



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 :
Aya FATNASSI

Le : samedi 26 septembre 2020

Thème

L'étude de la résistance aux bêta-lactamines des entérobactéries isolées de différents prélèvements pathologiques à l'hôpital El-Hakim Saâdan-Biskra

Jury :

M.	Hakim HEBAL	MAA	Université de Biskra	Président
Mme.	Widad BOUGUENOUN	MCB	Université de Biskra	Rapporteur
Mme.	Imene MERZOUGUI	MCB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2019-2020

Remerciements

Tout d'abord, Je remercie dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage, la patience et la force de vouloir et pouvoir continuer surtout dans les moments les plus difficiles, pour la réalisation de ce modeste travail.

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements les plus sincères à mon encadreur Mme. BOUGUENOUN Widad, maître de conférences à la faculté des sciences de la nature et de la vie. Je lui exprime par ces quelques mots mon profond respect et ma reconnaissance pour avoir acceptée de diriger ce travail, ses conseils judicieux, sa précieuse aide, ses encouragements et ses suggestions sur la rédaction de ce travail ainsi que la confiance qu'elle m'a témoigné tout au long de cette étude.

J'adresse mes sincères remerciements à M. HEBAL Hakim, maître de conférences à la faculté des sciences de la nature et de la vie, pour m'avoir faite l'honneur d'accepter la présidence du jury, je tiens à vous exprimer tout mon respect et mon estime.

Mes sincères remerciements à Mme. MERZOUGUI Imene, maître de conférences à la faculté des sciences de la nature et de la vie, d'avoir acceptée d'examiner et discuter ce travail. Je tiens à vous exprimer tout mon respect et mon estime.

Mes sincères remerciements vont aussi à Mme. MOKRANI Djamila et Mme. BOULMAIZ Sara. Pour leurs générosités scientifiques et ses aides. Qu'elles trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance et mon profond respect.

Je remercie aussi M. BENKADDOUR Bachir, pour son aide et ses conseils.

Mes profonds remerciements vont également aux tous les ingénieurs du laboratoire, surtout Mme Saliha, pour leurs aides et vos conseils lors de la conception de ce travail.

Je tiens également à remercier Dr KHALIL khalid, Chef de services de laboratoire de microbiologique de l'hôpital El Hakim Saâdan-Biskra, pour son aide précieuse, sa disponibilité, ses conseils.

J'adresse mes vifs remerciements par ailleurs à mes collègues de laboratoire: SAKHRI Zineb, CHABBI Kaouther, ZIOUCHI Djanet, FERHAT Abd El-Fattah, CHERIF Fathi pour m'offrir un grand soutien moral et ils ont toujours accepté de ma donner un coup de main quand c'était nécessaire durant la préparation de mémoire, je vous souhaite le bon et le meilleurs.

Je remercie aussi tous mes collègues, enseignants et responsables, ainsi que les personnels administratifs de l'université qui a participé de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce mémoire à:

Mes très chers parents, aucun mot ne pourrait exprimer réellement votre juste valeur, mon profond amour, mon respect et ma vive gratitude. En hommage à tous les sacrifices que vous avez consenti pour moi durant mes longues années d'études. Je vous remercie d'avoir fait de moi ce que je suis maintenant et de m'avoir appris de vivre dans l'honneur et dans la dignité. Votre confiance et votre encouragement m'ont toujours donné de la force pour persévérer et continuer vers l'avant. L'estime et le merci d'être toujours avec moi. Quoique je fasse, je ne pourrai jamais vous rendre ce que vous avez fait pour moi, j'espère avoir été digne de ta confiance. Puisse Dieu tu procurer santés, bonheur et longue vie.

Mon cher frère Mohamed et ma chère sœur Torkia, je ne peux exprimer à travers ses lignes tous mes sentiments d'amour envers vous. Puisse l'amour et la fraternité nous unissent à jamais. Je vous souhaite la réussite dans votre vie, et d'être comblé de bonheur. Merci d'être toujours présents à mes côtés et de m'avoir continuellement encouragé.

A la mémoire de mes frères "Laarafi" et "Taha", que Dieu les accueille dans son vaste paradis.

« Je vous aime tous »

Aya.

Table des matières

Remerciements	
Dédicace	
Liste des Tableaux.....	I
Liste des Figures.....	II
Liste des abréviations	III
Introduction	1

Partie 1. Synthèse bibliographique

Chapitre 1. Notions générales sur les entérobactéries

1.1. Généralité	3
1.2. Famille des Enterobacteriaceae	3
1.2.1. Définition.....	3
1.2.2. Classification	3
1.2.3. Habitat	4
1.2.4. Caractères bactériologies des entérobactéries	4
1.2.4.1. Caractères morphologiques	4
1.2.4.2. Caractères cultureux	4
1.2.4.3. Caractères enzymatiques et biochimiques	5
1.2.4.4. Caractères antigénique.....	5
1.3. Pouvoir pathogène	6

Chapitre 2. La résistance des entérobactéries aux bêta-lactamines

2.1. La famille des bêta-lactamines	7
2.1.1. Généralité	7
2.1.2. Structure	7
2.1.3. Les sous famille des bêta-lactamines	7
2.1.3.1. Les pénicillines	7
2.1.3.2. Les céphalosporines.....	7
2.1.3.3. Monobactames.....	8
2.1.3.4. Carbapénèmes.....	8
2.1.4. Mode d'action des β -lactamines.....	8
2.2. La résistance des entérobactéries aux bêta-lactamine	8
2.2.1. Les différents types de la résistance bactérienne.....	8

2.2.1.1. Résistance naturelle ou intrinsèque	8
2.2.1.2. Résistance acquise	9
2.3. Mécanismes de résistance aux β -lactamines	9
2.3.1. Résistance non enzymatique.....	9
2.3.1.1. Diminution de la perméabilité	9
2.3.1.2. Hyperproduction de système d'efflux	9
2.3.1.3. Modification des protéines liant la pénicilline (PLP)	9
2.3.2. Résistance enzymatique	9
2.3.2.1. Les bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu (BLSE).....	9
2.3.2.2. Hyperproduction de céphalosporinase chromosomique de classe C (céphalosporinase de haut niveau)	10
2.3.2.3. Les carbapénémases.....	10

Partie 2. Partie expérimentale

Chapitre 3. Matériel et méthodes

3.1. Cadre de l'étude.....	11
3.2. Echantillonnage	11
3.3. Isolement et purification.....	11
3.4. Techniques utilisées pour l'identification des bactéries.....	12
3.4.1. Tests préliminaires	12
3.4.1.1. Examen macroscopique	12
3.4.1.2. Examen microscopique.....	12
A. Examen direct à l'état frais.....	12
B. Examen direct après coloration	12
3.4.2. Tests d'orientation et identification biochimiques	12
3.4.2.1. Test d'oxydase	12
3.4.2.2. Test de catalase	13
3.4.2.3. Galeries classique	13
3.4.2.4. Galeries API 20 ^E	15
3.5. Antibiogramme.....	16
3.6. Analyses phénotypiques des mécanismes de résistance.....	18
3.6.1. Recherche de la β -lactamase à spectre élargi (BLSE) chez les entérobactéries... 18	
3.6.1.1. Test de synergie	18

Chapitre 4. Résultats et discussion

4.1. Isolement des souches	20
4.2. Identification des isolats	20
4.2.1. Observation macroscopique	20
4.2.2. Observation microscopique	22
4.2.2.1. Examen à l'état frais	22
4.2.2.2. Examen après coloration de Gram.....	22
4.2.3. Identification par les testes d'orientation et identification biochimiques.....	23
4.2.3.1. Test d'oxydase	23
4.2.3.2. Test de catalase	24
4.2.3.3. La galerie biochimique classique.....	25
4.2.3.4. Galeries API 20 ^E	28
4.3. Provenance des souches collectées.....	29
4.4. Répartition des isolats.....	31
4.4.1. Répartition des entérobactéries selon l'espèce	31
4.4.2. La répartition des entérobactéries au cours du temps.....	32
4.4.3. La répartition des entérobactéries selon le type de prélèvement.....	33
4.4.4. La répartition des entérobactéries selon les services	34
4.4.5. La répartition des entérobactéries selon le sexe	35
4.4.6. Répartition des entérobactéries selon l'âge	35
4.5. L'étude de la résistance aux antibiotiques.....	36
4.5.1. Antibiogramme par diffusion de disques sur un milieu gélosé	36
4.6. Détection phénotypique des β -lactamases.....	41
4.6.1. Recherche de la production des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) chez les entérobactéries	41
4.6.1.1. Test de synergie	41
Conclusion.....	43
Bibliographie	46
Annexes	
Résumés	

Liste des Tableaux

Tableau 1. Classification des principales espèces d'entérobactéries isolées au laboratoire de bactériologie médicale (Boone <i>et al.</i> , 2001).....	4
Tableau 2. Caractères biochimique des quelques entérobactéries (Kassama et Hamadi, 2013).	5
Tableau 3. Identification à l'aide de la galerie classique.....	14
Tableau 4. Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour les entérobactéries (CDROM, 2016).....	17
Tableau 5. Les caractères cultureux des entérobactéries sur Mac Conkey.	20
Tableau 6. Résultats finaux de la galerie biochimique classique obtenus pour les 34 souches étudiés d'entérobactéries.....	26
Tableau 7. Provenance des <i>Enterobacteriaceae</i> identifiées, isolées des patients hospitaliers et non hospitaliers.	29

Liste des Figures

Figure 1.L'observation microscopique de <i>Enterobacteriaceae</i> (Avril <i>et al.</i> , 2000).	3
Figure 2.Le noyau de B-lactame (Ruppé,2010 et Mesli, 2014).	7
Figure 3.La galerie API20E utilisés (avant l'incubation).	16
Figure 4.Disposition des disques d'antibiotiques pour le test de synergie.	18
Figure 5.Test de synergie positif d'une souche d' <i>E.cloacae</i> (Bouguenoun, 2017).	19
Figure 6.Aspect des colonies d'entérobactéries sur milieu Mac Conkey (A: <i>E.cloacae</i> ; B: <i>E.coli</i> ; C: <i>K.pneumoniae</i>).	21
Figure 7.Observation microscopique avec l'état frais d'entérobactéries grossissement x40. ...	22
Figure 8.Observation microscopique avec coloration de Gram des isolats (A: <i>E.cloacae</i> ; B: <i>E.coli</i> ; C: <i>K.pneumoniae</i>) grossissement x100.	23
Figure 9.Résultat de test d'oxydase des isolats (A: <i>E.cloacae</i> ; B: <i>E.coli</i> ; C: <i>K.pneumoniae</i>)..	24
Figure 10.Résultat de test de catalase des isolats (A: <i>E.cloacae</i> ; B: <i>E.coli</i> ; C: <i>K.pneumoniae</i>).	25
Figure 11. L'identification biochimique d' <i>E.cloacae</i> par la galerie classique (1: Mannitol; 2: Mobilité; 3: Nitrate réductase; 4: Citrate de Simmons; 5: TSI; 6: Urée; 7: Indole; 8:TDA). ..	27
Figure 12. L'identification biochimique d' <i>E.coli</i> par la galerie classique (1:Mannitol; 2: Mobilité;3: Nitrate réductase; 4:Citrate de Simmons; 5: TSI; 6: Urée; 7:Indole; 8:TDA).	27
Figure 13.L'identification biochimique de <i>K.pneumoniae</i> par la galerie classique (1:Mannitol; 2: Mobilité;3: Nitrate réductase; 4: Citrate de Simmons ; 5: TSI; 6: Urée; 7: Indole; 8: TDA).	28
Figure 14. Résultats d'identification des souches d' <i>E.coli</i> par galerie API20 ^E et outil en ligne gratuite UPBM.LAB.	28
Figure 15. Répartition des entérobactéries selon les espèces.	31
Figure 16.Répartition des entérobactéries au cours du temps.	33
Figure 17.Répartition des souches par nature des prélèvements.	33
Figure 18.Répartition des entérobactéries selon les services.	34
Figure 19.Répartition des isolats d'entérobactéries selon le sexe.	35
Figure 20.Répartition des isolats d'entérobactéries selon l'âge.	36
Figure 21. L'antibiogramme d'une souche d' <i>E.cloacae</i>	37
Figure 22. L'antibiogramme d'une souche de <i>K.pneumoniae</i>	37
Figure 23. L'antibiogramme d'une souche d' <i>E.coli</i>	38
Figure 24.Profil de résistance des <i>E.cloacae</i> aux β -lactamines.	38
Figure 25.Profil de résistance des <i>K.pneumoniae</i> aux β -lactamines.	39
Figure 26.Profil de résistance des <i>E.coli</i> aux β -lactamines.	40
Figure 27.Test de synergie (1: <i>E.cloacae</i> ; 2: <i>K.pneumoniae</i> ; 3: <i>E.coli</i>).....	42

Liste des abréviations

ADH: Arginine dihydrolase

AmpC: Céphalosporinases

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

BGN: Bacilles à Gram négatif

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

CD-ROM : Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale

CTX-M: Céfotaxime Munich

E.cloacae : *Enterobacter cloacae*

E.coli : *Escherichia coli*

H₂S : Hydrogen Sulfide

GLU : Glucose

H₂S : Hydrogène Sulfuré

I: Intermédiaire

IND: Indole

K.pneumoniae : *Klebsiella pneumoniae*

LDC : Lysine Décarboxylase

LPS: Lipopolysaccharide

MH: Miller Hinton

NaCL : Chlorure de sodium

NIT : Nitrate

ODC : Ornithine Décarboxylase

ONPG : Orthonitrophényl-B-D-galactopyranoside

OXA : Oxacillinases

PLP : Protéine Liant les Pénicillines

R: Résistance

S: Sensible

SHV : Sulfhydryl variable

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

TDA : Tryptophan Deaminase

TSI : Triple Sugar Iron

UFC : Unité Formant Colonie

URE: Urée

VP : Réaction de Voges-Proskauer

Introduction

Introduction

Les entérobactéries forment une vaste famille de bacilles à Gram négatif regroupés en plusieurs genres et espèces. Tous ces germes ont en commun leur localisation préférentielle au niveau du système digestif, d'où leur appellation (entérobactéries) (Joly et Reynaud, 2007; Kariuki *et al.*, 2007).

Ces bactéries occupent une place importante en pathologie humaine et constituent plus de 80% des germes isolés au laboratoire de biologie médicale. Ils sont responsables de nombreuses infections nosocomiales et infections communautaires notamment les infections urinaires, les infections respiratoires, septicémies (Paterson, 2006; Mellouk, 2016), traduisent des difficultés de prise en charge liées principalement à leur résistance aux différentes familles d'antibiotiques les plus fréquemment utilisées en thérapeutique telles que les bêta-lactamines (Rossolini *et al.*, 2007; Frasca *et al.*, 2008; Ben moussa, 2016).

Cependant, la résistance bactérienne aux antibiotiques est en perpétuelle évolution. Cette résistance bactérienne est le résultat d'interactions complexes entre la bactérie d'une part et son environnement d'autre part, elle est liée essentiellement à un usage excessif des antibiotiques aussi bien en médecine humaine, qu'en médecine vétérinaire ou dans l'alimentation animale (Cohen *et al.*, 2011; Basmaci et Cohen, 2018). Les bactéries pour faire face à la pression de sélection exercée par les antibiotiques utilisent des parades leur permettant de s'adapter aux conditions hostiles de leur environnement (Ben redjeb *et al.*, 2000; Faure, 2009).

Les β -lactamines demeurent les antibiotiques les plus utilisés dans la pratique clinique courante, cette large utilisation est principalement liée à leur faible toxicité, à leur pouvoir bactéricide et à la diversité des molécules (Cavallo *et al.*, 2004; Robin *et al.*, 2012). En effet, chez les entérobactéries la résistance à ces molécules a évolué et est liée principalement à des systèmes d'efflux, à l'imperméabilité membranaire et à la production de β -lactamases qui catalysent de manière efficace et irréversible l'hydrolyse de la liaison amide du cycle β -lactame donnant un produit biologiquement inactif (Bonnet, 2006; Rawat et Nair, 2010; Chouchani *et al.*, 2011).

L'usage intensif et souvent abusif de ces antibiotiques et de la capacité des bactéries à échanger du matériel génétique dans des conditions de pressions antibiotiques ont été rapidement suivi par l'apparition de souches multirésistantes et a compromis, dans de

nombreux cas, se traduit par un problème majeur de santé publique en Algérie et à l'échelle mondiale (Grimont et Grimont, 2006 ; Baba Ahmed, 2012; El-bouamri, 2017).

Ce travail a pour but d'étudier l'émergence des entérobactéries isolées de différents prélèvements pathologiques au laboratoire de bactériologie de l'hôpital d'EL-Hakim Saâdan-Biskra, et de déterminer la fréquence de résistances aux β -lactamines de ces souches de entérobactérie ainsi que l'étude phénotypique des mécanismes de résistance des isolats.

Donc le présent travail est divisé en deux parties; la première constitue une synthèse bibliographique regroupant le chapitre 1 consacrée à un bref rappel sur les entérobactéries, les différents types d'infections qu'elles génèrent, suivi par la résistance des entérobactéries aux béta-lactamine en tant que chapitre 2.

Dans la seconde partie expérimentale de ce travail, le chapitre 3 concerne la détermination des caractères des entérobactéries par les tests d'orientation et les tests biochimique après l'isolement et la purification de ces bactéries, l'étude de la résistance au béta-lactamine et la recherche phénotypique des mécanismes de résistance aux β -lactamines des isolats, suivi par une discussion qui synthétise l'ensemble des résultats obtenus et leur discussion et nous achevons notre travail par une conclusion générale.

Partie 1

Synthèse bibliographique

Chapitre 1

Notions générales sur les entérobactéries

1.1. Généralité

Les bactéries appartenant à la famille d'*Enterobacteriaceae* sont très largement distribuées dans la nature et peuvent faire partie de la flore normale du tube digestif de l'homme et des animaux. Dans ce groupe de bactéries entériques figurent des bactéries pathogènes strictes comme *Salmonella* et *Shigella*, d'autres sont considérées comme opportunistes ou pathogènes occasionnels comme *Proteus* et *Klebsiella* et enfin des bactéries essentiellement saprophytes du tube digestif et qui dans certaines circonstances peuvent être responsables d'infections comme *Escherichia*. Leur identification est basée surtout sur des tests culturels, des caractères biochimiques et antigéniques (Jean *et al.*, 2007).

1.2. Famille des *Enterobacteriaceae*

1.2.1. Définition

Les entérobactéries constituent une famille hétérogène de bactéries Gram-négatif, retrouvées partout dans le sol, dans l'eau, et surtout dans l'intestin de l'homme et des animaux (Denis *et al.*, 1998). Elles comprennent un nombre très élevé de genres et d'espèces. Leur abondance dans l'intestin, leur mobilité, la rapidité de leur multiplication et l'acquisition fréquente de mécanismes de résistance aux antibiotiques expliquent qu'elles soient les bactéries les plus souvent impliquées en pathologie infectieuse humaine surtout en milieu hospitalier (Khayar, 2011).

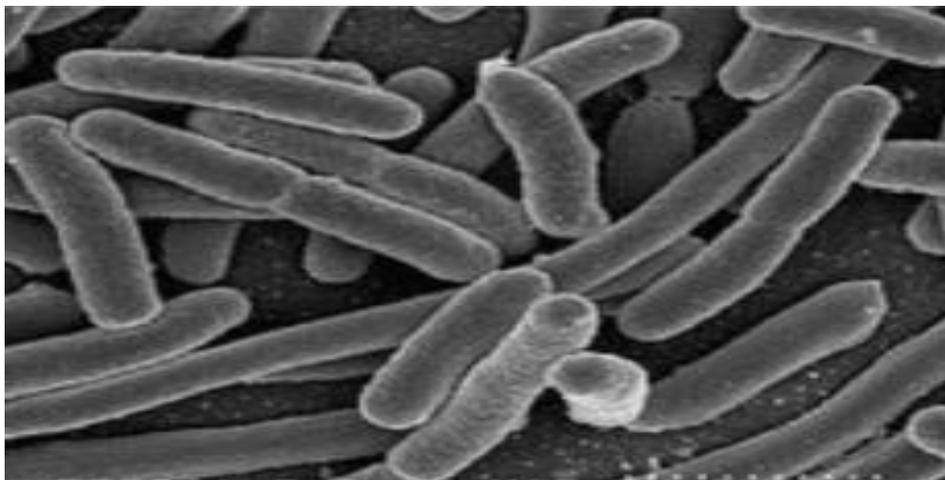


Figure 1. L'observation microscopique de *Enterobacteriaceae* (Avril *et al.*, 2000).

1.2.2. Classification

La famille des entérobactéries se compose d'environ 30 genres de bactéries et de plus de 100 espèces, mobiles par ciliature péritriche ou immobile (Avril *et al.*, 2000). Leur subdivision est dans le tableau suivant.

Tableau 1. Classification des principales espèces d'entérobactéries isolées au laboratoire de bactériologie médicale (Boone *et al.*, 2001).

Genre bactérien	Espèce bactérienne
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>K. ozaenae</i> , <i>K. rhinoscleromatis</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>E. cloacae</i> , <i>E. aerogenes</i> , ...
<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i> , <i>C. koseri</i> , ...
<i>Proteus</i>	<i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. penneri</i> , ..
<i>Providencia</i>	<i>P. rettgerii</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>P. alcalifaciens</i> , ...
<i>Morganella</i>	<i>M. morganii</i>
<i>Serratia</i>	<i>S. marcescens</i>
<i>Salmonella</i>	<i>S. enterica</i> (6 sous types)
<i>Yersinia</i>	<i>Y. pestis</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>Y. pseudotuberculosis</i>

D'autres genres, plus récemment décrits, sont parfois trouvés dans l'environnement et sont rarement isolés chez l'homme, ce sont: *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Ewingella*, *Kluyvera*, *Koserella*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Moellerella*, *Obesumbacterium*, *Rahnella*, *Tatumella*, *Trabulsiella*, *Xenorhabdus*, *Yokenella* (Freney *et al.*, 2008).

1.2.3. Habitat

Les entérobactéries sont des bactéries ubiquitaires retrouvées partout dans le sol, dans l'eau, dans certaines denrées alimentaires. On les trouve aussi dans la cavité buccale, au niveau des voies aériennes supérieures et sur les organes génitaux, mais la plupart des espèces qui composent cette famille sont des hôtes normaux ou pathogènes du tube digestif de l'homme et des animaux, pour cela elles sont nommées entérobactéries (Yassine, 2011).

1.2.4. Caractères bactériologies des entérobactéries

1.2.4.1. Caractères morphologiques

Toutes les entérobactéries ont une morphologie habituellement typique, sous forme de bacilles Gram négatif (BGN) (2- 4µm longueur/0,4- 0,6 µm largeur), soit mobiles par ciliature péritriche ou immobiles, non sporulés et peuvent être capsulés. La plupart des espèces pathogènes pour l'homme possèdent des fimbriae ou pili communs qui sont des facteurs d'adhésion (Terkja, 2014).

1.2.4.2. Caractères cultureux

Les entérobactéries poussent facilement sur les milieux ordinaires en 24 heures à 37°C en aérobiose et en anaérobiose. Leurs exigences nutritionnelles sont, en général, réduites et la plupart se multiplient en milieu synthétique avec une source de carbone simple comme le glucose. Ce sont des germes mésophiles et neutrophiles (pH optimum voisin de 5,5 - 8) et ils

sont assez tolérants aux variations de la pression osmotique. Ainsi on distingue 5 types de colonies :

- **Colonies S (smooth)** : arrondies, lisses, humides, blanches ou translucides.
- **Colonies R (rugueuses)** : sèches à contours irréguliers et mates (bactéries vieilles ou anormales).
- **Colonies M (muqueuses)** : grosses colonies ± confluentes (*Klebsiella* spp).
- **Colonies envahissantes ou nappantes** : formation d'un tapis uniforme (*Proteus*).
- **Colonies naines** : Elles s'observent avec des souches déficientes dans certaines de leurs chaînes métaboliques (Akel ,2014).

1.2.4.3. Caractères enzymatiques et biochimiques

Les caractères d'identification sont essentiellement "biochimiques" et utilisent des tests qui étudient le métabolisme protéique (présence d'uréase, production d'indole, dégradation du tryptophane) ou la fermentation des sucres (glucose, lactose, saccharose etc..), la capacité d'utiliser le citrate, la présence d'enzymes (décarboxylases, désaminases), la production d'hydrogène sulfuré ou la formation de gaz (Kassama et Hamadi, 2013).

Tableau 2. Caractères biochimique des quelques entérobactéries (Kassama et Hamadi, 2013).

Caractéristiques	Glu	Lac	ONPG	Ind	VP	Cit	Mob	Urée	PDA	H ₂ S
<i>Escherishia</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>Citrobacter</i>	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+/-
<i>Enterobacter</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>Klebsiella</i>	+	+	+	+/-	+	+	-	+	-	-
<i>Serratia</i>	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>Salmonella</i>	+	-	-	-	-	+/-	+	-	-	+
<i>Shigella</i>	+	-	+/-	+/-	-	-	+	-	-	-
<i>Proteus</i>	+	-	-	+/-	-	+/-	-	+	+	+/-
<i>Providencia</i>	+	-	-	+/-	-	+	+	-	+	-
<i>Yersinia</i>	+	-	+	+/-	+	-	+	+	-	-

Glu: Glucose, **Lac:** Lactose, **Ind:** Indol, **VP :** Pyruvate de sodium (réaction de Voges Proskauer), **Cit:** Citrate, **Mob:** Mobilité, **URE:** Urée, **PDA:** Phenylalanine deaminase, **H₂S:** Thiosulfate, **ONPG:** Ortho-Nitro-Phényl Galactopyranoside.

1.2.4.4. Caractères antigénique

L'identification des entérobactéries se fait par l'identification biochimique, la détermination du sérotype ne peut être entre prise que pour des souches dont l'identification

est certaine. Toute autre façon de faire ne peut qu'entraîner des erreurs du fait d'agglutinations croisées non spécifiques (Avril *et al.*, 2000). Elle se base sur l'identification des antigènes (O, H et K).

- **Les antigènes O**

Ce sont des antigènes de paroi constitués de lipopolysaccharides (LPS) qui sont thermostables et résistants à l'alcool ou l'acide.

- **Les antigènes H**

Ce sont des antigènes flagellaires qui ne sont donc présents que chez les souches mobiles. Constitués d'une protéine, la flagelline, ils sont thermolabiles et inactivés par l'alcool.

- **Les antigènes K**

Ces antigènes capsulaires sont généralement constitués d'une couche externe polysaccharidique. Parmi les antigènes K, se trouvent les antigènes L, A, B d'*E.coli* et l'antigène Vi de certains *Salmonelle* ou *Citrobacter*.

1.3. Pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène des entérobactéries chez l'homme est considérable. Les infections sont soit bien définies et peuvent concerner tous les sujets soit non spécifiques touchant les sujets immunodéprimés, en particulier ceux qui sont hospitalisés (Claire, 2011). Dans la majorité des cas, l'origine de l'infection est soit endogène à partir des flores bactériennes, soit exogène provenant de milieu extérieur. Les entérobactéries sont responsables de nombreuses infections (Anglaret et Mortier, 2002).

Les infections communautaires, il s'agit principalement des infections urinaires majoritairement provoquées par *E.coli*, les intoxications alimentaires provoquées par les *Salmonelles*, les infections pulmonaires provoquées par *Klebsiella pneumoniae*.

Les infections nosocomiales, sont fréquentes à type d'infections urinaires, des plaies opératoires, d'infections pulmonaires, de septicémies, ainsi que d'autres localisations. En plus des bactéries déjà citées dans les infections communautaires avec un profil de multirésistance on cite: *Klebsiella pneumoniae* (Bouguenoun, 2017), *Enterobacter sp*, *Serratia sp* (Avril *et al.*, 2000 ; Joly et Reynaud, 2002).

Chapitre 2

La résistance des entérobactéries aux béta-lactamines

2.1. La famille des bêta-lactamines

2.1.1. Généralité

Les β -lactamines sont les antibiotiques les plus couramment utilisés dans le monde pour traiter les infections bactériennes à cause de leur large spectre d'activité et leur faible toxicité. Ces antibiotiques sont actifs sur des bactéries en phase de croissance et agissent en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne (synthèse du peptidoglycane) par inactivation des principales enzymes impliquées dans cette construction PLP (Zenati, 2016).

2.1.2. 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 (Ayad, 2017).

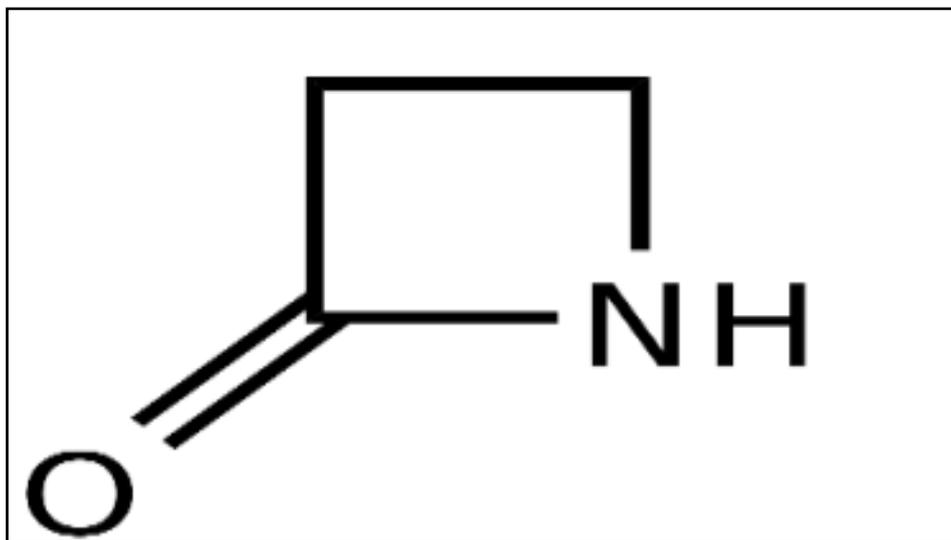


Figure 2. Le noyau de β -lactame (Ruppé, 2010 et Mesli, 2014).

2.1.3. Les sous famille des bêta-lactamines

2.1.3.1. Les pénicillines

Il s'agit d'une vaste famille de produit ayant en commun le noyau pénème (Cavallo *et al.*, 2004), on a défini plusieurs sous-classes, dont les plus utilisées sont les aminopénicillines (ampicilline, amoxicilline), les carboxypénicillines (ticarcilline) les uréidopénicillines (pipéracilline) et les amidinopénicillines (pivmecillinam) (Ayad, 2017). Les pénicillines tuent les bactéries en inhibant la formation de la paroi cellulaire bactérienne provoquant le mur de ventilation pour libérer le contenu de la cellule (Adzitey, 2015).

2.1.3.2. Les céphalosporines

- **Les céphalosporines de première génération (C1G)** : elles sont plutôt actives sur les bactéries à Gram positif. Exemples: céfalotine, céfazoline et céfalexine (Gharout-Sait, 2016).

- **Les céphalosporines de deuxième génération (C2G)** : elles ont un spectre étendu vers les bactéries à Gram négatif. Exemples: céfamandole, céfuroxime, céfoxitine et céfotétan (Lagha, 2015).
- **Les céphalosporines de troisième génération (C3G)** : elles ont un spectre étendu à la plupart des entérobactéries. Exemples : céfotaxime, ceftazidime, ceftriaxone et céfopérazone.
- **Les céphalosporines de quatrième génération (C4G)** : elles sont relativement stables à l'hydrolyse des céphalosporinases. Elles restent actives sur les entérobactéries ayant acquis une résistance aux C3G par hyperproduction d'une céphalosporinase. Exemples : céfépime et cefpirome (Ruppé, 2010).

2.1.3.3. Monobactames

Ces antibiotiques sont très actifs sur les entérobactéries. L'activité anti Gram négatif de l'aztréonam, chef de file de cette classe, est globalement comparable à celle des céphalosporines de 3ème génération comme la ceftazidime. L'aztréonam présente une bonne stabilité vis-à-vis des β -lactamases de spectre restreint. De plus, les monobactames constituent les seules β -lactamines non hydrolysées par les métallobactamases (Lagha, 2015).

2.1.3.4. Carbapénèmes

Les carbapénèmes possèdent le plus large spectre d'activité et la plus grande activité antimicrobienne contre les bactéries à Gram positif et Gram négatif, ils sont utilisés lors d'un traitement empirique ou dans le traitement d'infections par des bactéries à Gram négatif résistantes aux C3G. Les carbapénèmes sont les seules β -lactamines dont l'efficacité est prouvée dans les infections graves dues aux bactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) (Marylyse, 2015).

2.1.4. Mode d'action des β -lactamines

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; pour donner un acylenzyme qui sera ensuite dégradé en acide inactif. Ainsi, les pénicillines sont dégradées en acide pénicilloïque et les céphalosporines en acide céphalosporoïque (Lagha, 2015).

2.2. La résistance des entérobactéries aux bêta-lactamine

2.2.1. Les différents types de la résistance bactérienne

2.2.1.1. Résistance naturelle ou intrinsèque

La résistance naturelle est une caractéristique d'une espèce bactérienne, de support habituellement chromosomique qui délimite le spectre d'antibiotique et peut aider à

l'identification. La transmission de cette résistance est verticale, de la bactérie vers sa descendance (Brahimi, 2013). La résistance naturelle chez les bacilles à Gram négatif se manifeste souvent par des céphalosporinases chromosomiques qui s'expriment soit d'une manière constitutive ou inductible (Pierrot, 2015).

2.2.1.2. Résistance acquise

On oppose à la résistance naturelle, propriété d'espèce ou de genre, la résistance acquise qui est une propriété de souche. Cette dernière correspond à la capacité de supporter une concentration d'antibiotique beaucoup plus élevée que celle supportée par les autres souches de la même espèce (Guinoiseau, 2010). Elle peut donc se faire soit par mutation chromosomique soit par acquisition des gènes transférés d'un autre micro-organisme (Lozniewski *et al.*, 2010).

2.3. Mécanismes de résistance aux β -lactamines

2.3.1. Résistance non enzymatique

2.3.1.1. Diminution de la perméabilité

Les entérobactéries sont naturellement résistantes aux molécules hydrophobes et de masse moléculaire élevée (pénicillines). Des résistances acquises dues à une diminution de perméabilité de la paroi ont été rapportées chez *E.coli*, *Klebsiella*, *Proteus* et *Enterobacter* suite à une altération quantitative ou qualitative des porines (Ramoul, 2013).

2.3.1.2. Hyperproduction de système d'efflux

L'exportation active est un mécanisme de résistance de certaines bactéries aux antibiotiques grâce à des transporteurs membranaires appelés pompes d'efflux. Chez les bactéries à Gram négatif, les 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 (Yassine, 2011).

2.3.1.3. Modification des protéines liant la pénicilline (PLP)

Les PLP sont des cibles physiologiques des β -lactamines. Chez les entérobactéries, des souches de *Proteus mirabilis* résistantes à l'imipénème ont été observées suite à une perte d'affinité de la PLP 2 et une diminution de la quantité de la PLP. Ce mécanisme de résistance est très rare chez les entérobactéries (Faure, 2009).

2.3.2. Résistance enzymatique

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

Classiquement, les BLSE sont définies comme des enzymes, appartenant à la classe A ou D de la classification d'Ambler avec le support génétique est plasmidique ou

chromosomique (Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006), capables d'hydrolyser et causer une résistance aux oxymino-céphalosporines (C3G et C4G) et les monobactames, mais pas aux céphamycines (C2G) ou carbapénèmes. Ces enzymes sont inhibés par bêta-lactamases telle que l'acide clavulanique, le sulbactam et tazobactam (Peirano et Pitout, 2010; Elmeskini, 2011; Sefraoui, 2015). Elles ont été classées en 11 familles différentes sur la base de leur séquence d'acides aminés (Vidon et Bourdin, 2005). Les 4 familles majeures sont représentées par les enzymes de type TEM, SHV, OXA et CTX-M (Gniadkowski, 2001 et Illiaquer, 2010).

2.3.2.2. Hyperproduction de céphalosporinase chromosomique de classe C (céphalosporinase de haut niveau)

Le phénotype de résistance céphalosporinase de haut niveau se traduit par une résistance à l'ensemble des β -lactamines excepté les carbapénèmes (Eyquem et Montagnier, 2000). Il peut subsister une activité des céphalosporines à large spectre (céfépime, cefpirome). Il s'agit d'un phénotype retrouvé principalement chez les bactéries possédant naturellement une céphalosporinase ampC qui peut être alors sur exprimée (*Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* et autres entérobactéries du même groupe) (Gueudet *et al.*, 2010).

2.3.2.3. Les carbapénémases

Les carbapénèmes sont aujourd'hui parmi les traitements de choix des infections β -lactamases à spectre étendu sévères dues aux entérobactéries productrices de (BLSE). Mais leur utilisation pourrait être compromise par l'émergence de souches de bactéries résistantes également aux carbapénèmes (Gulmez *et al.*, 2008). Chez les entérobactéries, cette résistance est principalement due à mécanismes (Livermore et Woodford, 2006).

- **Acquisition des métallobêta-lactamases (VIM, IMP):** ces enzymes, appartenant au classe B d'ambler, hydrolysent toutes les β -lactamases à l'exception de l'aztréonam (Trigoso, 2010). L'activité de ces enzymes est inhibée par l'addition de chélateur d'ions bivalents. Ce sont des metalloprotéines, chromosomiques ou plasmidiques (Safraoui, 2015).

- **Acquisition de non métallobêta-lactamases:** 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).

Partie 2

Partie expérimentale

Chapitre 3

Matériel et méthodes

3.1. Cadre de l'étude

Nous avons choisi de mener ce travail sur la résistance des entérobactéries aux bêta-lactamines, du fait qu'une documentation devenue nécessaire chez nous à cause de sa fréquence dans les services des épidémies causées par des souches résistantes à une large variété d'antibiotiques. Les prélèvements ont été réalisés au laboratoire de bactériologie de l'hôpital El-Hakim Saâdan de Biskra.

3.2. Echantillonnage

Notre étude a été réalisée sur une période de cinq (05) mois allant du 04 Octobre 2019 au 20 Février 2020. Elle est menée sur 45 souches non répétitives des *Enterobacteriaceae*. Elle a porté sur des patients hospitalisés et non hospitalisés à l'Hôpital « El-Hakim Saâdan » de Biskra, Algérie.

Les prélèvements ont été recueillis de différents services, essentiellement : le service de médecine interne homme et femme, la pédiatrie, de Néonatalogie et d'Oncologie ; d'autres prélèvements ont été recueillis des services de l'hôpital El-Bachir Ben Nacer et d'autres des patients non hospitalisés (externe)

Les prélèvements correspondaient aux différents sites d'infection (urines, pus, cathéter, sang).

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

- Nom et prénom.
- Age et sexe.
- Service d'hospitalisation.
- Nature de prélèvement.
- Date de prélèvement.

Les isolats ont été repiqués dans des tubes de gélose nutritive inclinés et conservés à 4°C au niveau du laboratoire de microbiologie à l'université Mohamed Khider- Biskra (EL-Hadjeb).

3.3. Isolement et purification

Les souches bactériennes, ont été isolées sur le milieu Mac Conkey par la méthode des stries pour l'isolement des bactéries à Gram négatif grâce à l'action de deux inhibiteurs

présent dans le milieu. Le Cristal Violet pour l'inhibition de la flore Gram positive, et les sels biliaires pour la sélection des entérobactéries. Ce milieu contient également du lactose et un indicateur de pH. Puis incubé à 37°C pendant 24h.

3.4. Techniques utilisées pour l'identification des bactéries

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

Dans le but d'identification des isolats infectieux, on a procédé à une étude phénotypique présentée par les tests suivants.

3.4.1. Tests préliminaires

3.4.1.1. Examen macroscopique

Après incubation, le premier critère d'identification sur lequel on se base est celle de l'aspect macroscopique des colonies vu à l'œil nu, que ça soit taille, forme du relief (bombée, semi bombée, plate), couleur, aspect (collant, filamenteux...), transparence (opaque, translucide), allure des contours (régulier, dentelés), pigmentation, et aspect de la surface (lisse ou rugueuse) (solbi, 2013).

3.4.1.2. Examen microscopique

A. Examen direct à l'état frais

C'est une méthode rapide consiste à observer entre lame et lamelle une suspension bactérienne à l'objectif $\times 40$. Les renseignements obtenus par cette observation concernent principalement la mobilité des bactéries (François *et al.*, 2011) (annex 01).

B. Examen direct après coloration

La coloration de Gram est la base de l'identification d'une souche bactérienne. Elle doit être parfaitement maîtrisée car c'est le point de départ du choix des examens complémentaires à effectuer, des milieux à ensemencer.

Au terme du processus de coloration, les bactéries dites « Gram Négatives » apparaissent roses tandis que les bactéries dites « Gram Positives » sont colorés en bleu foncé/violet (Denis *et al.*, 2007) (annex 01).

3.4.2. Tests d'orientation et identification biochimiques

3.4.2.1. Test d'oxydase

Principe

Ce test permet la mise en évidence de la production de la bactérie étudié de l'enzyme «oxydase ». Les bactéries possédant une chaîne respiratoire complète sont dotées d'une

enzyme cytochrome oxydase. L'oxydation de Tétraméthyl-p-phénylènediamine indique la présence d'une oxydase chez la bactérie oxydase (El Bouamri, 2017).

Technique

Sur une lame de verre propre, déposer un disque imprégné de solution d'oxydase fixée par l'eau distillée stérile à l'aide d'une pipette Pasteur stérile flambée, déposer la colonie à étudier sur le disque et observer immédiatement.

Lecture

Une réaction positive se traduit par une coloration violette en quelques seconds, qui met en évidence la forme réduite incolore de dérivés méthylés du paraphénylène diamine, en leur forme oxydée semiquinonique rose violacé (Lecour, 2017).

3.4.2.2. Test de catalase

La catalase est une enzyme qui est produite en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire qui peuvent détruire les peroxydes H_2O_2 ce qui a un effet létal pour la bactérie. Ce test repose sur la décomposition de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène selon la réaction suivant (Rebiahi, 2012).



Technique

- Sur une lame propre sèche, déposer quelques gouttes d'eau oxygénée à 10 volumes;
- Ajouter l'inoculum bactérien à l'aide d'une anse de platine ou pipette de pasteur boutonnée.
- Observer immédiatement à l'œil nu.

Lecture

La réaction positive se traduit par l'apparition des bulles d'air, dégagement gazeux de dioxygène et la réaction négative se manifeste par l'absence des bulles d'air ou d'effervescence.

3.4.2.3. Galeries classique

La réalisation de la galerie classique consiste à effectuer des tests biochimiques permettant l'identification des bactéries en étudiant leur métabolisme enzymatique (tab.3).

Tableau 3. Identification à l'aide de la galerie classique.

Test	Technique	Lecture
Mannitol Mobilité- nitrate réductase (Solbi, 2013)	-Ensemencement par piqure centrale à l'aide d'une pipette Pasteur. Incubation à 37°C pendant 24h. Après l'incubation. Ajouter les réactifs nitrites 1 et nitrite 2 pour montrer la présence de nitrites.	- La fermentation du mannitol a été matérialisée par un virage du milieu de rouge au jaune. L'ajoute des réactifs Nit1 et Nit2 conduit à l'apparition d'une teinte rouge-orangé en présence d'ions nitrites, ce qui indique que la bactérie est capable de réduire les nitrates en nitrites. La bactérie immobile ne se développe que le long de la piqure centrale.
Milieu Citrate de Simmons (Memdouh, 2018)	-Ensemencement par des stries le long de la pente à l'aide de la pipette Pasteur, incubation à 37°C pendant 24h	-L'utilisation du citrate de Simmons se traduit par un virage de couleur du vert au bleu qui signifie qu'il y a eu une alcalinisation du milieu et que la bactérie possède un citrate perméase.
Gélose TSI (Triple Sugar Iron) (Bougattoucha et Boudella, 2010)	-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.	-Pour la fermentation de lactose: La surface inclinée vire au jaune. Dans le cas contraire, sa couleur reste inchangée. - Pour la fermentation de glucose: le culot vire au jaune. Dans le cas contraire, sa couleur reste inchangée - S'il y a production de gaz, il est possible d'observer, soit seulement quelques bulles, soit une poche gazeuse qui décolle complètement le milieu du fond du tube. - Pour la production de H ₂ S se traduit par un noircissement du milieu dans la zone joignant le culot à la pente.

Test urée-indole (Denis <i>et al.</i> , 2011)	-Prélever à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée stérile et flambée quelques colonies bactériennes puis les déposer sur le milieu « urée --indole ». -Incuber à 37°C pendant 24 heures, puis diviser le contenu en 2 tubes, On peut recherche la production d'indole par des réactifs de Kovacs, et le TDA est révélé par l'ajoute de perchlorure de fer	-Production d'une Uréase: coloration rose violette. -Production d'indole: apparition d'un anneau rouge à la surface. - La tryptophane-désaminase détecté par l'apparition d'une couleur brune après l'ajoute de perchlorure de fer.
--	---	---

3.4.2.4. Galeries API 20^E

C'est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries à Gram négatif, dont les entérobactéries. Elle comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Ces microtubes ont été inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation (18h-24h à 37C°) se traduisaient par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (Ayad, 2017).

Technique

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

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

Pour inoculer la galerie, il faut remplir à l'aide d'une pipette Pasteur les tubes et les cupules des tests CIT, VP et GEL avec la suspension bactérienne, et pour les autres tests; on va remplir uniquement les tubes (et non les cupules) avec la création d'une anaérobiose dans

les tests: ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leur cupule par l'huile de vaseline stérile. Enfin, on incube à 37 C° ± 1C° pendant 18-24 heures (Lagha, 2015).



Figure 3. La galerie API20^E utilisés (avant l'incubation).

Lecture

La lecture des galeries API 20^E se fait selon les indications du fournisseur. Après codification des réactions en un profil numérique, on se réfère à un catalogue analytique où l'identification est donnée avec un pourcentage et une appréciation. (Annex 03).

3.5. Antibiogramme

L'antibiogramme est réalisé par la méthode de diffusion en gélose (méthode des disques), selon le communiqué du comité de l'Antibiogramme du réseau algérien, surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques (CD ROM, 2016), qui repose sur la connaissance du phénotype sauvage caractéristique de l'espèce et de différents phénotypes de résistance acquis. Ces dernières sont définies non seulement par des caractères de résistance en termes de catégories clinique ("I" ou "R"), mais aussi en termes de diminution significative de sensibilité et par des images typiques (Synergie, Antagonisme).

Technique

A partir d'une culture pure de 18-24 h sur milieu gélosé Mueller-Hinton, une suspension en 5 ml de solution saline (0,9 % NaCl) a été préparée en équivalente au standard Mc Farland 0,5 (~ 10⁸ UFC/ml).

A partir de cette suspension bactérienne, une dilution au 1/10 dans l'eau physiologique (0,9 % NaCl) a été réalisée et bien homogénéisée; puisensemencée par écouvillonnage sur des boîtes de Pétri gélosées en Mueller-Hinton.

Les disques d'antibiotiques correspondant ont été appliqués à l'aide d'un distributeur ou par un pince en appuyant légèrement ; puis incubés pendant 18-24h à 37°C ± 1°C.

Lecture

La lecture a été faite par la mesurer avec précision les différents diamètres des zones d'inhibition, en comparaison ces résultats aux valeurs critiques (Tableau 04). Les bactéries ont été classées dans l'une des catégories: Sensible, Intermédiaire, Résistance.

Tableau 4. Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour les entérobactéries (CDROM, 2016).

Famille	Antibiotique	Abréviation	Charge (µg/ml)	Diamètre critique (mm)		
				≥ S	I	≤ R
β -lactamines	Amoxicilline	AMX	10	17	14 - 16	13
	Amoxicilline+acide clavulanique	AMC	20/10	18	14- 17	13
	Céfoxitine	FOX	30	18	15 - 17	14
	Céfotaxime	CTX	30	26	23- 25	22
	Céfazoline	CZ	30	15	/	14
	Céftazidime	CAZ	30	21	18- 20	17
	Azétreoname	ATM	30	21	18- 20	17
	Ertapénème	ERT	10	22	17- 21	18
	Pipéracilline	PIP	75	20	15- 20	16
	Imipénème	IMP	10	23	18- 22	19

	Céfipime	CPM	30	24	16- 23	17
--	----------	-----	----	----	--------	----

3.6. Analyses phénotypiques des mécanismes de résistance

3.6.1. Recherche de la β -lactamase à spectre élargi (BLSE) chez les entérobactéries

3.6.1.1. Test de synergie

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

Technique

La recherche de β -lactamase à spectre étendue est fait dans les conditions standard de l'antibiogramme, puis en disposant les disques d'ATB: un disque d'Amoxicilline + acide clavulanique (AMC 20/10) et les disques de C3G (CTX 30 μ g, FEP 30 μ g, CAZ 30 μ g) et l'aztréonam (ATM 30 μ g) à une distance de 20 à 30 mm sur les boites de Pétri (Figure N°5). Incubation pendant 18 heures à 37°C \pm 1°C (Rahal *et al.*, 2011).

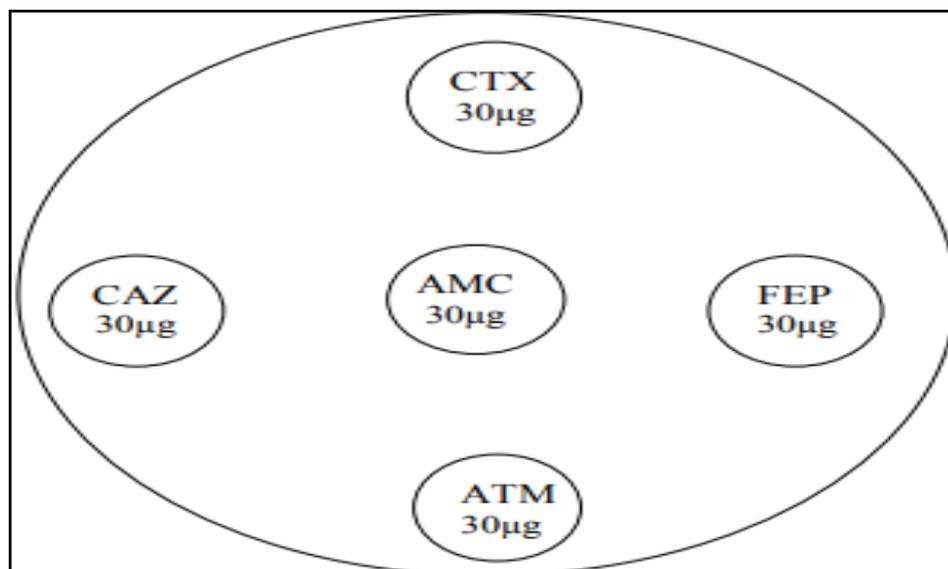


Figure 4. Disposition des disques d'antibiotiques pour le test de synergie.

Lecture

La production des enzymes BLSE se traduit par l'apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne entre les disques d'AMC et les C3G, C4G et aussi ATM (Rahal, 2005).

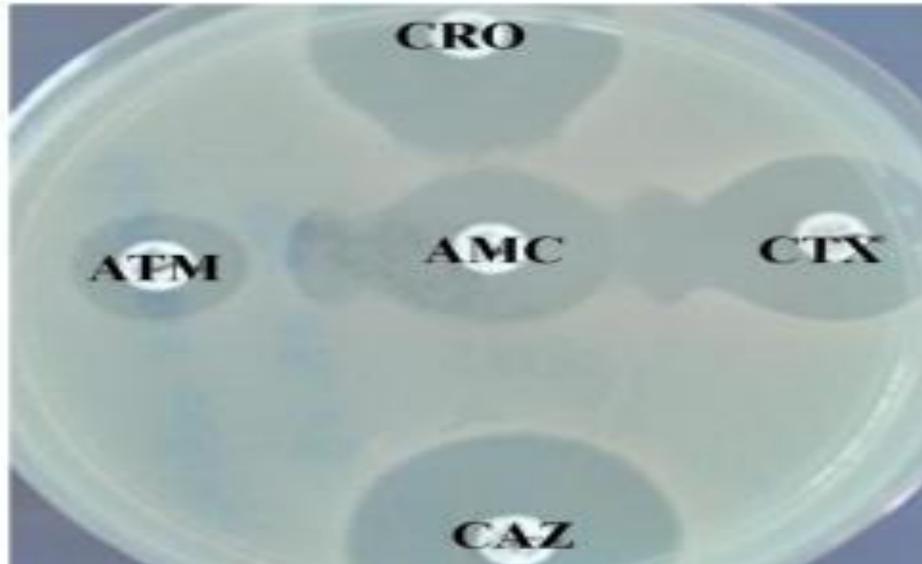


Figure 5. Test de synergie positif d'une souche d'*E.cloacae* (Bouguenoun, 2017).

Chapitre 4

Résultats et discussion

4.1. Isolement des souches

Durant une période de cinq mois de collecte qui s'est étalée à partir du premier Octobre 2019 jusqu'à la fin de Février 2020, sur un total de 45 souches non répétitives d'entérobactéries qui ont été isolées au laboratoire de bactériologie de l'hôpital El Hakim Saâdan-de la ville de Biskra, pour faire l'objectif de notre étude.

4.2. Identification des isolats

4.2.1. Observation macroscopique

L'isolement des souches sur le milieu gélosé de Mac Conkey nous a permis d'examiner la morphologie des colonies. Le tableau ci-dessous récapitule les principaux caractères des colonies observées. (fig.6)

Tableau 5. Les caractères cultureux des entérobactéries sur Mac Conkey.

Les souches bactériennes	Forme	Aspect	contour	Consistance	Couleur
<i>E.coli</i>	Colonies rondes	Lisses	à bords réguliers	Crémeuse	Rose, rouge brique
<i>K.pneumoniae</i>	Ronde et bombé	Lisse, opaques et souvent confluentes	régulier ou irrégulier	Crémeuse et très Muqueuse, Odeur désagréable caractéristique de la bactérie.	Rose, rouge brique
<i>E.cloacae</i>	Ronde	Lisse, colonies opaques	irréguliers ou irrégulier	sèches ou muqueuse	Rose légèrement irisées ou mates

Les résultats exprimés dans le tableau 05 montrent que l'observation macroscopique de *E.coli*, *E.cloacae* et *K. pneumoniae* sur milieu Mac conkey sont conformes à ceux montré par (Avril *et al.*, 2000; Fauchère et Avril, 2002; Freney *et al.*, 2008). Les aspects des colonies obtenues sont en relation avec la capacité des microorganismes à fermenter le lactose qui se trouve dans le milieu Mac conkey. Cela conduit par une coloration rose à rouge brique des colonies (Fauchère et Avril, 2002).

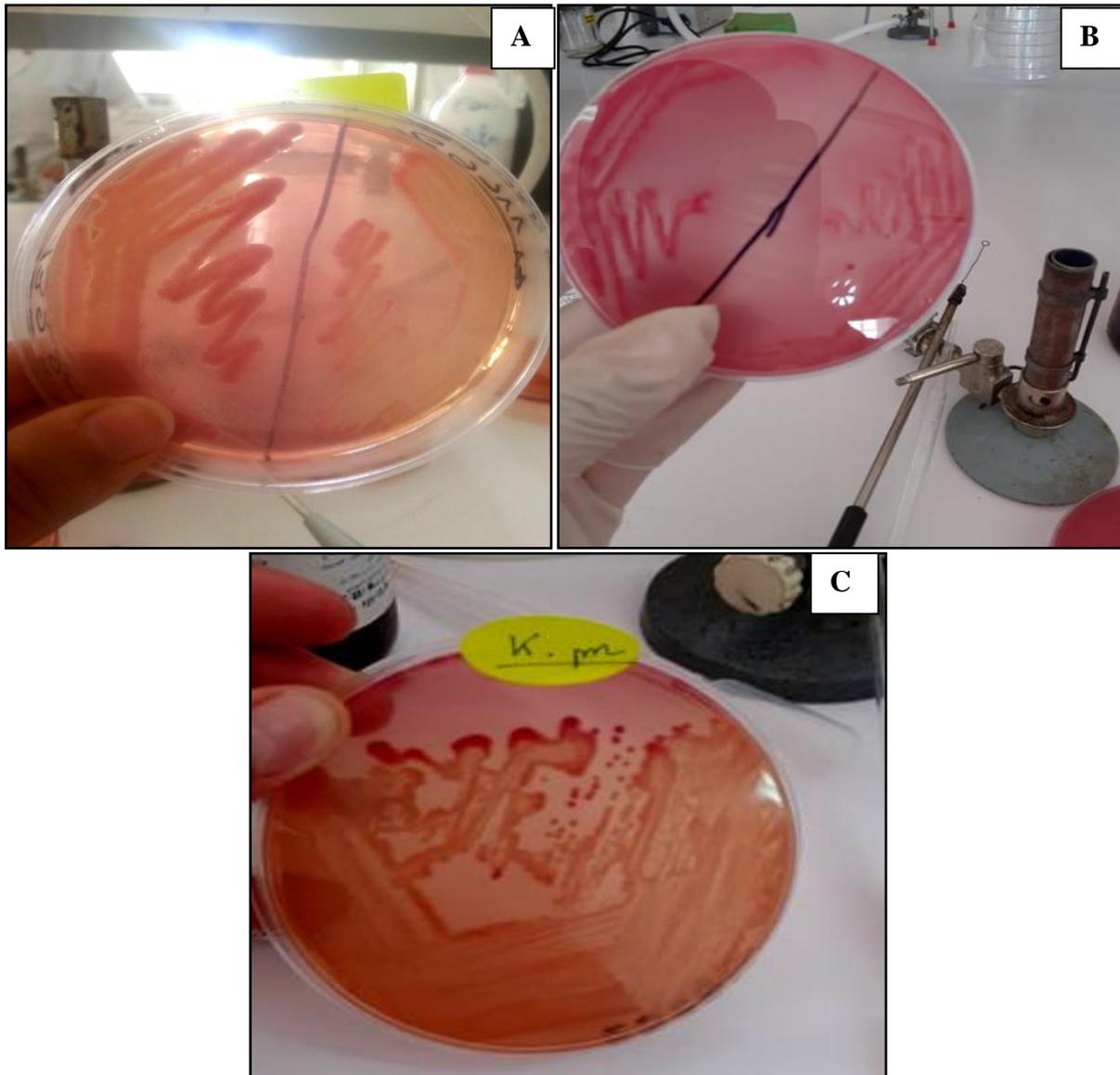


Figure 6. Aspect des colonies d'entérobactéries sur milieu Mac Conkey (A: *E.cloacae*; B: *E.coli*; C: *K.pneumoniae*).

4.2.2. Observation microscopique

4.2.2.1. Examen à l'état frais

L'observation des cellules à l'état frais indique que certaines souches sont des bacilles mobiles (*E.coli* et *E.cloacae*) et d'autres sont des bacilles immobiles (*K.pneumoniae*). Ces résultats sont compatibles avec celui de (Fauchère et Avril, 2002) (fig.7).

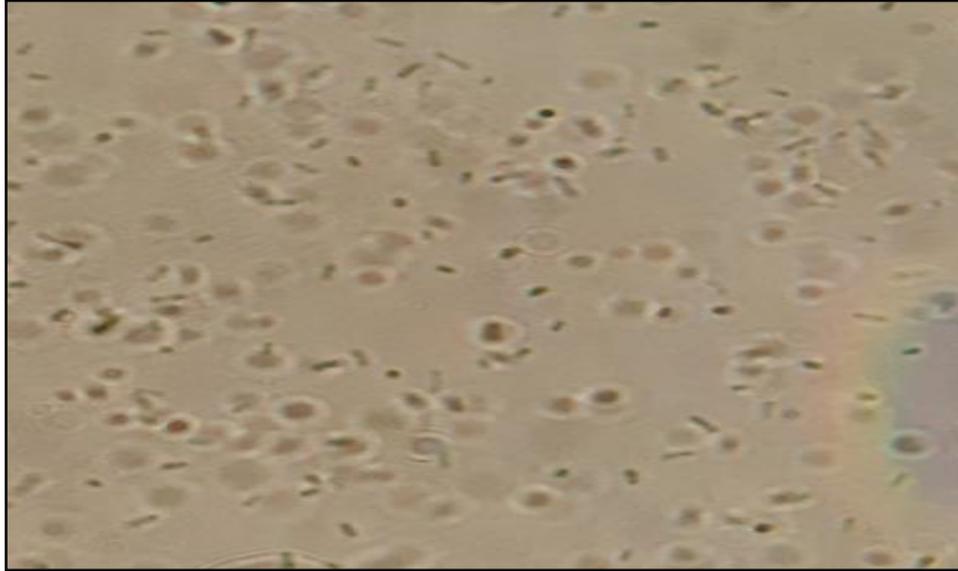


Figure 7. Observation microscopique avec l'état frais d'entérobactéries grossissement x40.

4.2.2.2. Examen après coloration de Gram

L'observation des souches étudiées après la coloration de Gram au « G x 100 », nous a révélé que ces dernières sont à Gram négatif (colorées en rose) et ont une forme en bacilles ou coccobacilles. Elles peuvent être isolées ou en paires (fig. 8). Nos résultats sont compatibles par (Fauchère et Avril, 2002; Fritz *et al.*, 2017).

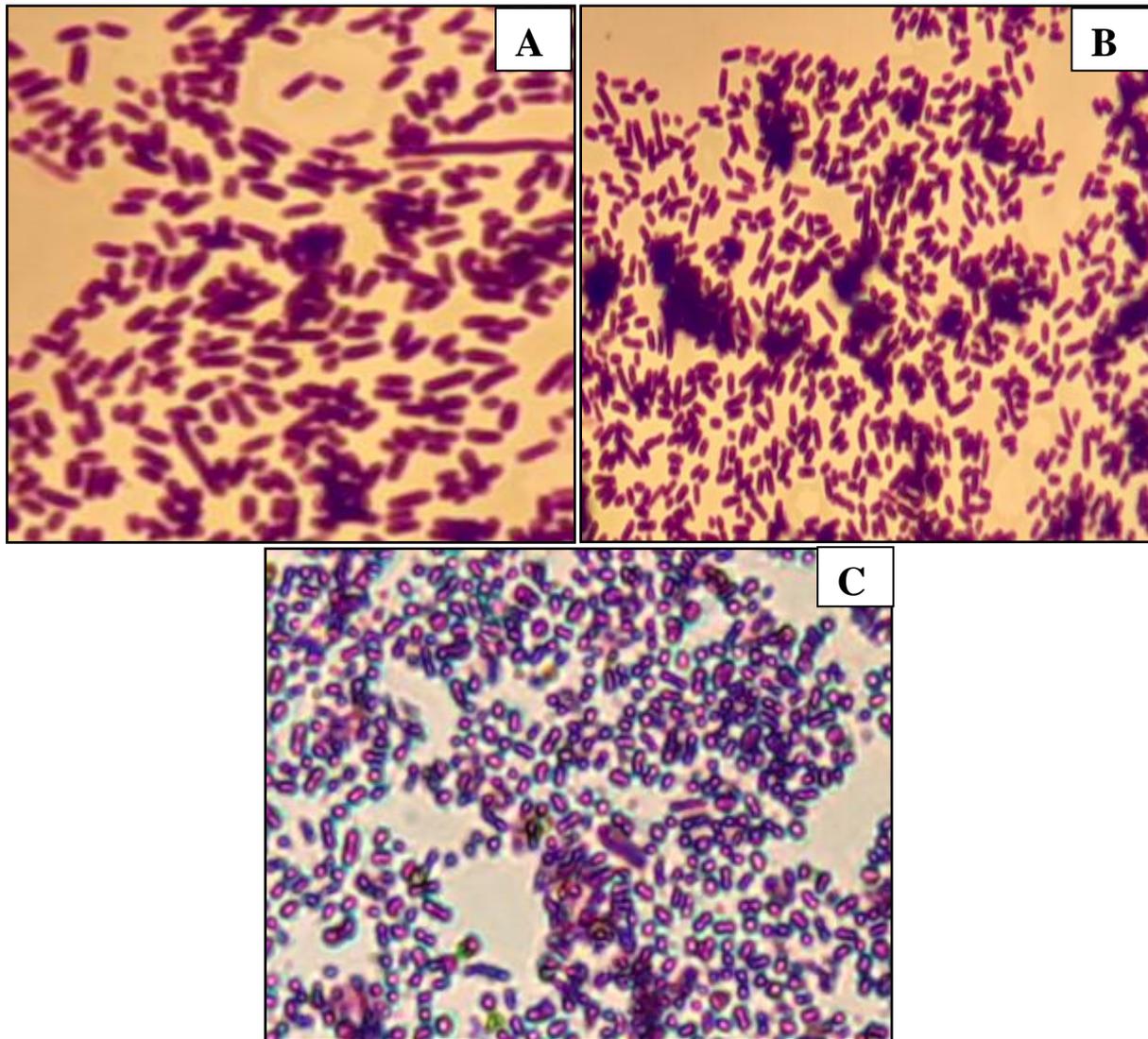


Figure 8. Observation microscopique avec coloration de Gram des isolats (A: *E.cloacae*; B: *E.coli*; C: *K.pneumoniae*) grossissement x100.

4.2.3. Identification par les testes d'orientation et identification biochimiques

4.2.3.1. Test d'oxydase

Le but du test d'oxydase est la recherche d'un système Cytochrome C des bactéries (Oxydase positive). Ce test est un bon contrôle pour les bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, car elles sont toutes oxydases négatives (Dhayanithi *et al.*, 2010).

Les résultats obtenus après le test d'oxydase sur les trois souches étudiées montre l'absence totale de coloration violet cela indique que ces souches a étaient dépourvues d'oxydase (oxydase négative). Ces résultats sont confirmés par la littérature (Freney *et al.*, 2007; Jean. *et al.*, 2007)(Fig.9).

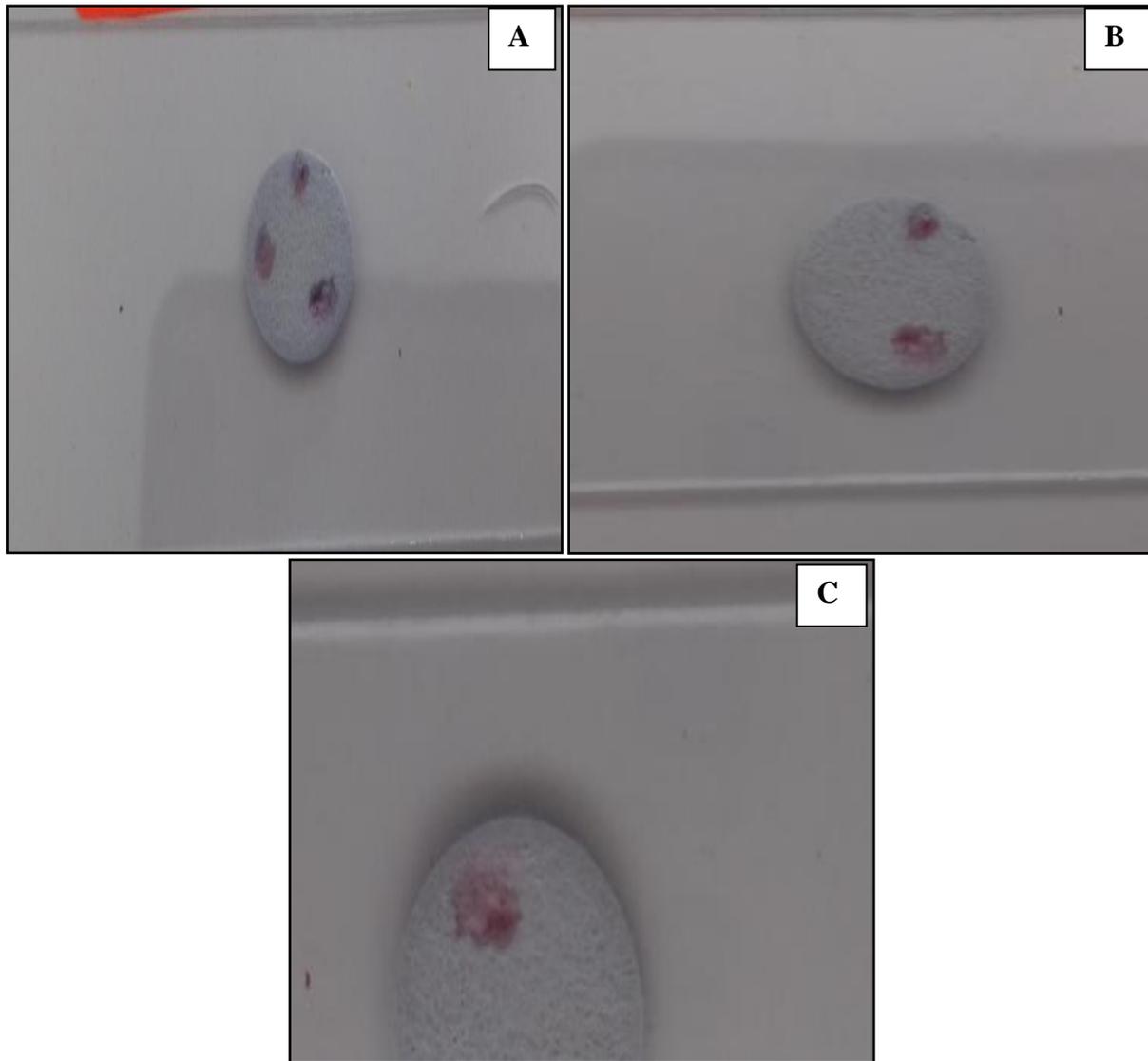


Figure 9. Résultat de test d'oxydase des isolats (A: *E.cloacae*; B: *E.coli*; C: *K.pneumoniae*).

4.2.3.2. 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 45 souches testées.

Après avoir effectué le test catalase, toutes les souches d'entérobactéries que nous avons étudiées ont présenté un caractère catalase positive, ces résultats sont confirmés par la littérature dite: la plupart des entérobactéries possèdent la catalase (catalase positive), sauf chez un sérovar de *Shigella dysenteriae* (Avril *et al.*, 2000; François *et al.*, 2011) (Fig.10).

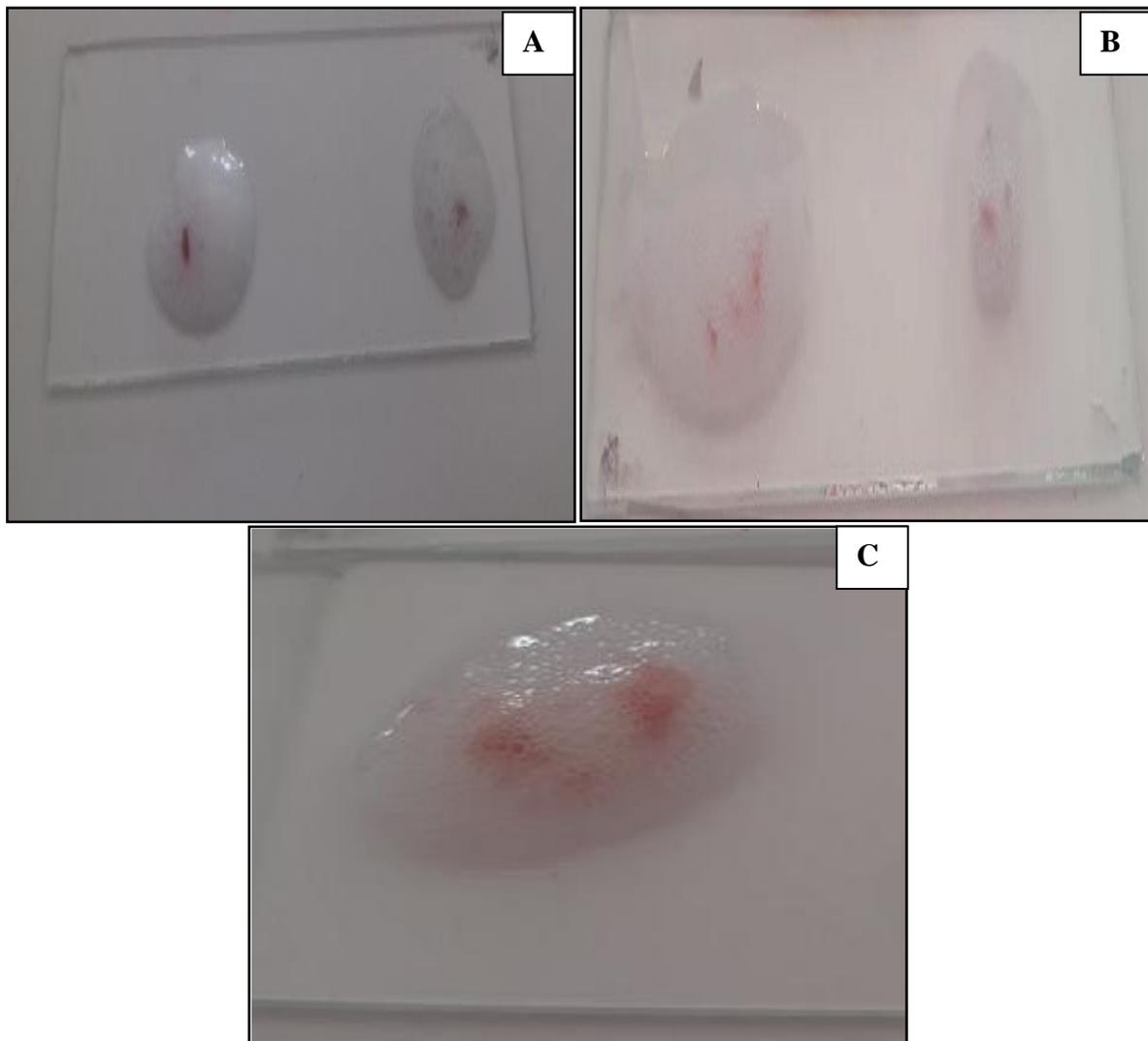


Figure 10. Résultat de test de catalase des isolats (A: *E.cloacae*; B: *E.coli*; C: *K.pneumoniae*).

4.2.3.3. La galerie biochimique classique

La galerie biochimique nous a permis d'identifier quelques caractères biochimiques des souches étudiés. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 06.

Tableau 6. Résultats finaux de la galerie biochimique classique obtenus pour les 34 souches étudiés d'entérobactéries.

Les souches	Les caractères biochimiques										
	Mannitol Mobilité- Nitrate réductase			Citrate de Simmons	TSI				Urée-Indole		
	Mannitol	Nit	Mob		Glu	Sac	H ₂ S	Gaz	urée	Ind	TDA
<i>E.cloacae</i> (8 souches)	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>E.coli</i> (13 souches)	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
<i>K.pneumoniae</i> (13 souches)	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-

(+): Test positive; (-): Test négative; **Nit**: Nitrate réductase ; **Mob**: Mobilité; **Glu** : Glucose ; **Sac**: Saccharose; **H₂S**: Hydrogène sulfuré; **Ind**: Indole; **TDA** : Tryptophane désaminase.

Les résultats exprimés dans le tableau 06 montrent que l'identification biochimique à été réalisé par les tests de la galerie classique pour analyser les principaux caractères biochimiques des isolats (*E.coli*, *E.cloacae* et *K. pneumoniae*). Nos résultats sont conformes à ceux montré par (Fauchère et Avril, 2002; François *et al.*, 2011; Fritz *et al.*, 2017).

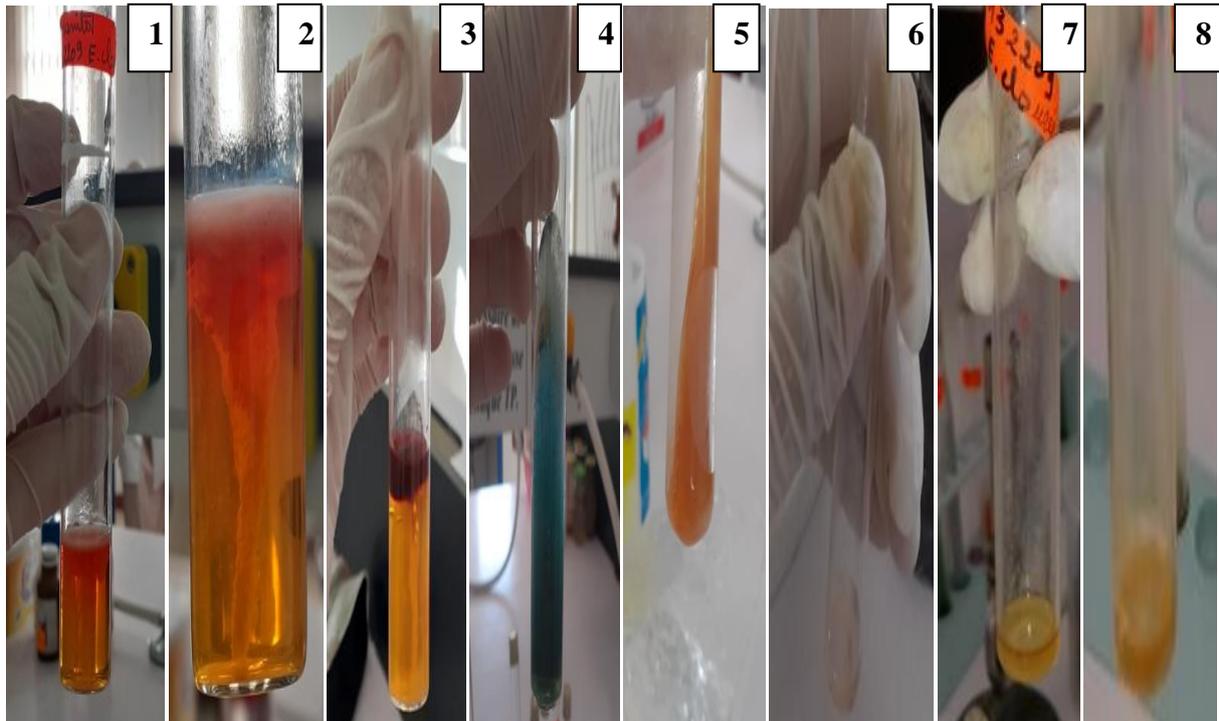


Figure 11. L'identification biochimique d'*E.cloacae* par la galerie classique (1: Mannitol; 2: Mobilité; 3: Nitrate réductase; 4: Citrate de Simmons; 5: TSI; 6: Urée; 7: Indole; 8:TDA).

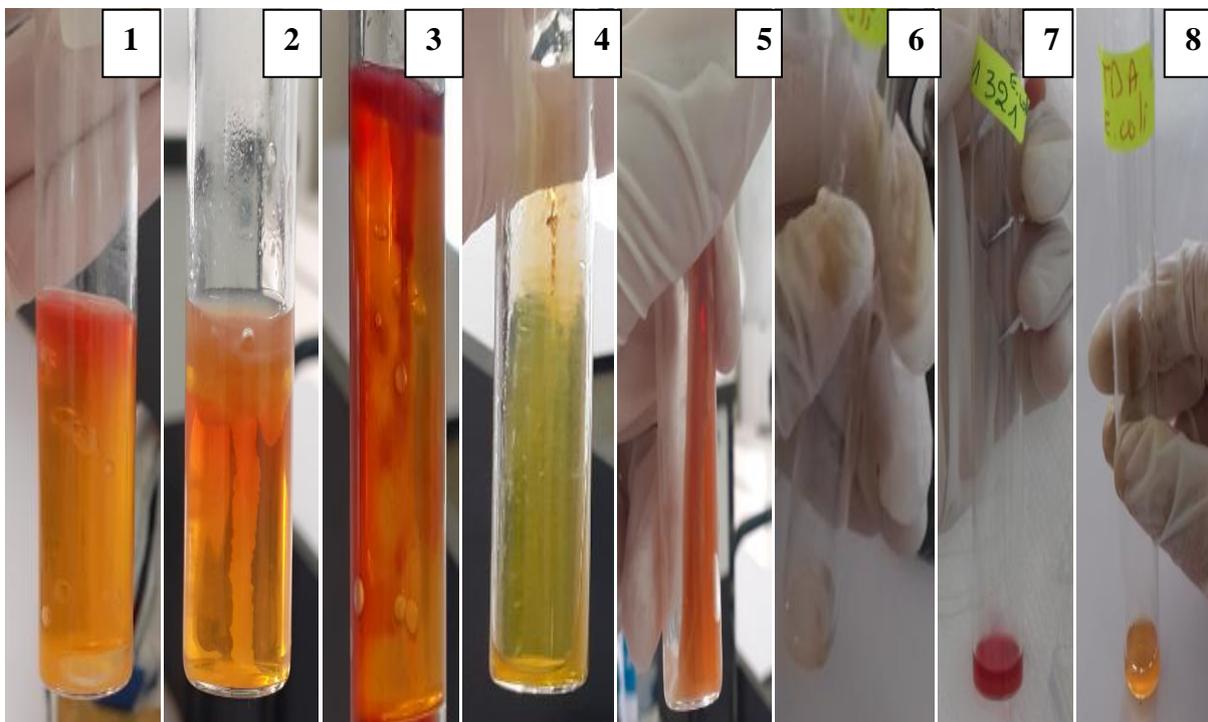


Figure 12. L'identification biochimique d'*E.coli* par la galerie classique (1:Mannitol; 2: Mobilité;3: Nitrate réductase; 4:Citrate de Simmons; 5: TSI; 6: Urée; 7:Indole; 8:TDA).

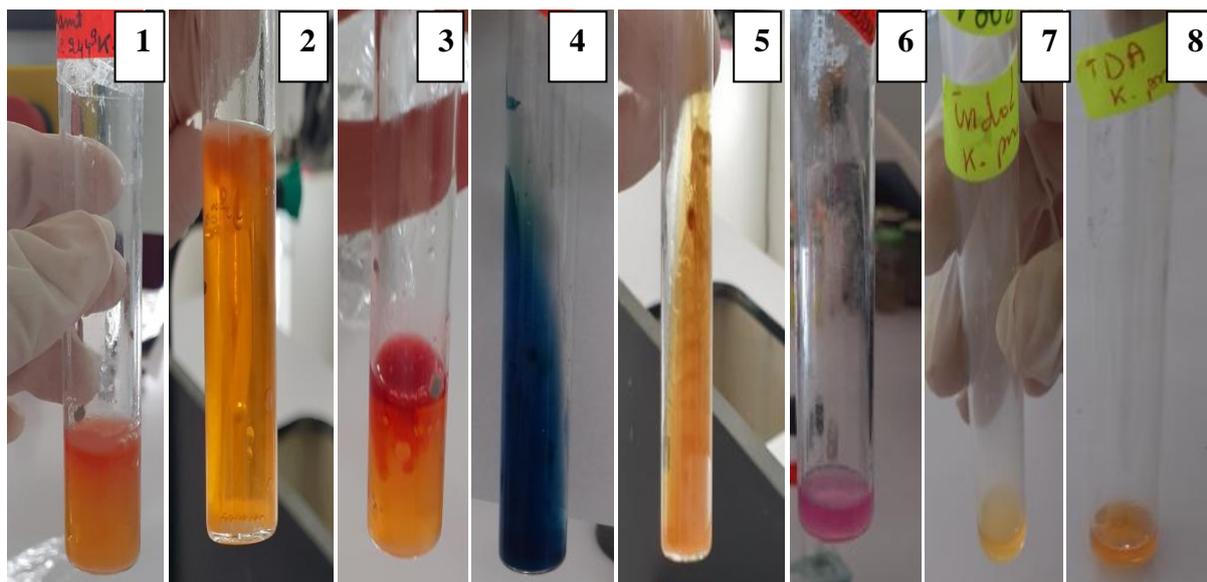


Figure 13. L'identification biochimique de *K.pneumoniae* par la galerie classique (1: Mannitol; 2: Mobilité; 3: Nitrate réductase; 4: Citrate de Simmons ; 5: TSI; 6: Urée; 7: Indole; 8: TDA).

4.2.3.4. Galeries API 20^E

L'identification des 11 souches d'origine clinique a été déterminée par API20^E (système d'identification) à l'aide d'un outil en ligne gratuite (UPBM.LAB) (fig. 14) a permis de mettre en évidence les principaux caractères biochimique liée aux les trois espèces étudiés. Les galeries ont été lus en et comparés avec le tableau de lecture des galeries (voir annexe 02).

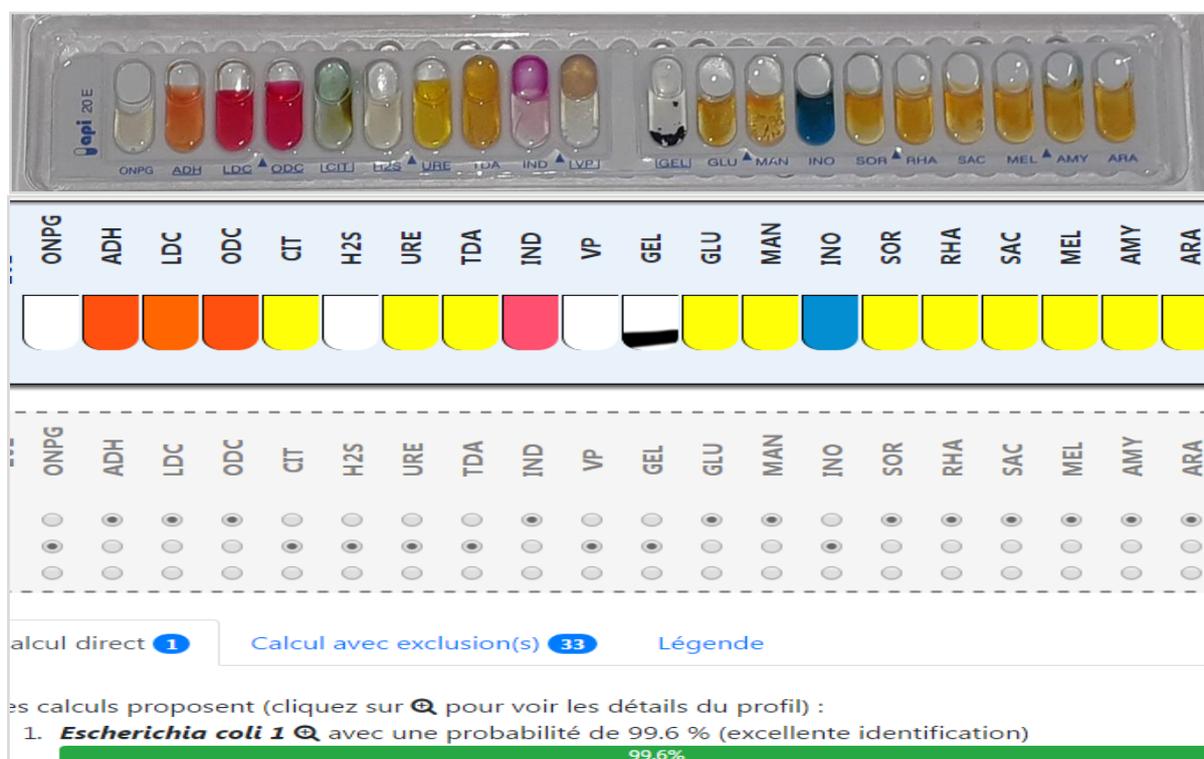


Figure 14. Résultats d'identification des souches d'*E.coli* par galerie API20^E et outil en ligne gratuite UPBM.LAB.

4.3. Provenance des souches collectées

La provenance des entérobactéries identifiées et les informations concernant chaque isolat (dont 18 souches de *K. pneumoniae*, 17 d'*E.coli* et 10 d'*E.cloacae*) sont présentées dans le tableau 07.

Tableau 7. Provenance des *Enterobacteriaceae* identifiées, isolées des patients hospitaliers et non hospitaliers.

Espèce	Code	Date de prélèvement	Service	Type de prélèvement	Sexe / Age
<i>Escherichia coli</i>	E1	11/2019	Pédiatrie	Urine	M/1 ans
	E2	11/2019	Externe	Urine	F/5 ans
	E3	11/2019	Externe	Urine	F/25 ans
	E4	11/2019	Médecine interne femme	Pus	F/30 ans
	E5	12/2019	Externe	Urine	F/92 ans
	E6	12/2019	Externe	Urine	F/34 ans
	E7	12/2019	Médecine interne femme	Urine	F/67 ans
	E8	12/2019	Externe	Urine	F/71 ans
	E9	01/2020	Oncologie	Urine	M/65 ans
	E10	01/2020	Externe	Urine	F/92 ans
	E11	01/2020	Externe	Urine	F/74 ans
	E12	01/2020	Externe	Urine	F/53 ans
	E13	01/2020	Externe	Urine	F/31 ans
	E14	01/2020	Externe	Urine	F/4 ans
	E15	02/2020	Pédiatrie	Urine	M/1 ans

	E16	02/2020	Médecine interne femme	Urine	F/76 ans
	E17	02/2020	Externe	Urine	F/54 ans
<i>Enterobacter cloacae</i>	C18	11/2019	Pédiatrie	Urine	M/9 mois
	C19	11/2019	Externe	Urine	M/69 ans
	C20	11/2019	Externe	Urine	M/80 ans
	C21	11/2019	Néonatalogie	Sang	F/45jours
	C22	12/2019	Pédiatrie	Urine	M/2 mois
	C23	12/2019	Externe	Pus	M/38 ans
	C24	01/2020	Externe	Urine	M/68 ans
	C25	01/2020	Externe	Pus	F/67 ans
	C26	02/2020	Externe	Urine	M/38ans
	C27	02/2020	Externe	Pus	F/48ans
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	K28	10/2019	Pédiatrie	Urine	M/50jour
	K29	11/2019	Médecine interne femme	Pus	F/55ans
	K30	11/2019	Externe	Urine	F/7ans
	K31	11/2019	Néonatalogie	Sang	F/35jours
	K32	11/2019	Néonatalogie	Cathéter	M/2mois
	K33	11/2019	Pédiatrie	Urine	M/3mois
	K34	11/2019	Médecine interne homme	Urine	M/30ans
	K35	12/2019	Médecine interne femme	Pus	F/65ans
	K36	12/2019	Pédiatrie	Urine	F/1mois

K37	12/2019	Externe	Urine	M/19ans
K38	12/2019	Pédiatrie	Urine	F/1mois
K39	12/2019	Médecine interne homme	Urine	M/69 ans
K40	01/2020	Externe	Pus	M/31ans
K41	01/2020	Externe	Urine	F/35 ans
K42	01/2020	Externe	Pus	M/48 ans
K43	01/2019	Externe	Urine	F/50 ans
K44	02/2020	Externe	Pus	M/52 ans
K45	02/2020	Pédiatrie	Urine	F/6 ans

F : Femme, **H** : Homme

4.4. Répartition des isolats

4.4.1. Répartition des entérobactéries selon l'espèce

Les résultats de la fréquence des entérobactéries est présente dans la figure 15 selon l'espèce (*E.coli*, *K.pneumoniae* et *E.cloacae*).

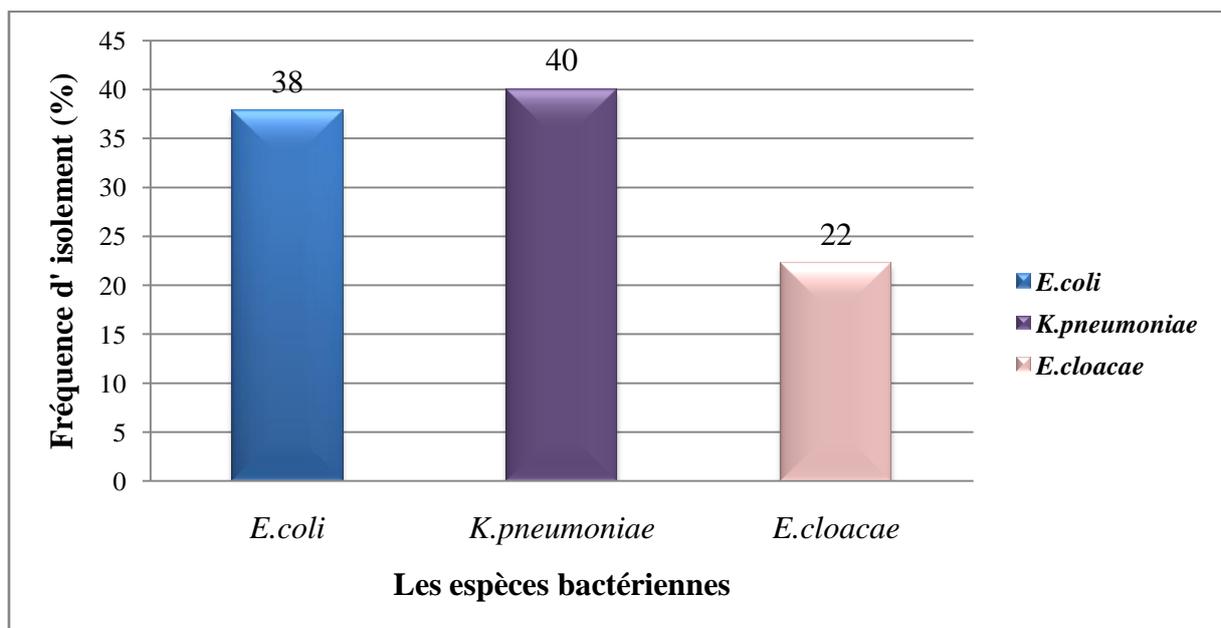


Figure 15. Répartition des entérobactéries selon les espèces.

Au total, 45 souches d'entérobactéries ont été collectées, elles sont réparties comme suit: l'espèce *K.pneumoniae* est prédominante avec une fréquence de 40% suivie par *E. coli* avec une fréquence de (38%) et *E.cloacae* (22%) (Fig.15).

Nos résultats montrent la prédominance de *K. pneumoniae* ce qui est en accord avec les résultats de Wolf *et al.* (2001) au Brésil avec un taux de 45%. Au Maroc, avec 52% d'après Qassimi (2010), et avec 60% selon Jans et Catry (2012) en Belgique. Tandis que, nos résultats sont inférieurs à ceux retrouvés dans la littérature, à l'échelle nationale, le 15^{ème} rapport du AARN en 2014 et dans l'étude de Bouguenoun (2017) avec un taux de 52,47%, 52% respectivement. D'autres études d'Akel (2014) et Ben-helalet *et al.* (2016) ont montré la prédominance de *K. pneumoniae* suivi par *E.cloacae* et *E.coli*.

Nos résultats diffèrent avec ceux obtenus dans d'études de Lagha (2015) et Larouci (2017) en Algérie et en Marrakech par Tidrarine (2019) qui ont trouvés que *E. coli* occupe la première place avec des taux de 43%, 42% et 56.25 % respectivement, suivi par *K. pneumoniae*. L'étude de Lahlou (2010) en Meknès; El-mahi (2013) au Rebat et Turmel (2014) en France ont montré que *E.coli* était également l'espèce la plus fréquemment isolée.

Les entérobactéries, ce sont l'un des familles de bactéries fréquemment isolées dans les laboratoires de bactériologie, *E. coli* et *Klebsiella spp* étant les espèces revenant le plus souvent (Bao, 2013 et Rangaiahagari *et al.*, 2013).

4.4.2. La répartition des entérobactéries au cours du temps

Au cours des 05 mois d'étude, la fréquence des souches isolées des entérobactéries a atteint un seuil élevé au mois de Novembre pour *K.pneumoniae* et *E.cloacae* représentant respectivement 18% et 9% .Tandis que, *E.coli* représente une valeur élevée au mois de Janvier est égale 13%, alors que le taux le plus faible a été au mois d'Octobre pour les trois souches (Fig.16).

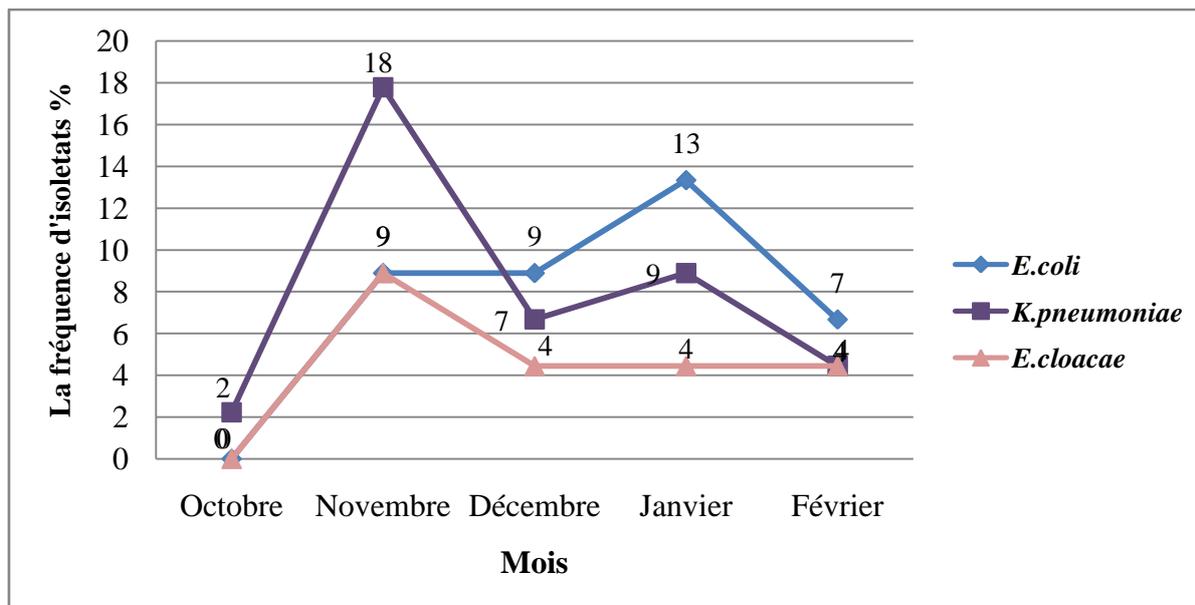


Figure 16. Répartition des entérobactéries au cours du temps.

Malgré la rareté des informations concernant l'influence des saisons sur les infections causées par les différentes espèces d'entérobactéries mais d'après Nyaledome (2016), le taux des infections bactériennes subissent l'influence des conditions climatiques comme l'humidité saisonnière.

4.4.3. La répartition des entérobactéries selon le type de prélèvement

La figure 17 montre que parmi les 45 souches cliniques d'entérobactéries isolées à partir de différent type de prélèvement, les urines constituent le spécimen le plus répandu d'*E. coli* (36%) suivi de *K. pneumoniae* (24%) et *E. cloacae* (13%).

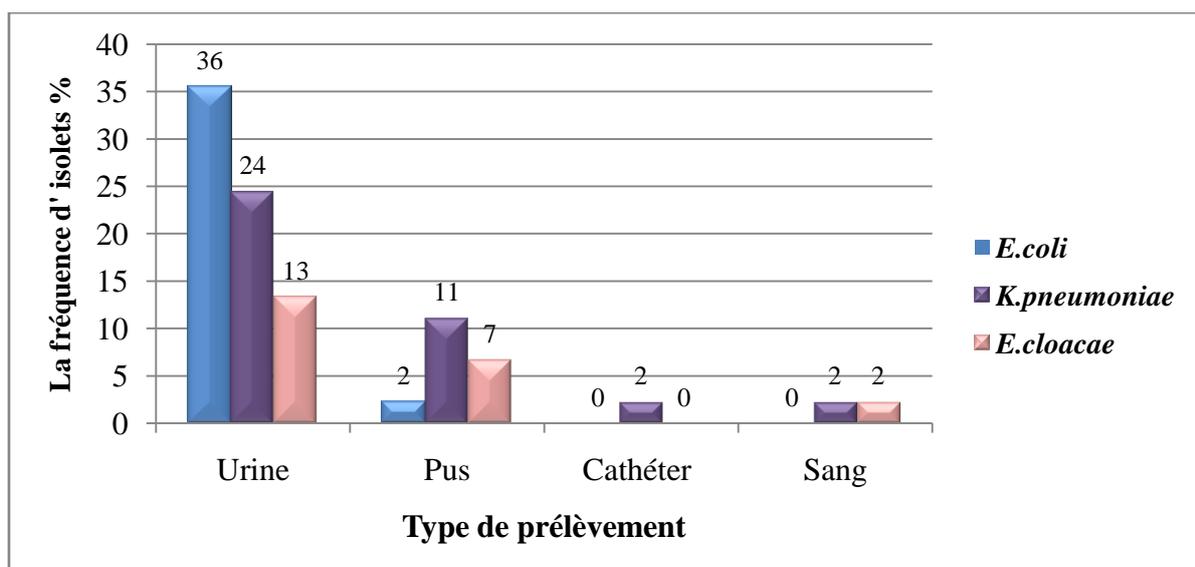


Figure 17. Répartition des souches par nature des prélèvements.

D'après nos résultats, on constate que la distribution des entérobactéries isolées en fonction des types de prélèvements révèle leur prédominance dans les prélèvements urinaires par rapport aux autres. Ceci est comparable aux résultats retrouvés dans la littérature, à l'échelle nationale, le 17^{ème} rapport de l'AARN en 2016, à l'HMIMV de Rabat en 2014 et au CHU de Fès en 2016 où *E.coli* représentait l'agent principal des infections urinaires (Tagajdid *et al.*, 2008), Belbel (2013) pour *K. pneumoniae* et Boudjemaa (2014) pour *E.cloacae*

En revanche, les taux minimaux ont été trouvés dans le sang et les cathéters respectivement.

4.4.4. La répartition des entérobactéries selon les services

La répartition des souches isolées selon le service est représentée dans la figure 18.

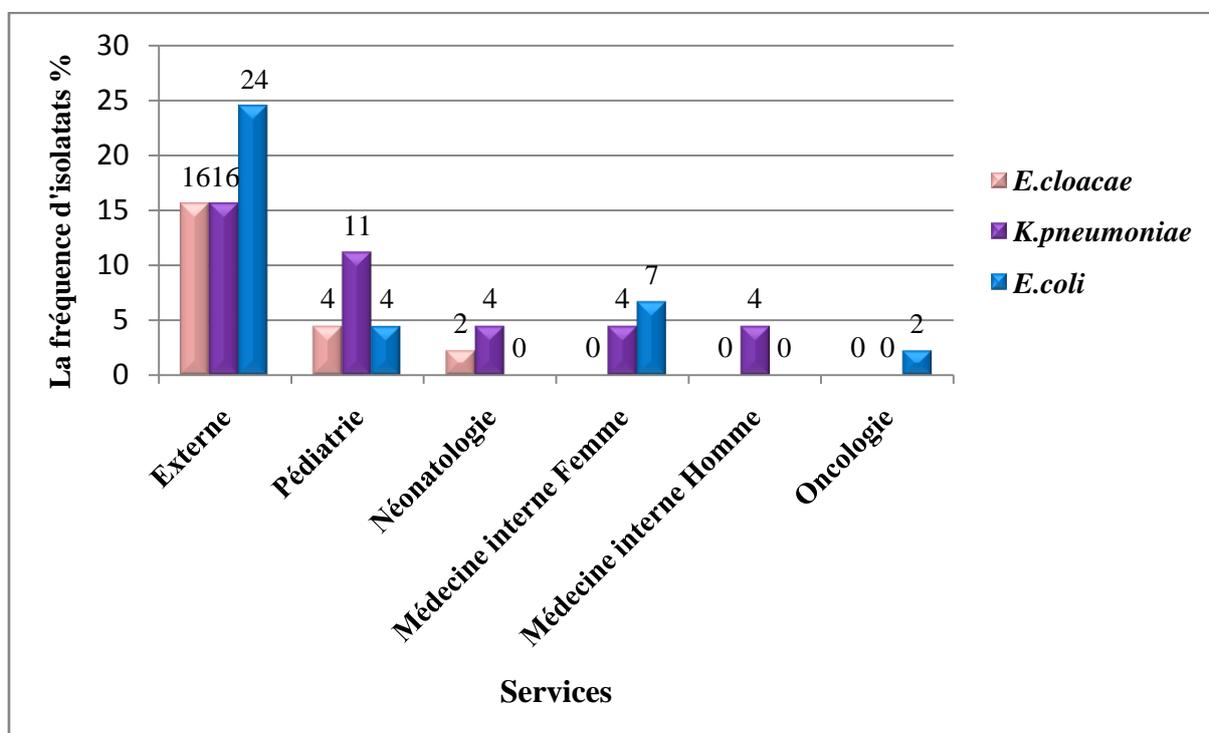


Figure 18. Répartition des entérobactéries selon les services.

La distribution des souches d'entérobactéries identifiées est variable selon les services. D'après les résultats obtenus, on a trouvé que les patients non hospitalisés (externes) semblent être les plus incriminés par les infections à *E. coli* avec (24%) suivi d'*E. cloacae* et *K. pneumoniae* (16%). Ceci peut revenir au fait que le laboratoire de bactériologie de l'hôpital incriminé dans notre étude reçoit des prélèvements des patients hospitalisés dans d'autres secteurs hospitaliers tel que El-Bachir Ben Nacer à cause du manque des laboratoires de bactériologie ainsi que les personnes non hospitalisés.

Nos résultat est concordent avec ce qui a été retrouvé dans l'étude de Tidrarine (2019) qui a trouvé que la majorité des entérobactéries sont issu de la consultation externe, qui pourrait être expliquée par l'utilisation des antibiotiques multiples ou à large spectre, manque d'hygiène ou une hospitalisation antérieure des patients, qui sont des facteurs qui pourront justifier ce taux important d'isolats en provenance de patients externes.

4.4.5. La répartition des entérobactéries selon le sexe

La répartition des isolats d'entérobactéries selon le sexe est présentée dans la figure 19.

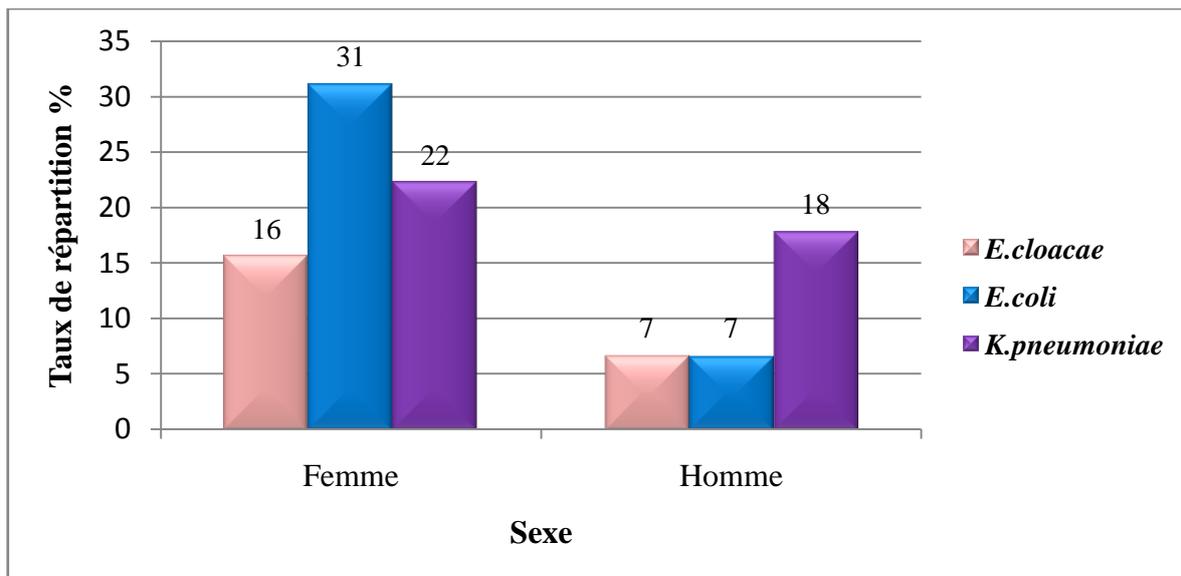


Figure 19. Répartition des isolats d'entérobactéries selon le sexe.

Les résultats exprimés dans la figure 19 montrent que les femmes représentent le taux d'infections le plus élevé pour les trois espèces isolées comparés aux hommes. Cela est expliqué par des facteurs anatomiques et physiques (Kumar *et al.*, 2006 et Naber *et al.*, 2009).

Ces résultats concordent avec les données des études rapportées à l'Est Algérien par Belbel (2013), Khennouchi (2015) et (Mellouk, 2016) qui ont révélé une prédominance féminine.

4.4.6. Répartition des entérobactéries selon l'âge

La figure 20 représente les résultats de la répartition des entérobactéries selon quatre tranches d'âge.

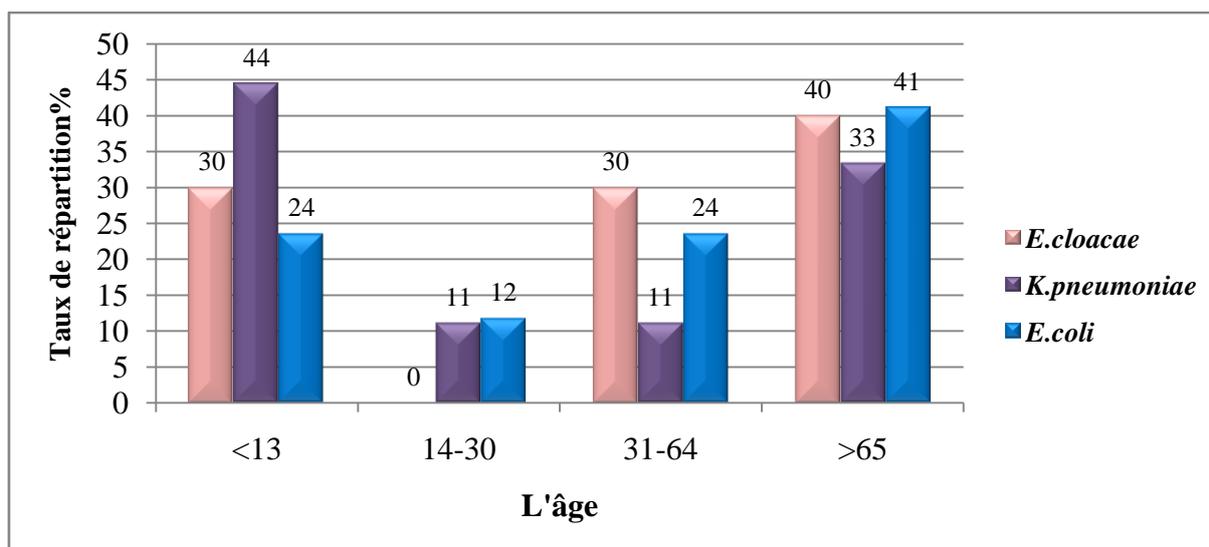


Figure 20. Répartition des isolats d'entérobactéries selon l'âge.

D'après nos résultats exprimés dans la figure 20, on constate que toutes les tranches d'âges sont touchées par les infections aux entérobactéries, avec des extrêmes d'âge variant entre 35 jours et 92 ans. En effet, la catégorie la plus touchée par *K. pneumoniae* est celle des enfants (moins de 13 ans) avec un taux de 44%. Cela est proche de celui trouvé par Belbel (2013) (51%). Sachant que, la tranche d'âge la plus touchée dans notre étude par les souches d'*E. cloacae* et d'*E. coli* est la population des personnes âgées de plus de 65 ans avec des taux 40% et 41% respectivement, correspondant à ceux trouvés par Khennouchi (2015) et Mellouk (2016) avec des taux 45% et 48% respectivement.

Les caractéristiques des patients influent sur le risque de développement de diverses infections. Les personnes âgées sont les plus à risque de développer des infections, peut-être d'une part, à cause d'immuno-sénescence, le déclin du système immunitaire et d'autre part, la prévalence très élevée de comorbidités (patients diabétique) (Eckenrode *et al.*, 2014).

4.5. L'étude de la résistance aux antibiotiques

4.5.1. Antibiogramme par diffusion de disques sur un milieu gélosé

L'interprétation des résultats de l'antibiogramme des souches testées (sensibles, intermédiaire, résistantes) a été faite selon les diamètres critiques recommandés par le comité algérien (2016) (Fig.21-22-23) (annexe 03).

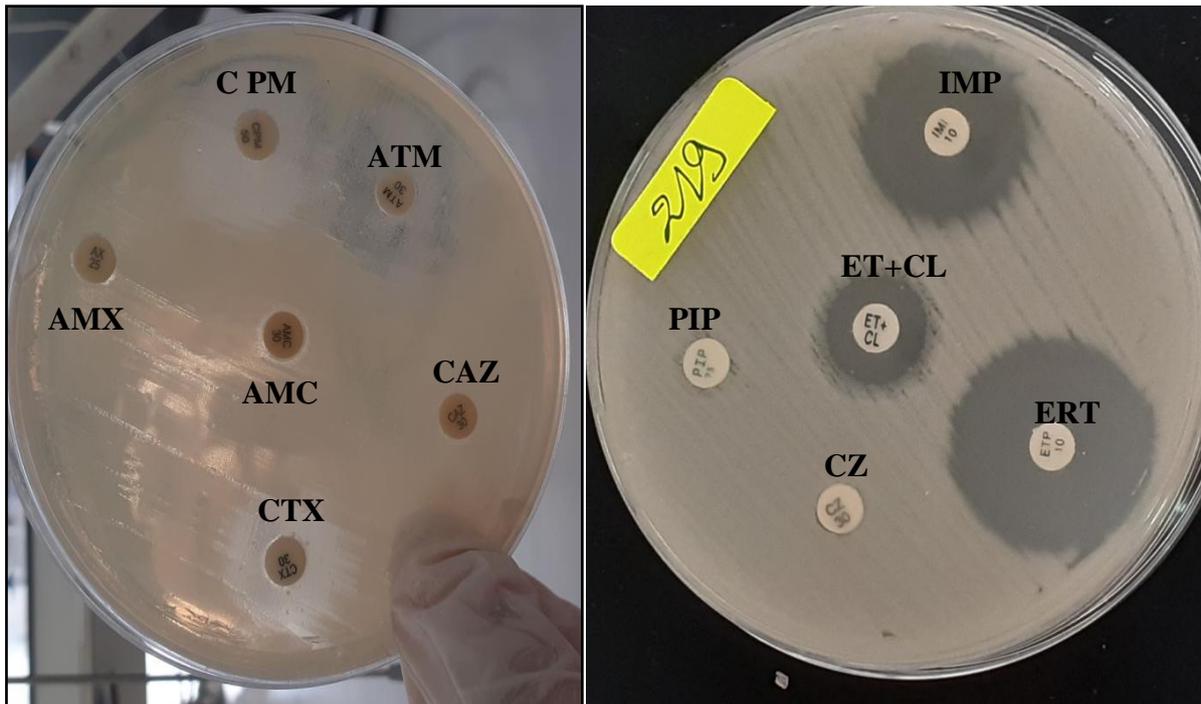


Figure 21. L'antibiogramme d'une souche d'*E. cloacae*.

AMC: amoxiciline+acide clavulanique, **ATM:** Aztréonam, **AMX:** amoxicilline, **CPM:** céfipime, **CTX:** céfotaxime, **CAZ:** céftazidime, **CZ:** céfazoline, **PIP:** piperacilline, **IMP :** imipénème, **ERT:** értapénème, **ERT :** értapénème+ acide clavulanique.

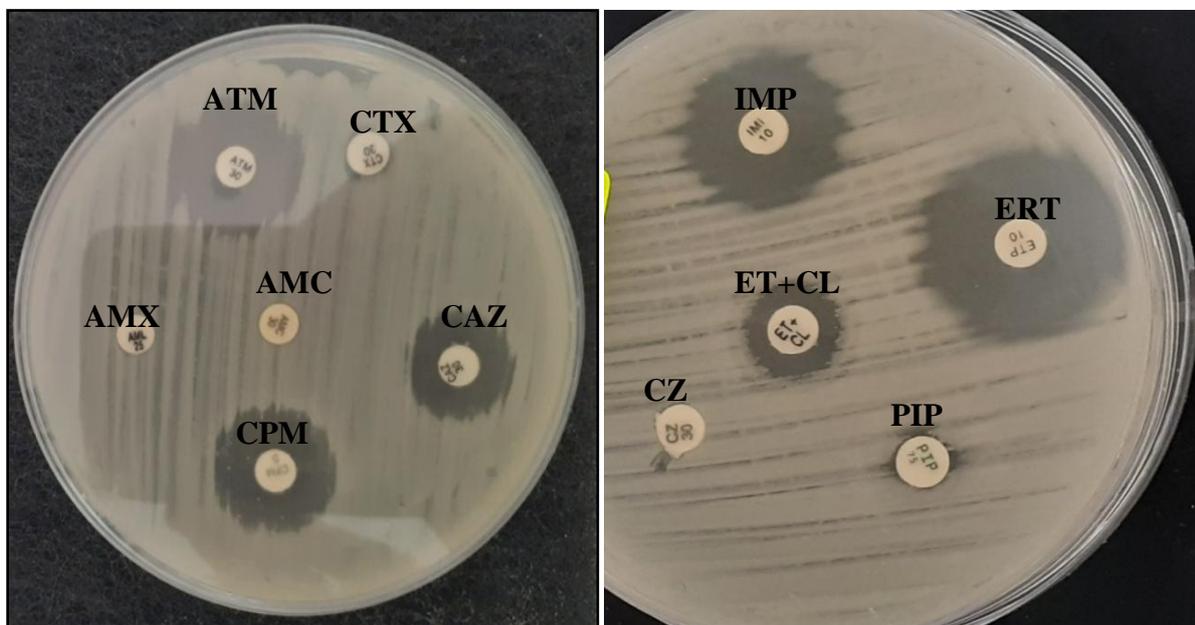


Figure 22. L'antibiogramme d'une souche de *K. pneumoniae*.

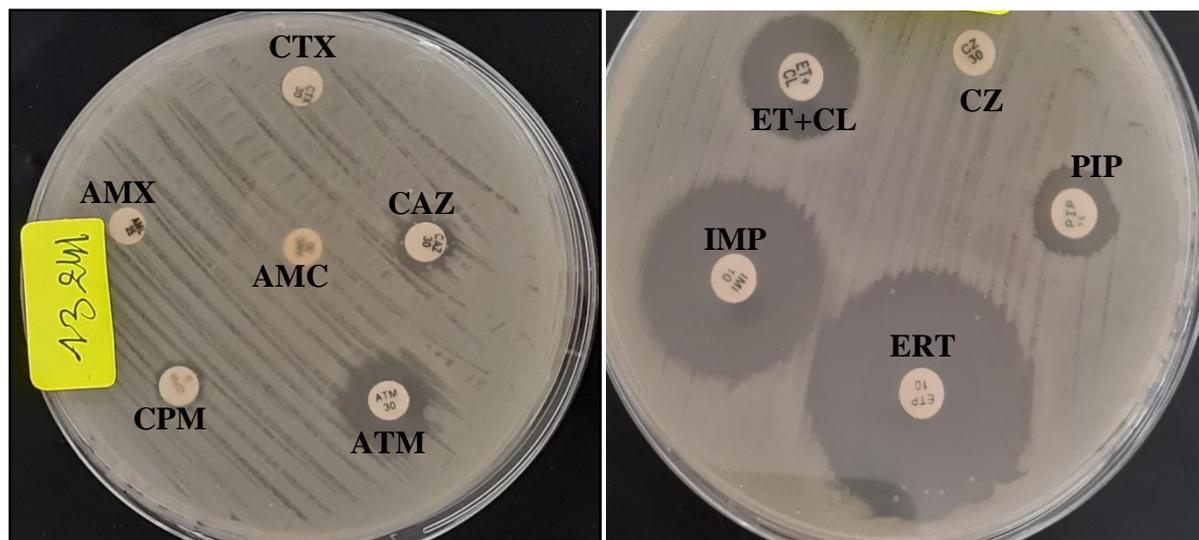


Figure 23. L'antibiogramme d'une souche d'*E.coli*.

Les niveaux des résistances bactériennes varient d'un pays à l'autre et d'une année à l'autre. Aussi, la connaissance de la situation locale et de son évolution sont nécessaires pour le choix de l'antibiothérapie de première intention (El Bakkouri *et al.*, 2009). En effet, nos résultats montrent un haut niveau de résistance aux β -lactamines chez les trois espèces étudiés (*K. pneumoniae*, *E. coli* et *E. cloacae*). Ces résultats ont probablement déjà été rapportés dans plusieurs études dans le monde entier (Touati *et al.*, 2008; Touati *et al.*, 2010; Dali, 2015; Sahu *et al.*, 2016; Jalapoor, 2011; Bouguenoun *et al.*, 2016).

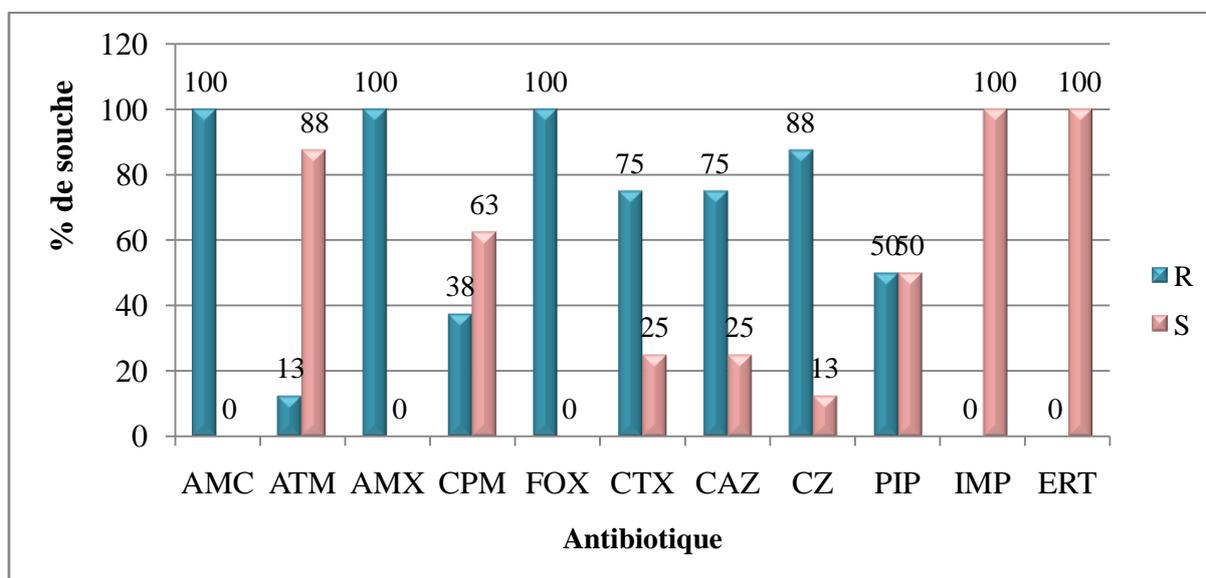


Figure 24. Profil de résistance des *E.cloacae* aux β -lactamines.

AMC: amoxiciline+acide clavulanique, **ATM:** Aztréonam, **AMX:** amoxicilline, **CPM:** céfépime, **FOX:** céfoxitine, **CTX:** céfotaxime, **CAZ:** céftazidime, **CZ:** céfazoline, **PIP:** piperacilline, **IMP :** imipénème, **ERT:** értapénème,

D'après l'analyse des nos résultats de l'antibiogramme d'*E. cloacae*, on a révélé un haut niveau de résistances aux l'antibiotiques suivants: Amoxicilline, Amoxicilline+ acide clavulanique et céfoxitine (100%). Ces résultats sont parfaitement en accord avec ceux trouvées par Bouguenoun (2017) et Toudji *et al.* (2017). Ainsi, pour la pipéracilline, on a constaté un taux de 50% qui est proche à celui trouvé par Boudjemaa (2014) avec 66%.

Le taux de résistance des nos isolats vis-à-vis la céfazoline était de 88%. Nos résultats restent dans le cadre de Mellouk (2016). Tandis que, la résistance à la céfotaxime et céftazidime sont 75%. Cela est inférieur à ceux rapportés par Toudji *et al.* (2017) qui ont trouvé 100% des souches résistante.

Concernant la céfépime, on a détecté 38% des souches résistantes. Ce résultat est inférieur à celui trouvé par Boudjemaa (2014) (52%).

Pour l'aztréonam, on a détecté 13% des souches résistantes, notre résultat est très proche à celui trouvée par Lagha (2015) avec un taux 18%. Alors qu'il est très inférieur à ce qui a été trouvé par Khennouchi (2015) (63%).

Dont aucune résistance n'a été détectée pour l'imipénème (IMP) et l'ertapénème (ERT). Ces résultats sont similaires à ceux trouvées par Khennouchi (2015) et Toudji *et al.* (2017). Tandis qu'ils sont différents à ceux trouvés par Boudjemaa (2014) avec un taux de 6.3% pour l'IMP et Bouguenoun (2017) avec un taux 40% pour l'ERT.

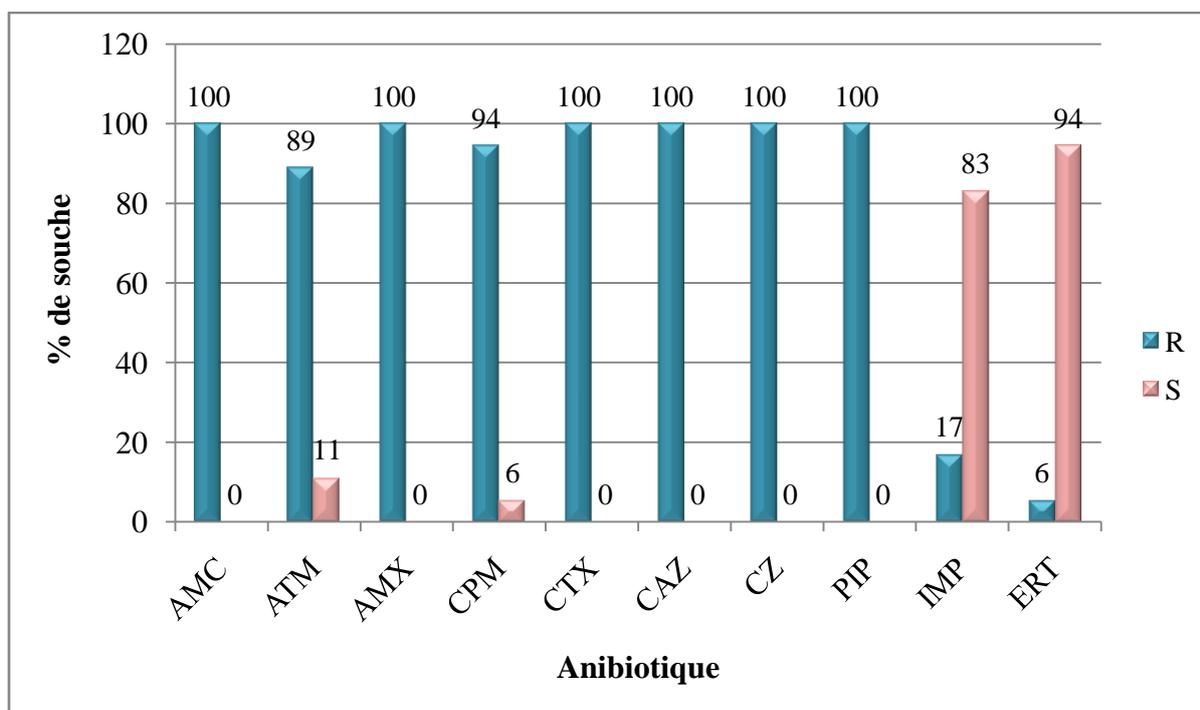


Figure 25. Profil de résistance des *K.pneumoniae* aux β -lactamines.

K. pneumoniae est une entérobactérie dotée d'une grande importance dans l'hospitalisme infectieux (Abid *et al.*, 2007). Il est bien connu que les β -lactamines sont les antibiotiques de premier choix pour le traitement des infections à *K. pneumoniae* aussi bien chez l'adulte que chez l'enfant (Rebuck *et al.*, 2000 et Hussein *et al.*, 2007).

D'après l'analyse des nos résultats de l'antibiogramme de *K. pneumoniae* on a noté une résistance de haut niveau vis-à-vis l'amoxicilline, amoxicilline+ acide clavulanique et la pipéracilline (100%). Ces résultats sont égaux à ceux rapportés par Lagha (2015) et Toudji *et al.* (2017).

Egalement, la résistance de notre série de souche à la céfazoline, céfotaxime et céftazidime a présentés un taux de 100%. Ces résultats sont supérieurs à ceux trouvée par Berrazeg *et al.* (2013) qui a révélé des taux de 73%, 50% et 39% respectivement.

En ce qui concerne la résistance des nos souches à l'aztréonam (89%). Ce résultat est un peu supérieur avec celui de Mellouk (2016) et Bouguenoun (2017) avec des taux de 62% et 78% respectivement.

D'autre part, le taux de résistance de nos isolats à l'imipénème était de 17%. Ce résultat est proche à celui signalé par Hashemi *et al.* (2013) de 19 %. Alors qu'en 2016 Hailaji *et al* ont trouvés que toutes les souches testée ont été à 100% sensibles.

Concernent le taux de résistance à l'ertapénème, on a noté un taux faible (6%). Notre résultat est proche avec celui retrouvée dans l'étude de Bouguenoun (2017) (13%).

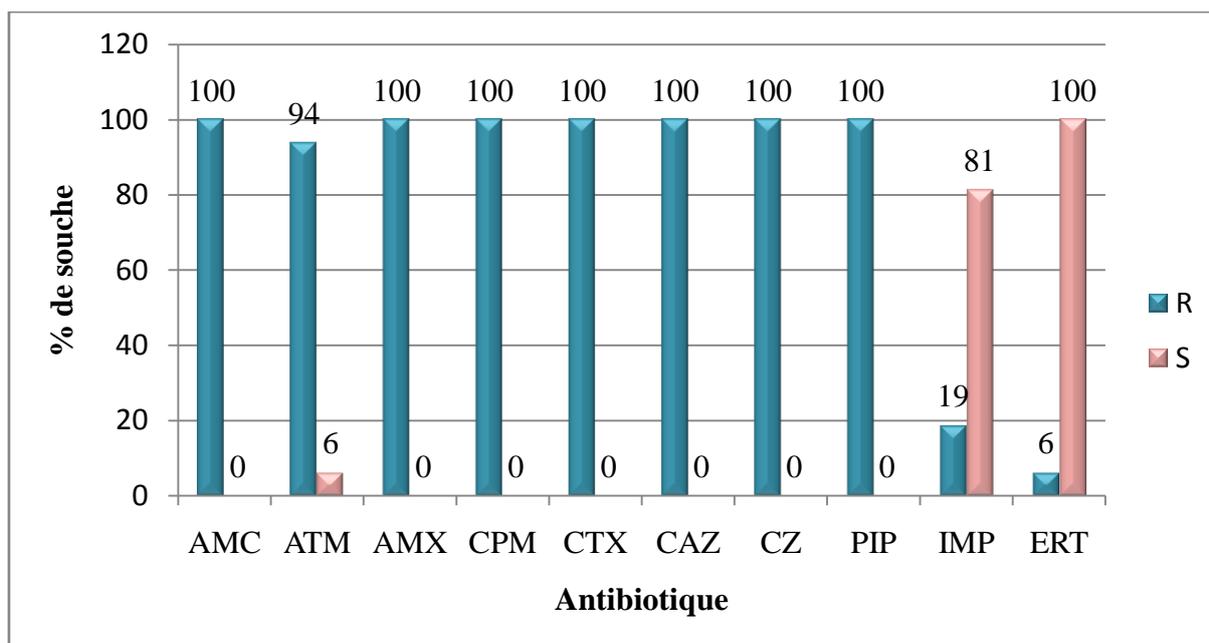


Figure 26. Profil de résistance des *E.coli* aux β -lactamines.

Les taux de la résistance de nos isolats vis-à-vis l'amoxicilline (AMX), amoxicilline+acide clavulanique (AMC) ont été de 100%. Ces résultats concordent avec les études réalisées par Lagha (2015); Agabou *et al.* (2016); Bouguenoun (2017) et Toudji *et al.* (2017).

Notre étude montre que le taux d'isolement des souches résistantes aux céfotaxime, céftazidime et la céfépime (100%) est très supérieur à celui rapportés par Ayad (2016) avec un taux de 41%,38% et 84% respectivement.

D'autre part, la résistance à la pipéracilline et aztréonam exprime un taux plus élevé de 100% et 94% respectivement. Ces résultats sont très proches à ceux trouvée par Bouguenoun (2017).

Pour l'imipénème, on a détecté un taux très faible des souches résistantes (6%), notre résultat est supérieur à celui trouvée par Rahal *et al.* (2010) (0.13%) et inférieur avec celui de Ben Haleb *et al.* (2016) (52%). Concernant l'ertapénème on a constaté un taux de 19%. Ce résultat est supérieur à celui de Bouguenoun (2017) avec un taux de 8%.

4.6. Détection phénotypique des β -lactamases

4.6.1. Recherche de la production des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) chez les entérobactéries

4.6.1.1. Test de synergie

Le test de synergie a révélé l'absence d'une image de synergie (bouchon de champagne ou entonnoir) entre un disque d'amoxicilline + l'acide clavulanique (AMC) et les disques de la céphalosporine de troisième génération (céftazidime (CAZ) et la céfotaxime (CTX)) et la céphalosporine de 4ème génération (céfépime (CPM)) et de l'aztreonam (ATM). Cela peut être expliqué par l'hyperproduction d'AmpC chromosomique ou aux mécanismes non enzymatique qui a probablement masquée la BLSE produite.

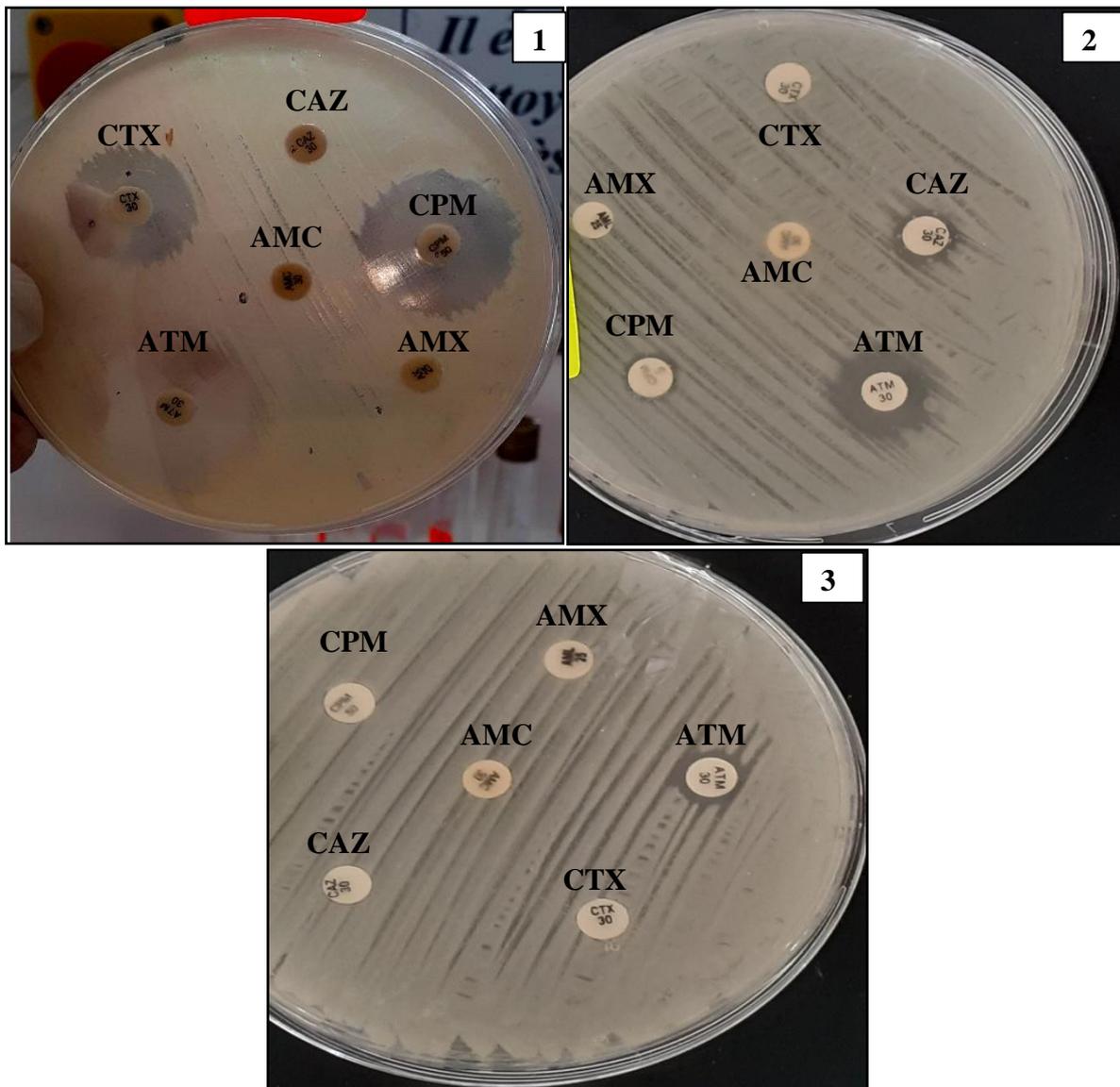


Figure 27. Test de synergie (1: *E.cloacae*; 2: *K.pneumoniae*; 3: *E.coli*).

La détection de la production d'une BLSE est parfois difficile compte tenu d'une éventuelle production d'une céphalosporinase de haut niveau. En effet, l'image de synergie peut être absente quand les souches étudiées possèdent des mécanismes de résistance aux β -lactamines dont la céphalosporinase hyperproduite qui masque le phénotype BLSE (El-Bouamri, 2017). Pour cela, il reste nécessaire de réaliser un test complémentaire, notamment le test à la cloxacilline ou le test du double disque (test espagnol).

Conclusion

Conclusion

Les entérobactéries constituent une part importante des bactéries isolées lors du diagnostic bactériologique des infections humaines. Leur prédominance dans l'intestin, leur rapidité de multiplication et leur fréquente résistance aux antibiotiques, notamment aux β -lactamines expliquent qu'elles soient les bactéries les plus impliquées en pathologie infectieuse humaine et constitue une menace importante pour la santé publique.

Notre travail a porté sur l'étude de l'émergence des entérobactéries résistantes aux β -lactamines et l'étude phénotypique des mécanismes de résistance de ces isolats.

L'identification de nos 45 isolats a été réalisée par l'observation macroscopique et microscopique, les tests d'orientation (test d'oxydase et de catalase) et les analyses biochimiques par les différents tests de la galerie classique (mannitol, citrate, nitrate réductase, TSI, urée-indole et TDA) pour 34 souches et la galerie Api 20 E pour les 11 restantes, dont on a pu enregistrer de cette identification, 17 souches d'*E.coli*, 10 d'*E.cloacae* et 18 de *K.pneumoniae*).

D'autre part, les résultats que nous avons enregistrés, dans cette période d'étude, indiquent que la résistance des trois souches (*K.pneumoniae*, *E.coli* et *E.cloacae*) vis-à-vis des β -lactamines est très élevée, presque la totalité ont été résistantes aux C3G mais pour la résistance des souches vis-à-vis des carbapénèmes (l'imipénème et l'értapénème) était de taux très faible pour *K.pneumoniae* et *E.coli*. Tandis que, *E.cloacae* était à 100% sensible vis-à-vis cet antibiotique.

D'un autre côté, la recherche des mécanismes de résistance des entérobactéries vis-à-vis des β -lactamines a montré qu'aucune souche n'est productrice de BLSE selon le test de synergie. Pour cela, il reste nécessaire de réaliser un test complémentaire, notamment le test à la cloxacilline ou le test du double disque (test espagnol) pour confirmer la production de BLSE.

Ainsi, comme perspectives de ce travail, nous proposons de :

- Tester la résistance des isolats vis-à-vis d'autres familles d'antibiotiques.
- La recherche phénotypique des β -lactamases à spectre étendu et des carbapénèmases.
- Réaliser des enquêtes sur la consommation des antibiotiques dans les hôpitaux du Biskra.
- Etudier la résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries en milieu communautaire.

➤ L'étude génotypique de la résistance aux antibiotiques pour mieux comprendre leurs mécanismes.

Enfin, les efforts soutenus en termes d'hygiène et de suivi épidémiologique seront nécessaires afin de pouvoir contrôler ce genre de dissémination de germes multirésistants qui représentent un problème préoccupant en termes de santé publique.

Bibliographie

Bibliographie

Réseau algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 2014. Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques(AARN). Le 15ème rapport d'évaluation (de janvier à décembre 2014).

Réseau algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 2016. Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques (AARN). Le 17ème rapport d'évaluation (de janvier à décembre 2016).

Abbott S.L. 2007. Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae. *Man. J of Clin.Microbiol.*, 9 (2007): 698-715.

Abid F, Boutefnouchet N, Dekhil M, Bouzerna N. 2007. Klebsiella pneumoniae productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) isolées dans les hôpitaux de la ville de Annaba, Algérie. *Scientific study & Research*; VII (2) : 199-214.

Adjidé CC, De Meyer A, Weyer M, Obin O, Lamory F, Lesueur C, Trouillet L, Biendo M, Eb F, Ganry O. 2010. Evaluation des risques microbiologiques hydriques associés à *Stenotrophomonas maltophilia* et *Pseudomonas aeruginosa* au CHU d'Amiens. *Pathologie Biologie*; 58 : e1-e5.

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

Agabou, A., Lezzar, N., Ouchenane, Z., Khemissi, S., Satta, D., Sotto, A., et al. (2016). Clonal relationship between human and avian ciprofloxacinresistant *Escherichia coli* isolat es in North-Eastern Algeria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 35: 227-34.

Akel Z. 2014. Profil épidémiologique des entérobactéries productrices de carbapénémases isolées au CHU IBN SINA-RABAT [thèse]. Rabat : Université Mohamed V de Rabat ;

Ambe, J. P., I. S. Gasi, and Y. Mava. 2007. Review of neonatal infections in University of Maiduguri Teaching Hospital: common bacterial pathogens seen. *Niger.J.Clin.Pract.* 10:290-293.

Anglaret X, Mortier E., 2002. *Maladies infectieuses*, 3 ème édition, Paris, De BoeckEstem, 292 p.

- Antibio-Résistance en Tunisie. 2007. <http://www.infectiologie.org.tn/pdf/lart/LART.pdf>
- Atena, A., Farzaneh, F., Rezvan, M., Zibaei, M . 2016. Prevalence of CTX-M-Type
- Avril J.L., Denis F., Dabernat H., Monteil H. (2000). Bacteriologie clinique.2ème
- Ayad.A, (2017)., Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries au CHU de Tlemcen. Thèse de doctorat présenté en université Abou baker Belgayed Tlemcen.
- Baba Ahmed-Kazi T.Z., Decre D., Genel N., Boucherit-Otmani Z., Arlet G., Drissi M. 2012. Molecular and Epidemiological Characterization of Enterobacterial Multidrug-Resistant Strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008-2010). *Microb. Drug Resist.*, 19:185-90.
- Bao L, Peng R, Ren X, Ma R, Li J, Wang Y. 2013. Analysis of some common pathogens and their drug resistance to antibiotics. *Pakistan Journal of Medical Sciences*. Jan-Mar; 29(1): 135–139.
- Basmaci R, Cohen R. (2018). Que doit savoir le pédiatre sur Escherichia coli producteur de bêtalactamase à spectre étendu ? Perfectionnement en Pédiatrie.
- BELBEL. Z .2013. Evaluation de la résistance aux antibiotiques des souches de Klebsiella pneumoniae isolées dans les hôpitaux de la ville d'Annaba .Thèse de doctorat d'état, université Badji Mokhtar, Annaba.
- BEN HELAL ET AL 2014.Occurrence and Characterization of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in a Tunisian Hospital.tunesie .
- Ben Jaballah N, Bouziri A, Kchaou W, Hamdi A, Mnif K, Belhadj S, Khaldi A, Kazdaghli K. 2006.Épidémiologie des infections bactériennes nosocomiales dans une unité de réanimation néonatale et pédiatrique tunisienne. *Médecine et maladies infectieuses*; 36 : 379-38.
- Benbella. I. 2016 Les Infections Urinaires Nosocomiales Au Chu Hassan Ii De Fès : Profil Bacteriologique Et Antibioresistance
- BEN-MOUSSA.2016. Thèse de doctorat. PROFILE DE SENSIBILTE DES ENTEROBACTERIES AUX FLUOROQUINOLONES AU CHU DE RABAT.
- Bennani M. 2014. Recherche d'entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu isolées dans les selles. Projet de Fin d'Études [Licence Sciences et Techniques Biologie et Santé]. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah .

- Ben Redjeb, S., Ben Hassen, A., Hammami, A., Kechrid, A. 2000. Epidémiologie des résistances bactériennes en Tunisie. "Résistance aux antibiotiques". Press. Méd. 1-5.
- Berrazeg M, Drissi M, Medjahed L, Rolain JM. 2013. Hierarchical clustering as a rapid tool for surveillance of emerging antibiotic resistance phenotypes in *Klebsiella pneumoniae* strains. *J Med Microbiol*; 62: 864-74.
- Bouskraoui, I. Ait Sab, G. Draiss, M. Bourrouss, M. Sbihi. 2010. Épidémiologie de l'infection urinaire chez l'enfant à Marrakech
- Bonnet R. 2006. B-lactamines et entérobactéries. Chapitre 15. Livre antibiogramme. Paris. ESKA: 2^{ème} édition. p 143.
- BOUDJEMAA Djahida Née SOUNA. 2014. Etude multicentrique de la résistance aux antibiotiques chez *Enterobacter cloacae*. En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat.
- Bougattoucha W., Boudella Y. 2010. Ecole de formation paramédicale, Laborantin diplôme d'état, Skikda, 7 p.
- 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
- 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 Bibliographie 42 and first report of OXA-48 in *Enterobacter cloacae*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 7 (2016) 135–140
- Boutet-Dubois A., Pantel A., Sotto A., Philippe Lavigne J. 2012. Les entérobactéries productrices de carbapénémases. Lettre d'information du Cclin Sud-Est destinée aux Acteurs de la Lutte contre les Infections Nosocomiales & Associées aux Soins. Avril 2012.
- Cavallo J.D., Fabre R., Jehl F., Rapp C., Garrabé E., 2004. Bêtalactamines. EMC-Maladies infectieuses. 1 : 129-202.
- Chouchani, C., Marrakchi, R., El SA. 2011. Evolution of beta-lactams resistance in Gramnegative bacteria in Tunisia. *Crit Rev Microbiol*. 37:167–77.

Cohen R, Bingen E, Grimprel E, Raymond J, Gendrel D. 2011. Résistance aux antibiotiques : un nouveau tournant à ne pas manquer. *Archives de Pédiatrie.*;18(4):359- 61.

Dali A.A.(2015). Infections nosocomiales a bactéries multirésistantes (BMR) en réanimation adultes a l'EHUO: Profile épidémiologique, facteurs de risque et facteurs pronostiques.[Thèses]. Université d'Oran 1 Ahmed BENBELLA (Algérie). 197p.

DEBABZA Manel.2014. Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat En Microbiologie. Emergence en milieu hospitalier des bacilles Gram négatifs multirésistants aux antibiotiques : étude bactériologique et moléculaire

Denis F, Poly MC, Martin C, Bingen E, Quentin R . (2011). Bactériologie médicale : techniques usuelles. Edition MASSON.295pp.

Denis F, Poly MC, Martin C, Bingen E, Quentin R. 2007. In Bacteriologie médicale : techniques usuelles ; Edition MASSON ;295.

Denis F., Dabernath, MONTEIL H. Avril J. L. 1998. Bactériologie clinique Edition marketing, Paris,; 144-145.

Dhayanithi NB ., Ajith Kumar TT ., Kathiresan K. (2010) . Effect of neem extract against the bacteria isolated from marine fish. *Journal of Environmental Biology.*; 31: 409-412.

Eckenrode S., Bakullari A., Metersky M.L., Wang Y., Pandolfi M.M., Galusha D., Jaser L., Eldridge N. 2014. The Association between Age, Sex, and Hospital-Acquired Infection Rates: Results from the 2009–2011 National Medicare Patient Safety Monitoring System. *J. Infection Control and Hospital Epidemiology*, 35: S3-S9.

El Bakkouri J., Belabbes H., Zerouali K., Belaiche A., Messaouidi D., Gros Claude J. D. P. et El Mdaghri N. 2009. Résistance aux Antibiotiques d'Escherichia coli Uropathogène Communautaire et Consommation d'Antibiotiques à Casablanca (Maroc). *European Journal of Scientific Research* ISSN 1450-216X; 36 (1): 49-5.

El Bouamri M.CH. (2017). Etude epidemio-moleculaire des Entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi au CHU de Marrakech. Thèse de Doctorat. Université Mohammed V-Rabat.165pp.

- El-mahi. F. 2013. Profil épidémiologique des entérobactéries productrices de carbapénèmases diagnostiquées au laboratoire de microbiologie du chu de rabat, Université Mohammed v-Souissi Faculté de Médecine et de Pharmacie –Rabat, thèse n°: 95, p57.
- Elmeskini K. 2011. Etude épidémiologique des infections à *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de Doctorat, Université Mohammed V, Maroc, 117 p.
- Eyquem A, Alouf J, Montagnier JL. 2000. Traité de microbiologie clinique : deuxièmes mises à jour et compléments. PICCIN, 238p.
- Fauchère, J. L., Avril, J. L. 2002. Bactériologie générale et médicale. Ed Ellipses. Paris. P.368.
- Faure S., 2009. Transfert d'un gène de résistance aux β -lactamines blaCTX-M-9 entre *Salmonella* et les entérobactéries de la flore intestinale humaine : Impact d'une antibiothérapie. Thèse de doctorat. Université Rennes de France. 190p.
- François Denis, Marie-Cecile Poly, Christian Martin, Edouard Bingen, Roland Quentin. (2011). Bactériologie médicale. 2eme édition.
- Frasca D, Dahyotfizelier C, Mimoz O. 2008. La colistine en réanimation. *Réanimation*.;17(3):251–8.
- Frenay J, Girardo P, Freydière AM, Renaud FN. 2008. Entérobactéries biologie clinique, (90-5-135) 2eme édition.
- Fritz H.K., Erik C.B., Peter D., Otto H., Axel R. 2017. Manuel de poche de Microbiologie médicale. 2ème Ed Lavoisier française. France. 741P.
- Gharout-Sait A. 2016. Etude de la résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries hospitalières et communautaires. Thèse de doctorat. Université A.MIRA-BEJAI. 195P.
- Gniadkowski M. 2001. Evolution and epidemiology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clin Microbiol Infect* 7. p 597-608.
- Grimont F. et Grimont P.A.D. 2006. The Genus *Enterobacter*. *Prokaryotes*; 6:197– 214.
- Grude N. Tveten Y. 2001. Kristiansen BE; Urinary tract infection in Norway: bacterial etiology and susceptibility. A retrospective study of clinical isolates; *Clin Microbiol Infect*; 7:543-7.

Guerin, F., Isnard, C., Cattoir, V., Giard, J. C. (2015) Complex Regulation Pathways of AmpC-Mediated beta-Lactam Resistance in *Enterobacter cloacae* Complex. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 59, 7753-7761.

Guinoiseau. E. (2010) Thèse de Doctorat : Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action. Life Sciences. Université de Corse. France.

Gulmez D., Woodford N., Palepou M.-F. I., Mushtaq S., Metan G., Yakupogullari Y., Kocagoz S., Uzung O., Hascelik G. et Livermore D. M. 2008. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapénèmases and outer membrane protein loss. *International Journal of Antimicrobial Agents*.

Hamouche E. D.K. Sarkis b,d. 2012. Évolution de la sensibilité aux antibiotiques de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* dans un CHU de Beyrouth entre 2005 et 2009

Hailaji NSM, Ould Salema ML, Ghabera SM. 2016. Sensitivity to antibiotics uropathogens bacterial in Nouakchott Mauritania. *Prog Urol*. May; 26(6):346-52.

Hart, C.A. 2006. *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* and *Serratia* spp. Principles and practice of Clinical Bacteriology. England, UK: John Wiley and Sons Ltd. 2nd ed: 377- 386.

Hashemi SH, Esna-Ashari F, Tavakoli S, Mamani M. 2013. The prevalence of antibiotic Resistance of Enterobacteriaceae strains isolated in community and Hospital acquired in infections in teaching hospital of Hamadan, west of Iran. *Journal of research in Health Sciences.*;13(1):75- 80.

Hussein K, Sprecher H, Mashiach T, Rabino G, Eluk O, Kassis I, Braun E, Oren I. 2007. First outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella* in an Israeli university hospital. *J Infection Control and Nosocomial Infection* 24: 34-8.

Illiaquer M.2010. Épidémiologie et caractérisation moléculaire de souches de *Klebsiella pneumoniae* résistantes aux céphalosporines de 3ème génération, hors BLSE, isolées entre 2007 et 2009, au CHU de Nantes. Thèse de doctorat d'état, université de Nantes, France, 123p.

- Jalalpoor S. 2011. Study of the antibiotic resistance pattern among the bacterial isolated from the hospital environment of Azzahra Hospital, Isfahan, Iran. *African J. Microbiol. Res.*, 5: 3317-3320.
- Janda, J.M., and Abbott, S.L. 2006. The Genera *Klebsiella* and *Raoultella*. The Enterobacteria. Washington, USA: ASM Press: 115-129.
- Jans.B, B. Catry, Y. Glupczynski Surveillance microbiologique et épidémiologique des Entérobactéries productrices de carbapénémases en Belgique janvier 2012 -juin 2014.
- Jarlier, V., Nicolas, M.H., Fournier, G., and Philippon, A. 1988. Extended-broad spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis.* 10: 867–878.
- Jean, F., Pascale,G., Anne-Marie,F., François, N.R.,(2007) *Biologie Médicale Entérobactéries* Elsevier SAS 392 p.
- Joly B. et Reynaud A. (2002). *Entérobactéries : Systématique et méthodes de diagnostic*. Ed TEC & DOC et Ed médicales Inter Nationales. Paris. 356P.
- Joly B. et Reynaud A. 2007. *Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic*. Edition Techniques et Documentation. Paris. p 3-182.
- Kariuki, S., G. Revathi, J. Corkill, J. Kiiru, J. Mwituria, N. Mirza, and C. A. Hart. 2007. *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections resistant to fluoroquinolones and extended-spectrum beta-lactams. *J.Infect.Dev.Ctries.* 1:257-262.
- Kassama M., et Hamaidi S. (2013). Evaluation de la résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries isolées à l'établissement hospitalier spécialisé de Constantine. *Constantine:Université Constantine* 1;62p.
- Khennouchi N.2015. thèse de doctorat. Evaluation de l'antibiorésistance du genre *Enterobacter* aux antibiotiques.
- KHAYAR Y. 2011. Comportement des entérobactéries isolées des urines vis-à-vis de l'amoxicilline – acide clavulanique, l'imipénème et l'ertapénème [thèse]. Rabat : Université Mohammed V de Rabat .

- Kumar M.S., V. Lakshmi, R. Rajagopalan. 2006. Occurrence of extended spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae spp. isolated at a tertiary care institute. *Indian J Med Microbiol.*; 24 : 208–11.
- 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.
- Lahlou, A. I. , Chegri, M., L'Kassmi, H. 2010. Épidémiologie et résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées d'infections urinaires à l'hôpital militaire Moulay-Ismaïl de Meknès Epidemiology and antibiotic resistance of Enterobacteriaceae isolated in urinary tract infections at the Moulay Ismail Military Hospital of Meknes. *Médecine et Maladies Infectieuses* . 40 (11) :632–636.
- Laurent D, 2018. Entérobactéries productrices de carbapénèmases : Etat des lieux national et nouveautés épidémiques.
- Larouci. H. Entérobactéries productrices de carbapénèmases en algérie .2017
- Lecour A. 2017. Détection des carbapénèmases chez les entérobactéries. Thèse de doctorat d'état, université Toulouse III Paul Sabatier, Paris, 140p.
- Livermore D.M. et Woodford N. 2006. β -lactamase threat in The Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. *Trends in Microbiology*; 14:413-20.
- Lozniewski.A et al., (2010). Résistance Bactérienne Aux Antibiotiques. CCLIN Sud-Est.
- Marylyse.V., (2015). Résistance Aux β -Lactamines à Large Spectre Chez les bactéries à gram négatif. Épidémiologie et diagnostic. Université LAVAL. Canada.
- MELLOUK Fatma Zohra 2016. Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Evaluation de la résistance des bacilles à Gram négatif aux antibiotiques « Bactéries isolées dans l'est algérien »
- Memdouh S. (2018). Les infections à Pseudomonas aeruginosa aux CHU de Constantine. Mémoire de magister. Université Frères Mentouri Constantine 1. 90pp.
- Mesli E. 2014. Etude multicentrique de la résistance aux antibiotiques chez Acinetobacter baumannii. Thèse de Doctorat, Université Abou Bekr Belkaïd -Tlemcen, Algérie, 126 p.

Midolo P.D, Matthews D, Fernandez C.D. 2002. Detection of extended-spectrum β lactamases in the routine clinical microbiology laboratory. *J Pathology* 34: 362-4.

Mohammedi, E. Vieille, P. Boulétreau (2002) Bactériémie à *Enterobacter cloacae* : émergence d'une résistance aux antibiotiques après antibioprophylaxie. *Annales françaises d'anesthésie et de réanimation*. 19, (7), 563.

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.

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

Paterson D.L. 2006. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Infect Control*; 34:S20–8.

Peirano G. et Pitout J.D.D. 2010. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* β -lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 β producing CTX-M O25: H4. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 35: 316-321.

Philippon, A., and Arlet, G. 1989. β -Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel ! *Ann Biol Clin*. 64(1): 37-51.

Pierrot A. 2015. Portage de la bactérie multi-résistance en structure d'accueil pour personne âgées. Evaluation d'une politique de dépistage cible en fonction de facteur de risque université Lorraine.

Qassimi L. 2010. Épidémiologie des infections nosocomiales en milieu de réanimation (A propos de 147 cas). [Thèse]. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah. Fes (Maroc). 148p.

Rahal K., 2005. Standardisation de l'antibiogramme en Médecine Humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS. 4ème édition. 95p.

Rahal K., Benslimani A., Tali-Maamar H., Missoum M. F. K., Kechih- Bounar S. et Ammari H. 2016. Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale. République Algérienne démocratique et populaire ministère de la santé, de la population et de la réforme hospitalière. p 192.

Rahal, K., Belouni, R., Tali-Maamar, H., Boudouane, M., Missoum, M.F.K., Benslimani, A., et al. (2011) Rapport d'évaluation : Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques.

Rahal, K., Belouni, R., Tali-Maamar, H., Boudouane, M., Missoum, M.F.K., Benslimani, A., et al. 2010. Rapport d'évaluation : Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques.

Ramoul A., 2013. Sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire des bactéries responsables d'infections respiratoires basses. Thèse de doctorat en microbiologie. : Université Badji Mokhtar. Annaba.

Rangaiahagari A, Uwizeyimana JP, Nyirabanzi J, Ngoga E, Wane J. 2013. Antibiotic sensitivity patterns of Enterobacteriaceae isolated at king Faisal hospital, Kigali - a three years study. Rwanda Medical Journal.;70:11-4.

Rawat D, Nair D. 2010. Extended-spectrum β lactamases in Gram Negative Bacteria. J. Glob. Infect. Dis., 2(3): 263–274.

Rebiahi S. (2012). Caractérisation de souches des Staphylococcus aureus et étude de leur antibiorésistance au niveau du centre hospital universitaire de Tlemcen. Thèse de Doctorat en Biologie. Université de Tlemcen. 131pp.

Rebuck J.A, Olsen K.M, Fey P.D, Langnas A.N, Rupp M.E. 2000. Characterization of an outbreak due to extended-spectrum beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae in a pediatric intensive care unit transplant population. J Clin Infect Dis 31: 1386-1372.

Robin, F., Gibold, L., and Bonnet, R. 2012. Intrinsic or acquired resistant to β -lactams in Enterobacteriaceae: How to identify them in clinical practice? Rev Francoph Lab 445: 47-58.

Rodriguez-Villalobos H. et Struelens M.-J. 2006. Résistance bactérienne par β lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimateur. Réanimation; 15: 205-213.

Rossolini, G. M., Mantengoli, E., Docquier, J. D., Musmanno, R. A., and Coratza, G. 2007. Epidemiology of infections caused by multiresistant gram-negatives: ESBLs, MBLs, panresistant strains. New Microbiol. 30, 332-339.

Ruppé, E. (2010) Epidemiology of expanded-spectrum beta-lactamases: The rise of CTX-M. Antibiotiques 12: 3-16.

Sahu M.K., Siddharth B., Choudhury A., Vishnubhatla S., Singh S.P., Menon R., Kapoor P.M., Talwar S., Choudhary S., Airan B.(2016).Incidence, microbiological profile of nosocomial infections, and their antibiotic resistance patterns in a high volume Cardiac Surgical Intensive Care Unit. Ann. Card. Anaesth., 19: 281-287.

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.

SEKHRI-ARAFI N.2010. Fréquence et marqueurs épidémiologiques de *Klebsiella pneumoniae* dans les services à haut risque infectieux au niveau du CHU Benbadis de Constantine. Pour l'obtention du Grade de Docteur en Sciences.

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

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

Tagajdid, M.R., Boumhil, L., Iken, M., Adnaoui, M., and Benouda, A. (2008) Resistance to fluoroquinolones and third generation cephalosporin of *Escherichia coli* from urines. Med Mal Infect 40: 70-3.

Talon, S. Lallemand-De-Conto, M. Thouverez, X. Bertrand (2004). *Escherichia coli* : résistance aux quinolones et aux b-lactamines des souches cliniques isolées en Franche-Comté

Terkja DN. 2014. Étude de la sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries isolées dans le service de neurochirurgie du C.H.U. de Tlemcen [Mémoire de master de Microbiologie]. Tlemcen :Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen .

TIDRARINE .S.2019. Epidémiologie des entérobactéries multirésistantes productrices de carbapénèmase à l'HIT. POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MÉDECINE. Marrakech.

Touati A, Zenati K, Brasme L, Benallaoua S, De Champs C. 2010. Extended-spectrum beta-lactamase characterisation and heavy metal resistance of Enterobacteriaceae strains isolated from hospital environmental surfaces. J. Hosp. Infect. 75:78-79.

Touati A., Brasme L., Benallaoua S., Gharout A., Madoux J., De C.C. (2008). First report of qnrB-producing *Enterobacter cloacae* and qnrA-producing *Acinetobacter baumannii* recovered from Algerian hospitals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 60:287–290.

TOUDJI Bouraïma Akouétévi Gérard D , Simplicite Damintoti, Ségla, Yaovi et Comlan de SOUZA1. 2017. Prévalence des souches d'entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi isolées au Togo et de leur sensibilité aux antibiotiques

Trigoso C. 2010. Carbapenemases: A Brief Review for Pediatric Infectious Disease Specialists. *Pediatr Infect Dis J*; 29(1):68-70.

Turmel, J.M. 2014. Évaluation des pratiques des médecins généralistes face aux infections urinaires à entérobactéries productrices de bêta lactamases à spectre élargi . Université de Poitiers , Faculté de Médecine et Pharmacie, France p.22.2014.

Vidoni O. 2010. β -lactamases à spectre étendu (BLSE). Intérêt porté aux CTX-M.

Wolf, B., Rey, L.C., Moreira, L.B., Milatovic, D, Fleer A, Verhoef J, Roord JJ .2001. Carriage of gram-negative bacilli in young Brazilian children with community-acquired pneumonia. *Int. J. Infect. Dis.* 5:155-9.

Yahyaoui G, Mahmoud M. 2013. LES ENTEROBACTERIES PRODUCTRICES DE CARBAPENEMASES : ETUDE PROSPECTIVE, Fès.

Yassine K., 2011. Comportement des Enterobacteries isolees des Urines vis-a-vis de l'amoxicilline – acide Clavulanique l'imipeneme et l'ertapeneme. Thèse du doctorat en pharmacie. Rabat : Universite Mohammed V. Ecole royale de service de sante militaire. 80p.

Zenati.F, (2016). Effet inhibiteur des huiles essentielles de trois plantes aromatiques sur *Escherichia coli* (BLSE) responsable d'infection urinaire d'origine hospitalière. Thèse de doctorat soutenu en université d'ABOU BAKER BELGAID. Tlemcen.

Annexes

Annexe 01**1. L'examen à l'état frais****➤ Technique**

- 1) Déposer une petite goutte d'eau stérile sur la lame.
- 2) Prélever une fraction de colonies sur gélose
- 3) Faire une suspension homogène dans la goutte d'eau en incorporant progressivement l'inoculum,
- 4) Recouvrir d'une lamelle en évitant d'enfermer des bulles d'air.
- 5) Le liquide ne doit pas déborder (sinon jeter la lame dans une solution désinfectante et recommencer).
- 6) Observer à l'objectif 40
- 7) Après observation, jeter l'état frais dans un bac contenant un désinfectant car les bactéries sont vivantes.

Des bactéries sont considérées comme mobiles lorsque des trajets très différents sont observés (déplacement dans toutes les directions). Une bactérie immobile est animée de mouvements d'agitation normaux appelés mouvements browniens, qu'il ne faut pas confondre avec la mobilité. En fonction de la mobilité observée, si elle est présente, on peut préjuger du type de ciliature de la bactérie (monotriche, péritriche..) ce qui oriente sur la bactérie isolée. (Denis, 2007).

2. Coloration de Gram**➤ Technique**

- 1) Préparer un frottis sur une lame propre, le fixer à la chaleur et le recouvrir avec un colorant de violet de gentiane, pendant 1 minute.
- 2) Fixer la première coloration par le lugol, laisser 1 minute.
- 3) Rejeter le lugol, rincer à l'eau.
- 4) Décolorer à l'alcool jusqu'à ce que la dernière goutte devienne claire et laisser pendant 30 secondes.
- 5) Rincer à l'eau et recouvrir la lame avec de la Fushine, laisser agir une minute.
- 6) Rejeter la Fushine, laver abondamment égoutter, puis sécher à la chaleur

➤ Lecture

Lire à l'objectif x100 à l'aide de l'huile à immersion. On peut observer deux types de cellules

les bactéries à Gram négatif sont de couleur rose et les bactéries à Gram positif sont colorées en violet (Denis, 2007).

Annexe 02

Tableau 01. Tableau de lecture de la galerie API 20^E

Tests	Réactions/enzymes	Résultats négatifs	Résultats positifs
ONPG	Béta-galactosidase	incolore	jaune
ADH	Arginine dihydrolase	jaune	Rouge/ orange
LDH	Lysine décarboxylase	jaune	Rouge/ orange
ODC	Ornithose décarboxylase	jaune	Rouge/ orange
CIT	Utilisation du citrate	Vert pale/ jaune	Bleu-vert/bleu
H2S	Production d' H ₂ S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/ fin liseré
URE	Uréase	Jaune	Rouge/ orange
TDA	Tryptophane désaminase	<u>TDA/immédiat</u> Jaune	<u>TDA/ immédiat</u> Marron-rougeâtre
IND	Production d'idole	<u>James/immédiat</u> Incolore Vert-pale/jaune	<u>James/immédiat</u> Rose
VP	Production d'acétoïne	<u>VP1/VP2</u> Aucune diffusion	<u>VP1/VP2</u> Diffusion du pigment noir
GEL	Gélatinase	Bleu/bleu-vert	Jaune/ jaune gris
GLU	Glucose fermentation /oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MAN	Mannitol fermentation /oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
IND	Inositol fermentation /oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SOR	Sorbitol fermentation /oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
RHA	Rhamnose fermentation /oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SAC	Sucrose fermentation /oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MEL	Melibiose fermentation /oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
AMY	Amygdalin fermentation /oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
ARA	Arabinose fermentation /oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune

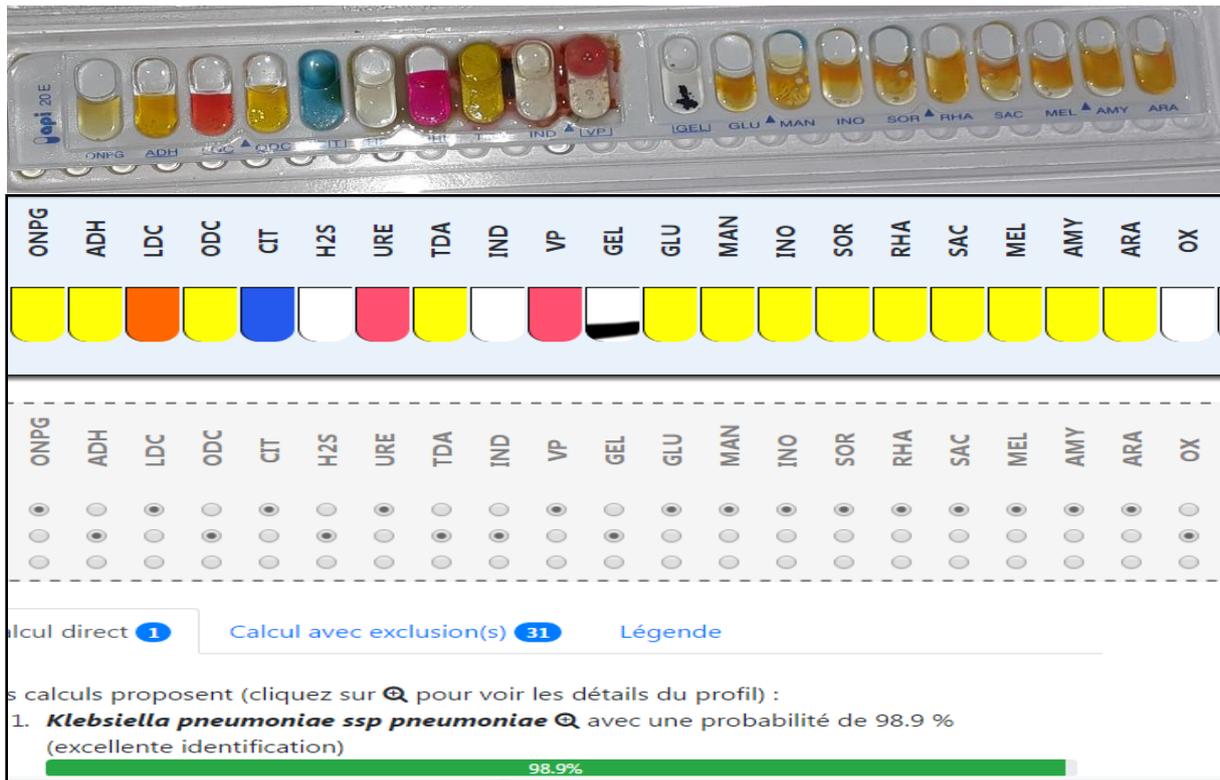


Figure 1. Résultat d'identification des souches de *K.pneumoniae* par galerie API20^E et outil en ligne gratuite UPBM.LAB

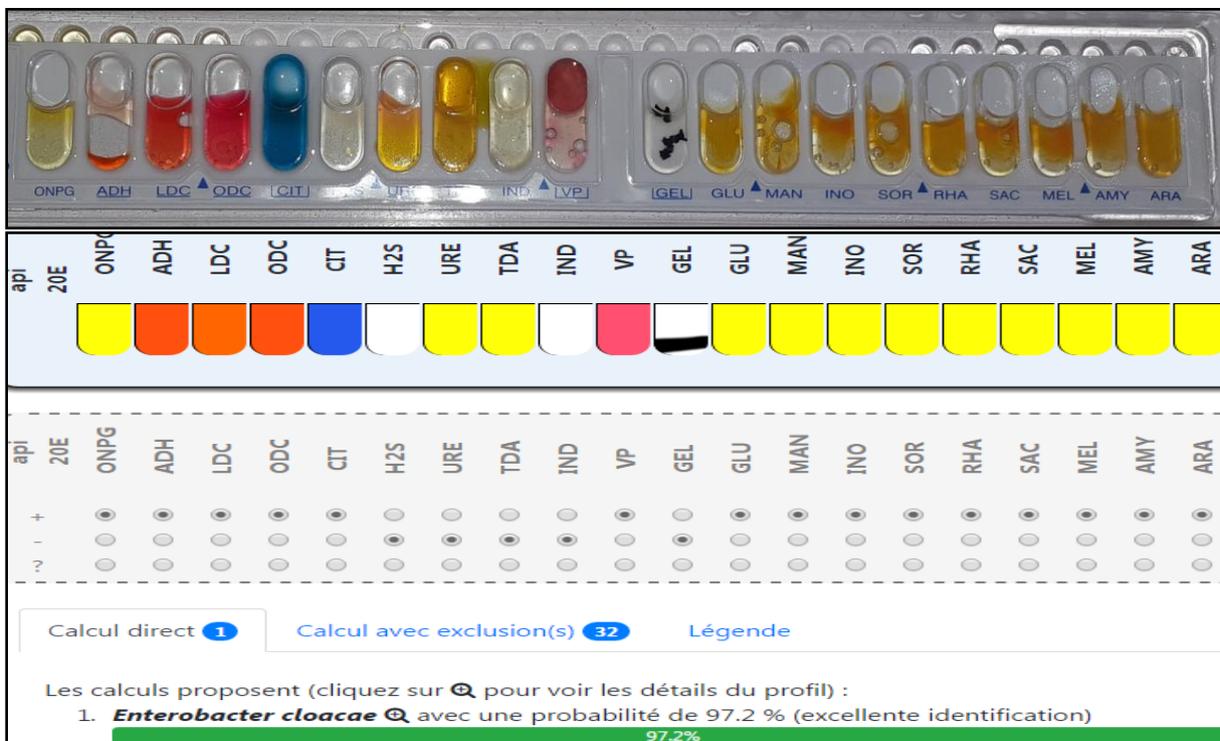


Figure 2. Résultat d'identification des souches d'*E. cloacae* par galerie API20^E et outil en ligne gratuite UPBM.LAB.

Annexe 03

Tableau 01. Les résultats d'antibiogramme de 08 souches d'*E.cloacae*.

N° de souche	Antibiotique											
	AMC	ATM	CTX	CAZ	AMX	CPM	FOX	ERT+CL	CZ	ERT	IMP	PIP
C1	8/R	35/S	18/R	R	R	25/S	10/R	24	R	22/S	23/S	20/S
C2	R	25/S	20/R	R	R	25/S	10/R	20	10/R	24/S	25/S	12/R
C3	R	13/R	R	R	R	R	R	23	R	25/S	28/S	R
C4	8/R	25/S	20/R	R	R	25/S	R	20	R	24/S	27/S	25/S
C5	R	30/S	26/S	10/R	13/R	29/S	14/R	30	23/S	22/S	25/S	30/S
C6	R	30/S	28/S	25/S	12/R	R	R	29	4/R	27/S	23/S	28/S
C7	R	25/S	22/R	20/S	R	20/S	R	R	R	27/S	24/S	R
C8	R	20/S	R	R	R	R	R	R	R	26/S	25/S	R

Tableau 02. Les résultats d'antibiogramme de 18 souches de *K.pneumoniae*.

N° de souche	Antibiotique											
	AMC	ATM	CPM	AMX	CAZ	CTX	PIP	ET+CL	CZ	ERT	IMP	
K1	R	13/R	R	R	R	R	R	13	R	25/S	23/S	
K2	R	11/R	R	R	R	R	R	20	R	29/S	25/S	
K2	R	12/R	R	R	R	R	R	14	R	25/S	23/S	
K3	R	17/R	R	R	R	R	R	13	R	23/S	24/S	
K4	R	17/R	R	R	R	R	R	15	R	25/S	23/S	
K5	R	11/R	R	R	R	R	R	13	R	22/S	26/S	
K6	R	13/R	R	R	R	R	R	18	R	27/S	23/S	
K7	R	15/R	R	R	R	R	R	17	R	25/S	24/S	
K8	R	15/R	R	R	10/R	R	R	15	R	22/S	23/S	

K9	R	28/S	11/R	R	11/R	R	R	16	R	23/S	24/S
K10	R	15/R	10/R	R	R	10/R	R	15	R	24/S	23/S
K11	R	14/R	13/R	R	14/R	10/R	R	R	R	17/R	24/S
K12	R	16/R	11/R	R	R	R	R	13	R	23/S	24/S
K13	R	16/R	13/R	R	R	R	R	13	R	22/S	16/R
K14	R	10/R	R	R	R	R	17/R	13	R	27/S	26/S
K15	R	22/S	R	R	17/R	10/R	R	15	R	22/S	16/R
K16	R	R	R	R	R	R	R	14	R	25/S	16/R
K17	R	R	27/S	R	17/R	R	16/R	17	R	24/S	23/S
K18	R	23/S	12/R	R	16/R	10/R	R	14	R	22/S	24/S

Tableau 03. Les résultats d'antibiogramme de 17 souches d'*E.coli*.

N° de souche	Antibiotique										
	AMC	ATM	CPM	AMX	CAZ	CTX	PIP	ET-CL	CZ	ERT	IMP
E1	R	15/R	R	R	R	R	R	20	R	32/S	27/S
E2	R	17/R	R	R	12/R	R	11/R	27	R	30/S	25/S
E3	R	15/R	10/R	R	R	R	11/R	28	R	30/S	25/S
E4	R	15/R	R	R	R	R	10/R	18	R	29/S	23/S
E5	R	11/R	R	R	R	R	R	18	R	30/S	25/S
E6	R	14/R	R	R	R	R	R	18	R	30/S	25/S
E7	R	14/R	R	R	R	R	R	18	R	30/S	24/S
E8	R	14/R	R	R	R	R	R	17	R	30/S	23/S
E9	R	16/R	R	R	R	R	R	18	R	25/S	24/S
E10	R	16/R	R	R	15/R	R	R	17	R	25/S	25/S

E11	R	13/R	R	R	13/R	R	10/R	18	R	28/S	29/S
E12	R	14/R	10/R	R	12/R	R	11/R	23	R	27/S	23/S
E13	R	12/R	R	R	10/R	R	R	18	R	30/S	23/S
E14	R	10/R	R	R	10/R	R	R	17	R	26/S	R
E15	R	14/R	R	R	9/R	R	R	13	R	R	25/R
E16	R	25/S	R	R	R	R	R	23	R	28/S	R

ملخص

تهدف هذه الدراسة لتقييم وتحديد مدى ظهور البكتيريا المعوية المعزولة من عينات مختلفة لمرضى من مستشفى الحكيم. سعدان- بسك رة ومقاومتها للبيتا لاكتاميين وكذلك دراسة النمط الظاهري لآليات مقاومة هذه السلالات. تم جمع 45 سلالة من البكتيريا المعوية (*E. coli* 17؛ 18 *K.pneumoniae*؛ *E.cloacae* 10) خلال خمسة أشهر؛ وتم التعرف عليها بواسطة الاختبارات البيوكيميائية الكلاسيكية و حددت 11 عينة عن طريق النظام API20^E وتمت دراسة حساسية السلالات البكتيرية المعزولة للمضادات الحيوية وفقا لتوصيات لجنة المضادات الحيوية التابعة للشبكة الجزائرية بطريقة نشر الأقراص في وسط MH في حين، تم الكشف عن إنتاج إنزيمات البيتا لاكتماز ذو المدى الواسع عند السلالات البكتيرية المعزولة عن طريق اختبار de synergie. أثبتت النتائج أن جميع السلالات لديها مستوى عالي من المقاومة للبيتا لاكتاميين، لكن مقاومة *E.coli* و *K.pneumoniae* للاميبينام وارتاينام كانت بنسبة منخفضة جداً. في حين، وجدنا أن *E.cloacae* حساسة بنسبة 100% لهذا النوع من المضادين الحيويين؛ بينما أظهرت نتائجنا أنه لا توجد أي سلالة منتجة للبيتا لاكتماز ذو المدى الواسع. حيث لا يزال من الضروري إجراء اختبار تكميلي، لا سيما اختبار الكلوكساسيلين أو اختبار القرص المزدوج (الاختبار الأسباني) لتأكيد إنتاج البيتا لاكتماز ذو المدى الواسع.

الكلمات المفتاحية: البيتا لاكتاميين، البيتا لاكتماز ذو المدى الواسع، *E.coli*، *K.pneumoniae*، *E.cloacae*، المقاومة.

Résumé

Cette étude vise à évaluer l'émergence des entérobactéries résistantes aux β -lactamines et isolées de différents prélèvements pathologiques à l'hôpital d'EL-Hakim Saâdan-Biskra ainsi que l'étude phénotypique des mécanismes de résistance des isolats. Une collection de 45 souches d'entérobactéries (17 souche d' *E.coli*, 18 de *K.pneumoniae*, 10 d'*E.cloacae*), sur une période de 05 mois, Les souches ont été identifiées suivant les tests d'orientation et les tests biochimiques classiques, l'identification des 11 isolats (04 souches d'*E.coli*, 05 de *K.pneumoniae*, 02 d'*E.cloacae*) ont été effectuée par la galerie API 20^E. L'antibiogramme a été réalisé selon les recommandations du comité du réseau algérien par la méthode de la diffusion des disques sur un milieu gélosé. Alors que, la production de BLSE chez les souches a été détectée par le test de synergie. Les résultats ont montré que toutes les souches ont un haut niveau de résistance aux β - lactamines mais pour la résistance des souches vis-à-vis de l'imipénème et l'értapénème étaient de taux très faible pour *K.pneumoniae* et *E.coli*. Tandis que, *E.cloacae* était à 100% sensible sur ces antibiotiques. Alors que, qu'aucune souche n'est productrice de BLSE (0%), il reste nécessaire de réaliser un test complémentaire, notamment le test à la cloxacilline ou le test du double disque (test espagnol) pour confirmés la production de BLSE.

Mots clés : β -lactamines, BLSE, *E.coli*, *K.pneumoniae*, *E.cloacae*, la résistance.

Abstract:

This study aims to assess the emergence of β -lactam-resistant of enterobacteria isolated from different pathogenic at the hospital of EL-Hakim Saâdan-Biskra and the phenotypic study of the resistance mechanisms of these isolates. A collection of 45 isolates of *Enterobacteriaceae* (*E.coli*, *K.pneumoniae*, *E.cloacae*) was conducted during the 05 month period. The strains were identified by orientation tests and the classical biochemical gallery and the identification of the 11 strains was performed by the API system gallery. Antimicrobial drug susceptibility was performed by the method of dissemination of disks on agar. ESBL production in strains was detected by synergy test. The results showed that all the strains showed a high level of resistance to β -lactams but for the resistance of the strains to imipenem and ertapenem were of very low level for *K.pneumoniae* and *E.coli*. While, *E.cloacae* is 100% sensitive to these antibiotics. While, our results showed no strain is producing ESBL (0%) it is still necessary to perform a complementary test, in particular the cloxacillin test or the double disc test (Spanish test) to confirm the production of ESBL, resistance.

Key words: β -lactams, ESBL, *E.coli*, *K.pneumoniae*, *E.cloacae*, resistance.