélectif CHROMagar orientation pour l'isolement des bactéries.

##### **3.1.2 Lecture**

Après ensemencement sur la gélose CHROMagar orientation et incubation à l'étuve à 37°C pendant 24 heures, certains bacilles à Gram négatif se présentent comme suit (figure10) :

*E.coli* : rose foncé à rougeâtre

*Klebsiella* , *enterobacter* , *citrobacter* : bleu métallique

*Proteus et providencia* : halo marron

*Pseudomonas* : crème, translucide

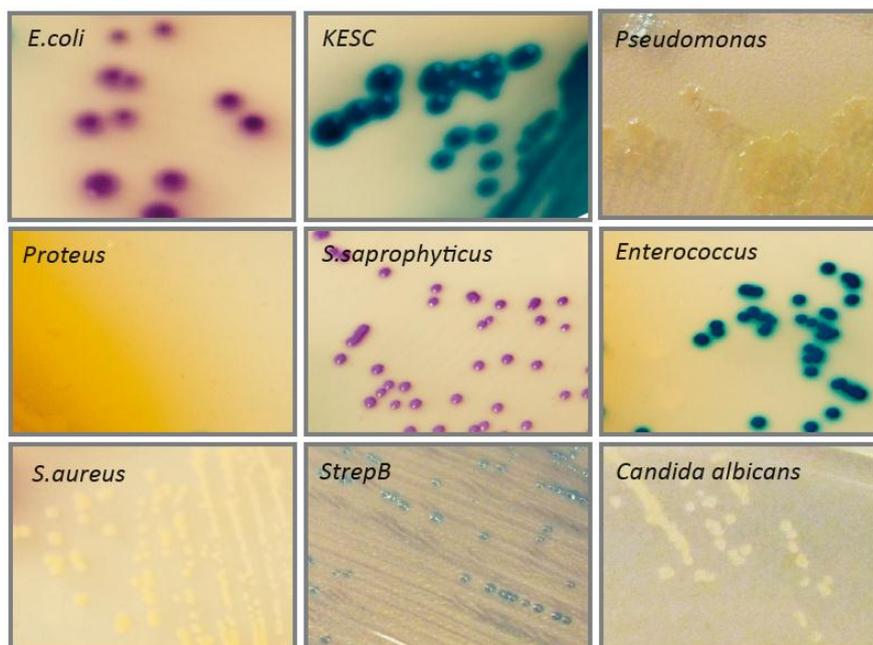


Figure 10 : L'aspect des colonies sur CHROMagar orientation

### 3.2 Coloration de Gram

La coloration de Gram est utilisée en microbiologie pour différencier des bactéries Gram positives et Gram négatives. C'est une étape très importante dans la classification et la différenciation des populations de microorganismes.

#### 3.2.1 Méthode

- **Préparation du Frottis**

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.

- **Réalisation de la coloration**

Coloration primaire : Coloration par le violet de gentiane ou cristal violet. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Rincer à l'eau déminéralisée.

-Mordantage au lugol (solution d'iode iodo-iodurée) : étaler le lugol et laisser agir 60 secondes ; Rincer à l'eau déminéralisée. On peut réaliser une deuxième fois l'opération identiquement pour plus de sécurité.

- Décoloration (rapide) à l'alcool (+acétone) : verser goutte à goutte l'alcool ou un mélange alcool-acétone sur la lame inclinée obliquement, et surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer sous un filet d'eau déminéralisée.

- Contre-coloration à la fuchsine. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à l'eau déminéralisée. Sécher la lame sur une platine chauffante à 40°C, 10 à 15 minutes

### **3.2.2 Lecture**

Les bactéries à Gram + vont rester colorées en violet tandis que celles à Gram – vont prendre la teinte de la contre-coloration qui sera appliquée dans un dernier temps.

### **3.3 Méthodes d'identification**

Après la pré-identification des souches par le milieu chromogène, et la coloration de Gram une identification complète se réalise selon deux méthodes, la première avec la galerie API 20E et la deuxième avec un système automatisé Vitek 2

#### **3.3.1 Galerie API 20E**

##### **3.3.1.1 Principe**

L'identification a été faite par la galerie rapide API système (Analytical profil index). API 20E est un système pour l'identification des entérobactéries et autres bacilles à Gram négatifs non fastidieux, utilisant 20 tests biochimiques standardisés et miniaturisés (figure 12), ainsi qu'une base de données. Ces galeries API 20E (Biomérieux) sont fournies par l'IPP (Institut Pasteur de Paris), il s'agit de galerie qui se présente sous forme de produits desséchés que l'on réhydrate par inoculation de la suspension du germe à tester. (Biomérieux,2000)



**Figure 11:Galerie Api 20 E (Biomérieux)**

### **3.3.1.2 Technique**

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

En effet, on retire la galerie de son emballage individuel et on la dépose dans la boîte d'incubation, puis on prépare l'inoculum bactérien : une colonie dans 5ml d'eau physiologique, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland.

Pour inoculer la galerie, il faut remplir à l'aide d'une pipette Pasteur les tubes et les cupules des tests CIT, VP et GEL avec la suspension bactérienne, et pour les autres tests ; on va remplir uniquement les tubes (et non les cupules) avec la création d'une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H<sub>2</sub>S en remplissant leur cupule par l'huile de vaseline stérile.

Enfin, on incube à  $37\text{ C}^{\circ} \pm 1\text{ C}^{\circ}$  pendant 18-24 heures.

### **3.3.13 Lecture**

La lecture des galeries API 20E se fait selon un tableau de lecture suivant les indications de Biomériux (Tableau11). Après codification des réactions en un profil numérique, on se réfère à un catalogue analytique où l'identification est donnée avec un pourcentage et une appréciation. (Figure 12)

## Matériels et méthodes

**Tableau 11 : Tableau de lecture de la galerie Api 20 E (biomérieux, 2002)**

Microtube	Substrat	Caractère recherché	Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	$\beta$ -galactosidase	Lecture directe		
ADH LDC ODH	Arginine Lysine Omithine	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Omithine décarboxylase	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H <sub>2</sub> S	Thiosulfate de sodium	Production d'H <sub>2</sub> S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d' $\alpha$ -naphthol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		
NO <sub>2</sub> / N <sub>2</sub>	Nitrates (NO <sub>3</sub> )	Nitrate réductase	Lecture indirecte dans la cupule GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif		

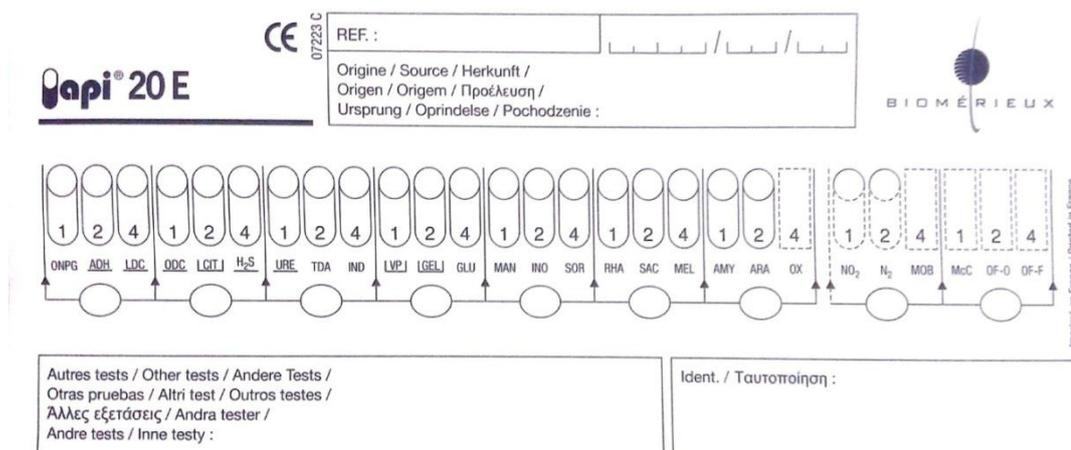


Figure 12 : la feuille après lecture de code à 7 chiffres

### 3.3.2 Système automatisé Vitek 2 (Biomerieux)

#### 3.3.2.1 Principe

Vitek 2 est un système automatisé de détection et d'identification de l'antibiorésistance proposé par bioMérieux (figure 13), y compris des bactéries multirésistantes (BMR). Son concept d'expertise informatisée est basé sur l'Advanced Expert System, qui permet d'identifier les phénotypes de résistance par comparaison avec les CMI de référence internationale. Le système expert permet de contourner les difficultés de détection des résistances, notamment celles liées aux variations des bactéries.

L'automate identifie les bactéries Gram positif en 2 h et les bactéries Gram négatif en 3 h, les levures en 15 h, les antibiogrammes étant rendus entre 2 et 7 h. Pour le clinicien, ces performances ont l'avantage de pouvoir prescrire plus précocement l'antibiotique le mieux ciblé le consommable se présente sous la forme de cartes miniaturisées de 64 cupules (une par groupe microbien). (Figure14)

Vitek 2 peut s'intégrer dans les systèmes d'information des laboratoires et des réseaux de surveillance en temps réel des résistances, en s'adaptant aux spécificités de chaque laboratoire.



**Figure 13 :l'automate Vitek2 avec ses périphériques**

1. Interface utilisateur, écran et clavier
2. Porte de remplissage avec indicateur
3. Porte de chargement avec indicateur
4. Porte de collecte des déchets
5. Porte d'accès utilisateur
6. DensiChek plus (densitomètre)
7. PC station de travail (environnement Windows + Logiciel de gestion du Vitek 2 Compact)
8. Cassette avec des cartes ID et/ou AST (portoir)

### **3.3.2.2 Technique**

Préparation de la suspension bactérienne ; La préparation de l'inoculum est toujours manuelle :

- deux tubes secs contenant 3ml de solution saline sont utilisés l'un pour l'identification et l'autre pour l'antibiogramme.

- avec une pipette, les colonies isolées sont sélectionnées et mises en suspension homogène dans les tubes précédents et bien mélangées avec le vortex.

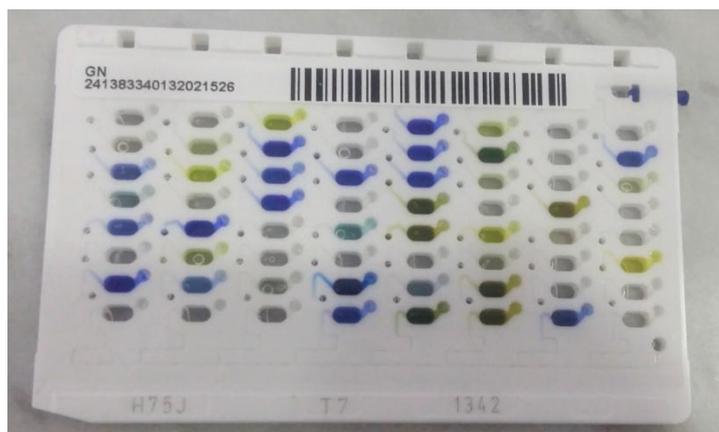
Cette suspension bactérienne est standardisée selon les méthodes appropriées en utilisant le Densicheck Plus.

Le volume de l'inoculum doit être de 0,5 à 0,63 Mac Farland pour les bactéries Gram négatives.

- Une carte d'identification et une autre d'antibiogramme, sont placées sur la cassette en plongeant les pailles de transfert dans les tubes contenant la suspension mère.

- Fermeture de la porte après le chargement de la cassette dans l'instrument (chambre d'inoculation).

- Le bouton « lancer le remplissage » est actionné ; un voyant lumineux indique au bout de 70 secondes que le cycle de remplissage est terminé.
- La cassette est retirée de la chambre d'inoculation puis placée à l'intérieur du lecteur incubateur (dans un délai maximum de 10 minutes).
- Un voyant lumineux indique que le chargement des cartes est terminé. La cassette vide est retirée du lecteur-incubateur.
- L'instrument lit les codes à barres des cartes et de la cassette et envoie automatiquement les informations au logiciel.



**Figure 14 : la carte utilisée après l'incubation et lecture des résultats**

## **4. Etude de la résistance aux antibiotiques**

### **4.1 Principe**

L'antibiogramme est réalisé par la méthode de diffusion en gélose (méthode des disques), selon le communiqué du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM, 2010), qui repose sur la connaissance du phénotype sauvage caractéristique de l'espèce et de différents phénotypes de résistance acquis. Ces dernières sont définies non seulement par des caractères de résistance en termes de catégories clinique ("I" ou "R"), mais aussi en termes de diminution significative de sensibilité et par des images typiques (Synergie, Antagonisme)

### **4.2 Technique**

A partir d'une culture pure de 18-24 h sur milieu gélosé Mueller-Hinton, une suspension en 5 ml de solution saline (0,9 % NaCl) a été préparée en équivalente au standard McFarland 0,5 (~ 10<sup>8</sup> UFC/ml). A partir de cette suspension bactérienne, une dilution au 1/10 dans l'eau physiologique (0,9 % NaCl) a été réalisée et bien homogénéisée ; puisensemencée par écouvillonnage sur des boîtes de Pétri gélosées en Mueller-Hinton.

- **Application des disques d'ATB**

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

### **4.3 Lecture**

La lecture a été faite par la mesurer avec précision les différents diamètres des zones d'inhibition, en comparaison ces résultats aux valeurs critiques figurant dans l'Annexe N°1,2 et 3.

Les bactéries ont été classées dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire ou Résistance.

## **5. Tests de détection de Beta lactamase à spectre étendu (BLSE)**

Après la réalisation l'antibiogramme, en cas de réduction de la sensibilité aux céphalosporines de troisième génération, les BLSE ont été mises en évidence par la recherche d'une synergie entre l'acide clavulanique et les céphalosporines de troisième génération selon les techniques suivantes.

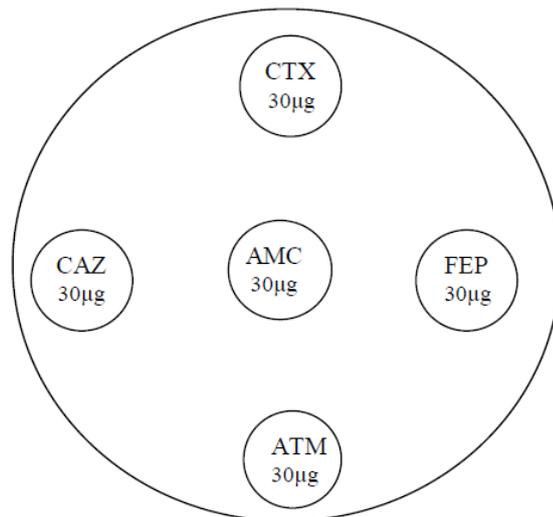
### **5.1 Test de synergie**

#### **5.1.1 Principe**

Le teste de synergie permet la détection de  $\beta$ -lactamases à spectre étendue chez une souche donnée. Ces enzymes peuvent être mises en évidence par la méthode des disques, qui consiste à rechercher une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de B-lactamase et les disques de céphalosporines de troisième génération (cefotaxime, ceftazidime et céfepime) et l'aztréonam. Cette image dite en "bouchon de champagne". (**Jarlier et al. 1988**).

#### **5.1.2 Technique**

La recherche de  $\beta$ -lactamase à spectre étendue est fait dans les conditions standard de l'antibiogramme, puis en disposant les disques d'ATB : un disque d'Amoxicilline + acide clavulanique (AMC 20/10) et les disques de C3G (CTX 30 $\mu\text{g}$ , FEP 30 $\mu\text{g}$ , CAZ 30 $\mu\text{g}$ ) et l'aztréonam (ATM 30 $\mu\text{g}$ ) à une distance de 20 à 30 mm sur les boites de Pétri (Figure 15). Incubation pendant 18 heures à  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .



**Figure 15 : Disposition des disques d'antibiotiques pour le test de synergie.**

### **5.1.3 Lecture**

La production des enzymes BLSE se traduit par l'apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne entre les disques d'AMC et les C3G.

# Résultats et discussion

#### IV. Résultats et discussion

##### 1. Souches bactériennes

Les résultats de la mise en culture on permet d’obtenir une collection de 211 souches qui ont était isolés de différents origine 92% des isolats répartis aux urines, 3% aux prélèvements de pus 2% aux spermo-culture et 1% aux prélèvements de gorge et d’oreille respectivement (figure 16)

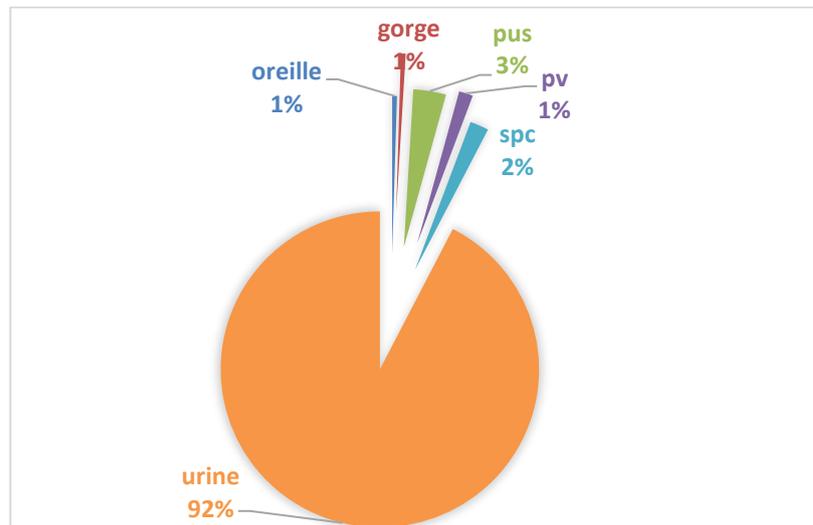


Figure 16 : répartition des isolats clinique selon l’origine

##### 2. Répartition des souches selon l’orientation de milieu

Les 211 souches de bacilles Gram négatif isolées et purifiées sur le milieu primaire d’orientation qui permet la différenciation des souches selon leurs couleurs donc les pré-identifiés (figure 17). Les souches sont réparties en plusieurs espèces selon l’orientation du milieu : 104 isolat d’*Esherichia coli*, 72 isolats de *Klebsiella pneumoniae*, 14 isolat *Pseudomonas aeruginosa* , 11 isolat *Proteus mirabilis*, 8 isolats d’*Acinetobacter baumannii* (Tableau 12)

Le tableau détaillé des prélèvements et des résultats est représenté dans l’annexe 4.

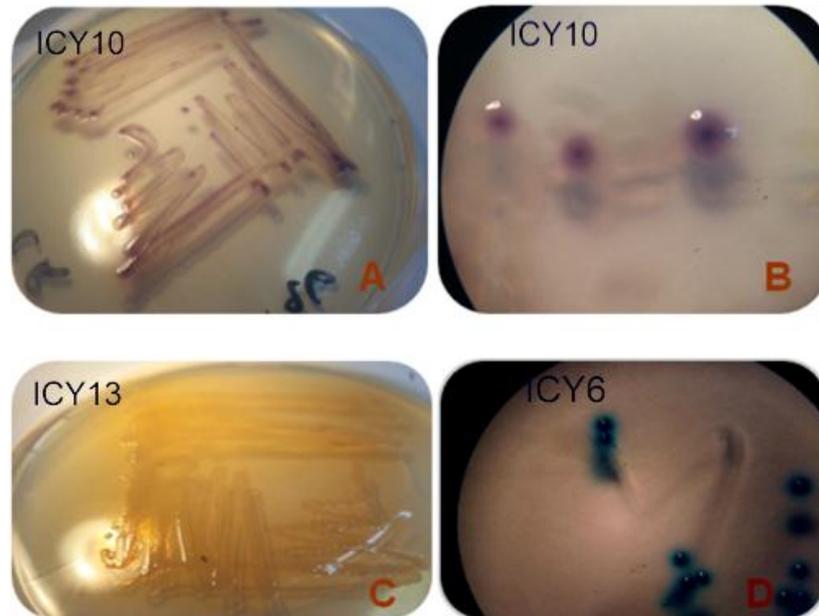


Figure 17 : forme typique des clones obtenues

Tableau 12 : répartition des isolats

Les espèces	Nombre d'espèces
<i>Acinetobacter baumannii</i>	8
<i>Escherichia coli</i>	104
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	72
<i>Proteus mirabilis</i>	11
<i>Providencia stuartii</i>	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
<b>Total</b>	<b>211</b>

Ce milieu a servi à un gain du temps en cas de présence d'une contamination ou une flore mixte où l'antibiogramme n'aura pas rétablie, des études approfondies ont été faites par Ods en 1994 aux états unis en utilisant ce milieu de pré-identification

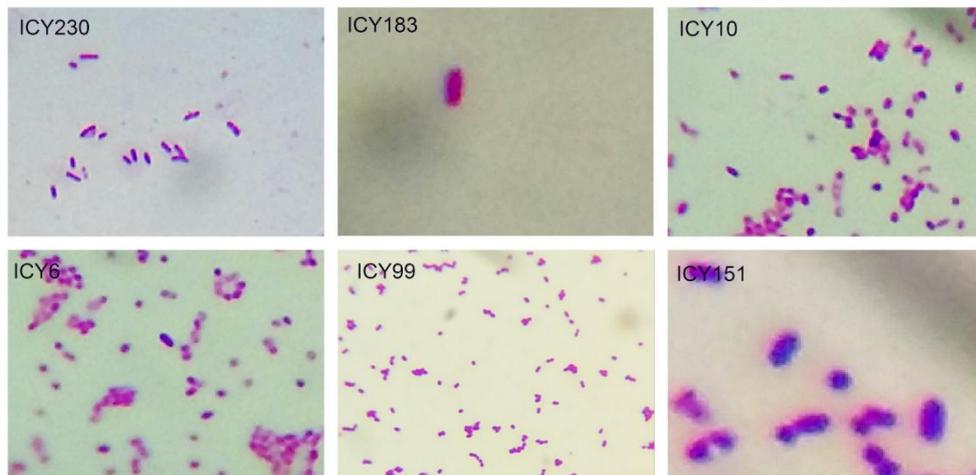
CHROMagar orientation semble être un milieu bien adapté pour le laboratoire bactériologique. Il peut servir d'un milieu d'isolement primaire et différentiel aux isolats cliniques de divers sites de prélèvement. Le milieu aide à la détection, l'identification présumée, et différenciation de quelques bacilles Gram négatifs, particulièrement quand des données biochimiques incertaines sont obtenues, et la détection des cultures bactériennes mixtes, de sorte que l'identification et l'antibiogramme plus exactement soient rapportées.

« Le mélange chromogène » des substrats dans l'agar semblent être enzymatique spécifique au genre et/ou à l'espèce pour certains bacilles Gram négatifs et des espèces entérococciques sont généralement plus rencontrés. Des espèces moins fréquemment trouvées de famille

*Enterobacteriaceae* et d'*Enterococcus* spp on besoin d'être mieux étudié avant de mettre en compte leurs couleurs déjà apparus. CHROMagar orientation est utile dans l'interprétation des résultats de culture sans identification complète du microorganisme. À cet effet, nous soulignons toujours que les espèces identifiées selon des caractéristiques différentielles sur un milieu primaire sont seulement une procédure de dépistage et peuvent ne jamais servir à remplacer une identification complète et les tests appropriés (Oddset Bernaerts. 1994).

### 3. Coloration de Gram

Pour cela une coloration de Gram était établie comme un test confirmatif pour quelques souches (figure 18)



**Figure 18 : Coloration de Gram pour quelques espèces**

### 4. Identification

Cette étape a été réalisée par deux méthodes :

#### 4.1 Galerie biochimiques Api20 E

Après une pré-identification des 211 isolats 07 isolats d'entre eux ont subis une identification complète avec la galerie api 20 E (figure 19), les résultats ont été interprétés avec le profil biochimique composé d'un code de 7 chiffres dans le tableau suivant : (tableau 13)

Tableau 13 : Les espèces identifiées par Api 20 E

Code de l'espèce	Profil biochimique	Espèces
ICY196	0234000	<i>Providencia stuartii</i>
ICY230	2206002	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
ICY177	5043102	<i>Escherichia coli</i>
ICY193	5044102	<i>Escherichia coli</i>
ICY183	0337000	<i>Proteus mirabilis</i>
ICY201	5044552	<i>Escherichia coli</i>
ICY151	0536000	<i>Proteus mirabilis</i>



Figure 19 : une espèce *Proteus mirabilis* identifié par Api 20 E (ICY83)

#### 4.2 Système automatisé vitek2

Parmi les 211 isolats cliniques obtenues 40 isolats bacilles Gram négatif d'entre eux ont subit des identifications complètes et antibiogrammes réalisé par Vitek 2 compact, les résultats sont affichés avec le logiciel lié à l'automate sous forme des rapports apparait comme suit (figure) :

## Résultats et discussion

LAM Dr BRAHIMI

**Rapport du laboratoire**

N° Client bioMérieux : 13432  
Référence du système : VK2C 13432

Nom du patient :  
Groupe d'isolats : 461116-1

Type de carte : AST-N233 Instrument de test : 000017086E9A (LAM BRAHIMI)

Imprimé par : LabSuper  
ID du patient : 461116  
Paillasse : ECBU

Numération :  
Germe sélectionné : Escherichia coli

Commentaires :

Informations sur l'identification	Escherichia coli
Germe sélectionné	Par : LabSuper
Commentaire sur l'ident. :	

Résultats Antibiogramme	Carte : AST-N233	N° de lot : 633391610	Péremption n : 3 sept. 2017 13:00 CDT		
	État : Final		Heure de l'analyse : 10,75 heures		
Antibiotique	CMI	Interprétation	Antibiotique	CMI	Interprétation
Ampicilline	>= 32	R	Imipénème	<= 0,25	S
Amoxicilline/acide clavulanique	16	I	Amikacine	<= 2	S
Ticarcilline	>= 128	R	Gentamicine	<= 1	S
Pipéracilline/tazobactam	8	S	Tobramycine	<= 1	S
Céfalocone	4	S	Acide nalidixique	>= 32	R
Céfoxitine	<= 4	S	Ciprofloxacine	<= 0,25	S
Céfotaxime	<= 1	S	Ofloxacine	1	S
Ceftazidime	<= 1	S	Nitrofurantoïne	<= 16	S
Ertapénème	<= 0,5	S	Triméthoprimo/sulfaméthoxazole	>= 320	R

== Antibiotique déduit \* = Modification AES \*\* = Modification Utilisateur

Résultats AES :	Dernière modification : 21 déc. 2015 08:47 : CST	Normes/Phénotype : Global CLSI-based + Natural Resistance
Niveau de fiabilité :	Concordant	

LAM Dr BRAHIMI

**Rapport du laboratoire**

N° Client bioMérieux : 13432  
Référence du système : VK2C 13432

Nom du patient :  
Groupe d'isolats : 491116-1

Type de carte : GN Instrument de test : 000017086E9A (LAM BRAHIMI)  
Type de carte : AST-N233 Instrument de test : 000017086E9A (LAM BRAHIMI)

Imprimé par : LabSuper  
ID du patient : 491116  
Paillasse : ECBU

Profil biochimique : 0002043141500000

Commentaires :

Informations sur l'identification	Carte : GN	N° de lot : 241370840	Péremption : 7 févr. 2017 12:00 CST
	État : Final		Heure de l'analyse : 5,50 heures
Germe sélectionné	97% de probabilité Pseudomonas aeruginosa		
Germe SRF	Profil biochimique : 0002043141500000		
Fiabilité : Excellente identification			
Germe(s) identifiés et tests discriminants :			
Commentaire sur l'ident. :			
Tests à l'encontre Pseudomonas aeruginosa dTRE(B).			

Résultats Antibiogramme	Carte : AST-N233	N° de lot : 633391610	Péremption n : 3 sept. 2017 13:00 CDT		
	État : Final		Heure de l'analyse : 12,00 heures		
Antibiotique	CMI	Interprétation	Antibiotique	CMI	Interprétation
Ampicilline	>= 32	R	Imipénème	>= 16	R
Amoxicilline/acide clavulanique	>= 32	R	Amikacine	<= 2	S
Ticarcilline	32	S	Gentamicine	<= 1	S
Pipéracilline/tazobactam	<= 4	S	Tobramycine	<= 1	S
Céfalocone			Acide nalidixique	>= 32	R
Céfoxitine	>= 64	R	Ciprofloxacine	0,5	S
Céfotaxime	32	*R	Ofloxacine	1	S
Ceftazidime	4	S	Nitrofurantoïne	256	R
Ertapénème			Triméthoprimo/sulfaméthoxazole	>= 320	R

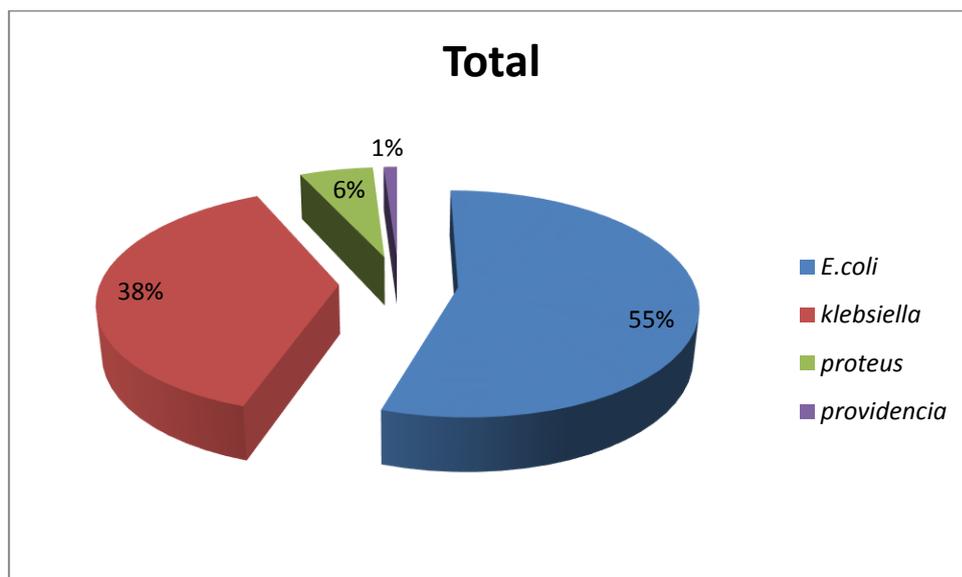
== Antibiotique déduit \* = Modification AES \*\* = Modification Utilisateur

Figure 20 : le Rapport des résultats obtenus par le système automatisé vitek2

Ce système automatisé fournit une identification et réalise des tests caractéristiques en quelques heures, qui diffèrent de son ancien modèle par l'identification définitive des bacilles Gram négatif et quelques *Enterococaceae* en 3 heures en utilisant une nouvelle technologie basée sur fluorescence extrêmement sensible en détectant les changements métaboliques (Funke et *al.*,1997) la surveillance continue des réactions permet une identification plus rapide par rapport aux systèmes classique qui nécessite une incubation de 24 h. d'ailleurs la cinétique de croissance dans ce système est continuellement surveillé et d'un algorithme qui ne dépend pas des espèces pour déterminer les CMI (Gayral et *al.*,1997)

### 5. Répartition des Bacilles Gram négatif fermentaire

Après l'identification des 211 souches de bacilles Gram négatif de différentes origines ; 189 isolats d'entre eux sont classée parmi les enterobactéries ; *Esherichia coli* représente l'espèce la prédominante avec un pourcentage de 55 % ensuite *Klebsiella pneumoniae* (38%), *Proteus mirabilis* (6%) ,*Providencia stuartii* (1%) (figure 21)



**Figure 21 : Répartition des entérobactéries**

Ce qui est approximativement semblable à des résultats au Maroc parmi 511 souches d'entérobactéries isolées chez des patients consultants à l'hôpital de Moulay Ismail à Meknes, *Escherichia coli* représente l'espèce prédominante (80 %), suivi de *Klebsiella pneumoniae* spp. (10 %) et de diverses autres espèces (10 %) : *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* (Lahlou et *al.*,2009)

## 6. Répartition des bacilles Gram négatif non fermentaire

Les résultats des bacilles Gram négatif non fermentaires sont de 22 isolats, provenant de diverses origines, où 64% de ces bacilles sont des *Pseudomonas aeruginosa*, et 36% des *Acinetobacter baumannii*. (Figure 22)

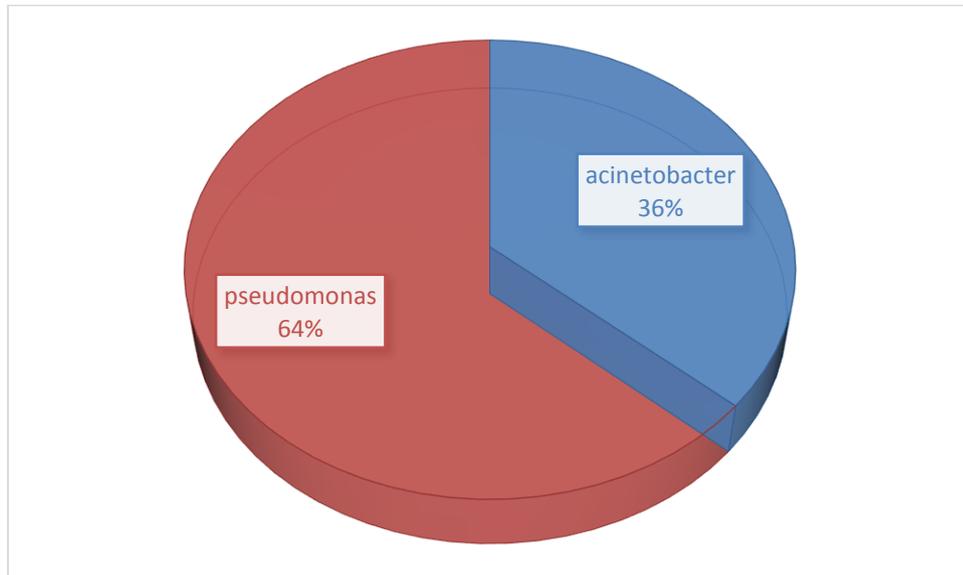


Figure 22 : Répartition des bacilles Gram négatif non fermentaire

Ces résultats se contredisent avec ceux obtenus à la ville de Telemcen où la répartition des *Pseudomonas aeruginosa* dans ma recherche a été plus élevée, où dans leur recherche sur un total de 44 bacilles Gram négatif non fermentaires identifiés, 36 ont été isolés à partir des patients (72%), dont 21 *Acinetobacter baumannii* (58.3%) et 15 *Pseudomonas aeruginosa* (41.7%) (Rabhi, 2012)

## 7. Répartition des espèces bacilles Gram négatif selon l'origine

Le nombre d'espèces selon leurs origines, pour *Escherichia coli* : 100 souches à partir des urines, une souche à partir de pus, deux souches dans les prélèvements vaginaux et une souche dans le sperme.

Pour *Klebsiella pneumoniae* : une souche isolée à partir d'un prélèvement de gorge, 4 souches à partir de pus, une souche dans les prélèvements vaginaux, 2 souches à partir du sperme et 64 souches dans les urines ; pour *Proteus mirabilis* 10 souches ont été isolées des urines et une du sperme ; pour *Providencia stuartii* 2 souches trouvées dans les urines et enfin *Pseudomonas aeruginosa* 11 souches ont été isolées des urines, 2 autres de pus et une de l'oreille. Les 8 isolats d'*Acinetobacter baumannii* sont d'origine urinaire (figure 23)

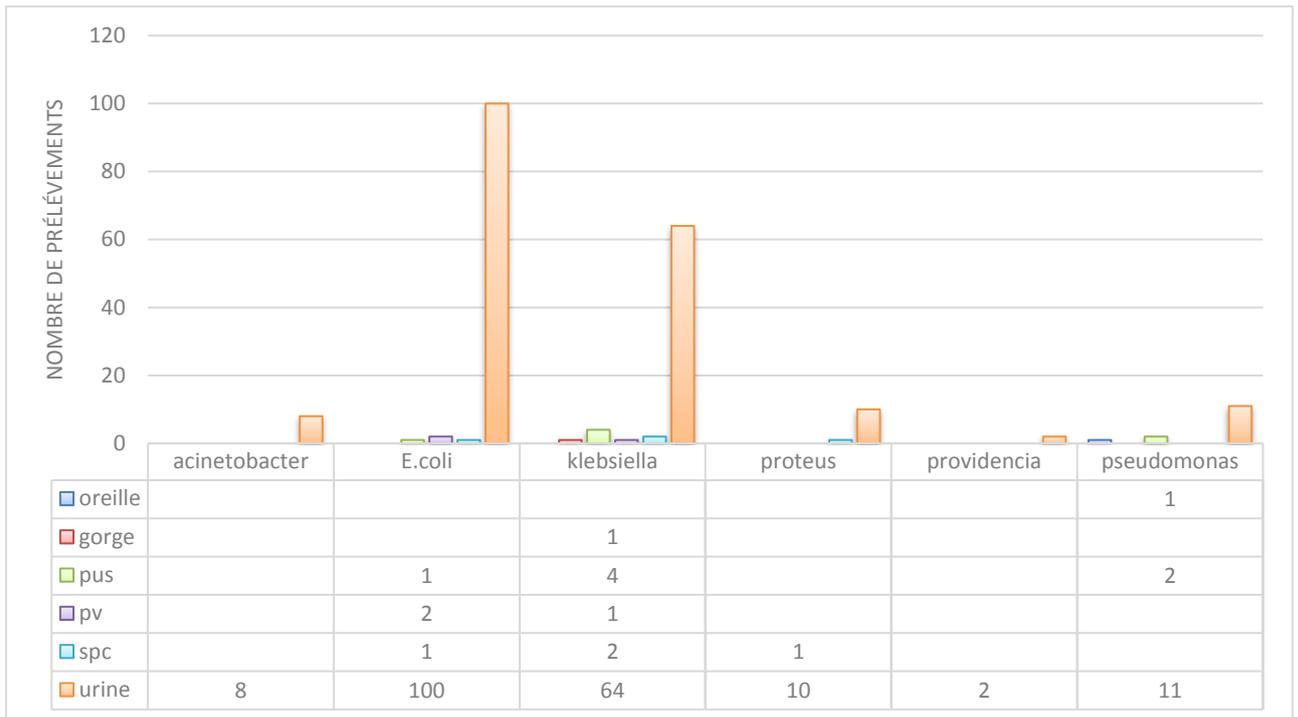


Figure 23 : Présentation des genres selon leurs l'origine

Donc on constate que la pluparts des isolats sont obtenus à partir des urines, l'infection urinaire constitue une des infections bactériennes communautaires les plus fréquentes

L'espèce *E. coli* est le germe le plus fréquemment isolé dans les infections urinaires. Ces résultats concordent avec ceux de l'étude réalisée par (LEMORT et al., 2006) mettant en relation la présence de cette bactérie avec la physiologie de l'infection urinaire qui est en général ascendante, et il existe une forte colonisation du périnée par les entérobactéries d'origine digestive, et en particulier *E. coli*. A cela, s'ajoutent des facteurs spécifiques d'uropathogénicité. Ainsi, *E. coli* possède des andésines, capables de lier la bactérie à l'épithélium urinaire et d'empêcher son élimination par les vidanges vésicales (Sekhsokh et al., 2008).

Mais pour les autres espèces nos résultats ne sont pas concordant avec ceux en France que des études montrent que la distribution des souches en prédominance de 2 espèces : *P. aeruginosa* (23 %) et *E. coli* (22 %). Puis, par ordre de fréquence décroissante, on trouve *Acinetobacter*spp (12 %), *Klebsiella pneumoniae* (8 %), *Proteus mirabilis* (7 %), *Enterobacter cloacae* (6 %) et *Serratia* spp (6 %) (Scheftel et al.,1991)

Et en deuxième lieu l'infection vaginale et les infections génitales masculine due à *Esherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* dans le cas d'une vaginite bactérienne les entérobactéries ont une place ce qui a conclu (Bohot et al.,2012) dans leurs étude en citant que Parmi les espèces bactériennes isolées dans les 9 cas de vaginites bactériennes avec prédominance d'un ou de plusieurs germes, ont été identifiés : 11 streptocoques, 4 entérobactéries 4 staphylocoques. (Bohot et al.,2012)

En revanche, en France selon des études, les bactéries à Gram négatif représentent 95 % des germes en cause dans les prostatites. À lui seul, *Escherichia coli* représente 80 % des germes retrouvés, 32 Plus rarement il s'agit de *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Enterobacter*. Les autres bactéries à Gram négatif sont devenues exceptionnelles (Dominique et al.,2004). Ce qui est proche des résultats déjà obtenus

Généralement l'origine des pus diagnostiqué est le pied diabétique, nos résultats indiquent la présence des entérobactéries et des bacilles Gram négatif non fermentaires, ces résultats sont proches des résultats obtenu à Merrakech en 2016 , où la répartition par familles a objectivé la prédominance des entérobactéries qui représentaient 42.7% des isolats, suivies des staphylocoques (24,7%), des streptocoques (15,8 %) puis des bacilles à Gram négatif non fermentant qui occupaient la quatrième place avec un taux de 14,6% (Labani, 2016)

Pour les otites une souche de *Pseudomonas aeruginosa* a été isolé, ce résultat concordant à celui en 1989 à Dakkar, que chez l'adulte, c'est souvent une otite externe qui, par ailleurs, survient à tout âge. L'examen bactériologique identifie en général un bacille à Gram négatif (surtout *Pseudomonas aeruginosa*) (Badara,1998)

### 8. Répartition des isolats selon le sexe

Nos résultats à propos de la catégorie de sexe la plus touché des infections par les bacilles Gram négatif montrent que les femmes sont les plus touchés par les infections et surtout l'infection urinaire car c'est l'infection la plus fréquente (figure 24)

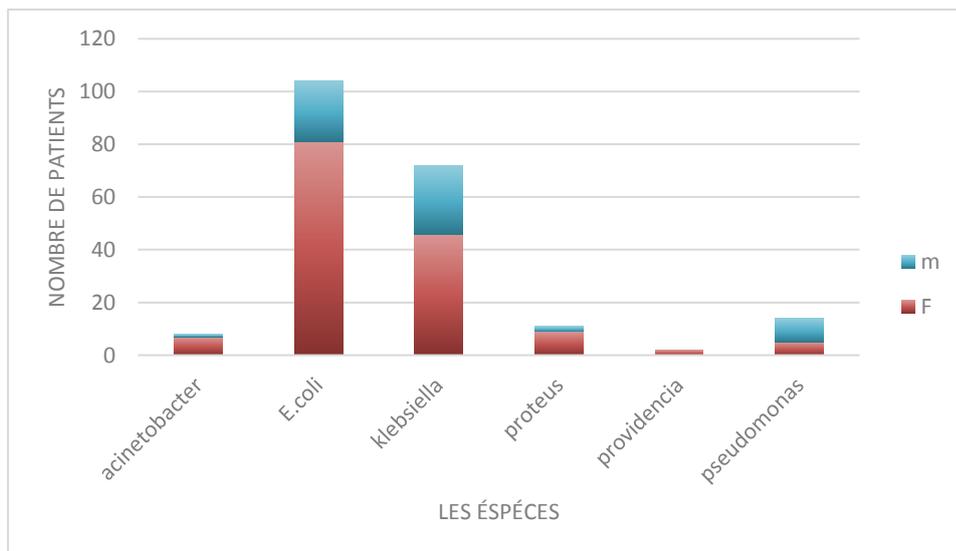


Figure 24 : répartition des espèces selon le sexe ;

(F : féminin ; M : masculin)

L'importance des infections urinaires chez les femmes peut être expliquée, d'une part par l'existence de deux pics, l'un au début de l'activité sexuelle et l'autre en période post ménopausique et ces identifications surviennent plus fréquemment chez la femme que chez l'homme dus à des facteurs anatomique et physiologique favorisant spécifiquement l'installation des germes pathogènes (Urètre court, grossesse...) et d'autre part par le fait que ces dernières soit plus récentes grâce au nombre d'ECBU demandés aux femmes enceinte. En effet, dans leur étude épidémiologique, Coron et *al*, en 2008 signalent que 40 à 50% des femmes ont au moins une infection urinaire au cours de leur existence. Chez l'homme, la fréquence augmente après 50ans, relation notamment avec la pathologie prostatique (Coron et *al*, 2008).

### 9. Evaluation de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries

L'antibiogramme effectué sur chaque espèce d'entérobactéries a permis d'étudier leurs profils de résistance vis-à-vis des antibiotiques testés. Les résultats de l'étude de la résistance des 189 isolats d'entérobactéries aux 09 différents antibiotiques utilisés sont illustrés dans la figure 25 montrent que presque 95 % des souches sont sensibles à la cefotaxime et ceftioxime ou les taux de sensibilité de Hamze et Izard en 1999 sont proches de nos résultats. La résistance à la cefotaxime est faible ; presque toutes les souches de *E. coli* et de *Proteus mirabilis* sont sensibles. (Hamze et Izard, 1999), et aussi ceux en France où la résistance au cefotaxime est rare (98 % de souches sensibles) (Maurin et *al.*, 1995)

En ce qui concerne les aminosides ; l'amikacine est efficace contre 100% des souches testées et 8% des souches sont résistantes à la gentamicine. Ces résultats sont concordants à ceux de Pons et son équipe en 1976 qui ont conclu leur recherche en disant que l'amikacine est actuellement parmi les antibiotiques aux quels nous avons fait référence, celui qui touche le maximum de souches, quels que soient l'espèce ou le genre, aux concentrations humorales obtenues avec la posologie habituelle ; c'est donc celui qui a le plus de chance d'être thérapeutiquement actif (Pons et *al.*, 1976)

Ainsi les quinolones, 37% des souches marquent une résistance remarquable à l'acide nalidixique ; Pour les fluoroquinolones, 90% des souches d'entérobactéries sont sensibles à la ciprofloxacine. Face aux autres familles d'antibiotique comme les sulfamides et associés une résistance a été observée chez 52% des souches d'entérobactéries. Ces résultats sont proches à ceux obtenus au Maroc, d'où les taux de résistance les plus élevés sont obtenus pour le triméthoprime sulfaméthoxazole (50%), suivi de l'acide nalidixique (26,52 %) et de la ciprofloxacine (20 %). (Elotmani, 2010)

Les fosfomycines ont montrés une activité sur 95 % des souches. En revanche 18% des souches sont classées d'une sensibilité intermédiaire en testant les furanes ces résultats sont relatifs à celui qui

a trouvé en 2011 au Maroc qu'une grande sensibilité des souches étudiées vis à vis de la fosfomycine (92.89%), qui s'explique par la faiblesse relative des prescriptions (Esskouri, 2011)

En plus, la fosfomycine est épargnée des mécanismes de résistance multiples auxquels sont exposés les autres antibiotiques en raison de sa structure unique et son mode d'action (Falagas, 2008).

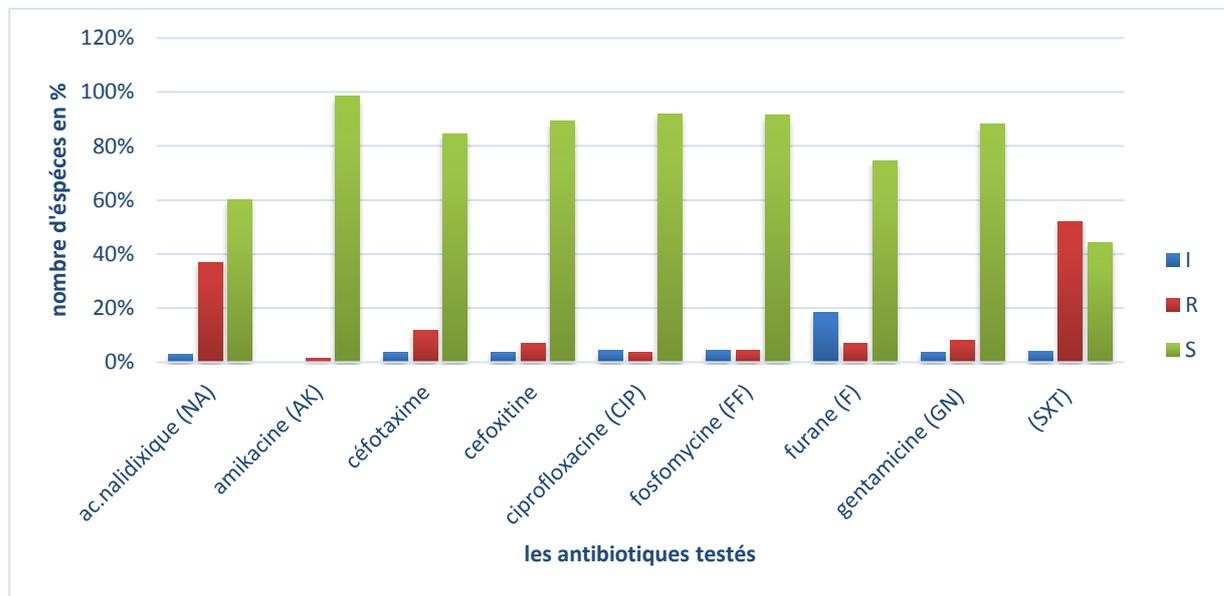


Figure 25 : profil de résistance aux antibiotiques des entérobactéries

(R : résistant ; S : sensible ; I : intermédiaire ; SXT :Sulfaméthoxazole+triméthoprime)

## 10. Bacilles Gram négatif non fermentaire

### 10.1 Evaluation de la Résistance aux antibiotiques des *Pseudomonas aeruginosa*

Les résultats de l'étude de la résistance aux antibiotiques des 14 souches de *Pseudomonas aeruginosa* aux 07 différents antibiotiques obtenus. Les résultats sont illustrés dans la figure 26. En analysant les profils de résistance aux antibiotiques des 14 souches de *Pseudomonas aeruginosa* étudiées, on note une résistance vis-à-vis la ceftioxime où 79% des isolats sont résistants une faible résistance à la céfotaxime soit 25%. En revanche, pour les fluoroquinolones toutes les souches (100%) étaient sensibles à la ciprofloxacine. Concernant les furanes, on observe une résistance marquée de 100% des isolats. Par ailleurs, vis-à-vis des, les sulfamides un taux de résistance de 95% a été détecté ; quant aux aminosides, ces derniers restent actifs sur 100% de souches étudiées par la gentamicine.

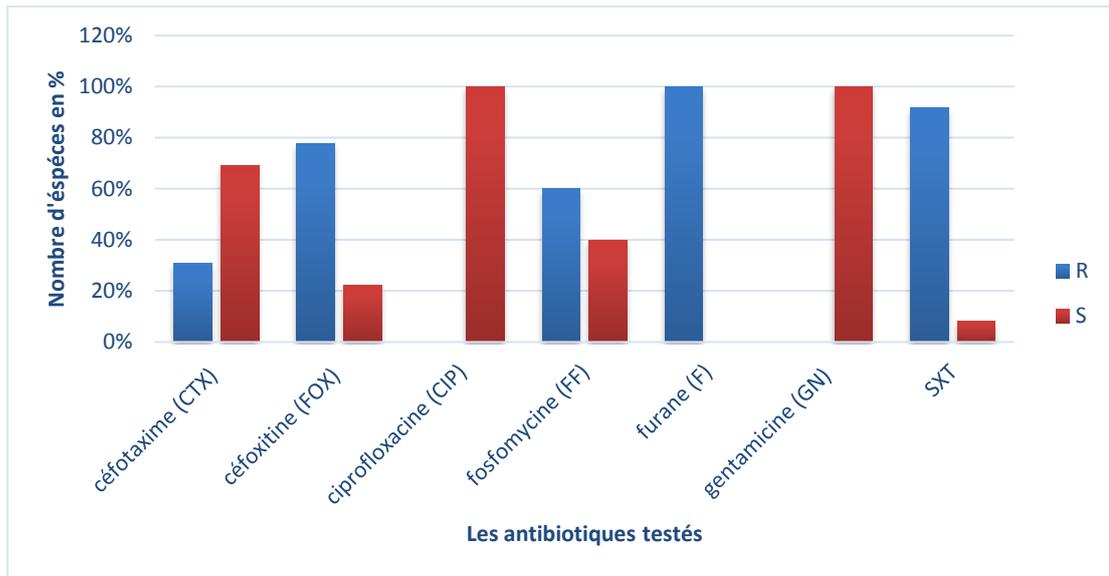


Figure 26 : Profil de résistance des *Pseudomonas aeruginosa*

Ce qui n'est pas le cas des taux de résistance trouvé par Rabhien 2012 à la ville de Tlemcen en trouvant que les taux de résistance pour ciprofloxacine sont de 29.41% et de 23.52% pour la gentamicine (Rabhi, 2012)

### 10.2 Evaluation de résistance des *Acinetobacter baumannii*

Les isolats étudiés présentent une forte résistance à la fosfomycine avec un taux de 59 % ; ensuite vis-à-vis la rifampicine avec un taux de 30 %. En revanche les isolats marquaient une sensibilité remarquable à l'amikacine, la ciprofloxacine, furane, gentamicine et les sulfamides (figure 27)

Ces résultats sont proches à ceux de Maurin et son équipe qui ont remarqué une activité des fluoroquinolones faible 36 % de souches sensibles à la ciprofloxacine. Avec plus d'une souche sur deux résistantes aux aminosides (Maurin et al., 1995)

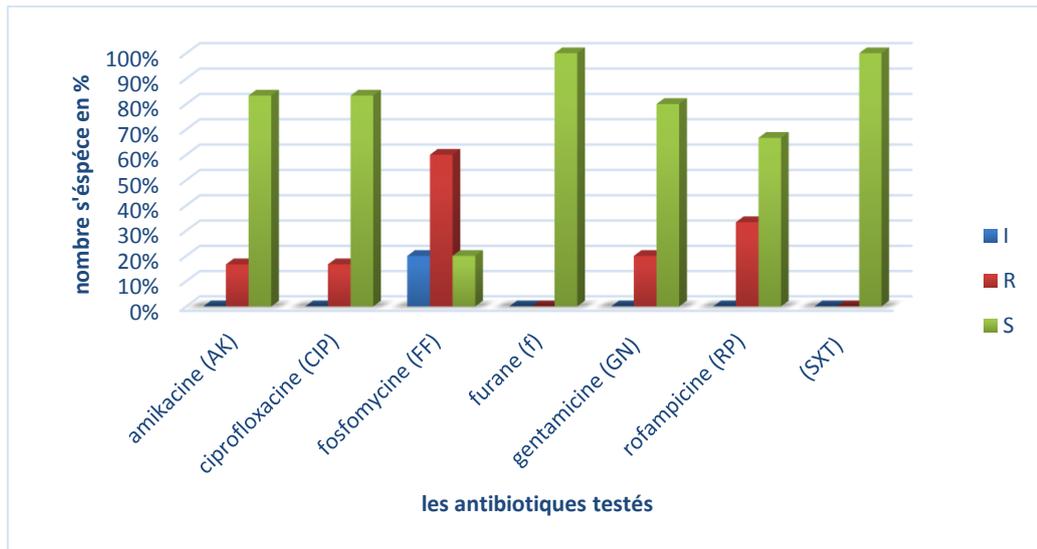


Figure 27 : Profil de résistance aux antibiotiques des *Acinetobacter baumannii*

(R : résistant ; S : sensible ; I : intermediaire ; SXT :Sulfamethoxazole+trimethoprim)

### 11. Recherche des $\beta$ -lactamases à spectre étendus (BLSE)

En recherchant les entérobactéries BLSE avec les tests sur une vingtaine des souches d'entérobactéries, les résultats sont notés négatif, donc absence de synergie entre les antibiotiques testés (AMC : Amoxicilline+ ac. Calvulanique ; CTX : Céfotaxime et AT : Aztreonam) (figure 28)

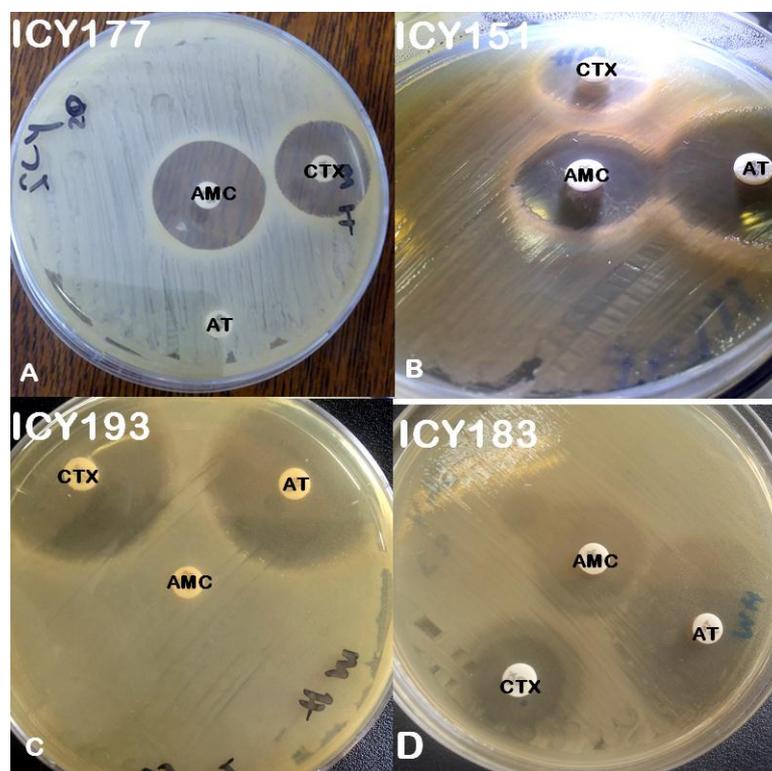


Figure 28 : Tests de synergie de quelques isolats d'entérobactéries

Les bactéries productrices de BLSE constituent une préoccupation majeure en milieu hospitalier en raison de leur diffusion épidémique et de leur multirésistance aux antibiotiques. En effet, les BLSE sont retrouvées chez une vaste proportion de bacilles à Gram négatif, mais les entérobactéries représentent les germes les plus incriminés (Gniadkowski. 2001).

Cette étude est assez différente de celles retrouvées dans d'autres études nationales publiées jusqu' alors au Nord d' Algérie, où des prévalences élevées ont été rapportées, soit 39.22% à Tlemcen (Baba Ahmed-Kazi Tani et *al.* 2014), et 31.4% à Annaba (Nedjai et *al.* 2012).

En conclusion, en attendant des résultats d'autres études en milieu hospitalier, on est tenté de dire qu'il existe une grande différence entre le niveau de résistance des bactéries à l'hôpital et en pratique de ville, lorsqu'on analyse de près les résultats ci-après : retrouvés par autre auteurs en pratique hospitalière :

405 souches d'entérobactéries ont été identifiées au laboratoire de bactériologie médicale à l'Hôpital de Laghouat. La prévalence des entérobactéries productrices de BLSE est assez importante en milieu hospitalier, soit 7,4% ; avec une prédominance de souches *Escherichia coli* (43%), suivies *Klebsiella pneumoniae* (30%), *Enterobacter cloacae* (20%), et *Citrobacter freundii* (7%). Les entérobactéries productrices de BLSE sont très dispersées dans le temps et les services (Lagha, 2015)

Au niveau du service de réanimation au CHU de Tlemcen. En effet, les résultats montrent que les fréquences d'isolement des souches d'*Acinetobacter baumannii* et de *Pseudomonas aeruginosa* sont très importantes, ainsi que les niveaux de résistance vis-à-vis de certaines classes d'antibiotiques comme l'imipénème sont devenus inquiétants. Les taux de résistance des isolats de *Pseudomonas aeruginosa* sont très inférieurs par rapport à ceux observés pour *Acinetobacter baumannii*. (Rabhi. 2012)

Dans le cas de cette étude les isolats ont été obtenus à partir des prélèvements recueillis dans un laboratoire privé « Dr Brahimi » ce qui laisse supposer que l'obtention des souches productrices de BLSE est plus fréquente en milieu Hospitalier où le taux de prélèvements recueilli par le personnel est nettement plus élevé en comparant celui recueilli dans des laboratoires à titre privé ceci est peut-être dû au coup de l'analyse en comparant à celui de la prise en charge publique.

# Conclusion et perspective

## *Conclusion et perspective*

On rapporte dans mon travail, l'analyse bactériologique de différents isolats clinique selon différentes origines du milieu communautaire dans un laboratoire d'analyse médicale à la ville de Tébessa dans une période de 3 mois.

Ce travail a visé les bacilles à Gram négatif, car ils sont classés les plus responsables des infections, cette recherche ma permis de distinguer deux groupes de bacilles Gram négatif, les bacilles Gram négatif fermentant ou les entérobactéries en premier lieu et les bacilles Gram négatif non fermentant (*Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*) en deuxième lieu avec un pourcentage de 89% et 7% respectivement du taux de isolats obtenu. Ces isolats en étant répartie selon leurs origines, 92 % des souches d'origine urinaire ce qui montre une fréquence élevée des infections urinaires.

Les résultats des pré-identification par mise e culture sur gélose CHROMagar ont pu rattachés 104 isolats a l'espèce *E.coli*, 72 isolats à *Klebsiella* spp, 11 isolats à *Proteus* spp , 2 isolats à *Providencia* spp , 14 isolat à *pseudomonas* et 8 isolat à *Acinetobacter* spp

Les résultats d'identification par le système api 20 E et le système automatisé vitek 2 ont confirmés l'appartenance des isolats obtenu aux espèces suivantes : *Acinetobacter baumannii* *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii* et *Pseudomonas aeruginosa*.

L'évaluation de la résistance de l'ensemble d'isolats est importante, les résultats montrent une activité remarquable de la plupart des molécules d'antibiotiques testés sur les différentes souches.

Les entérobactéries montrent une résistance naturelle aux sulfamides et associés avec un pourcentage de 50% des souches ensuite, 37% aux quinolones à l'acide nalidixique

Pour les bacilles Gram négatif non fermentant aussi les souches de *Pseudomonas aeruginosa* montrent une résistance élevée aux sulfamides et associés, en suite aux  $\beta$ -lactamines avec (77.78% des souches à la céfoxitine et 30% des souches à la céfotaxime) et en fin aux furanes et aux fosfomycines avec des taux de 100% et 60% respectivement.

On a donc noté une absence des BLSE et d'émergence des souches résistantes aux antibiotiques dans le milieu communautaire de la ville de Tébessa, ce qui n'est pas inquiétant par rapport aux autres villes nationales.

En perspective de ce travail il était nécessaire de continuer le travail sur :

- Recherche des BLSE par le test du rapprochement des disques et celui du double disque afin de confirmer la négativité ou la positivité du test de synergie.
- Recherche moléculaire des gènes de résistance
- Isoler et caractériser des isolats à partir de milieu hospitalier afin de réaliser une étude comparative sur la résistance des souches obtenues.

# Références

## Références

- 1- Abraham, E. P. and E. Chain (1940). "An enzyme from bacteria able to destroy penicillin." *Nature* 146: 837.
- 2- Andersson, D. I., and D. Hughes. 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol* 8:260-71.
- 3- Andremont A . Écosystème bactérien du tube digestif. Rapports avec le traitement des péritonites . *Med Mal Infect* 1995 ; 25 : 38 – 41 .
- 4- Andremont, A. T. and M. Tibon-Cornillot (2007). *Le triomphe des bactéries: La fin des antibiotiques ?*, Max Milo Editions 256 pages.
- 5- Andriole, V. T. (2000). *The Quinolones*, Elsevier Science 517 pages.
- 6- Arakawa, Y., M. Murakami, K. Suzuki, H. Ito, R. Wacharotayankun, S. Ohsuka, N. Kato, and M. Ohta. 1995. A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrob Agents Chemother* 39:1612-5.
- 7- Azucena E, Mobashery S. Aminoglycoside-modifying enzymes: mechanisms of catalytic processes and inhibition. *Drug Resist Updat*. 2001 Apr; 4(2):106-17.
- 8- Baba Ahmed-Kazi Tani Z., Arlet G. News Of Antibiotic Resistance Among Gramnegative Bacilli In Algeria. *Pathol Biol (Paris)* 2014 Jun;62(3):169-78.
- 9- Babic M, Hujer AM, Bonomo RA. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist Updat*. 2006 Jun; 9(3):142-56.
- 10- Badara A K. Etude Bacteriologique Des Prelevements De La Sphere ORL Au Chu Aristide Le Dantec G:Hese) .These Docteur En Pharmacie (Diplôme D'etat).Dakkr.1998.99
- 11- Barber, M. (1947). "Coagulase-positive Staphylococci resistant to penicillin." *The Journal of Pathology*. 59: 373-384.
- 12- Barbut F , Braun M , Burghoffer B , Lalande V , Eckert C . Rapid detection of toxigenic strains of *Clostridiumdifficile* in diarrheal stools by real-time PCR . *J Clin Microbiol* 2009 ; 47 (4) : 1276 – 7 .
- 13- Bébéar C , De Barbeyrac B , Pereyre S , Bébéar CM . Mycoplasmes. Précis de bactériologie clinique . Paris : ESKA ; 2007 .
- 14- Bégué, P. and J. Astruc (1999). *Pathologie infectieuse de l'enfant*, Masson 612 pages.
- 15- Bennett, P. M. 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1:S347-57
- 16- Bevilacqua, S. Évaluation de l'impact d'une équipe opérationnelle en infectiologie sur la consommation et le coût des antibiotiques au CHU de Nancy. (Essai d'intervention contrôlé).thèse de doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé.France.2011.140p

**17-** Blanco J, Mora A, Mamani R, López C, Blanco M, Dahbi G, Herrera A, Marzoa J, Fernández V, De La Cruz F, Martínez-Martínez L, Alonso MP, Nicolas-Chanoine MH, Johnson JR, Johnston B, López-Cerero L, Pascual Á, Rodríguez-Baño J. 2013. Four main virotypes among extended spectrum- $\beta$ -lactamase-producing isolates of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131: Bacterial, epidemiological, and clinical characteristics. *J Clin Microbiol* 51:3358–3367.

**18-** Bohbot J.-M., Sednaoui P., Verriere F., Achhammer I Diversité Etiologique Des Vaginites , *Gyneécologie Obstétrique & Fertilité* 40 (2012) 578–581,.

**19-** Boulouis HJ . Les infections par morsures de chiens ou de chats : agents bactériens et stratégies thérapeutiques . *Antibiotiques* 2004 ; 6 : 103 – 7 .

**20-** Bourinbaiar, A. S. and C. F. Coleman (1997). "The effect of gramicidin, a topical contraceptive and antimicrobial agent with anti-HIV activity, against herpes simplex viruses type 1 and 2 *in vitro*." *Archives of Virology* 142: 2225-2235.

**21-** Boyce JM, Opal SM, Chow JW, Zervos MJ, Potter-Bynoe G, Sherman CB, Romulo RL, Fortna S, Medeiros AA. Outbreak of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* with transferable vanB class vancomycin resistance. *J Clin Microbiol*. 1994 May; 32 (5):1148-53.

**22-** Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA, A Functional classification scheme for Betalactamase and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39:1211-1233, 1995.

**23-** Cambray, G., A. M. Guerout, and D. Mazel. 2010. Integrons. *Annu Rev Genet* 44:141-66.

**24-** Chevalier J, Mulfinger C, Garnotel E, Nicolas P, Davin-Régli A, Pagès JM. Identification and evolution of drug efflux pump in clinical *Enterobacter aerogenes* strains isolated in 1995 and 2003. *PLoS One*. 2008 Sep 12; 3(9):e3203.

**25-** Clements AC, Magalhaes RJ, tatem AJ, Paterson DL, Riley TV. *Clostridium difficile* PCR ribotype 027: Assessing the risks of further worldwide spread. *Lancet Infect Dis*. 2010 Jun;10(6):395-404

**26-** Clyti E , Pradinaud R . Donovanose . *Encycl Med Chir (Elsevier, Paris) Maladies infectieuses*, 8-020-A-10 . 2004 ; 5p .

**27-** Collins MD , Wallbranks S . Comparative sequence analyses of the 16S rRNA genes of *Lactobacillus minutus*, *Lactobacillus rimae* and *Streptococcus parvulus* : proposal for the creation of a new genus *Atopobium* . *FEMS Microbiol Lett* 1992 ; 74 (2–3) : 235 – 40 .

**28-** Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Euro Surveill*. 2008 Nov 20; 13(47). pii: 19044. Review. Erratum in: *Euro Surveill*. 2008 Nov 27; 13(48).

- 29-** Courvalin, P., F. Denis, M.-C. Ploy, M. P. d. garilhe, P. Trieu-Culot and Universalis. (2001). "Antibiotiques." Retrieved 24 mai, 2013, from <http://www.universalisedu.com/encyclopedie/antibiotiques/>.
- 30-** Cuzon G, Naas T, Guibert M, Nordmann P. In vivo selection of imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and plasmid-encoded DHA-1 cephalosporinase. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35:265-8.
- 31-** De Barbeyrac B , Bébéar C , Bébéar C . Chlamydia . In : Précis de bactériologie clinique . Paris : ESKA ; 2007 .
- 32-** Dekeyser S, Beclin E, Nguyen S, Dufosse F, Descamps D. Outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (Van B) at the Bethune Hospital (France). Two point-prevalence surveys: May 2008 and January 2009. *Pathol Biol (Paris)*. 2010 Apr; 58(2):e21-5.
- 33-** Denis F , Martin C , Ploy MC . L'érysipèle : données microbiologiques et pathologiques . *Med Mal Infect* 2000 ; 30 : 296 – 305 .
- 34-** Diallo A A, *Escherichia coli* pathogènes et résistantes aux antibiotiques dans les effluents d'origine humaine et animale : Prévalence et caractérisation avant et après traitement épuratoire. Thèse de doctorat. *Microbiologie*. Université De Toulouse. France. 2013. 204p
- 35-** Dominique S , Delmas V , Horpitean V , Boccon-Gibod L . Infections génitales masculines . *Encycl Med Chir (Elsevier, Paris) Maladies infectieuses*, 8-003-I-20 2004 .
- 36-** Dubreuil L . Étiologie bactérienne des péritonites . *Lettre Infect* 1997 ; 12 : 15 – 23 .
- 37-** Duchesne, E. (1897). Contribution a l'étude de la concurrence vitale chez les microorganismes ; antagonisme entre les moisissures et les microbes. Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon. France. thèse de doctorat: 64 pages.
- 38-** Dulon M, Haamann F, Peters C, Schablon A, Nienhaus A. MRSA prevalence in European healthcare settings: a review. *BMC Infect Dis*. 2011 May 20; 11(1):138.(Dulon et al.,2011)
- 39-** Dunais B, Bruno-Bazureau P, Carsenti-Dellamonica H, Touboul P, Pradier C. A decade-long surveillance of nasopharyngeal colonisation with *Streptococcus pneumoniae* among children attending day-care centres in south-eastern France: 1999-2008 *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011 Jul; 30(7):837-43.
- 40-** Esskouri Zohra. Sensibilité Des Enterobacteries Urinaires A La Fosfomycine Et A La Nitrofurantoïne A L'hôpital Militaire D'instruction Mohammed V De Rabat. Thèse Doctorat En Pharmacie . *Medecine Et De Pharmacie -Rabat-*. 2011.151

**41-** Falagas E, Kastoris C, Kapaskelis M, Karageorgopoulos E. Fosfomycin For The Treatment Of Multidrug-Resistant, Including Extended-Spectrum B-Lactamase Producing, Enterobacteriaceae Infections: A Systematic Review . The Lancet Infectious Diseases.2010 ; 10: 43–50.

**42-** Folster JP, Johnson PJ, Jackson L, Dhulipali V, Dyer DW, Shafer WM. MtrR modulates rpoH expression and levels of antimicrobial resistance in Neisseria gonorrhoeae. J Bacteriol. 2009 Jan; 191(1):287-97.

**43-** François D, Marie C P, Christian B, Roland Q. Bactériologie médicale: Techniques usuelles. Masson. Paris.2011 .573 pages

**44-** Frankei G , Giron JA , Valmassoi J , Schoolnik GK . Multigene amplification : simultaneous detection of three virulence genes in diarrhoeal stool . Mol Microbiol 1989 ; 3 : 1729 – 34 .

**45-** Frasca D., Dahyot-Fizelier C., Mimoz O., Mimoz O. La colistine en réanimation. Réanimation 2008;17:251-8.

**46-** Frei CR, Makos BR, Daniels KR, Oramasionwu CU. Emergence of communityacquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections as a common cause of hospitalization in United States children. J Pediatr Surg. 2010 Oct;45(10):1967-74.

**47-** Funke G, Monnet D, Debernardis C, Von Graevenitz A, Freney J. Evaluation Of The Vitek System For Rapid Identification Of Medically Relevant Gram-Negative Rods. J Clin Microbiol, 1998;36:1948–52.

**48-** Gansmandel, T. 2011. Etude epidemiologique des resistances d'Escherichia coli BLSE au centre hospitalier de Valenciennes en 2006. Universite du droit et de la sante (Lille). thes. pharma. 145:N°: 2011LIL2E008

**49-** Gardner HL , Dukes CD . *Haemophilus vaginalis* vaginitis : a newly defined specific infection previously classified non-specific vaginitis . Am J Obstet Gynecol 1955 ; 69 : 962 –76 . (Gardner et al., 1955)

**50-** Gayral JP, Robinson R, Stamstedt D. A New Integrated System For Microbiological Testing. Clin Microbiol Infect 1997;3(Suppl2):53.

**51-** Gniadkowski M.. Evolution And Epidemiology Of Extended-Spectrum B-Lactamases (Esbls) And ESBL-Producing Microorganisms, Clin Microbiol Infect 2001; 7: 597–608

**52-** Grencher T , JEANNE G . Biologie des liquides d'épanchement . Grenoble : bioMérieux ; 2006 .

**53-** Guibert M . La bactériologie des péritonites . Med Mal Infect 1995 ; 25 : 42 – 53 .

**54-** Hall, R. M., C. M. Collis, M. J. Kim, S. R. Partridge, G. D. Recchia, and H. W. Stokes.1999. Mobile gene cassettes and integrons in evolution. Ann N Y Acad Sci 870:68-80.

- 55-** Hamze M, Izard D. Sensibilité Des Entérobactéries Aux Antibiotiques.Situation En 1997 Au Nord Du Liban. *Med Mal Infect* 1999 ; 29 : 527-31
- 56-** Hansson K., L. Sundstrom, A. Pelletier, and P. H. Roy. 2002. IntI2 integron integrase in Tn7. *J Bacteriol* 184:1712-21
- 57-** Hochhut, B., Y. Lotfi, D. Mazel, S. M. Faruque, R. Woodgate, and M. K. Waldor. 2001. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in vibrio cholerae O139 and O1 SXT constins. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2991-3000.
- 58-** Hocquet D, Plésiat P, Dehecq B, Mariotte P, Talon D, Bertrand X; ONERBA. Nationwide investigation of extended-spectrum beta-lactamases, metallo-betalactamases, and extended-spectrum oxacillinases produced by ceftazidimeresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains in France. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Aug; 54(8):3512-5.
- 59-** Hooper, D. C. and E. Rubinstein (2003). Quinolone antimicrobial agents, American Society for Microbiology 485 pages.
- 60-** Houvenaeghel, M. (1992). Les aminosides. in *Antibiothérapie en réanimation et chirurgie*, Arnette Blackwell: 15-25.
- 61-** J.M., Weber M. Et Le Groupe Français "USI Résistance De 16 Antibiotiques De 3 876 Bacilles Gram Négatif Aérobie Isolés Dans 39 Centres De Soins Intensifs En France (1991). *infections nosocomiales Méd Mal Infect*. 1994 ; 24:255-62
- 62-** Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new beta-lactamases. *N Engl J Med*. 2005 Jan 27; 352(4):380-91.
- 63-** Jana S, Deb JK. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006 Mar; 70(2):140-50.
- 64-** John M, Steven S, Graham J. Robertson, Glenn R. Funnel L, Thomas G, Ross B. Evaluation Of Chromagar Orientation For Differentiation And Presumptive Identification Of Gram-Negative Bacilli And Enterococcus Species. *Journal Of Clinical Microbiology*. July 1996. Vol. 34, No. 7. P. 1788–1793
- 65-** KASS EH . Bacteriuria and the diagnosis of infections of the urinary tract ; with observations on the use of methionine as a urinary antiseptic . *AMA Arch Intern Med* 1957 ; 100 : 709 – 14 .
- 66-** Kipnis, É. and B. P. Guery (2010). "Réévaluation de la colistine." *Antibiotiques* 12: 205 227.
- 67-** Lagha,N. Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries productrices de  $\beta$  lactamases à spectre étendu (BLSE) isolées de l'hôpital de Laghouat. Thèse de doctorat en sciences. Tlemcen.2015.105

**68-** Lahlou A, Chegri M, L’Kassmi H . Épidémiologie Et Résistance Aux Antibiotiques Des Entérobactéries Isolées D’infections Urinaires A L’hôpital Militaire Moulay-Ismaïl De Meknès L’antibiotiques (2009) 11, 90—96

**69-** Lambert T. Etat actuel de la sensibilité des bactéries aux aminosides RéanUrg.1997; 6(4,Part 3) :9 s.

**70-** Le Minor, L. and M. Véron (1989). Bactériologie médicale, Médecine Sciences Publications 1107 pages.

**71-** Lemort ML., Neuville S., Medus M., Gueudet P.,Saada M., Aumaitre H., Lecaillon E. ;2006. Evaluation Comparée De La Sensibilité De Souches E. Coli Isolées D’infections Urinaires Des Patients Consultants Aux Urgences Et De Patients Hospitalisés En 2002 Et 2004 A L’hôpital De Perpignan Pathol Biol. S4 (8-9) :427-430.

**72-** Lerner, P. I. (2004). "Producing Penicillin." New England Journal of Medicine 351: 524-524.:

**73-** Lüscher D , Altwegg M . Detection of shigellae, enteroinvasive and enterotoxigenic *Escherichia coli* using the polymerase chain reaction (PCR) in patients returning from tropical countries . Mol Cell Probes 1994 ; 4 : 285 – 90 .

**74-** M. 2012. Prevalence And Characterization Of Extended Spectrum Beta-Lactamases In Klebsiella- Enterobacter-Serratia Group Bacteria, In Algeria. Med. Mal Infect. 42: 20-29.

**75-** Magiorakos, A., A. Srinivasan, R. Carey, Carmeli, M. Falagas, C. Giske, S. Harbarth, J. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist, D. Paterson, L. Rice, J. Stelling, M. Struelens, A. Vatopoulos, J. Weber and D. Monnet (2011). "Multidrug-Resistant, extensively drug resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance." European Journal of Clinical Microbiology 18: 268-281.

**76-** Manos J, Belas R. The Genera *Proteus* , *Providencia* , and *Morganella*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, editors. The Prokaryotes. Springer New York; 2006. p. 245-69.

**77-** Martinez, J. L. 2009. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. Proc Biol Sci 276:2521-30.

**78-** Maurin M, Musso D, Charrel R, Perez R, N’guyen A, Dumon H Et Ph. De Micco Résistance Aux Antibiotiques Des Bactéries Hospitalières (Bacilles Gram Négatif Aérobie). EPIDEMIOLOGIE Méd Mal Infect. 1995 ; 25, 508-14

**79-** Mazel, D., B. Dychinco, V. A. Webb, and J. Davies. 1998. A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. Science 280:605-8.

**80-** Meares EM , Stamey TA . Bacteriologic localization patterns in bacterial prostatitis and urethritis . Invest Urol 1968 ; 5 : 492 – 518 .

**81-** Melle RABHI Fatima Contribution A L'étude De La Résistance Des Bacilles A Gram Négatif Non Fermentants Aux Antibiotiques: Cas De La Colistine En Réanimation Master Microbiologie.Tlemcen.2012. 69

**82-** Mitscher, L. A., P. Devasthale and R. Zavod (2003). Structure-Activity Relationships. In Quinolone antimicrobial agents. 2. Washington D. C., American Society for Microbiology Press: 3-51.

**83-** Moroh, JL,A. Résistance bactérienne et Phytomolécules antimicrobiennes issues de *Morinda morindoides*. Thèse de doctorat. *Microbiologie – Biochimie*.Université De Bretagne Occidentale.France.2013.213p

**84-** Naas, T., Y. Mikami, T. Imai, L. Poirel, and P. Nordmann. 2001. Characterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. J Bacteriol 183:235-49.

**85-** Nadmia H, Elotmani F ,Talmi M, Zerouali K ,Perrier-Gros Claude C D, Timinouni M, Profil De Résistance Aux Antibiotiques Des Entérobactéries Uropathogènes Communautaires A El Jadida (Maroc)Lettre A La Rédaction ,2010

**86-** Nedjai, S., Barguigua, A., Djahmi, N., Jamali, L., Zerouali, K., Dekhil, M., And Timinouni,

**87-** Nugent Rp , Krohn MA , Hillier SL . Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation . J Clin Microbiol 1991 ; 29 : 297 –301.

**88-** Odds, F. C., And R. Bernaerts. 1994. Chromagar Candida, A New Differential Isolation Medium For Presumptive Identification Of Clinically Important Candida Species. J. Clin. Microbiol. 32:1923–1929.

**89-** O'Hara CM, Brenner FW, Miller JM. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. Clin Microbiol Rev 2000 Oct;13(4):534-46.

**90-** Pantel, A.Multirésistance des entérobactéries aux antibiotiques, Modulation de l'influx et de l'efflux membranaires chez *Escherichia coli* ST131, thèse de doctorat en microbiologie, université Montpellier.2015.243

**91-** Partridge, S. R., G. Tsafnat, E. Coiera, and J. R. Iredell. 2009. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. FEMS Microbiol Rev 33:757-84.

**92-** Perronne, C. (1999). Les maladies infectieuses, Doin Editions 406 pages.

**93-** Philippon A, Arlet G. Beta-lactamases of Gram negative bacteria: never-ending clockwork! Ann Biol Clin (Paris). 2006 Jan-Feb; 64(1):37-51

- 94-** Pons M. Perez .R Et Olmer .H Sensibilité Des Bacilles Gram Négatif A L'amikacine. Comparaison Avec Cinq Autres Antibiotiques Couramment Utilisés Contre Ces Germes. Médecine Et Maladies Infectieuses. 1976 - 6 - 12 - 499 ~ 501
- 95-** Rodriguez-Jovita M , Collins MD , Sjöden B , Falsen E . Characterization of a novel *Atopobium* isolate from the human vagina : description of *Atopobium vaginae* sp. nov . Int J Syst Bacteriol 1999 ; 49 (4) : 1573 – 6 .
- 96-** Rosset, R. (2003). "Pasteur et les vétérinaires." Bulletin de la société Française d'histoire de la Médecine et des Sciences Vétérinaires 2: 1-25.
- 97-** Sarges, R. and B. Witkop (1965). "Gramicidin A. V. The structure of valine- and isoleucinegramicidin A." Journal of the American Chemical Society 87: 2011-2020.
- 98-** SCHMIDT H , KNOP C , FRANKE S , ALEKSIC S , HEESEMAN J , KARCH H . Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli* . J Clin Microbiol 1995 ; 33 : 701 – 5 .
- 99-** Schumacher A, Steinke P, Bohnert JA, Akova M, Jonas D, Kern WV. Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of Enterobacteriaceae other than *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother. 2006 Feb;57(2):344-8.
- 100-** Sekhsokh Y., Chadli M. Et El Hamzaoui S.A. 2008. Fréquence Et Sensibilité Aux Antibiotiques Des Bactéries Isolées Dans Les Urines. Médecine Et Maladies Infectieuses; 38 : 324-327.
- 101-** Shen, L. I. (2003). Quinolone-DNA interaction. in Quinolone antimicrobial agents. 2, ASM Press: 77-95.
- 102-** Singh, S. B. and J. F. Barrett (2006). "Empirical antibacterial drug discovery-foundation in natural products." Biochemical Pharmacology 71: 1006-1015.
- 103-** Snyder, L., and W. Champness. 2007. Molecular genetics of bacteria. Washington, D.C. ASM Press,.
- 104-** Soto, S. M., Martín, M. C., and Mendoza, M. C. . 2003. Distinctive human and swine strains of *Salmonella enterica* serotype Wien carry large self-transferable R-plasmids. A plasmid contains a class 1-qacEΔ1-sul1 integron with the dfrA1-aadA1a cassette configuration. Food microbiology 20:9–16.
- 105-** Tensttdt, D. (2010). Quiz: "Dermato-allergologie et toxiderme". in Progrès en Dermato Allergologie Tome XVI: Strasbourg 2010, John Libbey Eurotext. 16: 133-162.
- 106-** Thévenot, P. (2003). De l'antibiogramme à la prescription, Editions BioMérieux 136 pages.

- 107-** van Hoek, A. H., D. Mevius, B. Guerra, P. Mullany, A. P. Roberts, and H. J. Aarts. 2011. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol* 2:203.
- 108-** Walsh, C. (2003). *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*, Amer Society for Microbiology 335 pages.
- 109-** Walsh, T. R. 2006. Combinatorial genetic evolution of multiresistance. *Curr Opin Microbiol* 9:476-82.
- 110-** Wilson ML, Gaido L. Laboratory diagnosis of urinary tract infections in adult patients. *Clin Infect Dis* 2004 ; 38 : 1150 – 8 .
- 111-** Wright G. Mechanisms of resistance to antibiotics. *Curr Opinion Chem Biol*.2003 Oct; 7(5):563-9.
- 112-** Wright GD. Aminoglycoside-modifying enzymes. *Curr Opin Microbiol*. 1999 Oct; 2(5):499-503.
- 113-** Wright GD. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005 Jul 29;57(10):1451-70.
- 114-** Yoshida, H., M. Bogaki, M. Nakamura, L. M. Yamanaka and S. Nakamura (1991). "Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35: 1647-1650.
- 115-** Youness LABANI. Profil Bactériologique Et Fréquence De Résistance Aux Antibiotiques De L'infection Du Pied Diabétique thèse doctorat en médecine. Merrakech .2016 .111
- 116-** Zhang Y, Xiao M, Horiyama T, Zhang Y, Li X, Nishino K, Yan A. The multidrug efflux pump MDTEF protects against nitrosative damage during the anaerobic respiration in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 2011 Jun 3.

# Annexes

Annexe N°1 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour les entérobactéries (CA-SFM. 2010).

Familles d'Antibiotiques	Antibiotiques testés	Signes	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)		Concentrations critiques (mg/L)	
				Sensible S	Résistante R	Sensible S	Résistante R
β-lactamines	Céfalotine	CF	30µg	≥ 18	<12	≤8	>32
	Amoxicilline	AMX	25µg	≥ 21	<16	≤4	>8
	Amoxicilline + Ac.clavulanique	AMC	20/10µg	≥ 21	<16	≤4/2	>8/2
	Ticarcilline	TIC	75µg	≥ 24	<22	≤8	>16
	Ticarcilline + Ac.clavulanique	TCC	75/10µg	≥ 24	<22	≤8/2	>16/2
	Pipéracilline	PIP	75µg	≥ 20	<16	≤8	>16
	Pipéracilline/tazo bactam	TPZ	75/10µg	≥ 21	<17	≤8/4	>16/4
	Ceftazidime+ Ac-clavulanique	CAZ-CV	30/10µg	≥26	<19	≤1	>8
	Aztréonam	ATM	30µg	≥ 27	<21	≤ 1	>8
	Céfotaxime	CTX	30µg	≥26	<23	≤1	>2
	Ceftazidime	CAZ	30µg	≥26	<19	≤1	>8
	Céfépime	FEP	30µg	≥24	<17	≤1	>8
	Céfprome	CPO	30µg	≥24	<17	≤1	>8
	Céfixime	CFM	30µg	≥ 25	<22	≤ 1	>2
	Céfuroxime	CXM	30µg	≥22	<22	≤8	>8
	Céfoxitine	FOX	30µg	≥22	<15	≤8	>32
	Imipénème	IPM	10µg	≥ 24	<17	≤ 2	>8
Aminosides	Kanamycine	K	30µg	≥17	<15	≤8	>16
	Tobramycine	TM	10µg	≥18	<16	≤2	>4
	Amikacine	AN	30µg	≥17	<15	≤8	>16
	Gentamicine	GM	15µg	≥18	<16	≤2	>4
	Nétilmicine	NET	30µg	≥21	<19	≤2	>4
Quinolones – Fluoroquinolones	Ofloxacine	OFX	5µg	≥25	<22	≤0.5	>1
	Ciprofloxacine	CIP	5µg	≥25	<22	≤0.5	>1
	Ac.nalidixique	NA	30µg	≥20	<15	≤8	>16
Sulfamides-Triméthoprimes	Sulfamides	I	200µg	≥17	<12	≤64	>256
	Triméthoprime	TMP	5µg	≥20	<16	≤2	>4
	Triméthoprime/Sulfamethoxasole	SXT	1,25/23,75 µg	≥16	<13	≤2/38	>4/76
Divers	Chloramphénicol	C	30µg	≥23	<23	≤8	>8
	Tétracycline	TE	30µg	≥19	<17	≤4	>8
	Colistine	CS	50µg	≥15	<15	≤2	>2
	Fosfomycine	FOS	50µg	≥14	<14	≤32	>32

**Annexe 2. Concentrations et diamètres critique et règles de lecture interprétative pour *Pseudomonas aeruginosa* (CA-SFM, 2010)**

Antibiotiques	Sigle	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/l)		Diamètres critiques (mm)		
			S	R	S	R	
Bêta-lactamines	Ceftazidime	CAZ	30µg	≤ 8	> 8	≥ 19	< 19
	Cefsulodine	CFS	30µ	≤ 1	> 2	≥ 26	< 23
	Céfopérazone	CFP	10µg	≤ 2	> 8	≥ 24	< 17
	Imipénème	IMP	10µg	≤ 4	> 8	≥ 22	< 17
Aminosides	Amikacine	AN	30µg	≤ 8	> 16	≥ 17	< 15
	Gentamicine	GM	15µg	≤ 4	> 4	≥ 16	< 16
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	CIP	5µg	≤ 0.5	> 1	≥ 25	< 22
Polypeptides	Colistine	CS	50µg	≤ 2	> 2	≥ 15	< 15

**Annexe 3. Concentrations et diamètres critique et règles de lecture interprétative pour *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas* spp et *Burkholderia cepacia* (CA-SFM, 2010)**

Antibiotiques	Sigle	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/l)		Diamètres critiques (mm)		
			S	R	S	R	
Bêta-lactamines	Ceftazidime	CAZ	30µg	≤ 4	> 8	≥ 21	< 19
	Ceftriaxone	CRO	30µ	≤ 1	> 2	≥ 26	< 23
	Imipénème	IPM	10µg	≤ 2	> 8	≥ 24	< 17
Aminosides	Amikacine	AN	30µg	≤ 8	> 16	≥ 17	< 15
	Gentamicine	GM	15µg	≤ 4	> 4	≥ 16	< 16
	Tobramycine	TM	10µg	≤ 4	> 4	≥ 16	< 16
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	CIP	5µg	≤ 1	> 1	≥ 22	< 22
Polypeptides	Colistine	CS	50µg	≤ 2	> 2	≥ 15	< 15

**Annexe 4.** L'ensembles des espèces isolées et leurs origines  
(PV : pélévement vaginale ; SPC : spermo-culture ; F : féminin ; M : masculin)

<b>ICY</b>	<b>Sexe</b>	<b>Origine</b>	<b>Espèces</b>
1	F	urine	<i>Escherichia coli</i>
2	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
3	m	urine	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
4	m	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
6	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
7	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
9	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
10	m	urine	<i>Escherichia coli</i>
11	f	urine	<i>Proteus mirabilis</i>
12	m	urine	<i>Escherichia coli</i>
13	f	urine	<i>Proteus mirabilis</i>
14	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
15	m	urine	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
16	m	spc	<i>Proteus mirabilis</i>
17	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
18	m	spc	<i>Escherichia coli</i>
21	m	urine	<i>Escherichia coli</i>
22	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
24	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
25	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
26	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
28	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
29	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
30	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
31	f	urine	<i>Proteus mirabilis</i>
32	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
33	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
36	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
39	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
40	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
41	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
42	m	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
43	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
44	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
45	m	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
47	f	pv	<i>Escherichia coli</i>
48	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
49	m	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
50	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
51	m	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
52	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
53	m	spc	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

54	m	urine	<i>Escherichia coli</i>
55	m	urine	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
56	m	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
57	m	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
58	m	spc	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
59	f	pus	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
60	m	urine	<i>Acinetobacter baumannii</i>
61	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
62	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
63	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
64	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
65	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
66	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
67	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
70	f	urine	<i>Proteus mirabilis</i>
72	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
73	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
74	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
75	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
76	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
77	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
80	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
81	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
83	m	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
84	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
86	m	gorge	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
87	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
88	m	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
89	m	urine	<i>Escherichia coli</i>
91	f	urine	<i>Acinetobacter baumannii</i>
92	f	urine	<i>Acinetobacter baumannii</i>
93	f	urine	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
94	f	urine	<i>Acinetobacter baumannii</i>
95	f	urine	<i>Acinetobacter baumannii</i>
98	f	urine	<i>Acinetobacter baumannii</i>
99	f	urine	<i>Acinetobacter baumannii</i>
100	f	pv	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
101	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
102	m	urine	<i>Escherichia coli</i>
103	m	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
104	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
105	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
106	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
109	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
110	m	pus	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
111	m	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

112	f	urine	<i>Proteus mirabilis</i>
113	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
114	m	urine	<i>Proteus mirabilis</i>
115	m	urine	<i>Escherichia coli</i>
116	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
117	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
118	f	urine	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
120	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
121	m	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
122	f	urine	<i>Proteus mirabilis</i>
123	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
125	f	urine	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
126	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
127	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
128	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
129	f	urine	<i>Proteus mirabilis</i>
130	m	urine	<i>Escherichia coli</i>
131	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
132	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
134	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
135	m	pus	<i>Escherichia coli</i>
137	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
138	m	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
139	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
141	m	urine	<i>Escherichia coli</i>
143	m	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
144	m	urine	<i>Escherichia coli</i>
145	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
146	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
147	m	urine	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
148	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
149	m	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
150	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
151	f	urine	<i>Proteus mirabilis</i>
152	m	urine	<i>Escherichia coli</i>
153	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
154	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
155	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
160	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
161	m	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
162	m	pus	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
163	m	urine	<i>Escherichia coli</i>
164	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
165	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
166	m	urine	<i>Escherichia coli</i>
167	f	urine	<i>Escherichia coli</i>

168	m	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
169	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
170	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
172	m	urine	<i>Escherichia coli</i>
173	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
174	m	urine	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
175	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
177	m	urine	<i>Escherichia coli</i>
178	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
181	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
182	f	urine	<i>Providencia stuartii</i>
183	f	urine	<i>Proteus mirabilis</i>
184	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
185	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
187	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
189	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
191	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
192	m	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
193	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
194	m	urine	<i>Escherichia coli</i>
195	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
196	f	urine	<i>Providencia stuartii</i>
197	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
199	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
200	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
201	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
203	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
204	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
207	f	urine	<i>Acinetobacter baumannii</i>
208	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
209	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
210	m	urine	<i>Escherichia coli</i>
211	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
212	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
213	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
214	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
215	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
216	m	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
217	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
218	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
221	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
222	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
223	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
225	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
226	m	urine	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
227	f	urine	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

229	f	pv	<i>Escherichia coli</i>
230	m	pus	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
231	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
235	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
236	f	pus	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
237	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
238	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
239	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
242	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
243	m	urine	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
244	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
245	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
246	m	oreille	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
247	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
248	m	urine	<i>Escherichia coli</i>
249	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
250	m	urine	<i>Escherichia coli</i>
251	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
252	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
253	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
254	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
255	m	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
256	m	urine	<i>Escherichia coli</i>
257	f	pus	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
258	m	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
259	f	urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
260	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
261	m	urine	<i>Escherichia coli</i>
262	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
267	f	urine	<i>Escherichia coli</i>
269	f	urine	<i>Escherichia coli</i>

## **Annex 05.** Composition des milieux solide

### **- Milieu de Muller-Hinton : (JOFFIN et GUY, 2006 )**

Formule en g/l d'eau distillée

Extrait de viande de boeuf .....	300g
Peptone de caséine.....	17,5g
Amidon.....	1,5g
Gélose.....	10g

pH= 7,4

### **- Milieu CHROMagr Orientation (Rambach, 1993):**

Formule approximative en un litre d'eau distillée

Chromopeptone.....	16.1 g
Chromogen Mix.....	1.3 g
Agar.....	15.0 g

pH= 7.0 +/- 0.2



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Larbi Tébessi - Tébessa  
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

### Déclaration sur l'honneur de non-plagiat

(à joindre obligatoirement au mémoire, remplie et signée)

Je soussigné(e),

Nom, Prénom : *Quonadi Yousof*

Régulièrement inscrit(e) en Master au département : *des sciences de la nature et la vie*

N° de carte d'étudiant : *4012952*

Année universitaire : *2016/2017*

Domaine : *Sciences de la Nature et la vie*

Fillière : *Science Biologie*

Spécialité : *Microbiologie Appliquée à la Santé et l'environnement*

Intitulé du mémoire : *Caractérisation Biochimique et évolution de la résistance aux antibiotiques de différents isolats cliniques*

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

Sanctions en cas de plagiat prouvé :

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

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

04 جوان 2017

Fait à Tébessa, le : *04/06/2017*

Signature de l'étudiant(e) :

