

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf : ...../UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2019

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**  
**EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER**

**Domaine : SNV      Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Microbiologie appliquée**

**Présenté par : AHMANACHE Sonia & KACI Ouahiba**

***Thème***

***Etude de la résistance des bacilles à Gram négatif aux  $\beta$ -lactamines  
à partir de divers prélèvements pathologiques***

**Soutenu le : 07 / 07 / 2019**

**Devant le jury composé de :**

<b>Mme. HAMID. S</b>	<b>M.C.B</b>	<b>Université de Bouira</b>	<b>Présidente</b>
<b>Mme. SAIT-DIB. S</b>	<b>M.C.B</b>	<b>Université de Bouira</b>	<b>Promotrice</b>
<b>Mme. GUELLAL. D</b>	<b>M.A.B</b>	<b>Université de Bouira</b>	<b>Examinatrice</b>

**Année Universitaire : 2018/2019**

## Remerciements

*Nous remercions tout d'abord notre Bon Dieu ALLAH le tout puissant de nous avoir donné la force, le courage et la patience pour mener à terme ce travail.*

*Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au sein du Laboratoire d'analyses Médicales Dr Salemi Epouse Si Larbi.*

*Nous remercions chaleureusement notre promotrice Mme Sait Dib Sabrina d'avoir accepté de nous encadrer, sa disponibilité, son aide précieuse, sa patience, sa gentillesse et surtout sa confiance ainsi que sa rigueur scientifique au quotidien durant ces années.*

*Nos vifs remerciements s'adressent aussi à Mme Hamid Sonia qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury de ce mémoire.*

*Nos vifs remerciements s'adressent aussi à Mm Guellal Drifa d'avoir accepté l'invitation comme examinatrice de ce mémoire.*

*Nos remerciements vont aussi au Dr Salemi Souad pour nous avoir accueillies, pour son assistance bien matérielle que morale, pour son aide et son soutien. Merci pour sa collaboration sans laquelle ce travail n'aurait pu être réalisé.*

*Nos vifs remerciements à Mme Chaouche hakima de nous avoir guidé et orienté dans l'interprétation des résultats de cette étude, pour sa disponibilité sans limite et pour ses précieux conseils.*

*Un grand Merci à L'équipe du laboratoire qui a contribué de près ou de loin au bon déroulement de ce travail.*

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

*Dédicace*

*En ce moment particulier dans ma vie, je tiens à dédier ce modeste*

*Travail :*

*A la mémoire de mon très cher papa qui est décédé à la fleur d'âge que j'aimerais pour toujours que dieu l'accueille dans son vaste paradis, et à mon grand père paternel AHMANACHE Youcef chahid de guerre national décédé le 08/04/1958.*

*A ma chère maman,*

*Symbole de reconnaissance et de remerciement sur tout ce qu'elle m'a donné dans ma vie.*

*A mon unique cher frère Ahcène:*

*Aucun mot ne saurait exprimer mes sentiments les plus profonds envers toi. Tes sacrifices, ton soutien moral et matériel, ta gentillesse sans égale, ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études.*

*A mon oncle paternel Ahmanache Tahar et sa femme ainsi que ses enfants Houria, Sihem , Mourad, Abdelmalek, Adel, Samia et Smail.*

*À mes grands-parents maternels et leurs enfants.*

*A mon fiancé pour son affection, Ces sacrifices consentis tout au long de ce travail et pour son soutien sans faille.*

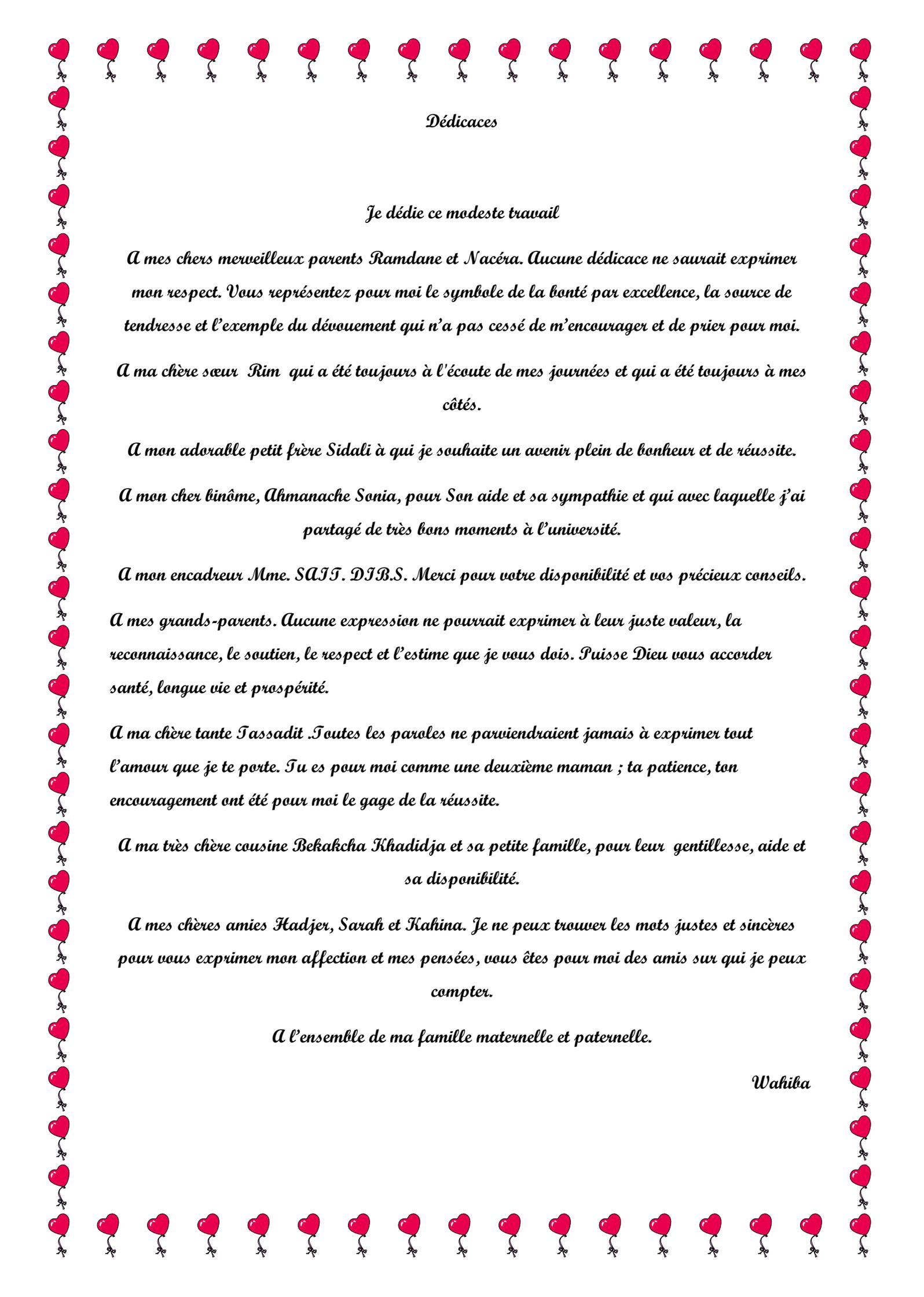
*A Monsieur AGGAD Ahmed et ses enfants Alderahmane, Mohamed, Leila, Messaoud et Souhila.*

*A ma promotrice la plus adorable et la plus gentille.*

*A mon binôme Ouahiba ainsi que sa famille.*

*A Toutes mes amies en particulier Sihem, Baya, Salima, Hamida .*

*Sonia*



*Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail*

*A mes chers merveilleux parents Ramdane et Nacéra. Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect. Vous représentez pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.*

*A ma chère sœur Rim qui a été toujours à l'écoute de mes journées et qui a été toujours à mes côtés.*

*A mon adorable petit frère Sidali à qui je souhaite un avenir plein de bonheur et de réussite.*

*A mon cher binôme, Ahmanache Sonia, pour Son aide et sa sympathie et qui avec laquelle j'ai partagé de très bons moments à l'université.*

*A mon encadreur Mme. SAJJ. DJB.S. Merci pour votre disponibilité et vos précieux conseils.*

*A mes grands-parents. Aucune expression ne pourrait exprimer à leur juste valeur, la reconnaissance, le soutien, le respect et l'estime que je vous dois. Puisse Dieu vous accorder santé, longue vie et prospérité.*

*A ma chère tante Fassadit .Toutes les paroles ne parviendraient jamais à exprimer tout l'amour que je te porte. Tu es pour moi comme une deuxième maman ; ta patience, ton encouragement ont été pour moi le gage de la réussite.*

*A ma très chère cousine Bekakcha Khadidja et sa petite famille, pour leur gentillesse, aide et sa disponibilité.*

*A mes chères amies Hadjer, Sarah et Kahina. Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des amis sur qui je peux compter.*

*A l'ensemble de ma famille maternelle et paternelle.*

*Wahiba*

## Sommaire

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
<b>Introduction</b> .....	1
<b><i>Chapitre I : Généralités sur les Beta- lactamines</i></b>	
I.1. Définition des antibiotiques.....	3
I.2. Classification des antibiotiques .....	3
I.3. Mode d'action des antibiotiques.....	3
I.4. Mécanisme de résistance aux antibiotiques.....	4
I.4.1. Mécanismes génétiques.....	4
I.4.2. Mécanismes biochimiques.....	5
I.5. Les $\beta$ - lactamines.....	5
I.5.1. Définition des $\beta$ – lactamines.....	5
I.5.2. Mécanismes d'action des $\beta$ -lactamines.....	6
I.5.3. Classification des $\beta$ -lactamines .....	6
I.5.4. Les types de résistance aux $\beta$ -lactamines.....	8
I.5.5. Mécanisme de résistance aux $\beta$ lactamines .....	9
I.6. Les $\beta$ - lactamases .....	11
VI.1. Classification des $\beta$ -lactamases.....	11
<b><i>Chapitre II : Les bacilles à Gram négatifs</i></b>	
II.1. Les entérobactéries.....	15
II.2. Identification des entérobactéries.....	16
II.3. Les caractères cultureux .....	16
II.4. Les caractères antigéniques .....	16
II.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	18
<b><i>Chapitre III : matériel et méthodes</i></b>	
III.1. Cadre de l'étude .....	20
III.2. Présentation de lieu d'étude .....	20
III.3. Matériel biologique.....	21
III.4. Nature de prélèvement récupéré .....	21
III.5. Techniques de prélèvements.....	21

III.5.1. Prélèvement d'urine.....	21
III.5.2. Prélèvement de pus.....	22
III.5.3. Prélèvement des selles.....	22
III.5.4. Prélèvement des liquides de ponction.....	23
III.6. Méthodologie de diagnostic.....	23
III.6.1. Les urines.....	23
III.6.1.1. Etude cyto bactériologique des urines.....	23
III.6.1.2. Chimie des urines.....	24
III.6.2. Coproculture.....	25
III.6.3. Etude cyto bactériologique de pus.....	25
III.6.4. Etude cyto bactériologiques des liquide de ponction.....	26
III.7. Identification.....	26
III.8. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques.....	28
III.9. Détection des phénotypes de résistance.....	30
III.9.2. Test de confirmation.....	31

## ***IV. Résultats et discussion***

IV.1. L'objectif de l'étude.....	32
IV.2. Caractéristiques des souches isolées.....	32
IV.2.1. Isolement et identification des souches.....	32
IV.2.2. Répartition des souches par espèce bactérien.....	32
IV.2.3. Répartition des souches selon la nature de prélèvement.....	33
IV.2.4. Répartition des souches par sexe.....	34
IV.2.5. Répartition des souches par selon âge.....	34
IV.3. Détermination du profil d'antibiorésistance.....	35
IV.4. Résistance des souches aux céphalosporine de troisième génération(CTX).....	35
IV.5. Etude de la résistance des bacilles à Gram négatif aux différentes classes de $\beta$ -lactamine.....	37
<b>Conclusion</b> .....	46

### **Références bibliographiques**

### **Annexes**

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau I :</b> Mécanisme d'action des principaux agents antimicrobiens.....	04
<b>Tableau II :</b> Les différents mécanismes de la résistance aux antibiotiques.....	05
<b>Tableau III:</b> Les $\beta$ -lactamines testés pour les entérobactéries.....	29
<b>Tableau IV:</b> Antibiotiques testés pour les souches de <i>Pseudomonas sp</i> .....	29
<b>Tableau V :</b> Répartition des souches par sexe.....	34
<b>Tableau VI :</b> Répartition des souches selon l'âge des patients.....	36

## *Liste des figures*

<b>Figure 01:</b> Structure générale des $\beta$ -lactamines.....	06
<b>Figure 02 :</b> Comparatif pénicillines et monobactames.....	08
<b>Figure 03 :</b> Structures générales des bêta-lactamines.....	08
<b>Figure 04 :</b> Structure des systèmes d'efflux actif.....	10
<b>Figure 05 :</b> Réaction d'inactivation d'une b lactamine par l'action d'une b lactamase.....	11
<b>Figure 06 :</b> Les bacilles à Gram négatif observés au microscope optique (Gx100).....	15
<b>Figure 07 :</b> Les bandelettes urinaires.....	24
<b>Figure 08:</b> Schémas d'isolement à partir des selles.....	25
<b>Figure 09 :</b> Galerie api 10S avant utilisation.....	27
<b>Figure 10 :</b> Galerie api 10S après utilisation.....	27
<b>Figure 11 :</b> Le DD test.....	30
<b>Figure 12:</b> Répartition des souches par groupe bactérien.....	32
<b>Figure 13 :</b> Répartition des souches par espèce bactérien.....	33
<b>Figure 14:</b> Répartition des souches par nature de prélèvements.....	33
<b>Figure 15:</b> Répartition des souches par catégories d'âge.....	34
<b>Figure 16:</b> L'antibiogramme d' <i>Esherichia.coli</i> .....	35
<b>Figure 17:</b> Répartition d ' <i>E.coli</i> , <i>Enterobacter sp</i> et <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	36
<b>Figure 18 :</b> Répartition des souches résistantes aux CTX selon les types de prélèvements..	36
<b>Figure 19:</b> Répartition des souches résistante au Céfotaxime selon le sexe de patient.....	37
<b>Figure 20 :</b> Taux de résistance vis-à-vis des $\beta$ -lactamines.....	38
<b>Figure 21:</b> Image de synergie positive sur gélose Mueller Hinton chez la souche 3260 ( <i>Escherichia coli</i> productrice d'une BLSE).....	39
<b>Figure 22:</b> Image de synergie positive sur gélose Mueller Hinton chez la souche 2191 ( <i>Enterobacter sp</i> productrice d'une BLSE).....	39
<b>Figure 24:</b> Image de synergie négative sur gélose Mueller Hinton	
<b>Figure 23 :</b> Image de synergie négative sur gélose Mueller Hinton chez la souche ( <i>Esherichia coli</i> non productrice d'une BLSE).....	40
chez la souche 53 ( <i>Escherichia coli</i> non productrice d'une BLSE).....	40
<b>Figure 25 :</b> Double disque positif.....	41
<b>Figure 26 :</b> Double disque négatif.....	41

## *Liste des abréviations*

**AMC** : Amoxicilline /Acide clavulanique

**ABC**: ATP-Binding Cassette

**ACT**: AmpC type

**AmpC**: Chromosomal located céphalosporinase

**BES**: Brazilian extended-spectrum  $\beta$ -lactamase

**BGT**: Bouillon Glucosé Tamponné

**BLSE**:  $\beta$ -lactames à spectre étendu

**CA-SFM** : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

**C1G** : Céphalosporine de 1ère génération

**C2G** : Céphalosporine de 2ème génération

**C3G** : Céphalosporine de 3ème génération

**C4G** : Céphalosporine de 4ème génération.

**CLSI**: Clinical and Laboratory Standards Institute

**CMY**: Active on cephamycins

**CTX-M**: Cefotaximase, first isolated at Munich

**DD-test**: Double disc test

**ECBU**: Etude cyto bactériologique des Urines

**LCR**: Liquide Céphalo Rachidien

**FOX**: Active on cefoxitin

**GES**: Guiana extended spectrum  $\beta$ -lactamase

**IMP:** Imipenemase

**IU:** Infection Urinaire

**MATE:** Multidrug and Toxic-compound Extrusion

**MFS:** Major Facilitator Superfamily

**OMS:** Organisation mondiale de la santé

**OXA:** Oxacillinase

**PCR:** Polymérase Chain Reaction

**PER:** Pseudomonas extended resistance

**PLP:** Protéine de liaison aux pénicillines

**RND:** Resistance-Nodulation-cell Division

**SFO:** *Serratia fonticola*

**SHV:** Sulfhydryl variable

**SMR:** Small Multidrug Resistance

**TDA :** Tryptophane désaminase

**TEM:** Temoniera

**TLA:** Tlahuicas

**TSI:** Tri Sugar Iron

**UFC:** Unité Formant colonie

**VEB:** Vietnam Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase

**VIH:** Virus of Humain Immunity

# *INTRODUCTION*

## **Introduction**

La découverte des antibiotiques a fait naître l'espoir qu'il serait un jour possible de juguler l'ensemble des maladies infectieuses. Le phénomène de résistance bactérienne aux antibiotiques a mis fin à cette "fatale illusion" (**Mangin, 2016**). L'utilisation massive et parfois abusive des antibiotiques, en ville comme l'hôpital, a modifié considérablement l'écologie microbienne et tend à augmenter le taux de bactéries résistantes (**Faure, 2009**).

Les bactéries pathogènes, grâce à leur flexibilité et plasticité génétique, sont capables de mettre en place un programme de résistance spécifique contre un antibiotique particulier. En effet, certaines souches arrivent à rétablir une multirésistance vis-à-vis de plusieurs antibiotiques à la fois donnant lieu à ce qu'on appelle les bactéries multirésistantes aux antibiotiques (multidrug resistant ou MDR) (**Bouyahya, 2017**).

Les entérobactéries sont parmi les souches les plus fréquemment isolées. Elles sont souvent responsables d'infections urinaires, pulmonaires, de septicémies mais également d'autres infections intra-abdominales. *E. coli* est également une cause fréquente d'infections urinaires acquises en milieu communautaire (**Gharout-Sait, 2016**).

Les  $\beta$ -lactamines demeurent les antibiotiques les plus utilisés dans la pratique clinique courante. Cette large utilisation est principalement liée à leur faible toxicité, à leur pouvoir bactéricide et à la diversité des molécules (**Cavallo et al., 2004**).

Chez les bacilles à Gram négatif, la résistance à ces molécules a évolué et est liée principalement à des systèmes d'efflux, à l'imperméabilité membranaire et à la production de  $\beta$ -lactamases (**Bonnet, 2006**).

La description de la première  $\beta$ -lactamase plasmidique date de 1942 chez une souche de *Staphylococcus aureus* résistante à la pénicilline. En 1963, une autre  $\beta$ -lactamase plasmidique a été décrite chez une souche d'*E. coli* (TEM-1). L'introduction en pratique clinique des céphalosporines de troisième génération (C3G) stables à l'hydrolyse par les pénicillinases au début des années 1980, a été suivie, dès 1983, de la description de la première  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE) chez des souches de *Klebsiella pneumoniae* en Allemagne. Avant 2002, les BLSE de types TEM et SHV étaient majoritaires (**Gharout-Sait, 2016**). En quelques années, les  $\beta$ -lactamases ont évolué parallèlement à l'utilisation massive

des  $\beta$ -lactamines. On a constaté une rapide diversification accompagnée d'élargissement de leur spectre d'activité, et leur diffusion parmi de nombreuses espèces d'entérobactéries et de bacilles non fermentant comme *Pseudomonas spp* et *Acinetobacter spp* (**Rodriguez, 2006**).

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés aux bacilles à Gram négatif résistantes aux  $\beta$ -lactamine, collectées au niveau des laboratoires d'analyses médicales privés de la wilaya de Bouira. Ainsi, ce manuscrit s'articule autour de trois parties présentées comme suit :

- La première partie portera sur la revue de la littérature concernant les  $\beta$ -lactamines, le mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines et les bacilles à Gram négatifs.
- La deuxième partie présentera le matériel et les méthodes expérimentales utilisés.
- La troisième partie sera consacrée à la présentation de l'ensemble des résultats obtenus et aux discussions qui en découlent. Nous terminerons ce travail par une conclusion et des perspectives de recherche à venir.

# CHAPITRE I

*Généralités sur*

*les Beta*

*lactamines*

### I.1. Définition des antibiotiques

Sur base de l'étymologie du mot « antimicrobien (du grec *anti* : contre, *mikros* : petit et *bios* : vie), on définit un composé de ce type comme toute substance capable d'agir contre la vie des microorganismes (Muylaert et Mainil, 2012).

Un antibiotique est une substance antibactérienne d'origine microbienne ou synthétisée chimiquement, capable d'inhiber spécifiquement la croissance d'autres microorganismes par un mécanisme particulier jouant sur les mécanismes vitaux du germe. De plus, il existe des antibiotiques semi-synthétiques, qui sont en fait des antibiotiques naturels modifiés par l'addition de groupements chimiques dans le but de les rendre moins sensibles à l'inactivation par les micro-organismes (Avril et al., 2000). Pour qu'il soit actif, un antibiotique doit pénétrer dans la bactérie, sans être détruit ni modifié, se fixer sur une cible et perturber la physiologie bactérienne (Ogawara, 1981).

Les antibiotiques sont caractérisés par :

- Activité antibactérienne (spectre d'activité);
- Toxicité sélective (mode d'action);
- Activité en milieu organique (pharmacocinétique);
- Bonne absorption et diffusion dans l'organisme (Yala et al., 2001).

### I.2. Classification des antibiotiques

Les antibiotiques ont été regroupés en familles dont la distinction repose sur la structure chimique, le mode d'action, le spectre d'activité, c'est-à-dire l'ensemble des espèces microbiennes sensible à cette action (Michel, 1981). Il existe sept classes majeures d'antibiotiques bactériens utilisés en milieu clinique :

Les  $\beta$ -lactamines, les glycolipides, les aminoglycosides, les tétracyclines, les macrolides, les quinolones et les sulfonamides (Nukaga et al., 2003).

### I.3. Mode d'action des antibiotiques

Les mécanismes d'action des agents antimicrobiens se divisent en fonction de la cible de l'antibiotique. Ils agissent notamment en inhibant la synthèse de la paroi cellulaire (peptidoglycane ou membrane externe), des acides nucléiques, des protéines ou sur l'inhibition de voies métaboliques. Le Tableau I présente les principaux antibiotiques utilisés en fonction de leur mécanisme d'action. À ce jour, des milliers de molécules d'antibiotiques

naturelles ou synthétiques ont été développés. Toutefois, la toxicité de certaines molécules les empêche d'être utilisées en médecine humaine. En somme, une centaine d'antibiotiques sont administrés dans un contexte clinique afin de maîtriser les maladies infectieuses causées par des agents bactériens.

**Tableau I :** Le mécanisme d'action des principaux agents antimicrobiens. (Prescott et al., 2010).

Mécanisme d'action	Agents antimicrobiens
Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire	β- lactamines
	Vancomycines
	Ethionamides et isoniazides
Inhibition de la synthèse protéique	Aminoglycosides ou aminosides
	Tétracyclines
	Chloramphénicol
	Macrolides
Inhibition de la synthèse des acides nucléiques	Rifampicines
	Quinolones
Inhibition des voies métaboliques	Sulfamides
	Triméthoprimes

#### I.4. Mécanisme de résistance aux antibiotiques

##### I.4.1. Mécanismes génétiques

Le déterminisme génétique de la résistance, qu'elle soit naturelle ou acquise, est de mieux en mieux appréhendé grâce aux progrès des méthodes d'analyses moléculaires incluant le clonage de gènes, l'amplification génique (polymérase chaîne réaction PCR), le séquençage.

De manière schématique, les mécanismes génétiques sont de deux types : modification d'ADN chromosomique par mutation et transfert d'ADN plasmidique ou non, ces deux mécanismes peuvent survenir simultanément ou successivement. D'après certaines études, ces différents mécanismes de résistance posent un vrai problème de résistance d'entérobactéries vis-à-vis des antibiotiques, ce qui limite le nombre d'antibiotique utilisés dans le traitement des infections causées par ces agents. Parmi ces molécules on cite la fosfomycine et la nitrofurantoïne (Brahimi, 2013).

### I.4.2. Mécanismes biochimiques

Quatre mécanismes principaux sont responsables de la résistance aux antibiotiques (Tableau II).

**Tableau II** : Les différents mécanismes de la résistance aux antibiotiques (**Carle, 2009**).

Mécanisme de résistance	Conséquence
Modification de la cible	Baisse de l'affinité de l'antibiotique pour son site d'action
Diminution de la concentration intracellulaire en antibiotique	Changement de la perméabilité de la paroi de la membrane bactérienne empêchant le médicament d'atteindre sa cible
Pompes d'efflux	Antibiotique éjecté de la cellule par transport actif et site d'action devenant inaccessible
Inactivation enzymatique de l'antibiotique	Production d'une enzyme qui inactive ou détruit l'antibiotique : Mécanisme de résistance le plus répandu

### I.5. Les $\beta$ -lactamines

#### I.5.1. Définition des $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines sont les antibiotiques les plus utilisés dans la pratique clinique courante

(**Rodriguez et Struelens, 2006**). Elles ont en commun un noyau  $\beta$ -lactame présentent une analogie structurale avec la terminaison D-Ala-D-Ala du précurseur du peptidoglycane. Elles se fixent de manière covalente sur des protéines membranaires, appelées protéines de liaison à la pénicilline (PLP) (**Sekhri-Arafa, 2011**).

Les  $\beta$ -lactamines, famille sans doute la plus prolifique des antibiotiques, sont caractérisés par la présence de la très commune fonction amide - CONH - en situation non pas linéaire, mais cyclisée.

Ce cycle généralement associé à d'autres hétérocycles, et diversement substitué a donné naissance aux trois principaux groupes de la famille (**Bouanchaud, 1986**).

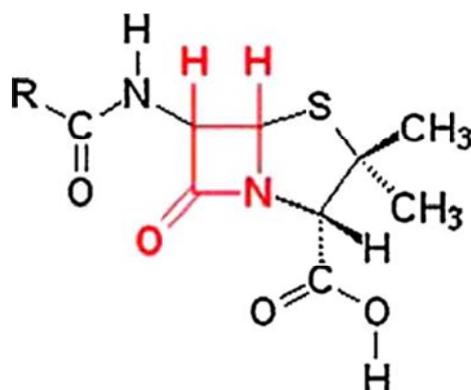


Figure n°1 : Structure générale des  $\beta$ -lactamines (Ruppé, 2010).

### I.5.2. Mécanisme d'action des $\beta$ -lactamines

Toutes les  $\beta$ -lactamines ont le même mécanisme d'action : elles bloquent la synthèse du peptidoglycane (ou mucopeptide, ou muréine), qui est le polymère majeur spécifique de la paroi des bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Ce blocage intervient par inhibition de certaines enzymes responsables de la transpeptidation, étape essentielle de la synthèse du peptidoglycane.

Ces enzymes, collectivement appelées PLP, sont insérées dans la partie externe de la membrane cytoplasmique bactérienne. Pour être actives, les  $\beta$ -lactamines vont devoir atteindre leur cible en pénétrant dans la paroi bactérienne et se fixer sur les PLP (Cavallo et al., 2004).

### I.5.3. Classification des $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines ont un effet bactéricide sur les bactéries en voie de croissance. Il existe de nombreuses variétés de  $\beta$ -lactamines qui se distinguent par leur spectre d'activité et leurs propriétés pharmacologiques. Parmi les  $\beta$ -lactamines on distingue : Les pénicillines, les céphalosporines, les associations avec les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases, les carbapénèmes, et les monobactames (Sekhri-Arafa, 2011).

#### a. Les pénicillines (Pénames)

Il s'agit d'un groupe de molécules, ayant en commun le noyau péname, qui est caractérisé par un pentacycle saturé (cycle thiazolidine) associé au noyau  $\beta$ -lactame. Selon la nature de la chaîne latérale, on a défini plusieurs sous-classes, dont les plus utilisées sont les aminopénicillines (ampicilline, amoxicilline), les carboxypénicillines (ticarcilline) les uréidopénicillines (pipéracilline) et les amidinopénicillines (pivmecillinam) (Ayad, 2017).

Les pénicillines tuent les bactéries en inhibant la formation de la paroi cellulaire bactérienne provoquant le mur de ventilation pour libérer le contenu de la cellule (**Adzitey, 2015**).

**b. Les céphalosporines :** constituées d'un noyau  $\beta$ -lactame associé à un noyau Dihydrothiazine (**Yala et al., 2001**). Les céphalosporines sont classées en trois générations :

✚ **Les céphalosporines de première génération (C1G) :** céfalotine, céfalexine sont plutôt actives sur les bactéries à Gram positif, essentiellement les streptocoques et les staphylocoques sensibles à la méthicilline et sur quelques entérobactéries ne produisant pas de céphalosporinases (**Gharout-Sait, 2016**).

✚ **Deuxième génération (C2G) :** Comme le céfamandole, céfoxitine, sont caractérisées par une meilleure résistance aux  $\beta$ -lactamases à large spectre et un spectre d'action plus étendu au sein des entérobactéries, avec des variations selon les molécules (**Limbert et al., 1991**).

✚ **Troisième génération (C3G) :** Telles que céfotaxime, ceftazidime, se distinguent par un accroissement important de leur spectre antibactérien et par leur stabilité à la plupart des  $\beta$ -lactamases comme les pénicillinases et les céphalosporinases chromosomiques des entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* (**Cavallo et al., 2004**).

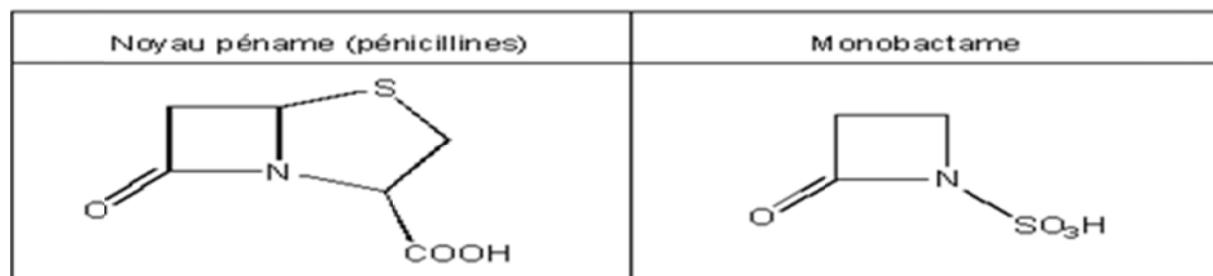
✚ **Quatrième génération (C4G) :** Telles que céfépime, ceftiprome (**Lagha, 2015**).

**c. Les carbapénèmes (Imipénème)**

Les carbapénèmes sont des  $\beta$ -lactamines possédant un très large spectre anti-bactérien doublé d'une grande stabilité envers la quasi-totalité des  $\beta$ -lactamases. Pour cette raison, ils font partie des antibiotiques utilisés en première ligne au cours du traitement probabiliste des infections nosocomiales sévères. Trois molécules sont commercialisées : l'imipénème, le méropénème et l'ertapénème et le doripénème est en voie de l'être (**Wolff et al., 2009**).

**d. Monobactames**

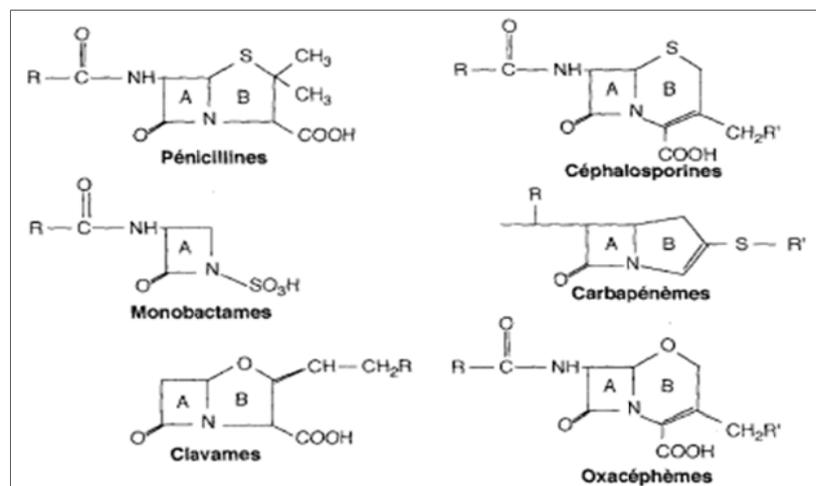
Ce sont des  $\beta$ -lactamines monocycliques, initialement découvertes dans des surnageants de culture de bactéries plutôt que de levures comme dans le cas des autres  $\beta$ -lactamines. L'aztréonam, seul monobactame commercialisé, n'est actif que sur les bactéries à Gram négatif. (**Ruppé, 2010**).



**Figure n°2** : Comparatif pénicillines et monobactames (Cavallo et al., 2004).

### e. Les clavames (Oxapénèmes)

Le noyau clavame dérive du noyau pénème par substitution du soufre en position 1 par un oxygène. Le seul représentant actuellement utilisé est l'acide clavulanique qui inhibe la plupart des  $\beta$ -lactamases de la classe A de Ambler en se fixant sur leurs sites actifs. Ce type de  $\beta$ - lactamine est administré en association avec une autre  $\beta$ -lactamine comme l'amoxicilline ou la ticarcilline, (Cavallo et al., 2004).



**Figure n°3** : Structures générales des bêta-lactamines. R = C-6 (ou C-7) chaîne latérale. R' seconde chaîne latérale : A = noyau bêta-lactame, B - second noyau. (birnbaum et vervloet, 1997).

### I.5.4. Les types de résistance aux $\beta$ -lactamines

#### 1) Résistance naturelle

La résistance naturelle est une caractéristique d'une espèce bactérienne, de support habituellement chromosomique qui délimite le spectre des antibiotiques et peut aider à l'identification. La transmission de cette résistance est verticale, de la bactérie vers sa descendance (Brahimi, 2013).

La résistance naturelle chez les bacilles à Gram négatif se manifeste souvent par des céphalosporinases chromosomiques qui s'expriment soit d'une manière constitutive ou inductible (Cavallo et al., 2004).

## 2) Résistance acquise

La résistance acquise, de support chromosomique ou plasmidique, fait suite à une mutation ou une acquisition de gènes conférant la résistance. Cette résistance est transmissible à la descendance (verticale) ou à d'autres bactéries de la même espèce ou d'espèces différentes (transmission horizontale) (Brahimi, 2013).

Les plasmides et les transposons déterminent la résistance aux antibiotiques de nombreuses  $\beta$ -lactamases.

Une  $\beta$ -lactamase spécifique à une bactérie peut apparaître chez d'autres espèces par la suite, au vu de ces mécanismes de transfert relativement facile de matériel génétique. Comme l'acquisition des nouvelles familles de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) qui ont été décrites plus récemment à différentes espèces d'entérobactéries : CTX-M, OXA, SFO-1, GES-1 (Lagha, 2015).

### I.5.5. Mécanisme de résistance aux Bêta-lactamines

#### A. Mécanisme de résistance non enzymatique

##### 1. Imperméabilité

Pour atteindre leurs cibles situées à la surface de la membrane cytoplasmique, les  $\beta$ -lactamines doivent diffuser aux travers de canaux spécialisés appelés porines. La diffusion est en fonction de la charge, de la masse moléculaire et de la polarité des molécules. Les  $\beta$ -lactamines touchées diffèrent selon la porine absente. La disparition de porine provoque l'augmentation des concentrations minimales inhibitrices de certaines  $\beta$ -lactamines comme cela a été mis en évidence chez certaines entérobactéries (*Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli*) (Nicaido, 2000).

##### 2. Modification de la cible PLP

Plusieurs facteurs peuvent concourir à la résistance par modification de la cible : perte d'affinité des PLP pour les bêta-lactamines par mutation, acquisition de gène ou fragments de gènes codant pour les PLP d'affinité diminuée ou hyperproduction de PLP normales. Des souches de *Proteus mirabilis* résistantes à l'imipénème et au mécilinam ont été observées suite à une perte d'affinité de la PLP 2 et à une diminution de la quantité de PLP 1A. Cependant, ce type de mécanisme de résistance reste très rare chez les entérobactéries (Bonnet, 2006).

### 3. Pompe à efflux

Le système d'efflux actif est efficace grâce aux protéines transmembranaires ancrées dans la membrane plasmique mais également dans la membrane externe des bactéries Gram négatif. Ces protéines sont spécifiques d'une classe d'antibiotiques ou au contraire responsables de « multidrug resistance » (MDR). Pour fonctionner, les pompes à efflux utilisent l'énergie fournie par dissipation d'un gradient de protons (familles MFS, RND et SMR) ou d'ions sodium (famille MATE) ou encore par hydrolyse d'ATP (famille ABC) (figure 04). En cas d'hyper expression de ces systèmes (**Faure, 2009**).

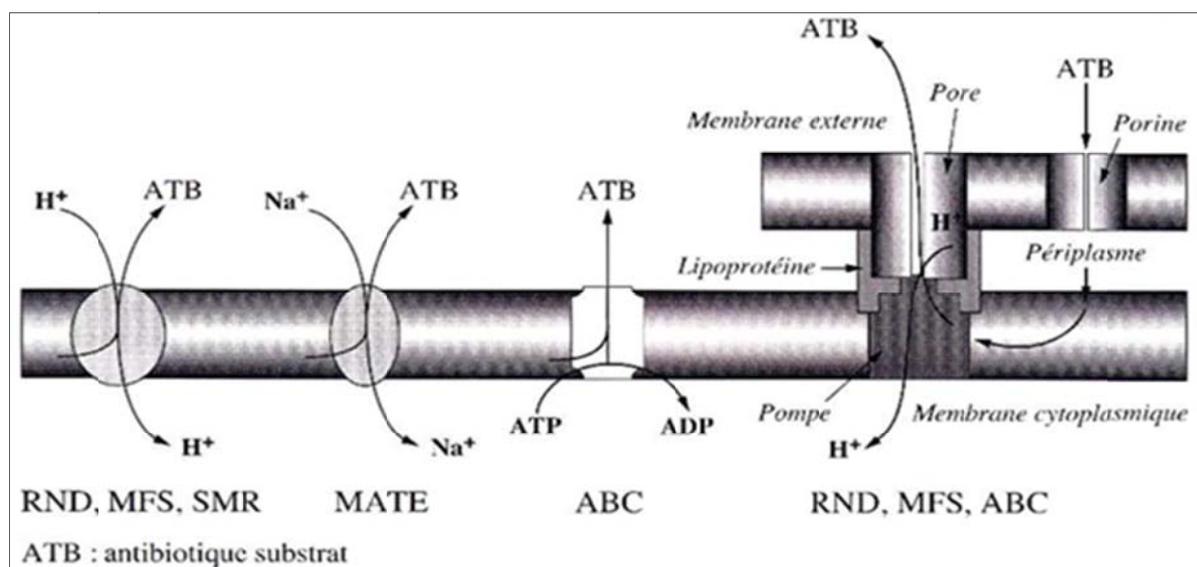


Figure n°4 : Structure des systèmes d'efflux actif.

### B. Mécanisme de résistance enzymatique

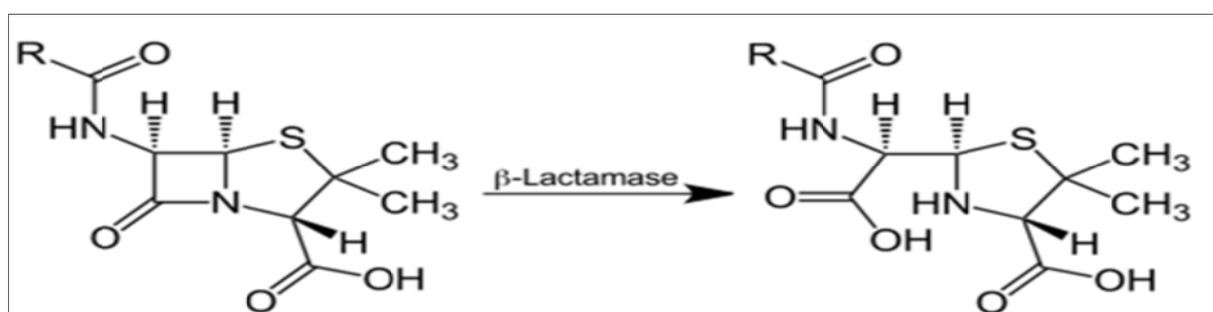
#### ❖ Production de $\beta$ -lactamases

À l'heure actuelle, la production des enzymes hydrolytiques appelées  $\beta$ -lactamases est le mécanisme de résistance prédominant des bactéries à Gram négatif vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines. Au début des années 1980, seules quelques enzymes de type plasmidiques comme TEM-1, TEM-2 et SHV-1 étaient connues, mais rapidement après l'introduction des antibiotiques à large spectre tels que les céphalosporines de 3ème génération, sont apparues des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu ou BLSE. Depuis, les  $\beta$ -lactamases ne cessent de se diversifier, d'élargir leur spectre d'activité et leur diffusion parmi de nombreuses espèces d'entérobactéries, *Pseudomonas sp* et *Acinetobacter sp* (**Faure, 2009**).

## I.6. Les $\beta$ -lactamases

C'est le mécanisme prédominant de la résistance aux Béta-lactamines chez les entérobactéries. Ce sont des enzymes capables d'ouvrir le cycle  $\beta$ -lactame en créant un intermédiaire acyl-enzyme instable, menant au final à la perte d'un groupement carboxyle (**Ruppé, 2010**).

Les  $\beta$ -lactamases sont sécrétées dans l'espace périplasmique chez les bactéries à Gram négatif. Cette localisation particulière permet aux enzymes d'agir directement sur les  $\beta$ -lactamines, avant que celles-ci n'aient le temps de rencontrer leurs cibles, les PLPs, situées dans la membrane cytoplasmique. Les  $\beta$ -lactamases ont une vitesse d'hydrolyse très efficace, soit de 1000 cycles  $\beta$ -lactame par seconde, comparativement aux PLPs ayant une capacité d'hydrolyse d'un cycle  $\beta$ -lactame par heure (**Prescott et al., 2010**).



$\beta$ -lactamine active

$\beta$ -lactamine inactive

**Figure n°5 :** Réaction d'inactivation d'une  $\beta$ -lactamine par l'action d'une  $\beta$ -lactamase.

Chez les bactéries à Gram négatif, les gènes codant pour ces enzymes sont soit d'origine chromosomique ou plasmidique (**Ruppé, 2010**).

### I.6.1. Classification des $\beta$ -lactamases

- **Classification structurale d'Ambller**

Cette classification est fondée sur l'homologie de séquence des acides aminés des  $\beta$ -lactamases. Elle divise ces enzymes d'inactivation en quatre groupes (A à D) selon la structure primaire de l'enzyme. Les enzymes des classes A, C et D sont dites à sérine active (type sérine), alors que la classe B regroupe les métallobêta-lactamases (type métallo-enzymes), qui ont besoin d'ions  $Zn^{2+}$  (**Chassagne, 2012**).

**✓ Classe A**

Cette classe est la plus diversifiée, on y retrouve les pénicillinases 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 céphalosporines de troisième génération et les monobactames. La majorité de ces enzymes est sensible aux inhibiteurs (acide clavulanique, sulbactame et tazobactame) utilisé 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).

**✓ Classe B**

Les métallo- $\beta$ -lactamases constituent la classe moléculaire B d'Ambler. Leur clinique importance est soulignée par le fait qu'ils hydrolysent les carbapénèmes, composés qui échappent à l'activité des  $\beta$ -lactamases à sérine actif. De plus, la plupart sont des enzymes à large spectre qui hydrolysent une variété de pénicillines et céphalosporines et sont insensibles aux inhibiteurs classiques (acide clavulanique, sulbactame, tazobactame) (Galleni, 2001).

**✓ Classe C**

Dans 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. Au départ à médiation chromosomique, les  $\beta$ -lactamases de la classe C sont aussi, aujourd'hui, à médiation plasmidique (Philippon et al., 2002).

**✓ Classe D**

La classe D correspond aux oxacillinases, enzymes se caractérisant classiquement par un phénotype « pénicillinase » peu sensible aux inhibiteurs tels acide clavulanique, tazobactam ayant une faible activité vis-à-vis des céphalosporines à spectre étroit. Elles hydrolysent fortement la cloxacilline, l'oxacilline ou encore selon le type, la méticilline. Enfin elles sont inhibées de manière variable par les ions Cl<sup>-</sup> bien que certaines y soient insensibles (OXA-29). Ces enzymes, jusque dans les années 90, réputées plasmidiques ont été classiquement peu décrites chez les entérobactéries (Philippon et Arlet, 2002).

**▪ Classification de Bush, Jacoby et Medeiros**

La classification de Bush et al est fondée sur les caractéristiques physicochimiques des enzymes comme leur point isoélectrique, poids moléculaire, substrat d'activité et profil d'inhibition. Les BLSE appartiennent à la catégorie 2be et 2d de cette classification (Rodriguez et Struelens, 2006).

### ✚ Bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE)

Les BLSE sont des  $\beta$ -lactamases de classe A (comme TEM1/2 et SHV-1), et selon la classification de Bush-JacobyMedeiros, les BLSE font aussi partie du groupe 2be, c'est-à-dire qu'elles sont capables d'hydrolyser les pénicillines, les céphalosporines de 1ère, 2ème, 3ème [C3G] (ex. céfotaxime, ceftazidime) et 4ème [C4G] (ex. céfépime) génération et les monobactames (ex. aztréonam). Par contre, les souches productrices de BLSE restent généralement sensibles aux céphamycines (ex. céfoxitine) et aux carbapénèmes (ex. imipénème). Au laboratoire, la détection des BLSE de classe A est classiquement basée sur l'observation d'une synergie entre l'acide clavulanique et les C3G, C4G ou l'aztréonam, et une sensibilité conservée à la céfoxitine et à l'imipénème (**Cattoir, 2008**).

### ✚ Différents types de BLSE

#### 1) BLSE 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*. 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* (**Cattoir, 2008**).

#### 2) BLSE de type SHV

Après TEM, le type SHV constitue celui comportant le plus grand nombre (supérieur à 70) d'enzymes BLSE. Les enzymes de type SHV dérivent par mutations ponctuelles de l'enzyme originale SHV-1. L'origine de ces enzymes est probablement une variante de l'enzyme chromosomique K2 de *K. pneumoniae* (**Rodriguez et Struelens, 2006**).

#### 3) Type OXA

Ces enzymes possèdent une grande activité catalytique pour la cloxacilline, l'oxacilline et la méticilline. À l'exception de l'OXA-18, elles ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique. Il y'a actuellement 11 BLSE du groupe OXA, dérivées de OXA-1, OXA-2 et OXA-10. En général, elles hydrolysent mieux la ceftazidime que le céfotaxime. Ces enzymes ont été fréquemment observés chez *Pseudomonas aeruginosa* mais aussi chez les entérobactéries, particulièrement en France et en Turquie. Les BLSE de type OXA sont codés par des gènes portés par des éléments mobiles comme les transposons et intégrons (**Rodriguez et Struelens, 2006**).

#### 4) Type CTX-M

Ce sont des  $\beta$ -lactamases de classe A qui tiennent leur nom de par leur hydrolyse préférentielle du céfotaxime par rapport à la ceftazidime (« CTX ») et « M » pour leur lieu d'isolement (Munich) puisque la dénomination CTX était déjà occupée (aujourd'hui TEM-3). Elles n'hydrolysent ni les céphamycines ni les carbapénèmes. **(Ruppé, 2010).**

#### 5) Autres types de BLSE

D'autres types plus rares de BLSE, appartenant à la classe A, incluent BES, GES-IBC, VEB, SFO, TLA et PER. Elles sont inhibées par l'acide clavulanique et en général ont le même substrat que TEM et SHV. Les enzymes BES-1, SFO-1 et TLA-1 ont été retrouvées chez les entérobactéries. Les enzymes du type GES et PER, VEB et IBC-2, ont été largement retrouvées chez *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* mais aussi chez les entérobactéries. Les souches productrices de GES ont été plus isolées en Afrique du Sud, Grèce et en France **(Rodriguez et Struelens, 2006).**

*Chapitre II*  
*Les bacilles à*  
*Gram négatifs*

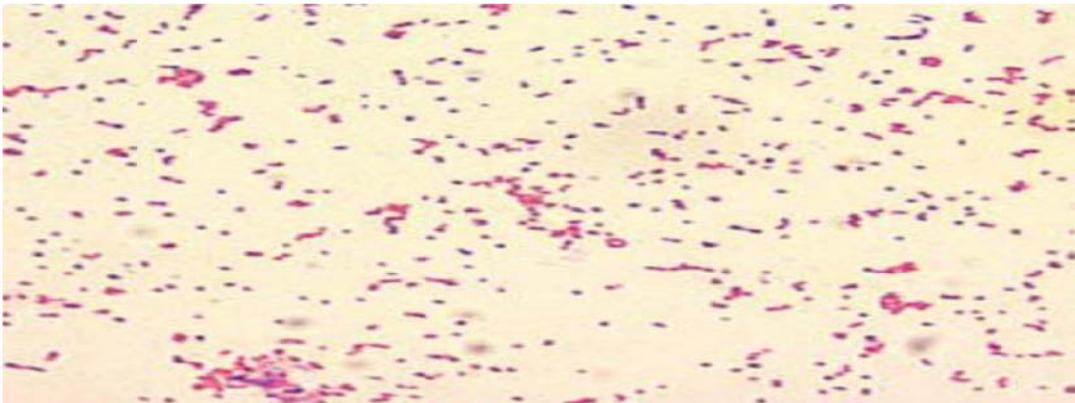
### II.1. Les entérobactéries

Les entérobactéries constituent un grand groupe de bactéries ayant une forte similitude. La création de ce groupe a été proposée par **Rahn en 1937** qu'il dénomma Enterobacteriaceae. (**Akel, 2014**).

Les enterobacteriaceae sont des bacilles à Gram négatif, le plus souvent courts (1 à 6 Um), droit immobiles ou mobiles par une ciliature péritriche (rares, exceptions) de culture aisé, aéro-anaérobies facultatifs, fermentaires, oxydase négative, catalase positive (rares, exceptions), nitrate réductase positive (rare exception) (**françois et al., 2011**).

La famille comprend 130 espèces actuellement répertoriées. Les espèces les plus communément isolées en bactériologie clinique appartiennent aux genres *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia* (**Khayar, 2011**).

Les espèces pathogènes les plus fréquemment isolées dont l'ingestion provoque une infection gastro-intestinale sont *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella* et certaines souches d'*Escherichia coli*. En France, ces bactéries pathogènes sont responsables de 35 000 à 49 000 cas de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC). Les salmonelles en sont les premières causes avec le recensement de 10 202 cas hospitalisés par an et 535 décès confirmés par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) (**Faure, 2009**).



**Figure n°6** : Les bacilles à Gram négatif observés au microscope optique (Gx100) (**Akel, 2014**).

## II.2. Identification des entérobactéries

La plupart des espèces sont morphologiquement indiscernables ; il s'agit en général de bacilles rectilignes, mais il existe de nombreuses variantes :

- ✚ **Mobilité** : les *shigelles*, *Yersinia* et *Klebsiellas* ne sont pas mobiles ;
- ✚ **Tests biochimiques** : de nombreux tests différencient les espèces en fonction de leurs métabolismes. Ils sont en général réalisés à l'aide de Kits commercialisés ou d'automates.
- ✚ **Sérologie** : les espèces importantes sont identifiées par détection des antigènes spécifiques par réaction d'agglutination (**John Spicer, 2003**).

## II.3. Les caractères cultureux

Sur gélose, les colonies sont lisses et régulières et atteignent 2 millimètres de large sauf celles des *Yersinia* qui sont plus petites. Les *Proteus* ont tendance à envahir la gélose et à y former un tapis uniforme. Selon l'espèce, on identifie le caractère macrosopique de la colonie : type R (rugueux), type M (muqueux), type S (Smooth=lisse) (**Khayar, 2011**).

## II.4. Les caractères antigéniques

L'étude des différents caractères antigéniques permet de classer en sérotypes, les souches appartenant à une même espèce ou au même genre (**Khayar, 2011**).

Les entérobactéries possèdent plusieurs types d'antigènes différents :

- **Antigène O ou somatique** : antigène de paroi constitué de lipopolysaccharides (LPS) thermostable, perdu chez les souches R (colonies rugueuses) qui deviennent auto agglutinables en eau distillée (**François et al., 2011**).
- **Antigène H ou flagellaires** : ils n'existent que chez les souches mobiles. Constitués de protéines spécifiques dénommées flagelline; ils sont thermolabiles et inactivés par l'alcool. Ils provoquent une agglutination floconneuse, rapidement constitués mais facilement dissociables par agitation (**Gharout-Sait, 2016**).
- **Les antigènes de surface comprenant**
  - Les antigènes K, capsulaires, de nature polysaccharidique. ils masquent l'agglutination par les anticorps anti O qui peut être restituée après chauffage de la souche car ils sont détruits par ébullition.

- Les antigènes d'adhérence ou adhésines de nature protéique, portés par des pili communs (encore appelés fimbriae) (**Khayar, 2011**).

Dans le cadre de notre étude, les germes ciblés sont : *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter sp.*, *Proteus mirabilis*. Pour cela, il semble nécessaire de rappeler brièvement quelques caractéristiques générales de ces bactéries.

### 1. *Esherichia coli*

Bacille à gram négatif, ciliature péritriche, culture sur milieu sélectif / indicateur, lactose positif. L'habitat normal est le tractus intestinal de l'homme et de l'animal, pour cette raison c'est un indicateur de contamination fécale (**Fritz et al., 2017**). Le pouvoir pathogène d'*E. coli* chez l'homme peut être extrêmement varié. D'un point de vue clinique, on distingue au sein de l'espèce les souches pathogènes intestinales et les souches pathogènes extra-intestinales (**Jauréguy, 2009**). *E.coli* est responsable d'infections urinaires, des plaies, des poumons, des méninges et de septicémies. Certaines souches sont des causes importantes de la diarrhée du voyageur et du syndrome hémolytique et urémique (**John Spicer, 2003**).

La bactérie était initialement sensible à beaucoup d'antibiotiques, mais l'acquisition de résistances est fréquente, surtout en milieu hospitalier (**Nauciel et Vildé, 2005**).

### 2. *Klebsiella*

Les *klebsiella* sont des bacilles à gram négatif aérobies encapsulés non mobiles, citrate VP positif, mais indole, H<sub>2</sub>S et urée négatifs et qui produisent de gaz en fermentant de nombreux sucres dont le glucose et le lactose *Klebsiella pneumoniae* est l'espèce la plus souvent isolée en pratique clinique (**John Spicer, 2003**). C'est un germe opportuniste, responsable d'infections diverses: infections suppuratives, urinaires, respiratoires, biliaires qui peuvent être à l'origine de bactériémie et surtout de septicémie de pronostic sévère, principalement chez les malades immunodéprimés, cancéreux, brûlés, cirrhotiques, diabétiques, chez les vieillards, nourrissons, nouveau-nés et prématurés. Elle est fréquemment isolée de l'environnement (eaux usées, sol,...etc) et de la flore commensale du tube digestif et des voies respiratoires supérieures (**Lagha, 2015**). On a aussi *Klebsiella oxytoca* qui a des caractères généraux identiques à ceux de *K. pneumoniae*, à l'exception du métabolisme du tryptophane en indole qui est positif chez *K.oxytoca*. La bactérie est aussi responsables d'infections urinaires, septicémies. A l'hôpital, *K. oxytoca* est rencontrée moins fréquemment que *K.pneumoniae* (**Wladimir et Trystram, 2003**).

### 3. *Proteus*

Les *Proteus sp* 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. 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 (**Fritz et al., 2017**). *Proteus mirabilis* appartient à la famille des Enterobacteriaceae. Germe commensal du tube digestif, ONPG-négative, TDA-positif, qui envahit la surface des milieux gélosés. Bacille très mobile, aéro-anaérobie, oxydase négatif, nitrate positif et qui fermente le glucose. Elle est impliquée dans des infections urinaires (10 % des infections urinaires en ville) et d'autres infections (**Wladimir et Trystram, 2003**).

### 4. *Enterobacter*

La famille des Enterobacteriaceae, comprenant de nombreuses espèces comme *Enterobacter aerogenes* ou *Enterobacter cloacae*. Bacilles à Gram négatif, mobiles, ONPG-positives, VP-positives. Fermentation des sucres : glucose +. Les souches du genre *Enterobacter* sont souvent responsables d'infections nosocomiales. *E.cloacae* et *E. aerogenes* peuvent être isolés à partir d'infections urinaires ou de plaies (**Wladimir et Trystram, 2003**).

#### II.5. *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* est un bacille Gram négatif de 2-4 µm de longueur, représentant un à plusieurs flagelles polaires. *Pseudomonas aeruginosa* possède comme élément de la paroi cellulaire, une membrane externe dont l'architecture est responsable de la résistance naturelle à de nombreux antibiotiques (**Fritz et al., 2017**).

*Pseudomonas aeruginosa* est un opportuniste agent pathogène fréquemment responsable d'infections dans l'hôpital. Cette bactérie à Gram négatif est répandue dans l'environnement, souvent dans l'eau, le sol et les plantes (**Ferroni et al., 1998**). Le genre *pseudomonas* est mobile (à ciliature polaire), aérobies stricts, cultivant facilement sur les milieux usuels. *P.aeruginosa* (ou bacille pyocyanique) se caractérise par la pigmentation bleu-vert de ses colonies.

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) (Avril *et al.*, 2000).

Les colonies de *Pseudomonas aeruginosa* sont de trois types :

- Les colonies larges sont grandes, rugueuses avec un centre plus bombé (colonies en œufs sur le plat) et un bord irrégulier. Très souvent, les colonies la présentent sous forme de Petits phages d'autolyse donnant un reflet irisé ou métallique caractéristique.
- Les colonies *sm* (small) sont rondes, petites, convexes et lisses.
- Les colonies muqueuses sont bombées, opaques visqueuses, filantes, ou parfois coulantes. Elles possèdent une pseudo-capsule constituée d'alginate (Touati, 2013).

# *Chapitre III*

## *Matériel et Methodes*

**III.1. Cadre de l'étude**

Nous avons choisi de mener ce travail sur la résistance des bacilles à Gram négatif aux bêta-lactamines, du fait d'une documentation devenue nécessaire chez nous à cause de sa fréquence dans les services des épidémies causées par des souches résistantes à une large variété d'antibiotiques. Les prélèvements sont étudiés au laboratoire d'analyse médicale Dr S. SELMI épouse SI LARBI.

**III.2. Présentation de lieu d'étude**

Notre étude a été effectuée au niveau du laboratoire d'analyse médicale privé Dr S.SELMI épouse SI LARBI, elle s'est étalée sur une période de 30 jours (du 04/02/2019 au 28 /05/2019).

Le Laboratoire est situé à l'ouest de Bouira (DRAA EL-BORDJ), il est mis en service depuis le 25/12/2012.

Il est composé d'un médecin biologiste, d'une réception gérée de 3 personnes. Le laboratoire est organisé de 3 unités :

- ✚ Unité de Biochimie ;
- ✚ Unité d'Hématologie ;
- ✚ Unité de Microbiologie.

Les activités de l'unité se focalisant sur les examens (analyses) suivants :

- Examen cytobactériologique des urines (ECBU) ;
- Examen cytobactériologique de liquide céphalo-rachidien(LCR) ;
- Examen cytobactériologique de liquide synovial
- Examen cytobactériologique du liquide pleural ;
- Examen cytobactériologique de liquide de dialyse ;
- Examen cytobactériologique de pus ;
- Copro-parasitologie des selles ;
- Prélèvement vaginale.

Les prélèvements reçus au laboratoire sont accompagnés d'une fiche de renseignement qui comporte :

- O Nom et prénom.
- O Age et sexe.
- O Service d'hospitalisation.
- O Nature de prélèvements.
- O Antibiothérapie en cours.

### III.3. Matériel biologique

#### III.3.1. Les souches étudiées

Dans ce travail on s'intéressera aux souches d'enterobactéries, *Pseudomonas sp.*

#### III.3.2. Les souches de références

ATCC25922 *Esherichia coli.*

ATCC27853 *Pseudomonas aeruginosa.*

### III.4. Nature de prélèvement récupéré

Les souches de bacilles à Gram négatif ont été isolées à partir de divers prélèvements : les urines, les selles, pus, liquides de ponction.

### III.5. Techniques de Prélèvements

#### III.5.1. Prélèvement d'urine

La méthode habituellement recommandée consiste à récupérer de manière aseptique l'urine de milieu de jet, « à la volée », après un lavage hygiénique des mains et une toilette des organes génitaux externes au savon doux puis rinçage à l'eau ou par un antiseptique non agressif. Après évacuation du premier jet (20 ml) contaminé par la flore commensale, au moins 20 à 30 ml sont recueillis dans un pot stérile.

Chez le patient sondé, l'urine ne sera jamais prélevée dans le sac collecteur ou par des manœuvres entraînant une rupture du « système clos ». Elle doit être prélevée dans un site de ponction spécifique prévu sur la sonde et après désinfection, ou collectée sur une sonde neuve lors d'un changement de dispositif pour éliminer toute contamination par des bactéries adhérentes à la paroi interne du cathéter urinaire.

Chez le nourrisson et le jeune enfant, le prélèvement au milieu du jet est une technique non invasive, à privilégier systématiquement chez les enfants qui ont une miction volontaire. Avec un peu de patience, il est même possible de recueillir de cette façon l'urine d'un très jeune enfant ou même d'un nourrisson qui urine toutes les demi-heures. La contamination par la flore périnéale et digestive est réduite par une désinfection soigneuse de la vulve, du prépuce ou du gland. En routine, la technique la plus utilisée est la collecte d'urine sur poche

à urine adhésive. Cette technique nécessite une désinfection cutanée extrêmement rigoureuse et un temps de pose bref (< 30 minutes) (**Janvier et al., 2008**).

Les urines recueillies dans un flacon stérile doivent être acheminées rapidement au laboratoire. Elles ne doivent jamais être conservées plus de 2h à température ambiante afin d'éviter la pullulation microbienne.

Les prélèvements sont conservés au laboratoire pendant 3 jours après l'analyse (**Bonacorsi, 2007**).

### **III.5.2. Prélèvement de pus**

De manière générale, il est préférable de limiter ou minimiser les prélèvements par écouvillonnage qui seront plus facilement contaminés, plus sensibles à la dessiccation et non adaptés à la recherche de bactéries anaérobies. Leur seront préférés : les biopsies, les pièces opératoires et les prélèvements à la seringue. Les biopsies doivent être placées dans un récipient stérile.

Lors des prélèvements superficiels (prélèvements de plaies, brûlures, ulcération, escarres, lésion cutanée etc.) un nettoyage et une antiseptie de la peau, ou de la partie superficielle, seront nécessaires avant prélèvement. Chaque fois que c'est possible, on essaiera d'aspirer à l'aiguille fine le liquide, la sérosité, le pus, présent au niveau de la lésion ou d'effectuer une biopsie de la lésion. Afin d'éviter le dessèchement du prélèvement dans la seringue, il est possible d'aspirer ensuite 1ml de sérum physiologique stérile. Il est aussi possible d'injecter du sérum physiologique en faible quantité dans la lésion et de ré-aspirer ensuite tout ce qui est possible (**M.-C.Ploy et Denis, 2007**).

Les prélèvements de pus doivent arriver rapidement au laboratoire (<2 heures à température ambiante), car très souvent il sera nécessaire de rechercher les bactéries anaérobies. Les prélèvements doivent arriver au laboratoire en sac hermétique, accompagnés d'une feuille de renseignements cliniques (**M.-C.Ploy et Denis, 2007**).

### **III.5.3. Prélèvement des selles**

Les selles seront recueillies dans un récipient stérile. Les flacons choisis doivent être bien hermétiques, Et munis d'une cuillère ou d'une spatule permettant un prélèvement et un ensemencement plus pratique. A partir de matière fécale est mise dans un récipient propre, la valeur de quelques grammes de selles est prélevés à l'aide d'une spatule ou du flacon cuillère

et introduite dans un flacon stérile. Un écouvillonnage rectal est parfois indiqué notamment chez le nourrisson ou l'enfant. Certaines bactéries doivent être recherchées systématiquement (le plus couramment : *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* et *Campylobacter*) et d'autres ne le sont que sur demandes spécifiques dans un contexte particulier (EHEC, *C.difficile*, *V.cholerae*,...) (Mariani-Kurkdjian et Bingen, 2007).

#### III.5.4. Prélèvement des liquides de ponction

##### 1. Les liquides pleuraux

Les pleurésies purulentes sont des infections secondaires de la cavité pleurale, le plus souvent consécutives à une pneumonie aigue ou un abcès pulmonaire.

Les liquides pleuraux non purulents correspondent le plus souvent à une insuffisance cardiaque, à une réaction inflammatoire ou à un process néoplasique.

##### 2. Les liquides d'ascite

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

##### ➤ Prélèvement

Liquide de ponction (ascite, pleural,...) réalisé par un médecin, premièrement désinfection cutanée puis le recueil dans le tube stérile (Quantité nécessaire  $\geq 3$ ml).

Les prélèvements doivent être acheminés rapidement au laboratoire (<30 minutes à une température ambiante) (M.-C.Ploy et Martin, 2007).

#### III.6. Méthodologie du diagnostic

##### III.6.1. Les urines

##### III.6.1.1. Etude cyto bactériologique des urines

L'examen cyto bactériologique des urines (ECBU) constitue l'élément de certitude de l'infection urinaire. Il a pour but de révéler la présence de germes responsables de cette infection. Pour obtenir de bons résultats, il est important de respecter les conditions de recueil, de conservation et de transport (Ait Miloud, 2011).

L'ECBU débute par :

- **Un examen macroscopique de l'échantillon d'urines** : qui permet de noter

- l'aspect limpide, trouble ou avec des hématies ;
- la couleur (jaune pâle ou jaune foncé) qui renseigne sur la concentration en eau de l'urine, sachant toutefois que certains médicaments peuvent la teinter (Berthélémy, 2016).

- **L'examen bactériologique**

Permet l'identification et le dénombrement des germes, exprimé en unités formant colonies (UFC)/mL (Berthélémy, 2016).

- **Méthode de l'anse calibrée**

Cette méthode est actuellement la plus utilisée. L'urine est prélevée à l'aide d'une anse de 10UI et estensemencée en 3 à 4 stries séparés sur une gélose nutritive. Cette méthode standardisée permet grâce a un abaque, de convertir l'aspect de la culture en UFC par millilitre. Les boites sont incubées à une température de 37°C pendant 24h (Bonacorsi, 2007).

### III.6.1.2. Chimie des urines

L'utilisation des bandelettes urinaires permet d'orienter le diagnostic d'infection. Ces bandelettes réactives utilisent des méthodes biochimiques pour déceler la présence des deux stigmates essentiels de l'infection : la leucocyturie et la bactériurie. La présence de leucocytes se traduit par l'excrétion d'une enzyme, le leucocyte estérase. Ce leucocyte estérase réagit avec la bandelette lorsque la leucocyturie est supérieure à 10/ml ( $10^4$ /ml). La mise en évidence des bactéries utilise la présence des nitrates. Seules les bactéries possédant un nitrate réductase sont capables d'élaborer des nitrites dans les urines. Il s'agit des entérobactéries, responsables de la grande majorité des IU (Ait Miloud, 2011).

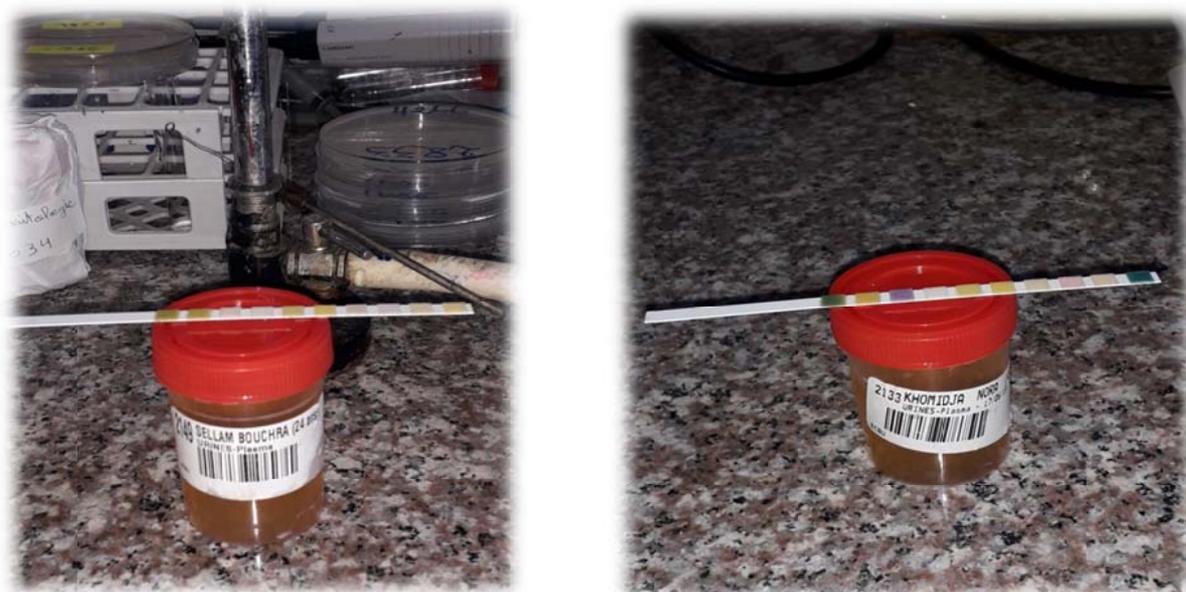


Figure n°7 : Les bandelettes urinaires.

### III.6.2. Coproculture

Sur chaque boîte, on recherche les bactéries entéropathogènes à savoir *Shigella* spp, *salmonella* spp et *E. coli* entéropathogènes (EPEC) chez les patients moins de 02 ans (Mariani et Bingen, 2007).

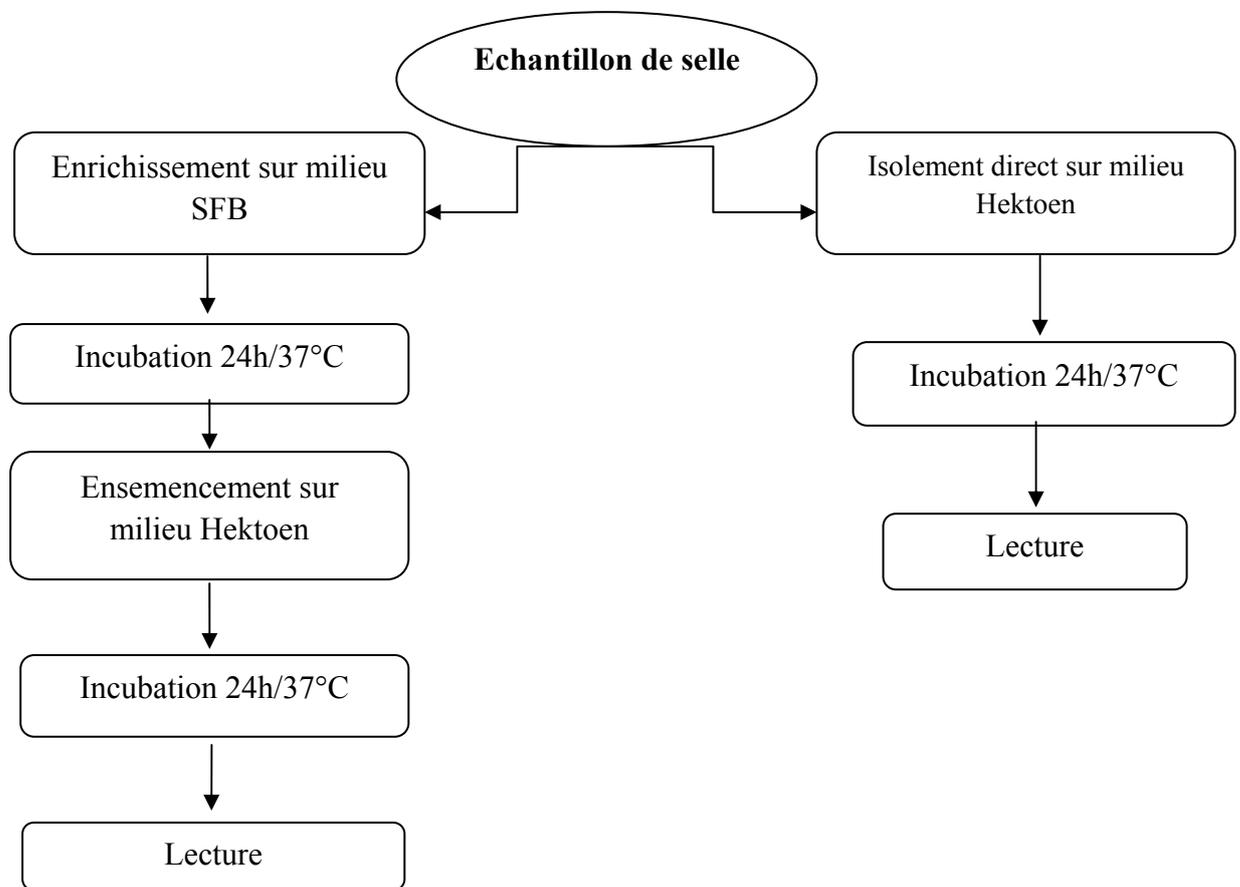


Figure n°8 : Schémas d'isolement à partir des selles.

### III.6.3. Etude cytobactériologique de pus

- **Examen direct**

Une coloration de gram sera effectuée sur un frottis du produit pathologique pour les localisations profondes.

- **Mise en culture**

Après un examen direct, on ensemence quelques gouttes par stries, une gélose au sang cuit, une gélose au sang frais et en réalisant en parallèle un enrichissement dans un bouillon glucosé tamponné (BGT) et les incubent à 37°C/24H à 48H. Après l'incubation, à partir de bouillon d'enrichissement on ensemence les mêmes milieux si la culture dans les boîtes d'origine est négative (Ploy et Denis, 2007).

### III.6.4. Etude bactériologique des liquides de ponction

On ensemence en premier lieu quelques gouttes de liquide par stries sur une gélose au sang cuit et gélose au sang frais. On réalise un enrichissement dans un bouillon glucosé tamponné(BGT). Incuber à 37°C/ 24H à 48H. Après l'incubation : lecture des boîtes

Si la culture est négative ; réincuber les boîtes.

Si la culture est positive ; identifier le germe + antibiogramme (**Poly et Martin, 2007**).

### III.7. Identification

L'identification des bactéries se fait suivant une clé dichotomique qui va des caractères les plus vastes aux plus pointus pour aboutir à une espèce bactérienne.

#### III.7.1. Identification morphologiques

- **Aspect macroscopique (colonies)**

Après incubation, le premier critère d'identification sur lequel on se base est celle de l'aspect macroscopique des colonies vu à l'œil nue, que ça soit taille, forme du relief (bombée, semi bombée, plate), couleur, aspect (collant, filamenteux...), odeur, transparence (opaque, translucide), allure des contours (régulier, dentelés), pigmentation, et aspect de la surface (lisse ou rugueuse).

- **Aspect microscopique**

- **Observation à l'état frais**

C'est une observation entre lame et lamelle à l'objectif x40, elle permet d'observer de la forme, la mobilité et le type de regroupement cellulaire (**Solbi, 2013**).

- **La coloration de Gram**

Coloration de Gram est un examen rapide par excellence pouvant être pris comme référence. C'est la seule technique qui permet non seulement d'affirmer l'existence d'une infection urinaire mais aussi de déterminer la nature du germe en cause, permettant au clinicien d'initier une antibiothérapie appropriée. La coloration de Gram se fait sur urines non centrifugées ; contrairement aux autres techniques, les résultats de la coloration de Gram dépendent très fortement de la qualité du technicien de laboratoire qui effectue l'examen, permettant d'éliminer certains faux positif ou faux négatif (**Goldstein, 1991**).

#### III.7.2. Identification biochimiques (la galerie API 10S)

- **Principe**

L'identification a été faite par la galerie rapide API système (Analytical profil index). API 10S est un système pour l'identification des entérobactéries et autres bacilles à Gram

négatifs non fastidieux, utilisant 10 tests biochimiques standardisés et miniaturisés, ainsi qu'une base de données. Ces galeries API 10S (Biomérieux) sont fournies par l'IPP (Institut Pasteur de Paris), il s'agit de galerie qui se présente sous forme de produits desséchés que l'on réhydrate par inoculation de la suspension du germe à tester.



**Figure n°9 :** Galerie API 10S avant utilisation.

- **Technique**

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

En effet, on retire la galerie de son emballage individuel et on la dépose dans la boîte d'incubation, puis on prépare l'inoculum bactérien : une colonie dans 5ml d'eau physiologique, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland. Pour inoculer la galerie, il faut remplir à l'aide d'une pipette Pasteur les tubes et les cupules des tests CIT, VP et GEL avec la suspension bactérienne, et pour les autres tests ; on va remplir uniquement les tubes (et non les cupules) avec la création d'une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H<sub>2</sub>S en remplissant leur cupule par l'huile de vaseline stérile. Enfin, on incube à 37 C° ± 1C° pendant 18-24 heures.

- **Lecture**

La lecture des galeries API 10S se fait selon les indications du fournisseur. Après codification des réactions en un profil numérique, on se réfère à un catalogue analytique où l'identification est donnée avec un pourcentage et une appréciation (Lagha, 2015).



**Figure n°10** : Galerie API 10S après utilisation (*Escherichia coli*).

### III.8. Etude 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 CLSI 2008 (OMS, 2008).

L'antibiogramme est l'examen biologique destiné à mesurer l'interaction entre chacune des molécules antibactériennes utilisables et une souche bactérienne susceptible d'être pathogène, isolée d'un patient. Le résultat contribue à évaluer la sensibilité de la souche bactérienne examinée ou sa résistance, ce qui signifie que la molécule sera probablement active au sens thérapeutique ou le traitement sera un échec. Le résultat numérique brut est accompagné d'une interprétation ou remplacé par elle : résistant, sensible, intermédiaire (Sekhri-Arafa, 2011).

#### o Technique

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne (inoculum à 0,5 Mac Farland de turbidité).
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche de haut en bas, en stries serrées.
- Application des disques d'antibiotiques : les disques sont déposés manuellement avec une pince stérile, utiles pour un rapprochement ou éloignement des disques, ou pour un choix positionnel comme l'emplacement des inhibiteurs.
- Mettre les boîtes dans le réfrigérateur à 4°C.
- Incubation : les boîtes sont mises à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24h.
- Dans notre travail au total 06 antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines : Ampicilline(AMP), l'association Amoxicilline acide clavulanique (AMC), céfazoline (CZ), cefoxitine (FOX/CX), cefotaxime (CTX), Imipénème (IPM).

○ **Lecture et interprétation**

Les résultats sont exprimés en mm après lecture des diamètres des zones d'inhibition et sont interprétés en trois catégories : S= sensible, R= résistant, et I= intermédiaire, en se référant aux normes CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

Selon le comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie les définitions de bactérie sensible, intermédiaire ou résistante sont les suivantes :

Une souche sensible est une souche pour laquelle la probabilité de succès thérapeutique est forte dans le cas d'un traitement par voie systémique avec la posologie recommandée.

Une souche de sensibilité intermédiaire est une souche pour laquelle le succès thérapeutique est imprévisible. La catégorie intermédiaire est aussi une zone tampon qui tient compte des incertitudes techniques et biologiques.

Une souche résistante est une souche pour laquelle il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quels que soient le type de traitement et la dose thérapeutique utilisée (**Brahimi, 2013**).

Les tableaux suivants montrent les listes des antibiotiques testés selon les recommandations du CLSI (**OMS, 2008**).

**Tableau N°III** : Les  $\beta$ -lactamines testés pour les entérobactéries.

Antibiotiques	Abréviations	Charges ( $\mu\text{g}$ )	Famille
Ampicilline	AMP	30	$\beta$ -lactamines
Amoxicilline+ Acide Clavulanique	AMC	20+10	
Céfazoline	CZ	30	
Céfotaxime	CTX	30	
Céfoxitine	CX	30	
Imipénème	IMP	10	

Tableau N°IV : Antibiotiques testés pour les souches de *Pseudomonas sp*

Antibiotiques	Abréviation	Charges (µg)	Familles
Ticarcilline	TIC	75	β-lactamines
Ticarcilline + ac.clavulanique	TICC	75+10	
Pipéracilline	PEP	100	
Céftazidime	CAZ	30	
Aztréonam	ATM	30	
Imipénème	IMP	10	

### III.9. Détection des phénotypes de résistance

#### III.9.1. Test de synergie (DD-test)

La production d'une β-lactamase à spectre élargi (BLSE) est détectée par le test de synergie qui consiste à placer des disques de : C3G (céftazidime et céfotaxime), C4G (céfépime) et un monobactame (aztréoname) à une distance de 20 mm (centre à centre) d'un disque d'augmentin (AMC : Amoxicilline /Acide clavulanique). L'augmentation de la zone d'inhibition entre le disque d'AMC et les disques C3G, C4G, Aztréoname indique la production d'une BLSE (Jarlier *et al.*, 1988).



Figure n°11 : Le DD-test.

La présence d'une BLSE a été caractérisée par la description d'une image de synergie en « bouchon de champagne » en raison de l'effet inhibiteur de l'acide clavulanique (Ayad, 2017).

### **III.9.2. Test de confirmation**

#### **Technique de double disque : (appelé aussi test espagnol)**

Ce test est fait pour les souches qui ne présentent pas une image de synergie, avec diminution des diamètres des céphalosporines de 3ème génération et pour déterminer si il ya production d'une BLSE (OMS, 2008).

On procède de la même manière que la technique d'antibiogramme dans la préparation de l'inoculum et l'ensemencement, puis on place deux disques d'antibiotiques : un disque d'AMC et un disque de CTX (C3G) à une distance de 25 mm.

On laisse diffuser à la température ambiante du laboratoire pendant une heure de temps et on remplace le disque d'AMC par un disque de CTX (C3G). On incube pendant 18 h à  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (Lagha, 2015).

# *Chapitre IV*

## *Résultats et discussion*

### IV.1. L'objectif de l'étude

L'objectif de cette étude est de déterminer les mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines chez des souches de bacilles à Gram négatif isolées des différents prélèvements dans la région de Bouira.

A cet effet, une collection de 64 souches des bacilles à gram négatif isolées dans le laboratoire d'analyses médicales privé Dr Salemi à Bouira (Sur une période allant du 04/02/2019 au 28/05/2019) a été étudiée.

### IV.2. Caractéristiques des souches isolées

#### IV.2.1. Isolement et identification des souches

64 souches sont isolées et identifiées, dont 98,43 % (63/64) sont des entérobactéries, 1,56% (1/64) est une souche de *Pseudomonas aeruginosa*.

La figure ci-dessous montre la répartition des différents groupes bactériens.

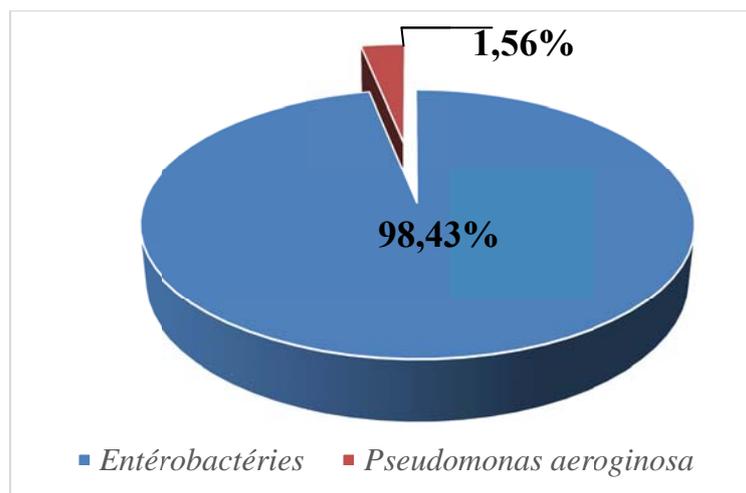


Figure n°12 : Répartition des souches par groupe bactérien.

#### IV.2.2. Répartition des souches par espèce bactérien

Un total de 64 souches des bacilles à Gram négatif incluant 39 *E. coli* (60,93%), 9 *Klebsiella pneumoniae* (14,06%), 6 *Klebsiella oxytoca* (9,38%), 5 *Enterobacter sp* (7,81%), 4 *Proteus mirabilis* (6,25%), 01 *pseudomonas aeruginosa* (1,56%).

Les fréquences des souches isolées sont montrées dans la figure suivante :

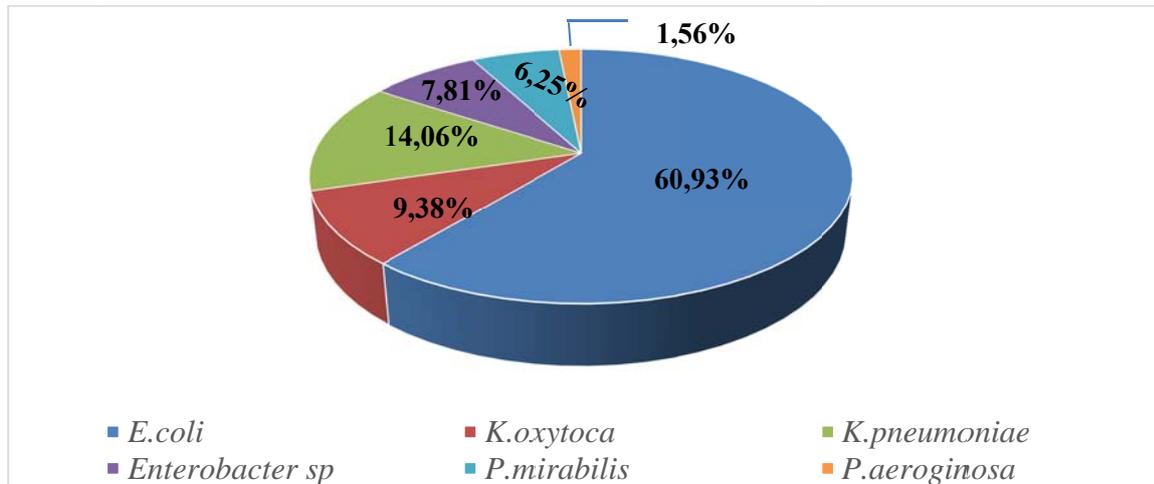


Figure n°13 : Répartition des souches par espèce bactérienne.

#### IV.2.3. Répartition des souches selon la nature du prélèvement

La figure 14 montre qu'un taux de 92,19% (59/64) des souches sont isolées des urines, 6,25% (04/64) sont isolées des pus et uniquement un taux de 1,56 % (1/64) sont isolées à partir des selles. Aucune souche n'est isolée à partir des liquides de ponction.

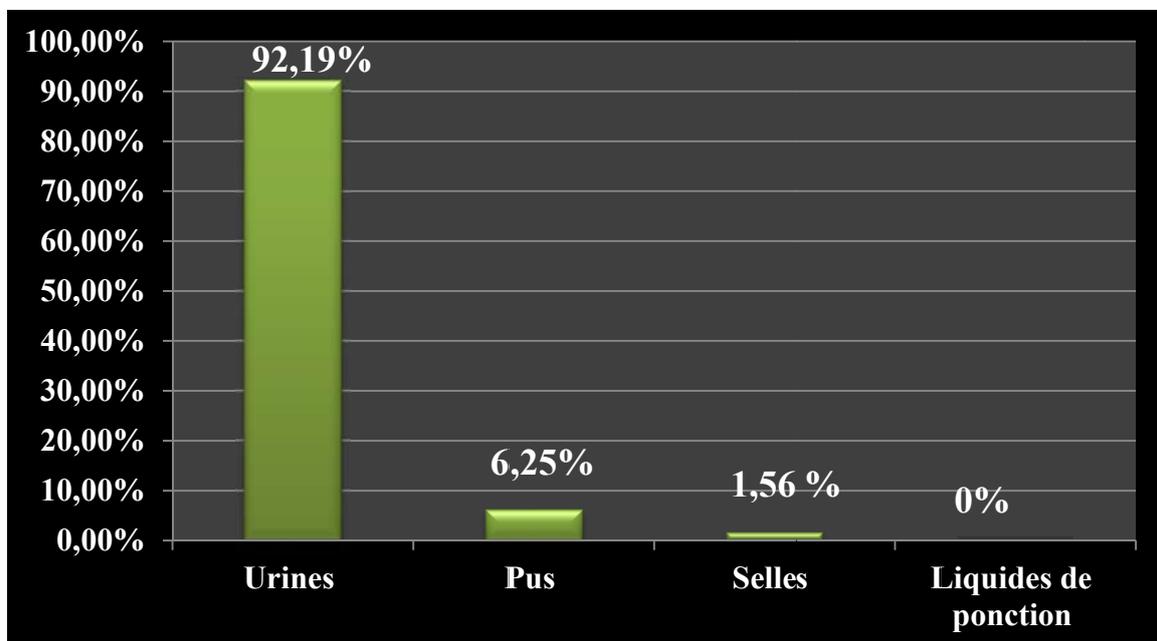


Figure n°14 : Répartition des souches par nature de prélèvements.

#### IV.2.4. Répartition des souches par sexe

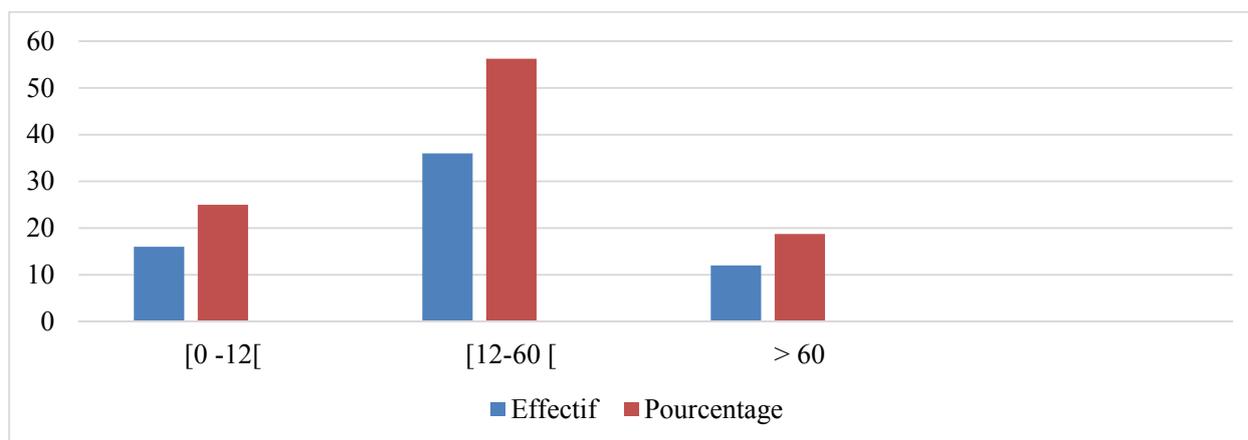
D'après les résultats obtenus, les femmes présentent un taux d'infections plus élevé avec un pourcentage de **81,25%** (52 Femmes) comparés aux hommes qui présentent un taux de **18,75%** (12 Hommes). Cette répartition est montrée dans le tableau suivant :

**Tableau V** : Répartition des souches par sexe.

Sexe	Effectif	Total
<b>Féminin</b>	52	81,25%
<b>Masculin</b>	12	18,75%
<b>Total</b>	64	100%

#### IV.2.5. Répartition des souches selon l'âge

La figure N°15 montre que les taux d'infection obtenus sont variables chez les différentes catégories d'âge, la tranche d'âge allant de 12 ans à 60 ans est la plus touchée par rapport aux autres tranches avec un taux de **56,25%**. Le tableau ci-dessous indique la comparaison.



**Figure n°15** : Répartition des souches par catégories d'âge.

### IV.3. Détermination du profil d'antibiorésistance

La détermination de la sensibilité aux antibiotiques est réalisée par la méthode de diffusion sur gélose Mueller-Hinton. Les diamètres critiques sont définis pour chaque antibiotique par le Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2010).

Les diamètres d'inhibition autour des disques sont mesurés, puis ils sont comparés aux diamètres critiques rassemblés (Voir l'annexe). Il convient de noter toutefois sur une fiche de

résultat d'antibiogramme (Voir l'annexe), qu'une souche dont la sensibilité aux antibiotiques est ainsi évaluée peut être déclarée " sensible (S), résistante (R), intermédiaire (I) ".

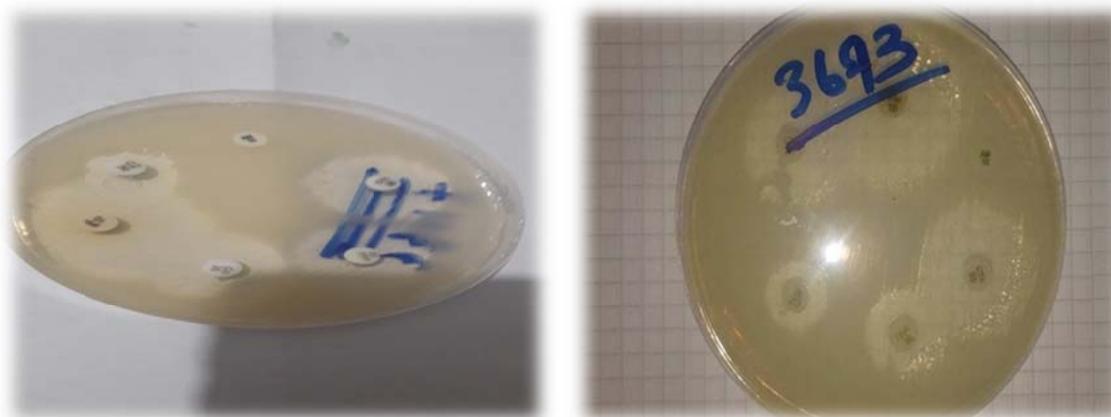


Figure n°16 : L'antibiogramme d'*E. coli*.

#### IV.4. Résistance des souches aux Céphalosporine de troisième génération (CTX)

Selon les résultats des antibiogrammes 9,38% (06/64) souches ont été définies comme résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération.

##### IV.4.1. Répartition des souches résistantes par espèces

Les différents taux de résistance aux  $\beta$ -lactamines testés (CTX) sont donnés dans la figure ci-dessous

La résistance aux C3G a été détectée chez 03/06 souches (50%) de *E. coli*, 02/06 souches (40 %) d'*Enterobacter sp* et 01/06 souche (17%) de *Klebsiella pneumoniae*.

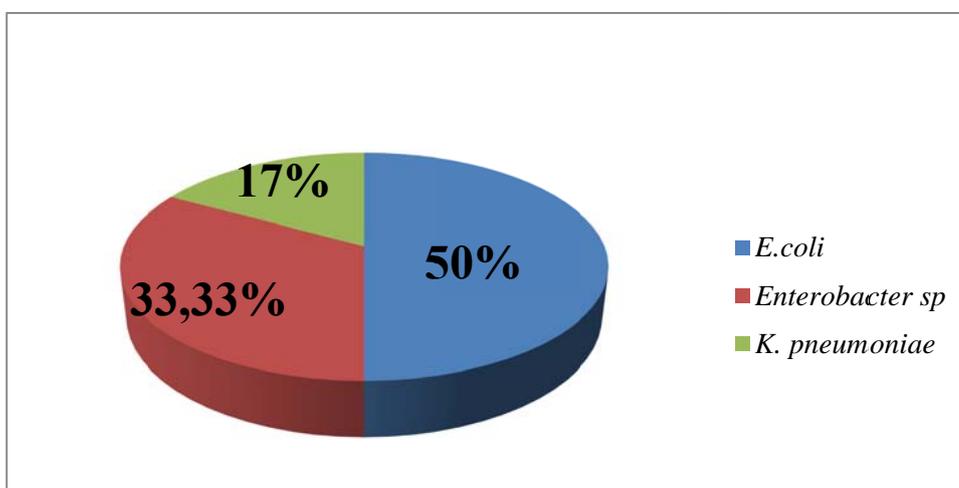


Figure n°17 : Répartition d '*E. coli*, *Enterobacter sp* et *Klebsiella pneumoniae*.

#### IV.4.2. La répartition en fonction de la nature de prélèvement

La répartition de 06 souches appartenant aux Entérobactéries (03 de *E.coli*, 02 d'*Enterobacter sp* et 01 de *Klebsiella pneumoniae*) en fonction de la nature de prélèvement est comme suite :

05 prélèvements urinaires (05/06) avec un taux de 83,33%, (01/06) avec un taux de 16,67% prélèvement de pus et aucune souche résistante n'est isolée à partir de selles et liquides de ponctions.

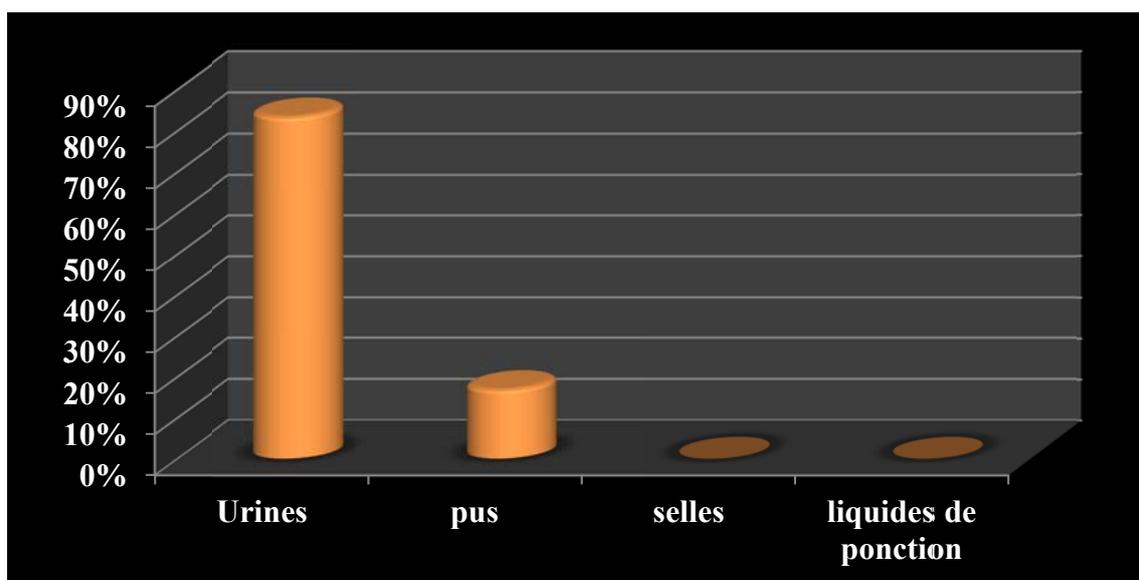


Figure n°18 : Répartition des souches résistantes aux CTX selon les types de prélèvements.

#### IV.4.3. Répartition des souches selon l'âge des patients

Le tableau VII montre que les taux de résistance aux Céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération obtenus sont variables chez les différentes catégories d'âge, la tranche d'âge allant de 12ans à 60 ans est la plus touchée par rapport aux autres tranches avec un taux de 50%.

Le tableau ci-dessous indique la comparaison :

Tableau VI : Répartition des souches selon l'âge des patients.

Tranche d'âge	Effectifs	Pourcentage %
[0-12[	02	33,33%
[12-60[	03	50%
>60	01	16,67%
<b>Total</b>	<b>06</b>	<b>100%</b>

#### IV.4.4. Répartition des souches selon le sexe

D'après les résultats obtenus, les femmes présentent un taux de résistance aux CTX plus élevé avec un pourcentage de 66,67% (04/06) comparés aux hommes qui présentent un taux de 33,33% (02/06). Cette répartition est montrée dans la figure 19.

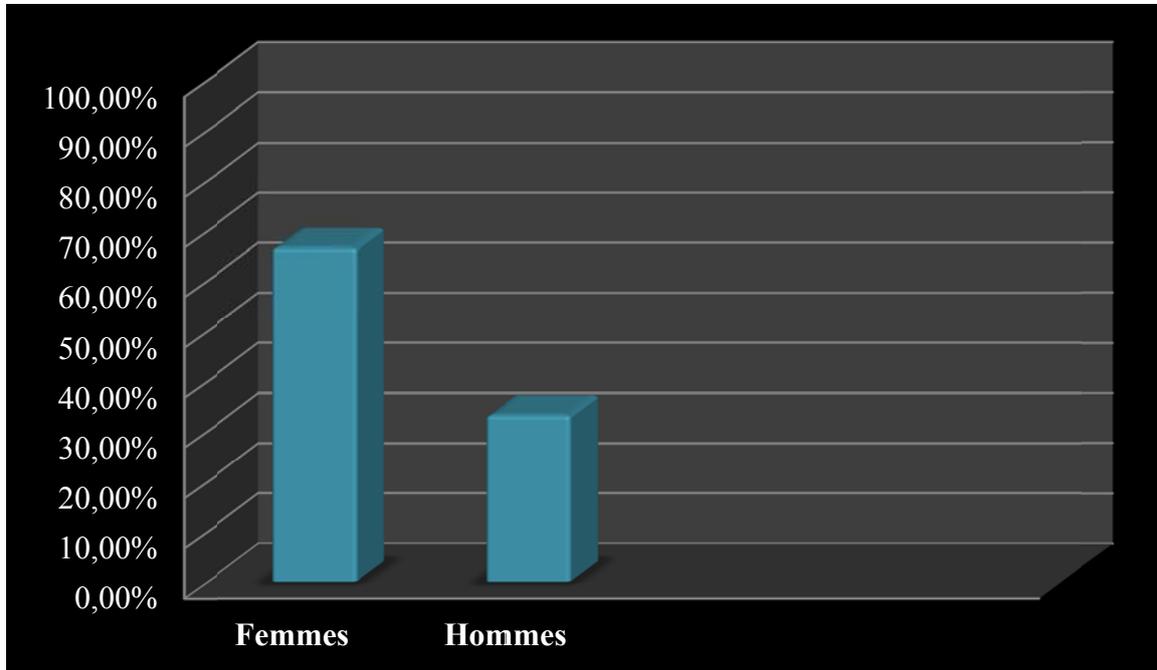


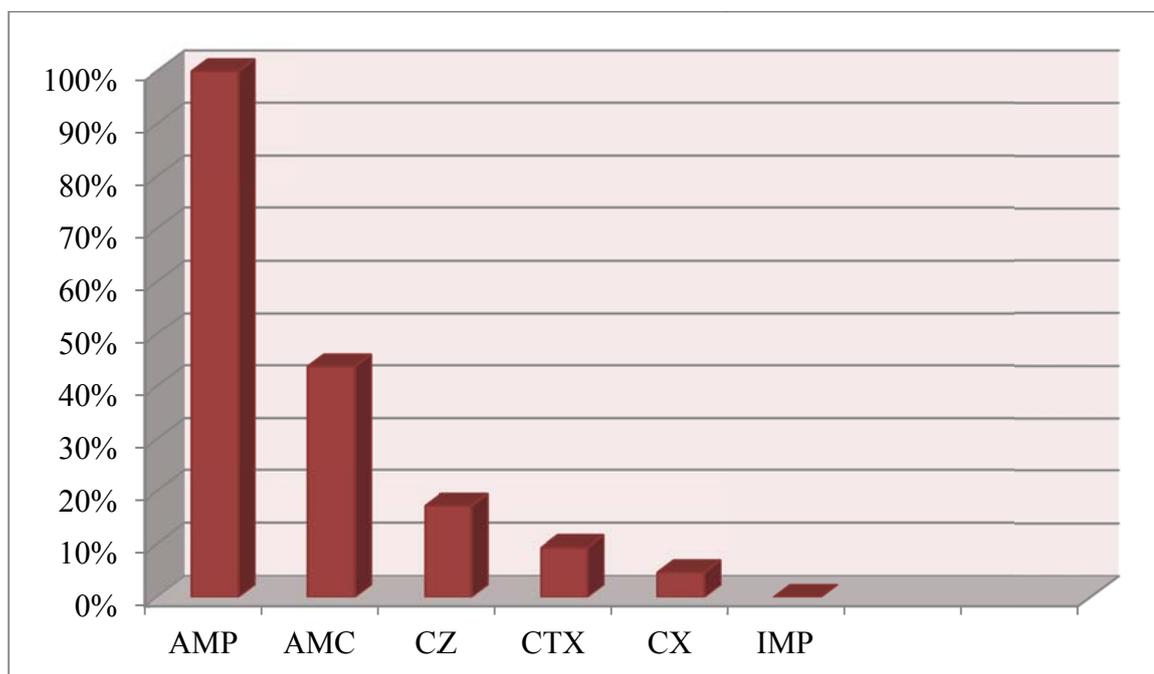
Figure n° 19 : Répartition des souches résistantes au Céfotaxime selon le sexe de patient.

#### IV.5. Etude de la résistance des bacilles à Gram négatifs aux différentes classes des $\beta$ -lactamines

64 des souches des bacilles à Gram négatifs sont résistantes aux  $\beta$ -lactamines. Les résultats de la sensibilité aux  $\beta$ -lactamines des souches collectées au niveau de laboratoire de Bouira sont montrés dans le tableau (Voir annexe).

#### IV.5.1. Le taux de résistance des souches étudiées vis-à-vis des $\beta$ -lactamines

Les taux de résistance de ces souches vis-à-vis des antibiotiques testés sont représentés dans la figure suivante :



**Figure n°20 :** Taux de résistance vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines.

D'après la figure 20, le taux de résistance reste élevé allant jusqu'à 100% pour l'Ampicilline, 43,75 % pour l'Amoxicilline/acide clavulanique, 9,3% pour Céfotaxime et 4,69 pour Céfoxitine.

On note un taux de résistance de (15,63%) au Céfazoline et aucune résistance n'a été observée vis-à-vis de l'Imipenème.

#### IV.5.2. Analyse des phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### ➤ DD-test

Le DD-test était positif avec 02 souches sur 06 (01 *Esherichia coli*, 01 *Enterobacter sp* qui ont présenté une synergie vis-à-vis de (l'Aztréonam, Amoxicilline,céfotaxime Céfazidime , Céfoxitine). Aucune image de synergie n'a été observée chez les autres souches, les figures ci-après montrent des exemples de DD-test positif.



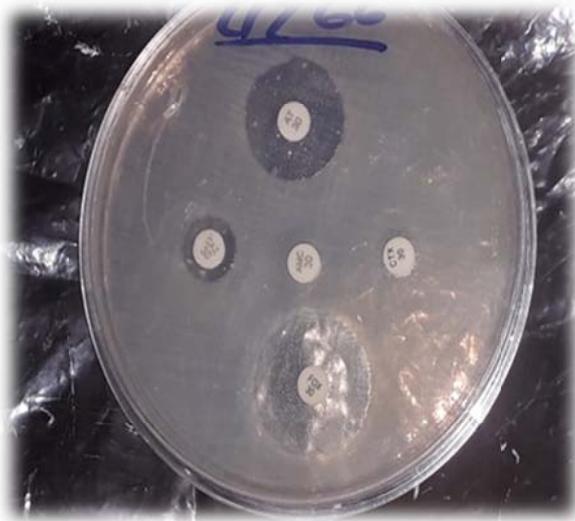
**Figure n°21 :** Image de synergie positive sur gélose Mueller Hinton  
Chez la souche 3260 (*Escherichia coli* productrice d'une BLSE).



**Figure n°22 :** Image de synergie positive sur gélose Mueller Hinton  
chez la souche 2891 (*Enterobacter sp* productrice d'une BLSE).

L'utilisation des céphalosporines de troisième génération a permis le développement de la résistance enzymatique chez les entérobactéries par production de bêta-lactamases à spectre étendue (BLSE) (Lagha, 2015).

Les souches ayant une image de synergie négative, présentant une résistance aux Céphalosporine de troisième génération (C3G) (Figure 23).



**Figure n° 23 :** Image de synergie négative sur gélose Mueller Hinton chez la souche 4266 (*Escherichia coli* non productrice d'une BLSE).



**Figure n° 24 :** Image de synergie négative sur gélose Mueller Hinton chez la souche 53 (*Escherichia coli* non productrice d'une BLSE).

➤ **Double disque ( Test de confirmation)**

Pour les souches qui ne présentent pas une image de synergie, un double disque est effectué pour confirmer la production d'une BLSE qui peut être masquée par un autre mécanisme de résistance, la figure suivante montre un double disque positif.



Figure n° 25 : Double disque positif.



Figure n° 26 : Double disque négatif.

### Discussions

Les entérobactéries sont les bactéries les plus fréquemment isolées dans les laboratoires de bactériologie et qui sont responsables de nombreuses infections communautaires et nosocomiales. Particulièrement dans les pays en voie de développement. (Bao et al., 2013).

Cette étude a été effectuée sur un collectif de 64 souches de bacilles à Gram négatif isolées au niveau de laboratoire d'analyses médicales privé à Bouira.

Dans l'ensemble des entérobactéries isolées, on note que *Escherichia coli* reste l'espèce la plus fréquente (60,93%), suivie par *Klebsiella pneumoniae* (14,06%).

Par contre En Tunisie *E. coli* occupe aussi la première place mais avec un pourcentage très élevé à 81,7% suivi par *K. pneumoniae* avec un taux de 3.7% (Péan et al., 2001).

Une autre étude à Meknes a montré que *E. coli* représente l'espèce prédominante (80 %), suivi de *Klebsiella spp* (10 %). (Lahlou et al., 2009).

Alors que, *Proteus sp* et *Enterobacter sp* occupent la dernière place avec des taux d'isolement de 19.3% et 18.6% respectivement (Messai et al., 2008). Le même classement a été rapporté par (Nijssen et al., 2007) mais avec des pourcentages de 2.9% pour *Enterobacter sp* et de 2.2% pour *Proteus mirabilis*.

Notre étude est en accord avec les études de Messai et al., 2007 et Nijssen et al., 2007 dont *Enterobacter sp* et *Proteus mirabilis* occupe aussi la dernière place mais avec des pourcentages différents (7,81%) et (6,25%) respectivement.

Aussi, ces espèces sont réparties différemment selon le site de prélèvement. Le site urinaire est le principal site d'infection, 92,19% des isolats proviennent des urines et 6,25% des pus.

En Tunisie, un taux de 60% des souches isolées dans les urines, est rapporté par (Mkaouar et al., 2008). Cela est en rapport avec la physiopathologie de l'infection urinaire qui est en général ascendante et il existe une forte colonisation du périnée par les entérobactéries d'origine digestive, et en particulier *Escherichia coli*. À cela s'ajoutent des facteurs spécifiques d'uropathogénicité. Ainsi, *Escherichia coli* possède des adhésines capables de lier la bactérie à l'épithélium urinaire et d'empêcher son élimination. *Klebsiella* et *Proteus* sécrètent une uréase qui alcalinise l'urine dont le pH, naturellement acide, empêche la prolifération des germes (Sekhsokh, 2008).

Le sexe et l'âge sont des facteurs de risque importants pour contracter une infection urinaire.

De façon générale et toutes catégories d'âges confondues, les femmes sont plus à risque de développer une infection urinaire (Daniel et Williamson, 2003).

En effet, dans notre étude il y a une prédominance du sexe féminin avec un pourcentage de 81,25% contre 18,75% du sexe masculin. Cette susceptibilité féminine à développer cette infection est rapportée également par différentes études, nationales et internationales.

En Algérie 53.08% des infections urinaires (IU) sont enregistrées chez des femmes, contre 46,92% chez les hommes (Brahimi, 2013).

Alors qu'à El Jadida 85% de ces infections sont observées chez des patients de sexe féminin (Nadmi, 2010).

En Espagne les fréquences enregistrées sont de l'ordre de 80,5% pour le sexe féminin et de 19,5% pour le sexe masculin.

Alors que le centre hospitalier Lyon-sud en France a trouvé une fréquence d'IU de 84,6 % chez les femmes et de 15,4 % chez les hommes. (Girard et al., 2006).

On déduit donc que les facteurs de risque chez la femme sont supérieurs à ceux de l'homme ce qui explique la nette prédominance féminine en matière d'infections urinaires.

Cette fréquence d'infections plus élevée chez les femmes s'explique par plusieurs facteurs qui favorisent la colonisation du vagin et de l'urètre par des bactéries d'origine digestive. :

- la faible longueur de l'urètre
- la modification de l'acidité vaginale par la diminution normale des hormones
- les sécrétions vaginales après la ménopause
- certaines habitudes d'hygiène (utilisation de produits qui déséquilibrent la flore bactérienne habituelle du vagin, de savon ou de gels spermicides susceptibles de modifier le pH).

De plus, la grossesse est aussi un facteur favorisant l'infection car la compression de l'utérus entraîne une dilatation voire une certaine obstruction des uretères. **(Brahimi, 2013).**

D'autre part, la fréquence augmente avec l'âge. Nos résultats approuvent ça, on note que la catégorie de (12-60) a un taux plus élevé (56,25 %) par rapport aux autres catégories. Cette constatation a été rapportée par d'autres auteurs :

Selon **Bouchakour M, 2010**, la tranche d'âge des adultes semble être la plus concernée avec un pourcentage de 90%.

Une étude nationale à El Jadida était montrée que 65% des patients sont des adultes **(Nadmi, 2010).**

Ces résultats s'expliquent par les deux périodes qui sont plus propices : en début d'activité sexuelle et en période post-ménopausique.

En période pré ménopausique, les principaux facteurs de risque de cystites aiguës sont le coït, l'exposition aux spermicides, les antécédents d'infections urinaires et un traitement antibiotique récent.

En période post-ménopausique, les principaux facteurs de risque sont les anomalies anatomiques ou fonctionnelles du tractus urinaire comme l'incontinence, le cystocèle. Lors de cette période, l'absence relative d'oestrogènes favorise la perte des lactobacilles au niveau de la flore du vagin, l'élévation du pH vaginal, l'augmentation de la colonisation de l'urètre par *E. coli* et donc apparition d'infections.

L'étude de la sensibilité des bacilles à Gram négatif isolés aux  $\beta$ -lactamines testées permet de dégager plusieurs points.

Nos résultats montrent un niveau de résistance important pour l'ampicilline (allant jusqu'à 100 %). Cette situation générale est la conséquence de la pression de sélection due au large usage des  $\beta$ -lactamines. De plus ces résistances acquises du fait de leur déterminisme plasmidique ont un grand pouvoir de dissémination (**Brahimi, 2013**).

Un bon niveau d'activité pour les céphalosporines de troisième génération (9,37%), l'évolution de la résistance des entérobactéries à cette génération est liée à l'émergence et à la diffusion de certains mécanismes de résistance dont le plus important est la production d'une  $\beta$ -lactamase à spectre élargi (**Mkaouar et al., 2008**).

Une autre étude réalisée à RABAT révèle qu'un niveau important pour la résistance à l'Ampicilline avec un taux de (69,74%) (**Brahimi, 2013**).

Une étude réalisée au laboratoire de microbiologie de l'hôpital des spécialités de Rabat (HSR), évaluant la résistance à l'ampicilline avec un taux de 67,9%. (**Ait Miloudi, 2011**).

A l'échelle nationale, et par comparaison avec d'autres études, le taux de résistance de AMP et CTX enregistrés dans notre travail sont supérieurs à ceux trouvés pour les souches lors de l'étude réalisée à l'hôpital D'AMIZOUR (W. BEJAIA). Le pourcentage enregistré de cette étude est de 66 % et 7,09 % respectivement (**Touati et al., 2003**).

On note que les taux de résistance des souches d'entérobactéries aux  $\beta$ -lactamines sont élevés à l'exception de l'imipénème qui reste actif sur toutes les souches. Nos résultats montrent que l'imipénème est la seule  $\beta$ -lactamine active pouvant être utilisée comme un traitement alternatif pour ces souches résistantes au cefotaxime et ceftazidime. Selon les anciennes études, ce dernier considéré, pour longtemps, comme un antibiotique de choix pour les cliniciens (**Mansour et al., 2008**).

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.

✚ Modification des cibles (PBP Penicillin Binding Protein) (**Bouchakour, 2010**).

Concernant la résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération : (9,38%) observé chez souches d'entérobactéries dont 2 espèces d'*E.coli* sont productrice de BLSE. Notre résultat est supérieur par rapport à ce qui est rapporté dans les hôpitaux de Bejaia en Algérie 5,8% (**Touati et al., 2006**).

*Escherichia coli* est caractérisé par le taux le plus élevé de résistance 50% vis- à vis au C3G.

Par contre selon Mkaouar **et al, 2008**, un taux de 37% est enregistré pour *Klebsiella Pneumoniae*. Ce taux élevé est probablement dû au fait que cette souche est productrice des enzymes inactivant les C3G tel que les BLSE et les céphalosporinases (**Carrër et Nordmann, 2009**).

Dans notre série, la répartition selon le type de prélèvement révèle que les souches résistantes ont été isolées principalement à partir des urines et des pus. Les prévalences les plus élevées des souches résistantes aux C3G ont été observées dans les urines (83,33%).

Tandis qu'en 2008, un pourcentage de 52% été observé chez les souches résistantes aux C3G dans les liquides de ponction, la majorité des liquides de ponction provenaient de malades hospitalisés dans les unités de soins intensifs, qui sont le plus souvent porteurs de dispositifs invasifs (**Mkaouar et al., 2008**).

*Conclusion*

## Conclusion

L'analyse bactériologique des divers prélèvements effectués au niveau de laboratoire privé de Bouira a permis d'isoler 64 bacilles à gram négatif, dont 63 (98,43%) souches d'entérobactéries et une souche (1,56%) de *Pseudomonas aeruginosa* durant une période de un mois.

Les résultats d'identification ont montré une prédominance d'*Escherichia coli* 39 (60,93%), suivi de 9 (14,06%) *Klebsiella pneumoniae* et en dernier 1 (1,56%) de *Pseudomonas aeruginosa*.

Les femmes présentent un taux d'infections plus élevé avec un pourcentage de 81,25%.

La plupart des souches résistantes au C3G ont été isolées à partir de prélèvement urinaire avec un taux de 83,33%,

La tranche d'âge allant de 12 à 60 ans est la catégorie la plus touchée avec un taux de résistance au C3G de 50%.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques nous a permis de constater des taux de résistance importants aux différentes  $\beta$ -lactamines utilisées.

Le taux de résistance chez les souches isolées est toujours élevé jusqu'au 100% pour l'ampicilline.

Parmi les 64 souches isolées ; 3 souches sont révélées productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu.

Les bacilles à Gram négatif sont des germes responsables de pathologies variées, fréquentes et parfois redoutables. Ce caractère redoutable des infections à bacilles à Gram négatif est dû en grande partie, au pouvoir pathogène et à leur grande capacité de résistance aux antibiotiques.

En perspectives, nos résultats obtenus au cours de notre étude restent préliminaires et méritent d'être exploités et complétés par :

- ✚ L'étude d'un plus grand nombre de souches ;

- ✚ L'étude de certains facteur de risque (tel que l'âge, le sexe du patient, antibiothérapie, l'hospitalisation préalable et diabète, etc.) dans l'acquisition de souches résistantes ;
- ✚ L'utilisation de la biologie moléculaire pour identifier les gènes qui codent pour les  $\beta$ -lactamases;
- ✚ Identification de type de  $\beta$ -lactamases par des réactions de PCR et séquençage des gènes ;
- ✚ Recherche des gènes de résistance aux autres familles d'antibiotiques associés aux  $\beta$ -lactamases.

# *Références*

## A

**Adzitey F. 2015.** Antibiotic classes and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from selected poultry; a mini review. University for Development Studies Ghana. *World's Veterinary Journal*, **5**: 36-41.

**Ait Miloud K. 2011.** L'infection urinaire: expérience du laboratoire de microbiologie de l'hôpital des spécialités de rabat. . Thèse de doctorat. Université MOHAMMED V Rabat. 82P.

**Avril J. M., Dabernat H., Monteil D. H. 2000.** Bactériologie clinique. 3<sup>ème</sup> Ed. Ed Ellepses. Paris. 602 P.

**Ayad A. 2017.** Etude des mécanismes de résistance aux antibiotiques chez *Esherichia coli* au niveau des hopiteaux de l'Ouest algérien. Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen. 139P.

## B

**Bakour R. 2008.** Prevalence and characterization of extended-spectrum b-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). *Pathologie Biologie*, **56**: 319–325.

**Bao L., Peng R., Ren X., Ma R. L., Wang Y. 2013.** Analysis of some common pathogens and their drug resistance to antibiotics. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, **29**: 135–139.

**Berthélémy S .2016.** L'examen cyto bactériologique des urines. Ed Elsevier Masson SAS. **556** :57-59.

**Bonnet R. 2006.** B-lactamines et entérobactéries. Chapitre 15. Livre antibiogramme. Paris. ESKA: 2<sup>ème</sup> édition. p 143.

**Bonacorsi S. 2007.** Examen cyto bactériologique des urines. *In* : **Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E., Quentin R.** Bactériologie médicale: Techniques usuelles. Ed Elsevier Masson. Paris. P :135-143.

**Birnbaum J., vervloet D. 1997.** Allergie aux penicillines. *Revue française d'allergologie*. **37**:29-35.

**Bouchakour M., Zerouali K., Gros Claude J. D., Amarouch H., El Mdaghri N., Courvalin P., Timinouni M. 2010.** Plasmid-mediated quinolone resistance in expanded spectrum beta lactamase-producing Enterobacteriaceae in Morocco. *J Infect Dev Ctries*, **4**:779–803.

**Bouanchaud D.H. 1986.** Beta lactamines : structure et nomenclature. **11** : 643P.

**Brahimi L. 2013.** Sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries isolées d'infections urinaires. Thèse de Doctorat. Université Mohammed V-Souissi . Rabat.93P.



**Carle S.2009.** La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important !.Le parrainage des antimicrobiens : Vision 2010, **42**: 6-21.

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

**Cavallo J.D., Fabre R., Jehl F., Rapp C., Garrabé E. 2004.** Bêta-lactamines. *EMC-Maladies Infectieuses*, **1**:129-202.

**Chassagne C . 2012.**Caractérisation phénotypique des souches d'entérobactérie produisant une oxacillinase-48 isolées lors d'une épidémie survenue au CHU de Nancy en 2009/2011. Université de lorraine. Thèse de doctorat.110P.

**Courvalin P., Timinouni M. 2010.** Plasmid-mediated quinolone resistance in expanded spectrum beta lactamase-producing Enterobacteriaceae in Morocco. *J Infect Dev Ctries*, **4**:779–803.



**Daniel J .G .T, Williamson D. 2003.** Les infections urinaires : une approche clinique. *Pharmactuel*, **36** :246-255.

**Dres V-S., Frantchez V., Pintos M., Bataglino M-N., Torales M., Díaz A., Dufrechou C. 2010.** Etiología de la infección urinaria de adquisición comunitaria y perfil de susceptibilidad de *Escherichia coli* a los principales agentes antimicrobianos. **26**: 14-24.

## F

**Faure S. 2009.** Transfert d'un gène de résistance aux  $\beta$ -lactamines *bla*CTX-M-9 entre *Salmonella* et les entérobactéries de la flore intestinale humaine : impact d'une antibiothérapie. Thèse de doctorat. Université Rennes de France.184P.

**Ferroni A., Nguyen L., Pron B., Quesne G., Brusset M-C., Berche R.1998.** Outbreak of nosocomial urinary tract infections due to *Pseudomonas aeruginosa* in a paediatric surgical unit associated with tap-water contamination. *Journal of Hospital Infection*, **39**: 301-307.

**Fritz H.K., Erik C.B., Peter D., Otto H., Axel R. 2017.**Manuel de poche de Microbiologie médicale.2<sup>ème</sup> Ed Lavoisier française. France.741P.

## G

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

**Gharout-Sait A. 2016.** Etude de la résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries hospitalières et communautaires. Thèse de doctorat. Université A.MIRA-BEJAI.195P.

**Girard R., de Montclos M., Bournaud C., Orgiazzi J.2006.** Dépistage des bactériuries à l'admission chez les patients diabétiques : peut-on abandonner les examens cyto bactériologiques urinaires systématiques. *Med Mal Infect.* **36**: 219–22.

**Goldstein F.M. 1991.** Place actuelle des tests rapides de détection de l'infection urinaire. **21** : 83– 88.

## J

**Janvier F., Kama E-M., Merens A., Cavallo J-D. 2008.** Les difficultés d'interprétation de l'examen cyto bactériologique des urines. *Revue Francophone des Laboratoires*, **406** : 1-8.

**Jauréguy F. 2009.** Déterminants cliniques et bactériens au cours des infections extra-intestinales dues à *Escherichia coli*. Service de Bactériologie-Virologie-Hygiène. France. **25** :221-223.

## L

**Lagha N .2015.** Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) isolées de l'hôpital de Laghouat. Thèse de Doctorat. Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen.80P.

**Lahlou A, Chegri M, L’Kassmi H. 2009.** Épidémiologie et résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées d’infections urinaires à l’hôpital militaire Moulay-Ismaïl de Meknès. Ed Elsevier Masson SAS.

**Limbirt M., Isert D., Klesel N., Markus A., Seeger K., Seibert G. 1991.** Antibacterial activities in vitro and in vivo and pharmacokinetics of Cefquinome (HR111V), a new broad spectrum cephalosporin. *Antimicrob. Agents Chemother*, **35 (1)**: 14-19.

## M

**Mangin L. 2016.** Antibiotiques et résistances : enquête sur les connaissances et les comportements du grand public. Thèse de doctorat. Université de lorraine.101P.

**Mariani-Kurkdjian P., Bingen E. 2007.** Analyse bactériologique des selles. *In* : **Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E. et Quentin R.** Bactériologie médicale: Techniques usuelles. Ed Elsevier Masson. Paris. P : 145-154.

**Messai Y., Iabadene H., Benhassine T., Alouache S., Tazir M., Gautier V., Arlet G., Bakour R. 2007.** Prevalence and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). *Pathologie Biologie*, **56**: 319–325.

**Michel C.1981.** Utilisation des antibiotiques en pisciculture. *Laboratoire d'Ichtyopathologie*,**11**:125-127.

**Mkaouar D., Mahjoubi F., Mezghani S., Znazen A., Ktari S., Hammami A. 2008.** Étude de la résistance des entérobactéries aux céphalosporines de troisième génération dans les hôpitaux de Sfax, Tunisie (1999–2005). *Médecine et maladies infectieuses*, **38** : 293-298.

**Muylaert A., Mainil I.J. 2012.** Résistances bactériennes aux antibiotiques :les mécanismes de leur « contagiosité ». *Faculté de Médecine vétérinaire*. Université de Liège. **156** :109-123.



**Nijssen S., Florijnb A., Bontena M.J.M., Schmitz F.J., Verhoef J., Fluit A.C. 2004.**  $\beta$ -lactam susceptibilities and prevalence of ESBL-producing isolates among more than 5000 European Enterobacteriaceae isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **24**: 585-591.

**Nordmann P., Carrer A. 2010.** Carbapenemases in enterobacteriaceae. *Archive de Pédiatrie*, **17** : 154-162.

**Nukaga M., Mayama K., Hujer A-M., Bonoma R-A., Knox J-R. 2003.** Ultrahigh resolution of class A beta-lactamase: on the mechanism and specificity of the extended spectrum SHV-2 enzyme. *Journal in Molecular Biology*, **328**:289-301.



**Ogawara H. 1981.** Antibiotic resistance in pathogenic and producing bacteria with special reference to betalactam antibiotics. *Microbial. Rev*, **4**:591-619.

**OMS. 2008.** Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale. 5<sup>ème</sup> Ed.50P.



**Péan Y., Goldstein F.W., 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** : 609-621.

**Philippon A., Arlet G., Jacoby GA. 2002.** Plasmid-determined AmpC-type  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother*, **4**: 8-11.

**Philippon A., Arlet G. 2005.** Les bêta-lactamases chez les bacilles à Gram-négatif : que de nouveautés en 15 ans !. Ed : Masson, Paris. **7** : 247-259.

**Ploy M.-C., Martin C. 2007.** Examen cyto bactériologique des urines. In : **Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E., Quentin R.** Bactériologie médicale: Techniques usuelles. Ed Elsevier Masson . Paris. P :165-169.



**Rodriguez-villalobos H., Struelens M.-J. 2006.** Résistance bactérienne par  $\beta$ -lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimateur. *Réanimation*, **15** :205-213.



**Sekhri-Arafa N. 2011.** Fréquence et marqueurs épidémiologiques de *Klebsiella pneumoniae* dans les services à haut risque infectieux au niveau du CHU Benbadis de Constantine. Thèse de doctorat. 187P.

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

**SOLBI S. 2013.** Effet du repiquage de *Pseudomonas aeruginosa* sur les caractères morphologiques, biochimiques et sensibilité aux antibiotiques. Thèse de doctorat. Université MOHAMMED V –SOUISSI.66P.



**Touati A., Benallaoua S., Kecha M., IDRE N. 2003.** Etude des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines des souches d'entérobactéries isolées en milieu hospitalier: cas de l'hôpital d'Amizour (w. Bejaia). **19** : 92-97.

**Touati A. 2006.** Caractérisation des phénotypes de résistances des entérobactéries aux  $\beta$ -lactamines isolées en milieu hospitalier : cas de deux hôpitaux de la wilaya de Bejaia. Thèse de doctorat. Université A/Mira de Bejaia. 91P.

**Touati M.2013.** Antibio-résistance des bacilles à Gram négatif non fermentants isolés au niveau des services de réanimation - CHU Annaba. Université Badji Mokhtar-Annaba. Thèse de doctorat. P139.



**Wladimir S., David., Trystram D. 2003.** Résistances aux  $\beta$ -lactamines. Service de Bactériologie-Hygiène -Pitié-Salpêtrière .Université Pierre et Marie Curie.78P.

**Wolff M., Joly-Guilloub M.L., Pajotc O. 2009.** Comparative review of carbapenems. Université Paris 7. Ed Elsevier Masson.*Réanimation*,17 : 242-250.

# *Annexes*

## Annexe I

### Les milieu de culture (OMS, 2008).

<b>Gélose Nutritive</b>		
Peptone	<b>05</b>	<b>g</b>
HM Peptone B	<b>1,50</b>	<b>g</b>
Extrait de levure	<b>1,50</b>	<b>g</b>
Chlorure de sodium	<b>5</b>	<b>g</b>
Agar	<b>15</b>	<b>g</b>
pH	<b>7,4</b>	

<b>Mueller Hinton</b>		
Hydrolysa de caséine	<b>17,5</b>	<b>g</b>
Infusion de viande de boeuf déshydratée	<b>300g</b>	<b>g</b>
Amidon de maïs	<b>1,5</b>	<b>g</b>
Agar Agar	<b>13</b>	<b>g</b>
Eau distillée	<b>1000</b>	<b>ml</b>
pH	<b>7,2-7,4</b>	

<b>Milieu Hektoen</b>		
Protéose peptone	<b>12</b>	<b>g</b>
Extrait de levure	<b>03</b>	<b>g</b>
Lactose	<b>12</b>	<b>g</b>
Saccharose	<b>12</b>	<b>g</b>
Salicine	<b>02</b>	<b>g</b>
Sels biliaire	<b>09</b>	<b>g</b>
Chlorure de sodium	<b>05</b>	<b>g</b>
Thiosulfate de sodium	<b>05</b>	<b>g</b>
Citrate de fer amoniacale	<b>1,5</b>	<b>g</b>
Citrate	<b>1,5</b>	<b>g</b>
Fushine acide	<b>0,10</b>	<b>g</b>
Bleu de bromophénol	<b>0,065</b>	<b>g</b>
Agar	<b>15</b>	<b>g</b>
pH	<b>7,5</b>	

## Annexe II

### Le matériel de laboratoire

Un réfrigérateur



Etuve



Bec bensun



Matériel usuel de laboratoire Exemple :  
Microscope



### Annexe III

Caractères culturels	Galeries biochimiques			Bactéries isolées
	TSI	Urée-Indole	Citrate de Simmons	
Ronde, bombé, opaque, lisse, crémeuse, non pigmenté	<b>Glu :+</b> <b>Sacc/Lac :+</b> <b>H<sub>2</sub>S :-</b> <b>Gaz :+</b>	<b>Urée : -</b>  <b>Indole :+</b>	-	<i>Esherichia coli</i>
Opaque, crémeuse, lisse, brillante, d'aspect gras	<b>Glu :+</b> <b>Sacc/Lac :+</b> <b>H<sub>2</sub>S :-</b> <b>Gaz :+</b>	<b>Urée : -</b>  <b>Indole :-</b>	+	<i>Enterobacter sp</i>
Ronde, bombé, opaque, lisse, sous forme de nappe	<b>Glu :+</b> <b>Sacc/Lac :-</b> <b>H<sub>2</sub>S :+</b> <b>Gaz :+</b>	<b>Urée : +</b>  <b>Indole :-</b>	+	<i>Proteus sp</i>
Lisse, bombé, brillante, humide, muqueuse, filante	<b>Glu :+</b> <b>Sacc/Lac :d</b> <b>H<sub>2</sub>S :-</b> <b>Gaz :d</b>	<b>Urée : -</b>  <b>Indole :-</b>	-	<i>Klebsiella sp</i>

## Annexe IV

**Tableau de lecture (bioMérieux, 2006).**

Tests	Composants actifs	QTE Mg/cup	Réaction/enzymes	Résultats	
<b>ONPG</b>	2-nitrophényl-BD-galactopyranoside	0,223	B galactosidase	Incolore	Jaune
<b>GLU</b>	D-glucose	1,9	Fermentation/oxidation (GLUcose) (3)	Bleu/bleu vert	Jaune/jaune gris
<b>ARA</b>	L-arabinose	1,9	Fermentation/oxidation) (3)	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>LDC</b>	L-lysine	1,9	Lysine Décarboxylase	Jaune	Rouge/orange
<b>ODC</b>	L-Ornithine	1,9	Omithine DéCarboxylase	Jaune	Jaune/rouge orange
<b>CIT</b>	Trisodium citrate	0,756	Utilisation du CITrate	Vert pale/jaune	Bleu-vert/bleu
<b>H2S</b>	Sodium thiosulfate	0,075	Production d'H2S	Incolore/ grisatre	Depot noir/ fin liserté
<b>URE</b>	Urée	0,38	UREase	aune	Rouge orange
<b>TDA</b>	L-tryptophane	0,39	Tryptophane DésAminase	TDA/ immédiat Jaune marron-rougeatre	
<b>IND</b>	L-tryptophane	0,19	Production d'INDole	Incolore Vert pale/jaune	Immediate Rose
<b>OX</b>	(voir notice de test oxydase)	-	Cytochrome OXYdase	(voir notice du test oxydase)	
<b>NO2</b>	(tube Glu)	-	Production de NO2	NIT+NIT 2/2-5 Jaune	Rouge

## Annexe V

**Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour les Entérobactéries (OMS, 2008).**

### Contrôle de qualité

#### *Escherichia coli* ATCC 25922

Antibiotiques testés « Beta lactamines »	Charge des disques	Diamètres critiques		
		(mm) Résistant	Intermédiaire	Sensible
Ampicilline	10 Ug	≤13	14-16	≥17
Amoxicilline+Ac. Clavulanique	20/10 Ug	≤13	14-17	≥18
Cefazoline	30Ug	≤14	15-17	≥18
Cefoxitine	30Ug	≤14	15-17	≥18
Cefotaxime	30Ug	≤14	15-22	≥23
Imipenem	10Ug	≤13	14-15	≥17

### Contrôle de qualité :

#### *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Antibiotiques testés « Beta lactamines »	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)		
		Résistant	Intermédiaire	Sensible
Ticarcilline	75 Ug	≤14	-	≥15
Ticarcilline+ ac. Clavulanique	75/10Ug	≤14	-	≥15
Piperacilline	100Ug	≤17	-	≥18
Ceftazidim	30Ug	≤14	15-17	≥18
Aztréonam	30Ug	≤15	16-21	≥22
Imipenem	10Ug	≤13	14-15	≥16

## Annexe VI

### Répartition des souches par catégories d'âge.

Tranche d'âge	Effectifs	Pourcentage %
[0-12[	16	25%
[12-60[	36	56,25%
>60	12	18,75%
<b>Total</b>	64	100%

## Annexe VII

Les Beta Lactamines							
Code	Souches	AMP	AMC	CZ	CTX	CX	IMP
118	<i>Proteus mirabilis</i>	12/R	18/S	11/R	20/S	22/S	25/S
200	<i>Escherichia coli</i>	10/R	32/S	22/S	29/S	21/S	20/S
347	<i>Escherichia coli</i>	10/R	10/R	10/R	25/S	20/S	25/S
209	<i>Escherichia coli</i>	12/R	35/S	19/S	28/S	21/S	24/S
2891	<i>Enterobacter sp</i>	09/R	08/R	18/S	12/R	9/R	20/S
2797	<i>Klebsiella oxytoca</i>	10/R	05/R	11/R	24/S	19/S	18/S
2684	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	09/R	19/S	18/S	23/S	23/S	17/S
2871	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	07/R	06/R	12/R	23/S	24/S	20/S
3203	<i>Escherichia coli</i>	11/R	13/R	19/S	27/S	20/S	22/S
3260	<i>Escherichia coli</i>	10/R	18/S	10/R	08/R	22/S	19/S
3175	<i>Escherichia coli</i>	09/R	22/S	09/S	26/S	27/S	22/S

<b>3101</b>	<i>Enterobacter sp</i>	10/R	08/R	11/R	26/S	30/S	24/S
<b>3120</b>	<i>Escherichia coli</i>	08/R	22/S	23/S	26/S	18/S	17/S
<b>3203</b>	<i>Escherichia coli</i>	11/R	13/R	22/S	23/S	20/S	24/S
<b>3430</b>	<i>Escherichia coli</i>	13/R	25/S	22/S	26/S	23/S	21/S
<b>3375</b>	<i>Escherichia coli</i>	09/S	20/S	22/S	29/S	21/S	30/S
<b>3536</b>	<i>Escherichia coli</i>	10/R	18/S	17/S	25/S	20/S	31/S
<b>3640</b>	<i>Escherichia coli</i>	09/S	20/S	19/S	27/S	20/S	32/S
<b>3686</b>	<i>Escherichia coli</i>	07/R	19/S	21/S	26/S	28/S	26/S
<b>3716</b>	<i>Escherichia coli</i>	10/R	22/S	19/S	28/S	18/S	22/S
<b>3671</b>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	12/R	10/R	14/R	24/S	20/S	17/S
<b>3886</b>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	09/R	18/S	19/S	23/S	22/S	23/S
<b>3734</b>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	08/R	23/S	19/S	25/S	18/S	17/S
<b>3836</b>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	13/R	19/S	18/S	24/S	19/S	20/S
<b>4117</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12/R	18/S	20/S	24/S	20/S	18/S
<b>53</b>	<i>Escherichia coli</i>	09/R	12/R	10/R	08/R	18/S	22/S
<b>468</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12/R	09/R	20/S	25/S	18/S	17/S
<b>500</b>	<i>Escherichia coli</i>	08/R	19/S	24/S	27/S	25/S	23/S
<b>404</b>	<i>Escherichia coli</i>	10/R	20/S	19/S	27/S	22/S	23/S
<b>4178</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12/R	25/S	22/S	28/S	19/S	24/S

<b>4266</b>	<i>Escherichia coli</i>	08/R	09/R	20/S	12/R	24/S	25/S
<b>149</b>	<i>Escherichia coli</i>	10/R	18/S	24/S	25/S	18/S	21/S
<b>598</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	09/R	22/S	23/S	28/S	20/S	23/S
<b>567</b>	<i>Escherichia coli</i>	12/R	24/S	23/S	28/S	23/S	26/S
<b>625</b>	<i>Enterobacter sp</i>	08/R	10/R	19/S	29/S	27/S	22/S
<b>666</b>	<i>Escherichia coli</i>	12/R	13/R	20/S	30/S	25/S	24/S
<b>2501</b>	<i>Escherichia coli</i>	10/R	28/S	25/S	24/S	20/S	19/S
<b>2621</b>	<i>Escherichia coli</i>	08/R	19/S	20/S	28/S	19/S	20/S
<b>2668</b>	<i>Escherichia coli</i>	10/R	18/S	22/S	27/S	23/S	22/S
<b>2868</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11/R	23/S	24/S	30/S	26/S	19/S
<b>2828</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	09/R	10/R	13/R	25/S	12/R	23/S
<b>3501</b>	<i>Escherichia coli</i>	10/R	22/S	11/R	26/S	22/S	24/S
<b>2833</b>	<i>Enterobacter sp</i>	08/R	09/R	22/S	12/R	23/S	26/S
<b>1951</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11/R	13/R	19/S	10/R	20/S	24/S
<b>3144</b>	<i>Escherichia coli</i>	10/R	13/R	20/S	26/S	21/S	26/S
<b>3643</b>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	10/R	12/R	25/S	30/S	27/S	24/S
<b>3852</b>	<i>Escherichia coli</i>	09/R	10/R	21/S	28/S	20/S	23/S
<b>3756</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	08/R	10/R	19/S	28/S	20/S	23/S
<b>2796</b>	<i>Proteus mirabilis</i>	10/R	11/R	22/S	30/S	21/S	23/S

<b>3501</b>	<i>Escherichia coli</i>	08/R	18/S	23/S	28/S	24/S	26/S
<b>4314</b>	<i>Escherichia coli</i>	10/R	08/R	22/S	30/S	23/S	25/S
<b>4381</b>	<i>Escherichia coli</i>	09/R	10/R	24/S	28/S	22/S	23/S
<b>4245</b>	<i>Escherichia coli</i>	12/R	19/S	23/S	30/S	20/S	22/S
<b>3005</b>	<i>Enterobacter sp</i>	11/R	13/R	20/S	24/S	12/R	23/S
<b>3041</b>	<i>Escherichia coli</i>	09/R	18/S	23/S	29/S	26/S	24/S
<b>3144</b>	<i>Escherichia coli</i>	08/R	10/R	23/S	27/S	26/S	25/S
<b>1816</b>	<i>Proteus mirabilis</i>	10/R	20/S	22/S	30/S	23/S	25/S
<b>1840</b>	<i>Escherichia coli</i>	11/R	12/R	23/S	28/S	21/S	24/S
<b>1299</b>	<i>Proteus mirabilis</i>	08/R	11/R	22/S	26/S	20/S	22/S
<b>1513</b>	<i>Escherichia coli</i>	11/R	13/R	20/S	28/S	23/S	25/S
<b>1233</b>	<i>Escherichia coli</i>	10/R	21/S	22/S	27/S	21/S	23/S
<b>1244</b>	<i>Escherichia coli</i>	09/R	22/S	20/S	25/S	19/S	22/S
<b>1245</b>	<i>Escherichia coli</i>	08/R	23/S	21/S	30/S	15/S	24/S
<b>1249</b>	<i>Escherichia coli</i>	12/R	24/S	26/S	29/S	18/S	22/S

## Résumé

L'objectif de la présente étude est d'étudier le profil de résistance aux  $\beta$ -lactamines chez 64 Bacilles à Gram négatif dont 63(98,43 %) qui sont des entérobactéries et 1 souche de *Pseudomonas aeruginosa* (1,56%) isolées pendant une période allant de 04/02/2019 au 28/05/2019, au niveau de laboratoire d'analyses médicales privé à Bouira.

Les urines, les pus et les selles sont les plus gros pourvoyeurs d'entérobactéries. 59/64 des souches ont été isolées dans les urines. L'espèce *E.coli* est la plus fréquemment rencontrée (60,93%) suivie de *Klebsiella pneumoniae* (9,38%), *Klebsiella oxytoca* (14,06%), d'*Enterobacter sp* (7,81%), *Proteus mirabilis* (6,25%) et *pseudomonas aeruginosa* (1,57%).

Les souches bactériennes ont été testées vis-à-vis de différentes classes des  $\beta$ -lactamines par la méthode de l'antibiogramme. Le taux de résistance reste élevé allant jusqu'à 100% pour l'Ampicilline.

L'étude de la sensibilité de ces souches vis-à-vis de céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération (céfotaxime) a permis de sélectionner 06 souches résistantes au CTX. 03/06 souches (de *Esherichia coli*, 02/05 souches d'*Enterobacter sp* et 01/06 souche de *Klebsiella pneumoniae*. Sur les 06 souches étudiées, 03 souches sont révélées probablement productrices de BLSE (DD-test). Un test de confirmation (méthode de double disque) est effectué pour les souches qui ne présentent pas une image de synergie.

**Mots clés :** Résistance,  $\beta$ -lactamines, bacilles à Gram négatif, BLSE.

## Summary

The objective of this study is to study the pattern of  $\beta$ -lactam resistance in 64 Gram-negative bacilli, of which 63 (98.43%) which are enterobacteriaceae and 1 isolated *Pseudomonas aeruginosa* strain (1.56%) during a period from 04/02/2019 to 28/05/2019, at the level of private medical analysis laboratory in Bouira.

Urine, pus and stool are the largest providers of enterobacteria. 59/64 strains were isolated in the urine.

The species *E.coli* is the most frequently encountered (60.93%) followed by *Klebsiella pneumoniae* (9.38%), *Klebsiella oxytoca* (14.06%), *Enterobacter sp* (7.81%), *Proteus mirabilis* (6.25%) and *pseudomonas aeruginosa* (1.57%).

The bacterial strains were tested against different classes of  $\beta$ -lactams by the antibiogram method. The resistance rate remains high of up to 100% for Ampicillin. The study of the susceptibility of these strains towards cephalosporin of 3rd generation (cefotaxime) made it possible to select 06 strains resistant to CTX. 03/06 strains (of *Esherichia coli*, 02/05 strains of *Enterobacter sp* and 01/06 strain of *Klebsiella pneumoniae*).

Of the 06 strains studied, 03 strains were probably found to produce ESBL (DD-test). A confirmation test (double disc method) is performed for strains that do not show a synergistic image.

**Key words:** Resistance,  $\beta$ -lactams, Gram-negative bacilli, BLSE.

## المخلص

ان الهدف من هذه الدراسة هو دراسة نمط مقاومة البيتا لكتامين في 64 عصيدة سالبة الجرام منها 63 (98,43%) من الانتيروبيكتيريا و 1,56% من البسودوموناس ايغوجينوزا المعزولة خلال مدة تتراوح من 2019/02/04 الى 2019/05/28 على مستوى مخبر التحاليل الطبية الخاص بالبويرة.

البول، القيح، والبراز هم أكبر مقدمي الانتيروبيكتيريا. لقد تم عزل 59/64 سلالة في البول. النوع اسيريشيا كولاي هو الاكثر شيوعا (60,93%) يليه كلبسيلا بنوموني (9,38%)، كلبسيلا اوكتوكا (14,06%)، اونتروباكترا اسبي (7,81%)، بروتويس ميغابيليس (6,25%) و البسودوموناس ايغوجينوزا (1,56%).

تم اختيار سلالات البكتيريا ضد فئات مختلفة من البيتا لكتامين بواسطة طريقة المضادات الحيوية. لا يزال معدل المقاومة مرتفعاً يصل الى 100 % بالنسبة لامبيسيلين.

مكّنت دراسة مدى حساسية هذه السلالات تجاه السيفالوسبورين من الجيل الثالث (السيفوتاكسيم) من اختيار 06 سلالة مقاومة لـ. (06/03 سلالة من اشيريشيا كولاي، 05/02 سلالة من الاونتروباكترا اسبي و 06/01 كلبسيلا بنوموني). (DD test) اختبار (BLSE) من بين ال 06-سلالات التي تمت دراستها، تم العثور على 03 سلالات منتجة تم اجراء اختبار التأكيد (طريقة القرص المزدوج) للسلالات التي لا تظهر صورة التازر.

**كلمات المفتاح:** المقاومة، البيتا لكتامين ، عصيدات سلبية الجرام، BLSE