



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par:

Nour el Houda NAILI

Rabab ELGARNI

Le: mardi 09 Juillet 2019

Thème

Evaluation de la résistance aux β -lactamines des souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa*, isolées à l'hôpital El-Hakim Saadan-Biskra.

Jury :

M.	Nasser BELOUCIF	MAA	Université de Biskra	Président
Mme.	Widad BOUGUENOUN	MCB	Université de Biskra	Rapporteur
M.	Madjed AGGOUNI	MAA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire: 2018 - 2019

Remerciements

Nous remercions **DIEU** le tout puissant de nous avoir donnée la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce travail.

Nous tenons à exprimer toute notre gratitude et remercier chaleureusement à madame **Widad BOUGUENOUN** notre encadreur, pour avoir accepté d'encadrer notre travail, pour ses conseils, et son aide ainsi que pour sa gentillesse et sa disponibilité, son assistance et son soutien indéfectible.

Mes remerciements s'adressent également à Mr. **Nasser BELOUCIF** qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury.

A Mr. **Madjed AGGOUNI** qui nous a fait l'honneur de participer à ce jury et d'examiner notre travail nous la remercions profondément.

Nous remercions particulièrement à tous les ingénieurs de laboratoire de la faculté, et de la bibliothèque (Walid et Mouhamed) et de la scolarité (Mouhssin).

A tous les enseignants de la faculté des sciences de la Nature et de la Vie de l'université de Biskra, qui ont fait de nous ce que nous sommes aujourd'hui ; nous vous remercions du fond du cœur pour vos conseils lors de la conception de ce travail et le fait de nous avoir mis en contact avec notre superviseur

Nous voulons exprimer nos remerciements les plus sincères au : Docteur Kklil, Chef de services de laboratoire de microbiologique de l'hôpital El Hakim Saadan –ville de Biskra.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans associer toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Dédicace

A mes chères parents pour toute leur affection, les sacrifices consentis à mon égard, leur soutien et leurs encouragements, qui m'ont permis d'aller de l'avant et de toujours donner le meilleur de moi-même.

A mes chères sœurs Chahira, Aicha, Yasmine, Selma et mes adorables frères Oussama et Yacine pour leurs présence à mes côtés.

A toute ma famille, Laamri, khalil et Imane en particulier.

A Rabab ma collègue qui m'a soutenu tout au long de ce travail, je ne saurais jamais lui exprimer mes sincères pour son aide.

A Mouhssin , Merci pour tout le soutien que vous m'avez apporté.

A mes amis, Haoua, Younes, Kamel et Hakima, merci pour votre soutien.

Enfin, je vous remercie d'avoir partagé avec moi un jour important que j'attendais depuis mon enfance.

Nour el Houda

Dédicace

Avec un énorme plaisir, je dédie ce modeste travail à mes très chers parents, source de tendresse, de noblesse et d'amour, qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique model de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance.

A mes chères sœurs Chaima et Ahlem, pour leurs soutien moral.

A toute la famille EL GARNI et L'GHOUL.

A mon binôme, NAILI Nour el houda, qui est pour moi une vraie sœur.

Je ne saurai terminer sans citer mes très chères amies : Somia, Amina, Afef, Djamila, Marwa

Enfin je le dédie à tous mes amis que je n'ai pas cités, et à tous ceux qui me connaissent.

A tous ceux que j'aime.

Rabab

Table des matières

Remerciements	
Dédicace	
Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Liste des abréviations	III
Introduction.....	01
PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre 1 .Partie Bibliographique	
Partie I. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	03
1. Généralités.....	03
2. Habitat.....	03
3. Caractères généraux des <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	03
3.1. Caractères morphologiques.....	03
3.2. Caractères cultureux.....	04
3.3. Caractères enzymatiques et biochimiques.....	04
4. Epidémiologie.....	04
5. Pouvoir pathogène.....	05
Partie II. Les bêta-lactamines.....	05
1. Généralité	05
1.1. Les pénicillines (noyau pénème).....	06
1.2. Les céphalosporines.....	06
1.2.1. Céphalosporines de première génération (C1G).....	06
1.2.2. Céphalosporines de deuxième génération (C2G).....	06
1.2.3. Céphalosporines de troisième génération(C3G).....	06
1.2.4. Céphalosporines de quatrième génération (C4G)	07
1.3. Monobactames	07
1.4. Les carbapénèmes.....	07
1.5. Inhibiteurs de bêta-lactamases	07
2. Mode d'action des β -lactamines.....	07
Partie III. La résistance aux β-lactamines chez <i>P. aeruginosa</i>	08
1. Résistance naturelle.....	08

2. Résistance acquise.....	08
2.1. Résistance non enzymatique.....	08
2.1.1. Perte de la porine OprD.....	08
2.1.2. Pompe à efflux.....	09
2.2. Résistance enzymatique.....	09
2.2.1. Hyperproduction de céphalosporinase chromosomique de classe C.....	09
2.2.2. Les bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu (BLSE).....	09
2.2.3. Les carbapénémases.....	10
2.2.3.1. Carbapénémases de classe D (Oxacillinase).....	10
2.2.3.2. Carbapénémases de classe B (métallo-béta-lactamases).....	10

DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre2. Matériel et Méthodes

1. Lieu d'étude	11
2. Echantillonnage.....	11
3. Ré-isolément et caractérisation macroscopique.....	11
4. Identification	12
4.1. Examen microscopique	12
4.2. Tests d'orientation et identification biochimiques.....	12
5. L'étude de la résistance aux β- lactamines.....	14
5.1. L'antibiogramme.....	14
6. Détection phénotypique des mécanismes de résistance aux β-lactamines (β-lactamases)	15
6.1. Recherche de la production des β-lactamases à spectre étendu (BLSE)	15
6.1.1. Test de synergie	15
6.1.2. Test de double disque.....	16
6.2. Recherche phénotypique de la production des carbapénémases	16
6.2.1. Test de Hodge modifié (MHT).....	16
6.2.2. Détection de métallo- β -lactamases (MBL) par bandelette E-test	17
6.2.3. Détection des carbapénémases par le Carba NP test modifié.....	18

Chapitre 3. Résultats

1. Lieu d'étude.....	21
2. Ré-isolément et caractérisation macroscopique.....	21
3. Identification	21
3.1. Examen microscopique.....	21

3.2. Tests d'orientation et identification biochimiques.....	22
3.2.1. Test d'oxydase.....	22
3.2.2. Test de catalase.....	22
3.2.3. La galerie biochimique classique	23
4. L'origine des souches.....	24
5. Répartition des isolats.....	26
5.1. La répartition des <i>P. aeruginosa</i> au cours du temps.....	26
5.2. La répartition des <i>P. aeruginosa</i> selon les services.....	26
5.3. La répartition des <i>P. aeruginosa</i> selon le type de prélèvement	27
5.4. La répartition des <i>P. aeruginosa</i> selon le sexe	27
5.5. La répartition des <i>P. aeruginosa</i> selon l'âge.....	27
6. L'étude de la sensibilité aux β- lactamines	29
6.1. L'antibiogramme.....	29
7. Détection phénotypique des β-lactamases.....	30
7.1. Recherche de la production des β-lactamases à spectre étendu (BLSE).....	30
7.1.1. Test de synergie	30
7.1.2. Test de double disque.....	31
8. Recherche phénotypique de la production des carbapénèmases	32
8.1. Test de Hodge Modifié (MHT).....	32
8.2. Détection de métallo-β-lactamases (MBL) par bandelette E-test	32
8.3. Détection des carbapénèmases par le Carba NP test Modifié (MCNP).....	33

Chapitre 4. Discussion

Discussion.....	36
Conclusion et perspectives	40
Bibliographie.....	41
Annexe.....	46
Résumé(s)	

Liste des Tableaux

Tableau 1:	Taxonomie de <i>P. aeruginosa</i>	03
Tableau 2:	Les tests d'orientation et identification biochimiques des souches isolées	12
Tableau 3:	Liste des antibiotiques testés sur <i>P. aeruginosa</i> (Comité de l'Antibiogramme du réseau algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques 2014 (CD ROM))	15
Tableau 4:	Interprétation des résultats du Carba NP test modifié.....	19
Tableau 5:	Résultats finaux de la galerie biochimique classique obtenus pour les 32 souches étudiées de <i>P. aeruginosa</i>	23
Tableau 6:	La provenance des souches <i>P. aeruginosa</i> cliniquement isolées.....	24
Tableau 7:	Profile phénotypique des <i>P. aeruginosa</i>	34

Liste des Figures

Figure 1:	Le noyau β -lactame	05
Figure 2:	Ré-isolement des isolats sur milieu King B	12
Figure 3:	Schéma du test de Hodge	17
Figure 4 :	E- test M β L	18
Figure 5 :	Le Carba NP test	20
Figure 6 :	La morphologie des isolats sur milieu King B.....	21
Figure 7:	Observation microscopique par microscope optique grossissement x100	22
Figure 8:	Résultat positif de l'oxydase chez toutes les souches.....	22
Figure 9:	Résultat de test de la catalase.....	23
Figure 10:	Taux des <i>P. aeruginosa</i> au cours du temps	26
Figure 11:	Répartition des <i>P. aeruginosa</i> selon les services.....	27
Figure 12:	Répartition des <i>P. aeruginosa</i> selon leur type de prélèvement.....	27
Figure 13:	Répartition des <i>P. aeruginosa</i> selon le sexe.....	28
Figure 14:	Répartition des <i>P. aeruginosa</i> selon l'âge	28
Figure 15:	Exemple d'antibiogramme de <i>P. aeruginosa</i>	29
Figure 16:	Profil de résistance aux β -lactamines des 32 souches de <i>P. aeruginosa</i> ...	30
Figure 17:	Test de synergie.....	31
Figure 18 :	Test de double disque	31
Figure 19:	Résultat d'MHT pour les souches <i>P. aeruginosa</i>	32
Figure 20:	Résultats de détection de métallo- β -lactamases (M β L) par bandelette E-test.....	33
Figure 21:	Les résultats de Carba NP test.....	34

Liste des abréviations

ADH : arginine dihydrolase

AmpC : céphalosporinases

ATCC : American Type Culture Collection

BGN-NF : Bacilles à Gram négatif-N4n fermentant

BLSE : β -lactamase à spectre étendu

C1G : Céphalosporines de première génération

C2G : Céphalosporines de deuxième génération

C3G : Céphalosporine de troisième génération

C4G : Céphalosporines de quatrième génération

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CTAB : Tampon de lyse: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

EDTA: Ethylene diamine tetracetic Acid

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.

GES : Guyana extended spectrum (une bétalactamases à spectre étendu)

H₂S : Hydrogen Sulfide

IPM : Imipénème

IPM- R : souche résistante à l'imipénème

KPC : Klebsiella pneumoniae Carbapenemase

LDC : lysine décarboxylase

LPS : Lipopolysaccharide

MBLs : Métallo- β -lactamases

MCNPT: Modified CARBA NP Test

MH: Miller Hinton

MHT: Modified Hodge Test

ODC: Ornithine Decarboxylase

ONPG: Orthonitrophényl- β -galactoside

OprD : Outer membrane protein D

PLP : protéine liant les pénicillines

RM : Rouge de Méthyl)

SHV : Sulfydryl variable

TDA : Tryptophan Deaminase

TEM : Temoniera : nom du malade chez qui la première souche a été isolée

TSI : Triple Sugar Iron

VP : Réaction de Voges-Proskauer

Introduction

Introduction

Au cours des dernières décennies, *P. aeruginosa* s'est imposé comme un pathogène hospitalier très important du fait du nombre et de la gravité des infections causées (Elmeskini, 2011).

P. aeruginosa est un micro-organisme qui dispose de multiples facteurs de virulence et présente une capacité de résistance naturelle et inductible aux antibiotiques et aux désinfectants. Ces caractéristiques en font un pathogène préoccupant pour les cliniciens (Venier, 2011).

P. aeruginosa possède une aptitude remarquable à acquérir de nouveaux mécanismes de résistance qui viennent s'additionner à une résistance naturelle importante. Le risque d'émergence de mutants résistants en cours de traitement est élevé, ce qui contribue à accroître la mortalité au cours de ces infections. Les β -lactamines, qui sont le plus souvent utilisées en association avec un aminoside, occupent une place de choix dans la stratégie thérapeutique des infections à *P. aeruginosa*. Cependant, leur utilisation doit être adaptée aux mécanismes de résistance aux β -lactamines de *P. aeruginosa* (Drissi, 2008).

Parmi les antibiotiques, les bêta-lactamines représentent la principale famille d'antibiotiques utilisés pour le traitement des infections sévères à *P. aeruginosa*. Du fait de résistances naturelle et acquise, le choix de la bêta-lactamine à utiliser en thérapeutique est restreint et doit être guidé par l'antibiogramme (Cholley, 2010).

P. aeruginosa est aujourd'hui clairement reconnu comme un pathogène nosocomial majeur chez les patients immunocompromis ou affaiblis. *P. aeruginosa* a toujours été considéré comme une cible difficile en chimiothérapie anti-infectieuse (Mesaros *et al.*, 2007), de ce fait, une étude des souches *P. aeruginosa* isolée à partir de laboratoire de bactériologie de l'hôpital El Hakim Saadan – de la ville de BISKRA dans une période allant de premier Octobre au la fin de Février 2019.

Les objectifs spécifiques de ce travail étaient :

- L'étude de l'émergence des *P. aeruginosa* résistants aux β -lactamines ;
- L'étude phénotypique des mécanismes de résistance des isolats ;
- L'étude épidémiologique de l'émergence des souches multi-résistantes aux β -lactamines à la ville de BISKRA.

Ainsi, ce manuscrit s'articule autour de quatre chapitres:

- Le premier chapitre présentera une petite bibliographie sur *P. aeruginosa* et ses différents mécanismes de résistance aux β -lactamines ;
- Le deuxième chapitre, dans la quelle nous détaillerons les outils méthodologiques utilisés ;
- Le troisième chapitre comportera les résultats de nos recherches ;
- Le quatrième chapitre représentera la discussion de notre travail; et pour finir, une conclusion générale.

Première partie
Synthèse bibliographique

Chapitre 1

Partie bibliographique

Partie I. *Pseudomonas aeruginosa*

1. Généralités

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie pathogène opportuniste capable d'infecter un large spectre d'hôte : humains, souris, plantes, insectes, nématodes ou amibes. Chez l'homme, cette bactérie affecte particulièrement les personnes immunodéprimées, les grands brûlés et les patients en soins intensifs (Rossignol, 2007).

P. aeruginosa a été isolé pour la première fois en 1882 par Gessard. Il l'a appelé *Bacillus pyocyaneus*. C'est en 1862 que Luke a mis en œuvre l'implication de *P. aeruginosa* dans des infections chez l'homme. Il a observé des particules de forme circulaire dans un pus de coloration bleu-vert. La même coloration a été observée par Sedillot. C'est le pigment pyocyanique (la pyocyanine) produit par *P. aeruginosa* qui est à l'origine de cette coloration.

La pyocyanine est diffusible dans le milieu extracellulaire, d'où le nom du bacille pyocyanique (Chaker, 2012). Ce dernier est l'espèce type du genre *Pseudomonas*. Sa taxonomie est présentée dans le tableau 1 (Mderreg, 2015).

Tableau 1 : Taxonomie de *P. aeruginosa* (Mderreg, 2015)

Règne	Bacteria
Embranchement	Prokaryota
Division	Proteobacteria
Classe	Gammaproteobacteria
Ordre	Pseudomonadales
Famille	Pseudomonadaceae
Genre	<i>Pseudomonas</i>
Espèce	<i>Aeruginosa</i>

2. Habitat

P. aeruginosa est une bactérie ubiquitaire retrouvée dans l'environnement (Sefraoui, 2015). Qui vit normalement à l'état de saprophyte dans l'eau et le sol humide ou sur les végétaux. Et elle résiste mal à la dessiccation. Cette bactérie peut vivre en commensale dans le tube digestif de l'homme et de divers animaux (Solbi, 2013).

3. Caractères généraux

3.1. Caractères morphologiques

P. aeruginosa est un bacille fin sous forme de bâtonnet de 1 à 5 µm de longueur et 0,5 à 1 µm de largeur (Chaker, 2012). C'est une bactérie à Gram négatif non fermentatif (BGN-

NF), parfois entouré d'une pseudo-capsule appelée slime qui peut jouer un rôle important dans la pathogénicité de cette bactérie, il est très mobile grâce à une ciliature polaire en général monotriche. Il peut être cultivé facilement sur tous les milieux en aérobiose (température de 37°C ou 30 °C), il dégage une odeur aromatique caractéristique de seringa due à la production d'ortho amino-acétophénone (Solbi, 2013).

3.2. Caractères cultureux

Sur milieu solides, trois types de colonies peuvent être observés simultanément ou de manière isolée :

- Colonies large « la » de 2 à 3 mm de diamètre, à bord irrégulier, rugueuses avec une partie centrale bombée présentant des reflets métallique (Denis *et al.*, 2007).

- Colonies Small « S » : petites, mates, légèrement bombées avec un bord circulaire régulier. (Solbi, 2013).

-Colonies muqueuses « M » bombée, coalescentes, filantes rencontrées chez les souches produisant un slime composé d'un polymère d'alginate.

Pour les souches pigmentées (95 %), la simple constatation d'une pigmentation verte du fait de la production de deux pigments, la pyocyanine (hydrosoluble) et de la pyoverdine (soluble dans le chloroforme) établit le diagnostic (Denis *et al.*, 2007).

3.3. Caractères enzymatiques et biochimiques

P. aeruginosa est une bactérie possède : Indole -, urée -, TDA - (tryptophane-désaminase), H₂S -, gélatine +, ONPG - (Orthonitrophényl-galactose), Nitrateréductase +, LDC -, (Lysine-décarboxylase), ODC- (Ornithine-décarboxylase), ADH+ (Arginine-deshydrogénase) (Liazid, 2012).

4. Epidémiologie

P. aeruginosa est un commensal du tube digestif, peu abondant chez l'homme en bonne santé (2 à 10 % de porteurs), mais la proportion de porteurs asymptomatiques chez les patients hospitalisés (essentiellement des personnes immunodéprimées) peut atteindre 50% sur certains sites et 60 % sur les plaies de brûlures ou d'escarres. Ainsi, la principale source de contamination des patients hospitalisés est donc leur flore endogène mais l'environnement est également incriminé (Cholley, 2010). *P. aeruginosa* est responsable de 16 % des infections pulmonaires, de 12% des infections du tractus urinaires, de 8% des infections touchant les grands brûlés et de 10% des infections du sang (bactériémie et/ou septicémie). Cette bactérie est également une des causes majeures de mortalité et de morbidité chez les personnes atteintes de mucoviscidose (Liazid, 2012).

5. Pouvoir pathogène

- Facteur d'adhésion à la cible cellulaire (pili de type IV, LPS...).
- Facteur de protection : biofilm mucoïde.
- facteurs d'invasion :
 - sécrétion d'enzymes dans le milieu extérieure : protéase alcaline, exotoxines A ;
 - sécrétion dans le cytoplasme de la cellule cible par système de sécrétion de type III d'exotoxines qui entraînent l'apoptose.
- Quorum sensing : capacité de déclencher la sécrétion coordonnée de facteur de virulence lorsque la densité bactérienne est suffisante (Bianchi *et al.*, 2013).

Les infections pourront avoir une origine endogène ou exogène.

- Infection communautaire : principalement broncho-pneumopathie évoluant sur un mode chronique dans la mucoviscidose et les dilatations de bronches ; otite externe, endophtalmie après traumatisme, infection cutanée dans les ulcères.
- Infection nosocomiale : pneumopathie chez les malades sous respirateur, infection ostéarticulaire dur matériel, infection urinaire chez les malades sondés, infection cutanée secondaire à des brûlures, septicémie (Grosjean *et al.*, 2011).

Partie II. Les β -lactamines

1. Généralités

Les β -lactamines constituent la famille la plus fréquemment utilisée dans le monde, pour leur large spectre antibactérien, leur faible toxicité et le vaste choix de molécules disponibles. Les antibiotiques formant la famille des β -lactamines, sont utilisés pour le traitement d'environ 55 % de toutes les infections bactériennes, en raison de leur grande efficacité et au peu d'effets secondaires qui leur sont attribués, les β -lactamines ont un effet bactéricide sur les bactéries en voie de croissance. Il existe de nombreuses variétés de β -lactamines, ayant toutes en commun le cycle β -lactame (**fig. 01**) (Lagha, 2015).

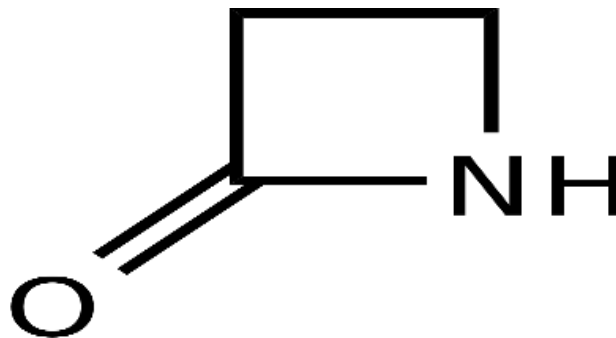


Figure 01. Le noyau β -lactame (Mesli, 2014)

1.1. Les pénicillines (noyau pénème)

Les pénicillines dont font partie la pénicilline G, la méticilline et les Isoxazolylpénicillines (oxacilline et cloxacilline), les amino-benzylpénicillines (ampicilline et Amoxicilline), les uréido-pénicillines (pipéracilline), les carboxypenicillines (ticarcilline) et les amidino-pénicillines (mécillinam) (Lagha, 2015).

1.2. Les céphalosporines

Les céphalosporines sont des dérivés de l'acide 7-amino-céphalosporanique, et elles se distinguent chimiquement des pénicillines par un cycle dihydrothiazine hexa-atomique à la place du cycle thiazolidine .Il y a quatre générations de céphalosporines, classées en fonction de leur date d'apparition, qui correspond à chaque fois à l'acquisition de nouvelles propriétés (Lagha, 2015).

1.2.1. Céphalosporines de première génération (C1G)

Ont un spectre d'action qui se limite aux cocci à Gram positif et à quelques bacilles à Gram négatif. Ces molécules sont, d'autre part, aisément dégradées par les β -lactamases. Il existait plus d'une dizaine de céphalosporines dites de première génération mais certaines ne sont plus commercialisées. Comme : Céfaclor, Céfadroxil, Céfalexine, Céfalogine, Céfatrizine, Céfazoline, Céfradine (Mesli, 2014).

1.2.2. Céphalosporines de deuxième génération (C2G)

Comprennent le céfuroxime, le céfamandole. Elles sont caractérisées par une meilleure résistance aux β -lactamases et un spectre d'action plus large, une activité à faible concentration et une bonne diffusion tissulaire (Mesli, 2014).

Les céphamycines ou 7-alpha-méthoxycéphèmes : les principales molécules sont la céfoxitine et le céfotétan qui sont rattachées, du fait de leurs propriétés, aux céphalosporines de deuxième génération. Elles sont caractérisées par un radical α -méthoxy en position 7. Ce radical protège le noyau β -lactame de l'hydrolyse par les β -lactamases, mais est responsable d'un effet inducteur intense sur les céphalosporinases chromosomiques (Mesli, 2014).

1.2.3. Céphalosporines de troisième génération(C 3G)

Elles comprennent entre autres le céfotaxime, le latamoxef, la céftriaxone, la ceftazidime, le céfménoxime et le céftizoxime. Quelques molécules proches des céphalosporines de troisième génération, présentent des avantages particuliers relatifs à leurs propriétés antibactériennes ou pharmacologiques : céfopérazone, céfatiam, céfotétan, cefsulodine, céfixime (Ramoul, 2014).

1.2.4. Céphalosporines de quatrième génération (C4G)

Ce sont des 7-méthoxyimino céphalosporines zwitterioniques, caractérisées par la présence d'un ammonium quaternaire en position C3. Elles montrent peu d'affinité pour les β -lactamases de classe I et pénètrent très rapidement au travers de la membrane extérieure des bacilles à Gram-négatif. Elles comprennent au moins une demi-douzaine de produits incluant cefpirome, céfépime, cefclidine, céfzoprane (Ramoul, 2014).

1.3. Les monobactames

Cette sous-classe de bêta-lactamine n'est composée que d'un seul agent commercialisé et réservé à la médecine humaine : l'aztréonam. Son spectre antibactérien se limite aux bacilles à Gram négatif et sa voie d'administration est parentérale du fait de sa très faible biodisponibilité par voie orale (inférieure à 1%) (Vasseur, 2014).

1.4. Les carbapénèmes

Cette sous-classe de bêta-lactamine possède, de par sa très forte affinité pour les PLP, le spectre antibactérien le plus large existant chez les bêta-lactamines. Celui-ci couvre la majorité des bactéries pathogènes à Gram positif et à Gram négatif. De plus, ces molécules possèdent une excellente résistance aux bêta-lactamases et seuls les métallo bêta-lactamases sont capables de les hydrolyser. Ces antibiotiques sont souvent utilisés en dernier recours et sont, de ce fait, réservés à la médecine humaine (Vasseur, 2014).

1.5. Inhibiteurs de bêta-lactamases

Ce sont des inhibiteurs suicides de bêta-lactamases qui associés avec une bêta-lactamine lui permettent de conserver son activité vis à vis des souches productrices de bêta-lactamases. Ils inhibent la majorité des bêta-lactamases. Ces molécules inhibitrices possèdent par ailleurs une activité antibactérienne, mais à des concentrations trop élevées, et non compatibles avec un usage thérapeutique (Bibbal, 2008).

2. Mode d'action des β -lactamines

Les β -lactamines agissent en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne par le biais d'une liaison à des cibles moléculaires spécifiques appelées les protéines liant les pénicillines (PLP). Le peptidoglycane est un polymère réticulé fait de chaînes polysaccharidiques reliées par des peptides. Ses précurseurs sont synthétisés dans le cytoplasme et assemblés à l'extérieur de la membrane cytoplasmique. Lorsque les bactéries sont en phase de croissance, il existe simultanément des phénomènes de synthèse et de destruction du peptidoglycane. L'équilibre entre ces deux phénomènes est rompu par les antibiotiques inhibant la synthèse du peptidoglycane. Le blocage de la phase finale de polymérisation représente le mode d'action des β -lactamines. Chez les bactéries à Gram négatif, les β -lactamines doivent traverser la

membrane externe pour atteindre leurs cibles. Cette membrane agit comme une barrière hydrophobe et les β lactamines, qui sont le plus souvent des molécules hydrophiles, vont traverser cette barrière essentiellement par la voie des porines.

Après avoir traversées la membrane externe des bactéries à Gram négatif, les β -lactamines diffusent facilement à travers le peptidoglycane, se trouvant ensuite dans l'espace périplasmique (Mesli, 2014).

Partie III. La résistance aux β -lactamines chez *P. aeruginosa*

1. Résistance naturelle

P. 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 la clavulanate. Cette résistance naturelle est due aussi à une mauvaise perméabilité membranaire. Il est donc naturellement résistant aux pénicillines des groupes V, G, M, et A, à la plus part des céphalosporines de troisième génération (Ramoul, 2014). *P. aeruginosa* est naturellement résistant à de nombreux antibiotiques : aminopénicillines, céphalosporines première et deuxième génération, céfixime, céfuroxime, céfotaxime, ceftriaxone, ertapénème, kanamycine, tétracyclines, chloramphénicol, triméthoprim (EUCAST, 2017) (Site web 2).

2. Résistance acquise

Les résistances acquises sont dues à une imperméabilité accrue de la membrane externe, une modification des porines, une altération des récepteurs aux antibiotiques et à la production d'enzymes inactivantes (Elmeskini, 2011). L'apparition de nouvelles résistances chez *P. aeruginosa* est fréquemment liée à l'acquisition de matériel génétique étranger (plasmide, transposon et intégron) récupéré d'autres bactéries à Gram négatif voire à Gram positif (gènes codant des méthylases de l'ARN 16S) (Mérens *et al.*, 2012).

2.1. Résistance non enzymatique

2.1.1. Perte de la porine OprD

Dans les bactéries à Gram négatif, les porines bactériennes sont une des voies principales d'entrée pour les antibiotiques usuels comme les β -lactamines et les fluoroquinolones. Cette protéine canalaire de la membrane externe possède un site spécifique de liaison aux carbapénèmes OprD (outer membrane proteinD), et permet la pénétration sélective de l'imipénème. Des modifications de la quantité absolue ou de l'état fonctionnel de ces porines ont pour conséquence une diminution de la diffusion des antibiotiques empruntant cette voie de pénétration (Bouguenoun, 2017). En effet, la résistance aux carbapénèmes résultant de la perte de la porine OprD nécessite la présence d'AmpC inductible ou déréprimée

de manière stable (Sefraoui, 2015). Chez *P. aeruginosa*, la modification de la protéine de membrane externe OprD reste le mécanisme le plus fréquent de résistance à l'imipénème. La résistance à l'imipénème est apparue juste après le début de l'utilisation clinique de cette molécule en 1987. Elle a été rapidement liée à l'absence d'une protéine de la membrane externe de 45~49 kiloDalton (kDa), l'OprD (Bouguenoun, 2017).

2.1.2. Pompe à efflux

Ce sont des systèmes complexes à trois composants qui permettent le rejet des molécules depuis l'espace périplasmique vers le milieu extérieur. Ces systèmes de pompes nécessitent la juxtaposition d'un transporteur (une protéine associée à la membrane cytoplasmique) et d'un canal localisé dans la membrane externe afin de permettre l'excrétion d'une molécule indésirable du cytoplasme vers le milieu extracellulaire en transitant par le périplasm (Sefraoui, 2015). Les bactéries utilisent les pompes à efflux comme mécanismes de défense et de détoxification vis-à-vis des composés toxiques de l'environnement. On considère que les pompes à efflux participent également à l'élimination des métabolites endogènes ou à la sécrétion de produits cellulaires (Aires, 2011).

2.2. Résistance enzymatique

2.2.1. Hyperproduction de céphalosporinase chromosomique de classe C

Des mutations dans le système de régulation de la production entraînent une production stable à haut niveau d'AmpC affectant l'activité de l'ensemble des β -lactamines à l'exception de celle des carbapénèmes. La régulation de l'expression de la β -lactamase AmpC fait intervenir les gènes *ampR*, *ampD*, *ampG*. Le gène *ampR* correspond notamment à un activateur transcriptionnel du gène *ampC* qui est inductible en présence de β -lactamines et qui est réprimé par la protéine codée par le gène *ampD*. Actuellement, la surproduction de céphalosporinases constitue le mécanisme de résistance à la ceftazidime le plus fréquemment retrouvé chez les souches cliniques de *P. aeruginosa* isolées dans divers pays de la Méditerranée (Bouguenoun, 2017).

2.2.2. Les bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu (BLSE)

Les β -lactamases à spectre élargi (BLSE) sont des enzymes hydrolysant la majorité des β -lactamines (Ruppé, 2011). Ce sont des enzymes plasmidiques, restaurée théoriquement par les inhibiteurs de β -lactamases, avec une sensibilité conservée à l'imipénème (Elmeskini, 2011). La production des BLSE par la souche *Pseudomonas* restent restreinte à ce jour. Cinq types de BLSE de classe A (TEM, SHV, PER, VEB et GES) ont été détectés chez *P. aeruginosa* (Ramoul, 2014).

Les BLSE appartiennent aux classes A ou D d'Ambler. Sont spécifiquement définies comme des β -lactamases capables d'hydrolyser les carboxypenicillines et les uréidopénicillines, mais aussi les céphalosporines à spectre étendu (ceftazidime, céfépime, cefpirome) et l'aztréonam et sont inhibées par l'inhibiteur des β -lactamases, l'acide clavulanique (Sefraoui, 2015).

2.2.3. Les carbapénémases

Les carbapénémases ce sont des métalloprotéines chromosomiques ou plasmidiques conférant une résistance aux carboxypénicillines, aux céphalosporines et à l'aztréonam, ainsi qu'un bas niveau de résistance à l'imipénème. Les carbapénémases sont redoutables car elles induisent une résistance de haut niveau à toutes les bétalactamines (Elmeskini, 2011).

2.2.3.1 .Carbapénémases de classe D (Oxacillinase)

Constituent un groupe hétérogène. Elles sont caractérisées par une hydrolyse plus rapide de l'oxacilline et de la cloxacilline que de la benzylpénicilline. Les oxacillinases classiques sont inhibées *in vitro* par le chlorure de sodium (Mesli, 2014).

Plus récemment, une nouvelle β -lactamases de Classe D à activité carbapénémase, l'OXA-198, a été rapportée en Belgique chez les souches de *P. aeruginosa* (El Garch *et al.*, 2011).

2.2.3.2 .Carbapénémases de classe B (métallo-béta-lactamases)

Sont des enzymes appartenant à la classe B d'Ambler (métallo-enzymes). Depuis l'apparition des enzymes IMP et VIM dans les années 90, les MBLs sont devenues les carbapénémases les plus répandues et les plus significatives chez *P. aeruginosa*. Ces enzymes possèdent dans leur site actif un cation indispensable à leur activité qui est invariablement le Zinc. En outre, l'activité de ces enzymes est inhibée par l'addition de chélateur d'ions bivalents (EDTA). Ce sont des métalloprotéines, chromosomiques ou plasmidiques, qui ont une activité catalytique beaucoup plus forte que les autres β -lactamases et hydrolysent toutes les β -lactamines sauf l'aztréonam. (Safraoui, 2015).

Chez *P. aeruginosa* les enzymes de classe B (carbapénémase) ont une activité beaucoup plus forte d'hydrolyser les β -lactamines. Les MBLs sont capables d'hydrolyser les β -lactames (y compris les carbapénèmes) sauf les Monobactame et Aztréonam (Ramoul, 2014).

Deuxième partie
Partie expérimentale

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

1. Lieu d'étude

Ce travail représente une étude sur des souches de *P. aeruginosa*, isolées des patients hospitalisés et non hospitalisés dans le laboratoire de microbiologie à l'hôpital El Hakim Saadan de Biskra - Algérie.

2. Echantillonnage

Notre étude est menée sur 32 souches de *P. aeruginosa*, qui ont été collectées à partir du premier octobre 2018 jusqu'à la fin de février 2019.

Les souches ont été isolées à partir de deux produits pathologiques (urine et pus) au laboratoire de bactériologie de l'hôpital El Hakim Saadan. Ainsi, des informations concernant chaque souche ont été recueillies de manière prospective : service d'hospitalisation du patient, type du prélèvement, la date, l'âge et le sexe du patient.

Les isolats ont été repiqués dans des tubes de gélose nutritive incliné et conservés à température 4°C au laboratoire de l'université.

3. Ré-isolement et caractérisation macroscopique

Ça consiste à faire l'ensemencement de quelques colonies prélevées à partir d'une culture de *P. aeruginosa* conservées, sur le milieu King B par la méthode des stries

Les boîtes sont conservées à 37 C° pendant 24 heures.

- **La lecture**

Les souches produisent une pigmentation jaune-verte (pyoverdine), diffusant dans toutes la boîte de Pétri. De plus, une odeur caractéristique de la fleur de «seringa» due à la production d'orthoamino- acétophénone, provient de ces cultures. La forme des colonies isolées sont de grande taille avec un aspect bombé au centre (colonies larges) et au contour irrégulier (Fig. 02) (Denis *et al.*, 2007).



Figure 02. Ré-isolément des isolats sur milieu King B

4. Identification

4.1. Examen microscopique

Les souches ont été caractérisées par des tests usuels de bactériologie qui sont principalement l'état frais et la coloration de Gram (Annexe.1).

4.2. Tests d'orientation et identification biochimiques

Après l'isolement et l'identification des caractères cultureux et microscopiques des isolats, l'identification a été estimée par des tests du métabolisme respiratoire et la galerie biochimique classique pour mettre en évidence les principaux caractères des *P. aeruginosa* (Tab.02).

Tableau02. Les tests d'orientation et identification biochimiques des souches isolées
(Bougattoucha et Boudella ,2010)

Tests	Milieux de Culture	Technique	Résultats
Test de l'oxydase		A l'aide d'une pipette Pasteur on dépose une colonie bactérienne sur un disque d'oxydase.	la colonie prend une teinte violette sur le disque : La bactérie possède une oxydase.

Test de Catalase		Sur une lame et à l'aide d'une pipette Pasteur, on dépose une colonie bactérienne à laquelle on ajoute l' H_2O_2 .	Apparition des bulles, dégagement gazeux de dioxygène : catalase positive.
Test Triple Sugar Iron(TSI)	Le milieu TSI	Ensemencement de culot par piquer centrale et la pente par des stries serrées à l'aide de la pipette Pasteur. Incubation à 37°C pendant 24h.	-culot rouge : glucose non fermenté. -pente inclinée rouge : lactose et saccharose non fermentés -Pas d'apparition de gaz dans le culot. -Pas de formation d'une coloration noire : pas de production hydrogène sulfuré (H_2S).
Test de citrate de Simmons	Le milieu citrate de Simmons	Ensemencement par des stries le long de la pente à l'aide de la pipette Pasteur, incubation à 37°C pendant 24h.	-Absence de culture et absence de virage de couleur : donc absence d'alcalinisation. La souche n'est pas capable d'utiliser le citrate comme seule source de carbone. Souche citrate de Simmons (-)
Test Mannitol mobilité et nitrate réductase	Le milieu mannitol mobilité	Ensemencement par pique centrale à l'aide d'une pipette Pasteur. Incubation à 37°C pendant 24h. Après l'incubation. Ajouter	-Absence de virage de couleur au jaune : absence d'acidification : Souche mannitol (-). - Culture dans toute la gélose et diffusion de la

		les réactifs nitrites 1 et nitrite 2 pour montrer la présence de nitrites.	culture à partir de la piqûre : bactérie mobile. -Absence de gaz et de production de N ₂ : nitrate réductase (-)
Test Rouge de Méthyle (RM) et Voges-Proskauer (VP)	Le milieu Clark et Lubs	Ensemencer le milieu Clark et Lubs avec quelques gouttes de suspension bactérienne de <i>P. aeruginosa</i> - Incuber à 37°C pendant 24 heures. -Après incubation, Transférer à l'aide d'une pipette Pasteur environ 0,5 ml de milieu Clark et Lubs dans un tube à vise. Ajouter 1 goutte de rouge de méthyle, pour le test RM. - Ajouter dans le premier tube du test, volume à volume les réactif VP1 et VP2 pour le test VP.	-Coloration rouge : fermentation du glucose par la voie des acides mixtes (production d'acides forts) : bactérie RM (+) -Pas d'apparition de coloration rouge : absence d'acétoïne et pas de fermentation du glucose par la voie butylène glycolique (pas de production d'acétoïne) donc souche VP (-).

5. L'étude de la résistance aux β - lactamines

5.1. L'antibiogramme

La sensibilité des isolats vis-à-vis des β - lactamines a été déterminée par la méthode de diffusion sur gélose Mueller Hinton (MH) selon la Recommandations du Comité de l'Antibiogramme du réseau algérien, surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques 2014. (Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale (CD ROM)) (Tab.03).

Des boîtes de gélose Mueller Hinton sont ensemencés par écouvillonnage à partir d'une suspension bactérienne comparé avec un étalon standardisé de 0.5 MC Farland selon l'EUCAST 2013, et les disques d'antibiotiques y sont déposés, puis incubées pendant 18 à

24h à 37°C. Les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse (Bouguenoun, 2017).

Les antibiotiques ont été testés sur une souche de référence « *Escherichia. coli* ATCC 25922 » pour confirmer l'activité des disques antibiotiques selon (CD ROM)

Tableau 03. Liste des antibiotiques testés sur *P. aeruginosa* (Comité de l'Antibiogramme du réseau algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques 2014 (CD ROM)) (Site web 3).

Antibiotique (les β -lactamines)	Abréviation	La charge (μg)	Diamètre (mm)		
			R	I	S
Ticarcilline	TIC	75 μg	≤ 15	16-23	≥ 24
Ticarcilline + acide Clavulanique	TCC	75/10 μg	≤ 15	16-23	≥ 24
Pipéracilline	PRL	100 μg	≤ 14	15-20	≥ 21
Céftazidime	CAZ	30 μg	≤ 14	15-17	≥ 18
Aztréonam	ATM	30 μg	≤ 15	16-21	≥ 22
Imipénème	IPM	10 μg	≤ 15	16-18	≥ 19
Céfépime	CPM	100 μg	<19	/	≥ 19

6. Détection phénotypique des mécanismes de résistance aux β -lactamines (β -lactamases)

6.1. Recherche de la production des β -lactamases à spectre étendu (BLSE)

6.1.1. Test de synergie

La démonstration phénotypique de la présence de β -lactamases à spectre élargie consiste à mettre en évidence une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de β -lactamases (Ticarcilline+ acide clavulanique (TCC)) et un disque de céphalosporine de 3^{ème} voir 4^{ème} génération (Céftazidime (CAZ), Céfépime (CPM)) et plus rarement monobactame (Aztréonam (ATM)).

- **Technique**

Appliquer sur une gélose Mueller Hinton, préalablementensemencée par la souche à tester, un disque de CAZ et un disque de TCC, et autre disque d'ATM et un disque de CPM, 1,5cm centre à centre. Incuber pendant 18 heures à 37°C (Philippon et Arlet, 2006).

- **Lecture**

Le test est positif s'il y a apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne visible entre le disque de TCC et les autres disques antibiotiques (Philippon et Arlet, 2006).

6.1.2. Test de double disque

L'image de synergie est quelques fois difficile à apparaitre, Ce test est basé sur la diminution des diamètres d'inhibition des C3G (Medboua, 2011).

- **Technique**

- On dépose un disque de Ticarcilline + acide clavulanique(TCC) avec un disque de Céftazidime(CAZ) à une distance de 30mm centre à centre.
- Laisser diffuser les antibiotiques pendant une heure, à la température ambiante (sur la paillasse).
- Après diffusion, on enlève le disque de TCC et le remplacer par un disque de CAZ. On incube la boîte à 37°C pendant 24 H (Medboua, 2011).

- **Lecture**

Le test du double disque est positif quand le diamètre d'inhibition du disque de C3G appliquée après diffusion du disque Ticarcilline + acide clavulanique (TCC) est supérieur ou égal à 5mm par rapport au diamètre d'inhibition du disque de C3G, ce qui indique une production d'une BLSE (Medboua, 2011).

6.2. Recherche phénotypique de la production des carbapénèmases

6.2.1. Test de Hodge modifié (MHT)

Ce test permet la mise en évidence d'une enzyme hydrolysant l'imipénème chez une souche résistante à cet antibiotique.

Ce test consiste à ensemencer en culture confluyente (à l'aide d'un écouvillon), une suspension à 0.5 Mc Farland de la souche *E. coli* ATCC 25922 sur une gélose Muller Hinton. Ensuite, un disque d'imipénème chargé à 10 µg est déposé au centre de la boîte. Les souches tests, suspectées de produire une carbapénèmases et les souches témoins (*K.pneumoniae* KPC+ pour témoin positif et témoin négatif (*d'Escherichia coli* ATCC 25922) sont ensemencées en strie depuis le disque vers le bord de la gélose sur une longueur d'au moins 20 mm.

La présence d'une distorsion de la zone d'inhibition autour du disque d'imipénème au contact de la souche testée est interprétée comme un résultat positif après incubation pendant 18 h à 37°C (Fig.03) (Rachidi, 2013).

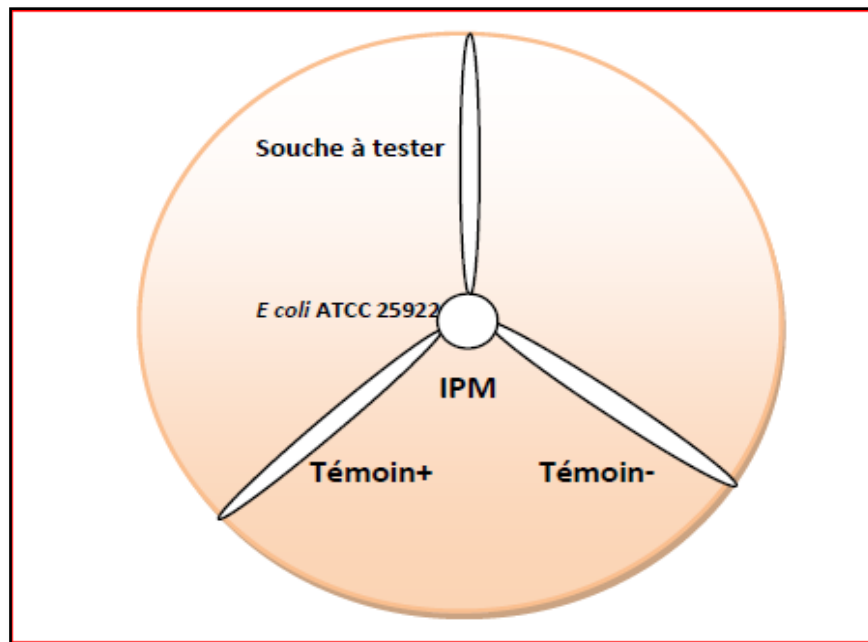


Figure 03. Schéma du test de Hodge (Drissi, 2008)

6.2.2. Détection de métallo- β -lactamases(M β L) par bandelette E-test

Les bandelettes E-test® MBL (AB BioMerieux, France) se composent de gradients IMP (4-256 g/ml) et IMP (1-64 g/ml) plus un niveau constant d'EDTA (IMP-EDTA). Le test est effectué en utilisant une procédure E-test standard, en déposant la bandelette sur une gélose Mueller-Hinton préalablement ensemencée par la souche à tester. Après incubation de 18 à 24 heures à 37°C, la production de M β L est indiquée par une réduction de la CMI de l'imipénème en présence d'EDTA (rapport CMI d'IMP / IMP+EDTA \geq 8) ou l'apparition d'une zone de synergie entre les sections IMP / IMP+EDTA (Fig.04) (Sefraoui, 2015).

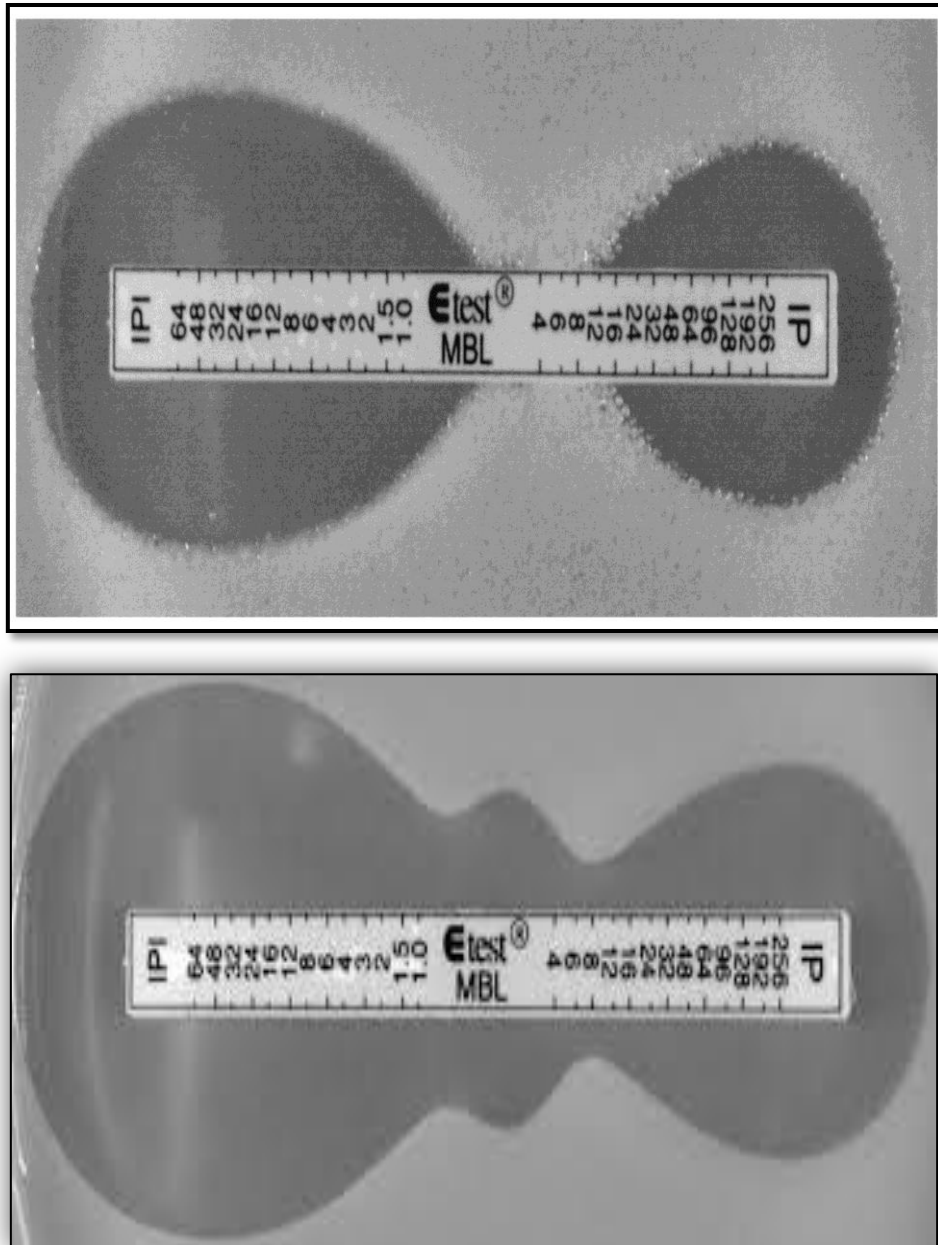


Figure04. E-test MBL (bioMerieux, 2011)

6.2.3. Détection des carbapénèmases par le Carba NP test modifié

Le Carba NP Test est une nouvelle technique biochimique de détection des carbapénèmases dont le principe repose sur la mise en évidence d'une acidification du milieu en cas d'hydrolyse de l'imipénème par les enzymes de type carbapénémase (Fig.05) (Bakour *et al.*, 2015).

➤ Réactifs

- Imipénème (Poudre pour solution injectable IV).
- Tampon de lyse : CetylTrimethyl Ammonium Bromide (CTAB) (Sigma-Aldrich).

- Rouge de Phénol en poudre (Sigma-Aldrich).

- ZnSO₄, 7 H₂O en poudre (Sigma-Aldrich).

- **La solution A** (solution contenant l'indicateur de pH) est préparée comme suit :

1- Préparer une solution concentrée de rouge de phénol 0.5% poids/volume ;

2- Mélanger 2ml de la solution concentrée de rouge de phénol dans 16.6ml d'eau distillée ;

3- Ajouter au mélange 180µl d'une solution de ZnSO₄ 10mM.

4- Ajuster le pH à 7.5-7.8 avec une solution de NaOH (1N).

- **La solution B**

1-Transférer 10 ml de Solution A dans un autre tube stérile ;

2-Ajouter 6mg/ml d'imipénème en poudre, et vortexer 1 à 2 sec.

Pour détecter la production d'une carbapénémase, on procède comme suit :

1- Dans un tube Eppendorf, mettre 200µl de tampon de lyse (CTAB 0.02 %) ;

2- Suspendre une dose calibrée (10µl) de colonies bactériennes (boucle d'anse de platine pleine) dans le tampon de lyse et vortexer 1 à 2 min ;

3- Transférer 100µl dans 2 tubes Eppendorf "A" et "B" ;

4- Ajouter 100µl de Solution A dans le tube Eppendorf "A" et 100µl de la Solution B dans le tube Eppendorf "B" ;

5- Vortexer 5 sec puis incubé à 37°C pendant au maximum de 2h.

La lecture visuelle est effectuée dans chaque tube Eppendorf dans les premier 30 min jusqu'à 2h maximum, et les résultats sont interprétés selon le tableau ci-dessous (Bakour *et al.*, 2015).

Tableau 04. Interprétation des résultats du Carba NP test modifié. (Bakour *et al.*, 2015).

Tube A	Tube B	Interprétation
Rouge	Rouge	Pas de production de Carbapénémase
Rouge	Orange/ Jaune	Production de Carbapénémase
Jaune	Jaune	Résultat non interprétable

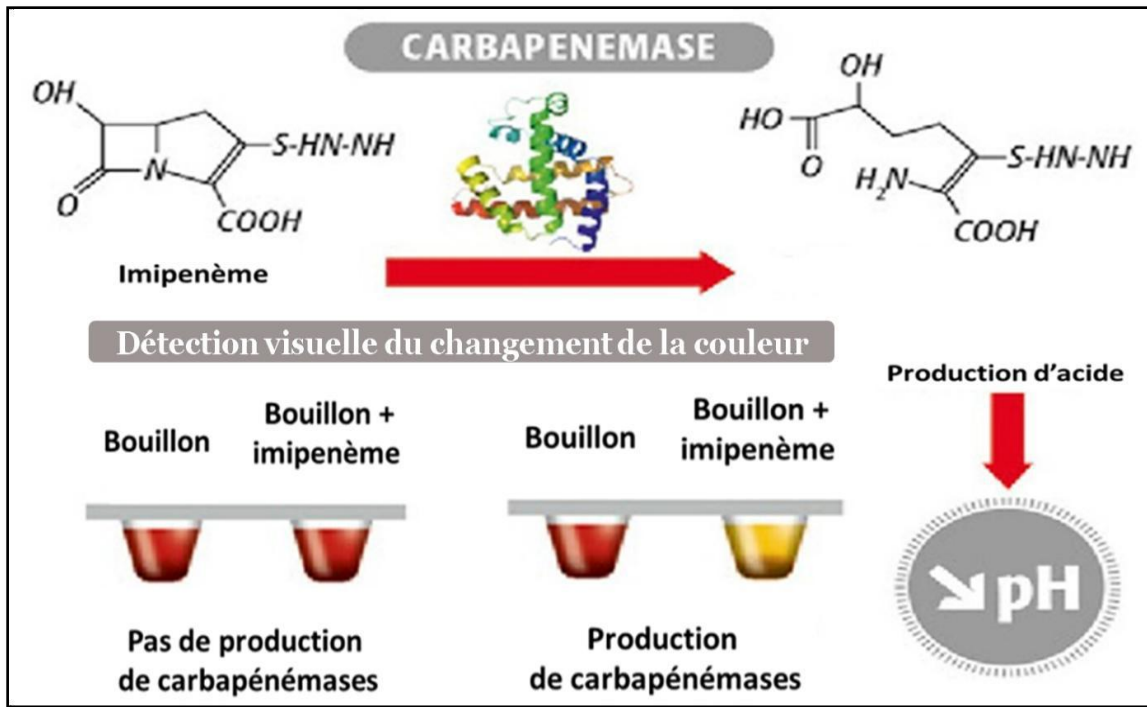


Figure 05. Le Carba NP test (Bouguenoun, 2017)

Chapitre 3

Résultats

1. Lieu d'étude et échantillonnage

Durant une période de cinq mois de récolte (du premier octobre jusqu'à la fin de Février 2019), 32 souches de *P. aeruginosa* ont été isolées au laboratoire de bactériologie de l'hôpital El Hakim Saadan-de la ville de Biskra, pour faire l'objectif de notre étude

2. Ré-isolement et caractérisation macroscopique

L'observation macroscopique des cultures est le premier examen effectué à partir de l'isolement, cette caractérisation des colonies bactérienne peut orienter le microbiologiste dans l'identification des souches bactériennes (Site web 1).

Après isolement et purification des 32 isolats sur le milieu King B, la totalité des isolats produit une pigmentation jaune-verte, diffusant dans toutes la boîte de Pétri. De plus, une odeur caractéristique de la fleur de « seringa » provient de ces cultures. La forme des colonies isolées sont de taille différente avec un aspect bombé au centre (colonies larges) et au contour irrégulier (Fig.06).



Figure 06. La morphologie des isolats sur milieu King B

3. Identification

3.1. Examen microscopique

L'examen microscopique des isolats à l'état frais a prouvé que les souches isolé sont des bacilles isolé et mobiles.

La coloration de Gram a montré que les 32 souches sont des Gram négatif, ils sont apparus sous forme des bacilles roses (Fig.07).

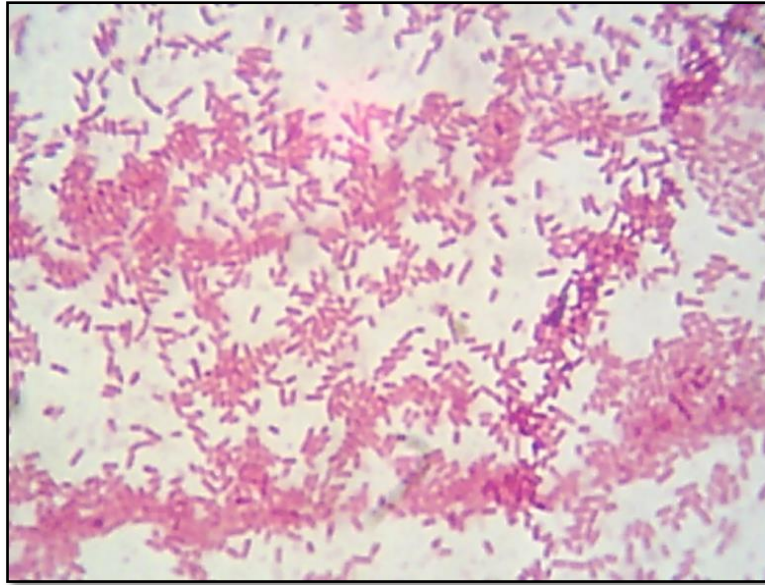


Figure 07. Observation microscopique par microscope optique grossissement x100

3.2. Tests d'orientation et identification biochimiques

3.2.1. Test d'oxydase

Nos souches ont une oxydase positive car la réaction d'oxydation se traduit par une coloration violette foncée (Fig.08).



Figure 08. Résultat positif de l'oxydase chez toutes les souches

3.2.2. Test de catalase

Le dégagement de bulles de gaz signifie qu'il y a une production de l'enzyme catalase et que le test est positif pour les 32 souches testées (Fig.09).



Figure 09. Résultat de test de la catalase

3.2.3. La galerie biochimique classique

La galerie biochimique nous a permis d'identifier quelques caractères biochimiques de *P. aeruginosa*. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 05 (Annexe 2).

Tableau 05 : Résultats finaux de la galerie biochimique classique obtenus pour les 32 souches étudiées de *P. aeruginosa*.

Les caractères biochimiques									
Mannitol mobilité (Rouge)			Citrate de Simmons (Vert)	Milieu Clark & Lubs (Jaune pâle)		Triple Sugar Iron (TSI) (Rouge orange)			
Manni- tol	Mobilité	Nitrate réductase		VP	RM	Glucose	Lactose	Gaz	H ₂ S
-	+	+	-	-	+	-	-	-	-

+: résultat positif , - : résultat négatif

Toutes les souches isolées ont présenté les mêmes caractères biochimiques.

4. L'origine des souches

Des informations concernant chaque souche ont été recueillies de manière prospective : service d'hospitalisation du patient, type du prélèvement, la date, l'âge et le sexe du patient (Tab.06).

Tableau 06 : Tableau de provenance des souches *P. aeruginosa* cliniquement isolées.

N° de souche	Date de prélèvement	Service/ Laboratoire (hospitalisé ou non)	type de prélèvement	Age	Sexe
P1	10/2018	Externe	Urine	3 ans	Homme
P2	10/2018	Pédiatrie	Urine	13ans	Femme
P3	10/2018	Pédiatrie	Urine	12ans	Femme
P4	10/2018	Pneumo- Phtisiologie	Pus (Pus plaie)	56 ans	Homme
P5	10/2018	Externe	Pus	2 ans	Homme
P6	10/2018	Externe	Urine	75 ans	Homme
P7	10/2018	Médecine interne	Urine	65 ans	Femme
P8	10/2018	Externe	Urine	60ans	Homme
P9	10/2018	Externe	Urine	18 ans	Femme
P10	10/2018	Urgence	Urine	52 ans	Femme
P11	10/2018	Urgence	Urine	48 ans	Homme
P12	10/2018	Urgence	Urine	60 ans	Homme
P13	11/2018	Médecine interne	Urine	30 ans	Homme
P14	11/2018	Urgence	Urine	62 ans	Homme

La suite du Tableau 06

P15	11/2018	Urgence	Urine	7ans	Femme
P16	11/2018	Externe	Urine	43 ans	Homme
P17	11/2018	Externe	Urine	72 ans	Homme
P18	11/2018	Médecine interne	Urine	30 ans	Homme
P19	11/2018	Pédiatrie	Urine	9 ans	Femme
P20	11/2018	Pédiatre	Pus	5 ans	Femme
P21	12/2018	Urgence	Urine	12 ans	Homme
P22	12/2018	Externe	Pus (Pus plaie)	28 ans	Femme
P23	12/2018	Externe	Pus (Pus plaie de diabétique)	80 ans	Femme
P24	12/2018	Externe	Pus (Pus brulure)	70 ans	Homme
P25	12/2018	Externe	Urine	55 ans	Homme
P26	12/2018	Externe	Urine	63 ans	Homme
P27	01/2019	Urgence	Urine	42 ans	Homme
P28	01/2019	Externe	Urine	55ans	Homme
P29	01/2019	Externe	Pus (Pus brulure)	68ans	Femme
P30	01/2019	Externe	Pus (Pus plaie)	30 ans	Homme
P31	02/2019	Externe	Urine	19 ans	Femme
P32	02/2019	Externe	Pus (Pus plaie)	24 ans	Homme

5. Répartition des isolats

5.1. La répartition des *P. aeruginosa* au cours du temps

Au cours des 05 mois d'étude, le taux des souches *P. aeruginosa* isolées a atteint un seuil élevé au mois d'Octobre (37.5%), alors que le taux le plus faible a été au mois de février (6.25%) avec une diminution continue au cours des mois d'étude (Fig.10).

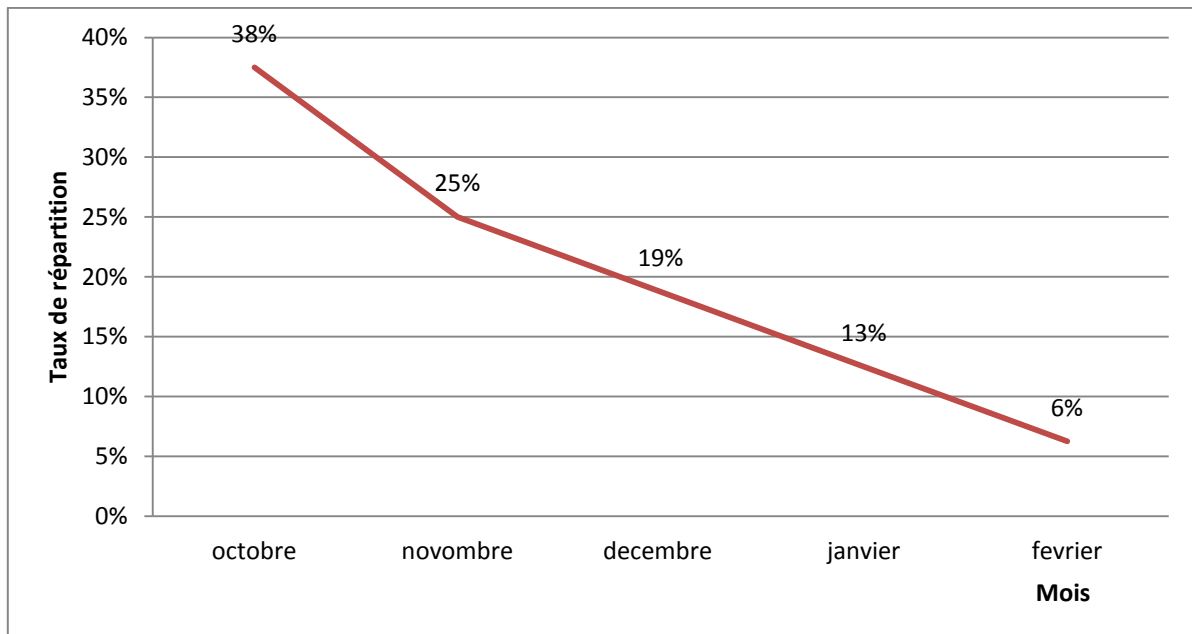


Figure 10. Taux des *P. aeruginosa* au cours du temps

5.2. La répartition des *P. aeruginosa* selon les services

Les patients non hospitalisés sont les plus incriminés dans notre étude par un taux de 53.12%, cependant, les patients admis dans le service des urgences ont été les plus infectés par *P. aeruginosa* avec un taux de 21.87% par rapport aux services de l'hôpital El Hakim Saadan : Pédiatrie, service de Médecine, Pneumo-phtisiologie, Cardiologie, Oncologie, Psychiatre (Fig.11).

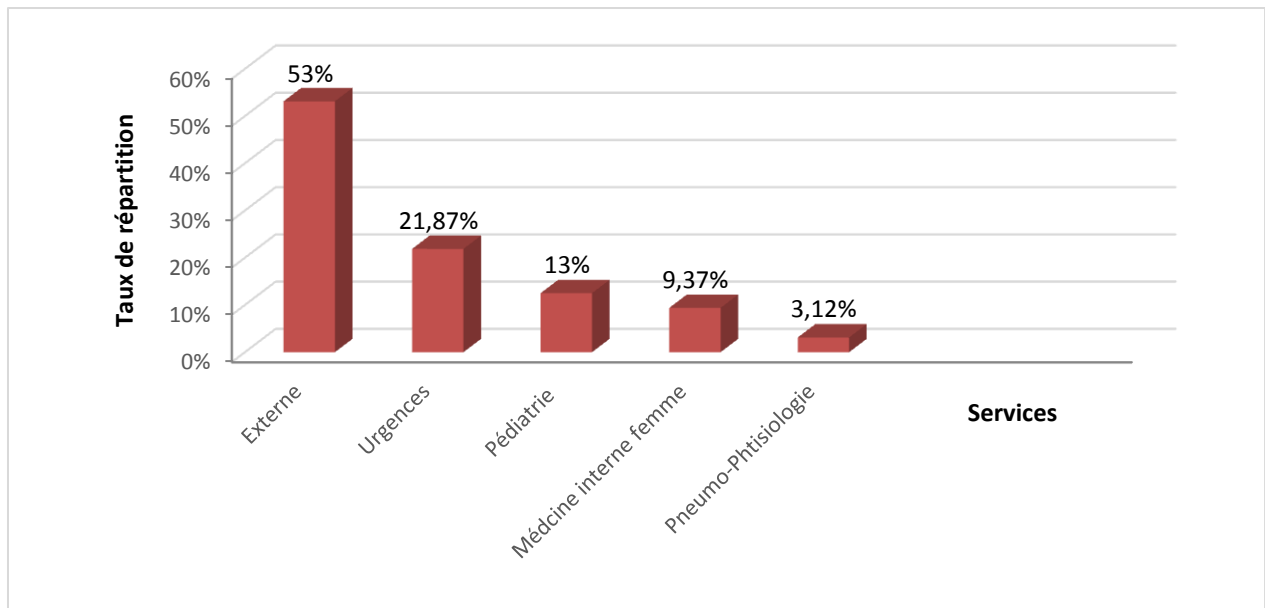


Figure 11. Répartition des *P. aeruginosa* selon les services

5.3. La répartition des *P. aeruginosa* selon le type de prélèvement

Parmi les 32 souches de *P. aeruginosa* qui ont été isolées à partir de deux (02) types de prélèvement, 71.87% (23 souches) ont été isolées à partir des urines (infections urinaires), par contre, 28.12% (09 souches) ont été isolées dans des prélèvements de pus (Fig. 12).

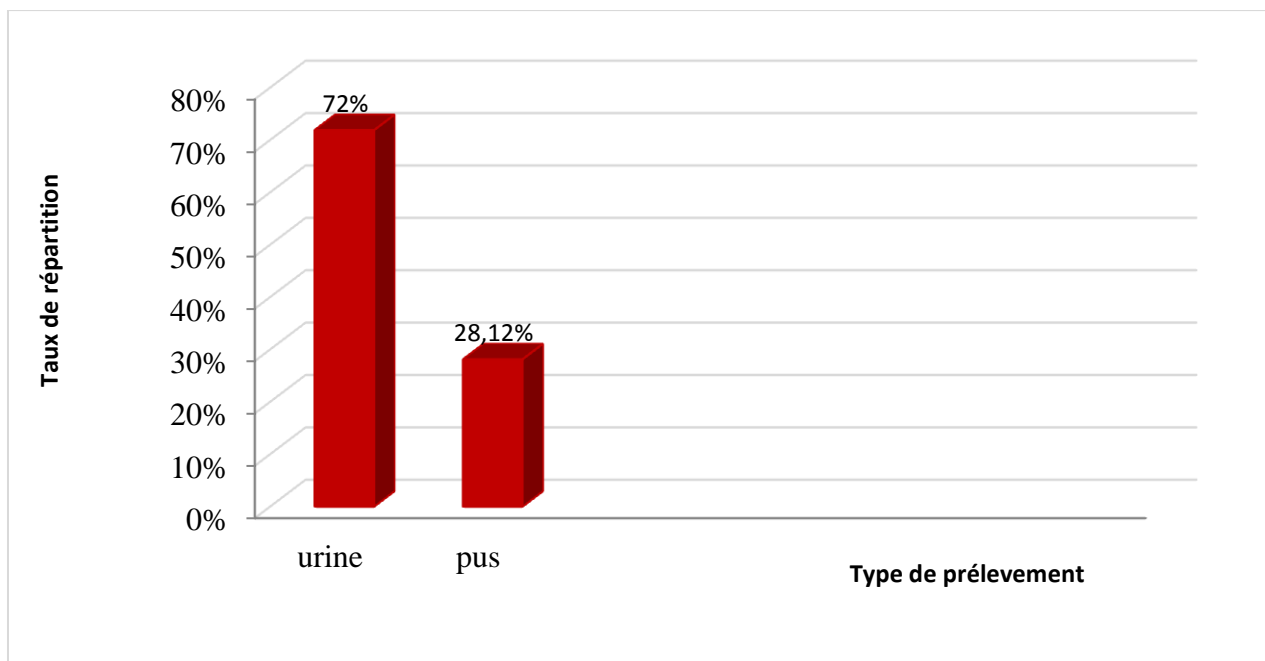


Figure 12. Répartition des *P. aeruginosa* selon leur type de prélèvement

5.4. La répartition des *P. aeruginosa* selon le sexe

Dans notre étude, le sexe masculin est dominant avec un taux 62.5 %, par rapport au sexe féminin 37.5 % (Fig.13).

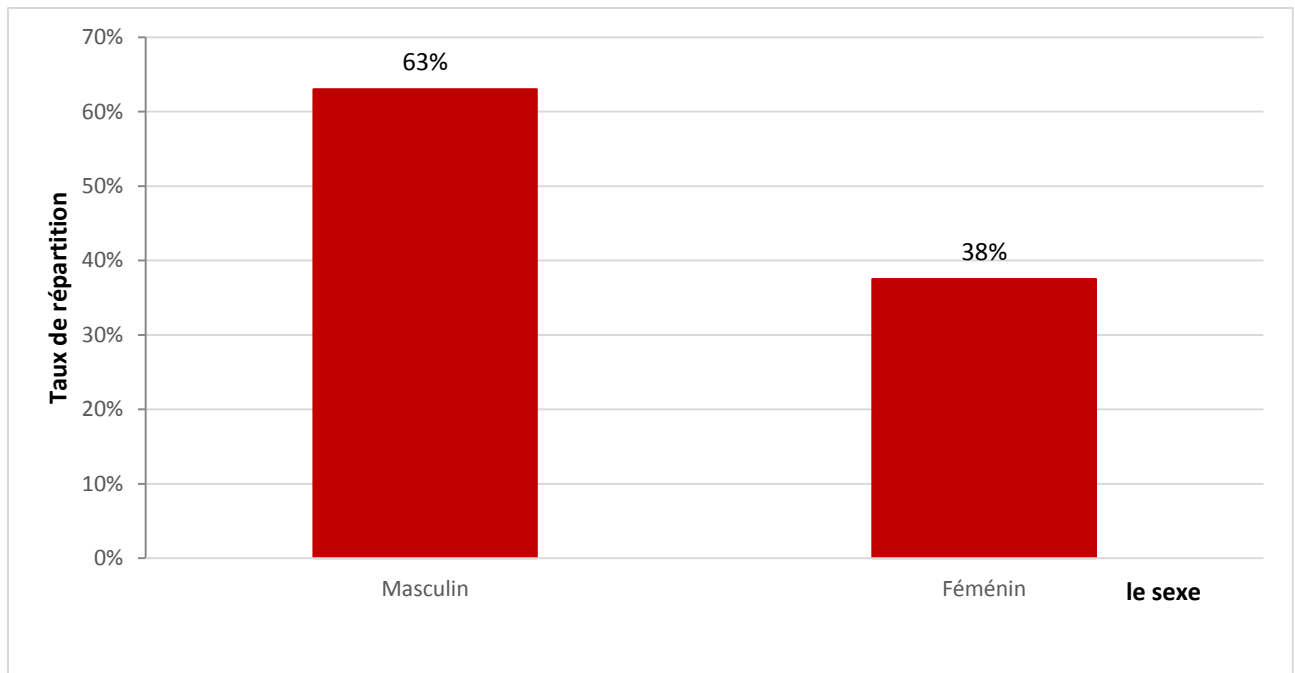


Figure 13. Répartition des *P. aeruginosa* selon le sexe

5.5. La répartition des *P. aeruginosa* selon l'âge

En ce qui concerne l'âge, toutes les tranches d'âge sont susceptibles aux infections par les *P. aeruginosa*. Dans notre étude, la catégorie la plus touchée est celle de ≥ 60 ans et de 40 à 58 ans, avec un taux de 31.25% et 21.87% respectivement (Fig.14).

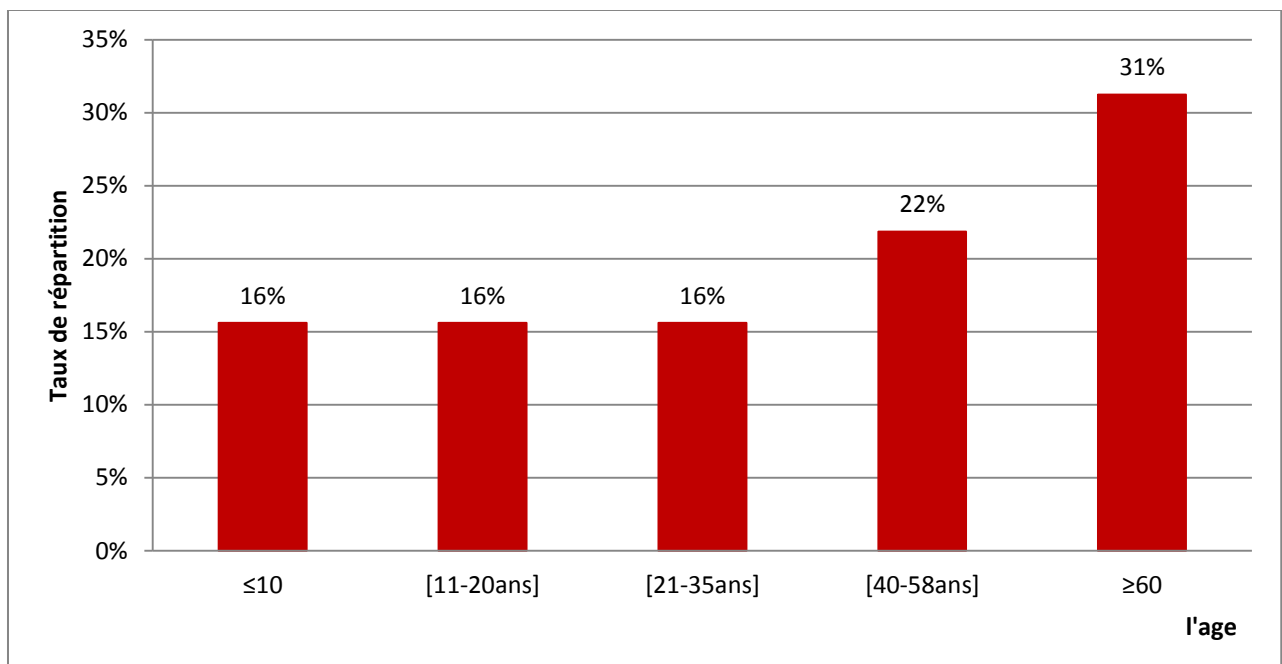


Figure 14. Répartition des *P. aeruginosa* selon l'âge

6. L'étude de la sensibilité aux β - lactamines

6.1. L'antibiogramme

Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaire correspondant à une absence de culture. Lorsque la technique est parfaitement standardisée, les diamètres des zones d'inhibition dépendent uniquement de la sensibilité du germe (Fig.15). La lecture de l'antibiogramme consiste à déduire à partir de la mesure de ces diamètres, le caractère sensible, résistant ou intermédiaire. Les résultats de l'antibiogramme réalisés sont résumés dans (Annexe 3).

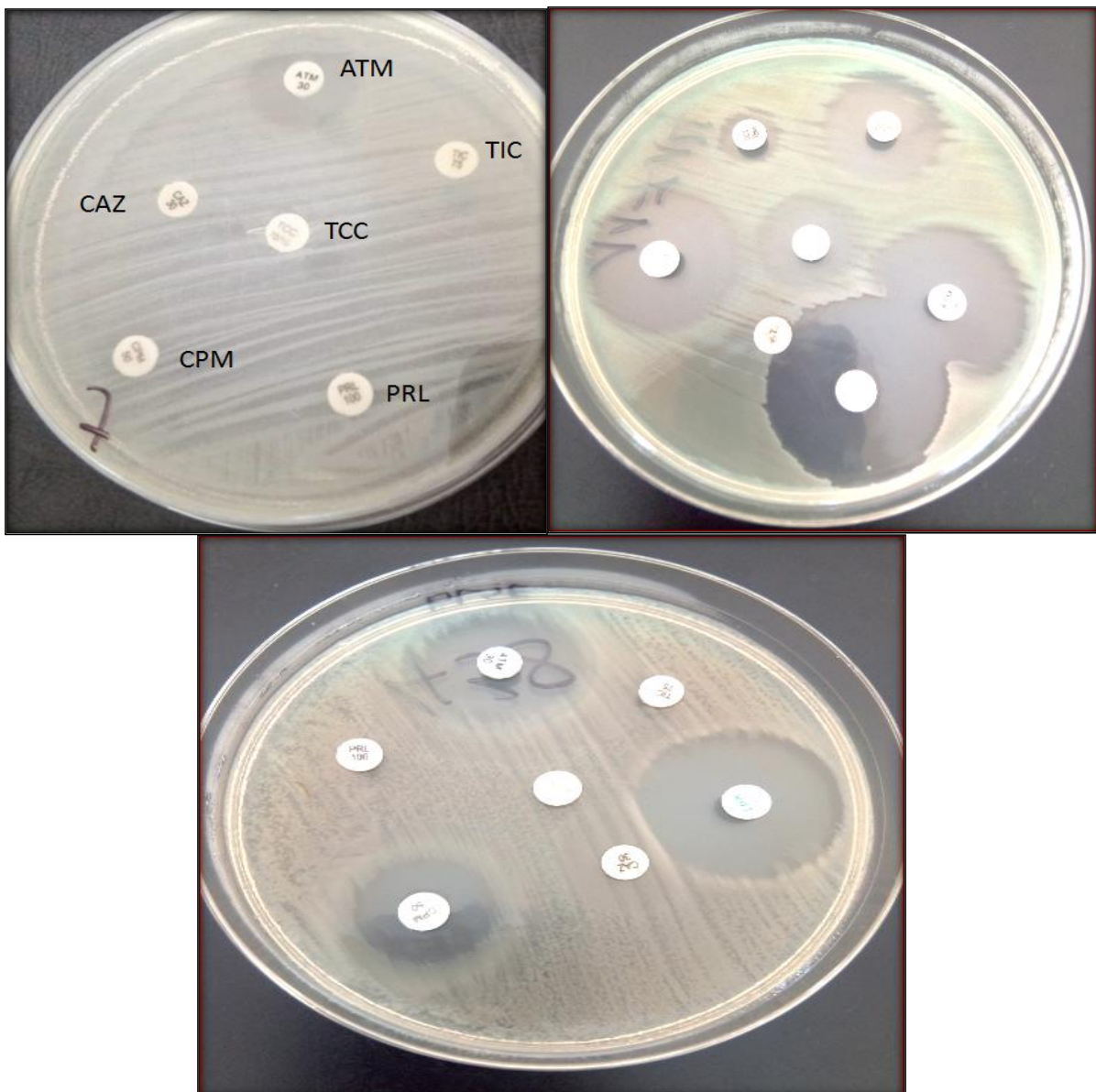


Figure 15. Exemple d'antibiogramme de *P. aeruginosa*

Selon l'antibiogramme qui a été réalisé sur les 32 souches, ont des phénotypes de résistance différents. Ticarcilline TIC (81% ; 26 souches), Ticarcilline + acide clavulanique

TCC (81% ; 26 souches), Pipéracilline PRL (78% ; 25 souches), Céfétazidime CAZ (88% ; 28 souches), Céfépime CPM (34% ; 11 souches), Aztréonam ATM (22% ; 7 souches) Imipénème IPM (22% ; 7 souches). *P. aeruginosa* a révélé un haut niveau de résistance aux β -lactamines, le taux de résistance et la sensibilité pour chaque antibiotique ont été calculés et représentés dans la figure 16.

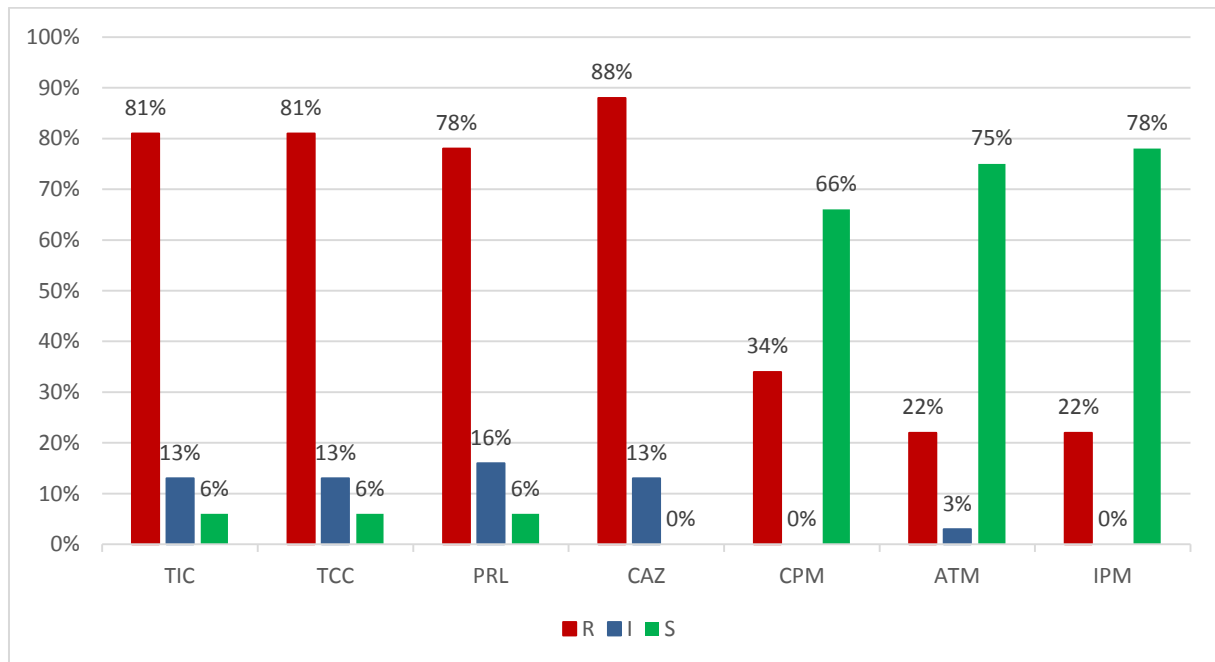


Figure 16. Profil de résistance aux β -lactamines des 32 souches de *P. aeruginosa*

TIC : Ticarcilline, **TCC** : Ticarcilline + acide Clavulanique, **PRL** : Pipéracilline, **CAZ** : Céfétazidime, **CPM** : Céfépime, **ATM** : Aztréonam, **IPM** : Imipénème

7. Détection phénotypique des β -lactamases

7.1. Recherche de la production des β -lactamases à spectre étendu (BLSE)

La recherche des enzymes BLSE a été systématique chez les 10 souches (P3, P14, P18, P20, P22, P23, P24, P27, P28, P29,) de *P. aeruginosa* résistantes ou ayant une sensibilité réduite à la Céfétazidime (CAZ).

7.1.1. Test de synergie

La recherche de BLSE, est réalisée grâce au test de synergie avec formation de l'image caractéristique en « bouchon de champagne » sur gélose de MH entre un disque Céfétazidime (CAZ) et un disque de Ticarcilline + acide clavulanique (TCC).

Aucune souche de *P. aeruginosa* n'a montré une image de synergie entre la TCC et la CAZ, l'ATM et CPM, traduisant ainsi l'absence de la production de BLSE (Fig.17).

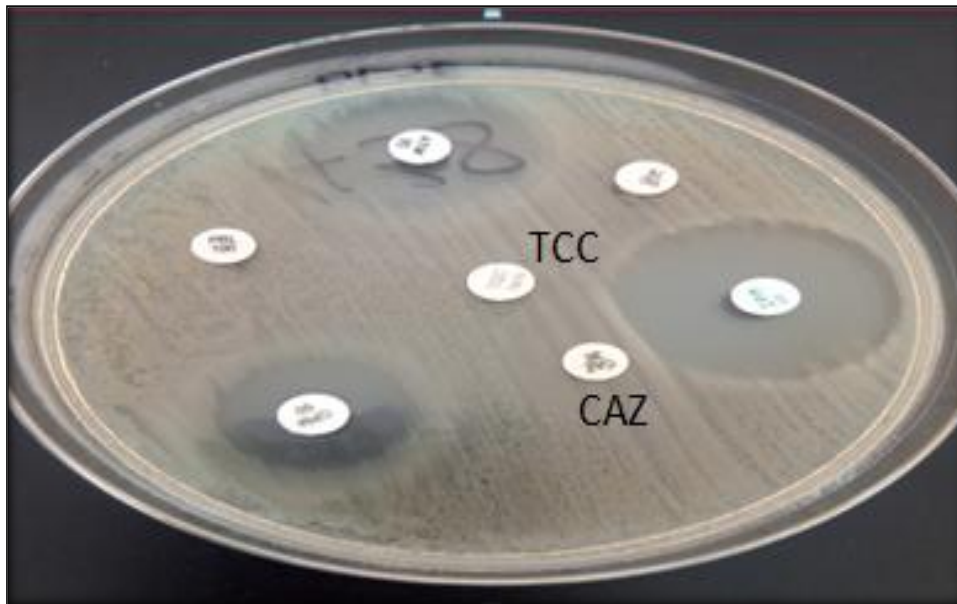


Figure 17. Test de synergie

7.1.2. Test de double disque

Le test du double disque est positif quand le diamètre d'inhibition du disque de C3G appliquée après diffusion du disque TCC est supérieur ou égal à 5mm par rapport au diamètre d'inhibition du disque de céphalosporine C3G.

On a réalisé le test sur les 10 souches de *P. aeruginosa*, dont la totalité a présenté un test négatif (Fig.18).

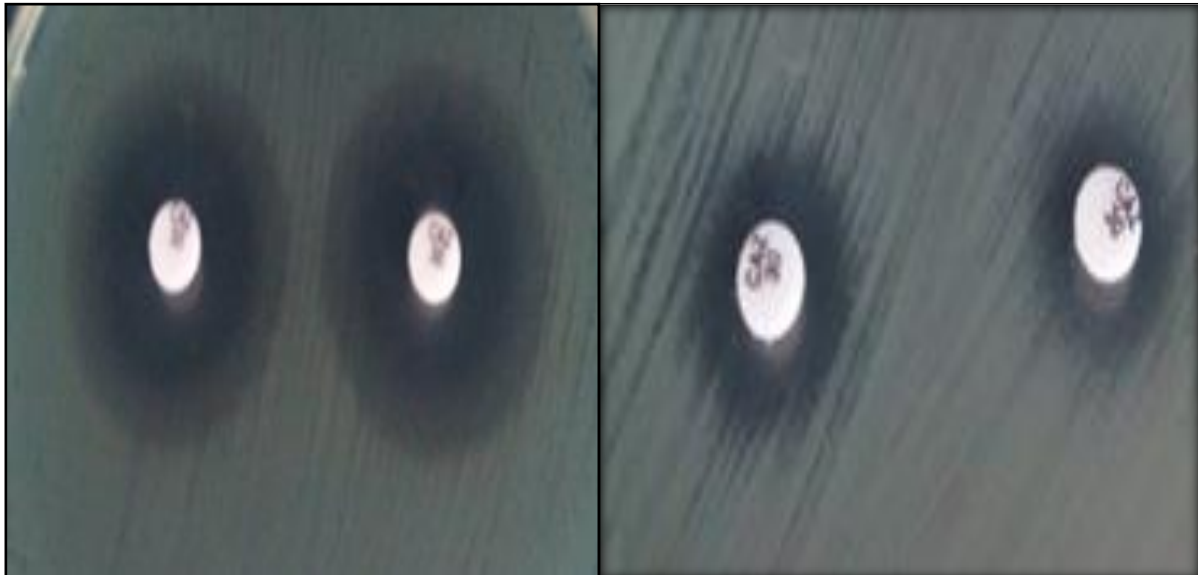


Figure18. Test de double disque

8. Recherche phénotypique de la production des carbapénèmases

La recherche d'enzymes ayant une activité de carbapénèmases a été systématique chez les souches résistantes ou de sensibilité réduite à l'imipénème.

8.1. Test de Hodge Modifié(MHT)

Parmi les 32 souches de *P.aeruginosa* isolées, 07 souches ont été résistantes à l'imipénème. L'MHT réalisés pour la détection de carbapénèmases a montré des résultats positifs pour les 06 souches IMP-R de *P.aeruginosa* (P16, P22, P23, P24, P28, P32), alors que le test était négatif pour la souche (P29) (Fig. 19).

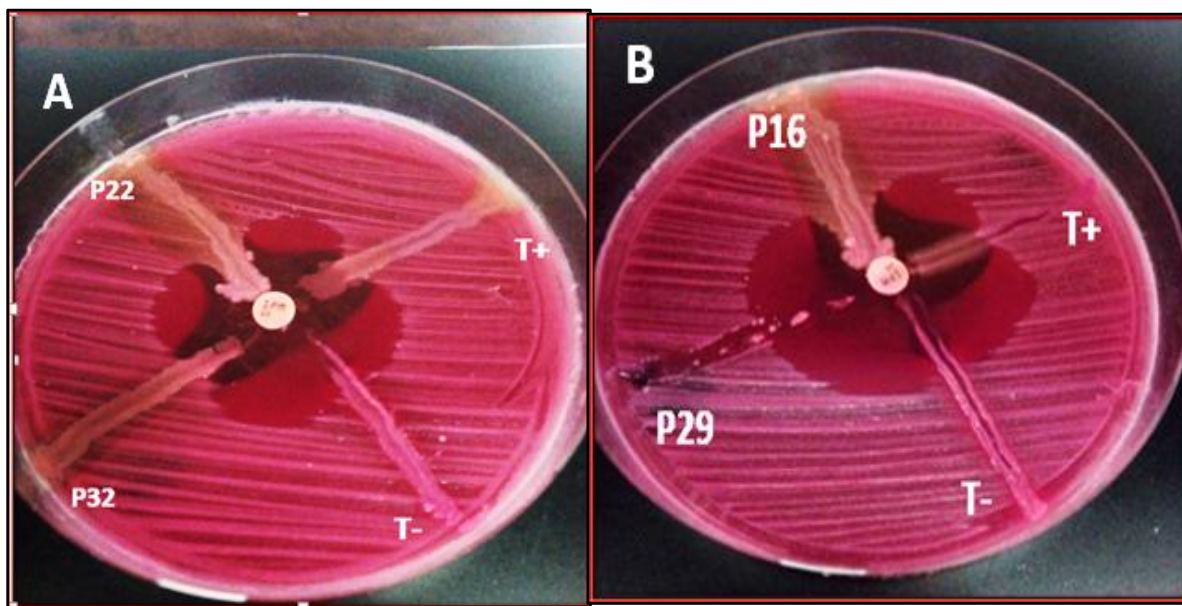


Figure 19. Résultat d'MHT pour les souches *P. aeruginosa*

A : Résultat d'MHT positif pour une souche de *P. aeruginosa*

B : Résultat d'MHT négatif pour la souche P29 de *P. aeruginosa*

8.2. Détection de métallob-lactamases (MBL) par bandelette E-test

La détection de MBL par bandelette E-test chez les souches IMP-R a révélé des résultats positifs chez 04 (P16, P22, P24, P32), suggérant ainsi la production des MBL (Fig.20).

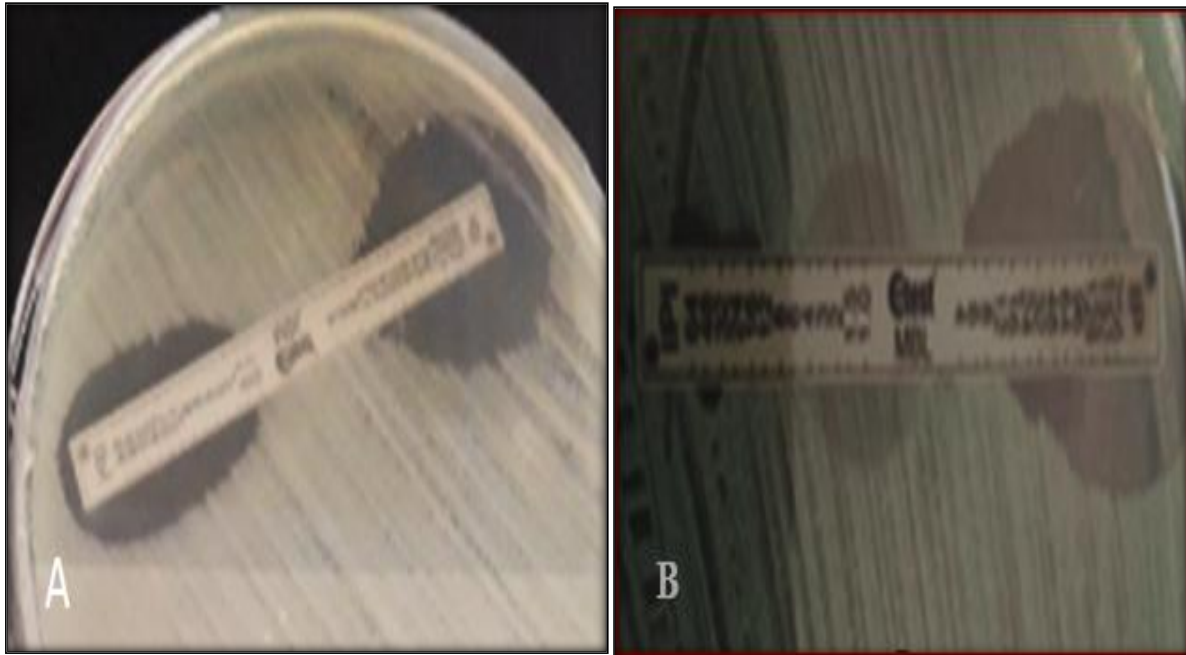


Figure 20. Résultats de détection de métallo- β -lactamases (M β L) par bandelette E-test

A : résultat négatif

B : résultat positif

8.3. Détection des carbapénèmases par le Carba NP test Modifié (MCNP)

A Partir des 07 souches de *P. aeruginosa* qui ont été soumis au Carba NP Test, cinq (05) souches (P16, P22 ; P24 ; P28 ; P32) ont présenté un test positif (Fig.21).

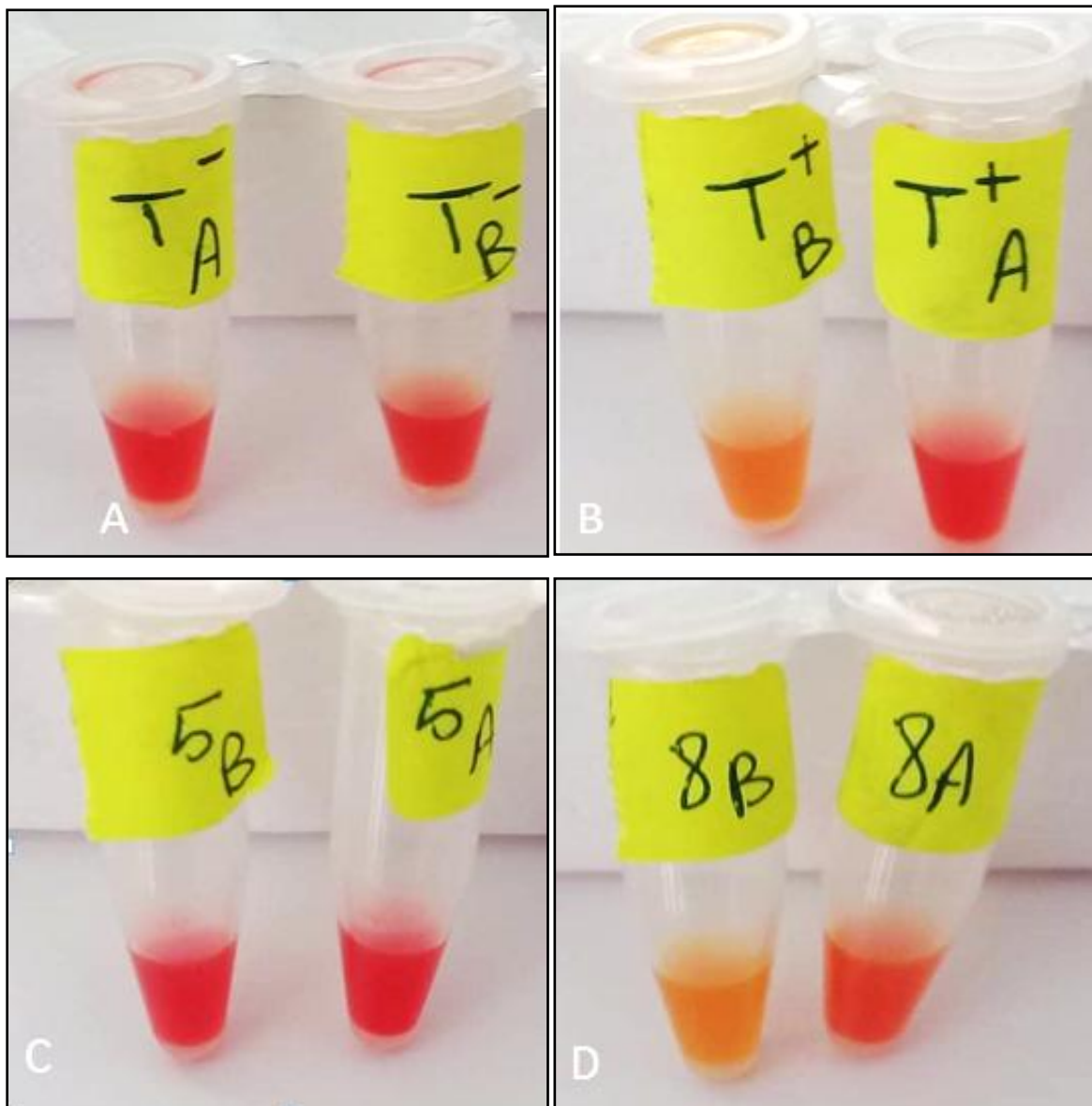


Figure 21. Les résultats de Carba NP test

A : témoin négatif

C : test négatif de Carba NP test

B : témoin positif

D : test positif de Carba NP test

Les résultats obtenus des trois (03) testes (Test de Hodge Modifié(MHT)), test de métallob- β -lactamases (MBL), Carba NP test modifié (MCNPT)) pour la recherche phénotypique de carbapénémase sont représentées dans le tableau 07.

Tableau07. Profile phénotypique des *P. aeruginosa*

	(MHT)	(MBL)	(MCNPT)
P16	+	+	+
P22	+	+	+
P23	+	-	-
P24	+	+	+
P28	+	-	+
P29	-	-	-
P32	+	+	+

Chapitre 4

Discussion

Discussion

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène ubiquitaire et opportuniste, fréquemment isolé chez les patients de réanimation, malgré les progrès thérapeutiques et les progrès réalisés en matière d'hygiène. Les infections qu'il provoque sont souvent sévères et de pronostic péjoratif (Aouraghe, 2016).

De ce fait, nous avons étudié un collectif de 32 souches de *P. aeruginosa* isolées au niveau du laboratoire de microbiologie à l'hôpital El Hakim Saadan de la ville de Biskra. Cette étude est réalisée afin d'évaluer l'émergence des souches *P. aeruginosa* et leurs taux résistance aux antibiotiques (β -lactamines) dans la ville de Biskra.

Dans notre étude, les infections urinaires à *P. aeruginosa* sont les plus fréquentes par rapport aux infections des plaies postopératoires, plaies des diabétiques et des plaies des brûlés (prélèvement de pus), avec un taux de 71.87%. Ceci est comparable à ce qui a été retrouvé à Guelma (2017) (Est algérien) et en France (Bouguenoun, 2017 ; Biquand, 2017). Le sondage à demeure et les manœuvres urinaires sont responsables de 80 % des infections urinaires nosocomiales. Le cathétérisme du tractus urinaire est le facteur le plus retrouvé parmi les causes d'infections. *P. aeruginosa* est le troisième pathogène le plus commun dans les infections urinaires liées au cathétérisme à l'hôpital (Biquand, 2017).

La bactérie semble être parmi les plus adhérentes des pathogènes urinaires à l'épithélium de la vessie. En outre, *P. aeruginosa* peut envahir la circulation sanguine au niveau du tractus urinaire (Elmeskini, 2011).

L'étude de la répartition de nos isolats dans les services a montré que les patients non hospitalisés (externes) sont les plus incriminés dans notre étude avec un taux de 53.12 %. Ceci peut revenir à l'absence d'un service de long séjour d'hospitalisation à l'hôpital El Hakim Saadan ou un service de réanimation qui est le plus impliqué dans beaucoup d'études sur *P. aeruginosa* en Algérie (Touati *et al.*, 2013) et dans le monde (Montalegre, 2016 ; Barbier et Wolff, 2010).

Il convient également à signaler que le laboratoire de bactériologie de l'hôpital de notre étude reçoit des prélèvements des patients de d'autres secteurs hospitaliers de la ville de Biskra (privé ou étatique) à cause d'absence des laboratoires de bactériologie dans ces derniers. En revanche, les malades hospitalisés dans ces hôpitaux sont considéré comme externe.

Nos résultats sont comparables à ce qui a été retrouvé dans l'étude de Nyaledome (2016) au Maroc, dont plus de la moitié des isolats de *P. aeruginosa* soit 56% d'isolats sont

issus de la consultation externe, qui pourrait être expliquée par un portage, une hospitalisation antérieure des patients ou par une utilisation abusive et inappropriée des antibiotiques en ambulatoire. Ce sont autant de raisons qui pourront justifier ce taux important d'isolats en provenance de patients externes (Nyaledome, 2016).

En ce qui concerne la répartition des infections à *P. aeruginosa* selon le sexe des patients, nous avons constaté que le sexe masculin est prédominant par rapport au sexe féminin. Au total, 32 patients ont été infecté par *P. aeruginosa*, 20 parmi eux ont été du sexe masculin (62.5%). Ces résultats sont en corrélation avec les données de la littérature au Maroc (Bah *et al.*, 2015 ; Aouraghe, 2016).qui présentent une prédominance masculine avec un taux de 76,7 %, et en 2015 avec 82% (Bah *et al.*, 2015).

Dans notre étude, le facteur d'âge a révélé un taux de 31.25% pour la catégorie de plus ou égale 60 ans. C'est la catégorie des personnes âgées qui est la plus touchée par *P. aeruginosa*, ceci peut-être, à cause d'immuno-sénescence, le déclin du système immunitaire et la prévalence très élevée de comorbidités (Bouguenoun, 2017).Nos résultats sont comparables à ce qui a été retrouvé dans l'étude de Gougeon (2017) au France. Alors que nos résultats ne concordent pas avec ceux retrouvés en 2017 à Annaba (Algérie) par Meradji.

Au cours des 05 mois d'étude le taux de souches *P. aeruginosa* isolées atteint a un seuil élevé au mois d'Octobre (37.5%) puis, on a constaté qu'il y a eu une diminution des infections par *P. aeruginosa* au cours du temps en arrivant à un taux de 6.25% en mois de Février. Dans le contexte de l'influence des variations saisonnières sur la fréquence des infections à pyocyanique, Nyaledome a montré selon les résultats de son étude au Maroc qu'il n'y a pas de corrélation entre les saisons de l'année et les infections. Dont au cours des trois années d'étude, le nombre des infections au pyocyanique était aléatoire en fonction des mois. Ainsi les pics durant ces trois années étaient enregistrés successivement en Janvier de la première période, en Avril de la seconde période et en juillet de la troisième période. Dans la littérature, il est à noter la rareté d'informations concernant l'influence des saisons sur les infections pyocyaniques. Toutefois, le taux des infections à *P. aeruginosa* subissent l'influence des conditions climatiques comme l'humidité saisonnière (Nyaledome, 2016).

Le premier fait marquant de notre étude est le taux de résistance élevé de *P. aeruginosa* aux β -lactamines testés ainsi que la diversité de phénotypes de résistance.

Les taux de la résistance de nos isolats vis-à-vis la Ticarcilline, la Ticarcilline + acide Clavulanique, la Pipéracilline ont été de 81%, 81%, et 78% respectivement. Ces résultats ne concordent pas avec l'étude réalisée à Tlemcen par Sefraoui (2015) dont les taux des mêmes antibiotiques étaient respectivement : 60,8%, 24,1%, 36,7% (Sefraoui, 2015).

Les taux de résistance de non isolats vis-à-vis la C3G et la C4G «Céftazidime et Céfépime » ont été de 88%, 34% respectivement. Ces résultats ne concordent pas avec l'étude réalisée par Liazid (2012) qui a rapporté les taux (7.14% et 32.14 %) (Liazid, 2012).

D'autre part, le taux de résistance d'imipénème a été de 22 %, ce résultat est en corrélation avec les études à Tlemcen (ouest Algérie) qui ont rapporté un taux de 18% (Sefraoui et *al.*, 2014) ; et concorde également avec une étude en Europe où le taux de résistance des souches de *P. aeruginosa* à l'imipénème était 17.1% (Thibault, 2011).

En ce qui concerne la recherche phénotypique des mécanismes de résistance aux β -lactamines dans ce travail, aucune souche de *P. aeruginosa* n'a montré un test de synergie et double disques positif d'où 0% ayant présentés un phénotype BLSE. Nos résultats concordent avec ceux retrouvés dans des études qui ont été mené en Algérie (Medboua, 2011 ; Bouguenoun *et al.*, 2016 ; Bouguenoun, 2017).

On déduit que sa peut être dues à l'hyperproduction de la céphalosporinase AmpC, un mécanisme non enzymatique.

En revanche, les tests phénotypiques qui visaient la recherche de la production des carbapénèmases chez les 07 souches IMP-R de *P. aeruginosa* isolées ont révélé d'après le MHT, que 06 souches sont productrices de carbapénèmases alors que d'après le test MCNPT, 05 souches ont présenté un résultat positif. Ces résultats sont expliqués par Tokandji (2017) qui ont déduit que le Carba NP test donne de meilleurs résultats. Aussi bien les valeurs de la sensibilité du Carba NP test sont supérieures à celles du test de Hodge modifié. Dont un résultat positif au test de Hodge modifié signifie une probabilité élevée de production de carbapénémase chez la bactérie, et le résultat négatif traduit une probabilité moyenne que la bactérie en question ne produise pas de carbapénémase (Tokandji, 2017). En plus du manque de spécificité (nombreux faux positifs) mais également de sensibilité (faux négatifs fréquents avec certains types d'enzyme, et en particulier les carbapénèmases de type NDM (Poirel *et al.*, 2013).

On pourra suggérer la présence d'une enzyme Oxacillinase ou métallo- β -lactamases chez les souches ayant présenté un MHT et MCNPT positifs.

D'un autre côté, le test phénotypique spécifique, E-test- M β L pour la recherche de métallo- β -lactamases, a montré que 04 souches sont productrices de M β L acquise à activité carbapénémase. Nos résultats sont comparables à ce qui a été trouvé en Annaba (2017) par Meradji (Meradji, 2017).

En revanche, une souche IMP-R a présenté un MHT et MCNPT positif mais un E-test M β L négatif, on peut déduire que la carbapénémase dans ce cas doit être une Oxacillinase.

En ce qui concerne la souche IMP-R (P29) qui n'a présenté aucun test positif, en plus de la souche ayant présenté seulement un MHT + contrairement aux autres tests (faux positif), on peut s'orienter vers un mécanisme de résistance non enzymatique, due probablement à l'imperméabilité en raison de la perte ou de l'altération de l'OprD comme le montrait l'étude de Bouguenoun (2017) où la totalité des souches IMP-R ont montré ce mécanisme de résistance. (Bouguenoun, 2017) Autres mécanismes de résistance peuvent être la cause, dont on cite l'activation de la pompe à efflux ou la perte de porine membranaire. Et une troisième souche IMP-R a présenté un MHT positif, alors que MCNPT et un E-test M β L négatif, la carbapénémase dans ce cas doit être une OprD ou un mécanisme de résistance non enzymatique.

De ce fait, l'enjeu est de reconnaître qu'un isolat producteur de BLSE ou de carbapénémases, peut être source des épidémies localisées, dont recours à des tests phénotypiques est facile à mettre en œuvre et est indispensable. A défaut, l'isolat doit être confié à un autre laboratoire pour la réalisation de ces tests complémentaires (Mérens *et al.*, 2012).

Devant le problème qui a été marqué concernant la résistance très élevée des *P. aeruginosa* aux β -lactamines, il faut signaler que ce problème pourrait être la conjonction d'infrastructures hospitalières inadaptées, rendant difficile l'application des règles d'hygiène et la consommation large d'antibiotiques à des doses probablement sous optimales (Nyaledome, 2016).

Conclusion
et
Perspectives

Conclusion et perspectives

P. aeruginosa, cette bactérie pathogène est caractérisée par son fort potentiel d'adaptation au milieu environnemental et hospitalier. Ce caractère redoutable est dû en grande partie, au pouvoir toxique de ces agents infectieux et à leur grande capacité de résistance aux antibiotiques.

L'objectif visé par ce travail est l'étude de l'émergence des *P. aeruginosa* résistants aux β -lactamines et l'étude phénotypique des mécanismes de résistance de ces isolats. Pour cela, nous avons fait une étude sur des souches cliniques de *P. aeruginosa* isolées à l'hôpital El Hakim Sadaan de la ville de Biskra, durant une période de cinq mois de récolte (du premier octobre jusqu'à la fin de Février 2019).

L'analyse biochimique a montré que cette bactérie est de Gram -, mobile, d'oxydase+, Catalase +, Lactose-, Saccharose-, Glucose-, H₂S-, Gaz-, Citrate-, Mannitol-, RM+, VP-, Nitrate réductase +.

Dans notre étude, nos isolats ont montré un profil de résistance inquiétant, dont les taux de résistance ont été comme suite : la Ticarcilline (81%), Ticarcilline + acide Clavulanique (81%), Pipéracilline (78%), Céfotaxime (88%), Céfépime (34%), Aztréonam (22%), Imipénème (22%).

D'un autre côté, la recherche des mécanismes de résistance des *P. aeruginosa* vis-à-vis des β -lactamines a montré qu'aucune souche n'est productrice de BLSE (0%) selon le test de synergie et de doubles disques. En revanche, 06 souches sont productrices de carbapénèmases selon le test de Hodge modifié alors que seulement 05 souches sont d'après le Carba NP test modifié. Nous avons trouvé aussi que 04 souches sont productrices de M β L.

De ce fait, les résultats que nous avons enregistrés, dans cette période d'étude, indiquent que la résistance des *P. aeruginosa* vis-à-vis des β -lactamines est très élevée dans la ville de Biskra. Ceci résulte de l'usage abusif des antibiotiques qui conduit à exercer une pression sur les bactéries, qui développent de la résistance par plusieurs mécanismes et donc le développement de nouvelles stratégies d'adaptation aux antibiotiques.

En perspectives de ce travail, il serait intéressant de :

- Poursuivre l'étude de l'émergence des souches *P. aeruginosa* dans la ville de Biskra pendant une période considérable ;
- Tester la résistance des isolats vis-à-vis d'autres familles d'antibiotiques ;
- D'identifier les supports génétiques de la résistance aux β -lactamines des *P. aeruginosa* résistantes aux carbapénèmes.

Bibliographie

Bibliographie

A

- 1- Aires J. 2011. Les systèmes d'efflux actifs bactériens : caractérisation et modélisation pour quelles perspectives. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*. (3) : 267.
- 2- Aouraghe S. 2016. Les infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa* au service de réanimation A1 (à-propos 30 cas). Thèse de Doctorat, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Maroc, 126 p.

B

- 3- Bah A., Bassinga J. Y. S., Ouzaa M. R., Ouedraogo S. M. L. Amarir M., Bennis A., Jaafar A. 2015. Pied diabétique en orthopédie : analyse et évaluation de nos résultats. *Médecine et Chirurgie du Pied*, 31(1), 32-37.
- 4- Bakour S., Garcia V., Loucif L., Brunel J. M., Gharout-Sait A., Touati A., Rolain J.M. 2015. Rapid identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* using Carba NP test. *New Microbes and New Infect.* 7: 89-93
- 5- Barbier F., Wolff M. 2010. Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa*. *Médecine/sciences*, 26(11), 960–968.
- 6- Bianchi V., El anbassi S., Duployez N. 2013. Bactériologie Virologie. Édition de boeck, Bibliothèque nationale, Paris, 141 p.
- 7- Bibbal D. 2008. Impacte des bêta-lactamine sur l'émergence d'entérobactéries résistantes dans la flore digestive chez le porc : caractérisation et stratégie e prévention. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse – France, 152 p.
- 8- Biquand A. 2017. Les Infections à *Pseudomonas aeruginosa* et leurs traitements en 2017. Thèse de Doctorat, Université de Rennes 1, France. 104 p.
- 9- Bougattoucha W., Boudella Y. 2010. Ecole de formation paramédicale, Laborantin diplôme d'état, Skikda, 7 p.
- 10- Bouguenoun W. 2017. Etude de résistance aux antibiotiques des bactéries incriminées dans les infections nosocomiales et leur dissémination dans l'environnement hospitalier de la région de GUELMA. Thèse de doctorat d'état, université Badji Mokhtar, Annaba, 218 p.
- 11- Bouguenoun W., Bakoura S., Bentorkic A. A., Charbel Al Bayssaria C., Meradd T., Rolain J. M. 2016. Molecular epidemiology of environmental and clinical carbapenemase-producing Gram-negative bacilli from hospitals in Guelma, Algeria: Multiple genetic lineages

and first report of OXA-48 in *Enterobacter cloacae*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 7 (2016) 135–140

C

12- Chaker H. 2012. Régulation de l'adaptation de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* à son hôte: implication des métabolites du tryptophane. Thèse de doctorat, université Grenoble-France, 291 p.

13- Cholley P. 2010. Analyse génétique des souches multi-résistantes de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'Est de la France, apport prédictif potentiel sur le risque infectieux. Thèse de doctorat, université de Franche-Comté, France, 162 p.

D

14- Denis F., Ploy M. C., Martin C., Bingen E., Quentin R. 2007. Bactériologie Médicale: Techniques Usuelles. Edition Masson, 333 p.

15- Drissi M. 2007. Etude de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau du CHU Tlemcen. Mécanisme de résistance aux β -lactamines. Thèse de doctorat, université Aboubek Belkaid, Tlemcen, 126 p.

E

16- El Garch F., Bogaerts P., Bebrone C., Galleni M., Glupczynski Y. 2011. OXA-198, an acquired carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(10), 4828-4833.

17- Elmeskini K. 2011. Etude épidémiologique des infections à *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de Doctorat, Université Mohammed V, Maroc, 117 p.

G

18- Gougeon A. 2017. Bactériémies à *Pseudomonas aeruginosa* : analyse de 181 épisodes bactériémiques documentés dans deux établissements hospitaliers du Nord de la France. Thèse de Doctorat, Université de Lille 2 – France, 141 p.

19- Grosjen J., Clavé D., Arechambaud M. 2011. Bactériologie et virologie pratique. Edition de boeck, Paris, 141p.

L

20- 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, Université Abou Bekr Belkaïd -Tlemcen, Algérie, 105 p.

21- Liazid A. 2012. Etude de la résistance aux antibiotiques des bactéries à Gram négatif non fermentates au niveau du C.H.U de Tlemcen. Thèse de magistère, université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, 95 p.

M

- 22- Medboua CH. 2011. Caractérisation des phénotypes de résistance aux β -lactamines à large spectre des bacilles à Gram négatif isolés au niveau du laboratoire central mère et enfants du CHU Beni-Messous d'Alger. Thèse de magistère. Université Abderrahmane MIRA – Béjaïa. 114 p.
- 23- Mderreg B. 2015. Infections à *Pseudomonas aeruginosa* en réanimation: Evolution de la résistance aux antibiotiques à travers le temps. Thèse de doctorat d'état, université MOHAMMED V, Rabat, 204 p.
- 24- Meradji S. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* : Facteurs de virulence et évaluation de la résistance aux bêta-lactamines et aux quinolones. Thèse de doctorat d'état, université Badji Mokhtar, Annaba, 466 p.
- 25- Mesaros N., Nordmann P., Plésiat P., Roussel-Delvallez M., Van Eldere J., Glupczynski, Y., Tulkens P. M. 2007. *Pseudomonas aeruginosa* : résistance et options thérapeutiques à l'aube du deuxième millénaire. *Antibiotiques*, 9 (3), 189-198.
- 26- Mesli E. 2014. Etude multicentrique de la résistance aux antibiotiques chez *Acinetobacter baumannii*. Thèse de Doctorat, Université Abou Bekr Belkaïd -Tlemcen, Algérie, 126 p.
- 27- Mérens A., Janvier F., Vu-Thien H., Cavallo J. D., Jeannot K. 2012. Phénotypes de résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*. *Revue Francophone Des Laboratoires*, (445), 68.
- 28- Montalegre R. 2016. Evaluation du risque d'émergence de résistances de *Pseudomonas aeruginosa* à différents antibiotiques antipyocyaniques en réanimation. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse III – France, 94 p.

N

- 29- Nyaledome A. 2016. *Pseudomonas aeruginosa* : Epidémiologie et état actuel des résistances à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V. Thèse de Doctorat, Université Mohammed V, Maroc, 116 p.

P

- 30- Philippon A., Arlet G. 2006. β -Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel. *Annales de Biologie Clinique*. Volume 64. *Revue générale* 1, p. 37, 51.
- 31-Poirel L., Dortet L., Nordmann P. 2013. Diagnostic des carbapénèmases : *détection et caractérisation*. *La Lettre de l'infectiologue*, 28(4) : 128-132.

R

- 32- Rachidi Z. 2013. Carbapénèmases : nouvelles techniques de dépistage et recommandations. Thèse de Doctorat, Université Mohammed V, Maroc, 192 p.

- 33- Ramoul A. 2014. Sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire des bactéries responsables d'infections respiratoires basses. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar-Annaba, Algérie, 157 p.
- 34- Rossignol G. 2007. Contribution à l'étude de facteurs de virulence d'une souche de *Pseudomonas fluorescens*: activité hémolytique et variation phénotypique. Thèse de doctorat d'état, Université Rouen, 266 p.
- 35- Ruppé E. 2010. Épidémiologie des bêta-lactamases à spectre élargi : l'avènement des CTX-M. *Antibiotiques*, 12 (1), 4.

S

- 36- Sefraoui I., M. Berrazeg et al.. 2014. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated from western Algeria between 2009 and 2012. *Microb Drug Resist.* 20(2) : 156-161.
- 37- Sefraoui I. 2015. Etude de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau de différents hôpitaux de l'ouest algérien. Thèse de doctorat, université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, 94 p.
- 38- Solbi S. 2013. Effet du repiquage de *Pseudomonas aeruginosa* sur les caractères morphologiques, biochimiques et sensibilités aux antibiotiques. Thèse de Doctorat, université Mohammed V, Rabat, 116 p.

T

- 39-Thibault M. 2011. Les infections nosocomiales l'importance d'un suivie epidemiologique et l'identification rapides des bactéries en cause. Thèse de Doctorat. Université de Grenoble-France, 93 p.
- 40 -Touati M., Diene S.M., Dekhil M., Djahoudi A., Racherache A., Rolain J.M. 2013. Dissemination of a class I integron carrying VIM-2 carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital intensive care unit in Annaba, Algeria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*, 57:2426-2427.
- 41 -Tokandji R. 2017. Détection des bactéries oroductrices de carbapénèmases : mise au point du carba NP test et comparaison au test dehodre modifié. Thèse de Doctorat, université Maroc, 142 p.

V

- 42 - Vasseur M. 2014. Détermination de nouvelles modalités di utilisation des bêta-lactamines en médecine vétérinaire par des approches PK/PD en vue de la protection de la santé publiques : implication de la taille de charge bactérienne pathogène. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse – France, 241 p.

43 - Venier A. G. 2011. *Pseudomonas aeruginosa* en réanimation : épidémiologie et facteurs de risque d'acquisition. Thèse de Doctorat, Université de Bordeaux 2 – France, 279 p.

Les Site web :

- 1) Site web 1: <http://fr.scribd.com/doc/263071749/Examen-Macroscopique-Et-Microscopique-Des-Cultures-Bactriens>
- 2) Site web 2: <http://www.eucast.org/>
- 3) Site web 3: <http://www.sante.dz/aarn/index.htm>

Annexes

Annexes

Annexe 1

1. L'examen à l'état frais

- **Principe**

- L'état frais est une technique qui permet l'observation des bactéries vivantes entre la lame et lamelle à l'objectif 40. Le but de cette étape est de déterminer la forme des bactéries ainsi que le type de leur mobilité et leur forme de regroupement (Denis, 2007).

- **Technique**

- L'observation est réalisée par une petite goutte de l'eau physiologique stérile qui est déposée à l'aide de pipette pasteur au centre d'une lame stérile.
- On prélève une partie d'une colonie bactérienne à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée et on la dissocie dans la goutte on applique ensuite une lamelle stérile sur la goutte en évitant la formation des bulles d'air (Denis, 2007).

2. Coloration de Gram

- **Principe**

La coloration de Gram est une coloration différentielle permettant de classer les bactéries en deux groupes selon la structure de leur paroi en : Bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Denis, 2007). En effet quand les bactéries sont mises au contact du violet de gentiane puis soumises à l'action du Lugol, il se forme un complexe colorant qui colore en violet tout la couche en peptidoglycane de la membrane des bactéries. Cependant, lorsque ces bactéries colorées sont lavées à l'alcool, seules celles à Gram négatif (présence membrane externe et couche mince de peptidoglycane), qui perdent leur coloration et prennent la couleur rose après la coloration par la Fushine. Les bactéries à Gram positif possèdent une couche épaisse de peptidoglycane qui empêche la pénétration de l'alcool et donc restent en couleur violet.

- **Technique**

Réaliser un frottis ou un étalement : A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, on dépose une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre ;

- Ensuite on prélève une colonie bien isolée avec la pipette Pasteur boutonnée et dissociée dans la goutte ;
- Fixer la préparation à la flamme, sécher soigneusement puis laisser refroidir la lame ;
- Puis on recouvre totalement la lame de violet de gentiane pendant 1 min ;

- Rincer à l'eau en transvasant les lames ;
- On recouvre le frottis par le Lugol pendant 2 min ;
- Laver à nouveau à l'eau ;
- Puis on ajoute l'alcool jusqu'à la disparition de la couleur violette pendant une dizaine de secondes et on lave rapidement à l'eau ;
- Puis on colore à nouveau avec la solution de fuchsine diluée pendant 1 min ;
- On Lave à l'eau et sécher à l'air ;
- A la fin on Observe à l'objectif X100, à l'aide d'huile d'immersion (Denis, 2007).

Annexe 2



Photo 01. Test de Mannitol-Mobilité



Photo 02. Test de Citrate de Simmons

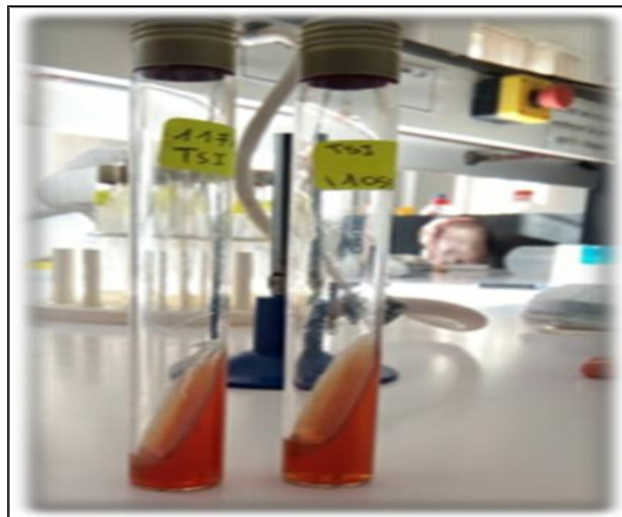


Photo 03. Test de triple Sugar Iron (TSI)



Photo 04. Test de VP

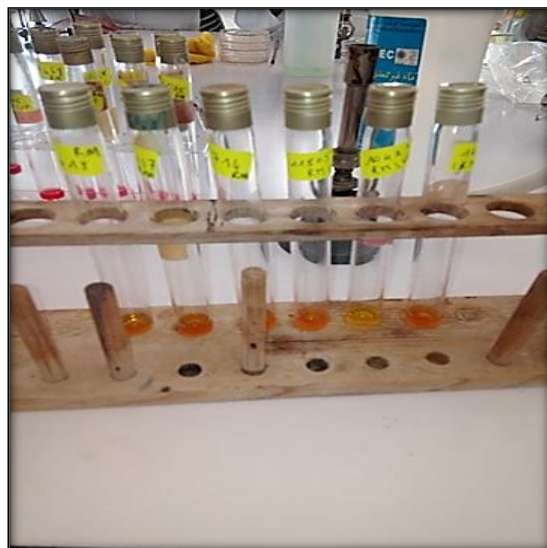


Photo 05. Test de RM

Annexe 3**Tableau 01.** Les résultats d'antibiogramme de 32souches de *P. aeruginosa*

Les antibiotiques des β -lactamines							
	TIC	TCC	PRL	CAZ	CPM	ATM	IPM
P1	15/R	6/R	9/R	6/R	18/R	22/S	23/S
P2	13/R	18/I	19/I	6/R	25/S	32/S	35/S
P3	36/S	30/S	19/I	6/R	25/S	11/R	28/S
P4	12/R	11/R	12/R	6/R	24/S	28/S	29/S
P5	22/I	14/R	11/R	6/R	24/S	29/S	30/S
P6	14/R	9/R	11/R	6/R	23/S	25/S	30/S
P7	11/R	10/R	11/R	6/R	22/S	22/S	30/S
P8	7/R	6/R	6/R	6/R	22/S	30/S	32/S
P9	15/R	11/R	16/I	7/R	26/S	24/S	31/S
P10	23/S	24/S	21/S	6/R	28/S	34/S	40/S
P11	12/R	15/R	13/R	6/R	25/S	30/S	29/S
P12	8/R	9/R	12/R	6/R	25/S	30/S	29/S
P13	14/R	12/R	12/R	6/R	25/S	29/S	29/S
P14	6/R	6/R	6/R	6/R	6/R	6/R	28/S
P15	6/R	6/R	16/I	6/R	21/S	28/S	32/S
P16	20/I	12/R	18/I	15/I	24/S	30/S	12/R
P17	22/I	16/R	11/R	6/R	26/S	28/S	30/S

P18	15/R	19/I	12/R	6/R	15/R	26/S	28/S
P19	6/R	6/R	22/R	6/R	29/S	38/S	34/S
P20	9/R	6/R	9/R	6/I	15/R	21/I	24/S
P21	23/I	20/I	12/R	7/R	26/S	31/S	28/S
P22	6/R	6/R	6/R	6/R	6/R	15/R	14/R
P23	14/R	6/R	6/R	6/R	17/R	25/S	12/R
P24	6/R	6/R	6/R	6/R	6/R	11/R	15/R
P25	6/R	6/R	6/R	17/I	28/S	38/S	28/S
P26	11/R	13/R	16/R	6/R	27/S	30/S	29/S
P27	6/R	6/R	6/R	17/I	18/R	22/S	27/S
P28	6/R	6/R	6/R	6/R	6/R	10/R	14/R
P29	6/R	6/R	6/R	6/R	6/R	6/R	6/R
P30	14/R	15/R	14/R	6/R	26/S	29/S	32/S
P31	14/R	16/I	11/R	6/R	24/S	26/S	30/S
P32	6/R	6/R	31/S	6/R	6/R	6/R	6/R

TIC : Ticarcilline, **TCC** : Ticarcilline + acide Clavulanique, **PRL** : Pipéracilline, **CAZ** :
Céftazidime, **CPM** : Céfépime, **ATM** : Aztréonam, **IPM** : Imipénème

R : Résistante, **I** : Intermédiaire, **S** : Sensible

ملخص

P. aeruginosa تعتبر أحد مسببات الأمراض الرئيسية في المستشفيات ، فهي مسؤولة عن عدد كبير من الإصابات الملحوظة بسبب شدة مقاومتها. هذا النوع يقاوم الـ β -lactamines وله قدرة كبيرة على التكيف، مما يؤدي إلى مشاكل علاجية حادة في كثير من الأحيان. الهدف الرئيسي من هذا العمل هو دراسة *P. aeruginosa* البكتيريا المقاومة والدراسة المظهرية للآليات المقاومة لهذه العزلات. هذه الدراسة شملت مجموعة مكونة من 32 سلالة من *P. aeruginosa* تم عزلها في الفترة ما بين أكتوبر 2018 وفبراير 2019، على مستوى مختبر البكتيريا في مستشفى الحكيم. سعدان في مدينة بسكرة. تم التعرف على 32 عزلة عن طريق اختبارات البيوكيميائية الكلاسيكية. في حين أن دراسة مدى تعرض العزلات للـ β -lactamines تم تحديدها بواسطة طريقة نشر أجار Mueller Hinton (MH) وفقاً لتوصيات لجنة المضادات الحيوية للشبكة الجزائرية. من ناحية، من أجل الكشف المظهري للآليات المقاومة للـ β -lactamines، تم إجراء اختبار Synergie et de Doubles disques للبحث الظاهري عن إنتاج ESBL، و MHT، و MCNPT واكتشاف M β L بواسطة شريط E-Test- للبحث عن النمط الظاهري لإنتاج الـ Carbapénémases. أولاً، أظهر التحليل الكيمائي الحيوي للعزلات الـ 32 أن هذه البكتيريا هي Gram-، mobile، +oxydase، +Catalase، -Lactose، -Succharose، -Glucose، -H2S، -Gaz، -Citrate، -Mannitol، +RM، -VP، +Nitrate réductase. بعد ذلك، أظهرت السلالات الـ 32 أنماطاً مقاومة عالية جداً في TIC (81%)، TCC (81%)، PRL (78%)، CAZ (88%)، CPM (34%)، ATM (22%)، IPM (22%)، بينما أظهرت نتائجنا أنه لا توجد سلالة تنتج BLSE (0%). من ناحية أخرى، تنتج 06 سلالات Carbapénémase وفقاً لـ MHT، بينما توجد 05 سلالات فقط وفقاً لـ MCNPT. وجدنا أيضاً أن 04 سلالات تنتج M β L. أخيراً، تشير النتائج التي سجلناها خلال فترة الدراسة هذه إلى أن مقاومة *P. aeruginosa* تجاه الـ β -lactamines عالية جداً في مدينة بسكرة.

الكلمات المفتاحية: *P. aeruginosa*، β -lactams، BLSE، Carbapénémase، النمط الظاهري للمقاومة، بسكرة

Résumé

P. aeruginosa s'est imposé comme un pathogène hospitalier majeur, responsable d'un nombre important d'infections remarquables par leur sévérité. Cette espèce manifeste vis-à-vis des β -lactamines un pouvoir d'adaptation de plus en plus grand qui aboutit à des problèmes thérapeutiques souvent aigus. L'objectif principal de ce travail est l'étude de l'émergence des *P. aeruginosa* résistants aux β -lactamines à la ville de Biskra et l'étude phénotypique des mécanismes de résistance de ces isolats. Un ensemble de 32 souches de *P. aeruginosa* qui a été isolées, entre Octobre 2018 et Février 2019, au niveau de laboratoire de bactériologie de l'hôpital El Hakim.Saadane - de la ville de Biskra. En premier lieu, L'identification des 32 isolats a été effectuée par les tests d'orientation et la galerie biochimique classique. Alors que l'étude de la sensibilité des isolats vis-à-vis des β -lactamines a été déterminée par la méthode de diffusion sur gélose Mueller Hinton (MH) selon la Recommandations du Comité de l'Antibiogramme du réseau algérien. D'un coté pour la détection phénotypique des mécanismes de résistance aux β -lactamines on a réalisé le test de synergie et de doubles disques pour la recherche phénotypique de la production de BLSE, et l'MHT, MCNPT et le E-test M β L pour la recherche phénotypique de la production des carbapénémases. L'analyse biochimique des 32 isolats a montré que cette bactérie est de Gram -, mobile, d'oxydase+, Catalase +, Lactose-, Saccharose-, Glucose-, H2S-, Gaz-, Citrate-, Mannitol-, RM+, VP-, Nitrate réductase +. Ensuite, les 32 souches ont montré des phénotypes de résistance très élevé à la : TIC (81%), TCC (81%), PRL (78%) CAZ (88%), CPM (34%), ATM (22%), IPM (22%). Alors que, nos résultats ont montré qu'aucune souche n'est productrice de BLSE (0%). En revanche, 06 souches sont productrices de carbapénémases selon MHT alors que seulement 05 souches le sont d'après MCNPT. Nous avons trouvé aussi que 04 souches sont productrices de M β L. Enfin, les résultats que nous avons enregistrés, dans cette période d'étude, indiquent que la résistance des *P. aeruginosa* vis-à-vis des β -lactamines est très élevée dans la ville de Biskra.

Mots clés : *P. aeruginosa*, β -lactamines, BLSE, Carbapénémase, phénotype de résistance, Biskra

Abstract

P. aeruginosa has emerged as a major hospital pathogen, responsible for a large number of infections remarkable for their severity. This species manifests towards β -lactamins a greater capacity of adaptation, which leads to often-acute therapeutic problems. The main objective of this work is the study of the emergence of β -lactam-resistant *P. aeruginosa* and the phenotypic study of the resistance mechanisms of these isolates. A set of 32 strains of *P. aeruginosa* that was isolated between October 2018 and February 2019, at bacteriology laboratory level of El HakimSaadane Hospital. From Biskra city. The 32 isolates were identified by orientation tests and the classical biochemical gallery. While the study of the susceptibility of isolates to β -lactams was determined by the Mueller Hinton (MH) agar diffusion method according to the recommendations of the Antibiogram Committee of the Algerian network. On the one hand, for the phenotypic detection of β -lactams resistance mechanisms, the synergy and double-disks test was carried out for the phenotypic search for ESBL production, and the MHT, MCNPT and the detection of M β L by strip. E-test for phenotypic research of carbapenems production. The biochemical analysis of the 32 isolates showed that this bacterium is Gram-, mobile, oxidase +, Catalase +, Lactose-, Sucrose-, Glucose-, H2S-, Gaz-, Citrate-, Mannitol-, RM +, VP -, Nitrate reductase +. Then the 32 strains showed very high resistance phenotypes at : TIC (81%), TCC (81%), PRL (78%) CAZ (88%), CPM (34%), ATM (22%), IPM (22%). While, our results showed no strain is producing ESBL (0%). On the other hand, 06 strains produce carbapenems according to MHT whereas only 05 strains are according to MCNPT. We also found that 04 strains produce M β L. Finally, the results we recorded during this study period indicate that the resistance of *P. aeruginosa* to β -lactams is very high in the city of Biskra.

Key words: *P. aeruginosa*, β -lactams, ESBL, Carbapenems, resistance phenotype, Biskra