



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



## MEMOIRE DE MASTER

Domaine : des sciences de la nature et de la vie  
Filière : sciences biologiques  
Option : microbiologie appliquée

### Thème :

**Caractérisation phénotypique de la résistance aux  
 $\beta$ -lactamines à large spectre des bacilles à Gram négatifs  
isolés à partir des produits pathologiques**

Présenté par :  
Fares Nacereddine  
Djeddai Samir

### Devant le jury :

Présidente Dr. Smaali. S	M.A.A	Université de Tébessa
Promoteur Dr. Mechai. A	M.C.A	Université de Tébessa
Co Promotrice Dr. Debabza. M	M.C.B	Université de Tébessa
Examinatrice Mme. Chadi. H	M.A.A	Université de Tébessa

Date de soutenance : 28 Mai 2018

Note : ..... Mention : .....



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



## MEMOIRE DE MASTER

**Domaine : des sciences de la nature et de la vie**  
**Filière : sciences biologiques**  
**Option : microbiologie appliquée**

### Thème :

**Caractérisation phénotypique de la résistance aux  
 $\beta$ -lactamines à large spectre des bacilles à Gram négatifs  
isolés à partir des produits pathologiques**

**Présenté par :**  
**FaresNacereddine**  
**Djeddai Samir**

### Devant le jury :

<b>Présidente Dr Smaali. S</b>	<b>M.A.A</b>	<b>Université de Tébessa</b>
<b>Promoteur Dr.Mechai. A</b>	<b>M.C.A</b>	<b>Université de Tébessa</b>
<b>Co Promotrice Dr .Debabza. M</b>	<b>M.C.B</b>	<b>Université de Tébessa</b>
<b>Examinatrice Mme. Chadi. H</b>	<b>M.A.A</b>	<b>Université de Tébessa</b>

**Date de soutenance : 28 Mai 2018**

**Note : ..... Mention : .....**

## ملخص

يهدف هذا البحث الى تقييم تواتر البكتيريا سالبة لصبغة غرام متعددة المقاومة من مختلف العينات المرضية في تبسة، إن السلالات المعزولة تم التعريف بها حسب الخصائص البكتريولوجية الكلاسيكية. ولقد تم دراسة حساسية السلالات البكتيرية المعزولة للمضادات الحيوية بطريقة الانتشار في الأقراص. إن إنتاج إنزيمات البيبتالاكتماز ذات الطيف الموسع عند السلالات البكتيرية المعزولة انجز عن طريق اجراء فحصين فحص التصارع وفحص ثنائي التصارع.

من أصل 32 بكتيريا معزولة المتسببة في التهاب المسالك البولية نجد ان 29 هي من البكتيريا المعوية بنسبة % 90.62 و % 9.38 بالنسبة لبكتيريا سالبة صبغة غرام الغير مخمر.

تعد *Escherichia coli* أكثر البكتيريا انتشارا بنسبة % 41.3 متبوعة بـ *Enterobactere* بنسبة % 20.67 ثم *Klebsiella* و *Serratia* بـ % 17.24 و *Proteus* بنسبة % 03.45.

دراسة الحساسية للمضادات الحيوية بينت ان السلالات المعزولة اظهرت مقاومة لجميع عائلات المضادات الحيوية خاصة البيبتالاكتامين مع فعالية ملحوظة للايميبينام والامينوزيد وعائلة الكينولون. فحوص الكشف سمحت بتحديد 11 سلالة منتجة للبيبتالاكتماز ذات الطيف الموسع أي بـ % 36.36 من البكتيريا المعوية.

ان تحليل النتائج يسمح لنا بالقول ان عائلة البيبتالاكتامين هي الأكثر عرضة للمقاومة وقد يكون الاستعمال المفرط لهذه العائلة هو السبب الرئيسي في الانتشار الواسع لهذا النوع من المقاومة عند البكتيريا في الأوساط الاستشفائية.

**الكلمات المفتاحية:** العصيات سالبة لصبغة غرام، البكتيريا المعوية، مقاومة المضادات الحيوية والبيبتالاكتماز ذات الطيف الموسع.

## Résumé

L'objectif de ce travail était d'évaluer la fréquence des bacilles à Gram négatif multi-résistants aux antibiotiques à partir des différents prélèvements pathologiques. Les souches ont été identifiées suivant les critères bactériologiques classiques. Un antibiogramme a été réalisé par la méthode de diffusion des disques. La production de BLSE chez les souches a été détectée par les tests : test de synergie et test du double disque.

Les tests bactériologiques ont révélé que sur 32 souches isolées responsables des infections urinaires, 29 (90.62%) étaient des EGN et 3 (9.38%) pour BGNF.

Le profil bactériologique était largement dominé par le genre *Escherichia coli* (41.38%), suivi d'*Entérobacter* (20.67%), de *Klebsiella* (17.24%), de *Serratia*, (17.24%) et de *Proteus* (3.45%).

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a montré que les souches isolées expriment à des degrés variés, une résistance aux antibiotiques des différentes familles, en particulier, aux  $\beta$ -lactamines avec cependant, une efficacité remarquable de l'imipénème, des aminosides et des quinolones. Les tests de détection des BLSE ont permis de caractériser 11 souches productrices de BLSE, soit (36.36%) des entérobactéries isolées.

L'analyse des résultats, nous a permis de constater que la famille d'antibiotiques la plus touchée par la résistance est la famille des bêta-lactamines. Ceci pourrait être dû à l'utilisation abusive de ces antibiotiques cause principale de la grande dissémination de ce type de résistance entre les bactéries dans l'environnement hospitalier.

**Mots clés :** bacilles à Gram négatif, Entérobactéries, résistance aux antibiotiques, bêta-lactamases à spectre étendu.

## Abstract

The objective of this study was to evaluate the frequency of Gram-negative bacilli multi-resistant to antibiotics from different pathological samples. The strains were identified according to conventional bacteriological criteria. The antibiogram was performed by the disk diffusion method. ESBL production was detected by two tests: synergy test and double disc test.

Bacteriological tests revealed that of 32 isolated strains responsible for urinary tract infection, 29 (90.62%) were EGN and 3 (9.38%) were for BGNF. The bacteriological profile was largely dominated by the genus *Escherichia coli* (41.38%), followed by *Enterobacter* (20.67%), *Klebsiella* (17.24%), *Serratia* (17.24%) and *Proteus* (3.45%).

The study of antibiotic susceptibility has shown that the isolated strains express, to varying degrees, antibiotic resistance of the different families, in particular to  $\beta$ -lactams, with a remarkable efficacy of imipenem, aminoglycosides and quinolones, however. The ESBL detection tests made it possible to characterize 11 ESBL producing strains, ie (36.36%) of the isolated Enterobacteria.

The analysis of the results showed that the family of antibiotics the most affected by resistance is the beta-lactam family. This could be due to the misuse of these antibiotics as the main cause of the large spread of this type of resistance between bacteria in hospital environment.

**Key words:** Gram-negative bacilli, *Enterobacteriaceae*, antibiotic resistance, extended-spectrum beta-lactamases.

## REMERCIEMENTS

*Tout d'abord, longue vie à « Allah » qui nous a guidé sur le droit chemin tout au long du travail et nous a inspiré les bons pas et les justes réflexes. Sans sa miséricorde, ce travail n'aurait pas abouti.*

*L'encadrement scientifique de ce travail a été assuré par **Dr. Mechai Abdelbasset**, maître de conférence classe A à la faculté des sciences de la Nature et de la vie, Université Tébessa. Nous tenons vivement à lui exprimer nos profonde reconnaissances gratitude pour sa disponibilité, sa patience, sa compréhension, ses qualités humaines et ses intérêts portés pour notre sujet de travail. Nous le remercions de nous avoir fait confiance et d'avoir été présent aussi souvent que possible malgré ses tâches pédagogiques. Son soutien permanent et son dynamisme nous ont permis d'avancer plus loin dans notre travail.*

*Nos remerciements vont aussi à*

*Mme. **Smaali**, d'avoir ménagé son temps pour présider ce jury  
Mme. **Chadi**, pour avoir bien voulu siéger dans ce jury afin d'examiner et critiquer ce mémoire et nous éclairer par ces précieux conseils.*

*Mme. **Mechai***

*Aucun remerciement ne saurait exprimer notre respect et considération pour les orientations que vous avez consenties pour notre étude de l'Université.*

*Mme. **Fenghour**, Mme. **Benhadj**, Mme. **Azizi**, Mr. **Menasriaet**, tous les enseignants qui nous ont fait former durant ces 5 années merci pour votre encouragement et gentillesse.*

*Tous nos amis pour leur solidarité*

*La meilleure équipe, l'équipe de la microbiologie*

***A nos parents***

*Pour l'enfance merveilleuse qu'ils nous ont offerte ainsi que pour leurs encouragements.*

*Pour leurs soutiens et leurs aides.*

*Avec tout notre amour.*

***A tous mes amis***

*Pour leurs bonnes humeurs, leurs gentillesse et pour tous nos fous rires partagés.*

***Pour tout ce qu'ils nous ont appris***

*Merci à tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre ont contribué à la réalisation de ce travail, et que nous ne pouvons citer individuellement.*

**DEDICACES**

*Je dédie ce travail*

*A mes parents.*

*A mes sœurs : Ibtissam et Assia.*

*A mes frères : Imad, Fares et Abdelaziz.*

*A toutes mes amies : Nacereddine , Taki , Abdelhak,*

*Oualid, Yahia, Chams, Saïd, Med amine et*

*Abderrahmen.*

*A tous ceux qui m'ont aidé dans mes études.*

*A tous mes proches, et tous ceux qui m'aiment.*

***Samir***

**DEDICACE**

*Je dédie ce travail*

*A mes parents.*

*A mes sœurs : Djemaa et Aïcha.*

*A mes frères : Khaled, Ahmed et Noureddine.*

*A toutes mes amies : Samir, Ilyes, Ismaïl, Haron,*

*Mourad, et Oualid.*

*A tous ceux qui m'ont aidé dans mes études.*

*A tous mes proches, et tous ceux qui m'aiment.*

***Nacer***



## LISTE DES TABLEAUX :

N°	Titre du tableau	Page
<b>Tableau 01</b>	Principaux caractères distinctifs des <i>Proteus</i>	<b>10</b>
<b>Tableau 02</b>	Caractères différentiels des <i>Pseudomonas</i>	<b>12</b>
<b>Tableau 03</b>	Liste des antibiotiques testés sur les entérobactéries	<b>33</b>
<b>Tableau 04</b>	Liste des antibiotiques testés sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<b>34</b>
<b>Tableau 05</b>	Répartition des souches selon les sites de prélèvement	<b>37</b>
<b>Tableau 06</b>	Répartition détaillée des souches isolées	<b>39</b>
<b>Tableau 07</b>	Pourcentage de sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries isolées	<b>42</b>
<b>Tableau 08</b>	Lecture de la galerie miniaturisée Api 20 E	<b>74</b>
<b>Tableau 09</b>	la sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries isolées	<b>75</b>
<b>Tableau 10</b>	résultat de teste double disque des souches Entérobactéries	<b>76</b>
<b>Tableau 11</b>	résultat de teste double disque des souches <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<b>76</b>

## LISTE DES FIGURES :

N°	Titre de la figure	Page
<b>Figure 01</b>	Mécanismes de résistance des bactéries Gram-négatives, et les antibiotiques touchés	<b>18</b>
<b>Figure 02</b>	Schéma explicatif du test du double disque	<b>26</b>
<b>Figure 03</b>	Observation microscopique de la souche E10	<b>38</b>
<b>Figure 04</b>	Observation microscopique de la souche E06	<b>38</b>
<b>Figure 05</b>	Photographie de l'API20E de la souche de E26	<b>38</b>
<b>Figure 06</b>	Photographie de l'API20E de la souche de E 13	<b>38</b>
<b>Figure 07</b>	Répartition des souches en fonction des groupes	<b>40</b>
<b>Figure 08</b>	Répartition des souches en fonction du genre des Entérobactéries	<b>40</b>
<b>Figure 09</b>	Répartition des souches en fonction du des espèces des Entérobactéries	<b>41</b>
<b>Figure 10</b>	Sensibilité aux antibiotiques des Entérobactéries isolées	<b>43</b>
<b>Figure 11</b>	Sensibilité aux antibiotiques des <i>Escherichia coli</i> isolées	<b>43</b>
<b>Figure 12</b>	Sensibilité aux antibiotiques des <i>Enterobacter cloacae</i> isolées	<b>44</b>
<b>Figure 13</b>	Sensibilité aux antibiotiques des <i>Klebsiella spp</i>	<b>45</b>
<b>Figure 14</b>	Sensibilité aux antibiotiques des <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolées	<b>46</b>
<b>Figure 15</b>	Sensibilité aux antibiotiques des <i>Serratia ssp</i> isolées	<b>46</b>
<b>Figure 16</b>	Sensibilité aux antibiotiques de <i>Proteus vilgarus</i> isolée	<b>47</b>
<b>Figure 17</b>	Sensibilité aux antibiotiques des <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolées	<b>48</b>
<b>Figure 18</b>	Test du double disque positif de la souche E04	<b>49</b>
<b>Figure 19</b>	Test du double disque positif de la souche E11	<b>49</b>
<b>Figure20</b>	pourcentages des Entérobactéries productrices des BLSE	<b>59</b>
<b>Figure 21</b>	Répartition des EBLSE selon les espèces	<b>50</b>
<b>Figure 22</b>	Sensibilité aux antibiotiques des EBLSE	<b>50</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

**%** : Pourcent

**°C** : Degré Celsius

**ADH** : Arginine dihydrolase

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

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

**ARA** : L-arabinose

**ARN** : Acide ribonucléique

**ARNr** : Acide ribonucléique ribosomal

**ATB** : Antibiotique

**BGN** : Bacille à Gram négatif

**BGNnF** : Bacille à Gram négatif non fermentaire

**BL** :  $\beta$ -lactamases

**BLSE** :  $\beta$ -lactamase à spectre élargi

**Case BN** : Céphalosporinase de bas niveau

**Case HN** : Céphalosporinase de haut niveau

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

**CTX-M** : Céfotaximase-Muenchen

**EBLSE** : Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi

**EDTA**: Éthylène-diamine-tétra-acétique

**GEL** : Gélatinase

**GLU** : Glucose

**H<sub>2</sub>S** : Sulfure d'hydrogène

**I**: Intermédiaire

**IND** : Indole

**INO** : Inositol

**KES** : *Klebsiella-Enterobacter-Serratia*

**LDC**: Lysine décarboxylase

**LPS**: Lipopolysaccharide

**m** : mètre

**MAL** : D-maltose

**MAN** : D-mannitol  
**MC** : Gélose Mac Conkey  
**MEL** : D-melibiose  
**MH** : Mueller Hinton  
**mm** : millimètre  
**MNE** : D-mannose  
**N2** : Azote  
**NIT** : Nitrate réductase  
**nm** : nanomètre  
**NO2** : Nitrites  
**NO3** : Nitrates  
**ODC** : Ornithine décarboxylas  
**ONPG** : Ortho-Nitrophényl- $\beta$ -galactoside  
**Pase BN** : Pénicillinase de bas niveau  
**Pase HN** : Pénicillinase de haut niveau  
**PLP**: Protéines Liant les Pénicillines  
**R**: Résistant  
**RHA** : L-rhamnose  
**S** : Sensible  
**SAC** : D-saccharose  
**SOR** : D-sorbitol  
**TDA**: Tryptophane désaminase  
**TOB**: Tobramycine  
**TRP** : L-tryptophane  
**URE** : Uréase  
**VP**: Voges Proskauer  
 **$\mu$ g** : Microgramme  
 **$\mu$ l** : Microlitr

<b>TABLE DES MATIÈRES</b>	<b>Page</b>
ملخص .....	I
RESUME .....	Ii
ABSTRACT .....	Iii
REMERCIEMENTS .....	Iv
DEDICACE .....	V
LISTE DES TABLEAUX .....	Vii
LISTE DES FIGURES .....	Viii
LISTE DES ABREVIATIONS .....	Ix
TABLE DES MATIERES.....	Xii
INTRODUCTION.....	01
 <b>CHAPITRE 01: Les bacilles à Gram négatif</b>	
<b>1. Les bacilles à Gram négatif.....</b>	<b>03</b>
<b>1.1. Les Entérobactéries .....</b>	<b>03</b>
<b>1.1.1. <i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>03</b>
a) Habitat.....	03
b) Caractères bactériologiques.....	04
c) Pouvoir pathogène.....	04
<b>1.1.2. <i>Salmonella</i> .....</b>	<b>05</b>
a) Habitat .....	05
b) Caractères bactériologiques.....	05
c) Pouvoir pathogène.....	06
<b>1.1.3. <i>Klebsiella-Enterobacter-Serratia</i>.....</b>	<b>06</b>
<b>1.1.3.1. <i>Klebsiella</i>.....</b>	<b>07</b>
a) Habitat.....	07
b) Caractères bactériologiques.....	07
<b>1.1.3.2. <i>Enterobacter</i>.....</b>	<b>07</b>
a) Habitat.....	08
b) Caractères bactériologiques.....	08
<b>1.1.3.3. <i>Serratia</i>.....</b>	<b>08</b>
a) Habitat.....	08
b) Caractères bactériologiques.....	08
<b>1.1.3.4. Pouvoir pathogène du groupe K. E. S .....</b>	<b>09</b>
<b>1.1.4. <i>Proteus</i>.....</b>	<b>09</b>
a) Habitat .....	09
b) Caractères bactériologiques.....	09
c) Pouvoir pathogène.....	10

<b>1.2. Bacilles Gram négatifs non fermentaires.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2.1. Caractères généraux.....</b>	<b>11</b>
<b>1.2.2. <i>Pseudomonas</i>.....</b>	<b>11</b>
a) Habitat.....	11
b) Caractères bactériologiques.....	11
<b>1.2.2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....</b>	<b>13</b>
a) Épidémiologie.....	13
b) Pouvoir pathogène.....	13
<b>1.2.3. <i>Acinetobacter</i>.....</b>	<b>13</b>
a) Habitat.....	14
b) Caractères bactériologiques.....	14
c) Pouvoir pathogène.....	15

## CHAPITRE 02 : Résistance aux antibiotiques

<b>1. Résistance aux antibiotiques.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1. Définition.....</b>	<b>16</b>
<b>1.2. Types de résistance.....</b>	<b>16</b>
1.2.1. Résistance naturelle.....	16
1.2.2. Résistance acquise.....	16
a) Résistances par mutation chromosomique.....	17
b) Résistances extra-chromosomiques.....	17
<b>1.3. Les niveaux de résistance.....</b>	<b>17</b>
<b>1.4. Mécanismes de Résistance bactérienne.....</b>	<b>17</b>
<b>1.5. Phénotype de résistance.....</b>	<b>18</b>
<b>2. Résistance des entérobactéries aux antibiotiques.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1. Entérobactéries et <math>\beta</math>-lactamines.....</b>	<b>19</b>
2.1.1. Résistance naturelle ou phénotypes « sauvages » .....	19
2.1.2. Résistance acquise .....	20

## CHAPITRE 03 : Les bêta- lactamase des bacilles à Gram négatifs

<b>1. Les bêta- lactamase des bacilles à Gram négatifs.....</b>	<b>22</b>
<b>1.1. Définition.....</b>	<b>22</b>
<b>1.2. Source et localisation.....</b>	<b>22</b>
<b>1.3. La classification.....</b>	<b>23</b>
1.3.1. Classe A.....	23
1.3.2. Classe B.....	24
1.3.3. Classe C .....	24
1.3.4. Classe D.....	24
<b>1.4. Bêta-lactamase à spectre élargie (BLSE) .....</b>	<b>24</b>

1.4.1. Diversité des types de BLSE.....	25
1.4.1.1. Bêta - lactamase de type TEM.....	25
1.4.1.2. Bêta - lactamase de type SHV.....	25
1.4.1.3. Bêta - lactamase de type OXA.....	25
1.4.1.4. Bêta - lactamase de type CTX-M.....	26

## MATERIEL ET METHODES

1. Cadre de l'étude .....	28
2. Objectif de l'étude .....	28
3. Matériel.....	28
3.1. Matériel biologique .....	28
3.1.1. Souches étudiées.....	28
3.2. Milieux de culture.....	28
3.2.1. Milieux de culture liquides.....	28
3.2.2. Milieux de culture solides.....	28
3.3 Tests biochimiques.....	29
3.4 Antibiotiques.....	29
2. Méthodes.....	30
2.1. Techniques de Prélèvement.....	30
2.1.1. Prélèvement d'urine.....	30
2.2. Isolement.....	30
2.3. Purification.....	30
2.4. Identification des souches.....	31
2.4.1. Identification biochimique par la galerie API20E....	31
a) Principe et description de la galerie.....	31
b) Technique.....	31
2.5. Conservation.....	32
2.6. Étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques.....	33
a) Principe.....	33
b) Technique.....	34
c) Lecture et interprétation.....	34
2.7 Test de synergie.....	35
a) Principe.....	35
b) Technique.....	35
c) Lecture et interprétation.....	35
2.8 Test du double disque.....	36
a) Principe.....	36

b) Technique.....	36
c) Lecture.....	36
<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	
<b>1. Isolats bactériens.....</b>	<b>37</b>
<b>1.1. Aspect macroscopique des isolats.....</b>	<b>37</b>
a) Sur la gélose Mac Conkey.....	37
b) Sur la gélose nutritive.....	37
<b>1.2. Aspect microscopique.....</b>	<b>38</b>
<b>1.3. Identification biochimique.....</b>	<b>38</b>
<b>2. Répartition des souches en fonction du groupe de BGN .....</b>	<b>40</b>
<b>2.1. Répartition des souches en fonction du genre.....</b>	<b>40</b>
<b>2.2. Répartition des souches en fonction des espèces.....</b>	<b>41</b>
2.2.1. Entérobactéries.....	41
2.3.2. Les bacilles Gram négatifs non fermentaires.....	41
<b>3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1. Les Entérobactéries.....</b>	<b>41</b>
3.1.1. <i>Escherichia coli</i> .....	43
3.1.2. <i>Enterobacter</i> .....	44
3.1.3. <i>Klebsiella</i> .....	45
a) <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	45
3.1.4. <i>Serratia</i> .....	46
3.1.5. <i>Proteus</i> .....	47
a) <i>Proteus vilgarus</i> .....	47
<b>3.2. Bacilles à Gram négatifs non fermentaires.....</b>	<b>48</b>
3.2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	48
<b>4. Entérobactéries productrices des BLSE.....</b>	<b>49</b>
4.1. Résultats des tests de détection des BLSE.....	49
4.2. Répartition des EBLSE selon les espèces.....	50
4.3. Résistance aux antibiotiques des souches EBLSE.....	51
<b>DISCUSSION</b>	
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>57</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>59</b>
<b>ANNEXE.....</b>	<b>70</b>



### Introduction

Les bacilles à Gram négatif occupent une place très importante parmi les micro-organismes responsables d'infections nosocomiales. Ces bactéries ont un niveau de résistance naturel élevé, en relation avec différents mécanismes de résistance. Elles peuvent acquérir des résistances qui peuvent être le fait d'une mutation chromosomique ou de l'acquisition de plasmides de résistance. Alors que la résistance par mutation chromosomique ne se transmet pas horizontalement, la résistance par acquisition de plasmides de résistance peut être transmise d'une bactérie à une autre, d'où son caractère épidémique. La détection de cette résistance permet de prévenir et de ralentir la diffusion de souches multirésistantes et d'optimiser le choix de l'antibiothérapie (**Debabza et al., 2018**).

Les  $\beta$ -lactamines représentent la principale famille d'antibiotiques la plus développée et la plus administrée dans les traitements des infections bactériennes dans le monde. Cette large utilisation est due à leur spectre d'action élargi, ainsi que leur faible toxicité, leur efficacité et à leur faible coût que certaines molécules (**Livermore, 1995**).

L'augmentation et la dissémination de la résistance bactérienne des bacilles à Gram négatif, représente un problème majeur de santé publique. Les infections nosocomiales causées par ces bactéries multirésistantes sont associées à un taux de morbidité et une mortalité élevées, à des hospitalisations prolongées, à des échecs thérapeutiques et à une augmentation des coûts des soins, (**Schwaber et Carmeli, 2007**).

Chez les bactéries, il existe 4 types de mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines: la faible affinité pour les PLP, l'imperméabilité, l'efflux et l'inactivation enzymatique par les  $\beta$  lactamases (**Poole, 2004**). Les  $\beta$ -lactamases constituent le principal mécanisme de résistance aux  $\beta$ -lactamines, des bactéries à Gram négatif (**Jacoby et Price, 2005**). Ces enzymes peuvent être chromosomiques ou plasmidiques et produites d'une manière inductible ou constitutive. Elles sont sécrétées dans l'espace périplasmique chez les bactéries à Gram négatif ou dans le liquide extracellulaire chez les bactéries à Gram positif (**Essack, 2001**).

Parmi les bactéries multi résistantes, les bactéries sécrétrices des bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) prennent une place de plus en plus importante. Les espèces de ce phénotype ont été largement exposées au cours d'une vingtaine d'années à une utilisation extensive des antibiotiques. Revers de la médaille, elles n'ont pas été épargnées par la résistance croissante aux molécules les plus fréquemment utilisées (**Péan et al., 2001**). Même qu'elles ont largement

été diffusées dans le monde depuis leur première mise évidence en 1983 et font l'objet de nombreuses études (**Paterson et Bonomo,2005**).

Les  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) sont des enzymes plasmidiques, appartenant à la classe A d'Ambler, qui confèrent une résistance à toutes les pénicillines, aux céphalosporines de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> génération et à au moins une céphalosporine de 3/4<sup>ème</sup> génération (C3/4G) ou à l'aztréonam (**Robin et al., 2012**).

L'acquisition des données sur la résistance bactérienne aux antibiotiques est nécessaire pour une meilleure prise en charge thérapeutique des infections et pour élaborer une stratégie de contrôle de la résistance antimicrobienne. La lutte contre la résistance aux  $\beta$ -lactamine peut se faire suivant plusieurs approches entre autre, l'utilisation des antibiotiques non  $\beta$ -lactamines et des  $\beta$ -latamines stables aux  $\beta$ -lactamases. L'approche thérapeutique la plus utilisée en clinique est l'utilisation de la combinaison des inhibiteurs suicides (acide clavulanique, sulbactame et tazobactame) des  $\beta$ -lactamases avec les pénicillines. Ces combinaisons inhibent la croissance des bactéries produisant les  $\beta$ -lactamases de la classe A d'Ambler (1980) tels que les enzymes de type TEM (Temoniera), SHV (sulfhydryl variable), qui sont généralement des  $\beta$ -lactamases à médiation plasmidique des bacilles Gram négatif (**Bush et al.,1995**).

Dans ce contexte notre contribution fixe les objectifs suivants :

- La Collection, l'isolement et l'identification des bacilles Gram négatifs, à partir de différents prélèvements pathologiques ;
- L'étude de la sensibilité aux antibiotiques, afin de cibler les souches multi résistantes ;
- La recherche des souches productrices de BLSE ;

# **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

**CHAPITRE 01 :**  
**Les bacilles à Gram négatif**

## 1. Les bacilles à Gram négatif :

Les bacilles à Gram négatif, fréquemment isolés des laboratoires de bactériologie, occupent une place importante en pathologie humaine. Généralement, on les divise en deux grands groupes : les entérobactéries et les bacilles à Gram négatif non fermentaires (**Liassine, 2000**).

Les entérobactéries sont responsables des nombreuses infections communautaires et infections nosocomiales notamment les infections urinaires, les gastro-entérites sévères, les infections respiratoires...etc. Les bacilles à Gram négatif non fermentaires (*Pseudomonas sp*, *Acinetobacter ssp*...etc), quant à eux, sont à l'origine des infections nosocomiales diverses notamment chez les immunodéprimés (VIH, leucémiques, cancéreux, greffés...).

L'importance de ces bacilles à Gram négatif est liée à leur multi résistance aux antibiotiques actuellement disponibles. C'est pourquoi ces bacilles à Gram négatif ont suscité de nombreuses études ces dernières décennies (**Gueye, 2007**).

### 1.1. Les Entérobactéries :

En milieu hospitalier, environ 40 à 50% des bactéries isolées appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*. Cette famille est constituée de genres bactériens qui sont rassemblés en raison des caractères bactériologiques communs : aéro-anaérobies facultatifs, mobiles grâce à une ciliature polaire, ou immobiles, non sporulés, poussant rapidement sur des milieux ordinaires, ne possédant pas d'oxydase, réduisant les nitrates en nitrites, utilisant le glucose par métabolisme fermentatif avec ou sans production de gaz (**Eyquem et al., 2000; Avril et al., 2000**).

#### 1.1.1. *Escherichia coli* :

Isolée pour la première fois par Escherich en 1885, *Escherichia coli* est l'espèce bactérienne qui a été la plus étudiée par les fundamentalistes pour des travaux de physiologie et de génétique (**Avril et al., 2000**).

##### a) Habitat :

*Escherichia coli* se retrouve en abondance dans la flore commensale humaine, en particulier dans le tube digestif de l'homme qu'elle colonise dès les premières heures de la naissance. Elle constitue l'espèce dominante de la flore aérobie anaéro-tolérante (**Ahoyo et al., 2007 ; Bonacorsi et al., 2001**).

**b) Caractères bactériologiques :****➤ Caractères morphologiques et culturels :**

Bacille de taille comprise entre 1 et 1,5 µm de largeur et 2 à 6 µm de longueur et souvent mobile. *E. coli* donne des colonies non pigmentées de 2 à 3 mm, de type "S" smooth: lisses et brillantes, ou de type "R" rough: présentant une surface sèche et rugueuse. Certaines colonies sont particulièrement mucoïdes et correspondent à la présence d'une capsule liée aux lipopolysaccharides de la membrane externe (Avril *et al.*, 1992 ; Avril *et al.*, 2000).

**➤ Caractères biochimiques :**

Elle représente l'espèce type de genre *Escherichia*. Appelée communément « colibacille » cette espèce possède des caractères biochimiques particuliers permettant de la différencier des espèces voisines. Lactose (+). La production d'indole à partir de tryptophane, l'absence d'utilisation du citrate comme source de carbone et l'absence de production d'acétoïne (réaction de Voges- Proskauer négative) (Joly et Reynaud, 2007).

**➤ Caractères antigéniques :**

Les différents sérotypes d' *E. coli* contiennent plusieurs catégories d'antigènes :

- **Antigènes somatiques O** : ils sont de nature lipopolysaccharidique ; il existe environ 160 antigènes O différents ;
- **Antigènes capsulaires K** : ils sont de nature polysaccharidique ; environ 70 antigènes d'enveloppe différents ont été reconnus;
- **Antigènes flagellaires H** : ils sont de nature protéique ; on en connaît 52 types, ils ne sont présents que chez les souches mobiles (Marc *et al.*, 1999; Avril *et al.*, 2000).

**c) Pouvoir pathogène :**

Les colibacilles, hôtes normaux de l'intestin, ne provoquent normalement pas de maladie. Cependant ils possèdent un potentiel pathogène qu'ils expriment dans certaines circonstances (pathogènes opportunistes) (CHU-PS, 2003).

C'est une des espèces bactériennes les plus souvent rencontrées en pathologie humaine. La plupart sont commensales, mais certaines souches possèdent des facteurs de virulence qui leur permettent de déclencher des diarrhées. *Escherichia coli* est une cause majeure de diarrhée aiguë dans le monde (Berche, 2003).

A côté des infections intestinales, elle est responsable d'infections extra-intestinales diverses : urinaires, abdominale, méningées et les bactériémies (**Fauchère et Avril, 2002**).

### **1.1.2. *Salmonella* :**

Les salmonelles sont des bactéries pathogènes, à transmission oro-fécale (**Bourgeois et al., 1996**).

#### **a) Habitat :**

Les *Salmonella* sont très largement répandues dans la nature et leur réservoir s'étend à tout le règne animal, en particulier les volailles. Elles sont présentes dans le tube digestif des malades et des porteurs sains, chez l'homme et chez les animaux, qui contaminent le milieu extérieur par leur excréta (**Flandrois, 1997**).

#### **b) Caractères bactériologiques :**

##### **➤ Caractères morphologiques et culturels :**

Les Salmonelles sont des germes mésophiles aéro-anaérobies et hygrophiles qui se présentent sous forme de bâtonnets de deux à trois microns de long et de 0,6 à 0,8 microns de large. La plupart d'entre elles ne sporulent pas et ne possèdent pas de capsule. En effet les Salmonelles cultivent sur des milieux ordinaires à base d'extraits de viande, à un pH voisin de la neutralité et à une température optimale de croissance de 37°C, les colonies sont généralement rondes, lisses (ou Smooth : S) à bords réguliers et ont un diamètre de 2 à 3 mm.

Les Salmonelles donnent des cultures homogènes après repiquage en bouillon. Il arrive exceptionnellement que des cultures de Salmonelles soient isolées sous forme rugueuse (ou Rough : R). La plupart des Salmonelles sont capables de cultiver sur milieu minimum, sans facteur de croissance. Quand elles sont adaptées à un hôte pour lequel elles ont un pouvoir pathogène manifeste, elles peuvent exiger un ou plusieurs facteurs de croissance pour cultiver (**Fagon et al, 1996**).

##### **➤ Caractères biochimiques :**

Les principaux caractères positifs sont : H<sub>2</sub>S, gaz (glucose), LDC, ODC, citrate de Simmons. Les caractères qui sont toujours négatifs sont : lactose, ONPG, uréase, TDA, gélatinase, VP, ADH, indole, saccharose. Il est important de noter quelques exceptions à ces caractères fondamentaux : *S. paratyphi* A ne produit pas H<sub>2</sub>S et elle est LDC (-); *S. typhi* ne

produit pas de gaz (glucose) et produit peu ou pas d'H<sub>2</sub>S (Eyquem *et al.*, 2000; Avril *et al.*, 2000).

➤ **Caractères antigéniques :**

Les bactéries du genre *Salmonella* peuvent être différenciées entre elles grâce à des épreuves sérologiques basées principalement sur trois antigènes qui sont l'antigène O, l'antigène H et l'antigène Vi qui est l'antigène de surface (Boissel et Proye, 1991).

c) **Pouvoir pathogène :**

Les infections à *Salmonella* peuvent revêtir trois aspects :

- **Formes septicémiques :** Ce sont les fièvres typhoïdes et para typhoïdes qui sont des maladies à déclaration obligatoire. Elles sont dues aux salmonelles majeures : *S. typha* et *S. paratyphi* A, B et rarement C, qui ne se rencontrent que chez l'homme, qui en est le seul réservoir (Flandrois, 1997 ; Avril, 1992).
- **Formes digestives :** Il s'agit des toxi-infections alimentaires et des gastro-entérites dues aux salmonelles ubiquistes, dont les hôtes naturels sont les animaux, qui peuvent contaminer l'homme (Flandrois, 1997 ; Avril, 1992).
- **Formes extra-digestives :** Elles sont plus rares : infections urinaires, méningites, infections pulmonaires... (Avril, 1992).

### **1.1.3. *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* :**

Le groupe *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* (K.E.S) rassemble plusieurs espèces bactériennes longtemps considérées comme commensales et actuellement responsables d'un grand nombre de complications infectieuses en milieu hospitalier. Les bactéries de ce groupe partagent en commun les caractères suivants :

- La réaction de Voges-Prauskauer est généralement positive ;
- Ce sont des bactéries pathogènes opportunistes peu virulentes, elles se rencontrent peu en pratique extrahospitalière. Ces bactéries sont responsables d'IN chez des malades débilisés : cirrhotiques, diabétiques, brûlés, cancéreux, malades de réanimation ;
- Ces bactéries sont souvent multirésistantes aux antibiotiques. La fréquence avec laquelle on les rencontre est d'autant plus grande que la pression de sélection par des antibiotiques à large spectre est forte (Berche *et al.*, 1988 ; Flandrois, 1997 ; Avril *et al.*, 2000).



### 1.1.3.1. *Klebsiella* :

Six espèces de *Klebsiella* sont usuellement reconnues : 4 espèces ont un pouvoir pathogène pour l'homme (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. ozaenae* et *K. rhinoscleromatis*); 2 espèces sont trouvées dans l'environnement et sont rarement pathogènes (*K. terrigena* et *K. planticola*) (Avril *et al.*, 2000).

#### a) Habitat :

*K. pneumoniae* et *K. oxytoca* sont les espèces les plus souvent rencontrées. Elles sont fréquemment isolées des eaux, du sol et des végétaux. Elles sont présentes dans la flore fécale de l'homme et sont souvent commensales de la peau, des muqueuses et des voies respiratoires. Les malades s'infectent soit avec leurs propres souches, soit avec des souches responsables de petites épidémies hospitalières. Elles sont alors manuportées de malade à malade (Avril *et al.*, 2000).

#### b) Caractères bactériologiques :

##### ➤ Caractères morphologiques et culturels :

Les *Klebsiella* sont des bacilles à Gram négatif de 0.5 µm sur 3 µm environ, à extrémités arrondies, se présentant de manière isolée, groupés en diplobacilles ou en courtes chaînettes souvent enrobés dans la même capsule. Cette bactérie se distingue par son immobilité constante, elle est asporogène, capsulée mais cette dernière peut être absente chez 5% des souches (Le Minor et Véron, 1989).

##### ➤ Caractères biochimiques :

Ces bactéries fermentent le glucose par la voie du butane-2,3-diol (VP +) avec production de gaz. Elles ne possèdent ni ODC ni ADH, ni TDA, ni lipases et ne produisent pas d'H<sub>2</sub>S (Flandrois, 1997 ; Maza *et al.*, 2004).

### 1.1.3.2. *Enterobacter* :

Les espèces rencontrées en bactériologie médicale sont : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. agglomerans*, *E. gergoviae*, *E. sakazakii*, *E. asburiae* et *E. intermedius* (Avril *et al.*, 2000).

**a) Habitat :**

Les *Enterobacter* sont des commensaux du tube digestif de l'homme et des animaux. On les trouve dans les eaux, sur le sol, sur la peau et les muqueuses. Ce sont des bactéries de l'hospitalisme (Avril *et al.*, 2000).

**b) Caractères bactériologiques :****➤ Caractères morphologiques et culturels :**

Bacilles mobiles, de 0,6 à 1 µm de largeur et 1,2 à 3 µm de longueur. Les colonies des *E. sakazakii* sont pigmentées en jaune. Un pigment jaune peut aussi être produit par des souches d'*E. agglomerans* (Didier, 1998 ; Avril *et al.*, 2000).

**➤ Caractères biochimiques**

Les principaux caractères biochimiques sont : VP (+/-), ODC (+), ADH (+/-), uréase (-), la production d'indole et d'H<sub>2</sub>S sont négatives (Berche *et al.*, 1988 ; Avril *et al.*, 2000).

**1.1.3.3. Serratia :****a) Habitat :**

Les *Serratia* sont des bactéries de l'environnement présentes sur le sol et sur les plantes. Les *Serratia* sont les entérobactéries les plus résistantes aux agents physiques et chimiques. Elles peuvent survivre des mois dans l'eau distillée et se multiplier dans des solutions antiseptiques. Elles se multiplient bien à + 4 °C. Les infections hospitalières peuvent être en relation avec des antiseptiques ou des flacons contaminés, mais la transmission manuportée semble être plus fréquente (Flandrois, 1997 ; Maza *et al.*, 2004).

**b) Caractères bactériologiques :****➤ Caractères morphologiques et culturels :**

Bacille mobile, de taille 0,9 à 2 µm de longueur et 0,5 à 0,8 µm de largeur. *Serratia* donne parfois des colonies pigmentées en rouge (prodigiosine) (Didier, 1998 ; Avril *et al.*, 2000).

➤ **Caractères biochimiques :**

Les *Serratia* sont : VP (+), ONPG (+), elles sont très protéolytiques et liquéfient la gélatine, et elles produisent une lipase. Elles ne possèdent ni ADH, ni TDA, ni uréase et ne produisent pas d'H<sub>2</sub>S (Berche *et al.*, 1988 ; Avril *et al.*, 2000).

#### **1.1.3.4. Pouvoir pathogène du groupe K. E. S :**

Les bactéries K.E.S seraient responsables de près de 10 à 30 % des IN. Leur pathogénicité s'exprime habituellement chez des malades affaiblis. Elles peuvent donner lieu à divers types d'infections : infections broncho-pulmonaires, infections urinaires, infections localisées, septicémies (Berche *et al.*, 1988).

#### **1.1.4. *Proteus* :**

##### **a) Habitat :**

Les espèces du genre *Proteus* sont largement répandues dans la nature et elles sont isolées du sol, de l'eau, de l'intestin de l'homme et de nombreuses espèces animales. Actuellement, le genre *Proteus* rassemble cinq espèces (Lamnaouer, 2002) dont 3 espèces importantes pour l'homme, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* et *Proteus penneri* (Goubau et Pellegrims, 2000).

*Proteus mirabilis* est l'espèce la plus fréquemment isolée de prélèvements cliniques. (Lamnaouer, 2002). Après *Escherichia coli*, elle est la bactérie la plus souvent isolée des urines et elle est à l'origine aussi d'infections nosocomiales (Mahrouki *et al.*, 2009).

##### **b) Caractères bactériologiques :**

➤ **Caractères morphologiques et culturels :**

Les *Proteus* spp sont des bacilles à Gram négatif, généralement très mobiles, polymorphes, mesurant de 0,4 à 0,8 µm de diamètre sur 1,0 µm à 80 µm de longueur. (Lamnaouer, 2002).

Certaines espèces comme *Proteus mirabilis* et *Proteus vulgaris* ont une propriété très connue de s'étaler très rapidement sur boîte de gélose : c'est le phénomène de swarming (Pelmont, 2005).

➤ **Caractères biochimiques :**

Les deux -espèces sont identifiées selon des clés rappelées dans (le tableau01)

Tableau01 : Principaux caractères distinctifs des *Proteus* (Berche *et al.*, 1988)

Caractères	<i>Proteus Mirabilis</i>	<i>Proteus Vulgaris</i>
Envahissement	+	+
Uréase	+	+
H <sub>2</sub> S	+	+
Indole	-	+
Mannose	-	-
ODC	+	-

### c) Pouvoir pathogène :

Les *Proteus* sont responsables de nombreuses IN comme les infections urinaires et les infections respiratoires, en particulier chez l'hôte immunodéprimé. Des méningites à *Proteus* ont été décrites chez le nourrisson. Ces bactéries ont la capacité d'acquérir facilement de nombreux caractères de résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques, expliquant qu'elles soient souvent sélectionnées dans le tube digestif des malades soumis à une antibiothérapie (Berche *et al.*, 1988).

## 1.2. Bacilles Gram négatifs non fermentaires :

La position taxonomique des bacilles à Gram négatif non fermentant a subi de nombreux changements ces dernières années, depuis la publication de la liste : « Approved list of bacterial names » (Rockstroh, 1997). Ces changements reposent sur des données phénotypiques comme les caractères conventionnels ou nutritionnels mais surtout génomiques (teneur en bases de l'ADN, pourcentage d'hybridation ADN-ADN, détermination de la stabilité thermique des hybrides). On peut distinguer un certain nombre de genres [*Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Brevundimonas*, *Acinetobacter*, *Ralstonia*, *Shewanella*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Chryseomonas*, *Flavobacterium*, *Flavimonas*, *Frateuria*, *Gluconobacter*, *Rhizobium*, *Bordetella*, *Kingella*, *Oligella*, *Protomonas*, *Xanthomonas*].

Les bacilles à Gram négatif non fermentant (BGN-NF) sont des bactéries ubiquitaires retrouvées dans l'environnement (sols, eaux, air...) et pouvant être responsables d'infections cliniques. Elles sont dites pathogènes opportunistes car, bien que pouvant être isolées au cours d'infections communautaires, elles sont le plus souvent responsables d'infections nosocomiales. Au sein des BGN-NF, les souches *Pseudomonas aeruginosa*, et *Acinetobacter*

*baumannii* sont les bactéries les plus fréquemment isolées lors d'infections nosocomiales dans les unités de soins intensifs (Berthelot, 2005).

### **1.2.1. Caractères généraux :**

Ce sont des bactéries à Gram négatif aérobies stricts de culture « facile » formant un groupe de bactéries très souvent oxydase positive.

Ces bactéries, cultivées sur milieux ordinaires, possèdent un métabolisme respiratoire strict (utilisation de l'oxygène comme accepteur terminal d'électrons). A noter que certains genres peuvent utiliser les nitrates comme accepteur terminal d'électrons en anaérobiose.

### **1.2.2. *Pseudomonas* :**

Le genre *Pseudomonas* est le genre type de la famille *Pseudomonadaceae*. Dans ce genre, *Pseudomonas aeruginosa* représente 80 % des souches isolées ; les autres espèces sont isolées à plus faible fréquence (Flandrois, 1997).

#### **a) Habitat :**

Ces bactéries occupent des niches écologiques variées, mais se retrouvent plus particulièrement dans les milieux humides tels que les eaux douces, les eaux de mer et les eaux thermales. Elles se retrouvent en plus petite quantité dans les eaux riches en matières organiques (en particulier les eaux stagnantes). Elles sont considérées comme une flore commensale chez l'homme ou l'animal. Certaines jouent un rôle pathogène dont *Pseudomonas syringae* chez les plantes et *Pseudomonas aeruginosa* chez l'homme et l'animal (Avril *et al.*, 2000).

#### **b) Caractères bactériologiques :**

##### **➤ Caractères morphologiques et culturels :**

Bacilles à Gram négatif, en forme de bâtonnets droits et fins de 1 à 3 µm de long ; 0,5 à 1 µm de large, mobiles par une ciliature polaire, non sporulés. Parfois entourés d'une pseudo capsule appelée slime qui peut jouer un rôle important dans la pathogénicité de ces bactéries. La culture est facile sur milieu complexe avec ou sans production de pigment, la température de croissance variée de 4 à 45°C selon les espèces, *P. aeruginosa* peut être cultivée à 41°C mais pas à 4°C. Ces souches sont capables de cultiver sur des milieux minéraux synthétiques avec une source simple de carbone : acétate, pyruvate et des milieux sélectifs à base de Cétrimide

que l'on peut additionner d'antibiotique (acide nalidixique). Les colonies de *P. aeruginosa* sont polymorphes, soit large avec une partie centrale bombée et un contour irrégulier (œufs sur le plat), soit des petites colonies mates légèrement bombées avec un bord circulaire régulier, des colonies muqueuses bombées, opaques, visqueuses parfois coulantes comme pour *Klebsiella*. La bactérie produit alors un polysaccharide extra-cellulaire qui est différent du slime (Avril et al., 2000).

Le genre *Pseudomonas* comprend des espèces fluorescentes produisant des pigments spécifiques. Les deux pigments les plus fréquents et caractéristiques sont la pyocyanine et la pyoverdine qui sont solubles dans les milieux de culture. Les espèces pigmentées sont par exemple : *P. aeruginosa* produit les deux pigments, mais pouvant être perdus par mutation. *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae*, et *P. cichorii* produisent de la pyoverdine, *P. aureofaciens* : produit un pigment jaune orange ou pourpre (Matewish et Lam, 2004). Certaines souches sont apigmentées tel que *P. alcaligenes* et *P. stutzeri* (Martin, 2007).

#### ➤ Caractères biochimiques :

Les principaux caractères distinctifs des *Pseudomonas* sont présentés dans (tableau 02)

**Tableau 02** : Caractères différentiels des *Pseudomonas* (Eyquem et al., 2000).

	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. stutzeri</i>
<b>LDC</b>	-	-	-	-
<b>ODC</b>	-	-	-	-
<b>ADH</b>	+	+	+	-
<b>Culture à 41°C</b>	+	-	-	<b>D</b>
<b>Gélatinase</b>	+	+	-	-
<b>Esculine</b>	-	-	-	-
<b>Citrate de simmens</b>	+	+	+	+
<b>King A</b>	<b>D</b>	-	-	-
<b>king B</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	-
<b>Caractères particuliers</b>	<b>TTR +</b>	<b>TTR d</b>	<b>TTR d</b>	<b>Colonies sèches plissées amylase +</b>

**TTR** : Tétrathionate-réductase, **d** : différent selon les souches.

### 1.2.2.1. *Pseudomonas aeruginosa* :

#### a) Épidémiologie :

La nature nosocomiale de la plupart des infections à *P. aeruginosa* rend nécessaire la connaissance parfaite des mécanismes de transmission. L'utilisation de marqueurs épidémiologiques fiables (sérotypie, lysotypie, pyocinotypie) permet de suivre les épidémies hospitalières et d'envisager la lutte contre les sources de contamination.

- **Le milieu extérieur** : et l'eau sous toutes ses formes ou le malade lui-même par ses exsudats (urines, crachats, selles...)
- **L'environnement hospitalier** : fleurs coupées (eau des vases), plantes en pots, fruits, légumes crus ou en salade (tomates, carottes, radis, laitues), siphons d'éviers ou de sol, humidificateurs, respirateurs, eau distillée
- **Les antiseptiques** : les ammoniums quaternaires par exemple sont souvent inactifs et permettent la multiplication de la bactérie (**Berche et al., 1988 ; Marc et al., 1999 ; Eyquem et al., 2000**).

#### b) Pouvoir pathogène :

Les *Pseudomonas* sont Peu virulents pour l'individu normal, par contre ils sont considérés comme des agents infectieux redoutables lorsque les défenses immunitaires du sujet sont altérées. *P. aeruginosa* est l'exemple type de la bactérie pathogène opportuniste. Les malades particulièrement sensibles sont les nourrissons, les personnes âgées, les sujets atteints d'affections graves, chroniques, métaboliques (diabète) mais surtout hématologiques ou cancéreuses. Chez les brûlés, cette infection est l'une des causes majeures de mortalité (**Avril et al., 2000**).

### 1.2.3. *Acinetobacter* :

On décrit 12 espèces appartenant au genre *Acinetobacter*. Une seule espèce, *Acinetobacter baumannii*, est régulièrement responsable d'infections humaines. Fréquemment résistant à de nombreux antibiotiques, *A. baumannii* est le seul *Acinetobacter* à l'origine de véritables épidémies hospitalières (**Flandrois, 1997 ; Avril et al., 2000**).

**a) Habitat :**

*Acinetobacter ssp* est un germe ubiquitaire retrouvé dans les sols, l'eau potable, les eaux de surface ainsi que dans diverses denrées alimentaires. On estime que jusqu'à 25% de la population est porteur d'*Acinetobacter ssp* (Siegrist, 2000).

Chez l'homme et les animaux, les *Acinetobacter ssp* font partie de la flore cutanée normale. Ces bactéries sont isolées de la bouche, de la gorge, de la trachée, du nez, de la conjonctive. D'une manière globale, l'espèce pathogène ou saprophyte la plus fréquemment isolée est *Acinetobacter baumannii* (Euzéby, 2010).

*Acinetobacter baumannii* est l'agent fréquent de colonisation cutanée et muqueuse chez les patients hospitalisés en unités de soins intensifs. Cette bactérie est aussi responsable d'infections nosocomiales qui concerne essentiellement l'arbre respiratoire, l'appareil urinaire, les plaies, et peuvent évoluer vers une bactériémie. D'autres manifestations cliniques ont été observées : pleurésies, péritonites chez les dialysés, méningite, etc. ces infections se manifestent souvent par bouffées épidémiques et sont dues à des souches multirésistantes (Lambert, 2007).

**b) Caractères bactériologiques :****➤ Caractères morphologiques et culturels :**

Les *Acinetobacter* sont des bacilles courts immobiles, présentant fréquemment des variations morphologiques (coccoïde ou bacillaire). Les *Acinetobacter* cultivent bien sur milieux usuels à une température optimale de 30-32 °C. En 24 heures, les colonies ont un diamètre de 2-3 mm sur gélose ordinaire ; elles sont convexes, à bords réguliers, souvent translucides. *A.baumannii* est la seule espèce capable de croître à 44 ou 45 °C. Certaines souches d'*Acinetobacter* dégagent lors de la culture une odeur désagréable ; quelques rares souches sont hémolytiques sur gélose au sang (Flandrois, 1997 ; Avril *et al.*, 2000).

**➤ Caractères biochimiques :**

Ce sont des aérobies stricts, catalase (+), oxydase (-), prototrophes, (Avril *et al.*, 2000). Ils ne réduisent généralement pas les nitrates en nitrites en milieu complexe. L'oxydation du glucose et d'autres sucres en acide gluconique résulte de la présence d'une glucose déshydrogénase membranaire. Une réponse négative est obtenue pour les tests LDC, ODC, ADH, production d'hydrogène sulfuré, indole, bêta-galactosidase et DNase. Une réponse variable est obtenue pour l'hydrolyse de la gélatine. Quelques souches produisent une uréase ou une phénylalanine désaminase d'activité faible (Gillespie et Hawkey, 2006).



**c) Pouvoir pathogène :**

L'incidence des infections à *A. baumannii* considérablement augmentée durant les 20 dernières années. En particulier dans les unités de soins intensifs et de chirurgie, des services où le risque de colonisation et d'infection est important, vu le terrain particulier des patients et la fréquence des manœuvres invasives (**Giamarellou et al., 2008**).

*Acinetobacter ssp* est responsable d'infections urinaires chez les malades sondés et peut être isolé aussi lors de pleurésies, de pneumonies, et dans les crachats et aspirations de malades de réanimation, de conjonctivites, de sinusites, de suppurations cutanées, d'ulcérations intestinales, bactériémie ou une septicémie vraie, de péricardites et de méningites graves chez des malades âgés, fragilisés par une intervention chirurgicale majeure (**Avril et al., 2000**).

## **CHAPITRE 02 :**

# **La Résistance aux antibiotiques des bacilles à Gram négatif**

## **1. Résistance aux antibiotiques :**

Des espèces bactériennes ou certaines souches d'une même espèce bactérienne peuvent être résistantes à l'action d'un ou de plusieurs antibiotiques. On parle alors, dans ce dernier cas, de résistance croisée ou de résistance multiple. La résistance bactérienne résulte toujours de l'incapacité de l'antibiotique à agir sur sa cible, du fait de la réaction des bactéries vis à vis de l'antibiotique, exprimée par divers mécanismes (**Bousseboua, 2005**).

### **1.1. Définition :**

Une souche bactérienne est dite résistante à un antibiotique lorsqu'elle peut croître en présence d'une concentration plus élevée de cet antibiotique que la concentration qui inhibe la majorité des souches de la même espèce (**Narcisse, 2000**).

### **1.2. Types de résistance :**

Les résistances bactériennes aux antibiotiques peuvent être naturelles ou acquises.

#### **1.2.1. Résistance naturelle :**

leur mécanisme sur le génome bactérien, est constant dans un taxon et est généralement chromosomique. Elles correspondent à la résistance de toutes les souches d'une même espèce bactérienne à un antibiotique. Elles sont dues soit à une absence de cible pour l'antibiotique soit à une imperméabilité de la paroi à cet antibiotique. Par exemple les entérobactéries sont résistantes aux macrolides (**Leclerc, 1981**).

#### **1.2.2. Résistance acquise :**

Le terme de résistance acquise est utilisé pour désigner des processus permettant à des bactéries appartenant à une espèce originellement sensible de devenir résistantes à un ou plusieurs antibiotiques. Les résistances acquises sont dues à des modifications génétiques, consistant en des mutations sur des gènes déjà présents chez la bactérie (résistance par mutation chromosomique), ou en l'acquisition de nouveaux gènes de résistance par transfert horizontal (résistance extra-chromosomique) (**Leclerc et al., 1995**).

**a) Résistances par mutation chromosomique :**

La résistance par mutation est peu répandue en clinique (moins de 20% des résistances acquises). Ce type de résistance est observé, entre autres, chez les mycobactéries. Les résistances mutationnelles sont :

- Spontanées : elles préexistent à l'utilisation de l'antibiotique ;
- Stables : elles se transmettent verticalement dans le clone bactérien ;
- Spécifiques : elles n'intéressent qu'un antibiotique ou qu'une seule famille d'antibiotiques ;
- rares : le taux de mutation se situe habituellement entre  $10^{-7}$  et  $10^{-8}$  (Leclerc *et al.*, 1995).

**b) Résistances extra-chromosomiques :**

Les résistances extra-chromosomiques sont fréquentes (plus de 80% des résistances acquises), et contagieuses. Les supports de ces résistances peuvent être des plasmides qualifiés plasmides R (R : résistance) ou des transposons acquis par conjugaison ou plus rarement par transduction. Ces résistances se transmettent horizontalement entre bactéries cohabitant, même d'espèces différentes (Leclerc *et al.*, 1995 ; Bathily, 2002).

Du fait que les plasmides R codent le plus souvent pour plusieurs résistances aux antibiotiques, appartenant à des familles différentes, leur acquisition confère une résistance multiple qui pose de grands problèmes dans l'utilisation thérapeutique des antibiotiques (Bousseboua, 2005).

**1.3. Les niveaux de résistance**

On parle de résistance de bas niveau lorsque la croissance des bactéries est arrêtée par de faibles doses d'antibiotique et de résistance de haut niveau lorsque cette croissance bactérienne est stoppée par de fortes concentrations d'antibiotique (<http://anne.free.fr/atb/resab.htm>).

**1.4. Mécanismes de Résistance bactérienne :**

Huit mécanismes de résistance sont impliqués chez les bactéries à Gram négatif (Figure 01), certains étant médiés par un plasmide. Ces mécanismes comprennent :

- La perte de porines, qui réduit le mouvement de l'antibiotique (ATB) à travers la membrane cellulaire ;
- La présence de  $\beta$ -lactamases dans l'espace périplasmique, ce qui dégrade les  $\beta$ -lactamines ;

- Une surexpression de la pompe d'efflux transmembranaire, ce qui expulse l'ATB à partir de la bactérie avant qu'il puisse avoir un effet ;
- La présence des enzymes de modification des antibiotiques, ce qui rend l'ATB incapable d'interagir avec sa cible ;
- Des mutations de la cible, qui empêchent l'ATB de se lier à son site d'action
- Des mutations ou des modifications ribosomales qui empêchent l'ATB de se lier et d'inhiber la synthèse des protéines ;
- Des mécanismes de contournement métabolique, qui utilisent une enzyme alternative résistante pour contourner l'effet inhibiteur de l'antibiotique ;
- Une mutation dans le lipopolysaccharide (LPS), qui rend la classe des polymyxines incapable de se lier à cette cible (Peleg et Hooper, 2010).

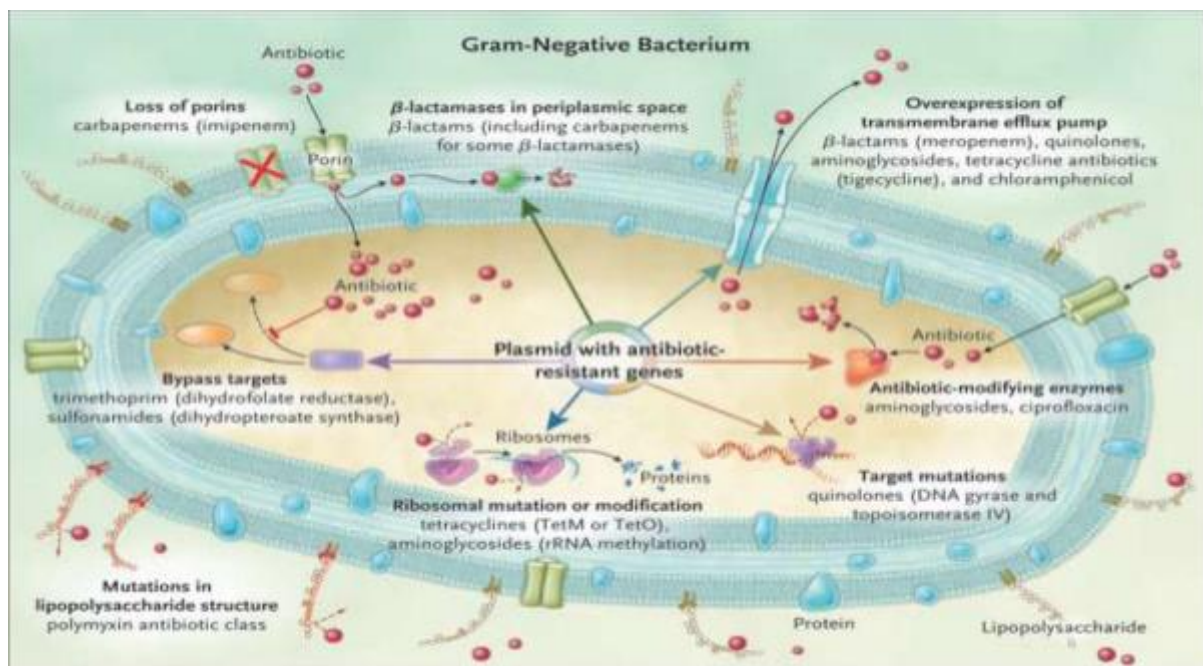


Figure 01 : Mécanismes de résistance des bactéries Gram-négatives, et les antibiotiques touchés (Peleg et Hooper, 2010).

### 1.5. Phénotype de résistance :

C'est l'expression de la résistance d'une souche, vis-à-vis de plusieurs antibiotiques de même famille ou de familles différentes. Le choix judicieux des antibiotiques testés permet parfois de reconnaître le mécanisme de résistance et/ ou le génotype correspondant au phénotype observé. L'étude du phénotype de résistance est proposée pour identifier certaines souches bactériennes responsables d'infections nosocomiales (Bathily, 2002).

## 2. Résistance des entérobactéries aux antibiotiques :

### 2.1. Entérobactéries et $\beta$ -lactamines :

#### 2.1.1 Résistance naturelle ou phénotypes « sauvages » :

Toutes les entérobactéries sont naturellement résistantes aux pénicillines G et M. Elles peuvent être divisées en 6 groupes en fonction de leur comportement vis à vis des  $\beta$ -lactamines (Zogheibe et Dupont, 2005).

#### Groupe 0 : Phénotype « sensible » d'espèces dépourvues de gènes de $\beta$ -lactamases

*Salmonella* spp et *Proteus mirabilis* sont dépourvus de  $\beta$ -lactamase à l'état « sauvage » et sont naturellement sensibles aux amino-pénicillines, carboxypénicillines, uréido-pénicillines, à l'aztréonam, aux céphalosporines et aux carbapénèmes (Bonnet, 2006).

#### Groupe 1 : Phénotype « sensible » d'espèces produisant naturellement une céphalosporinase de classe C

Une  $\beta$ -lactamase de classe C constitutive à bas niveau est présente chez les souches sauvages d'*Escherichia coli* et *Shigella* spp. et ne confère de résistance qu'aux  $\beta$ -lactamines qui pénètrent faiblement dans l'espace périplasmique (benzylpénicilline, cefsulodine) (Gautier, 2007).

#### Groupe 2 : Phénotype « pénicillinase de bas niveau »

Ce phénotype, observé chez *Klebsiella* (*K.pneumoniae*, *K.oxytoca*), *Citrobacter koseri* (*C.diversus*), *Citrobacter amalonaticus* et *Escherichia hermannii*, se caractérise par la résistance à bas niveau de ces espèces à l'amoxicilline et à la ticarcilline, par la sensibilité à la céfalotine, au céfotaxime et aux autres  $\beta$ -lactamines (Vedel, 1998).

#### Groupe 3 : Phénotype « céphalosporinase de bas niveau »

Des espèces comme *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Hafnia alvei*, *Yersinia enterocolitica*, *Providencia stuartii* et *Providencia rettgeri* possèdent une céphalosporinase inductible, leur conférant une résistance aux amino-pénicillines, aux céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération et à l'action de l'acide clavulanique. Ce caractère inductible est détecté dans l'antibiogramme en milieu gélosé par un antagonisme ("écrasement" du diamètre d'inhibition) entre une  $\beta$ -lactamine inductrice (imipénème, céfoxitine) et une céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération. Ce

type d'expression est le fait d'un mécanisme complexe faisant intervenir plusieurs gènes régulateurs (*ampR*, *ampD*, et *ampG*) (Philippon et Arlet, 2006).

**Groupe 4 : *Yersinia enterocolitica* et *Serratia fonticola***

Elles sont résistantes aux amino-pénicillines, uréido-pénicillines, carboxypénicillines et aux céphalosporines de 1<sup>ere</sup> génération par l'action associée d'une pénicillinase et d'une céphalosporinase naturelle produite à bas niveau (Zomahoun, 2004).

**Groupe 5 : Phénotype « céfuroximase »**

*Proteus vulgaris* et *Proteus penneri* possèdent une  $\beta$ -lactamase particulière par fois dénommée "céfuroximase" qui rend ces espèces résistantes aux pénicillines du groupe A et aux céphalosporines de 1<sup>ere</sup> et 2<sup>eme</sup> générations (à l'exception des céphamycines comme la céfoxitine) mais dont l'activité enzymatique est inhibée par l'action d'acide clavulanique (Denis et Ploy, 2007).

**Groupe 6 : Phénotype «  $\beta$ -lactamase à spectre étendu chromosomique »**

Les entérobactéries d'isolement très rare telle que *Kluyvera* montrant un phénotype de résistance inhabituel "pénicillinase de bas niveau". Ce phénotype est nettement à distinguer de celui "pénicillinase de bas niveau" (Philippon, 2005). Il s'agit d'une BLSE naturelle exprimée à bas niveau (Denis et Ploy, 2007). Après clonage du gène *cor* (KLUA-1) dans une souche réceptrice d'*E.coli*, a été identifié, par la suite, un des progénitures de BLSE plasmidiques de type CTX-M (Philippon, 2005).

**2.1.2 Résistance acquise :**

Nous avons identifié 6 phénotypes qui sont :

- phénotype sensibles (P.S.).

Les souches de ce phénotype sont sensibles aux bêta-lactamines. Il s'agit des entérobactéries du groupe 1.

- phénotype pénicillinase de bas niveau (P.B.N.).

Les souches sont résistantes à l'amoxicilline et sensibles à l'association amoxicilline + acide clavulanique, à la céfalotine et à la ceftriaxone.

- phénotype pénicillinase haut niveau (P.H.N.).

Les souches sont résistantes à l'amoxicilline, à l'association amoxicilline + acide clavulanique, à la céfalotine mais sont sensibles à la ceftriaxone.

- phénotype pénicillinase résistante aux inhibiteurs des bêta-lactamases (T.R.I.).

Les souches sont résistantes à l'amoxicilline, l'association amoxicilline + acide clavulanique mais sont sensibles à la céfalotine et à la ceftriaxone.

- Phénotype céphalosporinase inductible (C.Ind.).

Les souches de ce phénotype sont résistantes à l'amoxicilline, à l'association amoxicilline + acide clavulanique, à la céfalotine mais sont sensibles à la ceftriaxone et à la ticarcilline.

- phénotype céphalosporinase déprimée (C.D.).

Les souches sont résistantes à l'amoxicilline, à l'association amoxicilline + acide clavulanique, à la ticarcilline, à la céfalotine et à la ceftriaxone mais elles sont sensibles au mécilinam.

- phénotype bêta-lactamase à spectre élargi (B.L.S.E.)

Les souches de ce phénotype sont résistantes à l'amoxicilline, à l'association amoxicilline + acide clavulanique, à la céfalotine et à la ceftriaxone (**Ketta, 1998**).



## **CHAPITRE 03 :**

### **Les bêta- lactamase des bacilles à Gram négatif**

## 1. Les bêta- lactamase des bacilles à Gram négatifs

### 1.1. Définition

La résistance bactérienne aux  $\beta$ -lactamines est due principalement à la production d'enzymes ( $\beta$ -lactamases) capables d'hydrolyser l'anneau  $\beta$ -lactame commun à cette classe d'antibiotiques (**Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006**).

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation (**Philippon, 2005**), appartenant à la grande famille des hydrolases d'amides cycliques (**De Wals, 2007**).

Sur la base du mécanisme catalytique, on distingue : les enzymes à sérine active réparties en classes A, C et D ont en commun un résidu sérine dans le site actif ; Les métallo-enzymes : les enzymes de classes B ont besoins d'un ion métallique  $Zn^{2+}$  catalysant leurs activités (**Materon et al., 2004**).

### 1.2. Source et localisation :

La localisation de ces enzymes est exocellulaire chez les espèces à Gram-positif (*S. aureus*, *Bacillus*) ou périplasmique (liée à la paroi) chez celles à Gram-négatif.

La source des Bêta-lactamases est différente suivant la nature des bactéries productrices. Les Bêta-lactamases de classe A des bactéries à Gram positif (*S. aureus*, *B. cereus* et *lichenformis*) sont retrouvées à l'extérieur de la cellule, une partie étant liée à la membrane cytoplasmique par l'intermédiaire d'une liaison glycéride thioéther analogue à celle de la lipoprotéine de la membrane externe, cette liaison est inhibée par la globomycine qui favorise donc la libération de ces enzymes dans le milieu extérieur. Alors que, les Bêta-lactamases des bactéries à Gram négatif sont intracellulaires, plus exactement périplasmique et produites en moyenne, en quantité cent fois moins importante que chez les bactéries à Gram positif (**Philippon et al., 1986**)

En ce qui concerne le support génétique des Bêta-lactamases, celui-ci peut être :

- **Chromosomique** : elles sont alors soit constitutives, c'est-à-dire que le génome bactérien possède naturellement le gène d'expression de l'enzyme, soit inductibles ; l'expression du gène dépend alors de la présence ou non d'un inducteur dans le milieu (imipénème, céfoxitine, acide clavulanique...).
- **Plasmidique** : ce support de résistance a la possibilité d'être transmis à d'autres bactéries de façon stable.

- **Intégrons** : lié à l'intégration d'un transposon dans le génome bactérien qui est capable de promouvoir sa translocation d'un réplicon sur un autre ou en un autre site (**Barrial et al., 2006**).

### 1.3. La classification :

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'une extrême diversité (**Gautier, 2007**). Actuellement, plus de 400  $\beta$ -lactamases, dont plus de 200 BLSE, sont décrites et aucune  $\beta$ -lactamine, seule ou en association avec des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases, n'est invulnérable à leur action potentielle (**Li et al., 2007 ; Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006**). De nombreuses classifications existent, qui prennent comme critères : le phénotype, la nature du site actif, la séquence d'acide aminé, les caractéristiques physiques et l'origine (**Vidon et Bourdin, 2005**).

Les deux schémas les plus utilisés pour la classification des  $\beta$ -Lactamases sont celui d'Ambler qui est fondé sur l'homologie de séquence des acides aminés et celui de Bush-Jacoby-Medeiros fondé sur les propriétés fonctionnelles des enzymes (**Nordmann et Poirel, 2002**).

- La classification d'Ambler divise les  $\beta$ -lactamases en quatre groupes (de A à D). Cette classification moléculaire, impliquant la connaissance de la structure primaire des enzymes, a été suggérée par Ambler en 1980 (**Bryskier, 1999**).
- En 1995, Bush-Jacoby-Medeiros a présenté le dernier système de classification qui repose sur quatre groupes (1-4) et sous-groupes (A à F) (**Shah et al., 2004**).

Elle est fondée sur les caractéristiques physicochimiques des enzymes comme leur point isoélectrique, poids moléculaire, substrat d'activité et profil d'inhibition (**Nordmann et Poirel, 2002**).

#### 1.3.1. Classe A :

Les  $\beta$ -lactamases de la classe A est la plus diversifiée, on y retrouve les pénicillines des bactéries à Gram positif, les  $\beta$ -lactamases plasmidiques à large spectre qui hydrolysent les céphalosporines avec autant d'efficacité que les pénicillines, les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi qui hydrolysent les C3G et les monobactames. La majorité de ces enzymes est sensible aux inhibiteurs (acide clavulanique, sulbactame et tazobactame) utilisés en médecine. Les

principaux représentants de ce groupe sont les  $\beta$ -lactamases du type TEM, SHV et récemment le type CTX-M (Doi *et al.*, 2004).

### **1.3.2. Classe B :**

Les  $\beta$ -lactamases de la classe B hydrolysent les carbapénèmes, composés qui échappent à l'activité des  $\beta$ -lactamases à sérine active. La plupart des métallo- $\beta$ -lactamases hydrolysent une variété de pénicillines et de céphalosporines, et sont insensibles aux inhibiteurs classiques (acide clavulanique, sulbactame, tazobactame). A partir de la séquence des enzymes, cette classe est subdivisée en trois sous classes, B1, B2, et B3 (Galleni *et al.*, 2001).

### **1.3.3. Classe C :**

Les  $\beta$ -lactamases de la classe C on retrouve les céphalosporinases qui sont des enzymes résistantes à l'action de l'acide clavulanique et le sulbactame ; toutefois certaines sont faiblement inhibées par le tazobactame (Doi *et al.*, 2004). Leur hyperproduction est associée au phénotype de multirésistance observé chez certains BGN. Au départ à médiation chromosomique, les  $\beta$ -lactamases de la classe C sont aussi aujourd'hui à médiation plasmidique (Philippon *et al.*, 2002).

### **1.3.4. Classe D :**

La classe D regroupe les  $\beta$ -lactamases qui hydrolysent les isoxazolylpénicillines comme la cloxacilline et l'oxacilline. Ces dernières sont réfractaires à l'hydrolyse par les autres classes de  $\beta$ -lactamases et possèdent une certaine activité inhibitrice. On les appelle des oxacillinases et sont représentées par les  $\beta$ -lactamases du type OXA. Ces enzymes sont plus ou moins résistantes à l'action de l'acide clavulanique, mais sont bien inhibées par le tazobactame (Livermore, 1995).

## **1.4. Bêta-lactamase à spectre élargie (BLSE) :**

Les BLSE ont été décrites pour la première fois en 1983, en Allemagne (Knothe *et al.*, 1983), il n'y a pas de consensus concernant la définition de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE). Classiquement, les BLSE sont définies comme des enzymes appartenant à la classe A (à l'exception des BLSE de type OXA classe D) de la classification d'Ambler, capables d'hydrolyser les pénicillines, céphalosporines de première, deuxième, troisième et quatrième génération (céfépime ou ceftiofime) et l'aztréonam. Elles sont inhibées *in vitro* par les

inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases (acide clavulanique, tazobactam et sulbactam) (Livermore. 1995). Par contre, les BLSE sont sensibles aux céphamycines (céfotétan et cefoxitine) ainsi qu'aux carbapénèmes. Une co-résistance avec les aminosides, les tétracyclines et les fluoroquinolones est fréquente. Les bactéries possédant des BLSE sont dites multirésistantes (Paterson et Bonomo. 2005).

#### 1.4.1. Diversité des types de BLSE :

##### 1.4.1.1. Bêta - lactamase de type TEM :

De nombreux dérivés de TEM-1/2 (> 150) ont été décrits à ce jour, dont plus de 100 avec un phénotype de BLSE. Bien que fréquemment retrouvées chez *E. coli* et *K. pneumoniae*, les BLSE de type TEM ont aussi été rapportées parmi les autres membres de la famille des entérobactéries ainsi que *P. aeruginosa* (Bradford, 2001 ; Cattoir, 2008).

En Europe, les BLSE de type TEM les plus fréquentes sont TEM-24 chez *Enterobacter aerogenes*, TEM-3 et TEM-4 chez *K. pneumoniae*, et TEM-52 chez *Salmonella enterica* et *E. coli*. Les mutations responsables de l'élargissement de spectre ont généralement lieu au niveau de 4 positions de la protéine (positions 104, 164, 238 et 240) (Cattoir, 2008).

##### 1.4.1.2. Bêta - lactamase de type SHV :

La  $\beta$ -lactamase SHV-1 (SulfiHydroxyl Variable) qui est l'enzyme à partir de laquelle les BLSE de type SHV dérivent par substitution d'un ou de plusieurs acides aminés est très fréquentes chez *K. pneumoniae*. Cette enzyme hydrolyse les pénicillines, les céphalosporines mais pas les oxyimino-céphalosporines et l'aztréonam (Hammond *et al.*, 2005).

La majorité de ces enzymes ont été décrites chez les souches de *K. pneumoniae*. Toutefois ces enzymes ont été trouvées chez *Citrobacter freundii*, *C. diversus*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae* et *P. aeruginosa* (Bradford, 2001 ; Gangoué Piéboji, 2000 ; Gangoué-Piéboji *et al.*, 2005).

##### 1.4.1.3. Bêta - lactamase de type OXA :

La famille des BLSE de type OXA (OXA-18 et les dérivés d'OXA-2 et d'OXA-10) sont comparativement rare, et ont été trouvés la plupart du temps chez *P. aeruginosa*, avec la majorité qui résistent aux oxyimino céphalosporines tels que la ceftazidime. OXA-31 de *P. aeruginosa*, confère une résistance au cefepime mais pas au ceftazidime. Les BLSE de type

OXA portent typiquement des mutations multiples, les dérivés d'OXA-10 portent souvent des substitutions au niveau de Gly167, qui sont responsables de la résistance au ceftazidime. Ces BLSE peuvent être plasmidiques ou chromosomiques. OXA-23 une enzyme chromosomique caractérisée chez *P. mirabilis*, OXA-40 chez *A. baumannii* et OXA-48 une enzyme plasmidique caractérisée chez *K. pneumoniae* présentent une activité carbapénémase (Poole, 2004).

#### 1.4.1.4. Bêta - lactamase de type CTX-M :

Ces enzymes «émergentes» sont les plus fréquentes au sein des entérobactéries au niveau mondial après une diffusion rapide depuis le milieu des années 90. Au niveau de leur spectre d'activité, elles hydrolysent préférentiellement le céfotaxime, d'où leur nom de céfotaximases (Cattoir, 2008).

Certaines d'entre elles ont évolué plus récemment par mutation (ponctuelle ou non) générant un haut niveau de résistance à la ceftazidime telles les enzymes CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-19, CTX-M-23 ou encore très récemment CTX-M-32 dérivant par simple mutation (Asp240Gly) de CTX-M-1 (Philippon et Arlet, 2006).

Au niveau structural, les CTX-M ne sont pas proches des  $\beta$ -lactamases de type TEM ou SHV (< 40 % d'identité). A ce jour, de nombreux variants de CTX-M ont été décrits (>50), et sont classés en groupes phylogénétiques distincts : CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 et CTX-M-45. Les enzymes Toho-1/2, décrites au Japon, sont très proches structurellement des CTX-M et sont donc classées parmi celles-ci (Cattoir, 2008).

CTX-M-3 et CTX-M-15 ont été rapportées pour la première fois en Algérie par Touati et al., en 2006 chez les souches *E. coli*, *Enterobacter cloacae* et *K. pneumoniae* isolées dans les hôpitaux de Béjaïa (Touati et al., 2006).

Ces enzymes ont évolué à partir des  $\beta$ -lactamases chromosomiques de *Kluyvera spp.* Les enzymes naturelles de *Kluyvera ascorbata*, désignées KLUA sont regroupées dans le même cluster que le groupe CTX-M-2. L'enzyme KLUA-2 de la souche de *K. ascorbata* IP15.79 est identique à la CTX-M-5 caractérisée chez une souche de *Salmonella typhimurium*. La  $\beta$ -lactamase naturelle KLUA-1 de la souche *Kluyvera georgiana* CUETM4246-74 a été regroupée dans le même cluster que les enzymes du groupe CTX-M-8 et la seule différence entre ces deux

enzymes est une substitution dans la forme mature de l'enzyme et deux substitutions dans le peptide signal (**Bonnet, 2004**).

Les progénitures des enzymes des groupes CTX-M-1, CTX-M-9 et CTX-M-25 restent inconnus à ce jour. La mobilisation des gènes *blaCTX-M* est due à plusieurs éléments. Des séquences d'insertion comme *ISEcp1* et *ISEcp1-like* ont été trouvées en amont de plusieurs gènes codant pour les CTX-M. D'autres séquences d'insertions ont été décrites, dont certaines en aval de gène *blaCTX-M* (*IS903-like* en aval de CTX-M-14 et CTX-M-17) (**Ruppé, 2010**).

# **MATERIEL ET METHODES**



## **1. Cadre de l'étude**

Notre travail s'est étalé sur une période de 50 jours, allant de février à la fin de mars 2018, 42 souches bactériennes ont été récoltées à partir des prélèvements pathologiques de différents laboratoires des analyses médicales.

- **Khaldi Abdelaziz (Tébessa) :**

EPH d'une capacité de 120 lits, qui a bénéficié d'un aménagement achevé en 2008, il est réservé exclusivement aux maladies maternelles et infantiles et à la pédiatrie.

- **Hôpital Bouguerra Boulares (Bekkaria) :**

spécialisé en phtisiologie et abritant, depuis 2004, presque tous les services, soit la pédiatrie, la médecine interne, la psychiatrie, etc., se dote d'un service de rééducation.

- **Laboratoire des analyses médicales pharmacie zirgui nacer eddine (Bir El Ater).**

- **Laboratoire des analyses médicales Dr.allola (Tébessa).**

## **2. objectif de l'étude**

Le but principal à travail est basé sur 3 aspects :

- ✓ L'identification des souches isolées à partir d'échantillons provenant des prélèvements pathologiques
- ✓ L'étude de la sensibilité des souches isolées vis-à-vis de certains antibiotiques utilisés en thérapeutique
- ✓ La recherche des types de résistantes par production de BLSE.

## **3. Matériel**

### **3.1. Matériel biologique :**

#### **3.1.1 Souches étudiées :**

Le présent travail a pour but d'étudier 32 souches bacille à Gram négatifs isolées à partir de différents prélèvements pathologiques.

### **3.2. Milieux de culture :**

#### **3.2.1. Milieux de culture liquides :**

- BN : Bouillon Nutritif ;

#### **3.2.2. Milieux de culture solides :**

- Gélose nutritive ;
- Mac Conkey ;

- Mueller Hinton ;

### **3.3. Tests biochimiques :**

- Galerie API 20 E ;

### **3.4. Antibiotiques :**

#### **- En disque :**

- **β-lactamines:**

Amoxicilline/acide clavulanique AMC (20/10 µg), Ticarcilline TI (75 µg), Imipénème IMP (10 µg), Aztréonam AT (30 µg), Céfalexine CN (30 µg), Céfoxitine CX (30 µg), Céfotaxime CTX (30 µg), Ticarcilline /acide clavulanique TTC (75/10 µg), ceftazidime CAZ (30 µg) céfépime FEP (30 µg), pipéracilline PRL (30 µg).

- **Aminosides :**

Tobramycine TOB (10µg), Amikacine AK (30µg) et Gentamicine GN (15 µg).

- **Quinolones :**

Acide nalidixique NA (30 µg), Ofloxacin OFX (5 µg).

- **Polypeptide:**

Colistine CT (30 µg).

- **Autres :**

Fosfomycine FO (50 µg), nitrofuranes F (300 µg) Ciprofloxacine CIP (5 µg).

## **2. Méthodes :**

### **2.1. Techniques de Prélèvement :**

#### **2.1.1. Prélèvement d'urine :**

Après lavage hygiénique des mains et toilette soigneuse des organes génitaux externes, de préférence les urines du matin. Après élimination du premier jet, les urines sont recueillies dans un tube stérile (environ 10 à 20 ml), le tube est fermé hermétiquement et porté au laboratoire dans une demi-heure, sinon il faut le placer dans de la glace (**Djennane et al., 2009**).

Chez les nouveaux nés et les petits enfants, un collecteur stérile spécifique est utilisé. Ce dispositif à usage unique se pose après désinfection soigneuse du périnée. A la fin de la miction, le collecteur est ôté et fermé hermétiquement et porté au laboratoire dans une demi-heure, sinon il faut le placer dans de la glace (**Djennane et al., 2009**).

Chez le patient porteur d'une sonde urinaire, il ne faut en aucun cas prélever dans le sac collecteur, le recueil est effectué par ponction à l'aide d'une seringue dans la paroi de la sonde après désinfection. On distingue le sondage avec des systèmes ouverts qui sont de moins en moins utilisés et le sondage avec un système fermé est plus représentatif, car il s'oppose à la colonisation par les bactéries grâce aux valves anti retour (**Djennane et al., 2009**).

#### **2.2. Isolement :**

Après incubation, l'isolement a été fait à partir des tubes de bouillon nutritif présentant un trouble. Deux types de milieux de culture ont été utilisés : la gélose nutritive (GN) et la gélose Mac Conkey (MC).

L'ensemencement sur gélose a été fait comme suit :

- La première partie de la boîte a étéensemencée à l'aide de l'extrémité cotonnée de l'écouvillon imbibé dans le bouillon nutritif, en frottant à la surface de la gélose.
- La deuxième partie a étéensemencée par l'anse de platine ou une pipette Pasteur, à partir du premier ensemencement, en faisant des stries éloignées.

Les boîtes ont été ensuite incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures jusqu'à l'apparition des colonies.

#### **2.3. Purification :**

Cette étape est basée sur les caractères cultureux et la coloration de Gram. A partir des colonies isolées sur les différents milieux (GN et MC), procéder directement à la coloration de Gram. Ensuite, sélectionner les colonies présentant des bacilles à Gram négatif. La purification se fait en pour suivant le repiquage sur le même type de milieu jusqu'à l'obtention d'un isolat pure présentant les mêmes caractéristiques que celui obtenu en premier isolement. La dernière

culture pure doit être faite sur gélose nutritive pour faire l'objet d'autres tests (tests préliminaires, identification biochimique, antibiogramme, etc).

## **2.4. Identification :**

L'identification est l'étape qui précède toujours l'antibiogramme et elle est prise à partir des cultures pures représentées par des colonies que l'on peut différencier par leur aspect, forme, taille, bord, surface, chromogènes et Pour certaines souches l'identification est obtenue par une galerie API 20E.

### **2.4.1. Identification biochimique par la galerie API 20E :**

#### **a) Principe et description de la galerie :**

L'API 20 E est un système standardisé pour l'identification des entérobactéries et autres BGN non fastidieux, comportant 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

La galerie est commercialisée dans des boites stériles, elle comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée, chaque microtube est partagé en deux parties : le tubule (en bas) et la cupule (en haut).

Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification (BioMérieux).

#### **b) Technique :**

##### **➤ Préparation de la galerie :**

- On réunit fond et couvercle d'une boîte d'incubation et on répartit environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide et on place la galerie dans la boîte d'incubation.

##### **➤ Préparation de l'inoculum :**

- On prélève quelques colonies et on prépare une suspension bactérienne dans l'eau distillée stérile.

➤ **Ensemencement de la galerie API 20E :**

- On remplit les tubes et cupules des tests CIT, VIP et GEL avec la suspension bactérienne et on remplit uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests.
- On réalise une anaérobiose dans les tests ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE en remplissant leur cupule d'huile de vaseline.
- On referme la boîte d'incubation qu'on incube à 37°C pendant 24H.

➤ **Lecture de la galerie :**

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture (Tableau 08 en annexe).
- Si trois tests ou plus (test GLU + ou -) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :
  - **Test TDA :** ajouter une goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
  - **Test IND :** ajouter une goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
  - **Test VP :** ajouter une goutte de réactif VP1 et VP2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.

**Note :** le test de la recherche de production d'indole doit être réalisé en dernier, car cette réaction libère des gaz qui risquent d'altérer l'interprétation d'autres tests de la galerie. Ne pas remettre le couvercle d'incubation après l'ajout du réactif. Si le nombre de tests positifs avant ajout des réactifs (y compris le test GLU) est inférieur à trois :

- Réincuber la galerie 24 heures (plus ou moins 2 heures) de plus sans rajouter les réactifs.
- Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs (BioMérieux).

➤ **Interprétation :**

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

## **2.5. Conservation des souches :**

La conservation de courte durée des isolats purifiés a été réalisée par ensemencement sur gélose nutritive inclinée par l'anse de platine. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, les tubes ont été conservés au réfrigérateur à 4°C.

## 2.6. Étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques :

La sensibilité de toutes les souches vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines et d'autres familles d'antibiotiques est testée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du **CA-SFM (2018)**. Les listes des antibiotiques testés sur les entérobactéries sont respectivement présentées dans les (tableaux 03 et 04).

### a) Principe :

La méthode des disques consiste à déposer à la surface de la gélose Mueller-Hinton préalablementensemencée avec une suspension bactérienne, des disques pré imprégnés d'une dose connue des différents antibiotiques. Chaque antibiotique diffuse au sein de la gélose à partir du disque et y détermine des concentrations inversement proportionnelles à la distance du disque.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, chaque disque est entouré d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne. La multiplication des bactéries s'arrête là où existe dans la gélose, une concentration d'antibiotique égale à la concentration minimale inhibitrice (CMI). Les caractères de sensibilité ou de résistance de la souche en seront déduits (**Delarras, 1998**).

**Tableau 03 :** Liste des antibiotiques testés sur les entérobactéries.

Famille		Antibiotique	Sigle	Charge Du disque	Diamètres critiques	
					R (d)	I S (D)
$\beta$ -Lactamines	Carboxypénicilline	Ticarcilline	TI	75 $\mu$ g	<20	$\geq$ 23
	Carbapénème	Imipénème	IPM	10 $\mu$ g	<16	$\geq$ 22
	Clavams	Amoxiciline+Acide clavulanique	AMC	20+10 $\mu$ g	19	
	Monobactame	Aztréonam	AT	30 $\mu$ g	<21	$\geq$ 26
	C1G	Céfalexine	CN	30 $\mu$ g	14	
	C2G	Céfoxitine	CX	30 $\mu$ g	<15	$\geq$ 19
	C3G	Céfotaxime	CTX	30 $\mu$ g	<17	$\geq$ 20
Aminosides		Amikacine	AK	30 $\mu$ g	<13	$\geq$ 16
		Gentamicine	GN	15 $\mu$ g/10UI	<14	$\geq$ 17
		Tobramycine	TOB	10 $\mu$ g	<14	$\geq$ 17
Quinolones	Quinolones 1 <sup>ère</sup> G	Acide nalidixique	NA	30 $\mu$ g	<14	$\geq$ 19
	Quinolones 2 <sup>ème</sup> G	Ofloxacin	OFX	5 $\mu$ g	<22	$\geq$ 24
Fosfomycines		Fosfomycine	FO	50 $\mu$ g	19	
Furanes		Nitrofuranes	F	300 $\mu$ g	11	

C1G : céphalosporines première génération. C2G : céphalosporines deuxième génération.

C3G : céphalosporines troisième génération.

**Tableau 04 :** Liste des antibiotiques testés sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Famille		Antibiotique	Sigle	Charge	Diamètres critiques		
					R (d)	I	S (D)
<b>β-Lactamines</b>	<b>Carboxypénicilline</b>	<b>Ticarcilline + acide clavulanique</b>	<b>TTC</b>	<b>75/10 µg</b>	<b>18</b>		
		<b>Ticarcilline</b>	<b>TI</b>	<b>75 µg</b>	<b>18</b>		
	<b>Carbapénème</b>	<b>Imipénème</b>	<b>IPM</b>	<b>10 µg</b>	<b>&lt;17</b>		<b>≥20</b>
	<b>C3G</b>	<b>Ceftazidime</b>	<b>CAZ</b>	<b>30 µg</b>	<b>16</b>		
		<b>Céfépime</b>	<b>FEP</b>	<b>30 µg</b>	<b>19</b>		
	<b>Monobactames</b>	<b>Aztréonam</b>	<b>AT</b>	<b>30 µg</b>	<b>&lt;22</b>		<b>≥25</b>
<b>Pénames</b>	<b>Pipéracilline</b>	<b>PRL</b>	<b>30 µg</b>	<b>18</b>			
<b>Polypeptide</b>		<b>Colistine</b>	<b>CT</b>	<b>50 µg</b>	<b>&lt;10</b>		<b>≥ 11</b>
<b>Aminosides</b>		<b>Amikacine</b>	<b>AK</b>	<b>30 µg</b>	<b>&lt;15</b>		<b>≥18</b>
		<b>Gentamicine</b>	<b>GEN</b>	<b>15µg/ 10UI</b>	<b>16</b>		
		<b>Tobramycine</b>	<b>TOB</b>	<b>10 µg</b>	<b>16</b>		
<b>Fluoroquinolones</b>		<b>Ciprofloxacine</b>	<b>CIP</b>	<b>5 µg</b>	<b>22</b>		
<b>Fosfomycines</b>		<b>Fosfomycine</b>	<b>FO</b>	<b>50 µg (10 UI)</b>	<b>14</b>		

**b) Technique :**

➤ **Préparation de l'inoculum**

A partir d'une culture pure de 18H à 24H sur milieu d'isolement, on prélève à l'aide d'une anse quelques colonies bien isolées qu'on dissocie dans 5 ml d'eau physiologique, bien homogénéiser la suspension bactérienne.

➤ **Ensemencement :**

L'ensemencement est fait par la méthode d'écouvillonnage ; on trempe l'écouvillon dans la suspension bactérienne, on frotte l'écouvillon sur la totalité de la surface, de haut en bas, en stries serrées. On répète l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. On dépose les disques d'antibiotiques à tester. On incube les boites pendant 24H à 35°.

**c) Lecture et interprétation :**

Pour chaque antibiotique : mesurer le diamètre de la zone d'inhibition au revers de la gélose. L'interprétation des souches (sensibles, intermédiaires ou résistantes) se fait selon les diamètres critiques recommandés par **CA-SFM (2018)**.

Chaque disque a une concentration minimale inhibitrice, caractérisée par un diamètre d'inhibition, la comparaison des diamètres mesurés autour des disques déposés et ceux recommandés permettra de détecter le phénotype sensible, intermédiaire, et résistant :

- Si le diamètre de la zone d'inhibition est  $\geq D$  : la souche est dite sensible (S).
- Si le diamètre de la zone d'inhibition est  $< d$  : la souche est dite résistante (R).
- Si  $d \leq$  diamètre de la zone d'inhibition  $< D$  : la souche est dite intermédiaire (I) (CA-SFM, 2018).

## **2.7 Test de synergie :**

### **a) Principe :**

Les BLSE dérivées des enzymes de classe A (Amler) sont inhibées par les inhibiteurs de  $\beta$ - lactamases (acide clavulanique, sulbactam et tazobactam). Le test consiste donc à rechercher une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de bêta-lactamase : amoxicilline + acide clavulanique (AMC) et un disque de C3G ou un monobactam (aztréonam) (Rahal, 2005).

### **b) Technique :**

La recherche de BLSE se fait dans les conditions standard de l'antibiogramme en déposant un disque d'amoxicilline + acide clavulanique (AMC 20/10  $\mu$ g) à 30mm (centre à centre) d'un disque de C3G : céfotaxime (CTX 30  $\mu$ g), ceftazidime (CAZ 30  $\mu$ g), et aztréonam (ATM 30  $\mu$ g). Incuber 18 heures à 37°C (Rahal, 2005).

### **c) Lecture et interprétation**

La production des BLSE peut se traduire par l'apparition d'une image de synergie dite en « Bouchon de champagne » entre le disque AMC et CTX/ CAZ/ ATM. En l'absence d'une image de synergie, la production de BLSE sera suspectée devant toute diminution du diamètre autour des disques C3G ou de monobactam. On recherchera donc une BLSE devant un diamètre inférieur aux valeurs suivantes : CTX = 27 mm, CAZ = 22 mm et ATM = 27 mm. Dans ce cas, il faut pratiquer un test de confirmation de production de BLSE (Rahal, 2005).



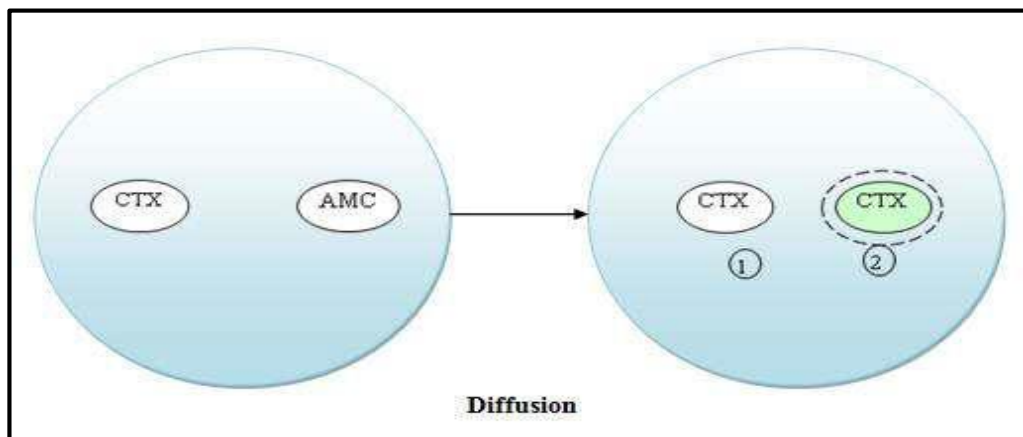
## 2.8 Test du double disque :

### a) Principe :

Le test du double disque ou le test espagnol consiste à rechercher une augmentation de la zone d'inhibition d'un disque de C3G, précédé par l'application d'un disque contenant l'AMC, comparé à un autre disque portant la même céphalosporine et placé côte à côte sur la gélose Muller-Hinton (**Matthew et Muller, 2004**).

### b) Technique :

- Procéder de la même manière que le test de synergie dans la préparation de l'inoculum et l'ensemencement.
- Déposer un disque d'AMC et un disque de C3G (CTX 30 $\mu$ g dans notre travail) à une distance de 25mm (centre à centre).
- Laisser diffuser les antibiotiques à la température ambiante du laboratoire pendant une heure de temps.
- Après une heure d'incubation sur la paillasse, ôter le disque d'AMC et le remplacer par un disque de C3G.
- Incuber pendant 18 heures à 37°C (**Rahal, 2005**).



**Figure 02 : Schéma explicatif du test du double disque.**

### c) Lecture :

Le test du double disque est positif quand le diamètre d'inhibition du disque de C3G appliqué après pré diffusion du disque de l'AMC est supérieur ou égal à 5mm par rapport au diamètre du disque de C3G (**Rahal, 2005**).

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

## RESULTATS :

### 1. Isolats bactériens

Durant la période de 50 jours, allant de février à la fin de mars 2018, 42 souches bactériennes ont été récoltées à partir des prélèvements urinaires de différents laboratoires des analyses médicales. Parmi ces souches, seulement 32 (76.19 %) ont donné une culture bactérienne contenant des bacilles à Gram négatif (BGN) pure. Ce taux est dû aux conditions défavorables de croissance de certaines bactéries et d'autres sont données des cultures mixtes à cause de la contamination, et sont réparties selon le (Tableau 05).

L'analyse des prélèvements a permis d'isoler 32 BGN. La purification a été basée sur les caractères culturels et les caractères morphologiques. Tout isolat pur donnant des BGN a été retenu pour une éventuelle identification biochimique par la galerie API20E.

**Tableau 05 :** Répartition des souches selon les sites de prélèvement.

Les laboratoires	Les souches récoltées	Les souches acceptées	Les souches éliminées
Khaldi Abdelaziz (Tébessa) EPH	03	03	00
Hôpital Bouguerra Boulaares (Bekkaria)	17	11	06
Laboratoire des analyses médicales pharmacie zirgui nacer eddine (Bir El Ater)	08	06	02
Laboratoire des analyses médicales Dr.allola (Tébessa)	14	12	02

#### 1.1. Aspect macroscopique des isolats :

Les isolats bactériens ont montré divers aspects culturels, en fonction du milieu de culture, permettant de suspecter leur appartenance à un groupe bactérien ou à un autre (entérobactéries, *Pseudomonas* ou autre).

##### a) Sur la gélose Mac Conkey :

- Colonies rouges ou roses (lactose +), rondes, lisses et bombées à contour régulier, de 0,5 à 4 mm de diamètre.
- Colonies jaunes rondes bombées de 0,1 à 0,5 mm de diamètre.

##### b) Sur la gélose nutritive :

- Colonies jaunes, rondes, bombées de 0,1 à 0,5 mm de diamètre.
- Colonies beiges, à bord irrégulier, de 2 à 3 mm de diamètre d'odeur putride.
- Colonies bleu vertes, à bord irrégulier de 0,5 mm de diamètre, dégageant une odeur du jasmin caractéristique de *P. aeruginosa*.

## 1.2. Aspect microscopique :

Après coloration de Gram, l'observation microscopique a montré des BGN droits, courts, moyens ou longs, épais ou fins, isolés ou regroupés en paires ou en chainettes de longueur variable, ou bien des coccobacilles isolés ou regroupés en paires (Figure 03 et 04).

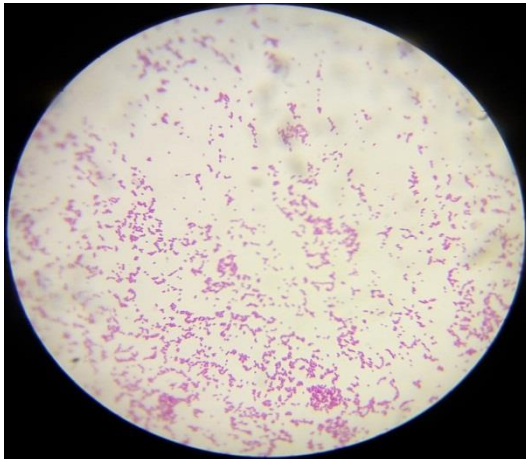


Figure03 : Observation microscopique de la souche E10

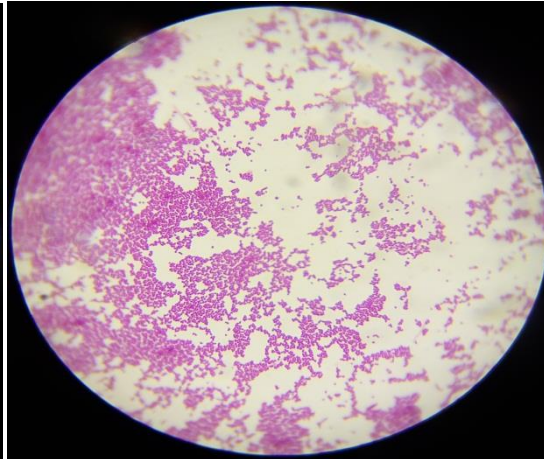


Figure 04 : Observation microscopique de la souche E06

## 1.3. Identification biochimique :

L'identification biochimique réalisée par la galerie API 20E (figure 05 et 06) a permis d'identifier 32 souches (90.62 %) qui appartiennent au groupe des entérobactéries (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*), et 3 (9.38%) souches qui sont des bacilles à Gram négatifs non fermentaires (*Pseudomonas aeruginosa*).



Figure 05 : résultat de l'API 20E de la souche de E26.



Figure 06 : résultat de l'API 20E de la souche de E13.

Tableau 06 : Répartition détaillée des souches isolées.

Groupe	Genre	Espèces	Effectif de l'espèce	% de l'espèce	Effectif des genre (s)	% du genre	Effectif du Groupe	% du groupe
Entérobactéries	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>	12	41.38	12	41.38	29	90.62%
		<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	06	20.69	06		
	<i>Klebsiella</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	02	6.70	05		
		<i>Klebsiella oxytoca</i>	01	3.45				
		<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	02	6.70				
	<i>Serratia</i>	<i>Serratia marcescens</i>	02	6.70	05	17.24		
		<i>Serratia ficaria</i>	01	3.45				
		<i>Serratia liquefaciens</i>	01	3.45				
		<i>Serratia odorifera</i>	01	3.45				
	<i>Proteus</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	01	3.45	01	3.45		
BGN nF	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	03	100	03	100	03	9.38%

## 2. Répartition des souches en fonction du groupe de BGN :

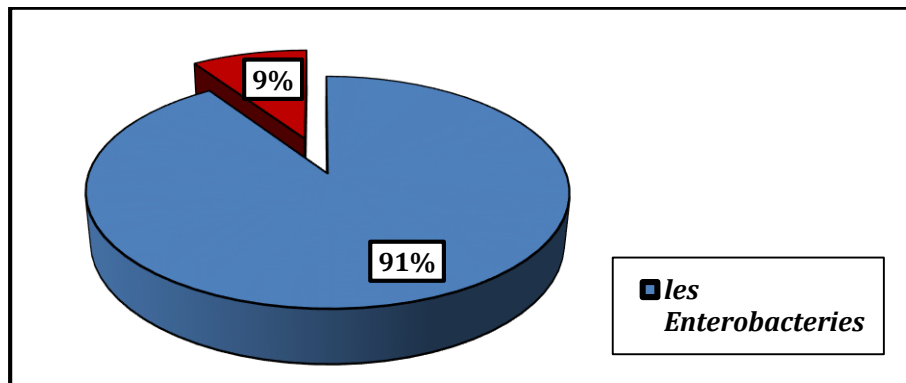


Figure 07 : Répartition des souches en fonction des groupes.

Parmi les 32 isolats identifiés par l'étude de leurs caractères biochimiques, nous avons constaté que 29 (90.62 %) souches appartiennent au groupe des entérobactéries (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*), et 3 (9.38%) souches sont des bacilles Gram négatifs non fermentaires (*Pseudomonas aeruginosa*).

Les 29 Entérobactéries ont été identifiées, parmi un total de 32 bacilles à Gram négatif, avec une fréquence d'isolement de (90.62) % (29/32) représenté par les genres (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*), Ainsi 03 souches ont été identifiées comme des bacilles Gram négatifs non fermentaires (*Pseudomonas aeruginosa*).

### 2.1. Répartition des souches en fonction du genre :

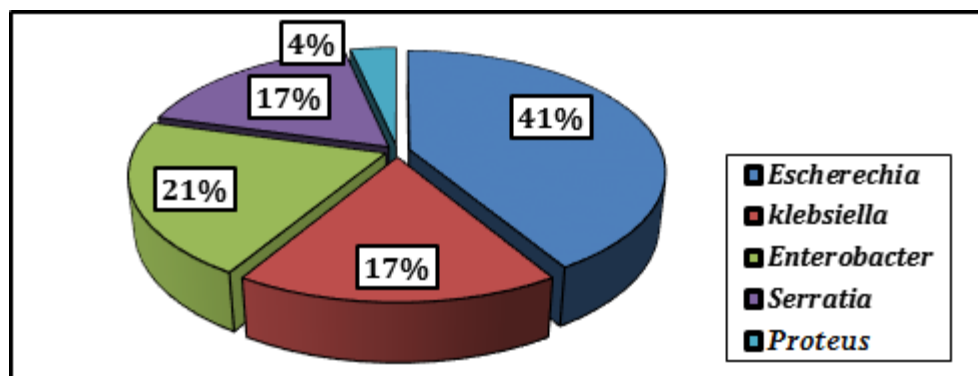


Figure 08 : Répartition des souches en fonction du genre d'entérobactéries.

Les souches isolées dans notre travail appartiennent à 5 genres différents d'*Enterobacteriaceae*, dont le plus représenté est *Escherichia* avec une fréquence de (41.38%), suivi d'*Enterobacter* (20.67%) puis de *Klebsiella* et *Serratia* (17.24%) et *Proteus* (3.45%). 3 souches des bacilles à Gram négatifs non fermentaires sont représenté par le genre *Pseudomonas*.

## 2.2. Répartition des souches en fonction des espèces :

### 2.2.1. Entérobactéries :

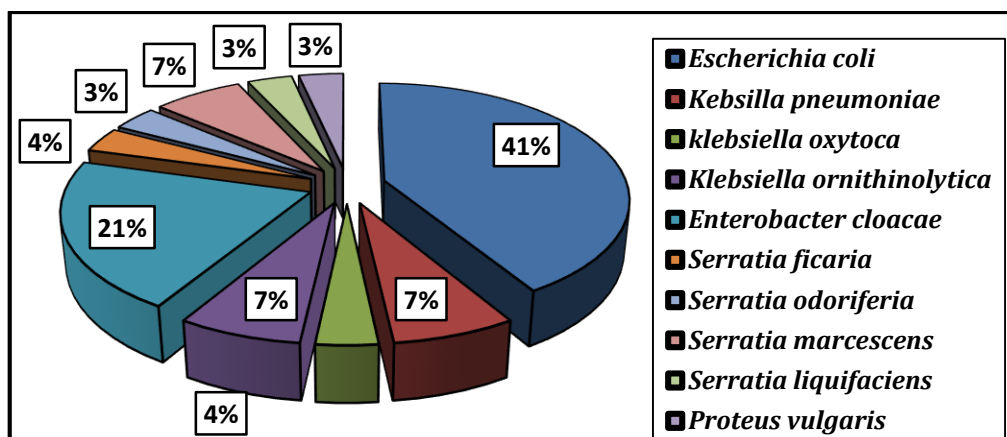


Figure 09 : Répartition des souches en fonction des espèces des Entérobactéries.

L'analyse des espèces identifiées par rapport à l'ensemble des souches d'entérobactéries isolées, a montré une prédominance d'*Escherichia coli* avec 12 souches soit (41.38%), suivie d'*Enterobacter cloacae* avec 06 souches (20.69 %), de *Klebsiella pneumoniae*. *Klebsiella ornithinolytica* et *Serratia marcescens* avec 02 souches (6.70%). les autres entérobactéries viennent en dernière position avec 5 isolats soit (3.45%), il s'agit de *Klebsiella oxytoca*, *serratia ficaria*, *serratia odorifera*, *serratia liquefaciens* et *proteus vilgaris*. la répartition des espèces est présentée dans la (figure09).

### 2.2.2. Les bacilles à Gram négatifs non fermentaires :

Toutes les souches des bacilles à Gram négatifs non fermentaires sont identifiées comme des *Pseudomonas aeruginosa*.

## 3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques :

### 3.1. Les Entérobactéries :

Toutes les souches ont été testées vis-à-vis de 14 molécules d'antibiotiques appartenant à 3 familles différentes dont ;7  $\beta$ -lactamines, 3 Aminosides, 2 Quinolones, et d'autre. Les antibiotiques choisis sont donnés dans le tableau 07, et présentés dans la (figure 10). Les souches d'entérobactéries ont montré une résistance à de nombreuses  $\beta$ -lactamines. Les taux de résistances sont illustrés dans le (Tableau 07).

Au vu des résultats obtenus (tableau 07, figure 10), nous avons constaté que les antibiotiques testés ont montré une grande hétérogénéité des souches. Généralement, les entérobactéries isolées ont exprimé une résistance croisée aux antibiotiques des différentes familles, mais à des degrés variables. Les taux de résistance les plus élevés ont été marqués à l'égard des différentes  $\beta$ -lactamines (AUG, CTX et l'association TI), aux Quinolones (NA et OFX). Toutes les souches sont résistantes à l'Amoxicilline et acide clavulanique, sauf la souche de *klebsella ornithinolytica*. En revanche, le taux de résistance le plus faible a été observé pour l'Imipénème (6,9 %). Pour les Aminosides, l'Amikacine est montré le plus efficace avec un taux de résistance, (6.7%) suivie de la Tobramycine (31.03%). Concernant les quinolones, la résistance des souches a été maintenue à (62.07%) pour acide nalidixique et l'Ofloxacin respectivement. Concernant les autres antibiotiques le Nitrofurane et la Fosfomycine nous avons constaté une forte sensibilité des souches testées estimée à (89.65%) et à (96.2%) respectivement.

**Tableau 07 :** Pourcentage de sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries isolées.

Famille	Antibiotique	R		I		S	
		Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%
$\beta$ -lactamines	AUG	28	96,55	00	00	01	3,45
	CN	13	37,7	00	0	16	55,17
	CX	16	27,59	05	17,24	08	55,17
	CTX	16	55,17	03	10,34	10	34,48
	AT	11	37,93	02	6,9	16	55,17
	IPM	2	6,9	02	6,9	25	86,21
	TI	27	93,1	01	3,45	01	3,45
Aminosides	GM	11	37,93	02	6,7	16	55,17
	AK	2	6,7	06	20,7	21	72,41
	TOB	09	31,03	06	20,7	14	48,27
Quinolones	NA	18	62,07	01	3,45	10	34,48
	OFX	18	62,07	02	6,7	09	31,03
Autres	F	03	10,43	00	00	26	89,65
	FO	04	13,79	00	00	25	86,2



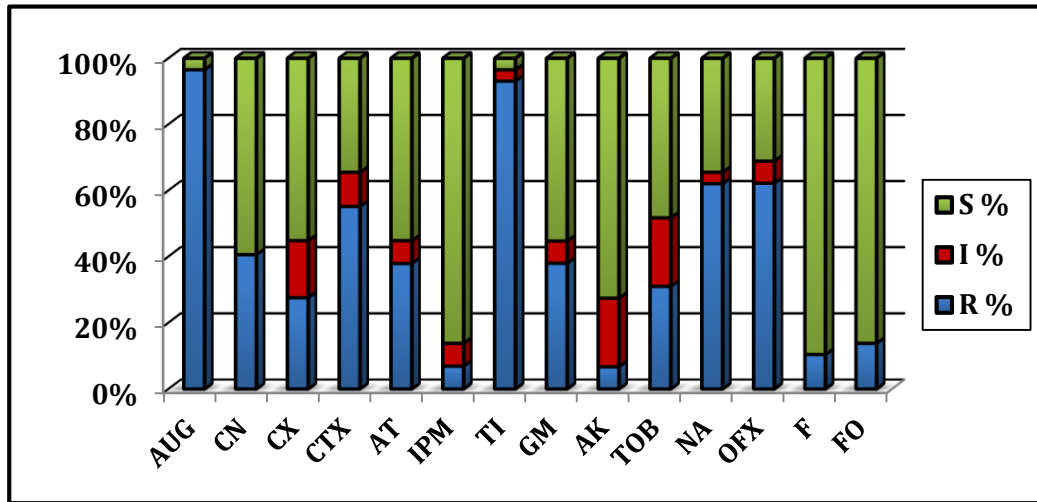


Figure 10 : Sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries isolées

### 3.1.1. *Escherichia coli* :

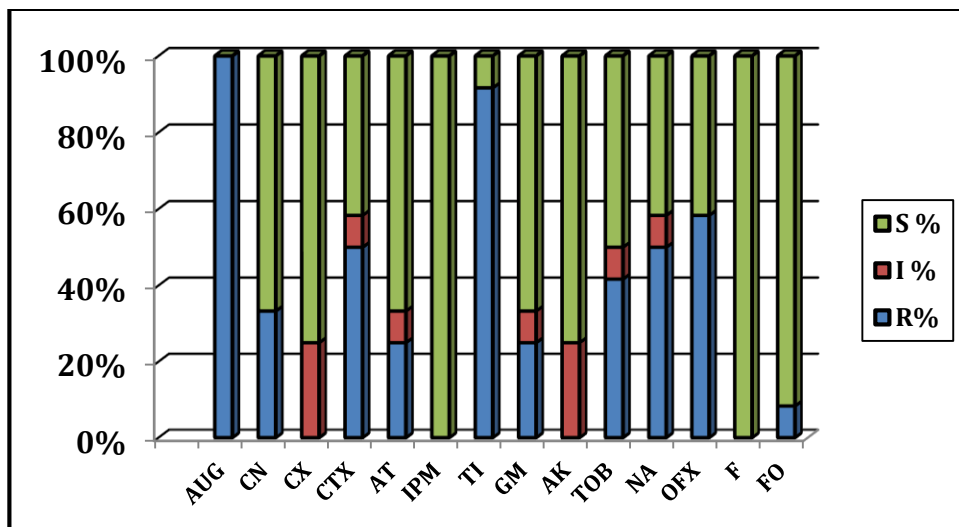
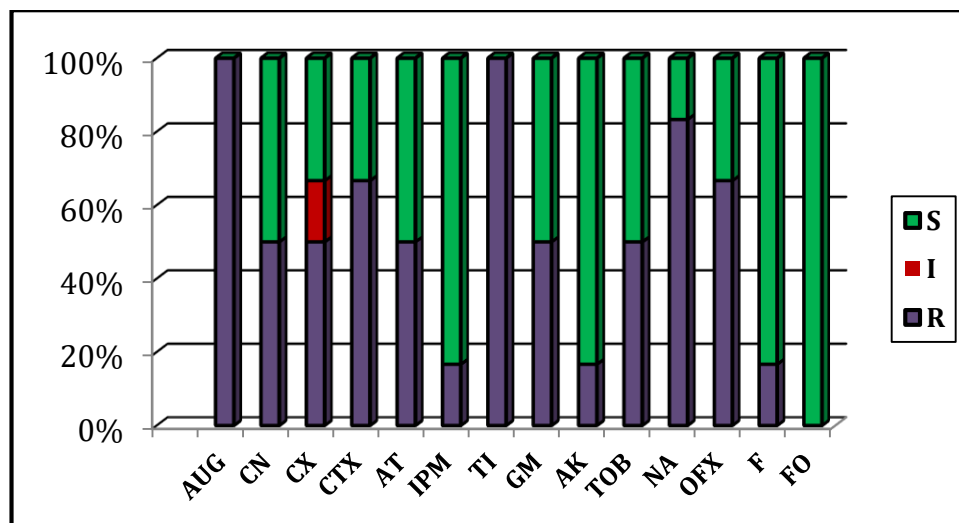


Figure 11 : Sensibilité aux antibiotiques des *Escherichia coli* isolées.

D'après l'analyse de profils de résistance aux antibiotiques de la souche étudiées *Escherichia coli*, nous avons noté une résistance vis-à-vis les  $\beta$ -lactamines teste, (100%) pour Amoxicilline et acide clavulanique, (91.67%) pour la Ticarcilline et (50%) pour la Cefotaxime et un taux considérable de (33.33%) pour la Cefalexine et (25%) pour l'Aztréonam, cependant toutes les souches testées étaient sensibles à l'Imipénème et à la cefoxitine. Concernant les aminosides, on observe une résistance de (41.67%) à la Tobramicine et (25%) pour la Gentamicine et une sensibilité de (75%) pour l'Amikacine. Par ailleurs, vis-à-vis des

Quinolones, un taux de résistance de (58.33%) a été détecté pour Ofloxacine et (50%) pour l'acide nalixique, quant aux Fosfomycine et Nitrofuranes ces derniers restent actifs sur les souches étudiées.

**3.1.2. Enterobacter :**



**Figure 12 :** Sensibilité aux antibiotiques des *Enterobacter cloacae* isolées.

La totalité des souches sont des *Enterobacter cloacae*, ces souches ont montré des taux de résistance variables vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines utilisées (100%) à l'Amoxicilline associé à l'acide Clavulanique et la Ticarcilline ainsi que (66.67%) Cefotaxim et (50%) Céfalexine, Cefoxitine et Aztréonam), plus (16.67%) de résistance à l'Imipeneme n'a été détectée (Figure 12). Nos souches se sont montrées résistance aux Aminosides, de (50%) gentamicine et Tobramycineme mais une sensibilité de (83.33%) à l'Amikacine. Cependant, des résistances ont été observées à l'égard des quinolones testées : (83.33%) à l'égard d'acide nalixique et (66.67%) pour Ofloxacine, Quant aux autres familles antibiotiques, elles ont gardé une activité prononcée sur toutes les souches.

3.1.3. *Klebsiella* :

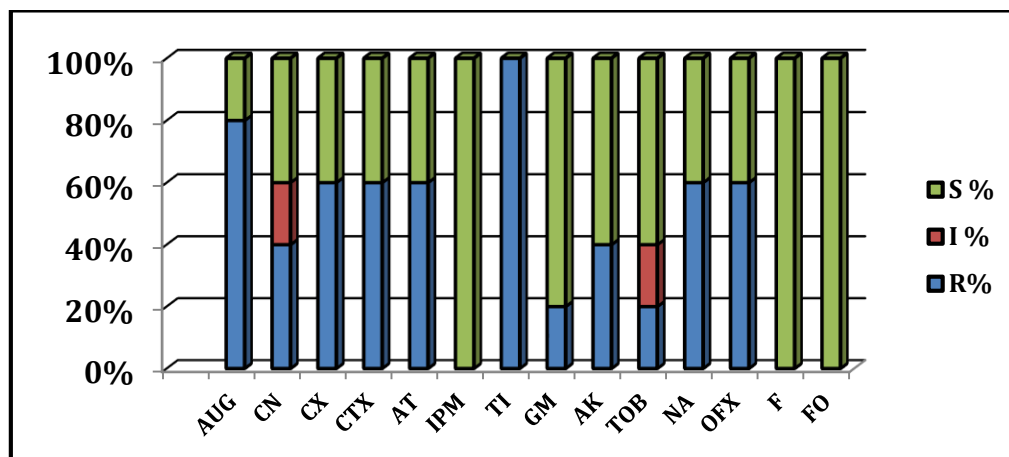


Figure 13 : Sensibilité aux antibiotiques des *Klebsiella* spp.

Pour les profils de résistance aux antibiotiques des souches de *Klebsiella* spp étudiées (Figure 13), on note une résistance très élevée vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines, En revanche, toutes les souches (100%) étaient sensibles à l'Imipenème. Concernant les Aminosides, on observe des résistances modérées, (40%) pour l'Amikacine et (20%) pour la Tobramycine et la Gentamicine. Par ailleurs, vis-à-vis des Quinolones, nous avons constaté un taux de résistance de (60%) pour acide nalixique et Ofloxacin respectivement et une sensibilité totale pour la Fosfomycine et la Nitrofuranes.

a) *Klebsiella pneumoniae* :

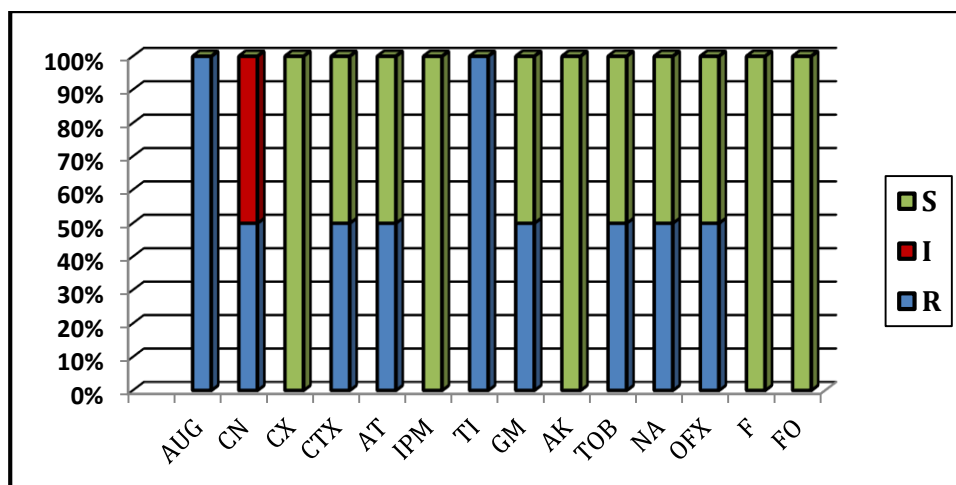
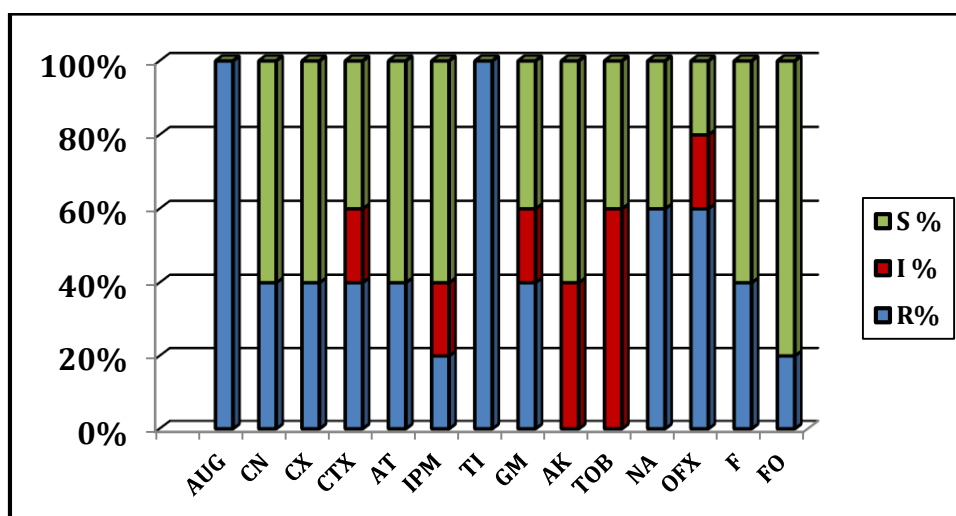


Figure 14 : Sensibilité aux antibiotiques des *Klebsiella pneumoniae* isolées.

En analysant les profils de résistance aux antibiotiques des 02 souches de *K.pneumoniae* étudiées (Figure 14), nous avons noté une résistance très élevée vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines: l'Amoxicilline associée à l'acide clavulanique et la Ticarcilline (100%), et une résistance de (50%) pour la Céfalexine, la Céfotaxime et l'Aztréonam, En revanche, toutes les souches (100%) étaient sensibles à la Cefoxitine et à l'Imipénème. Concernant les Aminosides, nous avons observé une résistance marquée pour la Tobramycine et la Gentamicine de (50%) et une sensibilité totale pour l'Amikacine. Par ailleurs, vis-à-vis des Quinolones, un taux de résistance de (50 %) a été détecté pour l'Ofloxacin et l'acide nalidixique ; quant aux Fosfomycine et Nitrofuranes ces derniers restent sans actifs sur les souches étudiées.

### 3.1.4. *Serratia* :



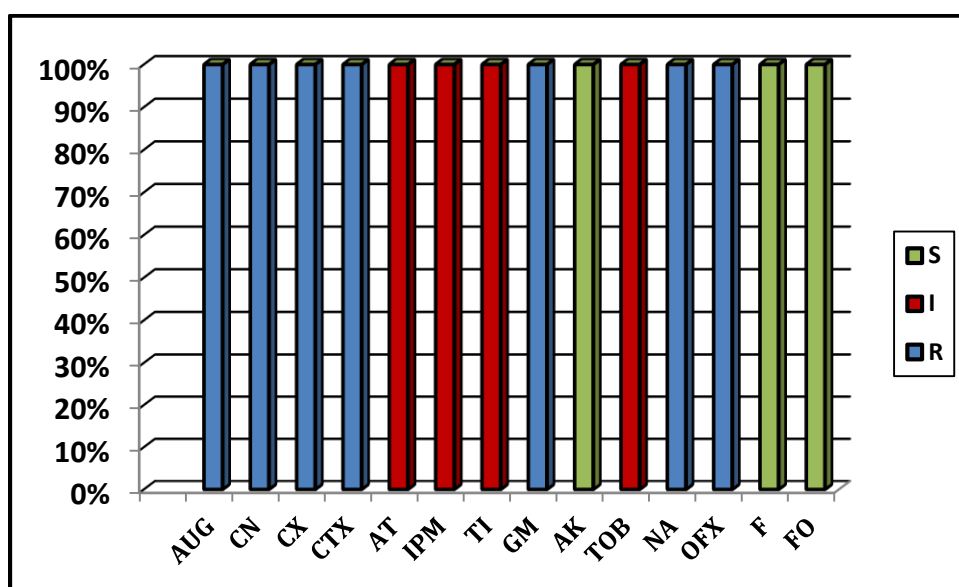
**Figure 15 :** Sensibilité aux antibiotiques des *Serratia ssp* isolées.

Les souches de genre *Serratia* sont *Serratia marcescens*, *serratia ficaria*, *serratia odorifera*, *serratia liquifaciens*, ces souches ont montré des taux de résistance vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines utilisées (100%) à l'Amoxicilline associée à l'acide clavulanique et la Ticarcilline (40%) pour Cefotaxim, Céfalexine, Cefoxitine et Aztréonam), plus (20%) des souches ont une résistance à Imipénème n'a été détectée (Figure 15). Nos souches se sont montrées résistance aux Aminosides, (40%) étaient sensible à la Gentamicine (60%) à l'Amikacine. Cependant, des résistances ont été observées à l'égard des Quinolones testées (60%) à l'acide nalixique et Ofloxacin respectivement.

**3.1.5. *Proteus* :**

**a) *Proteus vilgarus* :**

Après l'analyse de profils de résistance aux antibiotiques de la souche *Proteus vilgarus* (Figure 16), on note une résistance totale vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines teste sauf pour l'Imipenème Concernant les Aminosides, on observe une résistance de taux (100%) pour la Gentamicine et une sensibilité totale pour l'Amikacine Par ailleurs, vis-à-vis des Quinolones, un taux de résistance de (100 %) a été détecté pour l'Ofloxacin et l'acide nalidixique, quant aux Fosfomycine et Nitrofuranes ces derniers restent actifs sur la souches étudiée.



**Figure 16 :** Sensibilité aux antibiotiques de la souche *Proteus vilgarus*.

### 3.2. Bacilles à Gram négatifs non fermentaires :

#### 3.2.1 *Pseudomonas aeruginosa* :

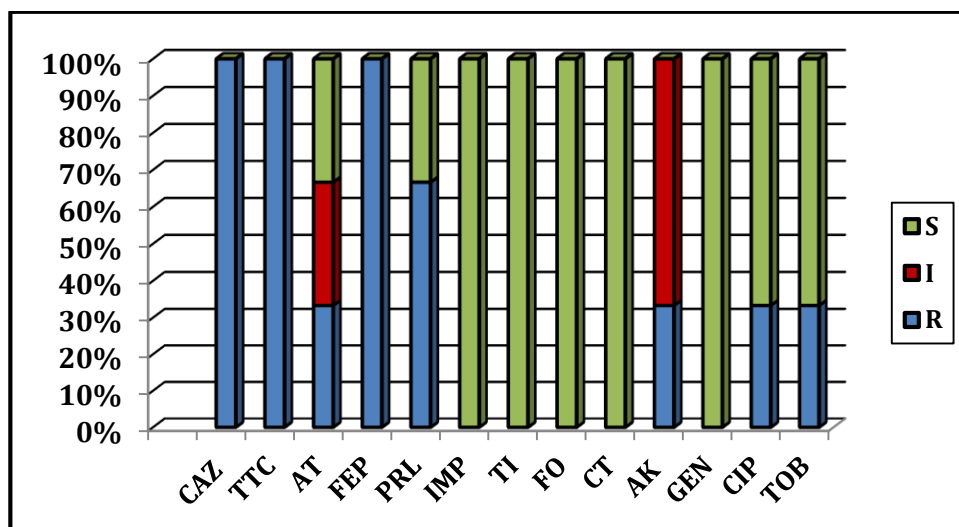


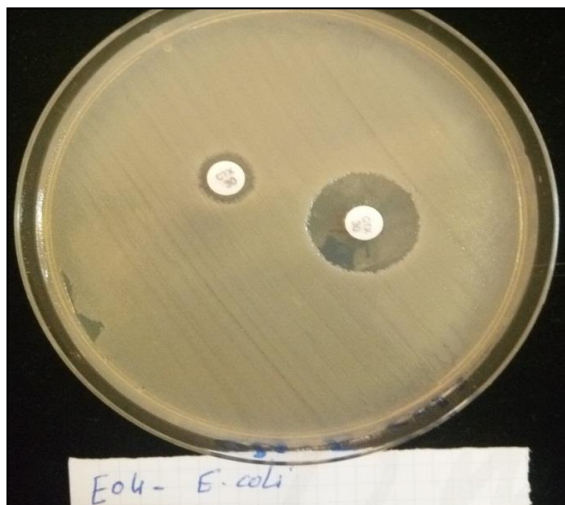
Figure 17 : Sensibilité aux antibiotiques des *Pseudomonas aeruginosa* isolées.

Les taux de résistance aux  $\beta$ -lactamines sont les suivants : (100%) à la Ticarcilline+acide clavulanique, Céfépime et Ceftazidime respectivement, (33.33%) à l'Aztréonam, (66.67%) à la Pipéracilline, et une sensibilité totale à l'Imipénème et à la Ticarcilline. Pour la famille des Aminocyclitol, les résultats révèlent une résistance de (33.33%) à l'Amikacine et la Tobramicine, tandis que la Gentamicine présente une activité sur les 3 souches. Pour les Quinolones, une résistance a été notée pour la Ciprofloxacine de (33.33%), cependant (100%) des souches étaient sensibles aux Colistine et Fosfomysine.

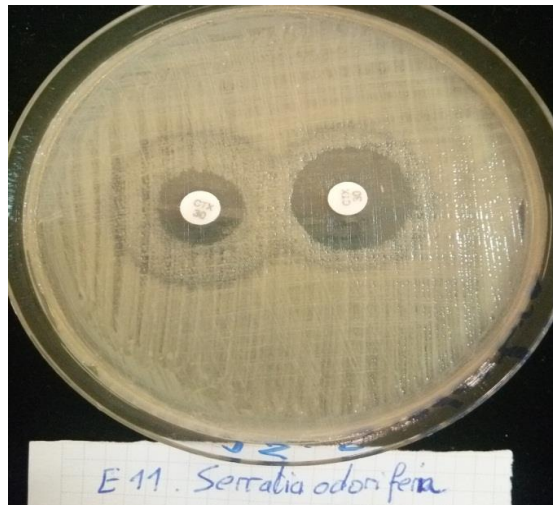
#### 4. Entérobactéries productrices des BLSE :

##### 4.1. Résultats des tests de détection des BLSE :

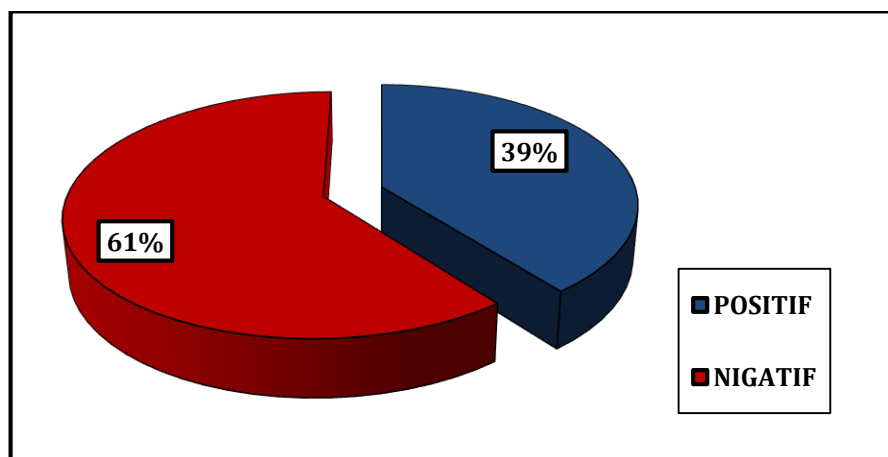
Le screening initial par le test de synergie nous a permis de suspecter des souches productrices de BLSE. Cependant, la méthode du double disque nous a permis de confirmer 11 souches productrices de BLSE. La figure 20 présente le pourcentage des souches BLSE. (Les figures 18-19) présentent des exemples de quelques tests de détection positifs.



**Figure 18 :** Test du double disque positif de la souche E04.



**Figure 19 :** Test du double disque positif de la souche E11.



**Figure 20 :** pourcentages des Entérobactéries productrices des BLSE

4.2. Répartition des EBLSE selon les espèces :

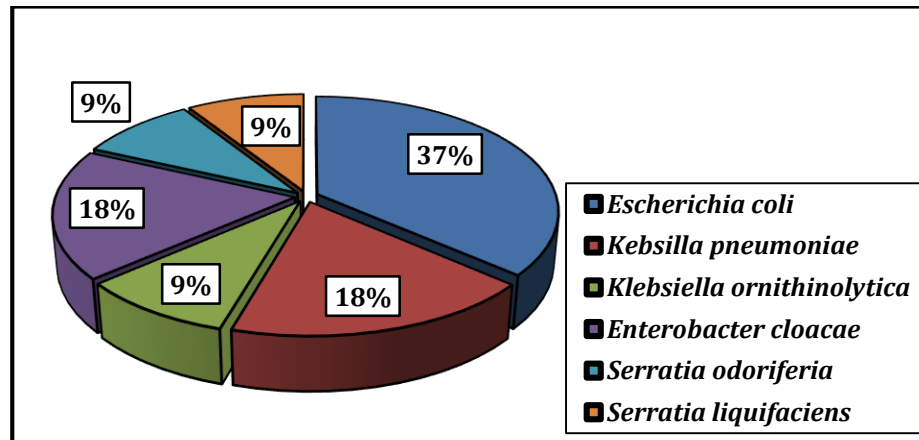


Figure 21 : Répartition des EBLSE selon les espèces.

Le comportement des Entérobactéries vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines nous a permis de classer, selon (Vedel, 1998), les souches en fonction de leur phénotype de résistance. L'analyse phénotypique des espèces d'entérobactéries est en faveur d'une production de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE) soit (36.36%), dont 4 souches d'*Escherichiacoli*, 2 souches *Klebsiella pneumoniae* ça fait de (18.18%), avec 2 souches d'*Enterobacter cloacae* (18.18%)et pour les souches (*Serratia odorifera*, *Seratia liquifaciens* et *Klebsiella ornithinolytica*) chacune prend l'effectife de 1 et le taux de (9.09%).

4.3. Résistance aux antibiotiques des souches EBLSE :

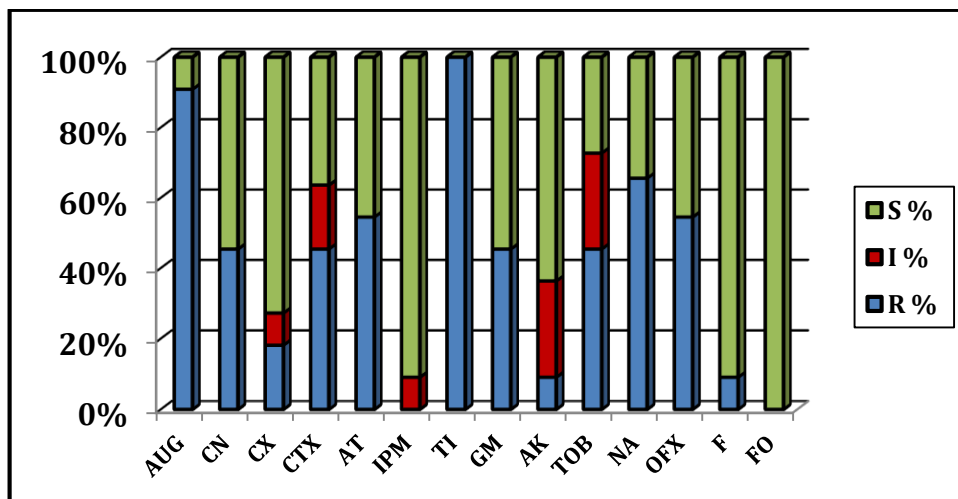


Figure 22 : Sensibilité aux antibiotiques des EBLSE.



Le profil de sensibilité aux antibiotiques des 11 souches étudiées montre la résistance à la plupart des  $\beta$ -lactamines sauf l'Imipenème qui reste actif sur toutes les souches étudiées, cela indiquant sa place en premier choix dans le traitement des infections sévères à bactéries multirésistantes. Ainsi, des résistances croisées sont observées avec les Aminosides, une résistance de (45.45%) à la Gentamycine, à la Tobramycine et une sensibilité pour Amikacine. Nous avons tout de même constaté une forte sensibilité au Nitrofurane et au Fosfomycine (figure 22).

## **DISCUSSION :**

### Les bacilles à Gram négatif :

Les bacilles à Gram négatif, dont les entérobactéries restent les bactéries les plus isolées dans les infections, particulièrement dans les pays en voie de développement, dont on fait partie.

Le traitement de choix pour ces infections reste les  $\beta$ -lactamines à large spectre, dont les céphalosporines de 3<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup> génération et les carbapénèmes.

L'habitat naturel de la plupart des entérobactéries est le tube digestif, qui reste le pourvoyeur des différentes infections, directement ou indirectement par les mains, les matériels hospitaliers contaminés et par les aliments (**Denton, 2007 ; Sekhsokh et al., 2008**).

Toutes les souches isolées dans notre travail sont d'origine des prélèvements urinaire. Une étude réalisée en France en (2000), a montré que (91,1%) des prélèvements communautaires sont des prélèvements urinaires (**Péan et al., 2001**). Nous avons constaté que *E. coli* est l'espèce la plus fréquemment isolée avec (41.38%), suivi par *Enterobacter cloacae* avec (20.69%), En effet, *E. coli* représente (60%) à (80%) des infections urinaires communautaires (**Caracciolo et al., 2011**).

### Fréquence des entérobactéries :

Les entérobactéries occupent une place très importante dans les infections urinaires. (**Larbi, 2001**).

Dans la présente étude (90.62%) des germes isolés sont des entérobactéries. Cette prédominance est rapportée dans d'autres travaux. En effet, une étude rétrospective effectuée à l'hôpital d'Ain mlila en Algérie rapporte une fréquence de (87%). (**Bouzenoïne et al., 2009**). Une autre étude rétrospective effectuée au laboratoire de microbiologie de l'hôpital universitaire de Tahar Sfar en Tunisie, rapporte une fréquence de (89%) (**Ben Haj et Khedher, 2010**).

### Fréquence des entérobactéries selon les genres :

Pour ce qui concerne la répartition des principales bactéries dans les urines, nous avons noté les pourcentages suivants :

*E. coli* représente l'espèce la plus fréquente (41.38%) suivi de *Entérobacter* (20.67%), alors que *Klebsiella* et *serratia* représentent (17.24%), en dernier lieu on retrouve autres entérobactéries (*proteus*) avec une fréquence de (3.45%). (Tableau 06, Figure 08). Ces résultats corroborent ceux de (**Caracciolo et al., 2011**) qui a rapporté que *E. coli* représente (60) à (80%) des infections urinaires communautaires.

Nos résultats se concordent aussi avec ceux de l'étude de, qui ont noté que les entérobactéries (particulièrement *E. coli*) représentaient plus de (80%) des germes responsables des infections urinaires.

D'après les statistiques du laboratoire DR Bellil, *E. coli* est de loin le germe le plus fréquemment isolé suivi de *Klebsiella spp* et d'*Entrobacter spp*. (**Bakiri et Amamra, 2009**). Cela est en rapport avec la physiopathologie de l'infection urinaire. L'IU 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, *E. coli* possède des adhésines, capables de lier la bactérie à l'épithélium urinaire et d'empêcher son élimination par les vidanges viscérales, *Klebsiella* et *Proteus* secrètent une uréase qui alcalinise l'urine, dont le pH naturellement acide empêche la prolifération des germes (**Sekhsokh, 2002**).

### Etude de la sensibilité des entérobactéries isolées aux antibiotiques :

#### Profil de Sensibilité des souches *d'Escherichia coli* :

La résistance aux  $\beta$ -lactamines peut être consécutive à 3 mécanismes :

- Altération des porines avec diminution de la perméabilité (bacilles à Gram négatifs).
- Inactivation enzymatiques par les  $\beta$ -lactamases qui ouvre le cycle  $\beta$ -lactame des pénicillines (pénicillinases). ces enzymes sont extracellulaires et ont un support génétique étant alors chromosomique ou plasmidique (bactérie Gram négatif).
- Modification des cibles (PBP Penicillin Binding Protein) (**Bakiri et Amamra, 2009**).

Autrefois, l'amoxicilline et l'augmentin étaient les molécules les plus utilisées dans le traitement des infections causées par *Escherichia coli*. La sensibilité de cette bactérie à ces deux antibiotiques a beaucoup diminué.

Notre étude confirme cette observation car les 12 souches d'*Escherichia coli* isolées sont résistantes à l'Augmentin. Ce résultat est comparable à ceux de certains chercheurs. Les aminosides (Gentamycine et Amikacine) gardent une excellente activité et restent jusque-là très actifs sur les entérobactéries et principalement sur *E. coli*. Ces résultats sont très proches de ceux rapportés par **(Bathily, 2002)** qu'est trouvée 45% de sensibilité.

### Les bactéries productrices de BLSE :

Depuis plus de 20 ans, la résistance des entérobactéries aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G) ne cesse de se renforcer notamment par l'acquisition de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE) **(Belmonte et al., 2010)**. Les bactéries productrices de BLSE constituent une préoccupation majeure en milieu hospitalier en raison de leur diffusion épidémique et de leur multirésistance aux antibiotiques.

Plusieurs études ont rapporté que les BLSE sont retrouvées chez une vaste proportion de bacilles à gram négatif, mais les entérobactéries représentent les germes les plus incriminés **(Gniadkowski. 2001)**.

Dans cette étude, L'incidence de souches d'entérobactéries productrices de BLSE était (39%), et parmi les espèces identifiées, on retrouvait majoritairement *E. coli* puis *K.pneumoniae*, *E.cloaca*, *Serratia odorifera*, *Serratia liquifaciens* et *Klebsiella ornithinolytica*.

Cette prévalence correspond à peu près à celle retrouvée dans certaines études, en particulier celle faite au Nord d'Algérie, où des prévalences élevées ont été rapportées, soit (39.22%) à Tlemcen **(Baba Ahmed-Kazi Tani et al., 2013)**, et (31.4%) à Annaba **(Nedjai et al., 2012)**.

Les prévalences de production de BLSE chez *E. coli*, *K. pneumoniae* et *Enterobacter cloacae* que nous avons obtenu dans cette étude ont été estimés de (36.36%), (18,18%) et (18,18%) respectivement. Ces taux sont relativement élevés en comparaison à des fréquences

de (1.3%) et (5.6%) respectivement trouvées par Barguigua et al. (**Barguigua et al., 2011**) au Maroc pour les deux genres *E. coli* et *K. pneumoniae*.

Nos résultats corroborent ceux rapporté dans d'autres pays à taux élevés de BLSE, comme Indonésie (18%) et (24%) respectivement rapportées par Severin et al. (**Severin et al., 2010**), et au Mali, où (21%) et (37.8%) respectivement trouvées par Duval et al. (**Duval et al., 2009**).

Au Iran, la prévalence des *K. pneumoniae* productrices de BLSE était très élevée soit un taux alarme (72.1%) (**Feizabadi et al., 2010**).

Les résultats des taux d'*E. cloacae* (18.18%) productrices de BLSE que nous avons trouvé sont paraît être du même ordre de grandeur que les proportions trouvées dans les pays africains où des taux élevés de BLSE ont été rapporté, soit (18.5%) au Mali (**Duval et al., 2009**).

Il a été rapporté que généralement, la prévalence globale de la production de BLSE variée considérablement selon les zones géographiques des pays et dans différentes structures hospitalières.

Le profil de sensibilité aux antibiotiques des 11 souches étudiées montre la résistance à la plupart des  $\beta$ -lactamines sauf l'Imipenème qui reste actif sur toutes les souches étudiées, cela indiquant sa place en premier choix dans le traitement des infections sévères à bactéries multirésistantes.

Ainsi, des résistances croisées sont observées avec les Aminosides, une résistance de (45.45%) Gentamicine et Tobramycine , pour les quinolones, et sensible pour Amikacine.

Correspond la famille des Quinolones, une résistance plus de (50%) a été observer, et sensible pour le Nitrofurane et les Fosfomycine Ceci est en rapport avec l'utilisation Abusive d'antibiotiques à large spectre (Pénicillines, Céphalosporines, Tétracyclines, Aminosides).

Récemment, un taux beaucoup plus important a été retrouvé dans une étude algérienne, où le pourcentage de la résistance de souches EBLSE était (100%) à la majorité des antibiotiques C3G testés, Gentamicine et Tobramycine (**Touati et al., 2012**).

De même, les proportions retrouvées par Ben Haj Khalifa et Khedher dans une étude portant sur les *Klebsiella spp.* uropathogène productrices des BLSE isolées à l'hôpital universitaire Tunisien, sont plus proches de celles que nous observons, dont la fréquence de la résistance de ces germes est estimée à (100%) aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, (92.5%) aux Gentamicines, (**Ben Haj Khalifa et Khedher, 2012**).

Il est actuellement prouvé que l'utilisation des antibiotiques, notamment les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération dans un but thérapeutique est le facteur de risque le plus important dans le développement de résistances bactériennes qui est devenue un problème majeur de santé public (**Rubin et Samore, 2002**).

## **CONCLUSION :**

**CONCLUSION :**

La diffusion des entérobactéries multirésistantes aux antibiotiques (MDR) à l'échelle mondiale constitue une menace de santé publique majeure. Résistantes à au moins trois classes d'antibiotiques, les entérobactéries (MDR) entraînent des infections échappant aux traitements de première intention qui peuvent entraîner de grandes difficultés de prise en charge pour les patients, avec des situations d'impasse thérapeutique.

En Algérie, le problème se pose essentiellement pour les entérobactéries productrices de BLSE qui posent, pratiquement, trois types de problèmes au monde médical :

- ✓ Un problème thérapeutique : pour le clinicien qui doit prescrire un antibiotique efficace, éviter les échecs thérapeutiques et la sélection de mutants résistants.
- ✓ Un problème microbiologique : une détection difficile, nécessitant la mise en œuvre de méthodes spécifiques.
- ✓ Un problème épidémiologique : pour les équipes de contrôle de l'infection qui doivent limiter la dissémination des souches multirésistantes.

Face à cette épidémie qui évolue à bas bruit et constitue une menace majeure pour la santé publique, une mobilisation déterminée et durable de l'ensemble des acteurs impliqués est indispensable.

Dans ce contexte, le but principal assigné à ce travail est basé sur deux aspects : le premier est l'identification de souches isolées à partir d'échantillons provenant des prélèvements pathogènes et le deuxième est l'étude de la sensibilité des souches isolées vis-à-vis de certains antibiotiques utilisés en thérapeutique afin de pouvoir par la suite rechercher les types de résistances par production de BLSE.

Cette présente étude a révélé que parmi les familles de bactéries bacilles à Gram négatifs isolées par ECBU, les entérobactéries sont les plus responsables des infections urinaires (90.62 %) par rapport aux bacilles à Gram négatif non fermentaire (9.38%).



D'après nos résultats, *Escherichia coli* constitue plus de (41.38%) des bactéries isolées dans les infections urinaires. Viennent ensuite, par ordre décroissant, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella sp*, *Serratia sp* et *Proteus sp*, concernant les bacilles à Gram négatif non fermentaire, ces derniers sont représentés par *Pseudomonas aeruginosa*.

L'analyse des résultats de l'antibiogramme révélée que la famille d'antibiotiques la plus touchée par la résistance est la famille des bêta-lactamines. Ceci pourrait être dû à l'utilisation abusive de ces antibiotiques cause principale de la grande dissémination de ce type de résistance entre les bactéries dans l'environnement hospitalier. Les niveaux de résistance atteints vis-à-vis les  $\beta$ -lactamines sont associés à de nombreux mécanismes de résistance, avec prédominance de la production de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) soit (36.36%).

Cette étude nous à permet de conclure aussi que dans le cadre de mesures destinées à limiter l'apparition d'épidémies intra-hospitalières dues à des souches d'entérobactéries productrices de BLSE : le dépistage précoce des infections à germes BLSE, le contrôle des réservoirs et des voies de transmission par isolement technique et géographique de patients colonisés ou infectés et le bon usage des antibiotiques sont à l'évidence des mesures qui permettent la réduction de la prévalence de ces bactéries multirésistantes. Cependant, leur mise en œuvre nécessite la prise de conscience collective de ces notions, la coopération de tous les services et par la formation approfondie des équipes soignantes.

Notre travail ouvre de nombreuses perspectives :

- ✓ Optimiser les méthodes et les milieux de prélèvements pour les différents types de BGN afin d'améliorer la sensibilité et la précision des données.
- ✓ Identifier les relations clonales entre les souches isolées d'un patient hébergeant une bactérie BGN multi résistante et celles isolées de son environnement par l'analyse des fragments de restriction.
- ✓ Des rapports prospectifs contrôlés ont nécessaires pour élucider correctement le rôle joué par la contamination des surfaces et de l'air (et de décontamination) dans la transmission des agents pathogènes nosocomiaux.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**A**

**01- Ahoyo AT, Baba-Moussa L, Anago AE, Avogbe P, Missihoun TD, Loko F, Prévost G, Sanni A. et Dramane K.** (2007). Incidence d'infections liées à *Escherichia coli* producteur de  $\beta$ -lactamase à spectre élargi au Centre hospitalier départemental du Zou et Collines au Bénin. *Médecine et maladies infectieuses*. 37 : 746-752.

**02- Allegranzi B, Bagheri NS, Combescure C, et al.** (2011). Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries. systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 377 : 228-241.

**03- Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil H.** (1992). Bactériologie clinique. 2ème édition. Ellipses, Paris. 511 p.

**04- Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil H.** (2000). Bactériologie clinique. 3ème édition. Ellipses, Paris. 602 p.

**B**

**05- Baba Ahmed-KaziTani Z, Decré D, Genel N, Boucherit-Otmani Z, Arlet G, and Drissi M.** (2013). Molecular and Epidemiological Characterization of Enterobacterial Multidrug 65 Resistant Strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008–2010). *Microbial Drug Resistance*. 19(3) : 185-190.

**06- Bakiri N, Amamra I.** (2009). Étude de l'antibiorésistance de souche d'entérobactéries isolées des eaux polluées et en milieu hospitalier. Microbiologie général et biologie moléculaire des micro-organisme. Université des frères Mentouri Consantine, 10 p.

**07- Barguigua A, El Otmani F, Talmi M, Bourjilat F, Haouzane F, Zerouali K, and Timinoumi M.** (2011). Characterization of ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* isolates from community in Morocco. *J Med Microbiol*. 60 : 1344-1352.

**08- Barrial K, et Scotet J.** (2005). Classification raisonnée des  $\beta$ -lactamases chez les bacilles à Gram négatif, Perspectives d'évolution. Encadrement : Dr Sylvestre TIGAUD. DES BACTERIOLOGIE, *Semestre Hiver*. 05(06) : 1-18. Enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*. 48 :1-14.

- 09- Bathily MD.** (2002). Sensibilité aux antibiotiques des bactéries à Gram négatif isolées d'infections urinaires de 1999 à 2001. Thèse de doctorat en Pharmacie. Université de Bamako, Mali. 88p.
- 10- Belmonte O, Drouet D, Alba J, Moiton M, Kuli B, Lugagne-Delpon N, Mourlan C et Jaffar-Bandjee M. C.** 2010. Evolution de la résistance des Entérobactéries aux antibiotiques sur l'île de la Réunion : émergence des  $\beta$ - lactamases à spectre élargi. *Pathologie Biologie*. 58 : 18-24.
- 11- Ben Haj Khalifa A, and Khedher M.** (2012). Epidémiologie des souches de *Klebsiella spp.* uropathogènes productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi dans un hôpital universitaireTunisien, 2009. *Pathol Biol (Paris)*. 60(2) : 1-5.
- 12- Ben Haj Khalifa A, Khedher M.** (2010). Fréquence et résistances aux antibiotiques des bactéries uropathogènes à l'hôpital universitaire Tahar Sfar de Mahdia. *Revue tunisienne d'infectiologie*. 4 : 57-61.
- 13- Berche P.** (2003). Bactériologie systématique D.C.E.M. 1. Faculté de médecine Necker Enfant malade. Sur le lien : [www.medix.free.fr/.../bacterie-diarrheeaigne.php](http://www.medix.free.fr/.../bacterie-diarrheeaigne.php)
- 14- Berche P, Gaillard JL, Simonet M.** (1988). Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. 1ère édition. Médecine-sciences Flammarion. 660 p.
- 15- Berthelot P, Grattard F, Mallaval FO, et al.** (2005). Epidemiology of nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderiacepacia* and *Stenotrophomonasmaltophilia*. *PatholBiol (Paris)*. 53 : 341-8.
- 16- Bonnet R.** (2004). Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzyme. *Antimicrobe Agents Chemother*. 48 : 1-14.
- 17- Bonnet R.** (2006).  $\beta$ -lactamines et entérobactéries. Chapitre 15. Livre antibiogramme. Paris. ESKA : 2ème édition .143 p.
- 18- Bourgeois CM, Mescle JF, Zucca J.** (1996). Microbiologie alimentaire : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Tome 1. Edition Lavoisier, Collection sciences et techniques, Paris. 672 p.
- 19- Bousseboua H.** 2005. Éléments de microbiologie : Programme de graduation : biologie, médecine, pharmacie, chirurgie dentaire, sciences vétérinaires, sciences alimentaires, agronomie. 2ème édition. Edition Campus-Club. 304 p.

**20- Bouzenoune F, Boudersa F, Bensaad A, Harkat F et al.** (2009). les infections urinaires à Ain M'lila(Algérie). Résistance aux antibiotiques des 239 souches isolées entre 2006 et 2007. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 39 : 142-143.

**21- Bradford P. A.** (2001). Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*. 14 (4) : 933-951.

**22- Bryskier A.** (1999). Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques. *Ellipses*, Paris. 436-445.

**23- Bush A., Jacoby GA., and Medeiros AA.** (1995). Functional classification scheme for beta-lactamases and its relation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 39 : 1211-1233.

## C

**24- CA-SFM.** (1998). AntibioGramme en diffusion. Recommandations techniques et Guide d'interprétation. Communiqué du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. *Sanofi Diagnostics Pasteur*. 12 p.

**25- CA-SFM.** (1999). Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Communiqué. *Pathol Biol*. 47 : 845-72.

**26- CA-SFM.** (2008). Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Recommandations. 50 p.

**27- CA-SFM.** (2018) Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Recommandations. 36-48 p.

**28- Caracciolo A, Bettinelli A, Bonato C, Isimbaldi C, Tagliabue A, Longoni L. et Bianchetti M.** (2011). Antimicrobial resistance among *Escherichia coli* that cause childhood community-acquired urinary tract infections in Northern Italy. *Italian Journal of Pediatrics*. 37 : 1-3.

**29- Cattoir V.** (2008). Les nouvelles  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE). *Pathologie infectieuse en réanimation*. 203-209.

**30- CHU-PS Pitié-Salpêtrière.** (2003). Bactériologie DCEM1. Université PARIS-VI Pierre et Marie Curie. Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière. Service de Bactériologie.

**D**

- 31- Debabza M, Mechai AB, Mechai AW, Sedira H, Fadeleddine S, Halaimia H, Difallah, M Nasri I, Brahim A, Saddar F, and Aliani A.** (2018). Dissemination of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in an Urban Wastewater Treatment Plant and Their Emission to a River. *J. Environ. Eng.* 144(2) : 04017093.
- 32- Delarras C.** (1998). Microbiologie. 90 heures de Travaux pratiques. *Gaëtan Morin. France*, 276 p.
- 33- De Wals PY.** (2007). Analyses mutationnelles et cinétiques de la  $\beta$ -lactamase TEM-1 d'*Escherichia coli* vers une meilleure compréhension du phénomène de résistance aux antibiotiques. Département de biochimie. Faculté de médecine. Université de Montréal.
- 34- Denis F. et Ploy MC.** (2007). Bactériologie médicale : techniques usuelles. *Elsevier Masson*. 316-318.
- 35- Djennane F, Mohammedi D, Tiouit D, Touati D. et Rahal K.** (2009). Examen Cytobactériologique des Urines. Techniques Microbiologiques. *Institut Pasteur d'Algérie*. 76 p.
- 36- Didier R.** (1998). Dictionnaire de maladies infectieuses diagnostic-épidémiologie-répartition géographique-taxonomie-symptomatologie. Editions scientifiques et médicales, Elsevier Masson, Paris. 1162.
- 37- Doi Y, Wachino JI, Ishiguro M, Kurokawa H, Yamane K, Shibata N, Shibayama K, Yokoyama K, Kato H, Yagi T, Arakawa Y.** (2004). Inhibitor sensitive AmpC $\beta$ -lactamase variant produced by an *Escherichia coli* clinical isolate resistant to oxyiminocephalosporins and cephamycins. *Antimicrob Agents Chemother.* 48 : 2652-2658.
- 38- Duval V, Maiga I, Maiga A, Guillard T, Brasme L, Forte D, Madoux J, Vernet-Garnier V, and De Champs C.** (2009). High prevalence of CTX-M-type beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Bamako, Mali. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(11) : 4957-4958.

**E**

- 39- Essack SY.** (2001). The development of beta-lactam antibiotics in response to the evolution of beta-lactamases. *Pharm Res.* 18 : 1391-1399.

**40- Euzeby J.P.** (2010). Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale à l'usage des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Le texte original est librement disponible sur: <http://www.bacteriologie.net/generale/resistancenaturelle.html>.

**41- Eyquem A, Alouf J, Montagnier JL.** (2000). Traité de microbiologie clinique : deuxièmes mises à jour et compléments. PICCIN. 238 p.

## **F**

**42- Fagon JY, Chastre J, Vuagnat A, et al.** (1996). Nosocomial pneumonia and mortality among patients in intensive care units. *JAMA*. 275 : 866-900.

**43- Fauchère JL.** (1997). Bactériofiches. Techniques en Bactériologie Clinique. Edition Ellipses. 174 p.

**44- Fauchère J.L. et Avril J.L.** (2002). Bactériologie générale et médicale. Ellipses.

**45- Feizabadi MM, Mahamadi-Yeganeh S, Mirsalehian A, Mirafshar SM, Mahboobi M, Nili F, and Yadegarinia D.** (2010). Genetic characterization of ESBL producing strains of *Klebsiella pneumoniae* from Tehran hospitals. *J Infect Dev Ctries*. 4 : 609-615.

## **G**

**46- Galleni M, Lamotte-Brasseur J, Rossolini GM, Spencer J, Dideberg O, Frère JM.** (2001). The metallo-  $\beta$ -lactamase working group. Standard numbering scheme for class B  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother*. 45 : 660-663.

**47- GangouéPiéboji J.** (2000). Résistance des bacilles à Gram négatif aux antibiotiques : prévalence et caractérisation des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi à l'Hôpital Central de Yaoundé. Thèse de Doctorat de 3e cycle, Université de Yaoundé I. 210 p.

**48- Gangoué-Piéboji J.** (2007). Caractérisation des bêta-lactamases et leur inhibition par les extraits de plantes médicinales. Thèse de doctorat en sciences : Biochimie, Université de Liège. 104 p.

**49- Gautier V.** (2007). Caractérisation et expression des gènes codant pour les  $\beta$ -lactamases chromosomiques au sein des entérobactéries de l'environnement. Ecole pratique des hautes études Sciences de la Vie et de la Terre. Mémoire Pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes.

- 50- Giamarellou H., Antoniadou A. et Kanellakopoulou K.** (2008). *Acinetobacterbaumannii*: a universal threat to public health. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 32 :106-119.
- 51- Gillespie SH et Hawkey PM.** (2006). Principles and Practice of Clinical Bacteriology. Edition wiley. 2eme Edition, London. 604 p.
- 52- Gniadkowski, M.** (2001). Evolution and epidemiology of extended spectrum beta lactamases and ESBL producing micro-organisms. *Clin. microbial infect.* 7 : 557 -608.
- 53- Goubau P et Pellegrims E.** (2000). Repères en microbiologie. *Garant*, 3 : 116-117.
- 54- Granier F et Denis F.** (2007). Hemoculture. In : **Denis F, Ploy MC, Martin C, Bingen E et Quentin R.** Bactériologie médicale : Techniques usuelles. Ed Elsevier Masson, Paris. :107-115.
- 55- Gueye O.** (2007). Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles à Gram négatif. Thèse doctorat. Université cheikh Anta Diop de Daka. 120 p.

## H

- 56- Hammond DS, Schooneveldt JM, Nimmo GR, Huygens F, Giffard PM.** (2005). *blaSHV* genes in *Klebsiella pneumoniae*: different allele distributions are associated with different promoters within individual isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 49 : 256-263.
- 57- Hounton NW.** (2000). Sensibilité des germes aux antibiotiques dans les infections urinaires de l'enfant à Cotonou (à propos de 213 souches bactériennes) Thèse de Med. 30 p.

## J

- 58- Jacoby GA, et Munoz-Price LS.** (2005). The New  $\beta$ -Lactamases. *The new England journal of medicine.* 352 : 380-391.
- 59- Joly B. et Reynaud A.** (2007). Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic. *Edition Techniques et Documentation*, Paris.182 p.

## L

- 60- Lamnaouer D.** (2002). Détermination des propriétés biologiques (activités pharmacologiques et toxicologiques) des plantes médicinales et aromatiques du PNT. Programme de l'UICN en Afrique du Nord : Phase III. Etat d'avancement. 3-7 p.
- 61- Larabi.K.** (2001). Epidémiologie des infections urinaires dans la région de Menzel Bourguiba à propos de 933 cas. *La Tunisie médicale.* 79 : 242-246.



- 62- Leclerc H, Gaillard JP, Simonet M.** (1995). Microbiologie générale : la bactérie et le monde bactérien. Edition Doin, Paris. 535 p.
- 63- Leclerc H.** (1981). Microbiologie générale. DOIN.184 – 209 p.
- 64- Le Minor L and Véron M.** (1989). Bactériologie médicale. 2<sup>ème</sup> édition. Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 2 : 428-432.
- 65- Liassine N.** (2000). Problème des pathogènes à Gram négatif résistants aux antibiotiques en milieu hospitalier. *Schweiz Med Wochenschr.* 130: 1930-1936.
- 66- Livermore DM.** (1995).  $\beta$ -lactamase mediated resistance: past, present and future. *J Infect Dis Soc.* 6: 75-83.
- 67- Livermore D. M.** (1995).  $\beta$ -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews.* 8: 557-584.

## M

- 68- Mahrouki S, Ben-Achour N, Chouchani C, Ben-Moussa M, et Belhadj O.** (2009). Identification of plasmid-encoded extended spectrum  $\beta$ -lactamases produced by a clinical strain of *Proteus mirabilis*. *Pathologie Biologie.* 57 : 55-59.
- 69- Marc V, Anne-Lise BG, Hervé B, Robin D, André P.** (1999). Microbiologie et pathologie infectieuse. 2<sup>ème</sup> édition américaine de Boeck université. 973 p.
- 70- Martin C.** (2007). Bacilles à Gram négatif non fermentaires. In : **Denis F, Ploy MC, Martin C, Bingen E et Quentin R.** Bactériologie médicale : Techniques usuelles. *Ed Elsevier Masson,* Paris. 330-343.
- 71- Matthew P, Muller MD.** (2004). Résistance des bactéries Gram-négatif due aux bêtalactamases. *Maladies infectieuses et Microbiologie.* 3 (6) : 15-23.
- 72- Maza ML, Pezzlo TT, Peterson ME, Shigei TJ.** (2004). Color Atlas of Medical Bacteriology. ASM Press, Washington. 316 p.
- 73- Materon IC, Beharry Z, Huang W, Perez C. et Palzkill T.** (2004). Analysis of the context dependent sequence requirements of active site residues in the metallo- $\beta$ -lactamase IMP-1. *J. Mol. Biol.* 344: 653-663.

**74- Mc Gowan J-E.** (2006). Resistance in non fermenting Gram-negative bacteria. Multidrug resistance to maximum. *The American Journal of Medicine*. 119: 29-36.

**75- Moulin MA. Coquerel.** (2002). Pharmacologie. Masson, Paris. 592 p.

## N

**76- Nedjai S, Barguigua A, Djahmi N, Jamali L, Zerouali K, Dekhil M, and Timinouni M.** (2012). Prevalence and characterization of extended spectrum beta-lactamases in *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group bacteria. in Algeria. *Med. Mal Infect*. 42 : 20-29.

**77- Nordmann P. et Poirel L.** (2002). Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect*. 08 : 321-31.

## P

**78- Paterson DL, Bonomo RA.** (2005). Extended-spectrum beta-lactamases. A clinical update. *Clin Microbiol Rev*. 18 : 657-86.

**79- Péan Y, Goldstein FW et De Bels F.** (2001). Évolution de la sensibilité et épidémiologie de la résistance des entérobactéries de ville au cours des enquêtes Vigil'Roc. *Méd Mal Infect*. 31 : 609-21.

**80- Peleg AY, Hooper DC.** (2010) Hospital-acquired infections due to Gram-negative bacteria. *The New England Journal of Medicine*. 362 (19) : 1804-1813.

**81- Pelmont J.** (2005). Biodégradations et métabolismes. les bactéries pour les technologies de l'environnement. *Collection Grenoble sciences*. L'Editeur. EDP Sciences. 124-125 p.

**82- Philippon A, Labia R, Jacoby JA.** (1989). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 33 : 1131-1136.

**83- Philippon A, Arlet G, Jacoby GA.** (2002). Plasmid-determined AmpC-type  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother*. 46 : 1-11.

**84- Philippon A.** (2005).  $\beta$ -lactamases: généralités. Université Paris V - Faculté de Médecine Descartes, Service de Bactériologie - 75014 PARIS. Sur le lien : [www.microbesedu.org/mecanisme/bla/generalites.html](http://www.microbesedu.org/mecanisme/bla/generalites.html) - 63k.

**85- Philippon A, et Arlet G.** (2006).  $\beta$ -lactamases de bacilles à Gram négative : le mouvement perpétuel. *Ann Biol Clin*. 64 (1) : 37-51.

**86- Poole K.** (2004). Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 61 : 2200-2223.

**87- Podie magne N. Karelle.** Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques des germes les plus fréquemment isolés au laboratoire de bactériologie du CNHU de Cotonou (à propos de 896 souches bactériennes isolées du 1<sup>er</sup> Mars au 30 Juin 1 999). Thèse de Med 1999. 853, 145.

## **R**

**88- Rahal K.** (1999). Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale selon les recommandations de l'O.M.S., I.N.S.P, Algérie.

**89- Rahal K.** (2005). Standardisation de l'antibiogramme en Médecine Humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'O.M.S. 4ème édition. 95 p.

**90- Rahal K.** (2011). Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale selon les recommandations de l'O.M.S., I.N.S.P, Algérie. 192 p.

**91- Rampal P.** (2000). Colites infectieuses de l'adulte, Edition John Libbey Eurotext, Paris. 309 p.

**92- Résistance aux antibiotiques :** <http://anne.decoستر.free.fr/atb/resab.htm>, du 27/12/03.

**93- Rodriguez-Villalobos H. et Struelens MJ.** (2006). Résistance bactérienne par  $\beta$ -lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimateur. *Réanimation*, 15: 205-213.

**94- Rockstroh T.** (1977). Changes in the nomenclature of bacteria after the 8th edition of Bergey's Manual of the Determinative Bacteriology. *Z Arztl Fortbild (Jena)*. 71: 545-50.

**95- Rubin, MA, and Samore MH.** (2002). Antimicrobial Use and Resistance. *Curr Infect Dis*. 4 : 491-497.

**96- Robin F, Gibold L, and Bonnet R.** (2012). Résistances naturelles et acquises aux  $\beta$ -lactamines chez les entérobactéries : comment les identifier en pratique quotidienne *Revue Francophone des laboratoires*. 445 : 47-58.

**97- Rupé E.** (2010). Epidemiology of expanded-spectrum beta-lactamases: The rise of CTX-M. *Antibiotics Journal*. 12: 3-16.

## **S**

**98- Schwaber MJ and Carmeli Y.** (2007). Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae* bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *J.Antimicrob.Chemother*. 60 : 913- 920 .

**99- Sekhsokh Y, Chadli M et El Hamzaoui SA.** (2008). Fréquence et sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées dans les urines. *Médecines et maladies infectieuses*. 38: 324-327.

**100- Severin JA, Mertaniasih NM, Kuntaman K, Lestari ES, Purwanta M, Lemmens-Den Toom N, Duerink DO, Hadi U, Van Belkum A, Verbrugh HA and Goessens WH.** (2010). Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases in clinical *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* isolates from Surabaya, Indonesia. *J Antimicrob Chemother*. 65(3): 465-469.

**101- Shah AA, Hasan F, Ahmed S. et Abdul H.** (2004). Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended spectrum  $\beta$ -lactamases. Microbiology Research Laboratory. Department of Biological Sciences. Quaid-i-Azam University. Islamabad. Pakistan. *Research in Microbiology*. 155 : 409–421.

### **T**

**102- Touati A, Benallaoua S, Forte D, Madoux J, Brasme L et De Champs C.** (2006). First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 beta  $\beta$ -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Bejaia, Algeria. *Antimicrobial Agents Journal*. 27 : 397-402.

**103- Touati A, Medboua C, Touati D, Denine R, Brasme L, and de Champs C.** (2012). CTXM- 15- producing *Enterobacteriaceae* isolates causing bloodstream infections at the Beni-Messous hospital in Algeirs (Algeria). *Int Res J Microbiol*. 3 : 181-185 .

**104- Touati A, Zenati K, Brasme L, Benallaoua S.** (2010). de Champs C. Extended-spectrum  $\beta$ - lactamase characterisation and heavy metal resistance of *Enterobacteriaceae* strains isolated from hospital environmental surfaces. *Journal of Hospital Infection* .75(1) : 78-79.

### **V**

**105- Vedel G.** (1998). Lecture interprétative de l'antibiogramme (interprétation phénotypique). In outil d'investigation microbiologique en réanimation. Edition Arnette. 183-188 p.

**106- Vidon O et Bourdin C.** (2005).  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE). Intérêt porté aux CTX-M. sur le lien : [umr5558-mq1.univlyon1. fr/.../Béta Lactamases Spectre Etendu ?](http://umr5558-mq1.univlyon1.fr/.../Béta Lactamases Spectre Etendu ?)

### **Z**

**107- Zomahoun C. I. N. P.** (2004). Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées des infections urinaires au laboratoire de bactériologie du

centre national hospitalier universitaire – HUBERT KOUTOUKOU MAGA  
(C.N.H.U.-H.K.M.) DE COTONOU. Faculté de médecine de pharmacie et  
d’odontostomatologie.

# **ANNEXES**

## **ANNEXES**

### **Les Milieux de culture utilisés**

#### **1) Bouillon nutritif :**

##### **a) Composition :**

- Tryptone 10g ;
- Extrait de viande 5g ;
- Chlorure de sodium 5g ;
- pH 7,2 ;

##### **b) Préparation :**

- 25 par litre. Autoclaver 20 minutes à 120°C.

#### **2) Gélose nutritive :**

##### **a) Composition :**

- Extrait de viande 1g ;
- Extrait de levure 2.5g ;
- Peptone 5,0g ;
- Chlorure de sodium 5,0g ;
- Agar 15g ;
- pH 7 ;

##### **b) Préparation :**

- 28 g par litre. Chauffer lentement jusqu'à dissolution, ajuster si nécessaire le pH, répartir, autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.

#### **3) Gélose Mac Conkey :**

##### **a) Composition :**

- Peptone de caséine 7g ;
- Peptone de viande 3g ;
- Lactose 10g ;
- Mélange de sels biliaires 1.5g ;

- Chlorure de sodium 5.0 ;
- Rouge neutre 0.03g ;
- Cristal violet 0.001 g ;
- Agar agar 13.5g ;

**b) Préparation :**

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

**4) Gélose Mueller-Hinton:**

**a) Composition :**

- Infusion de viande de bœuf 300g ;
- Hydrolysate de caséine 17.5g ;
- Amidon 1.5g ;
- Gélose 17g pH final 7,4 ;

**b) Préparation :**

- Porter à l'ébullition 38 g par litre d'eau distillée, puis répartir dans des flacons, stériliser à l'autoclave (120 °C pendant 15 mn).



## Les réactifs utilisés

### 2) Réactif de Kovacs :

- P-diméthyl aminobenzaldéhyde 7 g ;
- Alcool amylique 75 ml ;
- Acide chlorhydrique concentré 20 ml ;

### 3) Réactifs de Voges-Proskauer (VP) :

#### VP I :

- Hydroxyde de potassium 40 g ;
- Eau 100 ml ;

#### VP II :

- $\alpha$ -naphtol 6 g ;
- Ethanol 100 ml ;

### 4) Réactif de la recherche de la tryptophane désaminase (TDA) :

- Perchlorure de fer 3,4 g ;
- Eau distillée stérile 100 ml ;

### 5) Réactifs pour la recherche de la nitrate réductase (NR) :

#### Réactif NR 01 :

- Acide sulfamilique 0,8 g ;
- Acide acétique 5N 100 ml ;

#### Réactif NR 02 :

- Naphtylamine 0,5 g ;
- Acide acétique 5N 100 ml ;

## Les colorants utilisés

### a) Violet de gentiane au cristal :

- Violet de gentiane 10g(ou 5g) ;
- Phénol 20g ;
- Ethanol à 0.95 100 cm<sup>3</sup> ;
- Eau distillée 01 dm<sup>3</sup> ;

### b) Lugol :

- Iode 05g ;
- Iodure de potassium 10g ;
- Eau distillée 01g ;
- Flacon brun ;

### c) Fuchsine de Ziehl :

- Fuchsine basique 10g ;
- Phénol 50g ;
- Ethanol à 0.5 10cm<sup>3</sup> ;
- Eau distillée 1dm<sup>3</sup> ;

Tableau 08 : Lecture de la galerie miniaturisée Api 20E.

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	Ortho-nitro-phenyl-Galactosidase	Beta- galactosidase	Incolore	Jaune
ADH	L-arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orangé
LDC	L-lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orangé
ODC	L-ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orangé
CIT	Citrate de sodium	Utilisation du citrate	Vert pâle/jaune	Bleu-vert/vert
H <sub>2</sub> S	Thiosulfate de sodium	Production d'H <sub>2</sub> S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/fin liseré
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orangé
TDA	L-tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA / immédiat	
			Jaune	Marron foncé
IND	L-tryptophane	Production d'indole	James/ 2 mn	
			Jaune	Anneau rouge
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VP 1 + VP 2/ 10mn	
			Incolore	Rosé-rouge
GEL	Gélatine de kohn	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MAN	D-mannitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SOR	D-sorbitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
RHA	L-rhamnose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SAC	D-saccharose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MEL	D-melibiose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
ARA	L-arabinose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
Nitrate réductase Tube GLU	Potassium nitrate	Production de NO <sub>2</sub> Réduction au stade N <sub>2</sub>	NIT1 + NIT2 / 2-3 mn	
			Jaune	Rouge
			Zinc / 5mn	
			Rouge/orangé	Jaune

**ONPG** : orthonitrophényl-bêta-D-galactopyranoside ; **ADH** : arginine dihydrolase ; **VP** : Réaction de Voges-Proskauer ; **LDC** : lysine décarboxylase ; **ODC** : ornithine décarboxylase ; **CIT** : Utilisation du citrate ; **H<sub>2</sub>S** : recherche d'une thiosulfate réductase ; **URE** : Hydrolyse de l'urée (uréase) ; **TDA** : recherche d'une Tryptophane désaminase ; **IND** : production d'indole ; **GEL** : recherche du gélatinase ; **GLU** : recherche de l'acidification de neuf (glucose) ; **MAN** : mannitol ; **INO** : inositol ; **SOR** : D-sorbitol ; **RHA** : rhamnose ; **SAC** : D-saccharose ; **MEL** : melibiose ; **AMY** : amygdaline ; **ARA** : arabinose.

Tableau 09 : la sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries isolées.

Les Souches	Code des souche	AUG	β-lactamines						aminosides			quinolones		autres	
			CN	CX	CTX	AT	IPM	TI	GM	AK	TOB	NA	OFX	F	FO
<i>Escherichia coli</i>	E 01	R	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	S	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	E 02	R	R	I	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S
<i>Escherichia coli</i>	E 03	R	R	S	R	R	S	R	S	S	R	R	R	S	S
<i>Escherichia coli 01</i>	E 04	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S
<i>Escherichia coli</i>	E 05	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
<i>Escherichia coli 01</i>	E 06	R	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	E 07	R	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	E 08	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	R	S	S
<i>Enterobacter cloacae</i>	E 09	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S
<i>Serratia ficaria</i>	E 10	R	R	R	R	S	S	R	R	I	S	R	R	R	S
<i>Serratia odorifera</i>	E 11	R	S	S	S	R	I	R	R	S	I	S	S	S	S
<i>Enterobacter cloacae</i>	E 12	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S
<i>Enterobacter cloacae</i>	E 13	R	S	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>Klebsiella oxytoca</i>	E 14	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R	S	S
<i>Escherichia coli</i>	E 15	R	R	I	R	S	S	R	R	I	R	R	R	S	S
<i>Enterobacter cloacae</i>	E 16	R	S	I	R	S	R	R	S	S	S	R	R	S	S
<i>Escherichia coli</i>	E 17	R	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R
<i>Serratia marcescens</i>	E 18	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	S	I	R	S
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	E 19	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	I	S	S
<i>Serratia liquifaciens</i>	E 20	R	S	S	I	S	S	R	S	I	I	R	R	S	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	E 21	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>Enterobacter cloacae</i>	E 22	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S
<i>Serratia marcescens</i>	E 23	R	S	S	S	S	S	R	S	S	I	R	R	S	R
<i>Escherichia coli</i>	E 24	R	S	I	R	S	S	R	R	I	R	R	R	S	R
<i>Proteus vulgaris</i>	E 25	R	R	R	R	I	I	I	R	S	I	R	R	S	R
<i>Enterobacter cloacae</i>	E 26	R	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	E 27	R	R	I	R	I	S	R	S	S	I	R	R	S	S
<i>Escherichia coli</i>	E 28	R	S	S	I	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	E 29	S	S	S	S	S	S	R	S	R	I	R	R	S	S

S : sensible, R : résistant, I : intermédiaire

**Tableau 10** : résultat de teste double disque des souches Entérobactéries.

Souches	Code de la souche	Position des disques		interpretation
		01	02	
<i>Escherichia coli</i>	E 01	30	29	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	E 02	08	17	+
<i>Escherichia coli</i>	E 03	08	19	+
<i>Escherichia coli 01</i>	E 04	08	19	+
<i>Escherichia coli 01</i>	E 06	10	18	+
<i>Escherichia coli</i>	E 07	27	25	-
<i>Escherichia coli</i>	E 08	19	23	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	E 09	30	28	-
<i>Serratia ficaria</i>	E 10	20	20	-
<i>Serratia odorifera</i>	E 11	14	20	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	E 12	00	00	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	E 13	26	24	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	E 14	18	19	-
<i>Escherichia coli</i>	E 15	28	26	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	E 16	19	20	-
<i>Escherichia coli</i>	E 17	25	29	-
<i>Serratia marcescens</i>	E 18	14	15	-
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	E 19	14	16	-
<i>Serratia liquifaciens</i>	E 20	00	17	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	E 21	00	13	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	E 22	00	11	+
<i>Serratia marcescens</i>	E 23	16	20	-
<i>Escherichia coli</i>	E 24	15	18	-
<i>Proteus vulgaris</i>	E 25	13	14	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	E 26	00	10	+
<i>Escherichia coli</i>	E 27	15	15	-
<i>Escherichia coli</i>	E 28	20	30	+
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	E 29	19	30	+

- **Position 01** : antibiotique CTX stable

- **Position 02** : antibiotique AMC remplacer CTX

**Tableau 11** : résultat de teste double disque des souches *Pseudomonas aeruginosa*.

Souches	Nouveau code	Position des disques		Interpretation
		01	02	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P 01	0	0	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P 02	0	0	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P 03	0	0	-

- **Position 01** : disque CAZ

- **Position 02** : disque TTC remplacer par CAZ



Université Larbi Tébessi - Tébessa

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 : *Fares Nacer eddine*

Régulièrement inscrit(e) en Master au département : *Biologie Appliquée*

N° de carte d'étudiant : *4017971*

Année universitaire : *2017/2018*

Domaine : *sciences de la nature et de la vie*

Filière : *science Biologique*

Spécialité : *microbiologie Appliquée*

Intitulé du mémoire : *Caractérisation phénotypique de la résistance aux  $\beta$ -lactamines à large spectre des bacilles à Gram négatif.*

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.

Fait à Tébessa, le : .....

Signature de l'étudiant(e) :

2018 جوان

عبد الباقى

مدرسة تربية  
وإدارة







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 : Djeddai Samir  
Régulièrement inscrit(e) en **Master** au département : Biologie appliquée  
N° de carte d'étudiant : 3409464/2013  
Année universitaire : 2017/2018  
Domaine : des sciences de la nature et la vie  
Filière : sciences biologiques  
Spécialité : Microbiologie appliquée  
Intitulé du mémoire : caractérisation phénotypique de la résistance aux B-lactamines à large spectre des bacilles à Gram négatifs isolés à partir des produits pathologiques

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.

Fait à Tébessa, le : .....

Signature de l'étudiant(e) :

Signature  
2018 جوان 10  
سرفه نجاه  
ون إداري