



République Algérienne Démocratique Et Populaire

Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La

Recherche Scientifique

UNIVERSITE ABBÈS LAGHROUR KHENCHELA

Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie

Département De Biologie Moléculaire et Cellulaire

MÉMOIRE

Préparé pour l'obtention du diplôme de Master académique

FILIÈRE : Sciences Biologiques

Option: Microbiologie

Thème

**Évaluation de l'antibio-résistance des bacilles à Gram négatif
isolées à partir du
milieu hospitalier de Khenchela**

Présenté par :

- DEBBACHE Ghania
- NEMER Sabrina

Encadré par :

Mr. BOUSSAA A.

Soutenu Le : 05/06-2016

Devant le Jury :

Présidente : M ^{elle} DEROUICHE Faouzia	MCB	Univ.Abbès Laghrou-Khenchela
Encadreur: Mr. BOUSSAA Abdelhalim	MAA	Univ.Abbès Laghrou-Khenchela
Examinateur: Mr. LARBA Rabah	MCA	Univ.Abbès Laghrou-Khenchela

Promotion: Juin 2016

Ce travail a été réalisé dans l'établissement public hospitalier Ahmed Ben Bella de la wilaya de Khenchela et dans les laboratoires pédagogiques de l'université Abbès Laghrou Khenchela

Remerciements



A la fin de ce travail réalisé au sein des laboratoires de l'Université Abbés laghrour et à l'unité de Bactériologie de l'E.P.H. Ahmed Ben Bella de la wilaya de Khenchela, nous aimerions réserver ses lignes en signe de gratitude et de reconnaissance pour tous ceux qui ont apporté une contribution scientifique ou morale à ce modeste travail.

*Nos remerciements s'adressent d'abord au M^{lle} **Derouiche Faouzia** docteure à l'université Abbes Laghrour Khenchela. Vous nous faites un grand honneur en présidant ce jury. On vous prie de bien vouloir recevoir le témoignage de notre profond respect.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à **Dr Larba Rabah** docteur à l'université Abbes Laghrour, Khenchela. On vous remercie de nous avoir honorées par votre présence en tant qu'examinateur et pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire.*

*Nous remercions très vivement notre encadreur, **Mr Boussaa Abdelhalim** Vous nous avez guidés dans la réalisation de ce travail malgré vos multiples occupations. Infatigable, toujours disponible, aimable, ces qualités vous ont valu l'estime de tous les étudiants et forcent l'admiration de tous. Apprendre à vos côtés a été un réel plaisir. J'ai gardé de bons souvenirs de vos enseignements avec clarté et précision. Que Dieu vous récompense.*

Nos remerciements vont aussi au corps professoral et administratif de la Faculté des Sciences de la nature et de la vie, pour la richesse et la qualité de leur enseignement et qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée.

*Nous remercions M^r **Remadnia Rachid** (chef de service), **Samiha, Houda** et tout le personnel du laboratoire de l'E.P.H Ahmed Ben Bella de la wilaya de Khenchela pour nous avoir accueillies au sein de leur service.*

Enfin, un immense merci à, nos camarades de promotion, nos amies et nos collègues de travail pour les encouragements et soutiens inaltérables, sans qui ce travail de thèse n'aurait pas été possible.

*Merci à Dieu,
à qui je dois tout,
d'avoir guidé
mes pas et de
m'avoir donné la
volonté pour
accomplir ce travail.*



Dédicace

Je dédie ce travail, tout d'abord à

A ma chère mère

Ma douce et tendre mère. Quoique je fasse, je ne pourrais te rendre ce que tu as fait pour moi.

Si je suis arrivée là, c'est bien grâce à toi. Que dieu te donne longue vie et te protège.

A mon cher père

Tes conseils m'ont suivi et m'ont permis d'atteindre le bout du chemin. Sois fier de moi

Aujourd'hui et vois à travers ce travail mon amour sincère et ma gratitude profonde.

A ma chers frère: YASSINE

A ma tendre LOUDJAINÉ

A mes sœurs MALIKA, SIHAM, FOUZIA, RADHIA qui n'a jamais

cessé de m'encourager

pour qui je souhaite que du bonheur et la réussite pour ses études.

A toute personne qui me connaisse et me considère comme une amie

*A tous mes collègues de la promotion avec qui j'ai partagé les joies et
les difficultés durant ces années.*

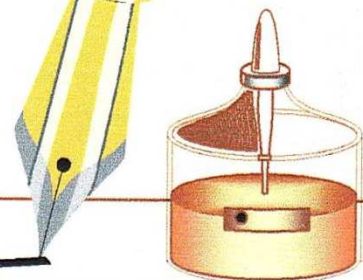
*Et plus particulièrement à Sabrina, Tu as été pour moi durant ces années
passées ensemble plus qu'une amie, une sœur. Toute ma gratitude et ma sympathie.*

Aux personnes qui m'ont encouragé et motivé, qui n'ont cessé d'œuvré

pour ma réussite et pour mon bonheur

Pour tous mercis.

Ghania



Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie,
le symbole de tendresse,
qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma mère*

Fatima

et épouse de mon père Warda

*A mon cher père, Helal, Aucune dédicace ne saurait exprimer
l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour
vous.*

*Rien au monde ne vaut les efforts
fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.
Ce travail et le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon
éducation et ma formation le long de ces années*

*A mes cher sœurs Asma ,Saliha... et mes frères Sabri ,
Mohamed....Et ma cher grande mère.*

*Je dédie ce mémoire, à tous ma famille Nemer
qui m'ont accompagné et soutenu particulièrement Fozia , Salim...
durant cette année de formation.*

Et à toutes mes amies

*Une spéciale dédicace a mon amies Ghania mon conseiller, et amie
fidèle,*

*qui m'a assisté dans les moments difficiles
et m'a pris doucement par la main pour traverser ensemble des
épreuves pénibles.*

Sabrina

Liste des figures

Figure N°01: Cycle β -lactame	3
Figure N°02: Classification des β -lactamines	4
Figure N°03: Observation microscopique d' <i>Eschérichia. coli</i> (a) coloration Gram, (b) micrographe électronique.....	9
Figure N°04: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (a) coloration de Gram (x1000), (b) colonies sur gélose ordinaire.....	16
Figure N°05: <i>Acinetobacter baumannii</i> sous microscope électronique.....	18
Figure N°06: Mécanisme d'action des β -lactamines.....	23
Figure N°07: Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle β -lactame.....	25
Figure N°08: Les BLSE dérivées de TEM.....	30
Figure N°09: BLSE dérivées de SHV.....	31
Figure N°10: La Galerie Api 20 ^E	41
Figure N°11: (a) Dépôt des disques pour les <i>Entérobactéries</i> . (b) Dépôt des disques pour les <i>Pseudomonas</i>	45
Figure N°12: Technique d'E-Test pour détermination de la CMI.....	47
Figure N°13: Disposition des disques d'antibiotiques pour recherche de BLSE.....	48
Figure N°14: Technique de test de Hodge	49
Figure N° 15 : Disposition des disques d'antibiotiques pour la synergie.....	50
Figure N°16: Fréquence des souches BGN isolées.....	52
Figure N°17 : Répartition des souches par sexe des patients.....	53
Figure N°18: Aspect macroscopique des souches des <i>BGN</i> sur gélose nutritive.....	54

Figure N°19 : Aspect macroscopique des souches des <i>BGN</i> sur gélose EMB.....	55
Figure N°20: Résultats de la coloration de gram sous microscope optique (X1000).....	55
Figure N°21 : Aspect macroscopique des <i>Pseudomonas</i> sous UV.....	56
Figure N°22: Taux de résistance aux β -lactamines des BGN.....	58
Figure N°23: Taux de résistance aux autres familles d'antibiotiques des BGN.....	59
Figure N°24 : Résultat de l'antibiogramme (β -lactamines)	61
Figure N°25 : Résultat de l'antibiogramme (autres que β -lactamines)	63
Figure N°26 : Résultats de la détermination des CMI par l'E-test.....	66
Figure N°27 : Résultats du test de Hodge (<i>K.pneumoniae</i>).....	67
Figure N°28 : Résultats du test d'inhibition à l'EDTA	67
Figure N°29 : Résultats du test de recherche de BLSE	68

Liste des tableaux

Tableau N°I : Caractères biochimiques d'identification des espèces du genre <i>Klebsiella</i>	12
Tableau N°II : Caractères biochimiques permettant la différenciation des deux espèces du genre <i>Enterobacter</i>	14
Tableau N°III: Répartition des souches selon la nature du prélèvement.....	53
Tableau N°IV : Résultat de l'identification biochimique des bactéries par les galeries API 20 ^E	57
Tableau N°V : Taux de résistance aux β -lactamines par espèces.....	58
Tableau N°VI : Taux de résistance aux autres familles d'antibiotiques par espèces.....	59
Tableau N°VII : Caractéristiques cliniques de la souche résistante aux carbapénèmes.....	60
Tableau N°VIII : Sensibilité des souches des BGN aux β -lactamines testées.....	62
Tableau N°IX : Sensibilité des souches des BGN aux antibiotiques autres que les β -lactamines.....	64
Tableau N°X : CMI ($\mu\text{g/ml}$) des souches résistantes aux β -lactamines.....	65

Liste des annexes

Annexes N°01: Classification des β -lactamases.....	90
Annexes N°02: Tableaux des concentrations critiques pour l'interprétation des CMI et des diamètres critiques des zones d'inhibition pour les <i>Entérobactéries</i>	91
Annexes N°03: Tableaux des concentrations critiques pour l'interprétation des CMI et des diamètres critiques des zones d'inhibition pour les <i>Pseudomonas</i>	92
Annexes N°04: Tableaux de lecture de la galerie API 20 ^E	93
Annexes N°05: Résultat de l'identification biochimique des bactéries par les galeries API 20 ^E	94
Annexes N°06: Composition des colorants de gram.....	96
Annexes N°07: Composition des milieux de culture utilisée.....	97
Annexes N°08: Composition des milieux d'identification.....	100
Annexes N°09: Composition des additifs.....	101
Annexes N°10: Préparation de l'étalon de turbidité McFarland 0,5.....	103
Annexes N°11: Préparation de la solution d'EDTA	104
Annexe N°12 : liste de matériel utilisé.....	105

ADH : Arginine dihydrolase.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AK: Amikacine.

AMC /AUG: Amoxicilline/Acide clavulanique.

AMP: Ampiciline.

AmpC: Chromosomal located cephalosporinase.

API20E : Analytical profile index 20E (E= Entérobacéries).

ATCC : American Type Culture Collection.

ATM: Aztréonam.

BGN : bacille à Gram négatif.

bla: beta-lactamase.

BLSE : β -Lactamase à Spectre Etendu.

BN : bouillon nutritif.

C: Chloromphénicol.

C1G: Céphalosporine de 1^{ère} génération.

C2G: Céphalosporine de 2^{ème} génération.

C3G : Céphalosporine de 3^{ème} génération.

C4G: Céphalosporine de 4^{ème} génération.

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

CAZ: Céfotazidime.

CIP: Ciprofloxacine.

Cm :Centimètre.

CMI: Concentration minimale inhibitrice.

CT : Colistine .

CTX: Céfotaxime.

CTX-M : Cefotaximase, first isolated at Munich.

CZ: Cefazoline.

DD-test : Double Disque Test.

DHA : Dharhan hospital.

DNase : Désoxyribonucléase

ECBU : Examen Cytobactériologique des Urines.

EDTA: Ethylenediamine tetra acetic acid.

EMB: Eosine bleu de méthylène.

EPH : Etablissement publique hospitaliers.

ETP: Ertapénème.

F: Nitofurane.
FF: Fosfomycine.
FOX: Céfoxitine.
G+C : Guanine+cytosine.
Glu : Glutamate ou acide glutamique
Gly : Glycine.
GN : Gélose nutritive.
GN: Gentamicine.
H : Heure.
H₂O₂ : Eau oxygénée.
H₂S : sulfure d'hydrogène.
I : Intermédiaire.
IMP : Imipenemase.
IMP: Imipénème.
IND: Indole.
IS : Insertion Sequence (séquence d'insertion).
KES : *Klebsiella, Enterobacter, Serratia*.
KF :Céfalotine.
LDC : Lysine décarboxylase.
LEV: Levofloxacin.
Lys : Lysine.
MDR : Multidrug resistance.
Mex : Multiple efflux.
MH : Mueller Hinton.
Min : minute.
ml : Millilitre.
mm : Millimètre.
MβL : métallo-bêta-lactamase.
NA: Acide nalidixique.
NaCl :chlorure de sodium.
NAG :N-acétylglucosamine.
NAM:Acide N-acétylmuramique.
NDM : *New Delhi* metallo-β-lactamase.
NET: Netilmicine.
ODC : Ornithine décarboxylase.

OXA : Oxacillinase.

PBP : Penicillin Binding Protein.

pH : Potentiel hydrogène.

PLP: Protéine liant les pénicillines.

PRL: Pipracilline.

R : Résistante.

RND : Resistance Nodulation cell Division.

S : Sensible.

Ser : Sérine.

SHV: Sulfhydryl variable.

Sp : Espèce.

SPP : Abréviation de species au pluriel représente l'ensemble des espèces du genre.

Subsp : Sous espèce.

SXT: Cotrimoxazole (Triméthoprime-sulfaméthoxazole).

TC: Ticarcillin.

TDA: Tryptophane désaminase.

TEM : Temoniera.

TIM: Ticarcilline + Acide clavulanique.

TOB: Tobramycine.

TSI : Triple Sucre à Identifié.

UFC : unité formant colonie.

UV : ultraviolet.

VIM : Verona IMipenamase.

VP : Vosges-proskauer.

Zn²⁺ : Zinc (2+).

Introduction

La découverte des antibiotiques au début du XXe siècle a constitué une véritable révolution pour le traitement des maladies infectieuses d'origine bactérienne. Les antibiotiques sont définis comme toute substance antibactérienne d'origine biologique, synthétique ou semi synthétique (**Lavigne, 2007**), capable d'inhiber sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs (**Perronne, 1999**).

Les antibiotiques peuvent être classés en se basant sur différents critères tels que leurs origines, leurs structures et leurs mécanismes d'action. Les β -lactamines constituent une famille majeure d'antibiotiques très largement utilisés en clinique. Ces molécules agissent en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne par fixation aux protéines liant les pénicillines (PLP), enzymes impliquées dans la synthèse du peptidoglycane chez les bacilles à Gram négatif (BGN) (**Bradford, 2001**).

Les BGN résistante aux antibiotiques expliquent qu'elles soient les bactéries les plus souvent impliquées en pathologie infectieuse humaine surtout en milieu hospitalier (**Verhaegen, 2004**).

Depuis plus de 20 ans, la résistance des entérobactéries aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) ne cesse de se renforcer notamment par l'acquisition de β -lactamases à spectre étendu (BLSE). De nombreuses études relatent la progression continue à l'échelle mondiale de ce type de résistance (**Coque et al., 2008**).

Les carbapénèmes sont connues pour leur stabilité vis-à-vis de la plupart des β -lactamases naturelles ou acquises. Cependant, on assiste, très récemment, à la description de plus en plus fréquente de souches résistantes à ces molécules (**Grall et al., 2011**).

L'émergence de la résistance aux carbapénèmes est l'un des problèmes les plus importants posé par la résistance aux antibiotiques car il existe peu d'alternatives thérapeutiques possibles (**Nordmann, 2010**).

Plusieurs études ont été menées sur la résistance aux antibiotiques dans le milieu hospitalier, mais dans l'autre main il y a aucun travail de ce genre est réalisé aux niveaux de la Wilaya de Khenchela.

De là, s'inscrit l'objectif de notre travail qui est de déterminer la fréquence de résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération et des résistances associées aux seins du milieu hospitalier dans la Wilaya de Khenchela.

Notre travail est divisé en 3 parties :

- Une 1^{ère} Partie, est consacrée à une synthèse bibliographique sur les β -lactamines et les BGN et leurs mécanismes de résistance aux β -lactamines, avant de définir plus précisément les BLSE.
- La 2^{ème} partie, décrit le matériel et méthodes pour l'analyse détaillée de nos souches cliniques isolées des patients hospitalisés aux différents services de l'hôpital de KHENCHELA.
- Enfin, la 3^{ème} partie, notre travail est réservé à la présentation et discussion de l'ensemble des résultats obtenus.

I. Généralités sur les β -lactamines

1. Définition

Les bêta-lactamines constituent la famille d'antibiotiques la plus importante, aussi bien par le nombre et la diversité des molécules utilisables que par leurs indications en thérapeutique et en prophylaxie des infections bactériennes. Cette large utilisation est due à leur spectre d'action, leur faible toxicité et à leur efficacité (**Cavallo *et al.*, 2004**).

La base commune à toutes les bêta-lactamines est le noyau azétidinone qui contient la structure carbonyle lactame laquelle est indispensable pour l'activité des molécules. À partir de cette structure, quatre groupes ont été développées par adjonction d'un cycle : les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes, les monobactames et les inhibiteurs des β -lactamases (**Bryskier, 1999**).

2. Structure

Les β -lactamines ont en commun une structure appelée l'anneau β -lactame, qui est formée de quatre membres : trois atomes de carbone et un atome d'azote. Cet anneau constitue la portion responsable de l'activité de ces molécules (**Fisher *et al.*, 2005**).

La structure de base des pénicillines, l'acide 6-aminopénicillanique, est constituée d'un cycle thiazolidine lié au cycle β -lactame (noyau « péname »). Par contre, les céphalosporines se distinguent chimiquement des pénicillines par le remplacement du cycle thiazolidine par un cycle dihydrothiazine (noyau « céphème ») avec un atome de soufre en position 1 (**Dbaiibo, 2000**). Leur noyau céphème est beaucoup plus stable que le noyau péname des pénicillines, ce qui permet aux céphalosporines de mieux résister globalement à l'action diverse des β -lactamases bactériennes.

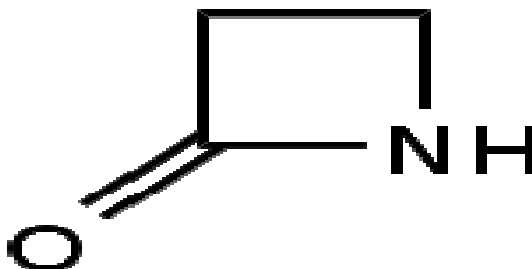
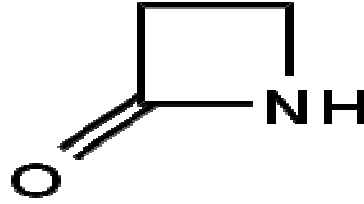


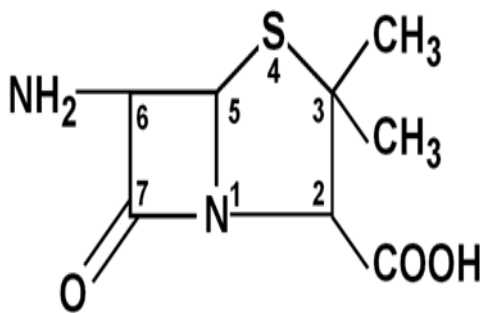
Figure N°01: Cycle β -lactame (**Bessard, 2004**)

3. Classification des β -lactamines

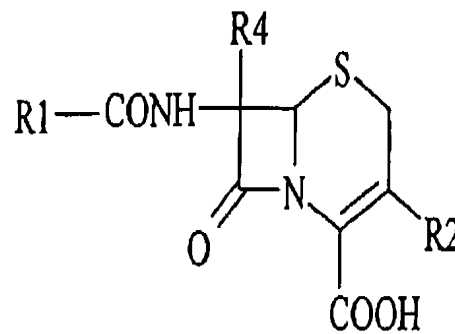
La famille des β -lactamines est répartie en quatre principaux groupes : les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes (Figure N°02) (Bryskier, 1999).



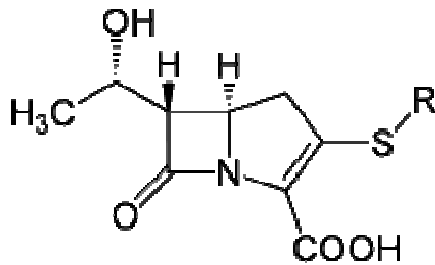
Cycle β -lactame



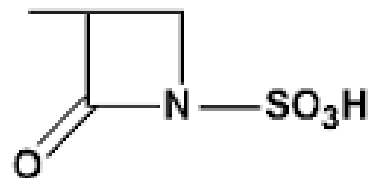
Les pénèmes (pénicillines)



Les céphèmes (céphalosporines)



Les pénèmes (carbapénèmes)



Les monobactames

Figure N°02: Classification des β -lactamines (Cavallo *et al.*, 2004)

3.1. Les pénèmes (pénicillines)

✓ Les pénicillines G (Benzylpénicillines) est la première pénicilline découverte par Fleming. Elle est produite par *Penicillium notatum*. Elle est active sur les cocci (à l'exception des staphylocoques dont la majorité produit une pénicillinase), la plupart des bacilles à Gram

positif, les anaérobies et les spirochètes. Elle est en revanche inactive sur la plupart des bacilles à Gram négatif.

✓ Les pénicillines M sont la méticilline fut le premier dérivé de la pénicilline capable de résister à la pénicillinase du staphylocoque. D'autres molécules sont également administrées lors d'infections à staphylocoque telles que l'oxacilline et la flucloxacilline.

✓ Les aminopénicillines sont des pénicillines à large spectre actives sur certains bacilles à Gram négatif non producteurs de céphalosporinases, Ces produits sont actifs sur certaines entérobactéries et sont utilisés que dans les infections urinaires (**Nauciel, 2000**).

✓ Les carboxypénicillines et les uréidopénicillines sont actives sur *Pseudomonas aeruginosa*, elles ont un spectre beaucoup plus étendu que celui des pénicillines A vers certains bacilles à Gram négatif. Elles restent sensibles aux pénicillinases mais sont moins sensibles aux céphalosporinases. La première molécule fut la carbénicilline, remplacée maintenant par la ticarcilline (**Cavallo et al., 2004**).

3.2. Les céphèmes (céphalosporines)

Les céphalosporines sont des antibiotiques appartenant à la grande famille des β -lactamines. La mise en évidence de cette famille a été initiée en 1945 par le professeur BROTZU (**Gootz, 1990**). Il a mis en évidence l'activité antibactérienne du filtrat d'un champignon dénommé *Cephalosporium acremonium*, isolé à partir d'eau de mer prélevée à proximité d'une décharge publique. Ces β -lactamines sont toutes à large spectre et leur intérêt réside surtout dans leur activité sur les bacilles à Gram négatif.

Actuellement, il existe quatre générations de céphalosporines classées selon leur date de mise sur leur spectre d'activité :

***Première génération (C1G):** Comme la céfalotine, céfaloridine, sont essentiellement efficaces contre les bactéries pathogènes Gram positif comme *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pneumoniae* et à quelques entérobactéries ne produisant pas de céphalosporinases inductibles comme *E. coli* et *Salmonella spp.* Ce sont les moins stables vis-à-vis de l'hydrolyse par les bêta-lactamases (**Limbirt et al., 1991**).

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

***Troisième génération (C3G):** Telles que céfotaxime, ceftazidime (**Jarlier et Nordmann, 2000**), se distinguent par un accroissement important de leur spectre antibactérien et par leur

stabilité à la plupart des β -lactamases comme les pénicillines et les céphalosporines chromosomiques des entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* (Cavallo *et al.*, 2004).

***Quatrième génération (C4G):** Telles que céfépime, cefpirome, sont à large spectre et présentent un gain d'activité sur les cocci à Gram positif, une activité sur *P. aeruginosa* et une meilleure résistance à l'hydrolyse par les céphalosporinases hyperproduites (Hardman et Limbird, 1998). Elles sont une substitution possible aux céphalosporines de troisième génération pour le traitement de germes résistants.

3.3. Les pénèmes (carbapénèmes)

Les carbapénèmes se distinguent des pénicillines (pénams) par la présence d'un atome de carbone au lieu d'un soufre en position I et d'une liaison insaturée en C2-C3 (Figure N°02), ont un très large spectre antibactérien doublé d'une grande stabilité envers la quasi-totalité des β -lactamases. (Wolff *et al.*, 2009).

Quatre molécules sont actuellement commercialisées: l'imipénème, le méropénème, l'ertapénème et le doripénème. Le spectre d'action *in vitro* contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, aérobies et anaérobies est pratiquement identique pour les quatre molécules. La différence la plus notable concerne l'ertapénème, dont l'activité sur *P. aeruginosa* et *A. baumannii* est trop limitée pour une utilisation clinique (Grail *et al.*, 2011).

3.4. Les monobactames

Ce dernier groupe a été individualisé en 1976. Le noyau des monobactames est limité au cycle β -lactame (Figure N°02). Les premiers monobactames ont été isolés de substances naturelles produites par certaines bactéries, mais les produits récents sont entièrement synthétiques. Le seul produit utilisé actuellement est l'aztréonam. Une série de substitutions latérales sur le noyau monobactame lui confère ses caractéristiques originales. Une chaîne latérale aminothiazolyl lui confère une très bonne activité contre les bactéries à Gram négatif aérobies et plus particulièrement contre les entérobactéries pour lesquelles il possède une activité comparable à celle des céphalosporines de troisième génération en raison de sa bonne stabilité vis-à-vis des β -lactamases. Son activité s'étend à *P. aeruginosa*. Il n'a en revanche aucune activité sur les bacilles à Gram positif et les anaérobies (Petitjean, 1988).

3.5. Les inhibiteurs de β -lactamases

Ils existent également les inhibiteurs des β -lactamases possèdent une faible activité antibactérienne intrinsèque. En se liant de manière irréversible à la β -lactamase, ils permettent l'activité de la β -lactamine à laquelle ils sont associés. Il en résulte une action synergique et une augmentation de l'activité de la β -lactamine. Actuellement, sont disponibles les associations suivantes:

- Amoxicilline-acide clavulanique (Augmentin) (**Andre et al., 1998**).
- Pipéracilline-tazobactame (Tazocilline)
- Ticarcilline-acide clavulanique (Claventin)

En plus de son effet inhibiteur irréversible sur les β -lactamases, le sulbactam a une activité antibiotique intrinsèque sur quelques germes, mais il est toujours utilisé en association avec les antibiotiques détruits par les β -lactamases (**Allain, 2008**).

4. Mode d'action des β -lactamines

Les β -lactamines, analogues structuraux de la terminaison peptidyl-D-alanyl-D-alanine du peptidoglycane, ont pour fonction d'interagir avec un groupe de protéines, les PLPs, également appelées protéines de fixation de la pénicilline (PBP, pour Penicillin Binding Protein), des enzymes responsables de la synthèse et du remodelage du peptidoglycane (**Ghuysen, 1991 ; Nanninga, 1991**).

L'inhibition de ces transpeptidases, impliquées dans l'étape finale de la biosynthèse de la paroi cellulaire, le cycle β -lactame se lie de manière covalente et irréversible au site actif de l'enzyme provoquant son inactivation. Il entraîne une interruption de la synthèse du peptidoglycane et une production subséquente d'enzymes autolytiques entraînant la mort cellulaire (**Stratton, 2000**). Le peptidoglycane est un constituant majeur de la paroi cellulaire présent chez toutes les bactéries. Il forme un réseau tridimensionnel autour de la cellule et la protège de sa propre pression osmotique, et est essentiel à la croissance et à la division cellulaire (**Matagne et al., 1998**).

Il s'agit d'un polymère formé de chaînes linéaires composées de répétitions alternatives d'un disaccharide contenant le N-acétylglucosamine (NAG) et l'acide N-acétylmuramique (NAM). Le dernier sucre de ce disaccharide se termine toujours par deux résidus D-alanine. L'assemblage final de ces unités, la transpeptidation, est un processus catalysé par les PBP se terminant par le clivage du résidu D-alanine terminal (**Wilke et al., 2005**).

II. Les bacilles à Gram négatif

Les bacilles à Gram négatif constituent une large catégorie de micro-organismes qui sont incapables de retenir une coloration de cristal violet en raison de la structure distincte de leur paroi cellulaire. Parmi ceux-ci, les entérobactéries de même que les bactéries non-fermentaires forment deux groupes largement responsables de plusieurs maladies infectieuses. Les bactéries regroupées dans la famille des *Enterobacteriaceae* se retrouvent principalement dans le sol, l'eau, et certaines (incluant *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Proteus sp.* et *Serratia marcescens*) sont des constituants naturels de la flore intestinale de l'homme. Ces micro-organismes sont d'importants pathogènes en milieux hospitaliers (**Laurent et al., 2008 ; Piednoir et al., 2011**) et communautaires (**Arslan et al., 2005 ; Chong et al., 2011 ; Songa et al., 2011**). Ces derniers se propagent facilement entre humains par le biais des mains, de l'eau et de la nourriture contaminée de même que de sources environnementales (**Nih-niaid, 2012**).

Les principales bactéries à Gram négatif causant des infections sont *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* parmi les entérobactéries ainsi que *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* parmi les bactéries non-fermentaires. Les différents agents antimicrobiens développés avec le temps représentent des outils thérapeutiques de choix pour le contrôle des infections causées par ces micro-organismes. Malheureusement, l'incidence de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif a augmenté à un rythme alarmant au niveau mondial au cours des 20 dernières années (**Cantòn et al., 2012 ; El Salabi et al., 2013 ; Nordmann et al., 2011 ; Woodford et al., 2011**).

1. Les entérobactéries

Les entérobactéries constituent une famille hétérogène des bactéries Gram-négatif qui sont fréquemment impliquée dans les infections humaines. Elles se compose d'environ 30 genres de bactéries et de plus de 100 espèces, mobiles par ciliature péritriche ou immobiles (**Avril et al., 2000**). Les germes de cette famille sont en majorité pathogènes du tube digestif humain et d'autres sont des colonisateurs normaux de ce tube digestif (*Escherichia coli*, *Enterobacter spp*, *Klebsiella spp*), bien qu'ils soient également présents dans l'environnement. Dans le cadre de notre étude, les entérobactéries incriminées sont: *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aeroganes*.

1.1. *Escherichia coli*

1.1.1. Historique et Taxonomie

C'est en 1885 que la bactérie *Escherichia coli* est décrite pour la première fois dans des selles de nourrissons, par l'Allemand Theodor Escherich. Toutefois, en 1904 isolement de cette même bactérie dans un cas d'infection urinaire, et son nom actuel lui est donné en 1919 par Castellani et Chambers (**Grimont, 1987**). Le genre *Escherichia* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*, qui doit son nom à leur isolement fréquent du tube digestif et/ou des fèces des mammifères (**Greatorix et Thorne, 1994**). Les genres constituant cette famille sont des bacilles à Gram négatif, aéro-anaérobies facultatifs qui peuvent fermenter les nitrates et qui ne possèdent pas d'oxydase (**Le Minor et al., 1990**).

1.1.2. Définition et caractéristiques

Escherichia coli, C'est un Bacille à Gram négatif, assez grand ($1-1.5 \times 2-6 \mu\text{m}$), aéro-anaérobie facultatif, oxydase négatif, nitrate positif et qui fermente le glucose (**Farmer et al., 2007**). Les principaux caractères distincts de *E. coli* vis à vis les autres entérobactéries sont: la fermentation du lactose, la production d'une β -galactosidase, la production d'indole à partir du tryptophane, l'absence d'uréase et l'absence d'utilisation du citrate (Simmons) comme source d'énergie et de carbone, se sont des bacilles à 70% mobiles, asporulés, de 2,5 μm de long X 0,6 large .

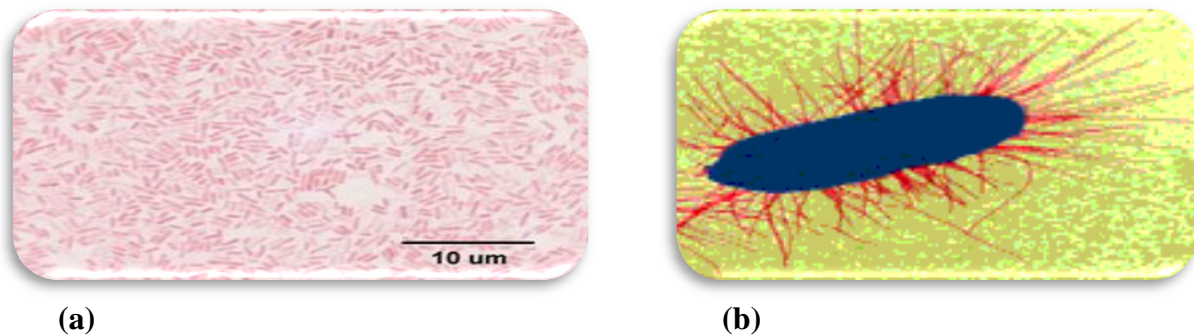


Figure N°03: Observation microscopique d'*Escherichia coli* (a) coloration Gram, (b) micrographe électronique (**kaiser, 1998**)

1.1.3. Habitat

On trouve *Escherichia coli* en abondance dans la flore commensale, en particulier dans le tube digestif. Par ailleurs, elle est très répandue dans l'environnement : eau, sols, et dans les aliments (**Baraduc et al., 2000**).

Escherichia coli est considéré comme un hôte normal de la microflore bactérienne du tractus digestif de l'homme ainsi que de celle de nombreux animaux à sang chaud. Il représente près de 80% de la microflore aérobie (**Ghebru, 1988**).

1.1.4. Pouvoir pathogène

Chez l'homme, la colonisation par *E. coli* est précoce, et peut être responsable d'un nombre varié de pathologie. Toutefois, trois types de syndromes majeurs résultent de l'infection par de souches *E. coli* pathogènes : infections urinaires (impliqué dans 80 % des infections urinaires), les infections digestives (diarrhées, infections hépatobiliaires et autres), et les méningites néonatales et septicémies (**Jaureguy, 2009**).

1.2. *Klebsiella pneumoniae*

1.2.1. Taxonomie

Le genre *Klebsiella* a été nommé par Trevisan en 1887 pour honorer Klebs Edwin, un microbiologiste Allemand du 19^{ème} siècle. L'espèce type est *Klebsiella pneumoniae*, connue autre fois sous le nom de pneumobacille de Friedlander. Ce dernier avait décrit cette bactérie dans les poumons d'un patient décédé d'une pneumonie (**Freney et al., 2000**). Le genre *Klebsiella* appartient à la famille des *Enterbacteriaceae*, l'ordre *Enterobacteriales*, la classe *Gamma-proteobacteria*, le phylum *Proteobacteria*, et le domaine des *Bacteria* (**Brenner et al., 2005**).

La position taxonomique du genre *Klebsiella* est discutée car de nouvelles espèces ont été incluses dans ce genre sur des arguments phénotypiques sans réévaluation globale de la position taxonomique du genre parmi les entérobactéries, ni des différences d'espèces entre elles (**Freney et al., 2007**).

1.2.2. Biotope

K. pneumoniae subsp. pneumoniae est une espèce isolée dans l'environnement à partir d'échantillons de sol, d'eaux de surface, d'eaux usées, de végétaux (**Kumar et al., 2011**), et de muqueuses des mammifères, en particulier de la flore fécale (**Bagley, 1985; Brisse et Duijkeren, 2005**). Chez l'homme, cette espèce végète sur la peau, les muqueuses, les voies respiratoires supérieures et elle est isolée des selles chez 30 % des individus. Pour ce qui est des infections nosocomiales, le tube digestif des patients hospitalisés et les mains du personnel sont les deux sources principales (**Haverkorn et Michel, 1979**). Les deux sous-espèces

K. pneumoniae subsp. ozaenae et *K. pneumoniae subsp. rhinoscleromatis* n'ont été isolées qu'en situation pathogène de l'arbre respiratoire de l'homme (**Drancourt et al., 2001**).

1.2.3. Caractères bactériologiques

1.2.3.1. Caractères morphologiques

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

1.2.3.2. Caractères cultureux

K.pneumoniae se développe en aéro-anaérobiose. Sur les milieux classiques d'isolement pour entérobactéries (Drigalski, Hektoen, Mac Conkey) après une incubation de 18 à 24 h à 30 ou à 37 °C, les colonies sont d'un diamètre de 3 à 4 mm, lisses, lactose positives, bombées, brillantes, muqueuses (**Le Minor et Véron, 1989; Freney et al., 2000**). En milieu liquide (bouillon nutritif, eau peptonée), la culture est rapide (quelques heures) à 30° et 37 °C pour *K. pneumoniae* avec parfois dépôt muqueux et collerette visqueuse en surface. À la différence des autres espèces de *Klebsiella*, plus de 90% des souches de *K. pneumoniae* croissent à 44 °C en bouillon lactosé bilié vert brillant et plus de 80% en fermentant le lactose avec production de gaz (**Le Minor et Véron, 1989**).

1.2.3.3. Caractères biochimiques

K. pneumoniae présente les caractères généraux des entérobactéries: oxydase négative, catalase positive (**Le Minor et Véron, 1989**). L'identification phénotypique du genre *Klebsiella* repose essentiellement sur Les caractères biochimiques différentiels illustrés dans le tableau N° I.

Tableau N° I : Caractères biochimiques d'identification des espèces du genre *Klebsiella* (Freney *et al.*, 2007)

Test	<i>K. pneumoniae</i>			<i>K. oxytoca</i>
	<i>K. pneumoniae</i> <i>subsp. ozaenae</i>	<i>K. pneumoniae</i> <i>subsp. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i> <i>subsp. rhinoscleromatis</i>	
Indole	-	-	-	+
ODC	-	-	-	-
LDC	V	+	-	+
VP	-	+	-	+

V: variable.

1.2.3.4. Caractères antigéniques

K. pneumoniae possède des antigènes communs avec ceux portés par les autres entérobactéries excepté l'antigène flagellaire du fait de son immobilité :

*Antigènes « O » somatiques : la recherche des antigènes « O » présente peu d'intérêt pratique, en raison de la difficulté de leur détermination par suite du caractère thermostable des antigènes capsulaires

*Antigènes « K » capsulaires : au moins 77 antigènes K ont été décrites chez *K. pneumoniae*, K1 à K72, K74, K79 à K82. Les souches les plus souvent pathogènes pour l'homme et les animaux appartiennent aux types capsulaires 1 et 2, plus rarement 3 et 4.

*Antigène d'adhérence : appelé fimbriae, de nature protéique, porté par des pili communs (Freney *et al.*, 2000; Le Minor et Véron, 1989).

1.2.4. Pouvoir pathogène

K. pneumoniae subsp. pneumoniae est un pathogène opportuniste responsable d'infections communautaires et d'infections nosocomiales. Parmi les infections communautaires, *K. pneumoniae* est responsable d'infections broncho-pulmonaires incluant les pneumonies lobaires nécrosantes, les abcès pulmonaires, les pleurésies purulentes (Carpenter, 1990). Cette espèce est également responsable d'infections intra-abdominales et est isolée de mal perforant plantaire. *K. pneumoniae subsp. pneumoniae* est surtout actuellement un agent d'infections nosocomiales (Podschn et Ullmann, 1998), responsable d'infections urinaires sur sonde, de bactériémies (Garcia *et al.*, 1985), de pneumonies, d'infections de sites opératoires et

d'infections néonatales. *K. pneumoniae subsp. ozaenae* est responsable d'une rhinite chronique atrophique décrite sous le nom d'ozène. Cette infection se manifeste par une ulcération chronique de la muqueuse nasale pouvant aboutir à une perforation du cartilage nasal, accompagnée de décharges nasales purulentes et nauséabondes (**Freney et al., 2007**).

K. pneumoniae occupe une place importante dans la pathologie infectieuse du nouveau-né. En effet, les infections nosocomiales à *K. pneumoniae* dans les services de néonatalogie sont fréquentes, notamment dans les unités de soins intensifs et chez les prématurés (**Bennet et al., 1985**).

1.3. *Enterobacter aerogenes*

1.3.1. Classification

Enterobacter aerogenes appartient au genre *Enterobacter* et à la famille des *Enterobacteriaceae*. Le genre *Enterobacter* fait partie du groupe KES (*Klebsiella, Enterobacter, Serratia*), qui est d'une importance considérable en clinique hospitalière. Considéré comme habituellement commensal non pathogène pour l'homme, de nos jours, il est agent responsable d'infections nosocomiales et l'emploi intensif des antibiotiques a entraîné la sélection de souches multirésistantes (**Avril et al., 2000; Monnet et Richard, 1995**)

La classification du genre *Enterobacter* a été l'objet de nombreux remaniements (**Avril et al., 2000**). Actuellement, le genre *Enterobacter* comprend 14 espèces (**Bornet et al., 2000**). *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. gergoviae*, *E. pyrinus*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. dissolvens*, *E. nimipressuralis*, *E. sakazakii*, *E. Taylorae*, *E. aminigenus* Biogroupe 1, *E. aminigenus* Biogroupe 2, *E. intermedium* et *E. kobei*. (**Avril et Domino, 1999; Carlier et al., 2000**). Les espèces les plus fréquemment rencontrées en milieu hospitalier sont *E. cloacae* qui représente l'espèce type du genre *Enterobacter* et *E. aerogenes* (**Sanders et Sanders, 1997**)

1.3.2. Habitat

Enterobacter aerogenes est une bactérie ubiquiste, retrouvée sur les plantes et dans le sol, l'eau et le tube digestif de l'homme et des animaux d'où le nom d'entérobactérie. Elle constitue en effet, une part prépondérante de la flore intestinale de l'homme mais relativement peu rencontrée dans d'autres sites du corps; comme sur la peau et dans les muqueuses (**Hibbert et al., 1995**).

1.3.3. Caractères Bacteriologiques

1.3.3.1. Caractères morphologiques

E.aerogenes est un bacille à Gram négatif, de taille variable de 0,6 à 1 µm de large et de 1,2 à 3 µm de longueur, asporulé, capsulé (entouré d'une fine capsule), mobile, pourvu d'une cillature péritriche ce qui le différencie de *Klebsiella pneumoniae* espèce taxonomiquement proche d'*E.aerogenes*) (Hibbert *et al.*, 1995; Le Minor *et al.*, 1990)

1.3.3.2. Caractères cultureux

Enterobacter aerogenes se développe en aéro-anaérobiose sur des milieux ordinaires à base d'extrait de viande sans addition de NaCl ni d'autres suppléments. Peut croître dans un milieu minéral contenant comme seule source de carbone du métagydroxybenzoate (Le Minor *et al.*, 1990). Sur milieux classiques d'isolement pour entérobactéries (Hektoen, Mac Conkey, Luria Bertani, ...), les colonies d'*E.aerogenes* sont lactose (+) ou (-), bombées, légèrement muqueuses, d'un diamètre de 2 à 3 mm à bord régulier en 18 à 24 heures à 37 °C. En milieu liquide, la culture est trouble et homogène au bout de 18 à 24 heures à 37°C (Marmonier, 2000).

1.3.4. Caractères biochimiques

Enterobacter aerogenes peut être définie comme une entérobactérie, catalase (+), oxydase (-), gélatinase (-) (Marmonier, 2000; Le Minor *et al.*, 1990).

Tableau N°II: Caractères biochimiques permettant la différenciation des deux espèces du genre *Enterobacter* les plus fréquemment rencontrées en Clinique (Bouza *et al.*, 1985).

Tests	<i>E.aerogenes</i>	<i>E.cloacae</i>
VP	+	+
Ornithine décarboxylase	+	+
Lysine décarboxylase	+	-
Uréase	-	+
Arginine dihydrolase	-	+
Fermentation de :		
• Glucose	+	(+)
• Adonitol	+	(-)
• D- Sorbitol	+	+
• Raffinose	+	+
• D- arabitol	+	-
• Inositol	+	(-)

+ : réaction positive

(+) : réaction généralement positive

- : réaction négative

(-) : réaction généralement négative

1.3.5. Caractères antigéniques

Enterobacter aerogenes possède des antigènes communs avec ceux portés par les autres entérobactéries ou ceux d'autres bacilles à Gram négatif.

-L'antigène somatique O : antigène de paroi composé d'un lipide A commun et toxique, d'une partie polyosidique commune à toutes les entérobactéries (le core) sauf de rares mutants et d'une partie polyosidique apportant la spécificité des formes smith (S). Les réactions d'agglutination se produisent lentement, sont constituées d'agglutinats granulaires, difficilement dissociables par agitation (**Le Minor et al., 1990**).

- L'antigène flagéllaire H : mobile, *Enterobacter aerogenes* possède un antigène flagéllaire polypeptidique et souvent diphasique (deux gènes différents codent pour deux types de flagellines mais leur contrôle génétique fait que l'expression du gène est pour un individu unique: dans la lecture, les deux types peuvent cohabiter). Les réactions d'agglutination se produisent rapidement, sont constituées d'agglutinats floconneux, facilement dissociables par agitation (**Pena et al., 1993**).

- L'antigène capsulaire K : *Enterobacter aerogenes* possède des antigènes capsulaires de nature polyosidique, apparentés à ceux de *Klebsiella pneumoniae* (**Le Minor et al., 1990**).

2. Les bactéries à Gram négative non fermentaire

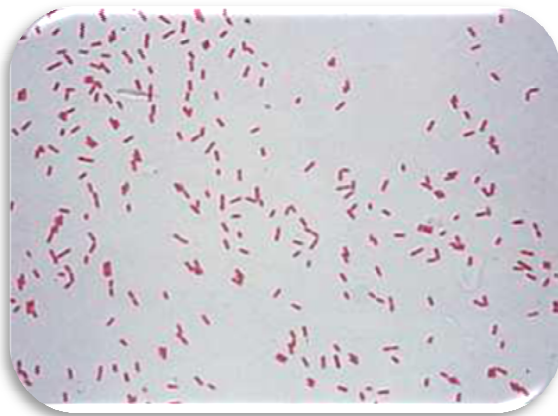
2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

2.1.1. Définition

Pseudomonas aeruginosa, autrement connu sous le nom de bacille pyocyanique, bacille du pus bleu ou pyo, est une bactérie à Gram-négatif du genre *Pseudomonas*. Les bacilles sont fins, droits et très mobiles grâce à un flagelle polaire : ciliature monotriche, dépourvus de spores et de capsules. Ils apparaissent la plupart du temps isolés ou en diplobacilles. Elle peut, dans certaines conditions, être pathogène. Très résistante, elle est de plus en plus souvent responsable d'infections nosocomiales. C'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement. Le taux de mortalité atteint 50 % chez les patients vulnérables. Leur classification en genres et espèces à l'intérieur de la famille des *Pseudomonadaceae* a longtemps reposé sur des caractères phénotypiques simples d'orientation (**Martin, 2007**).

2.1.2. Morphologie

Les souches de cette espèce sont constituées de bacilles de 0,5 à 0,8 μm de diamètre sur 1,5 à 3,0 μm de longueur, se présentant de manière isolée ou groupés par deux ou en courtes chaînes, mobiles grâce à une ciliature monotriche (quelques rares cellules portent cependant plusieurs flagelles polaires) (Euzéby, 2005).



(a)



(b)

Figure N°04: *Pseudomonas aeruginosa* (a) coloration de Gram (x1000), (b) colonies sur gélose ordinaire (Salton et Kim, 1996).

2.1.3. Métabolisme et culture

P. aeruginosa possède une versatilité nutritionnelle remarquable pouvant utiliser une variété de sucres simples et complexes, d'alcools et d'acides aminés comme seule source de carbone. Elle est capable de se multiplier à l'intérieur d'un large spectre de température allant de 4 à 45°C. La température optimale de croissance se situe entre 30 à 37°C (Potvin, 2007). *Pseudomonas aeruginosa* n'est pas capable de fermenter les sucres mais peut les attaquer (le glucose en particulier) par voie oxydative, entraînant une acidification du milieu.

2.1.4. Caractères biochimiques d'identification

Le bacille pyocyanique possède toujours une cytochrome oxydase et peut se développer sur milieu sélectif au ceftrimide, il métabolise les sucres uniquement par voie oxydative, il produit une arginine dihydrolase, une gélatinase, ainsi qu'une nitrate réductase (Cavallo *et al.*, 1998)

On peut noter également la production d'un voile fragile visqueux et peu épais à la surface des milieux liquides avec une odeur aromatique caractéristique (odeur de seringa) (Jean, 2004).

2.1.5. Pathologie

Pseudomonas aeruginosa cause principalement des infections opportunistes telles que les infections pulmonaires chez les patients immunodéprimés (patients atteints de leucémie, SIDA, cancer) les grands brûlés ou ayant inhalé de l'air chaud lors d'un incendie. En milieu hospitalier, *Pseudomonas aeruginosa* peut également induire des infections postopératoires ou des bactériémies dont le pronostic est sévère (**Rossignol, 2007**).

2.2. *Acinetobacter baumannii*

2.2.1. Classification et nomenclature

L'histoire du genre *Acinetobacter* débute au début du XX^{ème} siècle avec la description par un microbiologiste néerlandais Martinus Wiliem Beijerinck d'un microorganisme dénommé *Micrococcus calcoaceticus* isolé à partir de prélèvement de sol. C'est en 1954 que Brisou et Prévost proposent la désignation du genre *Acinetobacter* (du grec *akinetos* « Incapable de bouger »). Une avancée majeure dans l'histoire du genre *Acinetobacter* a été réalisée en 1986 grâce aux techniques d'hybridation ADN/ADN de Bouvet et Grimont qui sont parvenus à distinguer 12 espèces génomiques ou genomic species. A ce jour, 35 espèces bactériennes d'*Acinetobacter* ont été décrites, dont 26 espèces nommées et neuf espèces génomiques (**Camp et al., 2010 ; Howard et al., 2012**).

Certaines étant clairement dénommées comme *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter iwoffli* et *Acinetobacter baumannii* qui représente l'espèce d'*Acinetobacter* de la plus grande importance clinique. Le genre *Acinetobacter* est actuellement défini comme appartenant à la famille des *Moraxellaceae* qui regroupe les genres *Moraxella*, *Acinetobacter* et *P. psychrobacter* (**Bergogne-Bérézin et Towner, 1996**).

2.2.2. Morphologie

Les bactéries du genre *Acinetobacter* sont des gamma-protéobactéries, bacilles ou coccobacilles à Gram négatif, aérobies strictes, oxydase négatives, catalase positives, immobiles et non-fermentants (**Jans et al., 2004**). Elles ne produisent pas de spores et apparaissent au microscope sous la forme de courts bacilles ou de cocci (en phase stationnaire). Leur contenu ADN en G+C est compris entre 39 et 47% (**Peleg et al., 2008**).

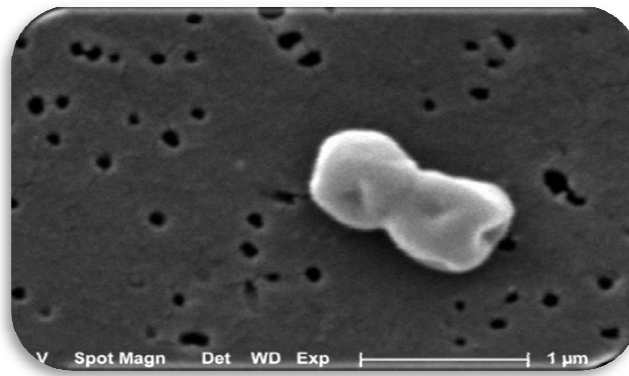


Figure N°05: *Acinetobacter baumannii* sous microscope électronique (Arduino *et al.*, 2004)

2.2.3. Habitat

A. baumannii est une bactérie omniprésente dans la nature (sols, eaux, animaux) et commensal chez l'homme en bonne santé de façon transitoire à une faible densité sur la peau chaude et humide de l'aisselle, l'aîne, la gorge entre les orteils, des narines et du tractus intestinal, mais- sans causer généralement d'infection, *A. baumannii* ne se trouve que rarement dans le cadre de la microflore cutanée normale, selon une étude seulement 3% (ou plus) de la population sont colonisés par la bactérie (Jaggi *et al.*, 2012; Howard *et al.*, 2012). Cette bactérie a également été isolée de la tête et les poux du corps humaine (Kempf *et al.*, 2012).

2.2.4. Caractères biochimiques d'identification

Ce sont des bactéries aérobies stricts, catalase (+), oxydase (-), prototrophes, (Avril *et al.*, 2000) Ils ne réduisent généralement pas les nitrates en nitrites en milieu complexe. L'oxydation du glucose et d'autres sucres en acide gluconique résulte de la présence d'une glucose déshydrogénase membranaire. Une réponse négative est obtenue pour les tests LDC, ODC, ADH, production d'hydrogène sulfuré, indole, bêta-galactosidase et DNase. Une réponse variable est obtenue pour l'hydrolyse de la gélatine, cultiver à 44°C (Gillespie et Hawkey, 2006).

2.2.5. Epidémiologie et pouvoir pathogène

Depuis quelques années, ce germe est considéré comme un pathogène opportuniste responsable d'un taux croissant d'infections nosocomiales sévères comme les pneumopathies, ou il est responsable de 7,8 à 23% de la mortalité par pneumonie acquise dans les hôpitaux et 10 à 43% en unités de soins intensifs (Ramoul *et al.*, 2013). De plus, les bactériémies, les infections de l'appareil urinaire et les méningites secondaires, *A. baumannii* peut également provoquer des infections de la peau et des tissus mous, notamment au niveau des plaies chez les blessés de

guerre, où un grand nombre de militaire rapatriés de la guerre en Iraq et en Afghanistan sont infectés d'*A. baumannii* (**Camp et al., 2010**).

Cette bactérie adhère facilement non seulement à des surfaces biologiques mais aussi abiotiques, sur laquelle il est capable de former des biofilms ce qui facilite le processus de colonisation du matériel prothétique (**Gordon et Wareham, 2010**), dont la manifestation la plus frappante d'*A.baumannii* est l'apparition endémique et épidémique des souches multirésistantes dans les hôpitaux (**Dijkshoorn et al., 2007**).

La gravité et l'évolution souvent fatale de ces infections sont dues à la conjonction d'un terrain immunodéprimé et à une bactérie ayant une capacité d'acquérir et d'accumuler les facteurs de résistance à de nombreux antibiotiques (**Giamarellou et al., 2008**).

III. Mécanismes de la résistance des BGN aux β -lactamines

1. Mécanismes de la résistance bactérienne naturelle aux β -lactamines

1.1. Résistance des Enterobacteries aux β -lactamines

La résistance aux antibiotiques peut être naturelle ou acquise. La résistance naturelle est exprimée par toutes les souches d'une espèce et son support génétique est le chromosome. La résistance acquise n'est présente en revanche que chez certaines souches au sein d'une espèce donnée (**Ploy et al., 2005**).

Les entérobactéries sont soit naturellement sensibles aux β -lactamines (exemple: *Escherichia coli*), soit elles sont naturellement résistantes (exemple: les *Klebsiella sp* sont toujours résistantes à l'ampicilline), soit elles ont une résistance acquise (**Vora et Auckenthaler, 2009**). La résistance naturelle ou intrinsèque à un antibiotique est commune à toutes les bactéries d'une même espèce. Elle est due à la présence des gènes chromosomiques communs à toutes les bactéries d'une même espèce et transmise à la descendance. La résistance naturelle détermine les phénotypes « Sauvages » des espèces bactériennes vis-à-vis les antibiotiques (**Mayer et al., 2000**).

Chez les entérobactéries, la plupart des espèces produisent naturellement des β -lactamases chromosomiques soit de classe A (*Klebsiella spp.*, *Citrobacter koseri*, *Escherichia hermanii*...), soit de classe C (*Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*...), voire les deux types d'enzymes (*Yersinia enterocolitica*) (**Livermore, 1995**). L'expression phénotypique de ces enzymes peut-être constitutive ou inductible par les β -lactamines elles mêmes. On constate un phénotype de résistance de pénicillinase de bas niveau inclut les espèces possédant une pénicillinase chromosomique constitutive (**Zogheib et Dupont, 2005**), exprimée à bas niveau chez *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Citrobacter koseri*, *Raoultella planticola*, *R. ornithinolytica*, *R. terrigena*, *Escherichia hermanii*, *C. gillennii*, qui est caractérisé par une résistance aux aminopénicillines et aux carboxypénicillines.

Les espèces *E. coli* et *Shigella* possèdent un gène *ampC* codant pour une céphalosporinase de la classe C d'Ambler donc résistante aux inhibiteurs. Elle est exprimée de manière constitutive à très bas niveau, avec une sensibilité à toutes les β -lactamines testées ou une sensibilité intermédiaire aux céphalosporines de première génération et/ou aux aminopénicillines avec et sans inhibiteurs. Des espèces d'entérobactéries, comme par exemple *Proteus vulgaris*, *P. penneri* possèdent une céfuroximase inductible. D'autres comme *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *E. asburiae*, *Serratia marcescens*, *C. freundii*, *C. braakii*, *C.*

youngae, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, *P. stuartii*, *Hafnia alvei* et *Pantoea agglomerans* possèdent une céphalosporinase inductible, leur conférant une résistance aux aminopénicillines, aux céphalosporines de première génération et à l'action de l'acide clavulanique (**Robin et al., 2012**).

1.2. Résistance des *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa possède une résistance naturelle à un grand nombre d'antibiotiques en raison de la production d'une β -lactamase chromosomique inductible de classe C. Cette enzyme n'est pas inhibée par le clavulanate. Cette résistance naturelle est due à une membrane externe faiblement perméable, ce qui lui confère une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques, dont la plupart des bêtalactamines hydrophiles, et en fin l'existence des systèmes d'efflux sont souvent des complexes protéiques ternaires avec une pompe transmembranaire, une protéine périplasmique de jonction et une porine de la membrane externe. La pompe la plus fréquemment rencontrée chez *Pseudomonas aeruginosa* est de type MexAB-OPrM (**Cattoir, 2004**).

Pseudomonas aeruginosa est donc naturellement résistante aux aminopénicillines, benzylpénicilline, C1G, C2G, et certains C3G comme le Céfotaxime et le moxalactam (**Vedel, 2005**), *P. aeruginosa* est naturellement sensible aux carboxypénicillines, comme la ticarcilline et la carbénicilline, aux uréidopénicillines, comme la pipéracilline, à certaines céphalosporines (cefsulodine, céfoperazone et ceftazidime), aux monobactames, comme l'aztréonam, et aux carbapénèmes, comme l'imipénème et le méropénème (**Poirel, 2006**).

Toutefois, son rôle dans la résistance naturelle de la bactérie aux β -lactamines reste assez marginal compte tenu de sa faible activité et de son spectre restreint. *Pseudomonas aeruginosa* est capable de produire pas moins de douze systèmes d'efflux actifs différents appartenant à la famille RND (Resistance Nodulation cell Division). Toutefois, seuls deux de ces systèmes appelés Mex (Multiple efflux) contribuent réellement à la résistance naturelle aux antibiotiques (**Poole, 2005**).

1.3 .Résistance des *Acinetobacter baumannii*

A. baumannii est naturellement résistant à de nombreux antibiotiques (Naas *et al.*, 2008) tels que les aminopénicillines, les céphalosporines de première et de deuxième génération ainsi que l'ertapénème. Deux β -lactamases participent à la résistance naturelle de *A. baumannii*, AmpC, une céphalosporinase non inductible exprimée à bas niveau et une oxacillinase représentée par les variants de OXA-51/69.

Actuellement, la surproduction de AmpC constitue le principal mécanisme de résistance aux β -lactamines rencontré chez les isolats cliniques. *A.baumannii* est également capable d'acquérir d'autres β -lactamases appartenant aux classes A [β -lactamases à spectre étendu, (BLSE)], B (mérallo-carbapénémases) et D (oxacillinases) de Ambler, portées le plus souvent par des intégrons de classe 1 (Naas *et al.*, 2006).

La résistance de *A. baumannii* aux carbapénèmes (tels que l'imipénème) est le plus souvent associée à la production de carbapénémase, de type oxacillinase (OXA-23, OXA-24/40 et OXA-58), plus rarement de mérallo- β -lactamases (VIM, IMP et NDM) ou encore de BLSE possédant une activité carbapénémase (Naas *et al.*, 2008)

2. Résistance acquise

Les bactéries peuvent développer une résistance à un antibiotique préalablement sensible, ce qui implique des changements génétiques. Cette résistance est souvent instable. Ces changements peuvent être de deux types: soit une mutation spontanée, soit l'acquisition de gènes par un autre micro-organisme (Sylvie-Carle, 2009). Le principal mécanisme de résistance acquis aux β -lactamines chez les bacilles à Gram négatif est la production des β -lactamases (cavallo *et al.*, 2004).

2.1. Mécanismes non enzymatiques

2. 1.1. Modification des protéines liant la pénicilline

C'est un mécanisme de résistance acquis très largement répandu chez les bactéries à Gram positif (Maiti *et al.*, 2006). Chez les entérobactéries, des souches de *Proteus mirabilis* résistantes à l'imipénème ont été observées suite à une perte d'affinité de la PLP2 et une diminution de la quantité de la PLP1a (Faure, 2009). Chez l'*Acinetobacter baumannii*, le rôle de la perte ou de la diminution d'expression d'une PLP appelée PLP2 dans la résistance aux carbapénèmes a été suggéré par une étude qui reposait sur l'analyse des profils PLP d'une collection de souches résistantes à l'imipénème (Poirel et Nordmann, 2008).

2. 1.2. Imperméabilité de la membrane externe

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des β -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides s'effectue à travers les porines. La sensibilité aux β -lactamines dépend du nombre des porines fonctionnelles. L'altération des porines par mutation est à l'origine de résistances acquises aux β -lactamines, soit par une modification structurale d'une des porines essentielles, ce qui a été décrit chez *E. coli*, soit par une diminution quantitative des porines, qui est la situation la plus fréquente (Cavallo *et al.*, 2004). La résistance de *K. pneumoniae* par l'imperméabilité est due à des mutations ponctuelles, délétions et l'insertion des IS dans les gènes qui codent pour ces porines OmpK35, OmpK36 et OmpK37 (Skopkova-Zarnayova *et al.*, 2005).

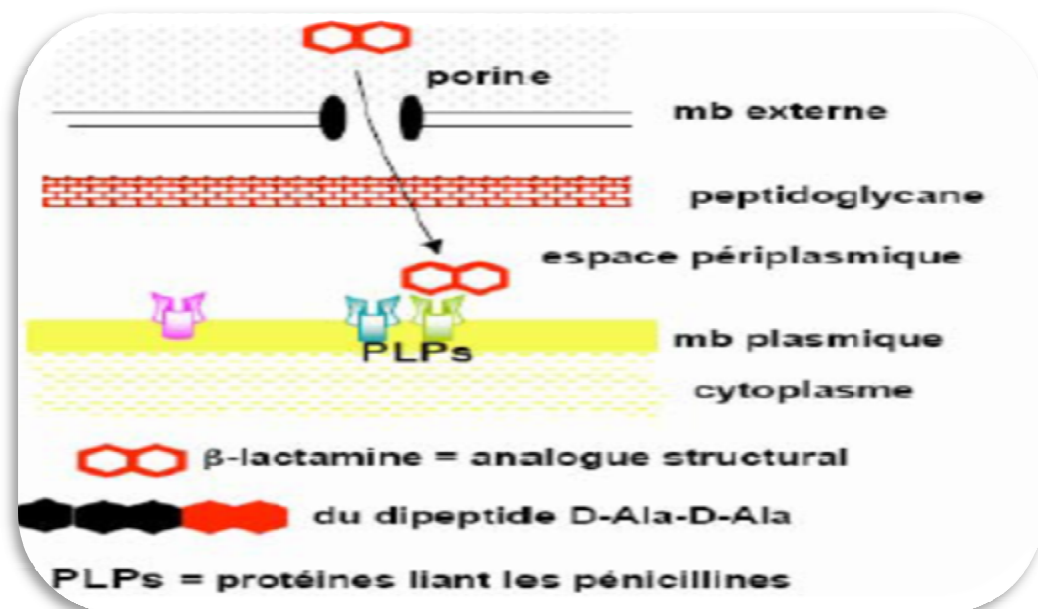


Figure N°06: Mécanisme d'action des β -lactamines (Verdet, 2007).

La résistance de *Pseudomonas aeruginosa* à l'imipénème est due dans la plus part des cas à la perte d'une porine nommée (oprD2) propre aux carbapénèmes, ce mécanisme est relativement fréquent, touchant de 15–20 % des souches en France (Nordmann, 2003; Grall *et al.*, 2011). La résistance ne s'exprime à haut niveau que si la perte de cette porine est accompagnée d'une hyperproduction de la céphalosporinase chromosomique (Lahlou *et al.*, 2008).

Chez *A. baumannii*, la perte d'une porine d'environ 22 kDa a été rapportée par plusieurs équipes comme vraisemblablement impliquée dans la résistance aux carbapénèmes (Nordmann, 2010).

2.1. 3. Système d'efflux

Les bactéries peuvent résister aux antibiotiques par exportations actives grâce à des transporteurs membranaires appelés pompes d'efflux, ces pompes d'efflux peuvent être des transporteurs drogues-spécifiques et confèrent une résistance vis-à-vis d'une seule classe d'antibiotiques (comme les pompes d'efflux des tétracyclines). Cependant la plupart de ces transporteurs peuvent prendre en charge des composés de structure très différente et contribuer ainsi de manière significative à la multirésistance (MDR pour *multidrug resistance*) (**Cattoir, 2004**).

Les systèmes d'efflux ont été décrits pour la première fois chez les bactéries à Gram négatif comme *E. coli* et *P. aeruginosa* (**Li et al., 2000 ; Hocquet et al., 2004**), ce système est généralement un complexe protéique avec une pompe transmembranaire, une protéine périplasmique de jonction et une porine de la membrane externe (**Faure, 2009**). Chez *E. coli*, différents systèmes d'efflux contenant des pompes RND ont été décrits dont AcrAB-TolC est le mieux caractérisé (**Kumar et Schweizer, 2005**).

La résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques peut aussi résulter d'une augmentation de l'efflux actif, de complexe MexA–MexB–OprM induit une résistance ou une diminution de la sensibilité à la ticarcilline et à l'aztréonam, alors que la sensibilité à la pipéracilline et à la ceftazidime est conservée (**Nordmann, 2003 ; Hocquet et al., 2004**). D'autre part, il existe chez *A. baumannii* un ou deux systèmes d'efflux dont certains ont une incidence sur la pénétration des antibiotiques en particulier les aminosides (**Joly- Guillon, 2006**). L'identification du système d'efflux de type RND a montré que l'activité des β -lactamines pouvait être affectée en cas de surexpression. Ce mécanisme ne semble cependant pas être seul responsable des phénotypes de résistance couramment observés mais jouerait un rôle important en association avec d'autres mécanismes (**Poirel et Nordmann, 2008**).

2.2. Mécanismes enzymatiques

2.2.1. Generalité sur β -lactamase

Les β -lactamases constituent le principal mécanisme de la résistance naturelle et acquise aux β -lactamines, en particulier chez les bactéries bacilles à Gram négatif. Ces enzymes bactériennes, catalysent l'hydrolyse de la liaison amide du cycle β -lactame (**Philippon et Arlet., 2006**).

2.2.2. Production de β -lactamases

À l'heure actuelle, la production des enzymes hydrolytiques appelées β -lactamases est le mécanisme de résistance prédominant des bactéries à Gram négatif *vis-à-vis* des β -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 3^{ème} génération, sont apparues des β -lactamases à spectre étendu ou BLSE. Depuis, les β -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).

2.2.3. Mode d'action

Les β -lactamases catalysent de manière efficace et irréversible l'hydrolyse du pont amide de l'anneau β -lactame des pénicillines, des céphalosporines, des monobactames et des carbapénèmes ; pour donner un acylenzyme qui sera ensuite dégradé en acide inactif (Figure N°07). Ainsi, les pénicillines sont dégradées en acide pénicilloïque et les céphalosporines en acide céphalospoïque (Medeiros, 1984).

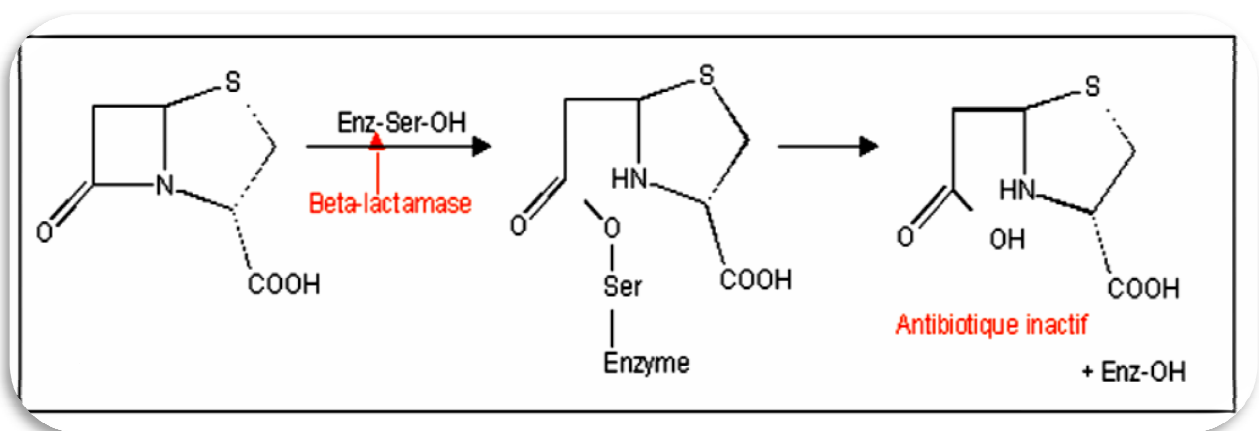


Figure N°07: Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle β -lactame (Barrial et Scotet, 2006).

La différence majeure entre les β -lactamases et les PLP réside dans la vitesse à laquelle l'acylenzyme est hydrolysé. En effet, si les PLP ne sont capables d'hydrolyser qu'un cycle β -lactame par heure (l'acylenzyme apparaît dans ce cas comme un intermédiaire stable), les β -lactamases les plus efficaces peuvent en hydrolyser 1000 par seconde, rendant l'antibiotique totalement inactif et régénérant l'enzyme pour une nouvelle réaction d'hydrolyse (Ghuysen, 1990 ; Massova et Mobashery, 1998).

2.2.4. Classification des β -lactamase

La grande diversité de ces enzymes d'inactivation a suscité, depuis 1945, la publication d'articles visant à les classer, les plus connues sont la classification de Bush et la classification de Ambler (**AnnexeN° 01**) (**Bush et Jacoby, 2010**).

2.2.4.1. Classification de Bush

Cette classification a initialement été décrite par Jack et Richmond en 1970, pour ensuite être révisée à deux reprises par Bush. La version récente propose de classer ces enzymes en fonction de:

- 1) Substrat de préférence entre la pénicilline, oxacilline, carbénicilline, céphaloridine, céphalosporines à large spectre d'activité et carbapénèmes.
- 2) Profil d'inhibition par le clavulanate: Les céphalosporinases sont insensibles au clavulanate, les pénicillinases sont sensibles au clavulanate et les métallob β -lactamases sont sensibles à l'EDTA (**Bush et Jacoby, 2010**).

2.2.4.2. Classification d'Ambler

Initialement proposée par Ambler (**Ambler, 1980**), cette classification repose sur la similarité des séquences entre les différents membres des β -lactamases. De plus, elle reflète les relations fondamentales de chaque β -lactamase et ne change pas à cause des mutations. Cette nomenclature se compose de quatre groupes, soit les β -lactamases de classe A, B, C et D. Les enzymes de classe A, C et D sont dites à sérine active tandis que celles de classe B sont appelées métallob β -lactamases (carbapénèmases) (**Jacoby et Munoz-Price, 2005**).

• Les β -lactamases de classe A

Les β -lactamases de classe A, d'origine chromosomique ou plasmidique, se caractérisent par leur capacité à hydrolyser l'amide cyclique lié à la molécule de β -lactame. Cette activité hydrolytique, assurée par une sérine conservée (Ser-70)- induit la formation d'acide penicilloïque pour la pénicilline et de céphalosporoate, analogue aux pénicillinoates, pour les céphalosporines.

Cette sérine est retrouvée dans le site actif de la β -lactamase qui se compose d'hélices α entourées de cinq feuillets β anti-parallèles (**Knox, 1995**) et assure un fort taux de résistance aux pénicillines, céphalosporines et carbénicillines. Toutefois, les β -lactamases de classe A sont généralement sujettes à l'inhibition par les inhibiteurs de β -lactamases (**Livermore, 1995**).

- **Les β -lactamases de classe B**

Les β -lactamases de classe B sont des métallo- β -lactamases et utilisent un ion de zinc (Zn^{2+}) comme cofacteur permettant ainsi la décomposition de l'anneau β -lactame (**Ambler, 1980 ; Bando et al., 1991**). Ces enzymes ont été émergées depuis une dizaine d'années, d'abord chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*, puis ensuite chez les entérobactéries et d'autres bacilles Gram négatif.

L'importance clinique des métallo-bêta-lactamases est liée au fait qu'elles hydrolysent les carbapénèmes, composés qui échappent à l'activité des bêta-lactamases à sérine active. La plupart des métallo-bêta-lactamases hydrolysent une variété de pénicillines et de céphalosporines, et sont insensibles aux inhibiteurs suicides classiques (**Bebrone, 2007**).

- **Les β -lactamases de classe C**

Les β -lactamases de classe C, décrites en 1981 par Jaurin et Grundstrom, ont longtemps été ubiquitaires aux chromosomes de différentes espèces bactériennes entériques (**Jaurin et Grundstrom, 1981**). Dans la classe C, on retrouve les céphalosporinases AmpC qui sont codées par des gènes qui étaient primitivement situés sur le chromosome de nombreuses bactéries à Gram négatif telles que *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* et *Enterobacter* spp. Chez ces bactéries, l'expression d'AmpC est inductible. Les gènes codant pour ces enzymes sont aussi présents chez *E. coli*, où ils ne sont pas inductibles. Ces enzymes sont résistantes à l'acide clavulanique (**Philippon et al., 2002**).

- **Les β -lactamases de classe D**

Les β -lactamases de classe D se distinguent par leur capacité à hydrolyser les pénicillines isoxazolyl (oxacilline) et la méthicilline, et qui sont faiblement inhibées par l'acide clavulanique. Elles sont retrouvées fréquemment chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter* spp. (OXA-11, 14, 16, 17 et 19) et peu chez les entérobactéries (**Paterson et Bonomo, 2005**).

De plus, certains membres de cette famille, dont OXA-10 (PSE-2) et OXA-11 (**Hall et al., 1993**), possèdent un large spectre d'activités assurant une forte résistance aux céphalosporines de troisième génération dont la céfotaxime, le céfoperazone et la ceftazidime (**Hall et al., 1993; Livermore, 1995**).

2.2.5. Les céphalosporinases plasmidiques

Les céphalosporinases plasmidiques ou case plasmidiques, sont des β -lactamases de la classe C, avec un phénotype de résistance est identique à celui des céphalosporinases hyperproduites qui se traduit généralement par une résistance aux C3G, associé avec une résistance à l'acide clavulanique et souvent à la céfoxitine, à l'exception de l'imipénème (**Philippon et al., 2002**). Il s'agit d'un phénotype retrouvé principalement chez les bactéries possédant naturellement une céphalosporinase ampC qui peut être alors surexprimée (*Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, autres entérobactéries du même groupe).

L'expression de cette céphalosporinase est médiée par Amp-C (**Hanson, 2003**). La transmission plasmidique de promiscuité dans la famille des entérobactéries entraîne des taux très élevés de céphalosporinases chez *E. coli* qui porte un gène AmpC constitutif est faiblement exprimé (**Bush, 2001**).

Chez des souches cliniques de *Klebsiella pneumoniae*, cette résistance a été décrite pour la première fois avec MIR-1 en 1988, aux États-Unis (**Philippon et al., 2002**). Et la première enzyme de type DHA a été identifiée en 1992, à Dhahran, en Arabie Saoudite, chez une souche clinique de *Salmonella enterica* sérotype *Enteritidis* (**Fortineau et al., 2001; Gaillot et al., 1997**). La découverte de "céphalosporinases plasmidiques" originaires d'entérobactéries, indiquait une nouvelle et importante étape de la résistance acquise aux antibiotiques (C3G en particulier) par mobilisation des gènes chromosomiques (**Philippon et al., 2002**).

Les enzymes plasmidiques sont, le plus souvent, non inductibles, à l'exception de ACT-1, de DHA-1 et de CFE-1 (**Nakano et al., 2004**). Par séquençage, il a été démontré la présence d'un gène régulateur *ampR* en amont du gène de structure ampC (Barnaud et al. 1998). Lorsqu'il est lié à la pentapeptide UDP-Mur-NAc, AmpR réprime l'expression de *ampC* et sa propre transcription, et cette inactivation peut être régulée par la présence de β -lactames comme la céfoxitine, l'acide clavulanique, et de l'imipénème ou par des mutations dans le *AMPD* gène. Récemment, pour plusieurs de ces enzymes transférables, les progéniteurs ont été identifiés : groupe BIL-1, CMY-2, LAT-1,2 dérivées de *Citrobacter freundii*, DHA-1 (*Morganella morganii*), MIR-1, ACT-1 (*Enterobacter cloacae*), et ACC-1 (*Hafnia alvei*), ou encore de *P. aeruginosa* (CMY-1, FOX-1, MOX-1) (**Hanson, 2003 ; Philippon et al., 2002**).

3. β -lactamases à spectre étendu (BLSE)

3.1. Définition

Les BLSE ont été décrites pour la première fois en 1983, en Allemagne (**Knothe et al., 1983**), il n'y a pas de consensus concernant la définition de β -lactamases à spectre étendu (BLSE). Classiquement, les BLSE sont définies comme des enzymes appartenant à la classe A (À l'exception des BLSE de type OXA classe D) de la classification d'Ambler, capables d'hydrolyser les pénicillines, céphalosporines de première, deuxième, troisième et quatrième génération (céfépime ou cefpirome) et l'aztréonam. Elles sont inhibées in vitro par les inhibiteurs des β -lactamases (acide clavulanique, tazobactam et sulbactam) (**Livermore, 1995**). Par contre, les BLSE sont sensibles aux céphamycines (céfotétan et cefoxitine) ainsi qu'aux carbapénèmes. Une co-résistance avec les aminosides, les tétracyclines et les fluoroquinolones est fréquente. Les bactéries possédant des BLSE sont dites multirésistantes (**Paterson et Bonomo, 2005**).

Il s'agit d'un mécanisme de résistance de type plasmidique, et donc transmissible à d'autres bactéries. La présence de ce type de mécanisme de résistance au sein de souches pathogènes fait peser un risque majeur d'inadéquation thérapeutique et donc d'échec thérapeutique (**Schwaber et Carmeli, 2007**), et est également un facteur de diffusion. Au sein des entérobactéries, *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* sont les deux espèces les plus fréquemment porteuses de ces mécanismes de résistance. Toutefois, ces enzymes ont été retrouvées au sein de nombreuses autres espèces bactériennes, entérobactéries et bacilles non fermentants (tels que *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*) (**Jacoby et Munoz-Price, 2005**).

3.2. Différents types de BLSE

Elles sont classées selon leurs types moléculaires, les plus fréquents étant les types TEM, SHV, CTX-M (**Jacoby et Munoz-Price, 2005**).

3.2.1. BLSE de type TEM (Temoneira - nom du patient)

La première β -lactamase plasmidique de type TEM (TEM-1) a été isolée en 1965, en Grèce, à partir d'une souche d'*E. coli* isolée chez une patiente nommée Temoneira, d'où la nomination (**Datta et Kontomichalou, 1965**).

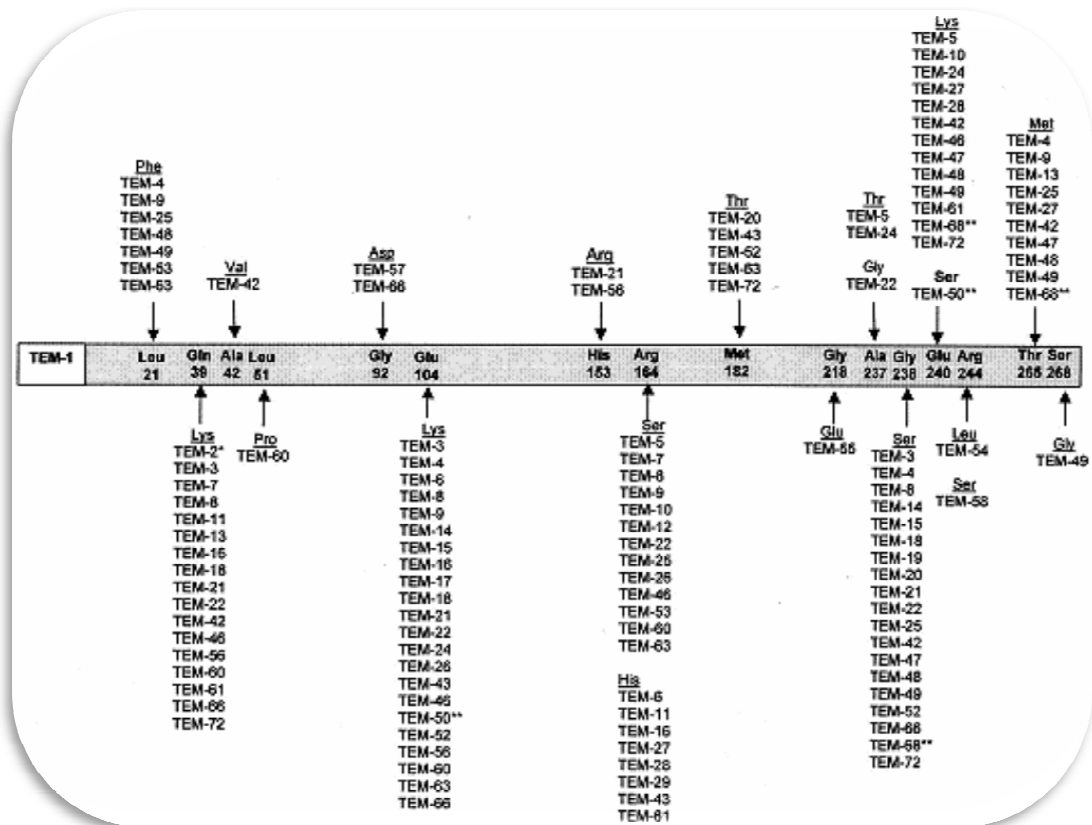


Figure N°08: Les BLSE dérivées de TEM (Ambler *et al.*, 1991).

La majorité des BLSE de ce type dérivent par quatre à sept mutations ponctuelles de l'enzyme originale (TEM-1 ou TEM-2). Les substitutions les plus courantes sont le glutamate en lysine en position 104, l'arginine en sérine en position 164, la glycine en sérine en position 238 et le glutamate en lysine en position 240 (Bradford, 2001). Une seule de ces substitutions peut entraîner une importante modification de l'affinité de l'enzyme (Figure N°8). Par exemple, lorsque l'acide aminé devient une sérine, l'interaction entre le $-NH_3$ de la sérine et le groupement oxy-amino des C3G se traduit par une meilleure stabilité de la β -lactamine dans le site actif de l'enzyme. Ces mutations rendent l'enzyme capable d'hydrolyser les C3G, mais aussi plus vulnérable à l'action des inhibiteurs (acide clavulanique). Cependant, d'autres mutations peuvent conférer la résistance aux inhibiteurs. Ces variantes sont appelées TRI (TEM résistantes aux inhibiteurs). Les enzymes dérivées par mutations permettant d'hydrolyser à la fois les C3G et les inhibiteurs sont de plus en plus fréquentes (Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006).

3.2.2. BLSE de type SHV (Sulfhydryl variable)

Les enzymes BLSE de type SHV dérivent par mutations ponctuelles de l'enzyme originale SHV-1 qui correspond à un gène *blaSHV* de pénicillinase chromosomique de *K. pneumoniae* (Brisse et Verhoef, 2001 ; Haegman *et al.*, 2004).

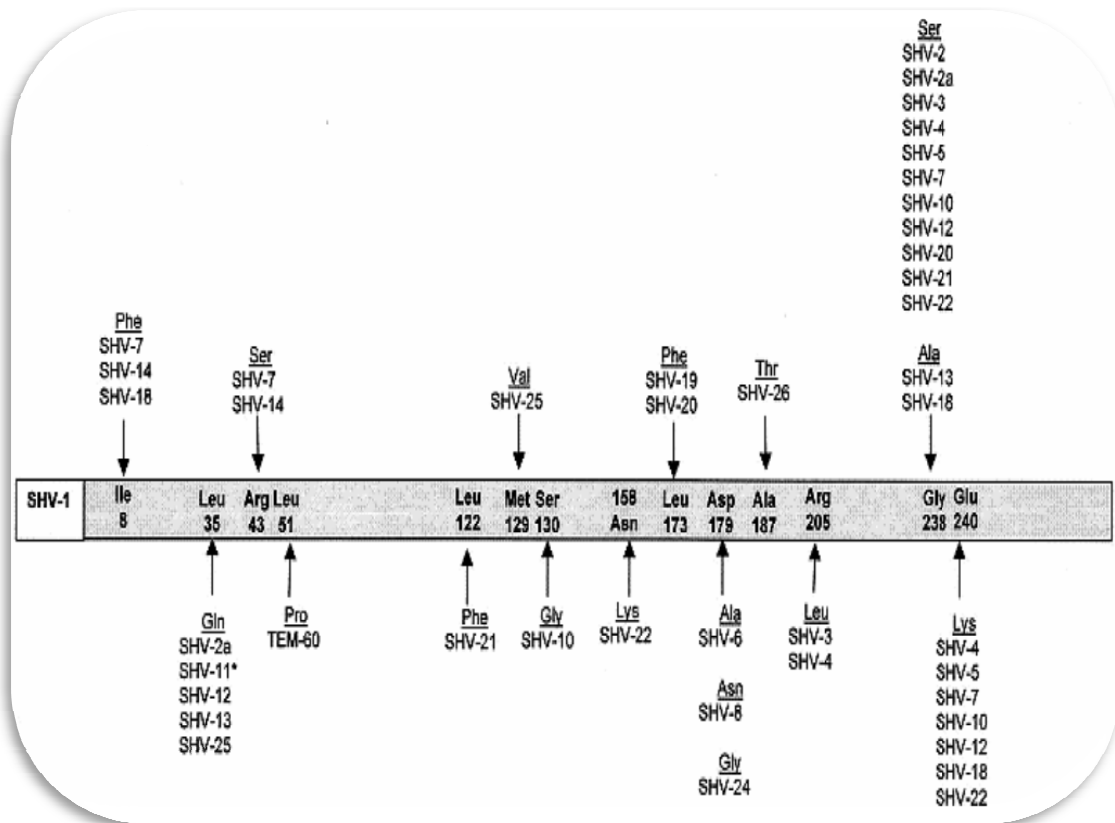


Figure N°09: Les BLSE dérivées de SHV (Bradford, 1999).

La majorité des BLSE de type SHV est caractérisée par la substitution d'acides aminés Gly238Ser ou Gly238Ser et Glu240Lys (Figure N°09). Le résidu sérine à la position 238 est indispensable pour l'hydrolyse efficace du céfotaxime et le résidu lysine est crucial pour l'hydrolyse efficace de la ceftazidime (Elhani, 2012).

La majorité des BLSE de type SHV ont été décrites chez les souches de *K.pneumoniae*, toutefois ces enzymes ont été trouvées chez *Citrobacter freundii*, *C. diversus*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae* (Bradford, 2001). Ainsi, ces enzymes sont aussi présentes chez les espèces de *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter spp* (Naiemi *et al.*, 2005; Poirel *et al.*, 2004). La présence de la séquence d'insertion IS26 sur le gène SHV faciliterait l'acquisition du phénotype BLSE (Hammond *et al.*, 2005).

3.2.3. BLSE de type CTX-M (Cefotaximase-Munich)

Les BLSE de type CTX-M ont été décrites initialement en 1986 (FEC-1) au Japon, Allemagne et France en 1989 (CTXM-1) et ont depuis lors disséminé largement dans le monde (Thomson et Moland, 2000). Ces « nouvelles » enzymes représentent à l'heure actuelle les BLSE les plus fréquentes au niveau mondial après leur diffusion rapide depuis les années 90 (Bonnet, 2004; Livermore *et al.*, 2007).

Le groupe CTX-M (pour céfotaximase) conférait à l'origine, chez les entérobactéries, un plus haut niveau de résistance au céfotaxime (ou ceftriaxone), céfépime et aztréonam qu'à la ceftazidime (**Arlet et Philippon, 2003; Bonnet, 2004**). Certaines d'entre elles ont évolué plus récemment par mutation (ponctuelle ou non) générant un haut niveau de résistance à la ceftazidime telles les enzymes CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-19, CTX-M-23 et CTX-M-32 (**Bonnet, 2004**). Les CTX-M sont plus fortement inhibées par le tazobactam que par l'acide clavulanique, et ont été classés en 6 groupes phylogénétiques : le groupe CTX-M-1 avec M-1, 3, 10, 11, 12, 15, 22, 23, 28, 29 et 30 ; le groupe CTX-M-2 avec M-4, 5, 6, 7, 20, et Toho-1 ; le groupe CTX-M-8 avec CTX-M-8, CTX-M-40 et CTX-M-63 ; le groupe CTX-M-9, avec M-13, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 27, le groupe CTX-M-25 avec CTX-M-26 et enfin le groupe CTX-M-45. Ces nouvelles BLSE ne sont pas étroitement liées aux β -lactamases de type TEM ou SHV puisqu'elles ne présentent que 40 % d'homologie avec ces BLSE classiques (**Elhani, 2012**).

Les analyses génétiques ont montré que les gènes progéniteurs appartiennent au genre *Kluyvera*, entérobactéries d'isolement très rare en bactériologie médicale (**Bonnet, 2004 ; Humeniuk et al., 2002**). La β -lactamase naturelle de *Kluyvera cryocrescens* (KLUC-1) présente 95 à 100 % d'identité avec les enzymes plasmidiques du phylum CTX-M-1 (**Decousser et al., 2001**). Ainsi le phylum CTX-M-2 dérive de la β -lactamase naturelle de *Kluyvera ascorbata* (codé par le gène *bla*KLUA) alors que le phylum CTX-M-8 vient de *K. georgiana* (codé par le gène *bla* KLUG) (**Poirel et al., 2002**), cette espèce serait également à l'origine du groupe 9 (**Olson et al., 2005**).

La dissémination horizontale des gènes codant pour les enzymes CTX-M s'effectue via des plasmides conjugatifs mais aussi via d'autres éléments génétiques comme les intégrons et les séquences d'insertion ISEcp1 (**Bradford, 2001**).

3.2.4. Autres types de BLSE

D'autres BLSE ont une distribution moins large, caractérisées par un haut niveau de résistance à la ceftazidime et parfois à l'aztréonam plutôt qu'au céfotaxime (**Arlet et Philippon, 2003; Bradford, 2001**), qui sont individualisées en BES-1 (*brazilian extended spectrum*), GES-1 (*Guyana extended spectrum*), PER-1 (*Pseudomonas extended resistance*) (**Weldhagen et al., 2003**), SFO-1 (*Serratia fonticola*), TLA-1 (Tlahuicas, tribu mexicaine), et VEB-1 (*Vietnam extended spectrum*). Des enzymes proches de GES-1 ont été découvertes en Grèce, malheureusement dénommées à tort IBC (*integron borne cephalosporinase*) (IBC-1, IBC-2) (**Philippon et Arlet, 2006**). En fin, l'OXA-1 qui a une grande activité catalytique pour la cloxacilline, l'oxacilline et la méticilline.

4. Répartition des mécanismes de résistance acquis aux b-lactamines chez les principales espèces d'intérêt médical

4.1. Les entérobactéries

La principale entérobactérie est *E. coli*. C'est la bactérie la plus fréquente en pathologie infectieuse, aussi bien dans les infections nosocomiales que dans les infections communautaires. Elle est responsable de 40 à 70 % des infections urinaires en milieu hospitalier et environ 70 % en ville. (Lavigne *et al.*, 2002). La fréquence des résistances acquises à l'amoxicilline concerne entre 30 et 50 % des souches en fonction de leur caractère nosocomial ou communautaire et en fonction du site d'isolement, alors que les résistances aux céphalosporines de troisième génération sont encore rares, de l'ordre de 1 % des souches. (Lavigne *et al.*, 2002; Sirot *et al.*, 2002)

Les mécanismes de résistance acquis les plus fréquents parmi les souches résistantes à l'amoxicilline sont essentiellement enzymatiques, impliquant surtout les pénicillinases de type TEM-1 ou TEM-2 (plus de 80 % des souches), suivies de très loin par les pénicillinases résistantes aux inhibiteurs TRI (de 3 à 7,6 %), l'hyperproduction de céphalosporinase (de 1 à 4 %) ou les associations TEM-hyperproduction de céphalosporinase (de 0,5 à 3,6 %). Les enzymes de type OXA sont rares, ainsi que les b-lactamases à spectre étendu qui représentent 0,1 à 0,4 % des souches. (Lavigne *et al.*, 2002)

Dans les cas fréquents où les bactéries hyperproduisent la pénicillinase TEM, les inhibiteurs de b-lactamase ne permettent pas de restaurer l'activité de l'amoxicilline. Les résistances non enzymatiques sont décrites, mais leur fréquence est mal connue en clinique et a une importance secondaire par rapport aux mécanismes enzymatiques.

Parmi les autres entérobactéries, on retrouve les mêmes mécanismes de résistance que chez *E. coli*, avec des fréquences variables en fonction des espèces. Les pénicillinases à large spectre de type TEM sont les plus répandues dans l'ensemble des espèces, alors que l'hyperproduction de la céphalosporinase AmpC. Les b-lactamases à spectre étendu sont plus fréquentes chez *E. aerogenes* et *K. pneumoniae* que chez *E. coli* ou les autres entérobactéries. Chez *K. pneumoniae*, environ 10 % des souches isolées à l'hôpital produisent une b-lactamase à spectre étendu (Jarlier et Nordmann, 2000) et les souches d'*E. aerogenes* produisant l'enzyme TEM-24 connaissent actuellement une extension clonale considérable (Bosi *et al.*, 1999). En dehors de l'espèce *E. coli*, les enzymes TRI sont rares. Les céphalosporinases AmpC plasmidiques sont encore peu fréquentes et les imipénémases restent exceptionnelles. Les

mécanismes enzymatiques sont parfois associés entre eux. Du fait de la fréquence des mécanismes enzymatiques chez les entérobactéries, la place des mécanismes non enzymatiques est parfois difficile à évaluer. Des souches de *K. pneumoniae* de sensibilité diminuée ou résistantes aux céphamycines par diminution d'expression d'une ou plusieurs porines sont assez souvent isolées en milieu hospitalier. Elles sont de sensibilité diminuée ou résistantes aux céphalosporines de première et deuxième générations, et ont une sensibilité diminuée aux uréidopénicillines, aux céphalosporines de troisième génération (y compris le céfépime et le céfpirome) et à des antibiotiques d'autres familles comme les quinolones, le chloramphénicol, les cyclines et le triméthoprime. **(Jarlier et Nordmann, 2000)**

L'association de modifications des porines à une forte hyperproduction de céphalosporinase chez de rares souches d'*E. cloacae*, *E. aerogenes* ou *C. freundii* peut conduire à une résistance à l'ensemble des b-lactamines, y compris à l'imipénème. **(Jarlier et Nordmann, 2000)**

4.2. *Pseudomonas aeruginosa*

On note depuis le début des années 1990 une stabilité des résistances aux b-lactamines chez *P. aeruginosa* **(GERPB, 2000)**. Les antibiotiques pour lesquels les pourcentages des souches sensibles restent les plus élevés sont l'imipénème (de 81 à 86 %), la ceftazidime (de 75 à 80 %) et la pipéracilline (de 69 à 73 %). L'association de tazobactam à la pipéracilline permet de récupérer environ 8 % de souches sensible **(GERPB, 2000)**. La sensibilité aux antibiotiques varie selon les sérotypes, le plus résistant étant de loin le sérotype O:12 du fait de la grande fréquence de la production de pénicillinase PSE-1 chez ce sérotype. Les sérotypes O:11 et O:4 présentent également des taux de sensibilité diminués aux b-lactamines du fait d'une hyperproduction plus fréquente de la céphalosporinase chromosomique AmpC pour O:11 et d'une fréquence plus élevée de l'hyperexpression de l'efflux pour O:4.

L'étude de la répartition des mécanismes de résistance aux b-lactamines montre que les mécanismes enzymatiques sont les plus fréquents, avec environ 16 % de souches de *P. aeruginosa* hyperproductrices de la céphalosporinase AmpC et de 11 à 13 % de souches productrices de b-lactamases transférables, dont la plus fréquente est la carbénicillinase PSE-1, loin devant les enzymes de type OXA ou TEM. Les b-lactamases à spectre élargi et les carbapénémases sont encore peu fréquentes en France chez *P. aeruginosa*, mais le risque d'extension clonale de ces souches doit faire l'objet d'une vigilance accrue. En ce qui concerne les mécanismes non enzymatiques, de 14 à 19 % des *P. aeruginosa* isolés en France présentent une résistance à l'imipénème par modification de la porine OprD2, et une résistance par

hyperexpression de la pompe d'efflux MexAB-OprM qui touche essentiellement la ticarcilline et l'aztréonam est retrouvée chez environ 15 % des souches de *P. aeruginosa*. (**Cavallo et al., 2002; GERPB, 2000**) Chez *P. aeruginosa*, l'association à un produit d'une autre classe d'antibiotique bactéricide (aminoside, ciprofloxacine) doit être la règle, en particulier dans les infections graves, pour rechercher une synergie bactéricide et limiter la sélection des souches résistantes.

L'association d'un inhibiteur de b-lactamase à une pénicilline n'a guère d'intérêt et peut même dans le cas de l'acide clavulanique induire l'hyperproduction de la céphalosporinase. Les isolats résistants à l'amikacine et à la ciprofloxacine sont plus fréquemment rencontrés parmi les souches productrices de b-lactamases transférables et à un moindre niveau parmi les souches hyperproductrices de céphalosporinase. Les souches de sensibilité diminuée à l'imipénème sont plus fréquentes lorsqu'il y a par ailleurs une forte hyperproduction de céphalosporinase. La sensibilité à la fosfomycine est faible, à l'exception notable des souches produisant une pénicillinase de type PSE-1, plus fréquentes avec le sérotype O:12 (**GERPB, 2000**).

4.3. *Acinetobacter baumannii*

Cette espèce est la principale espèce d'*Acinetobacter* responsable d'infections nosocomiales. Le principal mécanisme de résistance acquise est de loin celui de l'inactivation enzymatique avec hyperproduction de la céphalosporinase chromosomique ACE et/ou production de pénicillinases de type TEM (**Philippon et al., 2000**). Les autres pénicillinases (CARB-5 ou OXA) sont rares et les b-lactamases à spectre étendu (PER-1, VEB-1, SHV) sont encore exceptionnelles. Un mécanisme d'imperméabilité est évoqué chez certaines souches multirésistantes (environ 3 %) pour les quelles aucun mécanisme enzymatique n'est mis en évidence. Les résistances à l'imipénème sont quelquefois observées, liées à un mécanisme enzymatique (enzymes OXA ou carbapénèmase) ou bien à l'association d'une imperméabilité membranaire et d'une modification des PLP (**Philippon et al., 2000**).

1. Lieu et durée de l'étude

Cette étude a été réalisée au laboratoire de bactériologie de l'EPH Ahmed Ben Bella et les laboratoires pédagogiques de l'université Abbes Laghrour de la wilaya de Khenchela. Ce travail a duré de 15 mars à 30 Avril 2016.

2. Méthodes

2.1. Prélèvements

Les prélèvements correspondants aux différents sites (urines, pus, liquide de dialyse, etc.), sont réalisés dans différents services du EPH Ahmed Ben Bella et de service d'Hémodialyse de l'hôpital Ali Boushaba de la wilaya de KHENCHELA.

2.2. L'enrichissement

Dans le cas du prélèvement liquide (urine et liquide de dialyse, ponction d'assit ...). A proximité de bec bunsen, 10µl de liquide de prélèvement sans mis dans un tube contenant 5ml de cœur-cerveau ou bouillon nutritive, ainsi pour les prélèvements écouvillonné (pus prélèvement vaginale) mettre l'écouvillon dans un tube contenue de 5ml de bouillon nutritive. Ensuite on incube à 37 C° pendant 24H.

2.3. Isolement et purification

L'isolement se fait sur le milieu sélectif (EMB) et sur le milieu gélose nutritive. A l'aide d'une pipette pasteur on ensemence par stries sur gélose de façon à obtenir des colonies bien isolées, après on incube à 37°C pendant 24 heures. Après l'étude de l'aspect des colonies, nous avons effectué des repiquages successifs sur milieu sélectif afin d'obtenir de souches pures.

2.4. L'identification des bactéries

L'identification comporte une série des étapes, se succèdent le plus souvent dans un ordre déterminé ; les souches isolées ont été identifiées par des techniques microbiologiques standards examen macroscopique et examen microscopique (coloration de Gram) et par le système Galerie API20E (**Biomatérieux**) et la Galerie biochimique classique.

2.4.1. Biodiversité morphologique des isolats

2.4.1.1. Examen macroscopique

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification sur gélose nutritive et sur gélose EMB, les éléments importants de l'identification macroscopique sont:

- La forme des colonies: rondes, irrégulières, ondulées,...etc.
- La taille des colonies: par la mesure du diamètre.
- La chromogènes: la couleur de la colonie.
- L'élévation: convexe, légèrement convexe, plate....etc.
- L'opacité: opaque, translucide, transparente.
- La surface: lisse, rugueuse, sèche, dentelée,...etc.
- La consistance : les colonies grasses, crémeuse donnant facilement des suspensions homogènes, correspondent au type S (Smooth = lisse). Tandis que les colonies sèches correspondent au type R (Rough = rugueux) et les colonies muqueuses (filantes) correspondant au type M (Muqueux); elles donnent difficilement des suspensions homogènes.

2.4.1.2. Examen microscopique

➤ Coloration de Gram

C'est un procédé qui permet de diviser les bactéries en deux groupes distincts : les bactéries à coloration de Gram positive et les bactéries à coloration de Gram négative. Cette coloration permet en plus de préciser la morphologie et le mode de regroupement des cellules. Sur des lames en verre propres, des frottis des souches isolées ont été réalisés puis fixés par la chaleur en les passant, par mouvements rapides, trois à quatre fois sur la flamme du bec Bunsen.

Les frottis préparés sont colorés avec une solution de violet de Gentiane, qui est un colorant basique, pendant une minute. Ensuite les lames sont rincées avec l'eau distillée.

On applique ensuite une solution iodo-iodurée de Lugol qui agit comme un mordant en augmentant les interactions entre le colorant et les cellules afin que ses dernières soient contrastées. Après rinçage, les frottis sont décolorés à l'éthanol. Cette dernière étape engendre l'aspect différentiel de la coloration de Gram.

Les bactéries de coloration positive gardent le violet de Gentiane tandis que les autres le perdent et se décolorent. Juste après la décoloration est arrêtée par lavage à l'eau du robinet. Finalement les frottis seront recolorés au moyen d'un colorant basique de couleur rose : la fuchsine pendant une minute puis rincer abondamment à l'eau du robinet. Une fois séchés, les

lames sont examinées sous microscope optique à l'aide de l'objectif à immersion (x 100). Les bactéries Gram négatif apparaissent colorées en rose tandis que les bactéries Gram positif sont colorées en violet (**Prescott *et al.*, 2003**).

2.4.2. Identification biochimique

2.4.2.1. Test d'oxydase

- **Principe**

L'oxydase est une enzyme qui catalyse une réaction d'oxydoréduction impliquant une molécule de dioxygène (O₂) comme accepteur d'électrons (**Denis *et al.*, 2007**).

Sa présence ou son absence représente un des critères systématiques les plus discriminatifs et les plus employés pour l'identification des BGN.

- **Technique**

La mise en évidence de l'oxydase a été faite selon la méthode des disques d'oxydase qui consiste à :

- Déposer un disque d'oxydase sur une lame, et l'imbiber avec une goutte d'eau physiologique stérile.
- Prélever une colonie à l'aide d'une pipette Pasteur et l'étaler sur le disque (**Denis *et al.*, 2007**).

- **Lecture**

La présence d'une cytochrome-oxydase se traduit, en 20 à 60 secondes, par l'apparition d'une coloration rouge virant rapidement au violet très foncé (**Denis *et al.*, 2007**).

2.4.2.2. Teste catalase

La catalase (Ferro porphyrine de poids moléculaire élevé) a la propriété de décomposer l'eau oxygénée avec dégagement d'oxygène. C'est l'action directe de l'enzyme qui est mise en évidence dans la masse bactérienne.

On prend une goutte d'eau oxygénée (H₂O₂) à 10 volumes qu'on déposé sur une lame avec une colonie bien distincte de culture jeune de 24h, le dégagement immédiat de bulles d'oxygène exprime la présence d'une catalase.



2.4.3. Galerie biochimique classique

2.4.3.1. Test du citrate de Simmons

L'utilisation du citrate comme seule source de carbone est mise en évidence par la réalisation d'un ensemencement en surface sur le milieu citrate de Simmons.

Après incubation pendant 24H à 37°C une réaction positive se traduit par une alcalinisation du milieu en le faisant virer au bleu.

2.4.3.2. Test mannitol mobilité

Le test permet de tester d'une part la dégradation du mannitol et d'autre part la mobilité de la souche.

Le milieu mannitol - mobilité contient le rouge de phénol comme indicateur coloré de pH, l'ensemencement est réalisé par piqûre centrale.

La dégradation du mannitol se traduit par une acidification du milieu qui fait virer l'indicateur de pH au jaune, ce changement de couleur permet également de localiser les bactéries dans le tube et de ce fait évaluer indirectement leur pouvoir d'envahissement et par conséquent leur mobilité.

2.4.3.3. Teste des produits de fermentation du glucose

Le milieu utilisé est le milieu Clark et Lubs, on ensemence 5ml de ce milieu avec le germe à étudier. Incuber à 37°C pendant 24H puis additionner les réactifs de Voges Proskauer.

Si la souche étudiée produit de l'acétone, la présence de ce métabolite se manifeste par l'apparition d'une coloration rose en surface, pouvant diffuser dans le milieu.

2.4.3.4. Teste des décarboxylases : LDC, ODC, ADH

A partir d'une culture de la souche à étudier sur gélose, on prépare une suspension en eau physiologique, on ensemence chacun des tubes avec 2 ou 3 gouttes de cette suspension :

- Le premier tube contient uniquement le milieu de Møller, c'est le tube témoin.
- Le 2eme contient le milieu Møller avec lysine.
- Le 3eme contient le milieu Møller avec l'arginine.
- Le 4eme contient le milieu Møller avec l'ornithine.

On recouvre les quatre tubes avec une couche d'huile de vaseline de 1 à 1,5 cm et on incube pendant 24H à 37°C

- ✓ Résultat positif : virage au jaune.
- ✓ Résultat négatif : virage au violet

2.4.3.5. Test des trois sucres à identifier : (Milieu TSI)

On réalise un ensemencement par stries sur la pente et par piqûre centrale dans le culot.

Le milieu permet de tester avec ou sans production de gaz, l'utilisation de glucose, saccharose et lactose par le virage du rouge de phénol au jaune et la production d'H₂S par la souche qui se traduit par un dépôt noir de fer, la lecture se fait au bout de 24H d'incubation à 37°C.

2.4.3.6. Teste de la production d'indole

Ajouter quelques gouttes du réactif de Kovacs, après 24 heures, à une suspension dense en milieu urée -indole.

La présence d'indole révèle la dégradation du tryptophane se traduisant par l'apparition d'un anneau rouge en surface.

2.4.3.7. Teste de l'uréase et du tryptophane désaminase

A partir d'une culture pure, on ensemence un milieu d'urée, puis on incube à l'étuve à 37°C pendant 18H. La présence de l'uréase se traduit par une alcalinisation du milieu d'où une coloration rose rouge. La désamination du tryptophane se manifeste par une coloration brune après l'adjonction de perchlorure de fer.

2.4.4. Recherche des pigments spécifiques de *Pseudomonas*

Cette recherche a été réalisée sur les milieux King A et King B qui permettent de différencier les espèces du genre *Pseudomonas*, par la mise en évidence de la production de pigments spécifiques (Guillaume, 2004).

- **Principe**

L'élaboration des pigments est influencée par la composition du milieu, ce qui justifie l'utilisation de deux milieux différents :

* La production de pyocyanine, due spécifiquement à *P.aeruginosa*, est favorisée par la présence d'ions inorganiques et de certains acides aminés qui composent le milieu King A.

* La production de pyoverdine, caractéristique du groupe fluorescent, dépendant de la nature des peptones, est favorisée par la teneur élevée en phosphate présent dans le milieu King B (Guillaume, 2004).

- **Technique**

- Ensemencer les deux milieux : King A et King B en faisant une strie médiane ou des stries serrées à la surface de la gélose et incuber à 37°C pendant 24H.

- **Lecture**

La présence des pigments diffusibles se traduit par l'apparition d'une couleur qui peut diffuser sur toute la boîte.

* **Sur le milieu King A :** Les colonies typiques sur ce milieu sont colorées en bleu vert (pyocyanine), parfois en brun rose (pyorubine).

* **Sur le milieu King B :** La production de pyoverdine se manifeste par une coloration jaune-verte, avec une fluorescence observée à la table UV (**Guillaume, 2004**).

2.4.5. Identification biochimique par la galerie API20E (Entérobactéries)

2.4.5.1. Principe et description de la galerie

L'API 20E est un système standardisé pour l'identification des entérobactéries.

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

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



Figure N°10 : la Galerie Api 20E

2.4.5.2. Technique

- **Préparation de la galerie**

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 9ml d'eau distillée stérile dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Incrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Sortir la galerie de son emballage.

- Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

- **Préparation de l'inoculum**

Préparer une suspension bactérienne dense dans 5 ml d'eau physiologique stérile à partir d'une culture pure et jeune de 18 à 24 H sur GN, La suspension bactérienne est standardisée à l'aide du témoin 0,5 McFarland.

- **Ensemencement de la galerie API 20 E**

- Introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, pointe appuyée à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation de bulles d'air :
 - Pour les caractères soulignés ADH, LDC, ODC, H₂S, URE, ensemercer le tubule par la suspension et la cupule par l'huile de paraffine.
 - Pour les caractères encadrés VP, CIT, Gel, ensemercer le tubule et la cupule par la suspension.
 - Pour les caractères non encadrés, non soulignés ensemercer uniquement le tubule par la suspension.
- Refermer la boîte d'incubation et la placer à 37°C pendant 18 à 24 heures.

2.4.5.3. Lecture de la galerie

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture (**Annexe N°04**).
- Si trois tests ou plus (test GLU + ou -) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :
 - * **Test TDA** : ajouter une goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
 - * **Test IND** : ajouter une goutte de réactif KOVACS. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
 - * **Test VP** : ajouter une goutte de réactif VP1 et VP2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.

2.4.5.4. Interprétation

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

2.5. Etude de la sensibilité aux antibiotiques (CA-SFM, 2015)

La méthode de diffusion est l'une des plus anciennes approches de détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques et demeure l'une des méthodes les plus utilisées en routine. Elle convient pour la majorité des bactéries pathogènes incluant les bactéries à croissance lente ; elle permet une variété dans le choix des antibiotiques et ne requiert aucun matériel particulier. Comme la plupart des techniques de diffusion en gélose.

• Milieu de culture

L'antibiogramme est réalisé sur la gélose Mueller Hinton reconstituée.

• Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture visible du prélèvement réalisée sur milieu non sélectif, réaliser une suspension bactérienne en solution salée (eau physiologique) pour atteindre une turbidité équivalente à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de McFarland (**Annexe N°10**), ce qui correspond à un inoculum d'environ $1 \text{ à } 2 \times 10^8$ UFC/mL pour *Escherichia coli*. Pour ce faire, prélever plusieurs colonies de même morphologie afin d'éviter de sélectionner un variant atypique. Mettre ces colonies en suspension en milieu salé avec un écouvillon en coton.

La suspension bactérienne est standardisée à l'aide du témoin 0,5 McFarland. Un inoculum lourd engendre des diamètres plus petits et inversement.

On comparé à l'œil nu la turbidité de la suspension bactérienne à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de McFarland. Dans ce cas agiter vigoureusement l'étalon de turbidité sur un Vortex avant usage. Pour faciliter la comparaison des deux échantillons, se placer face à un fond blanc avec des lignes noires. Pour ajuster la densité bactérienne au tube 0,5 McFarland, ajouter soit la solution salée soit les colonies.

• Inoculation des géloses

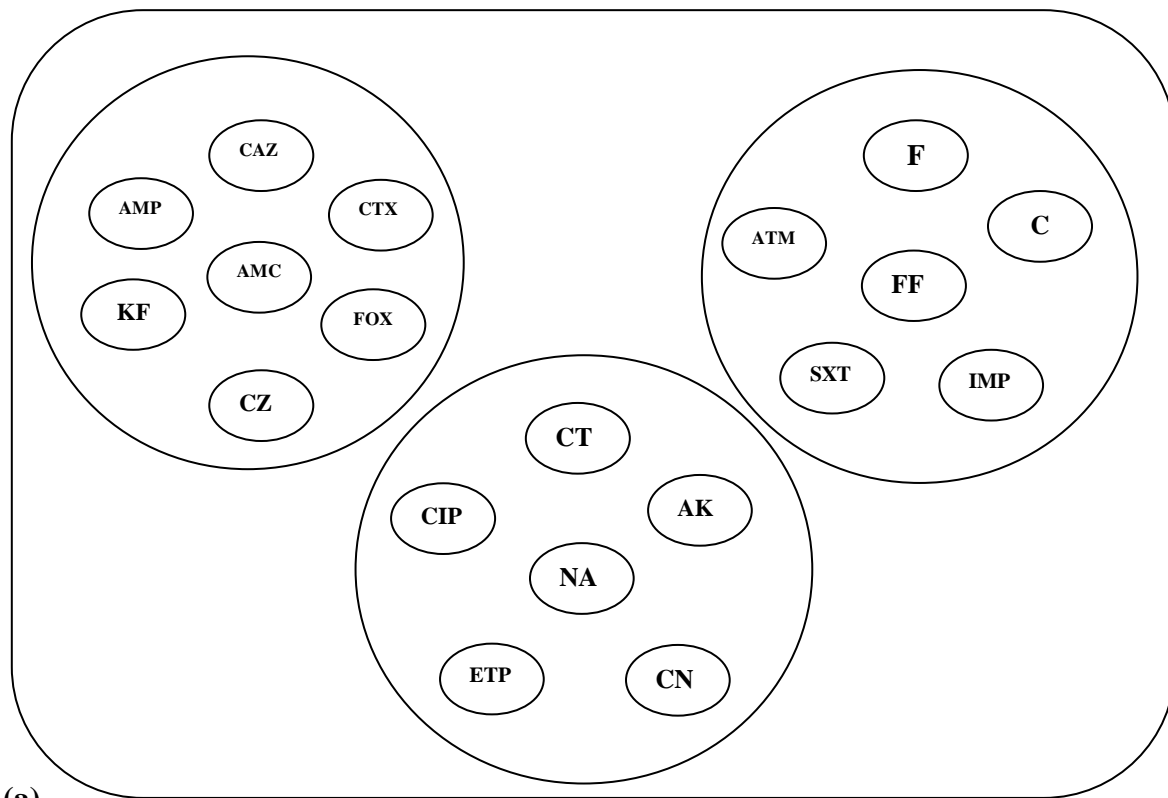
L'inoculum bactérien doit idéalement être employé dans les 15 min. qui suivent sa préparation. Son emploi doit être fait au plus tard dans les 60 min qui suivent sa préparation.

Plonger un écouvillon en coton stérile dans la suspension bactérienne et éliminer l'excès de liquide en tournant l'écouvillon sur les parois du tube pour éviter une sur-inoculation des boîtes, en particulier pour les bactéries à Gram négatif. Ecouvillonner sur la totalité de la surface de la gélose dans trois directions.

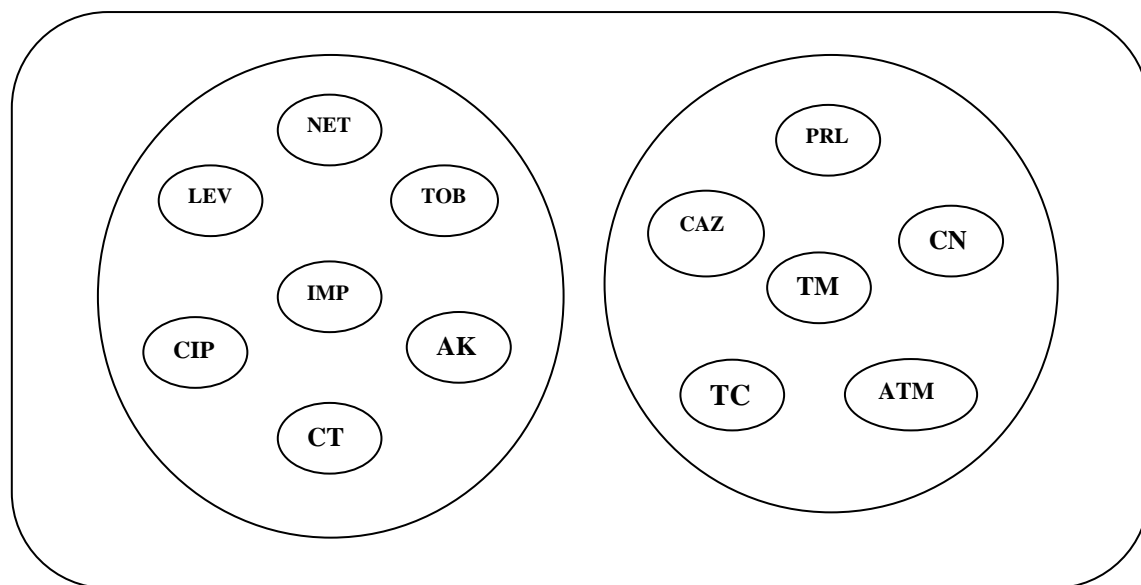
• Dépôt des disques imprégnés d'antibiotique

Déposer les disques fermement à la surface de la gélose inoculée et séchée. Le contact avec la surface doit être étroit. Les disques une fois déposés ne peuvent être déplacés car la diffusion des antibiotiques est très rapide.

Le nombre de disques déposés par boîte est limité du fait du chevauchement des zones d'inhibition et pour limiter les interférences entre les antibiotiques. Il est important que les diamètres des zones d'inhibition soient mesurables. Le nombre maximum de disques est fonction de la bactérie et des antibiotiques car certains entraînent pour des souches sensibles, des zones très larges.



(a)



(b)

Figure N° 11: (a) Dépôt des disques pour les *Entérobactéries*. (b) Dépôt des disques pour les *Pseudomonas*

- **Incubation des boîtes de Petri**

Retourner les boîtes et les incuber idéalement dans les 15 min. qui suivent le dépôt des disques, sans dépasser 30 min. Si elles sont abandonnées à température ambiante après dépôt des disques, la pré-diffusion des antibiotiques engendrera des zones d'inhibition faussement agrandies.

Il est possible d'effectuer la lecture après 16 à 24 H et de répondre quand la souche est résistante ; en cas de sensibilité, il y a lieu d'incuber à nouveau puis de lire à 24 H.

- **Lecture des boîtes après incubation**

Vérifier que les diamètres des zones d'inhibition sont dans les limites du contrôle de qualité. Les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques sont mesurés à l'aide d'une règle et l'interprétation en Sensible (S), Intermédiaire (I) ou Résistante (R) est effectuée selon les critères définis par le CA-SFM (communiqué CA-SFM, 2015) (Annexe N°03).

2.6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) est réalisée par la technique d'E-Test pour les souches résistantes aux Céfotaxime, Céftazidime,.

Les antibiotiques testés sont les suivants : Imipénème, Céfotaxime, Céftazidime, Ticarcilline-acide clavolanique.

- **E-Test**

La préparation des cultures suit les mêmes étapes que celles décrites pour l'antibiogramme standard.

La bandelette contenant différentes concentrations de l'antibiotique à tester est prélevée délicatement à l'aide d'une pince puis appliquée sur la surface gélosée. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 18-24H. La CMI de l'antibiotique testé est lue à l'œil nu, boîte ouverte et bien éclairée. Elle correspond à la graduation, située à la jonction entre l'ellipse (dessinée par l'inhibition de la culture bactérienne) et la bandelette E-test.



Figure N°12 : Technique d'E-Test pour détermination de la CMI

2.7. Étude des phénotypes de résistance aux β -lactamines

2.7.1. Test de synergie (Rahal, 2005)

• Principe

Cette technique, sur gélose dite des « bouchons de champagne » recommandée par le CASFM, reste la plus utilisée. Elle consiste à rechercher une synergie sur gélose de Mueller-Hinton entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur des β -lactamases (d'amoxicilline + acide clavulanique) et des disques (placés à 2 ou 3 cm du disque central) de C3G (ceftazidime, de céfotaxime) et/ou d'aztréonam et céfalotine. Elle permet de différencier une bactérie hyperproductrice de céphalosporinases d'une bactérie produisant une BLSE dans la famille des entérobactéries.

• Technique

La recherche de la β -lactamase à spectre étendu se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme en disposant un disque d'amoxicilline/acide clavulanique AMC à 30 mm (centre à centre) d'un disque de C3G (CAZ, CTX), ATM, KF.

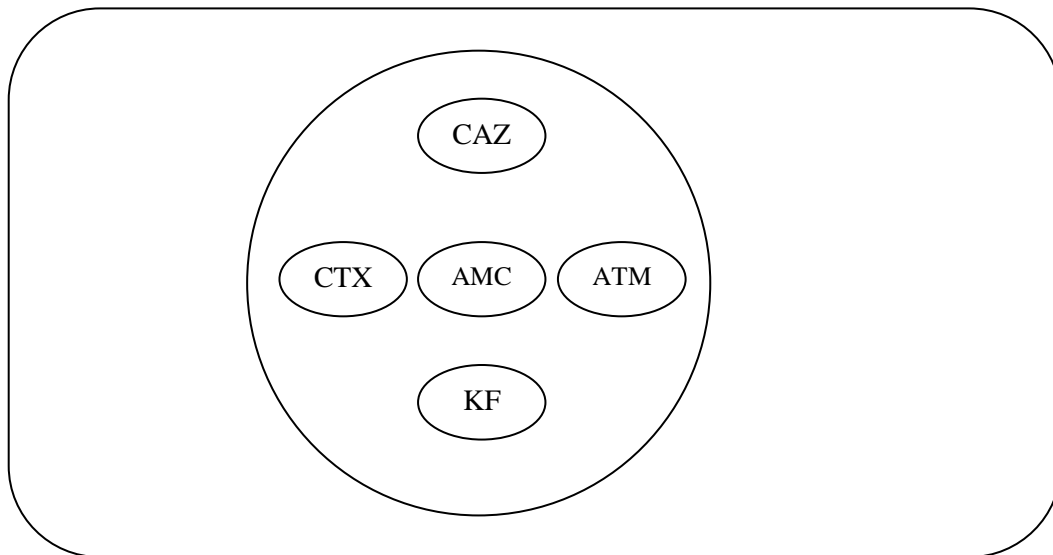


Figure N°13 : Disposition des disques d'antibiotiques pour recherche de BLSE

- **Lecture**

Il y a présence d'une BLSE ou un test de synergie positif quand il y a une image caractéristique, en « bouchon de Champagne ». Un résultat positif est basé sur l'inhibition des BLSE par l'acide clavulanique, et par conséquent l'augmentation de l'activité des céphalosporines de troisième génération.

2.7.2. Recherche des métallo- β -lactamases

2.7.2.1. Test de Hodge (Cuzon *et al.*, 2009; Anderson *et al.*, 2007)

- **Principe**

Un disque d'imipénème est appliqué au centre d'une boîte de Mueller Hinton (MH) préalablementensemencée avec une souche d'*Escherichia coli* sauvage (ATCC 25922) sensible aux carbapénèmes afin d'obtenir une culture confluyente et un diamètre dans la zone de sensibilité autour de l'imipénème.

- **Technique**

- ✓ Préparer une suspension d'*Escherichia coli* ATCC 25922 de 10^8 UFC/ml;
- ✓ Ensemencer par écouvillonnage une gélose Mac Conkey;
- ✓ Faire une lourde strie de la souche à tester à partir d'un prélèvement de quelques colonies d'une culture sur milieu Mueller Hinton gélosé du centre de la boîte vers la périphérie;
- ✓ Sécher les boîtes 15 mn;
- ✓ Déposer un disque d'imipénème et ensemencer par une strie les souches testées au centre vers l'extrémité de la boîte;

- ✓ Incuber 18 H à 37°C ± 1°C.

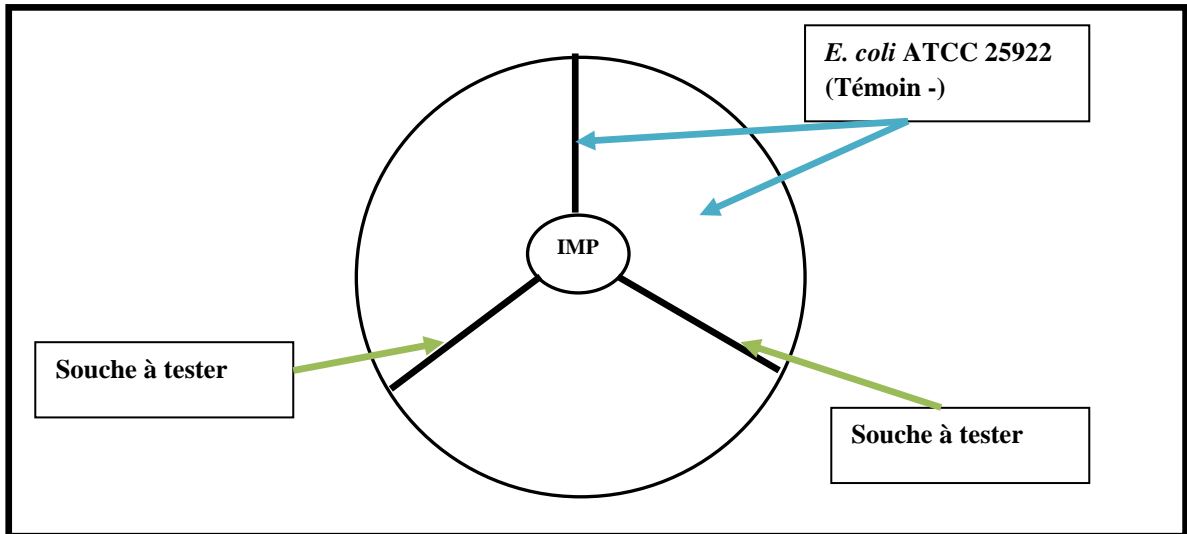


Figure N°14 : Technique de test de Hodge

- **Lecture**

L'hydrolyse de l'imipénème par la souche à tester se traduit par l'échancrure de la zone d'inhibition de la souche d'*Escherichia coli* ATCC 25922.

2.7.2.2. Test de l'EDTA (Aggoune-Khinache *et al.*, 2009; Galani *et al.*, 2008)

- **Principe**

La recherche de la production de métallo- β -lactamases a été effectuée sur les souches en mettant à profit la faculté de l'éthylènediamintetraacetic acid (EDTA) (Annexe N°11), chélateur bivalent à restaurer l'activité de l'imipénème en chélatant les ions Zn^{2+} indispensables à l'activité de la métallo- β -lactamases en la rendant inactive. Il permet de différencier entre les métallo- β -lactamases et les autres carbapénèmases de classe A ou D.

2.7.2.3. Technique de DDST (Double-disc synergy tests)

- **Principe**

- ✓ Préparer des suspensions de la souche à tester a une densité équivalente à 0.5 Mc Farland et inoculer une boîte de Mueller Hinton; Puis, placer trois disques, un disque d'imipénème (10 μ g) et un disque de imipénème + EDTA et un disque blanc de papier wattman a distance de 10, 15 et 20 mm (centre à centre);
- ✓ Ajouter 10 μ l de solution d'EDTA 0.5 M au disque blanc;
- ✓ Incuber 18 H à 37°C.

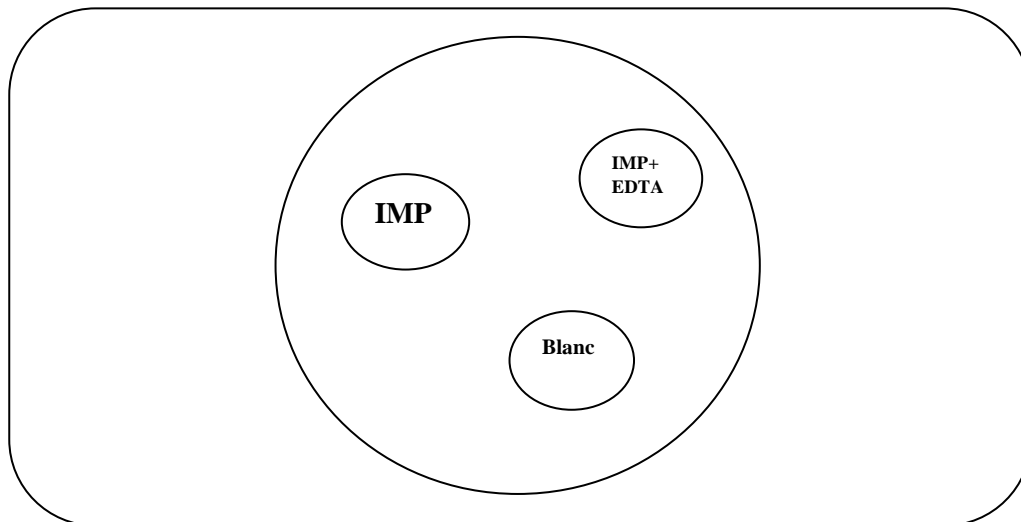


Figure N° 15 : Disposition des disques d'antibiotiques pour la synergie.

- **Lecture**

Après l'incubation, la présence d'une zone d'inhibition synergétique est interprétée positive.

2.7.2.4. Recherche de synergie

- **Principe**

Un DD-test est réalisé avec un disque d'imipénème (10 μ g) et un disque en papier wattman avec 10 μ l de solution d'EDTA à 0,5M distant de 15mm (Jeong *et al.*, 2006). La présence d'une M β L est détectée par visualisation d'une image de synergie entre le disque d'imipénème et celui d'EDTA.

3. Conservation des souches

A partir d'une suspension bactérienne et à l'aide d'une anse de platine ensemencé la surface de gélose inclinée, incubation de à 37°C pendant 24H.

Les souches sont conservées dans des tubes de gélose nutritive inclinés à une température de 4°C (ces bactéries sont placées dans un état de vie ralentie ou momentanément suspendue donc dans des conditions peu favorables pour leur multiplication).

4. Étude du transfert des gènes par conjugaison

- **Matériel**

- ✓ Souche donatrice : *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella spp*, *Escherichia coli* résistantes aux céftazidime et sensible aux Azide de sodium.
- ✓ Souche réceptrice : *Escherichia coli J53* résistante aux Azide de sodium sensible aux Céftazidime.

- ✓ Bouillon nutritif.
- ✓ Gélose Mueller Hinton.
- ✓ Azide de sodium en poudre
- ✓ Disque de céftazidime (CAZ) (4µl/ml).

• **Technique**

- ✓ Les quatre souches donatrices et la souche réceptrice sont cultivées dans 10 ml de bouillon nutritif, puis incubées à 37°C pendant une nuit au bain-marie agitateur. Des dilutions à 1/50^{ème} de la souche réceptrice et des souches donatrices sont réalisées dans du bouillon nutritif (200µl dans 10ml de BN), puis incubées à 37°C pendant 3h. Dans un Erlen, 1 ml de la culture de la souche donatrice et 3ml de la culture de la souche réceptrice sont mélangés à 5ml du bouillon nutritif neuf (rapport 1/3/5) ; puis incubés à 37°C pendant 2h, avec les témoins (la souche donatrice ensemencée sur MH et la réceptrice sur MH + Azide de sodium 0.2µg/ml) à 37°C pendant 24h.
- ✓ Le milieu de sélection des transconjugants est représenté par la gélose Mueller Hinton contenant disque d'antibiotique de ceftazidime (qui correspond au caractère suspecté plasmidique de la souche donatrice) et l'autre l'Azide de sodium (concentration finale de 0.2 µg/ml) qui est un caractère chromosomique de la souche réceptrice.
- ✓ On étale 200µl du mélange avec un râteau étaleur sur la surface des boites de sélection et on ensemence la souche réceptrice et donatrice séparément sur les boites témoins.
- ✓ On incube les boites témoins et de sélection à 37°C pendant 18H.
- ✓ L'étude de la résistance des transconjugants aux antibiotiques est réalisée par la méthode de l'antibiogramme standard en prélevant avec une cure dent stérile, une colonie (du transconjugant) qu'on dissocie dans 1ml d'eau physiologique stérile. A partir de cette dernière, on réalise l'antibiogramme.

1. Souches bactériennes

Au cours de notre étude, 50 souches des BGN ont été isolées, dont 25 souches résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération (céftazidime) ont été identifiées au niveau de deux hôpitaux à KHENCHELA, durant une période de 1 mois et 15 jours (de 15 Mars à 30 Avril 2016).

Selon les résultats de l'identification par la galerie API 20E, *P. aeruginosa* est l'espèce la plus fréquemment isolée avec un taux de 28% (14/50), suivi par, *K. pneumoniae*, et *Salmonella spp* avec des taux de, 24% (12/50) et 16% (8/50) respectivement (Figure N°16).

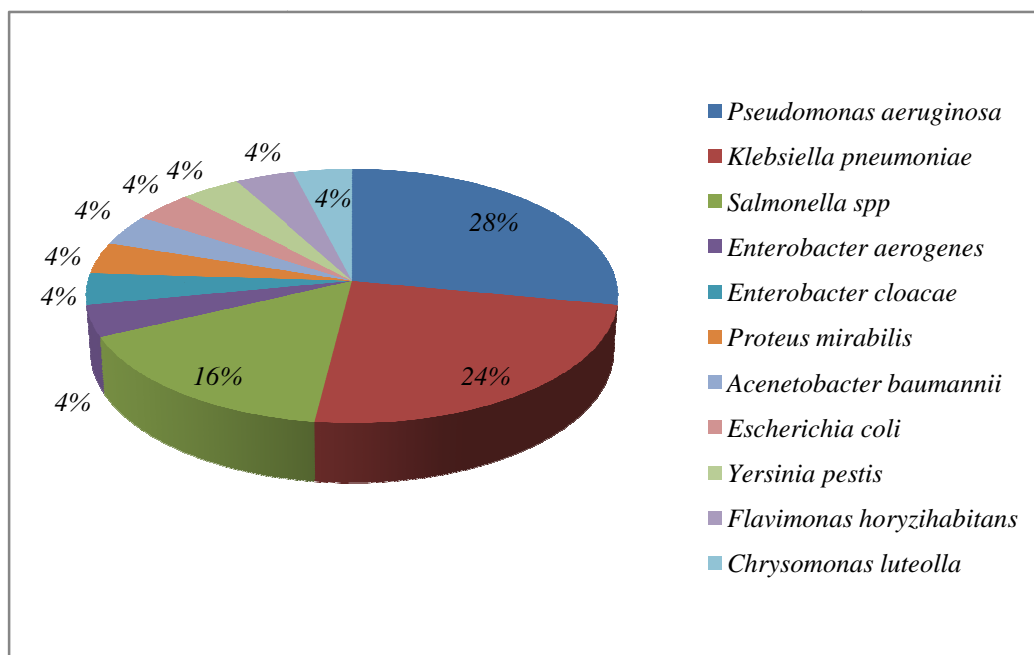


Figure N°16: Fréquence des souches BGN isolées.

1.1.Répartition des souches selon le sexe des patients

La figure N°17 montre que les taux d'isolement les plus élevés sont observés chez le sexe féminin avec une valeur de **74%** (37/50), tandis que le taux de prélèvement chez les patients de sexe masculin est de **26%** (13/50).

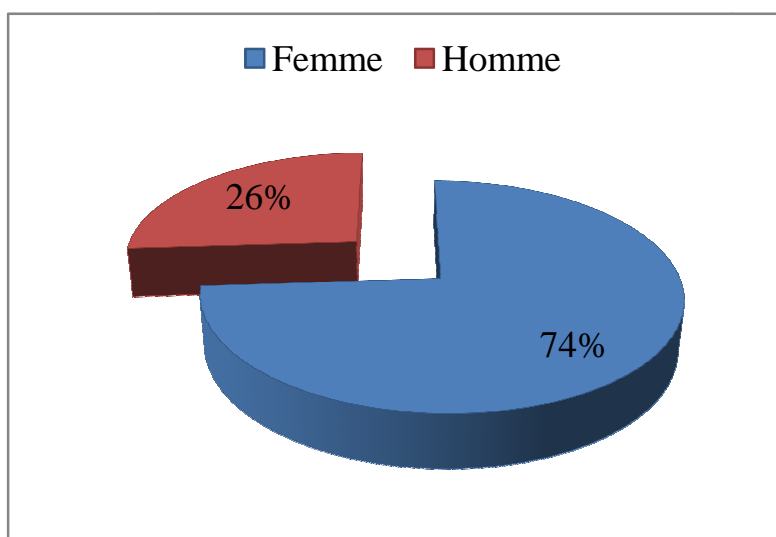


Figure N°17 : Répartition des souches par sexe des patients.

1.2. Répartition des souches selon la nature du prélèvement

Les résultats montrent que plus de la moitié des souches (66%) sont d'origine urinaire, et que (22%) des souches ont été isolées à partir de liquide de dialyse, (6%) des souches ont été isolées à partir de Pus, et (2%) isolés à partir de liquide de drainage et ponction d'assit et prélèvement vaginale. La répartition des souches selon l'origine de prélèvement est résumée dans le tableau N°III.

Tableau N°III : Répartition des souches selon la nature du prélèvement

Type de prélèvement	Nombre de prélèvement	Pourcentage %
ECBU	33	66%
Liquide de dialyse	11	22%
Pus	3	6%
Liquide de drainage	1	2%
Ponction d'assit	1	2%
Prélèvement vaginale	1	2%
Total	50	100%

ECBU: Examen Cytobactériologiques des Urines

2. Identification des souches

2.1. Examen macroscopique

Sur gélose nutritive et gélose EMB, les colonies présentant l'aspect macroscopique caractéristiques de la famille des *Enterobacteriaceae* et *Pseudomonadaceae*.

➤ **Sur gélose nutritive**

- Colonies beiges ou blanchâtres, rondes, bombées, de 1 à 4 mm de diamètre, d'odeur putride ou fade, parfois muqueuses ;
 - Colonies jaunes, rondes, bombées de 0,1 à 0,5 mm de diamètre ;
 - Colonies beiges, à bord irrégulier, de 2 à 3 mm de diamètre d'odeur putride ;
- Colonies bleu vertes, à bord irrégulier de 0,5 mm de diamètre, dégageant une odeur du jasmin caractéristique de *P. aeruginosa*.

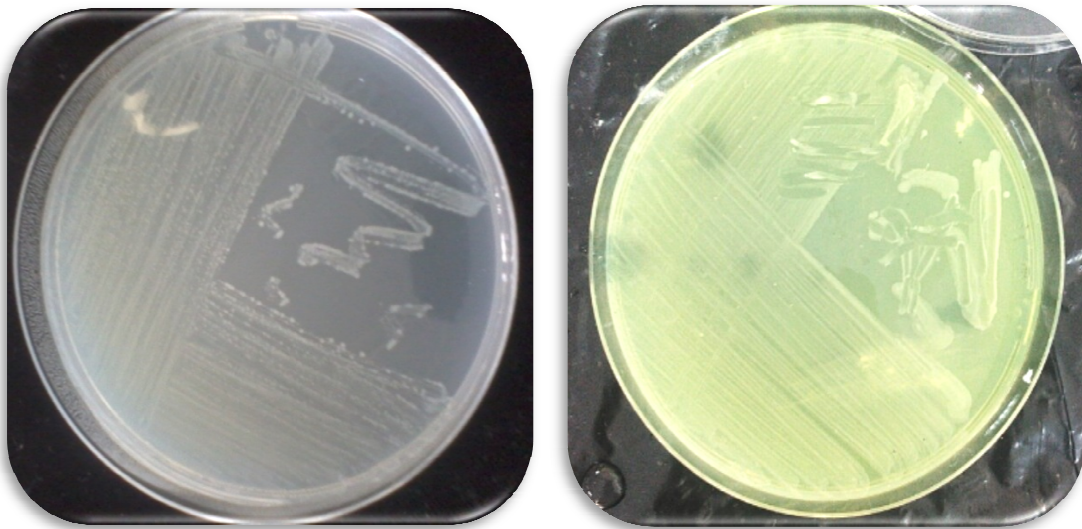


Figure N°18 : Aspect macroscopique des souches des BGN sur gélose nutritive.

➤ **Sur EMB**

- Colonies violettes :
Semi-bombées de 2 à 3mm de diamètre avec éclat métallique, centre sombre : *E. coli* très bombées muqueuses de diamètre 5 mm centra gris marron sans reflet *Klebsiella*
- colonies grisâtres :
1 à 2 mm de diamètre transparentes, grises ambrées : *Salmonella*, *Shigella*. 2 mm de diamètre, grisâtres avec une pellicule autour de la colonie : *Proteus morganii punctiformes* et grisâtres : *Enterococcus*.

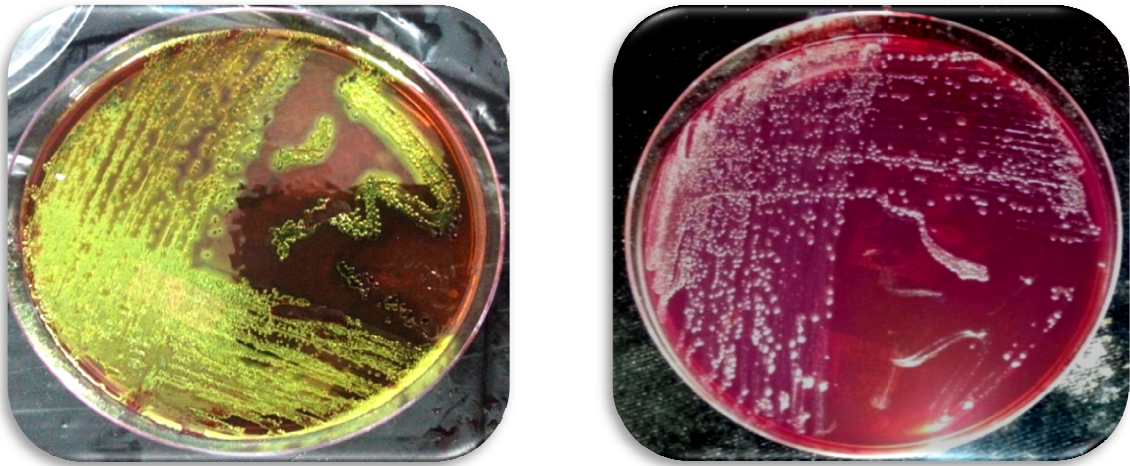


Figure N°19 : Aspect macroscopique des souches des *BGN* sur gélose EMB.

2.2. Examen microscopique

L'examen microscopique après coloration différentielle de Gram d'une culture jeune (18 à 24 heures d'incubation) a révélé des bacilles isolées ou en courtes chainettes colorés en rose. Les colonies apparues à la surface de la gélose sont donc issues de bacilles à Gram négatif, ceci concorde avec le caractère de la gélose EMB qui est un milieu sélectif pour les bacilles Gram négatif.

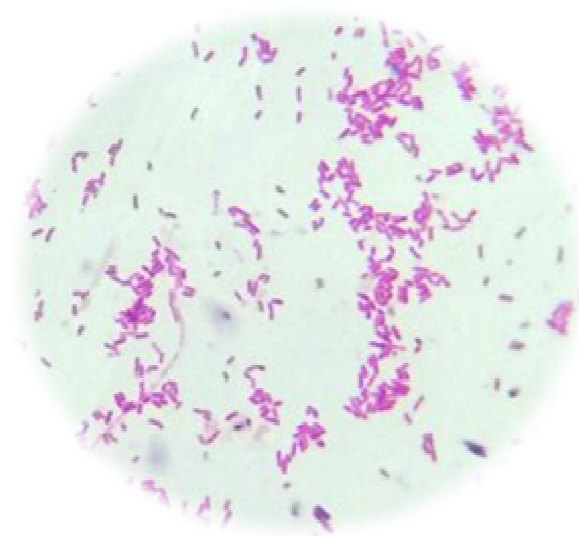


Figure N° 20: Résultats de la coloration de gram sous microscope optique (X1000).

2.3. Identification des *Pseudomonas*

Les milieux de King (milieu King A et milieu King B permettent de différencier entre elles les différences espèces du genre *Pseudomonas*, par la mise en évidence de la production de pigments spécifiques.

L'élaboration des pigments est influencée par la composition du milieu, ce qui justifie l'utilisation de deux milieux différents : King A et King B.



Figure N°21 : Aspect macroscopique des *Pseudomonas* sous UV

La production de pyocyanine, due spécifiquement à *Pseudomonas aeruginosa*, est favorisée par la présence d'ions inorganiques. La recherche de la production de pyocyanine est effectuée sur milieu King A.

La production de pyoverdine, est favorisée par une teneur élevée en phosphate. La recherche de la production de pyoverdine est effectuée sur milieu King B sous UV de longueur 365 nm.

2.4. Résultats de l'identification par la galerie Api20E

Tableau N°IV: Résultat de l'identification biochimique des bactéries par les galeries API 20E

ONPG	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+
ADH	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+
LDC	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+
ODC	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
CIT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
H2S	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
URE	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
IND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
VP	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
GEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
GLU	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
INO	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
SOR	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
RHA	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
SAC	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
MEL	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
AMY	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-
ARA	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
Identification	<i>Flavimonas horyzihabitans</i>	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	<i>Salmonella arizonae</i>	<i>Kluyvera spp</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Salmonella spp</i>	<i>Yersinia pestis</i>	<i>Chryseomonas luteolla</i>

(+) : Résultat positif, (-) : Résultat négatif; (ONPG) : β -galactosidase ; (ADH) : Arginine-dihydrolase ; (LDC) : Lysine-décarboxylase ; (ODC) : Ornithine-décarboxylase ; (CIT) : Citrate ; (H2S) : Production du sulfure d'hydrogène ; (URE) : Uréase ; (TDA) : Tryptophane-désaminase ; (IND) : Indole ; (VP) : Réaction de Voges-Proskauer ; (GEL) : Gélatine ; (GLU) : D-glucose ; (MAN) : D-mannitol ; (INO) : Inositol ; (SOR) : D-sorbitol ; (RHA) : L-rhamnose ; (SAC) : D-saccharose ; (AMY) : Amygdaline ; (MEL) : D-melibiose ; (ARA) : L- arabinose.

3. Etude de sensibilité aux antibiotiques

3.1. Étude de la sensibilité aux β -lactamines

Les 25 souches BGN sélectionnées selon leur résistance à la CAZ ont montré des taux de résistance élevés pour la plupart des β -lactamines, (76%) pour la Céftriaxone, et (60%) pour l'ampicilline et céfotaxime. Il est à noter que 4% (1/25) des souches testées résistantes aux carbapénèmes appartient au genre *Salmonella spp.* (Tableau N°V)

Tableau N°V: Taux de résistance aux β -lactamines par espèces.

Antibiotique Espèces	Taux de résistance (%)												
	AMP	AMC	CAZ	CTX	IMP	ATM	ETP	FOX	KF	PRL	TIM	TC	CZ
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	28	-	0	4	-	-	-	16	24	28	-
<i>K. pneumoniae</i>	24	20	24	12	0	8	12	12	24	-	-	-	16
<i>Salmonella spp</i>	12	12	16	8	4	8	8	8	12	-	-	-	8
<i>E. aerogenes</i>	4	4	4	4	0	4	0	4	4	-	-	-	4
<i>E. cloacae</i>	4	4	4	4	0	4	0	4	4	-	-	-	4
<i>P. mirabilis</i>	4	4	4	4	0	4	4	4	4	-	-	-	4
<i>A. baumannii</i>	4	4	4	4	0	4	4	4	4	-	-	-	4
<i>E. coli</i>	4	4	4	0	0	0	0	0	4	-	-	-	0
<i>Yersinia pestis</i>	4	4	4	0	0	0	0	4	4	-	-	-	4
<i>Flavimonas horyzihabitans</i>	0	4	4	0	0	4	0	0	0	-	-	-	-
<i>Chrysonomas luteolla</i>	0	4	4	0	0	4	4	4	0	-	-	-	0
Total	60	52	76	36	4	44	32	44	60	16	24	28	44

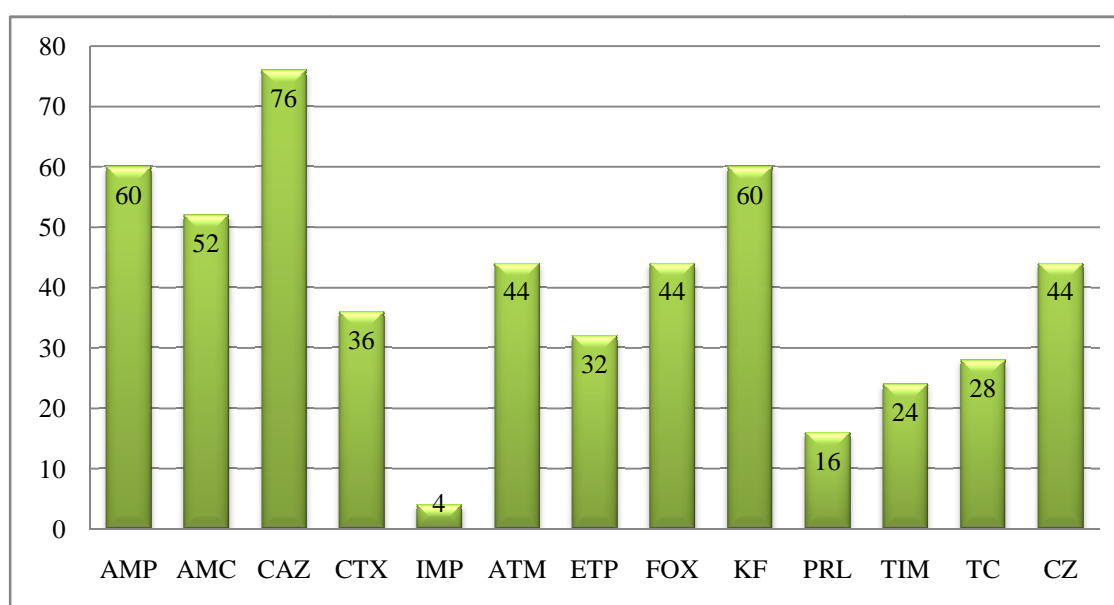


Figure N°22: Taux de résistance aux β -lactamines des BGN

Ces souches des BGN présentent également une résistance à d'autres familles d'antibiotiques mis à part les β -lactamines. En effet, des taux de résistance peut élevés de 40% ont été enregistrés pour Acide nalidixique et Triméthoprine-sulfaméthoxazole, (36%) été enregistrés pour la Gentamycine et la tétracycline, et de (24%) ont été enregistrés pour la Fosfomycine et Chloramphénicol (Tableau N°VI).

Tableau N°VI: Taux de résistance aux autres familles d'antibiotiques par espèces

Antibiotiques Espèce	Taux de résistance (%)											
	AK	CN	NA	CIP	C	F	SXT	FF	CT	LEV	NET	TOB
<i>P. aeruginosa</i>	-	8	-	0	-	-	-	-	-	0	0	8
<i>K. pneumoniae</i>	8	12	12	12	8	8	12	12	12	-	-	-
<i>Salmonella spp</i>	0	4	4	0	4	4	8	4	4	-	-	-
<i>E. aerogenes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	4	-	-	-
<i>E. cloacae</i>	0	4	4	0	4	0	4	0	0	-	-	-
<i>P. mirabilis</i>	0	0	4	0	0	4	4	0	4	-	-	-
<i>A. baumannii</i>	0	4	4	4	4	4	4	4	4	-	-	-
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	4	0	0	0	0	-	-	-
<i>Yersinia pestis</i>	0	0	4	4	0	0	4	0	0	-	-	-
<i>Flavimonas horyzihabitans</i>	0	0	4	0	0	0	4	0	4	-	-	-
<i>Chrysonomas luteolla</i>	0	4	4	0	0	0	0	4	4	-	-	-
Total	8	36	40	20	24	20	40	24	36	0	0	8

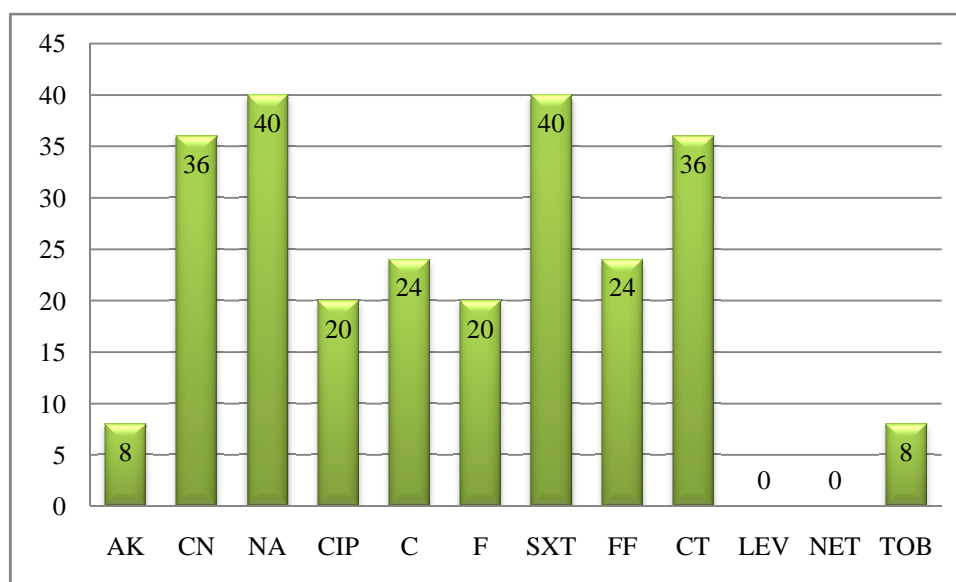


Figure N°23: Taux de résistance aux autres familles d'antibiotiques des BGN

4. Analyse des souches résistantes aux carbapénèmes

4.1. Caractéristiques des souches résistantes aux carbapénèmes

Les caractéristiques cliniques d'une souche (*Salmonella spp*) qui est résistante aux carbapénèmes et trois souches (*K.pneumoniae*, *P. mirabilis*) qui ont représenté des zones d'inhibition intermédiaire aux l'imipénème sont représentées dans le tableau N°VII.

Tableau N°VII : Caractéristiques cliniques de la souche résistante aux carbapénèmes

Code	Souches	Date d'isolement	Sexe	Origine	Hôpital
419	<i>Salmonella spp</i>	27-03-2016	Femme	ECBU	Ahmed Ben Bella KHENCHELA
388	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17-03-2016	Femme	ECB de Pus	
421	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	27-03-2016	Femme	ECBU	
430	<i>Proteus mirabilis</i>	27-03-2016	Homme	ECB de Pus	

Toutes les souches présentant une diminution de la sensibilité aux carbapénèmes ont été isolées durant la même période (Mars 2016) au niveau de l'EPH Ahmed Ben Bella de la wilaya de KHENCHELA.

Ces souches sont issues de diverses origines, 02 prélèvements sont isolés à partir des urines, et 02 prélèvements sont isolés à partir de pus. 03 souches ont été isolées des patients du sexe féminin contre 01 seule souche chez le sexe masculin.

4.2. Résistance des souches aux β -lactamines

Les résultats de l'antibiogramme effectué sur les 13 souches des BGN montrent que la totalité des souches sont résistantes à toutes les β -lactamines testées néanmoins, une diminution de la sensibilité à l'imipénème et à l'aztréonam pour certaines souches (Figure N°24) (Tableau N°VIII).

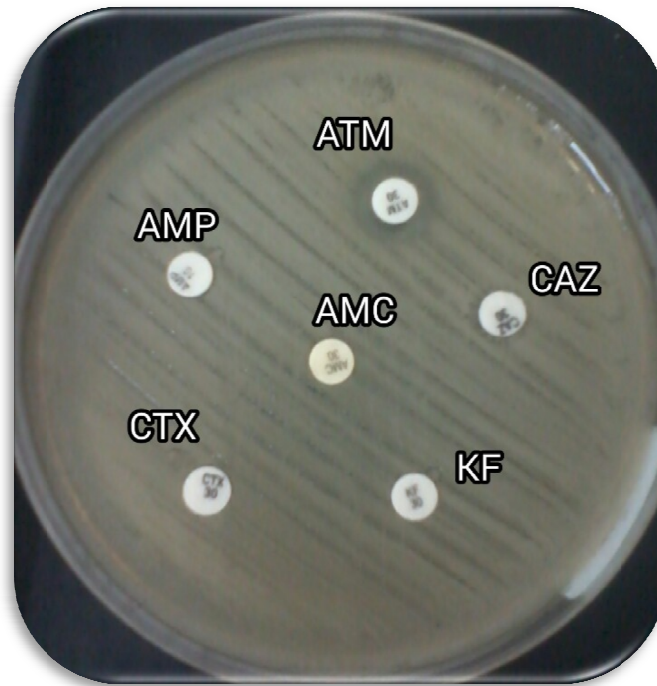


Figure N°24: Résultat de l'antibiogramme (β -lactamines) de la souche *E.aerogenes* (448).

4.3. Étude de la sensibilité aux autres familles d'antibiotiques

La majorité des souches sont résistantes aux autres familles d'antibiotiques (quinolones, aminosides, sulfamides).

L'indice de multi-résistance (rapport entre nombre d'antibiotiques auxquels la souche est résistante sur le nombre total d'antibiotiques testés) qui renseigne sur le niveau de résistance des souches aux molécules testées est très élevé pour la majorité des souches. Ainsi, seule deux souches de *K. pneumoniae* est résistante à tous les antibiotiques testés, alors que la souche d'*E. cloacae* est résistante à 5 des 9 antibiotiques testés. Enfin, la souche d'*E.aerogenes*, est résistante à 4 sur 9 antibiotiques testés (Figure N°25) (Tableau N°IX).

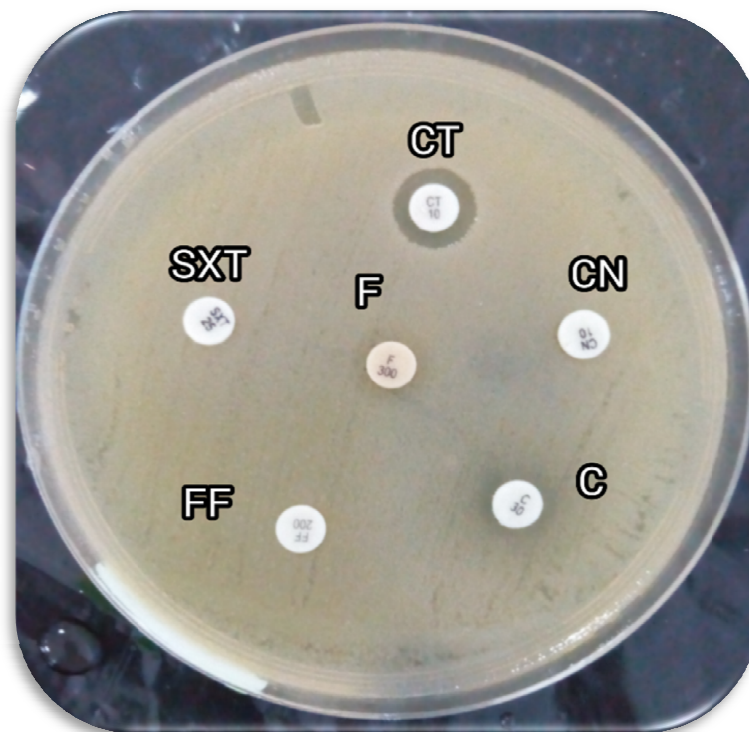


Figure N°25 : Résultat de l'antibiogramme (autres que β -lactamines) de la souche *K.pneumoniae* (388)

4.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Les CMI ont été déterminées par la technique d'E-test (Figure N°26) et sont données dans le tableau N°X.

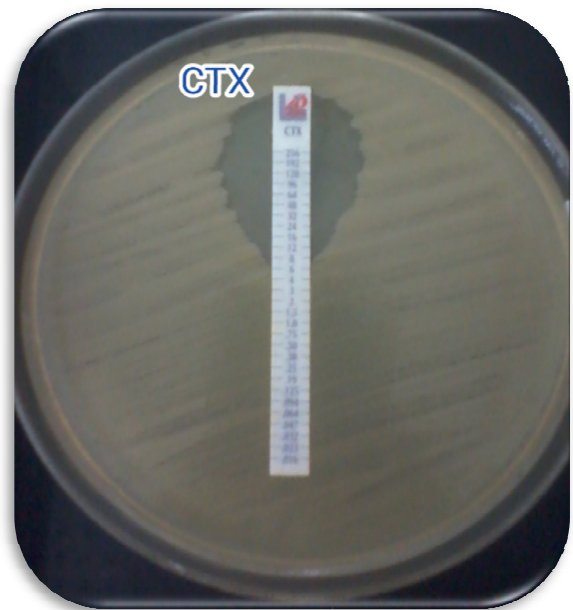
Il est à noter que les souches *K. pneumoniae* et *E.aerogenes* sont les plus résistantes avec des CMI >256 µg/ml pour la céfotaxime et ceftazidime. Concernant les carbapénèmes, les CMI de l'imipénème sont légèrement de l'ordre de 0.25 µg/ml pour *Salmonella spp* et *Salmonella orizonae* et de 12 µg/ml (Ticarcilline + Acide clavulanique) et de 1.5 µg/ml (ceftazidime), pour *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau N°X: CMI (µg/ml) des souches résistantes aux β-lactamines

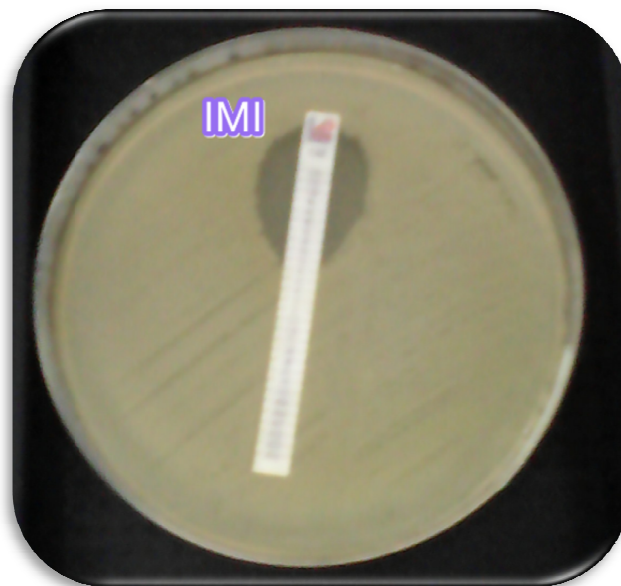
Codes	Antibiotiques Espèces	CAZ	CTX	IMP	TTC
373	<i>Flavimonas horyzihabitans</i>	10	6	-	-
388	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	≥256	≥256	-	-
389	<i>Acinetobacter baumannii</i>	56	-	0.75	-
419	<i>Salmonella spp</i>	8	4	-	-
421	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	8	-	-
340	<i>Proteus mirabilis</i>	1.5	-	-	-
435	<i>Salmonella spp</i>	-	8	0.25	-
422	<i>Salmonella orizonae</i>	-	0.95	0.25	-
448	<i>Enterobacter aerogenes</i>	≥256	≥256	-	-
398	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.5	-	-	12



a)



b)



c)

Figure N°26: Résultats de la détermination des CMI par l'E-test.

a et b) *Klebsiella pneumoniae*; **c)** *Acinetobacter baumannii*

5. Caractérisation des phénotypes de résistance aux β -lactamines

5.1. Recherche de la production de carbapénèmases (Résultats du Hodge-test)

Le test de Hodge est positif pour une seule souche (image de trèfle) indiquant la production de carbapénèmases (Figure N°27).

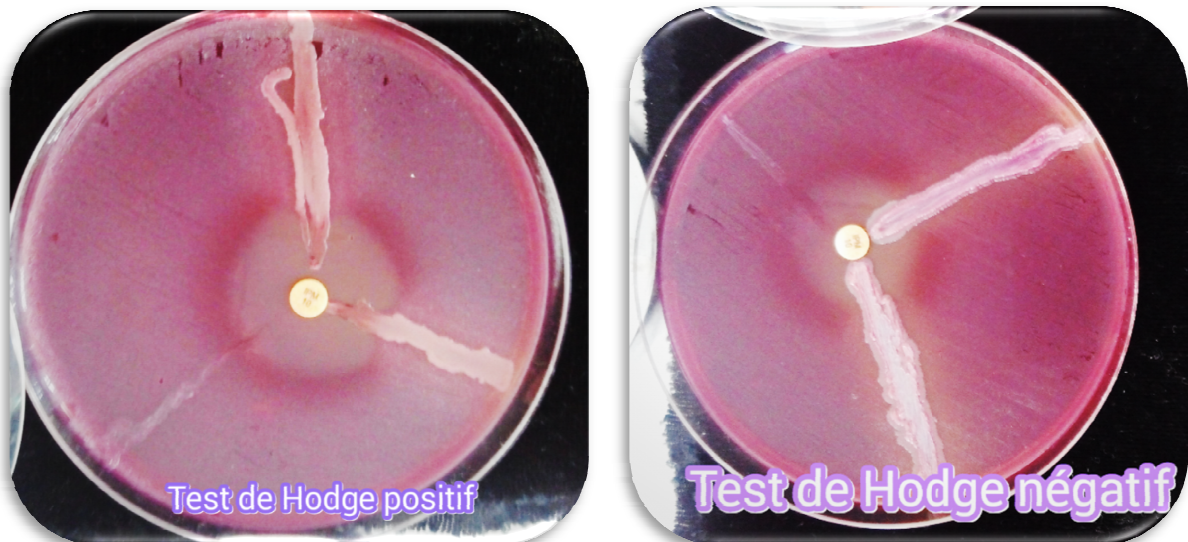


Figure N°27 : Résultats du test de Hodge (*K.pneumoniae* (388))

5.2. Production des métallobeta-lactamases

Le test à l'EDTA est positif pour une seule souche, que ça soit, en combinaison avec les disques d'imipénème ou par le test de synergie, indiquant, ainsi, la production de carbapénèmases de type métallobeta-lactamases, comme l'illustre la Figure N°28.

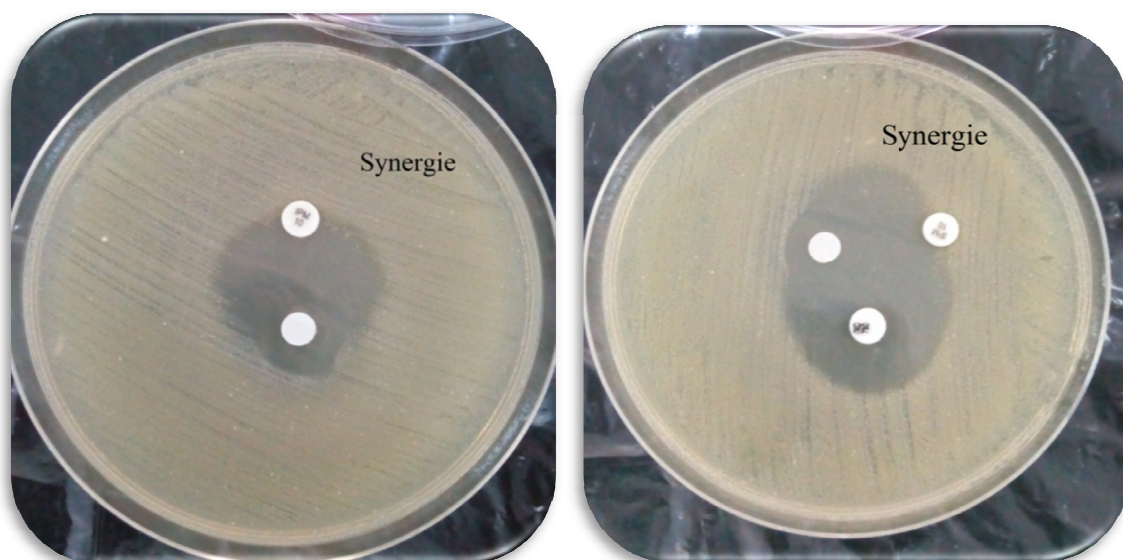


Figure N°28 : Résultats du test d'inhibition à l'EDTA (Souche de *K. pneumoniae* (388))

5.3. Recherche des β -lactamases à spectre étendu (BLSE)

L'absence de l'image de synergie chez tous les souches qui on à étudié (Figure N°29), indiquant une hyper production de céphalosorinase.

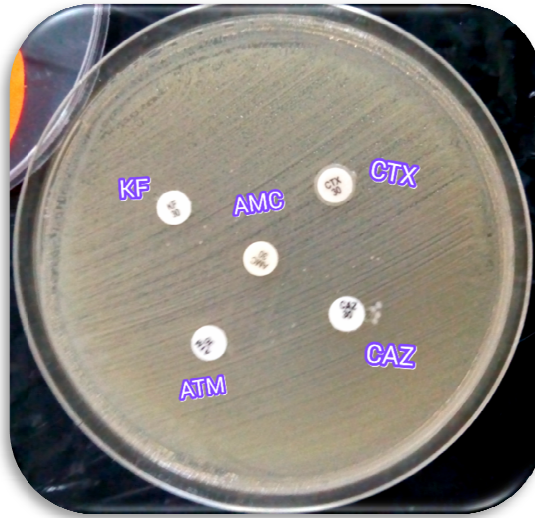


Figure N°29 : Résultats du test de recherche de BLSE (*Enterobacter aerogenes* 448).

6. Transfert des gènes de résistance par conjugaison

Le transfert par conjugaison des gènes de résistance aux antibiotiques a été réalisé pour quatre souches *Salmonella spp*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* avec la souche réceptrice *Escherichia coli* résistante à l'Azide de sodium. Et n'a donné aucune souches transconjugants qui présentant des profils identiques à ceux des souches donatrices.

Discussion général

Les bacilles à Gram négatif, dont les entérobactéries restent les bactéries les plus isolées dans les infections en milieu hospitalier et extrahospitalier. Elles occupent une place très importante en pathologie humaine infectieuse. Cette importance s'explique aussi bien par la variété des espèces bactériennes qui les composent et leur fréquence au niveau de la santé des populations.

La résistance aux antibiotiques est devenue un problème majeur de santé publique en Algérie. En effet ces dix dernières années, nous avons constaté une importante augmentation de la résistance aux antibiotiques en particulier chez les bacilles à Gram négatif. La résistance aux β -lactamines chez les entérobactéries est dominée par la production de BLSE de type CTX-M-3 et CTX-M-15. Les souches productrices de ces enzymes sont souvent à l'origine d'infections potentiellement sévères aussi bien en milieu hospitalier que communautaire (**Zbak et Arlet, 2014**).

Elles sont capables de développer de nombreux mécanismes de résistance tels que la production de β -lactamases dont les céphalosporines de 3^{ème} génération, et les carbapénèmes constituent souvent les seules armes contre bon nombre de bactéries à Gram négatifs multi-résistantes, en particulier les productrices de β -lactamase à Spectre Etendu (BLSE). Cependant, la production de carbapénèmases par les bactéries, contre-indique un traitement aux carbapénèmes. L'émergence et la diversité des souches productrices de carbapénèmases sont donc particulièrement préoccupantes (**Guzek et al., 2013**).

Ainsi, le but de ce travail était de déterminer la prévalence de la résistance aux carbapénèmes chez les BGN résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération isolées au niveau de l'EPH Ahmed Ben Bella et de service d'hémodialyse de l'hôpitala Ali Boushaba au KHENCHELA, mais aussi de caractériser le phénotype de résistance aux antibiotiques des souches. Il est à noter qu'à ce jour, cette région n'a fait l'objet d'aucunes publications concernant les mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les BGN.

Dans notre étude 50 souche ont été isolées dont 50% (25/50) sont résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération, et 2% (1/50) sont productrice de métallo-betalactamase.

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

De plus, plusieurs études antérieures réalisées en Algérie) ont montré des taux de résistance élevés aux C3G (**Belbel, 2014 ; Hamidechi et Meziani, 2011 ; Lagha, 2015 ; Metadjer, 2014**). D'autre étude ont montré un taux de résistance plus bas (8.47%) (**Mezhoud, 2014**).

La fréquence de prélèvements urinaires par rapport aux autres produits pathologiques est dominante avec une fréquence de 39%. Ceci concorde avec d'autres études sur la région est de l'Algérie (**Belbel, 2014**)

Parmi les 25 souches résistance aux C3G, 3 souches sont de sensibilité intermédiaire à l'imipénème (*K. pneumoniae*) et une souche résistante (*Salmonella spp.*). Les carbapénèmes incluent le seul groupe d'antibiotiques à faible toxicité utilisé lors des traitements d'infections dues aux entérobactéries productrices de BLSE (EBLSE). Toutefois, l'utilisation des carbapénèmes en thérapeutique a été suivie rapidement par la description de souches résistantes chez les entérobactéries. De plus, les travaux de **Armand-Lefèvre et al (2013)** ont permis de constater que le taux de résistance à l'imipénème a augmenté de 5,9% à 7,8% chez des patients porteurs de BLSE ayant été exposés à cet antibiotique durant 1 à 3 jours, et ont pu conclure par la suite que la consommation d'imipénème, même dans une période assez courte, est belle et bien un facteur de risque dans l'acquisition de la résistance.

Les souches *K. pneumoniae* à résistance intermédiaire à l'imipénème ont montré une résistance à la quasi-totalité des bêtalactamines testés. Une étude menée sur les souches de *K. pneumoniae* isolées du milieu hospitalier, a montré un taux de résistance élevée aux C3G soit 80% (**Belbel, 2014**).

De plus les souches de *Pseudomonas aeruginosa* résistante aux C3G ont montré une sensibilité à la quasi totalité des antibiotique testé, ce résultats est en désaccord avec ceux de (**Hamidechi et Meziani. 2011**). qui a les y trouvées sensible que à gentamycine et la ciprofloxacine. La résistance d'une souche aux C3G associé avec la sensibilité aux autres antibiotiques est due probablement à l'utilisation abusive des C3G.

Par ailleurs, on n'a pas pu montre la production des BLSE par les souches résistantes aux C3G, traduit par l'absence de l'image de synergie. Dans ce cas un test de BLSE avec la présence de la cloxacilline est nécessaire pour confirmer s'il y a une production d'une BLSE masqué par une hyperproduction de céphalosporinases, ou en utilisant les techniques de biologie moléculaire afin de caractériser les gènes de résistance. Le phénotype le prédominant est des

céphalosporinases de type oxacillinase, caractérisé par la résistance aux inhibiteurs des betalactamase (Acide clavulanique).

Durant cette étude, une souche productrice de métallo-beta-lactamase (*K. pneumoniae*) a été isolée et identifiée pour la première fois à l'hôpital de Khenchela. Cette souche est pratiquement résistante à tous les antibiotiques testés. D'autres études en Algérie ont montré la fréquence des souches de *K. pneumoniae* dans les infections nosocomiales (**Belbel, 2014**)

Plusieurs travaux ont décrit la dissémination de la résistance aux carbapénèmes un peu partout dans le monde. Une étude a rapporté que 49/62 soit 79 % des souches d'entérobactéries isolées à l'hôpital de Wenzhou (Chine) entre 2007 et 2010, étaient résistantes aux carbapénèmes (**Zhou et al., 2013**). Rastegar Lari et al ont rapporté une prévalence de 54% (19/35) de souches de *Klebsiella spp* résistantes à l'imipénème isolées chez 28 patients brûlés hospitalisés en Iran durant 6 mois (**Rastegar Lari et al., 2013**). Dans cette même région, un taux de résistance à l'imipénème de 19.3% a été enregistré chez des souches d'entérobactéries d'origine clinique et communautaire isolées en 2010 (**Hashmi et al., 2013**). Contrairement aux travaux réalisés par (**Nüesch-Inderbilen et al., 2013**) en Suisse qui n'ont identifié aucune souche d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes en communauté.

Actuellement, les carbapénémases chez les entérobactéries se trouvent principalement chez *K. pneumoniae*, et dans une moindre mesure, chez *E. coli* et d'autres entérobactéries, avec une prévalence plus élevée en Europe du Sud et en Asie que dans d'autres régions du monde. Il a été récemment suggéré que la propagation mondiale des entérobactéries productrices de carbapénémases sera dominée en milieu hospitalier par *K. pneumoniae* (**Nordmann et al., 2011**).

Les souches isolées ont montré une résistance plus ou moins élevées aux autres familles d'antibiotiques avec un taux de 36% pour la gentamycine et la tétracycline, et de 40% ont été enregistrés pour Acide nalidixique et Triméthoprime-sulfaméthoxazole. Plusieurs études en Algérie ont rapporté l'association de la résistance aux C3G avec des taux élevés de résistance aux autres familles d'antibiotique (**Belbel, 2014 ; Lagha, 2015 ; Touati et al., 2012**).

En effet les gènes de résistance psalmodiques aux bétalactamines, sont en générale associés avec d'autres gènes de résistance aux autres familles d'antibiotique comme les quinolones et les aminosides. Le transfert de ses gènes aboutis à l'apparition des souches à caractère multi résistant.

Notre résultats ont montré un taux de résistance élevée aux différentes familles d'antibiotique notamment les C3G (76% de souches sont résistantes au Ceftazidime). Avec la

présence des souches résistantes au carbapénèmes. Ce qui va produire un problème de santé publique dans les années prochaines.

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

Le transfert des gènes de résistances pour les BLSE par conjugaison, implique des éléments génétiques mobiles, tels que les plasmides. Ceux-ci, peuvent facilement dupliquer et se propager rapidement parmi différentes espèces bactériennes par transfert horizontal, ce qui représente un grand risque avec des conséquences significatives environnementales (**Pai et al., 2004**).

A la fin, on peut conclure que les souches isolées dans cette étude durant la période 15 mars à 30 avril 2016, sont d'apparition récente dans notre EPH « Ahmed Ben Bella » de KHECHELA et sont à considérer comme un problème émergent du fait de leur association constante aux β -lactamases à spectre étendu et aux céphalosporinases, rendant difficile le traitement de ces patients hospitalisés.

Conclusion et perspective

Dans la présente étude, des souches des *BGN* ont été collectées au niveau de l'EPH Ahmed Ben Bella et de service d'hémodialyse de l'hôpital Ali Boushaba de la wilaya de KHENCHELA, durant 1 mois et 15 jours (15mars-30 avril).

La résistance aux bêta-lactamines des bacilles à Gram négatif, commence à disséminée d'une façon rapide dans nos hôpitaux, en particulier par production de BLSE, en conséquences, les infections à ces bactéries productrices de BLSE entraînent de véritables situations d'impasse thérapeutique et sont directement responsables d'une surmortalité.

Les résultats de notre étude révèlent d'abord une certaine diversité pour les *BGN* identifiées. Les trois espèces prédominantes sont *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *salmonella spp.*

Au total, 50 souches des *BGN* ont été isolées et 25 souches ont été identifiées qui résiste aux céphalosporines de 3^{ème} génération (céftazidime).

Cependant, la plupart des patients identifiés montre que les taux d'isolement les plus élevés sont observés chez le sexe féminin des taux de (74%) et la moitié des souches (66%) sont d'origine urinaire.

De plus, un grand nombre de ces souches identifié ont présenté des phénotypes de résistance aux β -lactamines et aussi aux autres familles l'antibiotique, à savoir les aminosides, les quinolones, la colistine et le Triméthoprime/sulfaméthoxazole.

Différents facteurs en relation avec la thérapie antibiotique ont été fréquemment associés avec l'acquisition d'une souche productrice de BLSE : l'exposition préalable aux C3G (et aussi aux fluoroquinolones et aminosides), le nombre d'antibiotiques administrés et la durée du traitement. Le séjour dans les centres de soins chroniques a été aussi impliqué dans certains pays. Ces centres peuvent jouer un rôle de réservoir de souches multi-résistantes *Klebsiella* et *Salmonella*.

L'analyse phénotypique de résistance aux carbapénèmes a montré que les 04 souches (*K. pneumoniae*, 02 *Salmonella spp* et 01 *Proteus mirabilis*) et une seul souche (*Salmonella spp*) été productrices de carbapénèmases de type métallo- β -lactamase.

La lutte contre la diffusion des bactéries multi-résistantes est un axe majeur de santé publique dans le monde.

Notre étude reflète l'état actuel de la résistance aux antibiotiques dans notre région, et cela est dû en général à deux choses essentielles qui ont beaucoup contribué à cette multi-résistance à savoir :

- L'utilisation abusive des antibiotiques ;
- La mauvaise hygiène dans les services hospitaliers.

Un meilleur contrôle de la consommation d'antibiotiques au sein de l'établissement serait toutefois des facteurs favorisant une meilleure maîtrise des risques.

Les résultats obtenus au cours de notre étude restent préliminaires et méritent d'être exploités et complétés par :

- Étude d'un plus grand nombre de souches ;
- Étude de certains facteurs de risque (tel que l'âge et le sexe du patient) dans l'acquisition de souches résistantes ;
- La caractérisation des gènes de résistance en utilisant la technique de biologie moléculaire ;
- L'étude de la relation épidémiologique entre les différents isolats par RAPD.

A

Aggoune-Khinache N., Bensersa D., Henniche F-Z., Daoudi M., Abdouni M-A., Chabani A., Tiouit D. & Naim M. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* producteurs de métallo- β -lactamases en Algérie. *Médecine et maladies infectieuses*; **39**: 413-414.

Allain P. (2008). Bêta-lactamines, pénicillines et céphalosporines. Les médicaments. 3^{ème} édition.

Ambler R-P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **289**(1036) ; **32** : 1-3 1.

Ambler R-P., Coulson A-F-W., Frère J-M., Ghuysen J-M., Joris B., Forsman M., Levesque R-C., Tiraby A., & Waley S-G. (1991). A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. *Biochem. J.*; **276**: 269-270.

Anderson K., Lonsway D-R., Rasheed J-K., Biddle J., Jensen B. & McDougal L-K., et al. (2007). Evaluation of Methods to Identify the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol*; **45**(8): 2723-2725.

Andre M-H., Lortholary O. & Bryskier A. (1998). Classification des antibiotiques : relation structure-activité. *Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris), AKOS Encyclopédie Pratique de Médecine.* 5-0015. P6

Arlet G., and Philippon A. (2003). Les nouvelles β -lactamases à l'aube du troisième millénaire. *Rev Franç Lab.*; **352**: 41-55.

Arslan H., Azap O-K., Ergönül O., Timurkaynak F. (2005). Risk factors for ciprofloxacin resistance among *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infections in Turkey. *J Antimicrob Chemother*; **56**: 914-918.

Avril J-L. and Domino P-Y. (1999). Les marqueurs épidémiologiques bactériens. In *Les infections nosocomiales* : 110-118.

Avril J-L., Dabernat H., Denis F., & Monteil H. (2000). Bactériologie clinique, Ellipses, Paris. 2^{ème} édition : 171-211.

B

Bagley S-T. (1985). Habitat association of *Klebsiella* species. *Infect. Control* **6**:52-58.

Bandoh K-Y., Muto K., Watanabe N., Katoh & Ueno K. (1991). Biochemical properties and purification of metallo-beta-lactamase from *Bacteroides-ugilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* **35**(2): 1-2.

Baraduc R., Darfeuille-Michaud A., Forestier C., Jallat C., Joly B., & Livrelly D. (2000). *Escherichia coli* et autres *Escherichia*, *Shigella*. *Précis de bactériologie clinique.* Editions ESKA: 1115-1126.

- Barrial K., and Scotet J. (2006).** Classification raisonnée des β -lactamases chez les bacilles Gram négatif. Perspective d'évolution. *Tigaud de bactériologie* : 3-10.
- Bebrone C. (2007).** Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem Pharmacol.* ; **74**: 1686-701.
- Belbel Z. (2014).** Evaluation de la résistance aux antibiotiques des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées dans les hôpitaux de la ville d'Annaba .Thèse de doctorat.
- Bennet R., Eriksson M., Melen B., & Zetterstrom R. (1985).** Changes in the incidence and spectrum of neonatal septicemia during a fifteen-year period. *Acta Paediatr.Scand.* ; **74**:687-690.).
- Bergogne-Bérézin E. and Towner K-J. (1996).** *Acinetobacter spp.* as Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. *J.Clin. Microbiol. Rev* ; **9**(2) : 148-165.
- Bessard G. (2004).** Pharmacologie des antibiotiques. Faculté de médecine de Grenoble. Université Joseph Fourier. DCEM I. Sur le lien: <http://www-sante.ujfgrenoble.fr/SANTE/pharma/site.fac/diaporama/antibio2.ppt>
- Bonnet R. (2004).** Growing group of extended-spectrum-beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* ; **48**: 1–14.
- Bornet C., Davin-Régli A. & C. Bollet. (2000).** *Enterobacter*. In Précis de Bactériologie Clinique, Ed. ESKA : 1175-1180.
- Bosi C., Regli A-D., Bornet C., Mallea M., Pages J-M. & Bollet C. (1999).** Most *Enterobacter aerogenes* strains in France belong to a prevalent clone. *J. Clin. Microbiol*; **37**: 2165-2169
- Bouza E., De La Torre M-G., Erice A., Loza E., Diaz-Borrego J-M., & Buzon L. (1985).** *Enterobacter* bacteremia. An analysis of 50 episodes. *Arch. Intern. Med.* **145**: 1024-1027.
- Bradford P-A. (1999).** Automated thermal cycling is superior to traditional methods for nucleotide sequencing of *bla*SHV genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 2960-2963.
- Bradford P-A. (2001).** Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*; **14**:933-51 *Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis.*; **17**(10):1791-1798.
- Brenner D-J. and Krieg N-R. (2005).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Seconde Edition.
- Brisse S., and Duijkeren E. (2005).** Identification and antimicrobial susceptibility of 100 *Klebsiella* animal clinical isolates. *Vet.Microbiol.*; **105**:307-312.
- Brisse S., and Verhoef J. (2001).** Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *Int J Syst Evol Microbiol.* ; **51**: 915-924.

Bronchard R., Lepeule R., Lucet J-C., El Mniai A., Wolff M., Montravers P., Plésiat P. & Andremont A. (2013). Emergence of Imipenem-Resistant Gram-Negative Bacilli in Intestinal Flora of Intensive Care Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* ; **57**(3) : 1488–1495.

Bryskier A. (1999). Antibiotiques agents antibactériens et antifongiques. Edition Ellipses, Paris.

Bush K. (2001). New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis.*; **32**: 1085-1089.

Bush K., Jacoby J-A. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob. Agents. Chemother.*; **54**: 969-976.

C

Camp C. and Owatha I-T. (2010). A Review of *Acinetobacter baumannii* as a Highly Successful Pathogen in Times of War. *Labmedicine*; **41**(11).

Cantón R., Akóva M., Carmeli Y., Giske C-G., Glupczynski Y., Gniadkowski M., Livermore D.M., Miriagou V., Naas T., Rossolini G-M., Samuelsen O., Seifert H., Woodford N., Nordmann P. & European Network on Carbapenemases. (2012). Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect.*; **18**: 413-431.

Carlier E., Piagnerelli M., Deplano A., Lejeune P., & Govaerts D. (2000). Risks factors of infection and molecular typing in ICU colonized patients with *Enterobacter aerogenes*. 20^o International Symposium on Intensive Care and Emergency Médecine, Congres Center, Brussels.

Carpenter J-L. (1990). *Klebsiella* pulmonary infections: occurrence at one medical center and review. *Rev.Infect.Dis.* **12**:672-682.).

Cattoir V. (2004). Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathologie Biologie* ; **52** (10): 607-616.

Cavallo J-D., De Mouy D., Fabre R., Garrabe E., Armengaud M. (1998). *Pseudomonas aeruginosa* en pratique de ville : étude AFORCOPIBIO 1995-1996. *Méd mal infect*; **28**: 258-259.

Cavallo J-D., Fabre R., Jehl F., Rapp C., Garrabé E. (2004). Bêtalactamines. *EMC-Maladies infectieuses* ; (1) : 129-202.

Cavallo J-D., Plesiat P., Couetdic G., Leblanc F. & Fabre R. (2002). Mechanisms of b-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: prevalence of OprM-overproducing strains in a french multicentre study (1997). *J Antimicrob Chemother*; **50**:1039-1044

Chbani F., Zoughaghi L., Taouragt K., Aarab H. et Benaouda A. (2004). *Acinetobacter baumannii* : épidémiologie et résistance aux antibiotiques. *Prat.* ; **14**(2):23-4.

Chong Y., Ito Y., Kamimura T. (2011). Genetic evolution and clinical impact in extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection, Genetics and Evolution*; **11**: 1499-1504.

Comité de l'antibiogramme - Société française de microbiologie . (2015). <http://www.sfm-microbiologie.org>

Coque T., Baquerot F., & Canton R. (2008). Increasing prevalence of ESBL – producing Enterobacteriaceae in Europe. *Eurosurveillance.* ; **13**(47): 1–11.

Cuzon G., Naas T. & Nordmann P. (2009). Carbapénèmases de type KPC: quel enjeu en microbiologie clinique ? *Pathologie Biologie*.

D

Datta N., and Kontomichalou, P. (1965). Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature* ; **208**: 239-241.

Dbaiho G-S. (2000). Old and new targets of antibacterial therapy. *Leb Med J.* ;**48**: 177-181.

Decousser J-W., Poirel L., & Nordmann P. (2001). "Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum classe A beta-lactamase from *Kluyvera cryocrescens*". *Antimicrob. Agents Chemother.* ; **45**(12): 3595-3598.

Denis F., Ploy M-C, Martine C., Bingen E. & Quentin R. (2007). Bactériologie médicale: techniques usuelles. Paris, Elsevier Masson SAS : 640.

Dijkshoorn L., Nemec A. & Seifert H. (2007). An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature reviews* ;**(5)**.

Drancourt M., Bollet C., Carta A., & Rousselier P. (2001). Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* ; **51**:925-932.

E

El Salabi A., Walsh T-R. & Chouchani C. (2013). Extended spectrum β -lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol.*; **39**: 113-122.

Elhani D. (2012). Les bêta-lactamases à spectre étendu : le défi s'accroît. *Ann Biol Clin.* ; **70**(2) : 117-40.

Euzéby J-P. (2005). Dictionnaire de bactériologie vétérinaire : 200.

F

- Farmer J-J., Boatwright K-D., & Janda J-M. (2007).** *Enterobacteriaceae*: Introduction and identification. Manual of Clinical microbiology. Washington, DC, USA: ASM press. 9th ed: 649-669.
- Faure S. (2009).** Transfert d'un gène de résistance aux β -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 : 190.
- Fisher J-F., Meroueh S-O. & Mobashery S. (2005).** Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chem Rev.* **105**: 395-424.
- Fortineau, N., Poirel, L. & Nordmann, P. (2001).** plasmidique et inductible céphalosporinase DHA-2 de *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* ; **47**: 207-210.
- Freney J, Renaud F., Leclercq R., & Riegel P. (2007).** Précis de Bactériologie Clinique.1001-1014.649-665.
- Freney J., Hansen W. & Bollet T-C. (2000).** Précis de bactériologie clinique.

G

- Gaillot O., Clément C., Simonet M. & Philippon A. (1997).** Novel transférables β -lactame avec des caractéristiques de résistance céphalosporinase à *Salmonella enteritidis*. *J Antimicrob Chemother.* **39**: 85-87.
- Galani I., Rekatsina P-D., Hatzaki D., Plachouras D., Souli M. & Giamarellou H. (2008).** Evaluation of different laboratory tests for the detection of Metallo- β -lactamase production in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; **61**: 548-553.
- Garcia D. I-T., Romero-Vivas J., Martinez-Beltran A., Guerrero M., Meseguer, & Bouza E. (1985).** *Klebsiella* bacteremia: an analysis of 100 episodes. *Rev.Infect.Dis.* ; **7**:143-150.
- Ghebru H. (1988)** Contribution à l'étude du pouvoir pathogène des *Escherichia coli*. Mémoire de maîtrise sciences vétérinaires en microbiologie immunologie, Nantes.
- Ghuysen J-M. (1990).** Membrane topology, structure, and functions of the penicillin-interactive proteins. *Biotechnol Appl Biochem*; **12**: 468-72.
- Ghuysen J-M. (1991).** Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu Rev Microbiol.* ; **45**: 37-67.
- Giamarellou H., Antoniadou A., & Kanellakopoulou K. (2008).** *Acinetobacter baumannii* : a universel threat to public health *International journal antimicrobial agent*; **32**: 106-119.
- Gillespie S-H. et Hawkey P-M. (2006).** Principles and Practice of Clinical Bacteriology. Edition wiley. 2^{ème} Edition. London; 604.

- GOOTZ T-D. (1990).** Discovery and development of new antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*; **3** (1): 13-31.
- Gordon N-C. et Wareham D-W. (2010).** Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *International journal of antimicrobial agents* ; **35** : 219-226.
- Grail N., Andremont A. & Armand-Lefèvre L. (2011).** Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse *Journal des antinfectieux* :16.
- Greatorex J-S., and Thorne G-M. (1994).** Humoral immune responses to Shiga-like toxins and *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide in hemolytic-uremic syndrome patients and healthy subjects. *J Clin Microbiol* . ; **32**:1172-1178.
- Grimont P. (1987).** Taxonomie des *Escherichia*. *Méd Mal Infect Numéro spécial*.
- Groupe d'étude de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux bêta-lactamines (GERPB) (2000)** Évolution de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* en France de 1994 à 1998. *Lettre Infect*; **15**:18-23
- Guillaume P-Y. (2004)** . Les milieux de culture en microbiologie.
- Guzek A., Tomaszewski D., Rybicki Z., Truszczyński A., Barański M. & Korzeniewski K. (2013).** Comparison of in vitro efficacy of ertapenem, imipenem and meropenem by the *Enterobacteriaceae* strains family. *Anaesthesiology Intensive Therapy* ;**45**(2), 67–72.

H

- Haeggman S., Löfdahl S., Paauw A., Verhoef J., & Brisse S. (2004).** Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother* ; **48**: 2400-2408.
- Hall L-M., Livermore D-M., Gur D., Akova M., & Akalin H-E. (1993).** OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* ; **37**(8): 1637-1644.
- Hamidechi M-A et Meziani M. (nov 2011).** contribution du diagnostic biochimique bactérien dans l'établissement des parentés phylogénétiques : cas des *Enterobacteriaceae* et *Pseudomonas sp.* ;**34** : 24-31
- Hammond D-S., Schooneveldt J-M., Nimmo G-R., Huygens F., & Giffard P-M. (2005).** *bla*SHV genes in *Klebsiella pneumoniae*: different allele distributions are associated with different promoters within individual isolates. *Antimicrob. Agents Chemother* ;**49**: 256-263.
- Hanson N-D. (2003).** AmpC beta-lactamases: what do we need to know for the future? *J. Antimicrob Chemother*; **52**: 2-4.

Hardman J-G. and Limbird L-E. (1998). Les bases pharmacologiques de l'utilisation des médicaments, 9th edition. Nieuwegein, Pays-Bas, Mc Graw-Hill : 1069-1098.

Hashemi S-H., Esna-Ashari F., Tavakoli S. et Mamani M. (2013). The Prevalence of Antibiotic Resistance of *Enterobacteriaceae* Strains Isolated in Community- and Hospital-Acquired Infections in Teaching Hospitals of Hamadan, West of Iran. *Journal of Research in Health Sciences.* ;**13**(1):75-80.

Haverkorn M-L. and Michel M-F. (1979). Nosocomial *Klebsiellas*. I. Colonization of hospitalized patients. *J.Hyg.(Lond)* ; **82**:177-193.

Hibbert-Rogers L., Heritage J., Gascoyne-Binzi D., Hawkey P., Todd N., Lewis I., & Bailey C. (1995). Molecular epidemiology of ceftazidime resistant *Enterobacteriaceae* from patients on a paediatric oncology ward. *J. Antimicrob. Chemother.*:**36**(1): 65-82.

Hoquet D., Liane I., Patry F., Garch E. & Plesiat P. (2004). Two efflux systems expressed simultaneously in clinical *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathology Biology* ; **52**: 455-461.

Howard A., O'Donoghue M., Feeney A. & Sleator R-D. (2012). *Acinetobacter baumannii* an emerging opportunistic pathogen. *Virulence*; **3**, issue 3.

Humeniuk C., Arlet G., Gautier V., Grimont P., Labia R., & Philippon A. (2002). β - lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 3045-9.

J

Jacoby G-A., and Munoz-Price L-S. (2005). The new β -lactamases. *N Engl J Med.* ; **352**: 380-391

Jaggi N., Sissodia P. & Sharma L. (2012). *Acinetobacter baumannii* isolates in a tertiary care hospital: Antimicrobial resistance and clinical significance. *Journal of Microbiology and Infectious Diseases*; **2**(2), 57-63.

Jans B., Glupezynski Y., Suetens C. & Van Cleemput Els. (2004). Enquête épidémiologique relative à *Acinetobacter baumannii* producteur de BLSE (type VEB-1) en Belgique.

Jarlier V., Nordmann P. (2000) Entérobactériose β -lactamines. In: Freney J., Renaud F., Hansen W., Bollet C., eds .Précis de bactériologie clinique. Paris: Éditions ESKA-Alexandre Lacassagne : 649-665

Jaureguy F. (2009). Host and bacterial determinants of *Escherichia coli* extra intestinal infections. *Med Sci, Paris.* ; **25**(3): 221-223.

Jaurin B., and Grundstrom T. (1981). ampC cephalosporinase of *Escherichia coli* K12 has a different evolutionary origin from that of β -lactamases of the penicillinase type. *Proc Natl Acad Sci. USA.* ; **78**(8): 4897-4901.

Jean M. (2004). Evaluation et gestion des risques liés à *Pseudomonas aeruginosa* dans les établissements de thermalisme. Atelier Santé Environnement. ENSP : 5-6.

Jeong S-H., Bael I-K., Parkl K-O., Sohn S-G., Jang S-J., Sung K-H., Yang K-S., Lee K.; Young D., Lee S-H. (2006). Outbreaks of Imopenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing Carnapenemases in Korea. The Journal of Microbiology; **44**(4): 423-431.

Joly-Guillou M-L. (2006). *Acinetobacter In.* Ed ESKA. Courvalin P., Leclercq R. & Bingen E. AntibioGramme. Paris: 395-398.

K

Kaiser Gary E. (1998). *Eschérichia coli Entérobactériaceae: les bacilles fermentatifs, gram-négatifs, entériques* Microbiologie De Doc. Kaiser Copyright Septembre 23, 1998 http://216.239.37.104/translate_c?hl=fr&u=http://www.cat.cc.md.us/courses/bio141/labmanua/lab2/sedimentturbidity.html&prev=/search%3Fq%3DE.coli%2Bin%2Bthe%2Bnormal%2Bfecal%2Bflora%2Bof%2Banimals%26hl%3Dfr%26lr%3D

Kempf M., Rolain J., Diatta G., Azza S., Samb B., Mediannikov O. et al., (2012). Carbapenem resistance and *Acinetobacter baumannii* in Senegal: The paradigm of a common phenomenon in natural reservoirs. PLoS ONE ; Volume 7, Issue 6.

Knothe H., Shah P., Krcmery V., Antal M., & Mitsuhashi S. (1983). Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *J Infect.* ; **11**:315-317.

Knox J-R. (1995). Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrob Agents Chemother.* **39**(12):2593-60 1.

Kumar A. and Schweizer H-P. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake . *Adv Drug Deliv Reviews.* **57**:1486-1513.

Kumar A., Chakraborti S., Joshi P., Chakrabarti P., & Chakraborty R. (2011). A multiple antibiotic and serum resistant oligotrophic strain, *Klebsiella pneumoniae* MB45 having novel dfrA30, is sensitive to ZnO QDs. *Ann.Clin.Microbiol.Antimicrob.*; **10**:19.

L

Lagha N. (2015). Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) isolées de l'hôpital de Laghouat : Thèse de Doctorat

Lahlou A-I., Salord H., Gille Y., Roure C., Tigand S., Bajou T., Rtabi N. & Kassem H-L. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* et résistance isolée à l'imipénème : Clone émergent en milieu hospitalier. Article originale. *Les technologies de laboratoire* ; **11** :5-9.

Laurent C., Rodriguez-Villalobos H., Rost F., Strale H., Vincent J-L., Deplano A., Struelens M-J., Byl B. (2008). Intensive care unit outbreak of extended-spectrum betalactamase-producing

Klebsiella pneumoniae controlled by cohorting patients and reinforcing infection control measures. *Infect Control Hosp Epidemiol.*; **29**: 517-524.

Lavigne J-P. (2007). Effet des antibioques et mécanismes de résistance. Cours de bactériologie. Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes

Lavigne J-P., Sotto A., Merle C., Jourdan J., Soussy C-J. & Sirot D. (2002). Résistance enzymatique d'*Escherichia coli* aux bêtalactamines et prévalence en clinique. *Pathol Biol*; **50**: 388-393

Le Minor L. and Véron M. (1989). Bactériologie médicale, 2^{ème} édition, Flammarion Médecine-Sciences, Paris. **2**:428-432.

Le Minor L., Popoff M-Y., & Bockemuhl J. (1990). Supplement 1989 (n. 33) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol* **141**:1173-1177.

Li X-Z., Barré N. & Poole K. (2000). Influence of the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-OprJ and MexE-MexF-OprN multidrug efflux system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics microbiology chemotherapy Journal*. **46**: 885-893

Limbert 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.

Livermore D-M. (1995). Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Ch Microbiol Rev.* **8**(4):557-84.

Livermore D-M., Canton R., Gniadkowski M., Nordmann P., Rossolini G-M., Arlet G., Poirel L & Woodford N. (2007). CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* **59**(2): 165-174.

M

Maiti S-N., Babu R. & Shan R. (2006). Overcoming Bacterial Resistance: Role of β - Lactamase Inhibitors. *Top Heterocycl Chemistry.* **2**: 207-246.

Marmonier A. (2000). Le diagnostic phénotypique. In Précis de bactériologie Clinique ESKA Ed. 79-99.

Martin C. (2007). Bacilles à Gram négatif non fermentaires. In : **Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E. & Quentin R.** Bactériologie médicale: Techniques usuelles. Ed Elsevier Masson . Paris : 330-343.

Massova I., and Mobashery S. (1998). Kinship and diversification of bacterial penicillin binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* ; **42**: 1-17.

Matagne A., Dubus A., Galleni M., & Frere J-M. (1999). The beta-lactamase cycle: a tale of selective pressure and bacterial ingenuity. *Nat Prod Rep.*; **16**: 1-19.

Mayer K., Opal S., & Medeiros A. (2000). Mechanisms of antibiotic resistance. In: Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th edition, Churchill Livingstone. ; 2: 236-253.

Medeiros A-A. (1984). β -lactamases. *Bnt. Med. Buli.* **40**: 18-27.

Metadjer N. (2014). Etude de la résistance aux antibiotiques des bactéries à Gram négatifs isolées dans le service de chirurgie A du CHU de Tlemcen. Mémoire de magister.

Mezhoud H. (2014). Caractérisation phénotypique des mécanismes de résistance aux antibiotiques chez des bacilles à gram négatif isolés en médecine de ville. Mémoire de magister.

Monnet D., and C. Richard. (1995). Autres *Enterobacteriaceae*, In Freney J., Renaud F., Hansen W., and Bollet C. (ed.), Manuel de Bactériologie Clinique, 2 ed. Elsevier, Paris : 1053-1128.

N

Naas T., Coignard B., Carbonne A., Blanckaert K., Bajolet O., Bernet C., Verdeil X., Astagneau P., Desenclos J-C., & Nordmann P. (2006). VEB-1 Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*, France. *Emerg Infect Dis* ;**12**: 1214-22.

Naas T., Poirel L. & Nordmann P. (2008). Minor extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect*; **14**:42-52.

Naiemi N-A., Duim B., Savelkoul P-H., Spanjaard L., De Jonge E., Bart A., Vandembroucke-Grauls C-M., & de Jong M-D. (2005). Widespread transfer of resistance genes between bacterial species in an intensive care unit: implications for hospital epidemiology. *J Clin Microbiol*; **43**(9): 4862-4864.

Nakano R., Okamoto R., Nakano Y., Kaneko K., Okitsu N., Hosaka Y., & Inoue M. (2004). CFE-1, a novel plasmid-encoded AmpC beta-lactamase with an ampR gene originating from *Citrobacter freundii*. *Antimicrob. Agents Chemother*; **48**: 1151-1158.

Nanninga N. (1991). Cell division and peptidoglycan assembly in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **5**: 791-795.

Nauciel C. (2000). Bctériologie médicale. Ed Masson : 55-64.

Nih-niaid. (2012). Antimicrobial (Drug) Resistance. Retrieved 20-03-2016, from <http://www.niaid.nih.gov/topics/antimicrobialresistance/examples/gramnegative/Pags default.aspx>.

Nordmann P. (2003). Mechanism of resistance to betalactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*; **22**: 527–530.

Nordmann P. et Carrer A. (2010). Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Archive de Pédiatrie*; **17** : 154-162.

Nordmann P., Poirel L., Walsh T-R., & Livermore D-M. (2011). The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol.*; **19**:588-595.

Nüesch-Inderbilen M., Zurfluh K., Hächler H. & Stephan R. (2013). No evidence so far for the dissemination of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in the community in Switzerland. *Antimicrobial Resistance and Infection Control.* ; **2**(23), 1-3.

O

Olson A-B., Silverman M., Boyd D-A., McGeer A., Willey B-M., Pong-Porter V., Daneman N., & Mulvey M-R. (2005). Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum beta-lactamases from *Kluyvera Georgiana* isolated in Guyana. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**(5): 2112-2115.

P

Pai H., Kang C-I., Byeon J-H., Lee K-D., Park W-B., Kim H-B., Kim E-C., Oh M-D. & Choe K-W. (2004). Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC-type-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents Chemother.* **48**: 3720-3728.

Paterson D-L. and Bonomo R-A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* ; **18**: 657-686.

Peleg A-Y., Seifert H. & Paterson D-L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*; **21**:538-82.

Pena C., Pujol M., Pallares R., Cisnal M., Ariza J., & Gudiol F. (1993). Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter* spp. epidemiology and prognostic factors. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* ; **11**: 424-428.

Perronne C. (1999). *Maladies infectieuses* ; **1** : 65.

Petitjean O., Rosset M-A. (1988). Aztréonam. In: *Pharmacologie clinique*. Paris: Expansion Scientifique Française; 1393-1397

Philippon A. and Bernier M. (2000). Antibiotiques et bacilles à Gram négatif non fermentaires autres que *Pseudomonas aeruginosa*. In: Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C, editors. *Précis de bactériologie clinique*. Paris: Éditions ESKA-Alexandre Lacassagne : 688-705

Philippon A. et Arlet G. (2006). β -lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel. *Ann Biol Clin.* **64** (1) : 37-51.

Philippon A., Arlet G., & Jacoby G-A. (2002). Plasmid-determined AmpC-type β - lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*; **46**: 1-11.

Piednoir E., Thibon P., Borderan G-C., Godde F., Borgey F., Le Coutour X., Parienti J-J. (2011). Long-term clinical and economic benefits associated with the management of a nosocomial

outbreak resulting from extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Crit Care Med*; **39**: 2672-2677.

Ploy M-C., Gassama A., Chainier D., Denis F. (2005). Les intégrons en tant que support génétique de la résistance aux antibiotiques. *Immuno-analyse & biologie spécialisée* ; **20** : 343-352.

Podschun R. and Ullmann U. (1998) . *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin.Microbiol.Rev.* **11**:589-603

Poirel L. (2006). Nouveaux mécanismes de résistance chez *Pseudomonas aeruginosa* : quelles perspectives. XVIIe Congrès nationale de la SFHH-Nantes. P 25.

Poirel L. and Nordmann P. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms of Resistance, Multiple β -lactamases. *Acinetobacter Biology and Pathogenesis. Springer Science et Business Media.* :129-143.

Poirel L., Kampfer P. & Nordmann P. (2002). Chromosome-encoded Ambler A betalactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of CTX-M extended-spectrum betalactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* ; **46**: 4038-4040.

Poirel L., Lebessi E., Castro M., Fèvre C., Foustoukou M., & Nordmann P. (2004). Nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Athens, Greece. *Antimicrob. Agents Chemother.* ; **48**: 2277-2279.

Poole K. (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob Chemother.*; **56**: 20-51.

Potvin É. (2007). Présentation de *Pseudomonas aeruginosa*. Collection mémoires et thèses électroniques. Université Laval.

Prescott L., Harley J & Klein DA. (2003). Microbiologie. 2^{ème} édition De Boeck :1164 .

R

Ramoul A., Hammami S., Dekhil M. & Aimiri S. et al., (2013). Phenotypic and genotypic characterization of clinical multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* from Algerian intensive care units. *African Journal of Microbiology Research* ; **7**(10): 868-874.

Rastegar Lari A., Azimi L., Rahbar M., Fallah F. et Alaghebandan R. (2013). Phenotypic detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase among burns patients: First report from Iran. *Burns* ; **39** : 174 – 176.

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

Rodriguez-Villalobos H., and Struelens M-J. (2006). Résistance bactérienne par β -lactamases à spectre étendu: implications pour le réanimateur. *Rev Réanimation* ; **15** (3): 205–213.

Rossignol G. (2007). Contribution à l'étude de facteurs de virulence d'une souche hospitalière de *Pseudomonas fluorescens* : Activité hémolytique et variation phénotypique. Thèse de doctorat.: 7.

Rubin M-A., and Samore M-H. (2002). Antimicrobial Use and Resistance. *Curr Infect Dis Rep* ; 4: 491-497.

S

Salton M-J-R., Kim K-S. (1996). Structure. *Baron's Med.Microbiol.(Baron S et al, eds.)*, 4th ed., Univ of Texas Medical Branch. ISBN : 63-72.

Sanders W-E. and Sanders C-C. (1997). *Enterobacter* spp. : pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Cliv. Microbiol. Rev.*; 10 : 220-241.

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

Sirot J, Nicolas-Chanoine M-H, Chardon H, Avril J-L, Cattoen C, Croix J-C et al. (2002). Susceptibility of Enterobacteriaceae to b-lactam agents and fluoroquinolone: a 3-year survey in France. *Clin Microbiol Infect*; 8: 207-213

Skopkova-Zarnayova M., Siebor E., Rovna D., Bujdakova H. et Neuwirth C. (2005). Outer membrane protein profiles of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates that differ in cefoxitin resistance. *FEMS Microbiol Lett.* ; 243:197-203.

Songa J., Thamlikitkulb V., Hsuehc P. (2011). Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia amongst adults in the Asia-Pacific region. *Int J Antimicrob Agents*; 38: 108-117.

Stratton C-W. (2000). Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Leb Med J.* ;48:186-198.

Sylvie-Carle. (2009). La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important. *Pharmactuel.* 42 : 6-21.

T

Thomson K-S., and Moland E-S. (2000). the new β -lactamases of Gram negative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbes Infect.* ; 2: 1225–1235.

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

V

Vedel G. (2005). Simple method to determine β -lactam resistance phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* using the disc agar diffusion test. *Journal of antimicrobial chemotherapy* ; **56**(4): 657-664.

Verdet C. (2012). Organisation génétique des céphalosporinases acquises [en ligne] Université Paris VI Pierre et Marie Curie <http://www.microbe-edu.org/mecanisme/conference/verdet2.pdf> (consulté le 25 mars 2016)

Verhaegen. (2004). Bactéroïde ; the good , the bad , and the nitty-gritty. *clinical Microbiology Review*.

Vora S., and Auckenthaler R. (2009). Que signifie «bêtalactamases à spectre élargi» en pratique?. *Rev Med Suisse.* ; **5**: 1991-1994.

W

Weldhagen, G.F., Poirel, L. & Nordmann, P. (2003). Ambler class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob. Agents Chemother.* ; **47**: 2385-2392.

Wilke M-S., Lovering A-L., and Strynadka N-C. (2005). Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol.* ; **8**: 525-533.

Wolff M., Joly-Guillou M-L. & Pajot O. (2009). Les carbapénèmes. *Réanimation*; **18**: S199-S208.

Woodford N., Turton J-F. & Livermore D-M. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* ;**35**: 736-755.

Z

Zbak Baba Ahmed-Kazi T., Arlet G. (2014). Pathologie Biologie, Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie, ; **62** (3):P 169-178.

Zhou T., Zhang X., Guo M., Ye J., Lu Y., Bao Q. et Chi W. (2013). Phenotypic and Molecular Characteristics of Carbapenem-Non-Susceptible Enterobacteriaceae from a Teaching Hospital in Wenzhou, Southern China. *Japanese Journal of Infectious Diseases.* ;**66** : 96-102.

Zogheib E., and Dupont H. (2005). Entérobactéries multirésistantes. *Elsevier SAS. Conférences d'actualisation* : 153-165.

Liste des abréviations.....	VI
Liste des annexes.....	IX
Liste des figures.....	X
Liste des tableaux.....	XII

SOMMAIRE

Introduction	1
Étude bibliographique	
I. Généralités sur les β-lactamines	
1. Définition.....	3
2. Structure.....	3
3. Classification des β -lactamines	4
3.1. Les pénames (pénicillines).....	4
3.2. Les céphèmes (céphalosporines)	5
3.3. Les pénèmes (carbapénèmes)	6
3.4. Les monobactames	6
3.5. Les inhibiteurs de β -lactamases.....	6
4. Mode d'action des β -lactamines	7
II. Les bactéries à Gram négatif	
1. Les entérobactéries	8
1.1. <i>Escherichia coli</i>	9
1.1.1. Historique et Taxonomie.....	9
1.1.2. Définition et caractéristiques.....	9
1.1.3. Habitat.....	9
1.1.4. Pouvoir pathogène.....	10
1.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
1.2.1. Taxonomie.....	10
1.2.2. Biotope.....	10
1.2.3. Caractères bactériologiques.....	10
1.2.3.1. Caractères morphologiques.....	11
1.2.3.2. Caractères cultureux.....	11
1.2.3.3. Caractères biochimiques.....	11
1.2.3.4. Caractères antigéniques.....	12
1.2.4. Pouvoir pathogène.....	12
1.3. <i>Enterobacter aerogenes</i>	13
1.3.1. Classification.....	13

1.3.2. Habitat.....	13
1.3.3.Caractères Bactériologiques.....	14
1.3.3.1. Caractères morphologiques.....	14
1.3.3.2. Caractères cultureux.....	14
1.3.4. Caractères biochimiques.....	14
1.3.5. Caractères antigéniques.....	15
2. Les bactéries à Gram negative non fermentaire.....	15
2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
2.1.1. Définition.....	15
2.1.2. Morphologie.....	16
2.1.3. Métabolisme et culture.....	16
2.1.4. Caractères biochimiques d'identification.....	16
2.1.5. Pathologie.....	17
2.2. <i>Acinetobacter baumannii</i>	17
2.2.1. Classification et nomenclature.....	17
2.2.2. Morphologie	17
2.2.3. Habitat.....	18
2.2.4. Caractères biochimiques d'identification.....	18
2.2.5. Epidémiologie et pouvoir pathogène.....	18
III. Mécanismes de la résistance bactérienne aux β-lactamines	
1. Mécanismes de la résistance bactérienne naturel aux β -lactamines.....	20
1.1.Résistance des Enterobacteries aux β -lactamines.....	20
1.2. Résistance des <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
1.3 .Résistance des <i>Acinetobacter baumannii</i>	22
2. Résistance acquise.....	22
2.1. Mécanismes non enzymatiques.....	22
2. 1.1. Modification des protéines liant la pénicilline.....	22
2. 1.2. Imperméabilité de la membrane externe.....	23
2.1. 3. Système d'efflux.....	24
2.2. Mécanismes enzymatiques.....	24
2.2.1. Generalité sur β -lactamase	24
2.2.2. Production de β -lactamases.....	25
2.2.3. Mode d'action.....	25
2.2.4. Classification des β -lactamase.....	26
2.2.4.1. Classification de Bush.....	26

2.2.4.2. Classification d'Ambler.....	26
2.2.5. Les céphalosporinases plasmidiques.....	28
3. β -lactamases à spectre étendu (BLSE)	29
3.1. Définition.....	29
3.2. Différents types de BLSE	29
3.2.1. BLSE de type TEM (Temoneira - nom du patient).....	29
3.2.2. BLSE de type SHV (Sulphydryl variable).....	30
3.2.3. BLSE de type CTX-M (Cefotaximase-Munich).....	31
3.2.4. Autres types de BLSE.....	32
4. Répartition des mécanismes de résistance acquis aux b-lactamines chez les principales espèces d'intérêt médical.....	33
4.1. <i>Les entérobactéries</i>	33
4.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
4.3. <i>Acinetobacter baumannii</i>	35

Etude expérimentale

I. Matériel et méthodes

1. Lieu et durée de l'étude.....	36
2. Méthodes.....	36
2.1. Prélèvements.....	36
2.2. L'enrichissement.....	36
2.3. Isolement et purification.....	36
2.4. L'identification des bactéries	36
2.4.1. Biodiversité morphologique des isolats.....	37
2.4.1.1. Examen macroscopique.....	37
2.4.1.2. Examen microscopique.....	37
2.4.2. Identification biochimique	38
2.4.2.1. Test d'oxydase	38
2.4.2.2. Teste catalase	38
2.4.3. Galerie biochimique classique	39
2.4.3.1. Test du citrate de Simmons	39
2.4.3.2. Test mannitol mobilité	39
2.4.3.3. Teste des produits de fermentation du glucose	39
2.4.3.4. Teste des décarboxylases : LDC, ODC, ADH.....	39
2.4.3.5. Test des trois sucres à identifier : (Milieu TSI).....	40
2.4.3.6. Teste de la production d'indole	40

2.4.3.7. Teste de l'uréase et du tryptophane désaminase	40
2.4.4. Recherche des pigments spécifiques de <i>Pseudomonas</i>	40
2.4.5. Identification biochimique par la galerie API20E (Entérobactéries)	41
2.4.5.1. Principe et description de la galerie	41
2.4.5.2. Technique	41
2.4.5.3. Lecture de la galerie.....	42
2.4.5.4. Interprétation	42
2.5. Etude de la sensibilité aux antibiotiques	43
2.6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	46
2.7. Étude des phénotypes de résistance aux β -lactamines.....	47
2.7.1. Test de synergie.....	47
2.7.2. Recherche des métallo- β -lactamases	48
2.7.2.1. Test de Hodge	48
2.7.2.2. Test de l'EDTA.....	49
2.7.2.3. Technique de DDST (Double-disc synergy tests).....	49
2.7.2.4. Recherche de synergie.....	50
3. Conservation des souches.....	50
4. Étude du transfert des gènes par conjugaison	50

II. Résultats et discussion

1. Souches bactériennes.....	52
1.1. Répartition des souches selon le sexe des patients.....	52
1.2. Répartition des souches selon la nature du prélèvement	53
2. Identification des souches.....	53
2.1. Examen macroscopique.....	53
2.2. Examen microscopique.....	55
3.4. Identification des <i>Pseudomonas</i>	56
2.3. Résultats de l'identification par la galerie Api20E.....	57
3. Etude de sensibilité aux antibiotiques.....	58
3.1. Étude de la sensibilité aux β -lactamines	58
4. Analyse des souches résistantes aux carbapénèmes	60
4.1. Caractéristiques des souches résistantes aux carbapénèmes.....	60
4.2. Résistance des souches aux β -lactamines	60
4.3. Étude de la sensibilité aux autres familles d'antibiotiques	63
4.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	65
5. Caractérisation des phénotypes de résistance aux β -lactamines	67

5.1. Recherche de la production de carbapénèmases (Résultats du Hodge-test)	67
5.2. Production des métallob- β -lactamases	67
5.3. Recherche des β -lactamases à spectre étendu (BLSE)	68
6. Transfert des gènes de résistance par conjugaison	68
Discussion général	69
Conclusion et perspective.....	73
Références bibliographique.....	75
Annexes.....	89
Résumé	
Abstract	
ملخص	

Annexe N°01 : Classification des β -lactamases (Bush et Jacoby, 2010).

Bush-Jacoby group (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros group (1995)	Classe moléculaire	Substrats prefers	Inhibition		Enzyme représentative
				Clavulanate ou tazobactam	EDTA	
1	1	C	Céphalosporines	-	-	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1 ^e	ND	C	Céphalosporines	-	-	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Pénicillines	+	-	PC1
2b	2b	A	Pénicillines, premières céphalosporines	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Céphalosporines à large spectre, monobactames	+	-	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Pénicillines	-	-	TEM-30, SHV-10
2ber	ND	A	céphalosporines à large spectre, monobactames	-	-	TEM-50
2c	2c	A	Carbénicilline	+	-	PSE-1, CARB-3
2ce	ND	A	Carbénicilline, céfépime	+	-	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacilline	+/-	-	OXA-1, OXA-10
2de	ND	D	Céphalosporines à large spectre	+/-	-	OXA-11, OXA-15
2df	ND	D	Carbapénèmes	+/-	-	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Céphalosporines à large spectre	+	-	CepA
2f	2f	A	Carbapénèmes	+/-	-	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1) B (B3)	Carbapénèmes	-	+	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1 L1, CAU-1, GOB-
3b	3	B (B2)	Carbapénèmes	-	+	CphA, Sfh-1
ND	4	Inconnu				

ND : Non déterminé. - : non Inhibé. + : inhibé. +/- : Variable.

Annexe N°02: Tableaux des concentrations critiques pour l'interprétation des CMI et des diamètres critiques des zones d'inhibition pour les *Entérobactéries* (CA-SFM, 2015)

Familles	Antibiotiques	Abréviation	Charges (µg)	Concentrations critiques(mg/L)		Diamètres critiques(mm)	
				S≤	R>	S≤	R>
β-lactamines	Céftazidime	CAZ	30	1	4	22	19
	Céfotaxime	CTX	30	1	2	20	17
	Imipénème	IMP	10	2	8	22	16
	Amoxicilline/ Acide clavulanique	AMC /AUG	20-10 /30	32	32	16	16
	Ampicilline	AMP	10	8	8	14	14
	Aztréonam	ATM	30	1	4	24	21
	Ertapénème	ETP	10	0.5	1	25	22
	Céfoxitine	FOX	30	8	16	19	15
	Céfalotine	KF	30			22	18
	Cefazoline	CZ	30	-	-	-	-
Aminosides	Amikacine	AK	30	8	16	16	13
	Gentamicine	CN	10	2	4	17	14
Fluoroquinolones	Acide nalidixique	NA	30	16	16	19	14
	Ciprofloxacine	CIP	5	0.5	1	22	19
Autres antibiotiques	Chloromphénicol	C	30	8	8	17	17
	Nitofurane	F	300	64	64	15	15
	Cotrimoxazole (Triméthoprime-sulfaméthoxazole)	SXT	1.25/23.75	2	4	16	13
	Fosfomycine	FF	200	64	128	16	13
	Colistine	CT	10	2	2	CMI	CMI

Annexe N°03 : Tableaux des concentrations critiques pour l'interprétation des CMI et des diamètres critiques des zones d'inhibition pour les *Pseudomonas* (CA-SFM, 2015)

Familles	Antibiotiques	Abréviations	Charges (µg)	Concentrations critiques(mg/l)		Diamètres critiques(mm)	
				S≤	R>	S≤	R>
β-lactamines	Pipracilline	PRL	100	16	16	18	18
	Ticarcilline + Acide clavulanique	TIM	85	16	16	18	18
	Imipénème	IMP	10	4	8	20	17
	Céftazidime	CAZ	30	8	8	16	16
	Aztréonam	ATM	30	1	16	50	16
	Ticarcillin	TC	75	16	16	18	18
Aminosides	Gentamicine	CN	10	4	4	15	15
	Amikacine	AK	30	8	16	18	15
	Netilmicine	NET	30	4	4	12	12
	Tobramycine	TOB	10	4	4	16	16
Fluoroquinolones	Levofloxacin	LEV	5	1	2	20	17
	Ciprofloxacine	CIP	5	0.5	1	25	22
Autres antibiotiques	Colistine	CT	10	4	4	CMI	CMI

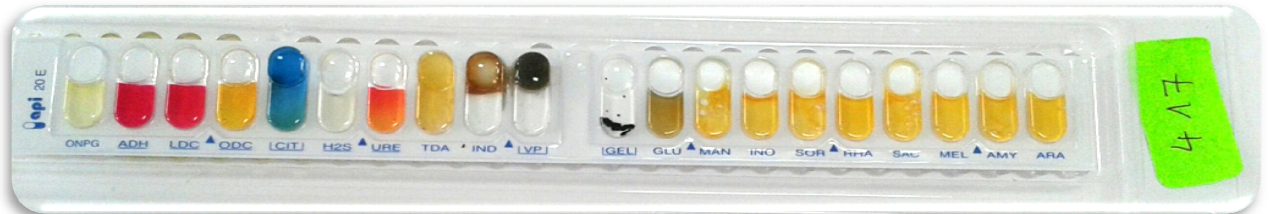
Annexe N° 04 : Tableaux de lecture de la galerie API 20^E

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultat	
			Négatif	Positif
ONPG	Ortho-nitro-phenyl-galactosidase	B-galactosidase	Incolore	Jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaun	Rouge/orangé
LDC	Ly	Lysine décarboxylase	Jaun	Orangé
ODC	Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaun	Rouge/orangé
CIT	Citrate de	Utilisation du citrate	Vert pale/jaune	Bleu-vert/vert
H₂S	Thiosulfate de Sodium	Utilisation d'H ₂ S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/fin liseré
URE	U	Uréase	Jaun	Rouge/orangé
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA / Immédiat	
			Jaune	Marron foncé
IND	Tryptophane	Production d'indole	IND / 2 min, max	
			Jaune	Anneau rouge
VP	Pyruvate de Sodium	Production d'acétoïne	VP 1 + VP 2 / 10 min	
			Incolore	Rose-rouge
GEL	Gélatine de Kohn	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	Glucose	Fermentation/oxydation	Bleu-vert/vert	Jaune
MAN	Mannitol	Fermentation/oxydation	Bleu-vert/vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation/oxydation	Bleu-vert/vert	Jaune
SOR	Sorbitol	Fermentation/oxydation	Bleu-vert/vert	Jaune
RHA	Rhamnose	Fermentation/oxydation	Bleu-vert/vert	Jaune
SAC	Saccharose	Fermentation/oxydation	Bleu-vert/vert	Jaune
MEL	Melibiose	Fermentation/oxydation	Bleu-vert/vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation/oxydation	Bleu-vert/vert	Jaune
ARA	Arabinose	Fermentation/oxydation	Bleu-vert/vert	Jaune
Ox	Sur papier filtre	Cytochrome-oxydase	Ox / 5-10 min	
			Incolore	Anneau violet

Annexes N°05: Résultat de l'identification biochimique des bactéries par les galeries API 20^E



Acinetobacter baumannii/calcoaceticus



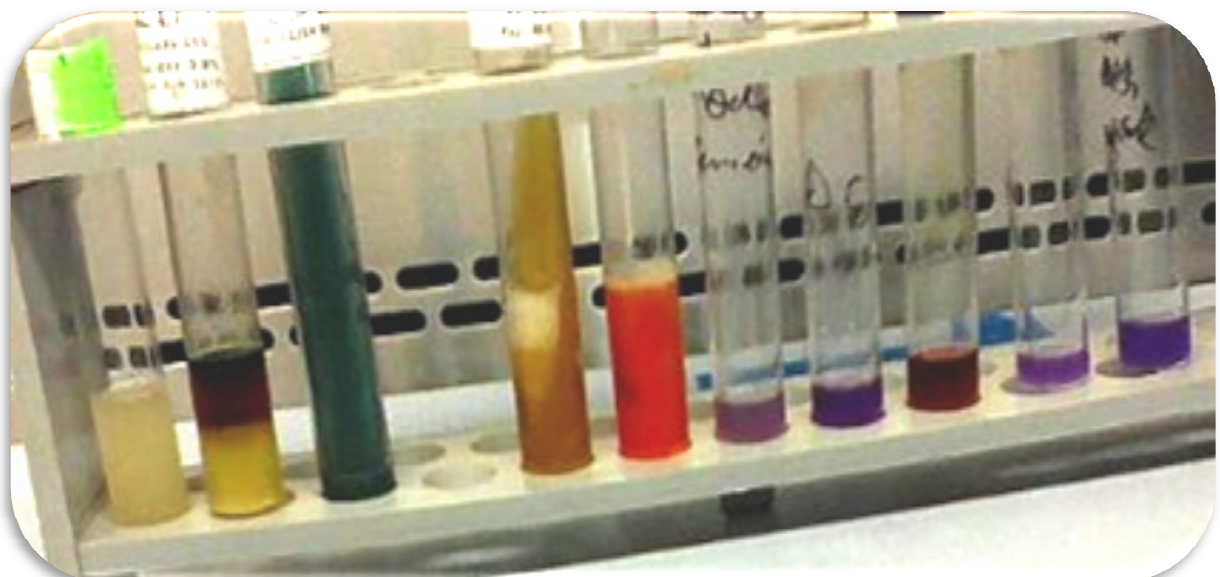
Klebsiella pneumoniae ssp pneumonia



Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae



Salmonella spp



Résultat de la galerie classique

Annexe N°06 : Composition des colorants de gram**Cristal violet ou violet de gentiane (pour coloration de Gram)****• Solution mère A**

Cristal Violet ou Violet de Gentiane..... 25 g
 Ethanol à 96 %..... 250 ml

La solution est vigoureusement agitée à trois reprises dans la même journée. On laisse déposer. La Solution est prête à l'emploi dès le lendemain.

Conservation : Quelques années en flacon brun Hermétiquement bouché.

• Solution mère B

Oxalate d'Ammonium (NH₄)₂C₂O₄.H₂O.....5 g
 Eau Distillée..... 500 ml

Conservation : 2 à 3 mois dans un flacon hermétiquement bouché.

Fuchsine**• Fuchsine mère saturée**

Fuchsine Basique..... 25 g
 Ethanol à 96 %..... 250 ml

Conservation : Quelques années dans un flacon brun hermétiquement bouché.

• Solution mère aqueuse de Phénol à 5 % (v/v) :

Phénol Cristallisé fondu50 ml
 Eau distillée..... 950 ml

conservation : Quelques mois dans un flacon hermétiquement bouché.

Fuchsine (solution de travail)

Solution saturée de Fuchsine Basique, filtrée..... 100 ml
 Solution aqueuse de Phénol à 5 %..... 900 ml

Conservation : Au moins 2 ans.

Fuchsine diluée (pour coloration de Gram)

Fuchsine Phéniquée 01 ml
 Eau Distillée..... 09 ml

Conservation : 1 mois tout au plus, et Faire la dilution avant chaque coloration.

Lugol faible (pour coloration de Gram)

Iodure de Potassium (KI)..... 2,34 g
 Iode en Cristaux ou Iode Sublimée..... 1,66 g
 Eau Distillée.....500 ml

Conservation : non filtré : 3 mois. Le Lugol doit avoir une coloration brun rouge. S'il est jaune, il ne fonctionnera plus et doit être jeté.

Annexe N°07 : Composition des milieux de culture utilisée**Gélose Mueller Hinton**

La gélose Mueller-Hinton est le milieu de référence pour les tests de sensibilité des germes aux antibiotiques. Sa formulation est conforme aux recommandations du de l'O.M.S.

Elle peut également être additionnée de sang pour réaliser l'antibiogramme des germes fragiles, tels que *Haemophilus influenzae*, *Neisseria*, *Enterococcus sp* et *Streptococcus pneumoniae*.

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Infusion de bœuf.....	300,00	Ph final à 25°C : 7,3 ± 0,2
Peptone de caséine.....	17,50	Le milieu en flacons ou boîtes se conserve entre 2 et 8°C
Amidon.....	1,50	
Agar.....	17,00	

Gélose nutritive

La Gélose Nutritive est un milieu largement utilisé pour la culture des micro-organismes peu exigeants. Elle est recommandée dans de nombreuses méthodes standardisées d'analyses des aliments, des laitages, de l'eau et d'autres produits.

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Peptone.....	5,00	Ph final à 25°C : 6,8 +/-0,2
Extrait de viande de bœuf.....	3,00	
Agar.....	15,00	

Le milieu en flacons et tubes se conserve entre 15 et 25°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage. Le milieu en boîtes se conserve entre 2 et 8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage.

Gélose EMB

La gélose EMB, préconisée originellement par Levine, est utilisée pour isoler et identifier *Escherichia coli* et *Enterobacter*, ainsi que les bactéries intestinales à Gram négatif dans les produits pharmaceutiques, les produits laitiers et les autres produits alimentaires.

Peptone	10,0g
Lactose	10,0g
Eosine	0,4g
Bleu de méthylène	0,0625g
Hydrogénophosphate de potassium	2,0g
Agar	15,0g
pH	7

Gélose Mac Conkey

Peptone de caséine	17
Crisal violet	0.001
Rouge neuter	0.03
Chlorure de sodium	5
Mélange de sels biliaires	1.5
Lactose	10
Peptone de viande	3
pH	7.4

Gélose King A

La gélose King A est utilisée pour la caractérisation des Pseudomonas par la mise en évidence de la production de pyocyanine. Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée.

-Peptone	20 g
- Glycérol	15 ml
- Sulfate de potassium	1,5 g
- Chlorure de magnésium	1,5 g
- Agar	20 g
-L'eau distillée	1000 ml

Le milieu en tubes se conserve entre 15 et 25°C jusqu'à la date d'expiration.

PH=6,8

Gélose King B

La gélose King B est utilisée pour la caractérisation des Pseudomonas par la mise en évidence de la production de fluorescéine (pyoverdine).

Potéose-peptone n°3 (difco)	20g
Agar	15g
Glycérol cp	10g
PO4HK2 anhydre	1.5g
SO4Mg 7H2O	1.5g
Eau distillée	1000ml

. pH final à 25°C : 7,2 ± 0,2 Le milieu en tubes se conserve entre 15 et 25°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage.

Bouillon nutritif

Le Bouillon Nutritif est un milieu largement utilisé pour la culture des microorganismes peu exigeants. Il est recommandé dans de nombreuses méthodes standardisées d'analyses des aliments, des laitages, de l'eau et d'autres produits. Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Peptone	5,00	pH final à 25°C : 6,8 ± 0,2
Extrait de viande de bœuf.....	3,00	

Le milieu en flacons ou tubes se conserve entre 15 et 25°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage.

Annexe N°08: Composition des milieux d'identification**Gélose TSI (Triple Sugar Iron.)**

La gélose TSI est utilisée pour l'identification présomptive des entérobactéries basée sur la fermentation du glucose, du lactose, du saccharose et sur la production de gaz et d'H₂S.

Son utilisation est recommandée pour la recherche de *Salmonella* dans les produits pharmaceutiques, et pour la recherche de *Salmonella* et *Campylobacter* dans les aliments.

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Peptone.....	20,00	Chlorure de sodium.....	5,00
Extrait de bœuf.....	3,00	Citrate ferrique ammoniacal.....	0,30
Extrait de levure.....	3,00	Thiosulfate de sodium.....	0,30
Saccharose.....	10,00	Rouge de phénol.....	0,025
Lactose.....	10,00	Agar.....	12,00
Glucose monohydrate.....	1,00		

Ph final à 25°C : 7,4 ± 0,2

Le milieu en tubes se conserve entre 2 et 8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage.

Milieu de Clark et Lubs

Le milieu de Clark et Lubs permet de différencier les *Entérobactériacées* avec les réactions au rouge de Méthyle et de Voges-Proskauer. Le rouge de méthyle différencie le processus de fermentation, il est jaune Au-dessus d'un pH de 6,3 et rouge en dessous de 4,2. La production d'acétylméthylcarbinol se révèle par l'apparition d'une coloration rouge en surface du milieu.

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Peptone.....	7,00	
Glucose.....	5,00	
Phosphate dipotassique.....	5,00	Ph final à 25°C : 7,0 ± 0,2

Le milieu en tubes se conserve à l'obscurité entre 15 et 25°C jusqu'à la date d'expiration.

Citrate de Simmons

La gélose au Citrate de Simmons est utilisée pour l'identification présomptive des entérobactéries basée sur l'utilisation du citrate

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Sulfate de magnésium.....	0,20	
Citrate de sodium.....	2,00	
Ammonium dihydrogénophosphate.....	1,00	Ph final à 25°C : 6,8 ± 0,2
Bleu de bromothymol.....	0,08	
Phosphate dipotassique.....	0,08	
Chlorure de sodium.....	5,00	
Agar.....	15	

Le milieu déshydraté se conserve entre 2 et 30°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage.

Mannitol mobilité

Milieu de différenciation rapide des *Entérobactériacées*. Il permet de rechercher simultanément la mobilité, l'utilisation du mannitol.

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Peptone de viande.....	15	Ph final 7,8
Extrait de viande.....	3	
Mannitol.....	10	
Potassium nitrate.....	1	
Rouge de phénol.....	0,05	
Agar.....	5	

Milieu de Moeller

Milieu auquel on additionne la lysine, l'arginine, l'ornithine, et autre acides aminés. Il est utilisé pour la différenciation des microorganismes selon leur aptitude à effectuer la réaction de décarboxylation des amino-acides.

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Extrait de levure.....	3	L'acide amine à rajouter peut être soit la l-lysine, l-arginine, l-ornithine, un milieu témoin est préparé sans l'addition d' amino-acides.
Glucose.....	1	
Acide amine.....	10	
Pourpre de bromocrésol.....	2 ml	
Pyridoxal.....	0,5ml	Ph final 6,8+/-0,1

Urée- indole

Permet de rechercher l'uréase, la production d'indole et le tryptophane désaminase (TDA) indiqué pour l'identification des *salmonella*, *shigella* et *yerssinia Entérolitica* dans les selles.

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

L-tryptophane.....	03	Ph final 6,7
Phosphate dipotassique.....	01	
Phosphate monopotassique.....	01	
Chlorure de sodium.....	05	
Urée.....	20	
Rouge de phénol.....	02 ,5	

Annexe N° 09 : Composition des additifs**Kovacs**

Le réactif de Kovacs est utilisé pour la mise en évidence de la production d'indole par les micro-organismes possédant une tryptophanase. Le tryptophane, acide aminé notamment présent dans les peptones tryptiques, est dégradé en indole qui réagit avec le P-Diméthylaminobenzaldéhyde du réactif. Une réaction positive, de la présence d'indole, est révélée par la coloration au rouge du réactif de Kovacs.

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée

P-Diméthylaminobenzaldéhyde.....	5,00 g
Alcool amylique.....	75,00 ml
Acide chlorhydrique pur.....	25,00 ml

Conserver en flacon ambré entre 2 et 8°C

Réactif de Greiss-Ilosvay

Solution réactionnelle pour la mise en évidence des nitrites formés par les bactéries, pour l'identification des micro-organismes réduisant les nitrates.

Nitrate réductase 1 : -Acide sulfanilique, - Acide acétique

Nitrate réductase 2 : -alph-naphtylamine,- Acide acétique

Réactif de Voges – Proskauer 1 et 2

Solution réactionnelle pour la mise en évidence de la présence d'acétyl –méthyle carbinol (acétoïne dans) le milieu. Ce composé est un produit de dégradation de l'acide pyruvique par les bactéries qui empruntent la voie de fermentation butanediolique caractéristique de certaines Entérobactéries.

VP1 : Soude caustique (NaOH)

VP2 : Alpha naphthol

Réactif TDA

Solution réactionnelle pour la mise en évidence de la présence, dans le milieu, de l'acide indol-pyruvique formés par les bactéries possédant la tryptophane désaminase.

Composition Chlorure de fer.....80 g/l

Rouge de méthyle

Solution réactionnelle pour la mise en évidence de l'acidification finale du milieu glucosé après fermentation du glucose en acides mixtes, caractéristiques de certaines Entérobactéries.

Composition : Rouge de méthyle Alcool 95 °C

Annexe N°10 : Préparation de l'étalon de turbidité McFarland 0,5 (CA-SFM ,2015)

- 1- Ajouter 0,5 mL d'une solution à 0,048 mol/L de BaCl₂ (1,175% p/v BaCl₂·2H₂O) à 99,5 mL d'une solution 0,18 mol/L (0,36 N) de H₂SO₄ (1% v/v) et agiter vigoureusement.
- 2 -Vérifier la densité de la suspension à l'aide d'un spectrophotomètre avec un faisceau de 1 cm et des cuvettes assorties. L'absorbance à 625 nm doit être comprise entre 0,08 et 0,13.
- 3- Distribuer la suspension dans des tubes de même taille que ceux utilisés pour ajuster l'inoculum. Sceller les tubes.
- 4 -Une fois scellés, conserver ces tubes à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- 5 -Avant usage, mélanger vigoureusement le tube à l'aide d'un Vortex.
- 6- Renouveler l'étalon ou vérifier son absorbance après 6 mois de conservation.
- 7 -Il convient de vérifier les étalons achetés dans le commerce en s'assurant que l'absorbance se situe dans les limites fixées.

Annexe N°11 : Préparation de la solution d'EDTA

La solution d'EDTA (MM = 372,24 g/mol) à 0.5 M (mol/l) est préparée par dissolution de 186.1 g de poudre d'EDTA- 2H₂O di sodique dans 1 000 ml d'eau distillée, puis ajustée au pH 8.2 en utilisant une solution de NaOH et stérilisée par autoclavage pendant 20 min à 120°C.

Annexe N°12 : Liste de matériel utilisé➤ **Souches de référence**

- *Escherichia coli*: ATCC 25922;
- *Escherichia coli* (Resistance à l'Azide de Sodium).

➤ **Matériel utilisés****Tableau:** Liste de matériel utilisé

Matériel utilisés	Milieux de culture		Réactifs
	Milieux de culture solides	Milieux de culture liquid	
-Microscope optique; -Bec bunsen; -Pipettes pasteur; -Anse de platine; -Boites de pétri; -Lames; -Etuve; -Pince; -Ecouvillons ; -Autoclave ; -Vortex ; -Bain marie.	-Gélose nutritive; -Milieu Eosine Bleu de Méthylène (EMB); -Mueller Hinton; -Gélose Mac conkey; -Gélose King A et King B.	-Bouillon nutritive; -Eau physiologique; -Eau distillée.	-Violet de Gentiane ; -Lugol ; -Alcool; -Fushine basique ; -Réactif de kovacs ; -VP I, VPII ; -Huile de paraffine ; -azide de sodium ; -EDTA ; -Acide sulfurique ; -BaCl ₂ Chlorure de barrium.

➤ Les Antibiotiques testés

Tableau: Liste des antibiotiques de la famille de β -lactamine

Famille	Antibiotiques	Abréviation	Charges (μg)
β-lactamine	Céftazidime	CAZ	30
	Céfotaxime	CTX	30
	Imipénème	IMP	10
	Amoxicilline/Acide clavulanique	AMC /AUG	30
	Ampicilline	AMP	10
	Aztréonam	ATM	30
	Ertapénème	ETP	10
	Céfoxitine	FOX	30
	Céfalotine	KF	30
	Cefazoline	CZ	30
	Ticarcillin	TC	75
	Pipracilline	PRL	100
	Ticarcilline + Acide clavulanique	TIM	85

Tableau: Liste des antibiotiques des autres familles que les β -lactamines

Familles	Antibiotiques	Abréviation	Charges (μg)
Aminosides	Gentamicine	CN	10
	Amikacine	AK	30
	Netilmicine	NET	30
	Tobramycine	TOB	10
	Levofloxacin	LEV	5
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	CIP	5
	Acide nalidixique	NA	30
Autres antibiotiques	Chloromphénicol	C	30
	Nitofurane	F	300
	Cotrimoxazole (Triméthoprime-sulfaméthoxazole)	SXT	1.25/23.75
	Fosfomycine	FF	200
	Colistine	CT	10

Tableau N°X: Sensibilité des souches des BGN aux β -lactamines testées

Codes	Antibiotiques	AMP	AMC	CAZ	CTX	IMP	ATM	ETP	FOX	KF	PRL	TIM	TC	CZ
	Espèces													
421	<i>K. pneumonia</i>	6 ®	8 ®	17 ®	10 ®	21 (I)	26 (S)	6 ®	6 ®	6 ®	-	-	-	6 ®
417	<i>K. pneumonia</i>	6 ®	13 ®	14 ®	6 ®	21 (I)	17 ®	28 (S)	24 (S)	6 ®	-	-	-	6 ®
419	<i>Salmonella spp</i>	6 ®	6 ®	6 ®	10 ®	16 ®	20 ®	9 ®	6 ®	6 ®	-	-	-	6 ®
448	<i>E. aerogenes</i>	6 ®	8 ®	6 ®	6 ®	30 (S)	6 ®	24 (S)	18 (I)	6 ®	-	-	-	6 ®
39	<i>E. cloacae</i>	6 ®	6 ®	6 ®	6 ®	23 (S)	16®	24 (I)	6 ®	6 ®	-	-	-	6 ®
388	<i>K. pneumonia</i>	6 ®	6 ®	6 ®	6 ®	20 (I)	14 ®	6 ®	8 ®	6 ®	-	-	-	6®
389	<i>A. baumannii</i>	6 ®	6 ®	6 ®	6 ®	30 (S)	12®	6 ®	6 ®	6 ®	-	-	-	-
435	<i>Salmonella spp</i>	6 ®	12 ®	6 ®	10 ®	32 (S)	16 ®	12 ®	6 ®	6 ®	-	-	-	6 ®
Md2	<i>P. aeruginosae</i>	-	-	13 ®	-	32 (S)	18 (I)	-	-	-	20 (I)	9 ®	12 ®	-
Md5	<i>P. aeruginosae</i>	-	-	13 ®	-	32 (S)	27 (I)	-	-	-	20 (I)	10 ®	16 ®	-
Md3	<i>P. aeruginosae</i>	-	-	10 ®	-	32 (S)	15 (I)	-	-	-	10 ®	6 ®	8 ®	-
Md 3a	<i>P. aeruginosae</i>	-	-	13 ®	-	30 (S)	23 (I)	-	-	-	18 ®	6 ®	6 ®	-
Md1	<i>P. aeruginosae</i>	-	-	6 ®	-	26 (S)	20 (I)	-	-	-	16 ®	6 ®	6 ®	-

AMP : Ampiciline ; **AMC** : Amoxicilline/Acide clavulanique ; **CAZ** : Céftazidime ; **CTX** : Céfotaxime ; **IMP** : Imipénème ; **ATM** : Aztréonam ; **ETP** : Ertapénème ; **FOX** : Céfoxitine ; **KF** : Céfalotine ; **CZ** : Cefazoline ; **TIM**: Ticarcilline + Acide clavulanique; **TC** : Ticarcillin; **PRL** : Pipracilline; ® : Résistant, S : Sensible, I : Intermédiaire.

Tableau N°XI: Sensibilité des souches des BGN aux antibiotiques autres que les β -lactamines

Code	Antibiotiques	AK	CN	NA	CIP	C	F	SXT	FF	CT	LEV	NET	TOB
	Espèces												
421	<i>K. pneumonia</i>	12 ®	12 ®	7 ®	18 ®	12 ®	12 ®	6 ®	18 (S)	6 ®	-	-	-
417	<i>K. pneumonia</i>	20 (S)	10 ®	16 (I)	18 ®	32 (S)	20 (S)	6 ®	20 (S)	6 ®	-	-	-
419	<i>Salmonella spp</i>	21 (S)	9 ®	9 ®	26 (S)	26 (S)	22 (S)	6 ®	21 (S)	12 (S)	-	-	-
448	<i>E. aerogenes</i>	18 (S)	12 ®	22 (S)	33 (S)	24 (S)	19 (S)	19 (S)	20 (S)	10 ®	-	-	-
39	<i>E. cloacae</i>	22 (S)	11 ®	13 ®	22 (S)	6 ®	18 (S)	6 ®	16 (S)	16 (S)	-	-	-
388	<i>K. pneumonia</i>	10 ®	6 ®	6 ®	6 ®	8 ®	6 ®	6 ®	6 ®	10 ®	-	-	-
389	<i>A. baumannii</i>	20 (S)	8 (S)	6 ®	15 (S)	6 ®	6 ®	6 ®	6 ®	12 (S)	-	-	-
435	<i>Salmonella spp</i>	21 (S)	24 (S)	20 (S)	32 (S)	24 (S)	10 ®	11 ®	6 (R)	6 ®	-	-	-
Md2	<i>P. aeruginosae</i>	24 (S)	20 (S)	-	36 (S)	-	-	-	-	14 (S)	24 (S)	16 (S)	24 (S)
Md5	<i>P. aeruginosae</i>	20 (S)	20 (S)	-	35 (S)	-	-	-	-	15 (S)	24 (S)	22 (S)	24 (S)
Md3	<i>P. aeruginosae</i>	22 (S)	22 (S)	-	38 (S)	-	-	-	-	13 (S)	32 (S)	17 (S)	24 (S)
Md 3a	<i>P. aeruginosae</i>	20 (S)	11 ®	-	30 (S)	-	-	-	-	19 (S)	30 (S)	16 (S)	14 ®
Md1	<i>P. aeruginosae</i>	20 (S)	8 ®	-	32 (S)	-	-	-	-	16 (S)	32 (S)	16 (S)	24 (S)

CN: Gentamicine; AK: Amikacine ; NA : Acide nalidixique ; CIP : Ciprofloxacine; C: Chloromphénicol; F: Nitofurane; SXT : Triméthoprime-sulfaméthoxazole ; FF : Fosfomycine; CT : Colistine; TOB : Tobramycine; NET : Netilmicine LEV : Levofloxacine ; ® : Résistant, S : Sensible, I : Intermédiaire.

تقييم مقاومة بكتيريا سلبيه الجرام للمضادات الحيوية معزولة من وسط استشفائي بخنشلة

ملخص:

هذه الدراسة تهدف إلى تقييم مقاومة بكتيريا سلبيه الجرام للمضادات الحيوية معزولة من المؤسسة العمومية الإستشفائية أحمد بن بلة و مركز تصفية الدم من مستشفى علي بوسحابة بولاية خنشلة, تم عزل هذه السلالات من عينات مختلفة (البول, سائل تصفية الدم, القيح...) التي حققت عن طريق دراسة كلاسيكية مع خطوات enrichissement, والعزل, وتحديد الهوية.

تحديد هوية السلالات يركز على تقنيتين Api20E, ودراسة حساسيتها للمضاد الحيوي (طريقة انتشار الأقراص على gélose, وتحديد التركيز الأدنى المثبطة حيث قمنا بالإجراءات حسب CA-SFM)

من بين 50 سلالة عزلت أثناء مسار الدراسة, 25 سلالة مقاومة لسيفاروسبونرين الجيل الثالث C3G وقد قمنا بتحديد هويتها *Pseudomonas aeruginosa* هي السلالة الأكثر عزلة (28%) و تليها *Klebsiella pneumoniae* (24%), و *Salmonella spp* (16%).

تم تنفيذ البحث عن النمط الظاهري بإنتاج بيتالاكتاماز دات الطيف الممتد, نتائجها توضح أن السلالات مقاومة لل سيفالوسبورين الجيل الثالث لتصل إلى السيفتازيديم بنسبة (76%) و للأمبيسيلين وسيفالوتين (60%), في حين أن للمضادات الحيوية شائعة جدا. و تم تسجيل (40%) لحمض ناليديكسيك وتريميثوبرين-سولفاميثوكزازول, و أيضا (36%) للجونتايسين و تيتراسيكلين.

إن البحث عن إنتاج كاربايناماز وذلك من خلال اختبار هودج المطلوب, وهو ايجابي لسلالة واحدة (صورة البرسيم) مما يدل على إنتاج كاربايناماز من نوع ماتالو-بيتا-لاكتاماز, والتي تمثل ب synergie بين EDTA و ايميبينام.

لقد أظهرت قيم التركيز الأدنى للتثبيط التي حصل عليها سلالة *Klebsiella pneumoniae*, هي الأكثر مقاومة للسفوتاكسيم و السفتازيديم بقيمة ≤ 265 ميكروغران /مل.

أربع سلالات تعرض النمط الظاهري BLSE التي تكون موضوع اختبار ل Conjugaison, للأسف النتائج التي تم عرضها تبين أنه لا توجد أي سلالة iteransconjugants التي لها ملامح مماثلة لسلالات المانحة.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا سلبيه الجرام، بيتالاكتامين، مقاومة، النمط الظاهري.

Évaluation de l'antibio-résistance des bacilles à Gram négatif isolées à partir du milieu hospitalier de Khenchela

Résumé :

Cette étude vise à l'évaluation de l'antibio-résistance des BGN isolées à partir de l'EPH Ahmed Ben Bella et de service d'hémodialyse de l'hôpital Ali Boushaba de la wilaya de KHENCHELA. Ces souches ont été isolées à partir de divers prélèvements (Urines, Liquide de dialyse, Pus...) qui ont fait l'objet d'une étude classique avec des étapes d'enrichissement, d'isolement et d'identification. En se basant sur l'identification des souches a été effectuée selon deux techniques : Api 20E et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques (méthode de diffusion de disques sur gélose et CMI par E. Test ont été réalisés selon CA-SFM).

Parmi 50 souches ont été isolées au cours de cette étude, 25 souches résistantes aux C3G ont été identifiées. *Pseudomonas aeruginosa* est l'espèce la plus isolée (28%), suivi de *Klebsiella pneumoniae* (24%) et de *Salmonella spp* (16%).

Une recherche phénotypique de la production de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) a été également effectuée, notre résultat montre que la plupart des souches identifiées résiste aux C3G d'un taux de 76% aux Céfotaxime, 60% aux l'Ampicilline et Céfalotine, ainsi qu'une résistance très fréquente aux autres antibiotiques, 40% ont été enregistrés pour l'acide nalidixique et Triméthoprim-sulfaméthoxazole, et 36% ont été enregistrés pour la Gentamycine et tétracycline.

Recherche de la production de carbapénèmases par la recherche de test de Hodge est positif pour une seule souche (image de trèfle) indiquant la production de carbapénèmases de type métallobeta-lactamases et représente l'image de synergie entre EDTA et l'imipénème.

Les valeurs des concentrations minimales inhibitrices obtenues ont montrés: *K. pneumoniae* est la plus résistante avec des céfotaxime et ceftazidime d'une valeur de >256 $\mu\text{g/ml}$.

Quatre souches présentant le phénotype BLSE ont fait l'objet d'un test de conjugaison, malheureusement les résultats ont été montrés aucune souches transconjugants qui présentent des profils identiques à ceux des souches donatrices.

Mots clé : Bacilles à Gram négatif, β -lactamine, Résistance, Phénotype.

The evaluation of the antibiotic-resistance of the BGN isolated from medium hospital in Khenchela

Abstract

This study aims to the evaluation of the antibiotic-resistance of the BGN isolated from the EPH Ahmed Ben Bella and service from hemodialysis of the hospital Ali Boushaba in wilaya of KHENCHELA. These stocks were insulated starting from various taking away (Urines, Liquid of dialysis, Pus...) who were the object of a classical study with stages of enrichment, insulation and identification. While basing itself on the identification of the stocks was carried out according to two techniques: Api 20^E and the study of the sensitivity to the antibiotics (method of diffusion of discs on agar and CMI through E. Test were carried out according to CASFM).

Among 50 stocks were insulated during this study, 25 stocks resistant to the C3G were identified. *Pseudomonas aeruginosa* is the species most isolated (28%), followed by *Klebsiella pneumoniae* (24%) and *Salmonella spp* (16%).

A phenotypical research of the production of β -lactamases with wide spectrum (BLSE) was also carried out, our result shows that most stocks identified resists the C3G of a rate of 76% in Céftazidime, 60% with Ampicilline and in Céfalotine, as well as a very frequent resistance to other antibiotics, 40% were recorded for Acid nalidixic and Triméthoprime-sulfaméthoxazole, and of 36% summer recorded for Gentamycine and tetracycline.

Research of the production of carbapénèmases by searched test of Hodge is positive for only one stock (clover image) indicating the production of carbapénèmases of type metal-beta-lactamases and represents the image of synergy between EDTA and the imipenème.

The values of the inhibiting minimal concentrations obtained showed: *K. pneumoniae* is most resistant with céfotaxime and ceftazidime of a value of $> 256 \mu\text{g/ml}$.

Four stocks presenting phenotype BLSE were the object of a test of conjugation, unfortunately the results were shown any stocks transconjugants which presenting profiles identical to those of the stocks donors.

Keywords: Bacilli with negative Gram, β -lactamine, Resistance, Phenotype

Nom : **DEBBACHE** Prénom : **GHANIA**

Nom : **NEMER** Prénom : **SABRINA**

Date de soutenance : 05/06/2016

Master Académique en Biologie Option: Microbiologie

Évaluation de l'antibio-résistance des BGN isolées partir du milieu hospitalier de Khenchela

Résumé :

Cette étude vise à l'évaluation de l'antibio-résistance des BGN isolée partir de l'EPH Ahmed Ben Bella et de service d'hémodialyse de l'hôpital Ali Boushaba du la wilaya de KHENCHELA. Ces souches ont été isolées à partir de divers prélèvements (Urines, Liquide de dialyse, Pus...) qui ont fait l'objet d'une étude classique avec des étapes d'enrichissement, d'isolement et d'identification. En se basant sur L'identification des souches a été effectuée selon deux techniques : Api 20^E et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques (méthode de diffusion de disques sur gélose et CMI par E. Test ont été réalisés selon CA-SFM).

Parmi 50 souches ont été isolées au cours de cette étude, 25 souches résistantes aux C3G ont été identifiées. *Pseudomonas aeruginosa* est l'espèce la plus isolée (28%), suivi de *Klebsiella pneumoniae* (24%) et de *Salmonella spp* (16%).

Une recherche phénotypique de la production de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) a été également effectuée, notre résultat montre que la plupart des souches identifiées résiste aux C3G d'un taux de 76% aux Céfotaxime, 60% aux l'Ampicilline et Céfalotine, ainsi qu'une résistance très fréquente aux autres antibiotiques, 40% ont été enregistrés pour l'acide nalidixique et Triméthoprime-sulfaméthoxazole, et 36% ont été enregistrés pour la Gentamycine et tétracycline.

Recherche de la production de carbapénèmases par la recherché de test de Hodge est positif pour une seule souche (image de trèfle) indiquant la production de carbapénèmases de type métallobeta-lactamases et représente l'image de synergie entre EDTA et l'imipénème.

Les valeurs des concentrations minimales inhibitrices obtenues ont montrés: *K. pneumoniae* est la plus résistante avec des céfotaxime et ceftazidime d'une valeur de $>256 \mu\text{g/ml}$.

Quatre souches présentant le phénotype BLSE ont fait l'objet d'un test de conjugaison, malheureusement les résultats ont été montrés aucune souches transconjugants qui présentant des profils identiques à ceux des souches donatrices.

Mots clé : Bacilles à Gram négatif, β -lactamine, Résistance, Phénotype.

Devant le Jury :

Présidente : M ^{elle} DEROUCHE Faouzia	MCB	Univ. Abbès Laghrour-Khenchela
Encadreur: Mr. BOUSSAA Abdelhalim	MAA	Univ. Abbès Laghrour-Khenchela
Éxamineur: Mr. LARBA Rabah	MCA	Univ. Abbès Laghrour-Khenchela

Promotion: Juin 2016

Ce travail a été réalisé dans l'établissement public hospitalier Ahmed Ben Bella de la wilaya de Khenchela et dans les laboratoires pédagogiques de l'université Abbes Laghrour Khenchela