

République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique
Université de Blida-1-
Faculté : Des Sciences de la Nature et de la Vie.
Département: Biologie et Physiologie Cellulaire.



Mémoire En vue de l'obtention du diplôme de Master
Option : Microbiologie-Bactériologie

Thème:

«Détermination des profils de résistance aux β -lactamines à large spectre des bacilles à Gram négatif isolés au niveau du laboratoire de l'Etablissement Hospitalier Public de Boufarik»

Présenté par: *HADJALLA HEDJALA Fatma Zohra et LADEK Ithem Zohor*

Devant le jury composé de :

<i>Mme KHALDOUN H.</i>	Maitre de conférences B à l'Université de Blida-1-	<i>Présidente</i>
<i>Mme BOUDJEMA N.</i>	Maitre de conférences B à l'Université de Blida-1-	<i>Examinatrice</i>
<i>Mme DEBIB A.</i>	Maitre de conférences B à l'Université de Blida-1-	<i>Promotrice</i>
<i>Mme LASSAS F.</i>	Médecin microbiologiste à l'EPH de Boufarik	<i>Co-promotrice:</i>

Année universitaire:

2015/2016

Remerciements

Ce travail a été effectué au sein du laboratoire de « Microbiologie », de l'Etablissement Public Hospitalier de Boufarik, Algérie.

Louanges à ALLAH le tout puissant pour nous avoir donné le courage et la Patience pour réaliser ce travail.

Nos remerciements s'adressent d'abord à notre chef d'option Mr Hamaidi S. que dieu garde ton âme dans ces vastes paradis.

Nos remerciements s'adressent à notre promotrice de thèse, le docteur DEBIB Aicha. Nous la remercions pour son encadrement, de nous avoir fait confiance et de ses encouragements.

Nous remercions chaleureusement, notre co-promotrice de mémoire, Madame le docteur LASSAS Fatiha pour ses précieux conseils, son soutien, son oreille attentive, sa gentillesse, et de son dynamisme. Merci de nous encourager pour la réalisation de ce projet de recherche.

Ainsi de votre aide, disponibilité et votre présence au sein de ce jury.

C'est avec un grand plaisir que nous remercions le docteur KHELDOUN de nous faire l'honneur de présider le jury de ce mémoire, que ce travail constitue le témoignage de notre respect.

Nous adressons nos vifs remerciements par ailleurs à madame l'examinatrice Dr BOUDJAMAA N., pour nous avoir fait l'honneur en acceptant d'examiner notre mémoire.

Nous tenons à exprimer nos remerciements profondément à tous les membres du laboratoire de microbiologie à l'EPH de Boufarik, à leur tête Mme BAYA, Mme BENCHIT, Mme SABABOU, Mme LACHMAT, Mme BEL KHIRANI, Mme REMIDI, et Mme YAHIA, pour leurs aides précieuses.

Egalement un grand merci à tous ceux qui comptent pour nous : parents, frères, sœurs, famille, amis, nos camarades de la faculté des sciences de la nature et de la vie et à toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Merci vivement à mon binôme pour les bons moments passés ensemble durant cette étude exceptionnelle.

Dédicaces

*En ce moment particulier dans ma vie,
Je tiens à dédier ce modeste travail :*

A mon binôme F/Z pour m'accompagner tout au long de ce travail.

*A ma tante paternelle et ma grand-mère pour leurs encouragements durant tout mon
parcours vers un avenir meilleur.*

*A ma sœur qui signifie tant pour moi, merci pour ton amour que tu as donné
au fil des aimées et pour les choses que tu fais si souvent
et qui nous gardent si proche.*

*A mon père pour tous ses encouragements et son soutien, vous m'avez transmis
l'amour
de la science et le savoir.*

A mamita qui ma aidé, encouragé et soutenu.

*A tous mes proches, je spécifie : Ahlem B., Soumia B., Selma Y. et Khadidja B. pour
votre soutien moral.*

A tous mes camarades, et

A l'ensemble de la famille LADEK et HADJALLA HEDJALA.

Dédicaces

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance...

Aussi, c'est tout simplement que Je dédie ce travail:

*A mes chers parents,
symbole de reconnaissance
et de remerciement sur tout ce
qu'ils m'ont donné dans ma vie.*

A mes chères frère et chère petite sœur

A mes cousins et cousines

A toute ma famille paternelle et maternelle

A mon binôme Ilou, avec mon grand amour et toute ma tendresse, Je vous souhaite un avenir plein de joie, de succès, de réussite et surtout de santé.

A tous mes amis et camarades

H. Fatma zohra

Sommaire

Introduction générale	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	4
1. Bacilles à Gram négatif.....	5
1.1 <i>Enterobacteriaceae</i>	5
1.1.1 Historique.....	5
1.1.2 Taxonomie.....	5
1.1.3 Habitat.....	6
1.1.4 Caractères bactériologiques.....	6
1.1.5 Mode de transmission.....	7
1.1.6 Pouvoir pathogène.....	7
1.2 Les bacilles à Gram négatif non-fermentaires.....	8
1.2.1 <i>Pseudomonas airogenosa</i>	8
1.2.2 <i>Acenitobacter</i>	10
2. Les bêta-lactamines.....	13
2.1 Historique.....	13
2.2 Généralités.....	13
2.3 Structure.....	14
2.4 Modes d'action des β -lactamines.....	14
2.5 Classification des β -lactamines	15
3. La résistance aux β -lactamines.....	18
3.1 La résistance bactérienne	18
3.2 Types de résistance.....	18
3.3 Mécanismes de résistance aux β -lactamines.....	19
3.3.1 Mécanismes non enzymatique.....	20
3.3.2 Mécanismes enzymatiques: Production de β -lactamases	20
3.3.3 Phénotype de résistance enzymatique aux β -lactamines chez les BGN.....	23
3.3.3.1 Résistance naturelle ou phénotypes «sauvages».....	23
3.3.3.2 Résistance acquise ou phénotypes «résistants».....	24

Chapitre II : Matériel et méthodes.....	29
1. Patients et prélèvements	30
2. Techniques de Prélèvement	31
3. Méthodologies de diagnostic.....	32
4. Identification	37
4.1 Etude morphologique.....	37
4.2 Identification biochimique.....	38
5. Étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques	43
6. Recherche phénotypique de la production des BLSE.....	45
6.1 Quand rechercher une BLSE ?.....	45
6.2 Méthode de détection des BLSE.....	45
Chapitre III : Résultats et discussion.....	47
1. Résultats	47
1.1 Répartition globale des prélèvements.....	47
1.2 Isolement et identification des souches	47
1.2.1 Répartition des souches par groupe bactérien.....	47
1.2.2 Répartition des souches par espèces.....	49
1.2.3 Répartition des souches par service.....	50
1.2.4 Répartition des souches selon la nature de prélèvements.....	53
1.2.5 Répartition des souches par sexe.....	51
1.2.6 Répartition des souches par âge.....	52
1.3 Résistance des souches aux β -lactamines.....	52
1.3.1 Répartition des souches résistantes par service.....	52
1.3.2 Répartition des souches résistantes par nature de prélèvement.....	53
1.3.3 Répartition des souches résistantes par catégorie d'âge.....	54
1.3.4 Répartition des souches résistantes par sexe	54
1.3.5 Étude de la résistance des principales souches d'entérobactéries aux β -lactamines.....	55
1.3.5.1 Étude de la résistance des souches d' <i>E. coli</i>	55
1.3.5.2 Étude de la résistance des souches de <i>K.pneumoniae</i>	55
1.3.5.3 Étude de la résistance des souches de <i>P. mirabilis</i>	56
1.3.6 Étude de la résistance des bacilles à Gram négatif non-fermentaires aux β -lactamine.....	57
1.3.7 Analyse des phénotypes de résistance aux β -lactamines.....	57

II. Discussion générale.....	59
Conclusion générale et perspectives.....	68
Références bibliographiques.....	70
Annexes.....	86

Liste des figures

	<i>Page</i>
Figure1: Inhibition de la croissance d'une culture de <i>Staphylococcus aureus</i> par la moisissure <i>Penicillium notatum</i>	13
Figure 2: Structure générale des bêta –lactamines.....	14
Figure 3:Acylation du site actif sérine d'une protéine de liaison à la pénicilline (PLP) par une β -lactamine	15
Figure4: Structures de quelques β -lactamines.....	16
Figure 5:Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	19
Figure 6: Mécanisme d'hydrolyse d'une β -lactamine par une β -lactamase.....	21
Figure 7: Dénombrement des colonies.....	34
Figure 8 : Schéma de détection de BLSE par le test du double disque.....	46
Figure 9: Répartition globale des prélèvements.....	48
Figure 10: Répartition des souches par groupe bactérien.....	49
Figure11: Répartition des souches isolées par service.....	50
Figure 12: Répartition des souches par nature de prélèvement.....	51
Figure 13: Répartition des souches par sexe.....	51
Figure 14: Répartition des souches par catégories d'âge.....	52
Figure 15: Répartition des souches résistantes par nature de prélèvement.....	53
Figure 16: Taux de résistance par sexe.....	54
Figure 17: Taux de résistance des souches d' <i>E. coli</i> aux β -lactamines.....	55
Figure 18:Taux de résistance des souches de <i>K.pneumoniae</i> aux β -lactamines.....	56
Figure 19:Taux de résistance des souches de <i>P. mirabilis</i> aux β -lactamines.....	56
Figure 20: DD-test positif.....	57
Figure 21: Test espagnol positif.....	58
Figure 22: Répartition des souches productrices de BLSE.....	58

Liste des tableaux

	<i>Page</i>
Tableau I: Classification simplifiée des β -lactamases Selon Ambler	22
Tableau II: Répartition des prélèvements selon leurs natures.....	30
Tableau III: Répartition des souches par espèces.....	49
Tableau VI : Présentation des taux de résistance par service.....	53
Tableau V: Répartition des souches résistantes par catégorie d'âge.....	54
Tableau VI: Taux de résistance des souches des bacilles à Gram négatif non-fermentaires <i>vis-à-vis</i> des β - lactamines.....	57
Tableau VII: Comparaison du nombre des souches productrices de BLSE dans les différents hôpitaux en Algérie avec nos souches.....	66

Liste des abréviations

ADH: Arginine Déshydrogénase.

AMC: Amoxicilline+acide clavulanique.

AmpC: Chromosomal located céphalosporinase.

API: Analytic Profile Index.

ARNr: Acide Ribonucléique Ribosomal.

ATM: Aztréonam.

BES: Brazil Extended Spectrum beta-lactamase.

BGN: Bacilles à Gram Négatif.

BHIB: Bouillon cœur-cerveau.

BLSE: β -Lactamases à Spectre Elargi.

C3G: Céphalosporines de troisième Génération.

CAZ: Ceftazidime.

CIT: Citrate de Simmons.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.

CMI: Concentration minimale inhibitrice.

CMY: Active oncephamycins.

CO₂: Dioxyde de Carbone.

CRO: Ceftriaxone.

CTX: Céfotaxime.

CTX-M: Cefotaximase, first isolated at Munich.

CZ: Céfazoline.

EBLSE: Entérobactéries productrices des β -Lactamases à Spectre Elargi.

ECBU: Examen Cytobactériologique des Urines.

EDTA: Ethylenediamine Tetra Acetic acid.

EPH: Etablissement Public Hospitalier.

FOX: Cefoxitine.

GEL: Gélatinase.

GES: Guiana Extended Spectrum β -lactamase.

GIM: Germanimipenemase.

GSC: Gélose au Sang Cuit.

GSF: Gélose au Sang Frais.

H₂S: Sulfure d'Hydrogène.

HMRU: Hôpital Militaire Universitaire Régional

IBC: Integron Borne Cephalosporinase

IMP: Imipenemase.

KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapénèmases.

LCR: Liquide Céphalo-Rachidien.

LDC: Lysine Décarboxylase.

MBL: Metallo- β -Lactamases.

ODC: Ornithine Décarboxylase.

ONPG: Ortho-Nitro-Phenyl- β .D.Galactosidase.

OXA: Oxacillinases.

PER: *Pseudomonas* Extended Resistant.

PLP: Protéines Liant les Pénicillines.

RM: Rouge de Méthyle.

SHV: Sulfhydryl Variable.

SFO: *Serratia fonticola*.

SPM: São Paulo MBL.

TCC: Ticarcilline+Acide Clavulanique.

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

TDA: Tryptophane Désaminase.

TLA: Nommée d'après Tlahuicas, tribu Indienne.

TSI: Three-Sugar-Iron.

VEB: Vietnam Extended spectrum Beta-lactamase.

VIM: Verona Integron-encoded Metallo- β -lactamase.

VP: Réaction de Voges Proskauer.

Zn⁺⁺: Cation de Zinc.

Résumé

Les Entérobactéries ont supplanté les Gram positifs en matière de fréquence de résistances aux antibiotiques en pratique ambulatoire. Cette évolution, qui touche des pathogènes opportunistes courants tels que *E. coli* et *K. pneumoniae*, est en grande partie due à l'apparition et à la dissémination de β -lactamases à spectre élargi (BLSE).

Au cours de notre étude, nous avons recueilli 1778 prélèvements de différente nature, dont 1271 sont des urines, 257 du sang, 159 du LCR et 91 du pus et divers, et qui sont issus de différents services y compris Néonatalogie, Pédiatrie, Maternité, Médecine interne, Maladies infectieuses, Chirurgie générale, Urgences et d'autres provenant des malades externes. Au total 240 souches ont été isolées et identifiées, dont 225 sont des bacilles à Gram négatif avec 210 entérobactéries, 14 *Pseudomons* (13 *P.aeruginosa* et 1 *Pseudomonas.sp*) et une *A. baumannii*.

Sur 225 souches isolées, 63 proviennent du service des maladies infectieuses et 158 des souches ont été isolées dans les urines avec une prédominance féminine évidente (72.89%).

L'étude de la sensibilité de ces souches *vis-à-vis* des β -lactamines a permis de sélectionner 180 souches résistantes à ces molécules (80%).

Parmi 180 souches résistantes, 176 sont des entérobactéries, une *A. baumannii* et 3 *P. aeruginosa*, chez les entérobactéries, *K. pneumoniae* est caractérisée par le taux le plus élevé de résistance 93.75%.

Les souches productrices des BLSE présentent un taux de 23.88% des souches résistantes, représentées majoritairement par *Escherichia coli* 47%, suivi de *Klebsiella pneumoniae* avec 40% et *Enterobacter cloacae* 5%, alors que *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* et *Acinetobacter baumannii* présente chacune 1 seule souche.

Mots clés : Résistance, β -lactamines, bacilles à Gram négatif, BLSE.

Abstract

Enterobacteria have supplanted Gram positive rate in terms of resistance to antibiotics in ambulatory practice. This development, common opportunistic pathogens touches such as *E. coli* and *K. pneumoniae*, is largely due to the emergence and spread of β -lactamases extended spectrum (ESBLs).

In our study, we collected 1778 samples of different nature, which 1271 are urine, 257 blood, 159 CSF and 91 of pus and diverse, from different services including, Neonatology, Pediatrics, Obstetrics, Internal Medicine, Infectious Diseases, General surgery, Emergency and others from outpatients.

In total of 240 strains were isolated and identified, of which 225 are Gram negative bacilli with 210 enterobacteria, 14 *Pseudomons* (13 *P.aeruginosa* and *Pseudomonas sp1*) and one *A. baumannii* .

From 225 strains, 63 were isolated from infectious diseases and 158 strains were isolated in the urine with obvious female predominance (72.89 %).

The study of the sensitivity of these strains to the β -lactam has allowed to select 180 strains resistant to these molecules (80%)

Among 180 resistant strains, 176 are from Enterobacteriaceae, one is an *A. baumannii* and 3 are *P. aeruginosa*. In Enterobacteriaceae, *K. pneumoniae* is characterized by the highest rate of resistance 93.75 %.

ESBL-producing strains present rate of 23.88 %, mainly represented by *Escherichia coli* 47 %, followed with *Klebsiella pneumoniae* 40% and *Enterobacter cloacae* 5%. But *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* and *Acinetobacter baumannii* are presented each one with a single strain.

Keywords: Resistance, β -lactams, Gram-negative bacilli, ESBLs.

المخلص

لقد تجاوزت العصيات المعوية البكتيريا إيجابية الـ Gram من حيث المقاومة المتنقلة للمضادات الحيوية، هذا التطور الذي يمس مسببات الأمراض الانتهازية مثل *E. coli* و *K. pneumoniae*، يرجع إلى حد كبير إلى ظهور وانتشار β -lactamases ذات الطيف الممتد (ESBLs).

في دراستنا، جمعنا 1778 عينة من طبيعة مختلفة، 1271 والتي هي البول، 257 الدم، 159 السائل الدماغي الشوكي و 91 من القيح وغيره، من مصالح مختلفة بما في ذلك مصلحة حديثي الولادة، طب الأطفال، طب النساء و التوليد، الطب الباطني، الأمراض المعدية، الجراحة العامة، حالات الطوارئ وغيرها من العيادات الخارجية.

بالإجمال 240 سلالة تم عزلها وتحديدها، منها 225 عصيات سلبية الـ Gram مع Enterobactéries 210، *A. baumannii* و 14 *Pseudomonas* (13 *P. aeruginosa*, *Pseudomonas.sp1*)

وقد تم عزل 225/63 سلالة من مصلحة الأمراض المعدية و تم عزل 225/158 سلالة من عينات البول مع غلبة واضحة للجنس الأنثوي (72.89%).

وسمحت دراسة حساسية السلالات مع β -lactamines بتحديد 180 سلالة مقاومة لهذه الجزيئات (نسبة الحساسية 80%).

من بين 180 سلالة مقاومة، 176 تنتمي إلى Enterobactéries، 180/1 هو *A. baumannii* و 180/3 هي *P. aeruginosa*، ويتميز *K. pneumoniae* بأعلى معدل في المقاومة 93.75%.

السلالات المقاومة المنتجة ESBLs تقرب 23.88% أي (43/180)، وتمثل معظمها بـ *Escherichia coli* 47%، تليها *Klebsiella pneumoniae* 40% و *Enterobacter cloacae* 5%. بينما تمثل كل من *Proteus vulgaris*، *Proteus mirabilis*، *Serratia marcescens*، *Acinetobacter baumannii*، بسلالة واحدة.

كلمات مفتاحية: الحساسية، المضادات الحيوية β -lactamines، عصيات سلبية الـ Gram، ESBLs.

Introduction

Au cours de ces deux dernières décennies et suite à l'utilisation intensive des antibiotiques, nous assistons à une sélection de souches multirésistantes aussi bien en milieu hospitalier qu'en milieu communautaire (**Pitout et al., 2005**). L'acquisition par les bactéries de nouvelles résistances aux antibiotiques représente un défi majeur pour la médecine du XXI^{ème} siècle (**Vodovar et al., 2012**).

Les infections aux bacilles à Gram négatif (BGN) multi-résistants sont de plus en plus fréquentes, avec une augmentation significative des taux de morbidité et de mortalité. Parallèlement, le nombre de nouveaux antibiotiques disponibles sur le marché est de plus en plus restreint, limitant fortement les options thérapeutiques (**Cattoir, 2013**).

Ces résistances sont liées à un défaut d'accumulation au contact de la cible (les PLP ou protéines liant les pénicillines) suite à une imperméabilité ou un efflux de l'antibiotique, à des modifications des PLP ou à la production d'enzymes inactivatrices appelées β -lactamases. (**Robin et al., 2012**).

La résistance des entérobactéries aux céphalosporines de troisième génération (C3G) est fortement renforcée par l'acquisition des β -lactamases à spectre élargi (BLSE). Ces enzymes (TEM, SHV, CTX-M et dérivés) confèrent aux entérobactéries la résistance à l'ensemble des β -lactamines à l'exception des céphamycines et des carbapénèmes (**Bradford, 2001**).

Actuellement, la prévalence de BLSE varie selon les pays et les hôpitaux, mais dans tous les cas, les CTX-M (céfotaximase) sont considérées comme le type de BLSE le plus fréquent au monde (**Perez et al., 2007**).

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à la résistance aux β -lactamines, des souches cliniques de bacilles à Gram négatif d'isolement courant dans cet hôpital, compte tenu aussi du fait que ces antibiotiques sont très fréquemment prescrits pour le traitement des infections dues à ces bactéries en absence d'antibiogramme.

De ce fait notre étude vise à déterminer les taux de résistance aux β -lactamines, chez les bacilles à Gram négatif, dans l'Etablissement public Hospitalier (EPH) de Boufarik

(Blida), leurs profils épidémiologiques et de comparer ces derniers avec ceux rapportés dans la littérature. Pour développer ces aspects, nous avons adopté la méthodologie suivante:

- Isolement et identification des souches d'entérobactéries, *Pseudomonas sp* et *Acinetobacter ssp* à partir de prélèvements pathologiques divers.
- Étude de la résistance de ces souches *vis-à-vis* des β -lactamines.
- Détermination leurs profils de résistance aux β -lactamines.

Introduction

Au cours de ces deux dernières décennies et suite à l'utilisation intensive des antibiotiques, nous assistons à une sélection de souches multirésistantes aussi bien en milieu hospitalier qu'en milieu communautaire (**Pitout et al., 2005**). L'acquisition par les bactéries de nouvelles résistances aux antibiotiques représente un défi majeur pour la médecine du XXI^{ème} siècle (**Vodovar et al., 2012**).

Les infections aux bacilles à Gram négatif (BGN) multi-résistants sont de plus en plus fréquentes, avec une augmentation significative des taux de morbidité et de mortalité. Parallèlement, le nombre de nouveaux antibiotiques disponibles sur le marché est de plus en plus restreint, limitant fortement les options thérapeutiques (**Cattoir, 2013**).

Ces résistances sont liées à un défaut d'accumulation au contact de la cible (les PLP ou protéines liant les pénicillines) suite à une imperméabilité ou un efflux de l'antibiotique, à des modifications des PLP ou à la production d'enzymes inactivatrices appelées β -lactamases. (**Robin et al., 2012**).

La résistance des entérobactéries aux céphalosporines de troisième génération (C3G) est fortement renforcée par l'acquisition des β -lactamases à spectre élargi (BLSE). Ces enzymes (TEM, SHV, CTX-M et dérivés) confèrent aux entérobactéries la résistance à l'ensemble des β -lactamines à l'exception des céphamycines et des carbapénèmes (**Bradford, 2001**).

Actuellement, la prévalence de BLSE varie selon les pays et les hôpitaux, mais dans tous les cas, les CTX-M (céfotaximase) sont considérées comme le type de BLSE le plus fréquent au monde (**Perez et al., 2007**).

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à la résistance aux β -lactamines, des souches cliniques de bacilles à Gram négatif d'isolement courant dans cet hôpital, compte tenu aussi du fait que ces antibiotiques sont très fréquemment prescrits pour le traitement des infections dues à ces bactéries en absence d'antibiogramme.

De ce fait notre étude vise à déterminer les taux de résistance aux β -lactamines, chez les bacilles à Gram négatif, dans l'Etablissement public Hospitalier (EPH) de Boufarik (Blida), leurs profils épidémiologiques et de comparer ces derniers avec ceux rapportés dans la littérature. Pour développer ces aspects, nous avons adopté la méthodologie suivante:

- Isolement et identification des souches d'entérobactéries, *Pseudomonas sp* et *Acinetobacter ssp* à partir de prélèvements pathologiques divers.
- Étude de la résistance de ces souches *vis-à-vis* des β -lactamines.
- Détermination leurs profils de résistance aux β -lactamines.

Chapitre I

Synthèse bibliographiques

1. Bacilles à Gram négatif

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

Les BLSE sont isolées principalement chez les entérobactéries (par exemple : *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Proteus spp.*). Néanmoins, d'autres agents pathogènes à Gram négatifs tels que *Pseudomonas aeruginosa* ou *Acinetobacter baumannii* en sont également parfois producteurs (**Chraïti et al., 2015**).

1.1 *Enterobacteriaceae*

1.1.1 Historique

Les entérobactéries constituent un grand groupe de bactéries ayant une forte similitude. La création de ce groupe a été proposée par Rahn en 1937 qu'il dénomma *Enterobacteriaceae* et dans lequel il rassembla les genres bactériens déjà décrits (tels que *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Shigella*) dans le genre unique *Enterobacter* (**Joly et Reynaud, 2002**).

1.1.2 Taxonomie

Les entérobactéries sont des *Eubactéries*, appartiennent à la division des *Proteobacteria*, la classe des *Gammaproteobacteria*, à l'ordre des *Enterobacteriales* et à la famille des *Enterobacteriaceae*. La subdivision des genres et espèces est basée sur la comparaison des caractéristiques physiologiques, biochimiques, antigéniques et génétiques des bactéries. Le séquençage des gènes codant pour l'ARNr 16S et surtout des gènes codant l'ARN polymérase B permet en effet une identification très précise de toutes les espèces (**Joly et Reynaud, 2002**).

Les entérobactéries constituent une famille hétérogène de bactéries Gram-négatif qui est fréquemment impliquée dans les infections humaines. Elle se compose d'environ 30 genres de bactéries et de plus de 100 espèces, (**Avril et al., 2000**) dont les plus isolées en pathologie clinique appartiennent à 12 genres qui sont : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia* (**Perrière, 1992**).

1.1.3 Habitat

Les germes de cette famille sont en majorité pathogènes du tube digestif humain et d'autres sont des colonisateurs normaux de ce tube digestif (*Escherichia coli*, *Enterobacter spp*, *Klebsiella spp*), bien qu'ils soient également présents dans l'environnement (**Farmer et al., 2007**). On les trouve aussi dans la cavité buccale, au niveau des vois aériennes supérieures et sur les organes génitaux. Ils peuvent persister en dehors d'organismes vivants, on les rencontre dans le sol, l'eau et dans certaines denrées alimentaires (**Fauchère et Avril, 2002**).

1.1.4 Caractères bactériologiques

- **Caractères morphologiques**

Les *Enterobacteriaceae* sont des bacilles à Gram négatif, le plus souvent courts (1 à 6 µm), droits, immobiles ou mobiles par une ciliature péritriche (**Denis et Ploy, 2011**).

- **Caractères cultureux**

L'ensemble de ces bactéries pousse habituellement très aisément sur milieux ordinaires. La température optimale de croissance est généralement de 35 à 37 °C, à l'exception des *Yersinia* (30 à 37 °C), des *Pantoea* et des *Erwinia* (27 à 30 °C), certaines ne poussant pas à 37° C. Elles sont toutes aéro-anaérobies facultatives (**Denis et Ploy, 2011**).

Les colonies des bactéries produisant une capsule, notamment de *Klebsiella pneumoniae*, sont muqueuses et plus grandes que les colonies habituelles (leur diamètre peut atteindre 10 mm), elles ont une consistance gélatineuse. Dans le cas des espèces *Proteus vulgaris* et *Proteus mirabilis* qui sont particulièrement mobiles, il se produit fréquemment un envahissement de la surface des milieux solides qui s'étend par vagues successives et peut gagner en 24 heures la totalité de la surface (**Joly et Reynaud, 2002**).

- **Caractères biochimiques**

Plusieurs processus métaboliques caractérisent cette famille bactérienne. Il s'agit notamment de la capacité de réduire les nitrates en nitrites (en vue de générer de l'énergie), de fermenter le glucose, de ne pas avoir de cytochrome-oxydase, d'être aérobies ou anaérobies. (**Eisenstein et al., 1996**).

1.1.5 Mode de transmission

Ces micro-organismes sont d'importants pathogènes en milieux hospitaliers (**Laurent et al, 2008 ; Piednoir et al, 2011**) et communautaires (**Arslan et al, 2005 ; Chong et al, 2011 ; Songa et al, 2011**).

Ces derniers se propagent facilement entre humains par le biais des mains, de l'eau et de la nourriture contaminée de même que de sources environnementales (**NIH-NIAID, 2012**).

1.1.6 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.

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:

- *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, des septicémies, ainsi que d'autres localisations. En plus des bactéries déjà citées dans les infections communautaires avec un profil de multirésistance on cite: *Enterobacter sp, Serratia sp* (**Avril et al., 2000 ; Joly et Reynaud, 2002**).

1.2 Bacilles à Gram négatif non-fermentaires.

1.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

➤ Généralités

La bactérie pathogène opportuniste actuellement connue sous le nom de *P. aeruginosa* a reçu plusieurs noms à travers son histoire sur la base de ses cultures de coloration bleu-vert caractéristique produisant le plus souvent des pigments de pyocyanine et de pyoverdine, ainsi que son odeur aromatique caractéristique (seringat). Le chirurgien Charles-Emmanuel Sedillot en 1850 fut le premier à observer que la coloration de pansements chirurgicaux a été associée à un agent transmissible (**Lister et al., 2009**). C'est en 1869 que Fordos a souligné que la coloration était due à un pigment bleu cristallin appelé pyocyanine (**Williams et Cameron, 1894**).

P. aeruginosa a été isolé pour la première fois treize ans plus tard en 1882 par Gessard qui a démontré que ce pigment a été le produit d'un organisme, *Bacillus pyocyaneus* (bacille pyocyanique) (**Gessard, 1984**).

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie hydrique répandue dans l'environnement (**Bernet et Laprugne-Garcia, 2009**). C'est l'exemple type de la bactérie pathogène opportuniste (**Avril et al., 2000**).

➤ Taxonomie

Le genre *Pseudomonas* est classé dans la famille des *Pseudomonadaceae*, l'ordre des *Pseudomonadales*, la classe des *Gammaprotobacteria*, division des *Proteobacteria*, embranchement des *Procaryotes* et règne des *Bacteria* (**Garrity et al., 2010**).

➤ Habitat

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie ubiquitaire retrouvée dans l'environnement (sols, eaux...) (**Lister et al., 2009**), sous forme planctonique, ou à l'état sessile dans un biofilm (**Costerton et al., 1995**).

La bactérie vit naturellement dans l'eau douce et de mer, les sols humides ou à la surface des végétaux. Elle peut survivre et se multiplier dans une infinie variété de liquides et de milieux, sur tout type de support et de matériel humide à une température entre 4°C et 45°C (**Bernet et Laprugne-Garcia, 2009**).

On isole cette espèce de suppurations profondes ou superficielles, d'urines (témoignant du caractère iatrogène de l'infection) et plus rarement d'hémocultures. *P. aeruginosa* peut également être isolé à partir de selles sans que cette présence soit reliée à un rôle pathogène. Les souches de *P. aeruginosa* isolées du tractus respiratoire des sujets (plus de 90 %) atteints de mucoviscidose présentent des particularités morphologiques et physiologiques à prendre en compte lors de l'analyse bactériologique (isolement, identification et antibiogramme) des expectorations (Denis et Ploy, 2011).

➤ **Caractères bactériologiques**

• **Caractères morphologiques**

Il s'agit d'un bacille à Gram négatif en forme de bâtonnet de 1 à 3 µm de long et 0,5 à 0,8 µm de large. *P. aeruginosa* est une bactérie dépourvue de spores et de capsules, mobile grâce à la présence d'un flagelle monotriche polaire (Hafiane et Ravaoarino, 2008).

• **Caractères biochimiques.**

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie aérobie possédant un métabolisme oxydatif, mais en absence d'oxygène elle peut utiliser les nitrates comme accepteur d'électrons (Van Alstet *al.*, 2009). *P. aeruginosa* dégage une odeur aromatique caractéristique de seringa due à la production d'ortho-amino-acétophénone, intermédiaire du métabolisme du tryptophane et non liée à la production de pigment, il hydrolyse aussi la gélatine et lécithine (Avril *et al.*, 2000).

• **Caractères cultureux**

Le genre *Pseudomonas* comprend des espèces fluorescentes produisant des pigments spécifiques. Les deux pigments les plus fréquents et caractéristiques sont la pyocyanine et la pyoverdine qui sont solubles dans les milieux de culture. Les espèces pigmentées sont par exemple : *P. aeruginosa* produit les deux pigments, mais pouvant être perdus par mutation. (Matewish et Lam, 2004).

La culture est facile sur milieu complexe avec ou sans production de pigment, la température de croissance variée de 4 à 45°C selon les espèces, *P. aeruginosa* peut être cultivée à 41°C mais pas à 4°C. Les colonies de *P. aeruginosa* ont polymorphes, soit large avec une partie centrale bombée et un contour irrégulier (œufs sur le plat), soit des petites colonies mates légèrement bombées avec un bord circulaire régulier, des colonies muqueuses

bombées, opaques, visqueuses parfois collantes comme pour *Klebsiella*. La bactérie produit alors un polysaccharide extra-cellulaire qui est différent du slime (Avril et al., 2000).

➤ **Transmission**

La principale source de contamination des patients hospitalisés est donc leur flore endogène mais l'environnement est également incriminé (Talon et al., 1995; Bergmans et al., 1998; Minchella et al., 2010). La transmission croisée est le plus souvent manuportée par le personnel soignant, soit directement de patient à patient, soit indirectement à partir de surfaces inertes préalablement contaminées (Talon et al., 1995; Bergmans et al., 1998; Lister et al., 2009).

➤ **Pouvoir pathogène**

La pathogénicité de *P. aeruginosa* est attribuée à la production de plusieurs facteurs de virulence, hautement induits dans l'infection et s'expriment préférentiellement sur les terrains immunodéprimés (Mahenthiralingam et al., 1996). Chez les brûlés, cette infection est l'une des causes majeures de mortalité (Avril et al., 2000).

1.2.2 *Acinetobacter baumannii*

➤ **Généralités**

Acinetobacter baumannii est un bacille à Gram-négatif non-fermentant, présentant souvent une multi-résistance aux antibiotiques (bêta-lactamines incluant les molécules à large spectre telles les pénicillines à large spectre et les céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} générations, les aminoglycosides et les fluoroquinolones) (Jan et al., 2004). L'évolution de sa résistance a été spectaculaire depuis 30 ans (Delmas, 2008).

➤ **Taxonomie**

Longtemps considéré comme un représentant de la famille des *Neisseriaceae*, le genre *Acinetobacter* comprend actuellement 32 espèces, ce genre est inclus dans la famille des *Moraxellaceae*, ordre des *Pseudomonadales*, classe des *Gammaproteobacteria*, division des *Proteobacteria*, embranchement des *Procaryotes* et règne des *Bacteria* (Euzéby, 2010).

➤ **Habitat**

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

Cette bactérie est fréquemment retrouvée en milieu hospitalier dans des milieux aqueux et humides (lavabo, savons, eau distillée, eau des systèmes d'humidification) et elle est également capable de résister à certains désinfectants à base d'ammonium quaternaire et de proliférer dans des flacons de désinfectants (Jan et al., 2004).

En revanche, selon Giamarellou et al., (2008), *A. baumannii* a été isolé dans plusieurs sources, comme la nourriture, par conséquent, la nourriture de l'hôpital pourrait être une source potentielle d'acquisition d'*A. baumannii* et de colonisation subséquente du tube digestif des patients hospitalisés (Giamarellou et al., 2008).

Chez l'homme, les *Acinetobacter* font partie de la flore cutanée de la peau saine, et sont souvent retrouvés dans les localisations humides (creux axillaires, aines, espaces interdigitaux) (Delmas, 2008).

➤ **Caractères bactériologiques**

• **Caractères biochimiques.**

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

• **Caractères morphologiques**

Bacilles à Gram négatif, immobiles, non sporulés, parfois capsulés, trapus, souvent associés en paire ou en courtes chaînes ; formes filamenteuses dans les cultures âgées (Delmas, 2008)

- **Caractères culturaux**

L'isolement des souches en milieu solide peut être obtenu après incubation à température comprise entre 30 et 37°C sur des milieux conventionnels (gélose au sang, gélose trypticase soja, etc.) et sur les milieux dédiés aux bacilles à Gram négatif comme la gélose Mac Conkey ou la gélose de Drigalski, à l'exception de l'*Acinetobacter baumannii* qui se caractérise par sa température de croissance entre 15°C et 44°C, critère essentiel dans le diagnostic différentiel avec les autres espèces. Les colonies apparaissent en générale lactose négatif sur les milieux lactosés (**Lambert, 2007**).

- **Transmission**

Sa transmission s'effectue le plus souvent de façon manuportée par l'intermédiaire du personnel soignant ou par aérosolisation à partir de matériel contaminé (p.ex. : humidificateur, matériel de ventilation) (**Jan et al., 2004**).

- **Pouvoir pathogène**

Ce germe est considéré comme un pathogène opportuniste occasionnellement responsable d'infections nosocomiales sporadiques ou à caractère épidémique. Les infections le plus souvent rencontrées sont les infections pulmonaires en particulier chez les patients intubés et ventilés en réanimation (létalité globale associée de 40-70%), les septicémies, les infections de plaies et les infections du tractus urinaire (**Jan et al., 2004**), méningites, suppurations diverses. Leur grande résistance aux antibiotiques rend le traitement de ces infections difficile. *Acinetobacter baumannii* est l'espèce la plus fréquemment rencontrée dans ce type d'infection (**Delmas, 2008**).

Les infections à *A. baumannii* touchent surtout les patients âgés et immunodéprimés, en particulier ceux qui séjournent de façon prolongée dans des unités de réanimation (**Jan et al., 2004**).

2. Les bêta-lactamines

2.1 Historique

En 1928, Fleming (1881-1955), professeur de bactériologie à Londres, observa sur une boîte de Pétri, qui contenait une culture de staphylocoques et qui avait été contaminée accidentellement par une moisissure, que les colonies de staphylocoques situées à proximité de la moisissure avaient été lysées (Figure1). Il identifia cette moisissure comme étant un *Penicillium* et réussit à préparer un « jus de moisissure » qu'il appela pénicilline. Ce n'est qu'en 1940 qu'une équipe de chercheurs d'Oxford, Florey, Chain et Heatley, réussit à obtenir une pénicilline concentrée, partiellement purifiée et stable (Cavallo et al., 2004)

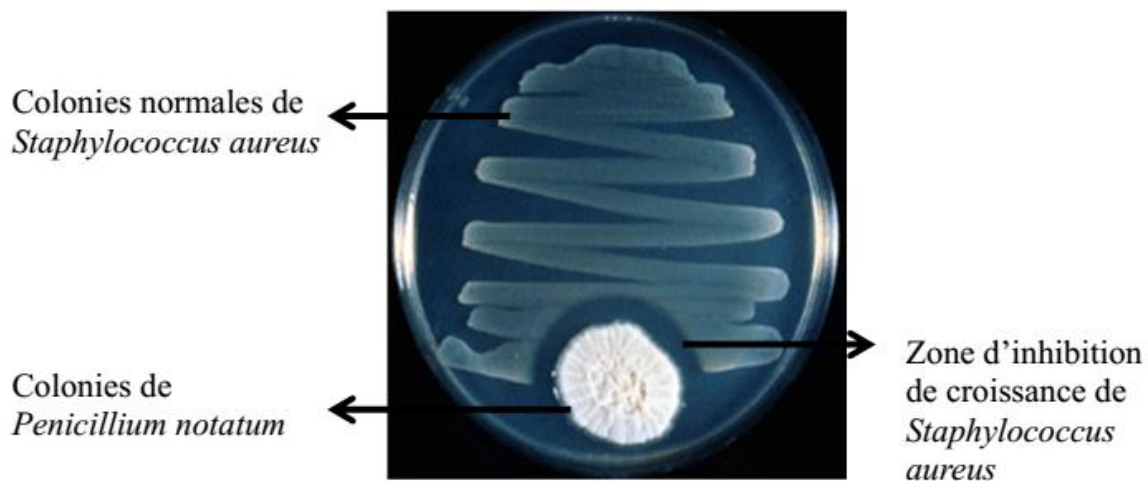


Figure 1: Inhibition de la croissance d'une culture de *Staphylococcus aureus* par la moisissure *Penicillium notatum*. (Prescott et al.,2010).

2.2 Généralités

Les bêta-lactamines sont parmi les antibiotiques les plus utilisés dans le traitement des infections causées par les *K. pneumoniae* vue leur diversité, faible toxicité, activité bactéricide et large spectre d'action. Elles comprennent les dérivés de la pénicilline, les céphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes, et ont toutes en commun le cycle β -lactame (Bryskier, 1984)

2.3 Structure

Les β -lactamines ont en commun une structure appelée l'anneau β -lactame, qui est formée de quatre membres : trois atomes de carbone et un atome d'azote. Cet anneau constitue la portion responsable de l'activité de ces molécules (**Fisher et al., 2005**) (Figure 2)

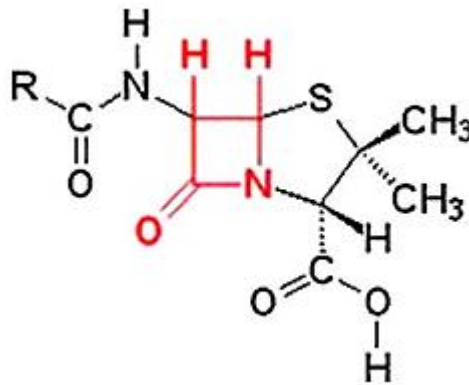


Figure 2 : Structure générale des bêta-lactamines (**Ruppé, 2010**).

2.4 Modes d'action des β -lactamines

Chaque antibiotique exerce son action biochimique en modifiant une réaction particulière du métabolisme bactérien (**François Jehl, 2012**).

Toutes les β -lactamines ont le même mécanisme d'action: elles bloquent la synthèse du peptidoglycane (ou mucopeptide, ou muréine), qui est le polymère majeur spécifique de la paroi des bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Ce blocage intervient par inhibition de certaines enzymes responsables de la transpeptidation, étape essentielle de la synthèse du peptidoglycane. Ces enzymes, collectivement appelées PLP, sont insérées dans la partie externe de la membrane cytoplasmique bactérienne.

Pour être actives, les β -lactamines vont devoir atteindre leur cible en pénétrant dans la paroi bactérienne et se fixer sur les PLP, ce qui aboutit à l'inactivation du site actif de l'enzyme, provoquant une inhibition de la synthèse du peptidoglycane et l'arrêt de la croissance bactérienne. La fixation est irréversible et l'antibiotique se comporte comme un substrat suicide (**Cavallo et al., 2004**) (Figure 3).

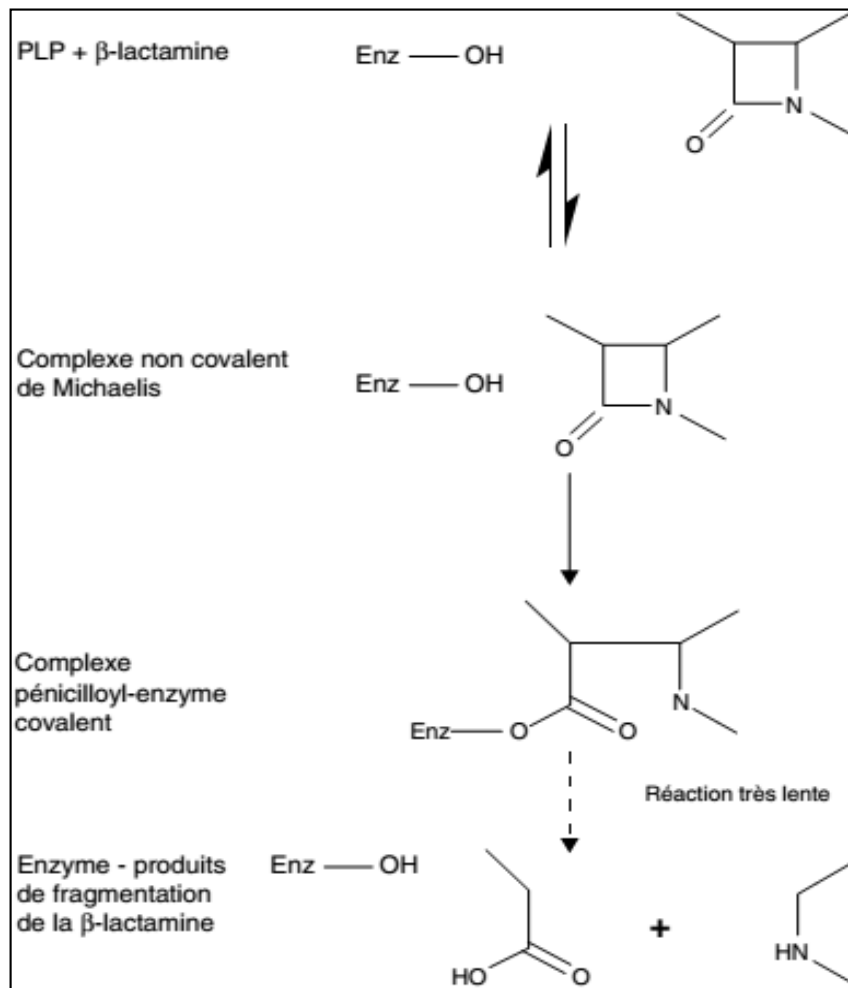


Figure 3: Acylation du site actif sérine d'une protéine de liaison à la pénicilline (PLP) par une β -lactamine. Enz : enzym (**Cavallo et al., 2004**)

2.5 Classification des β -lactamines

Les β -lactamines, qu'elles soient naturelles ou produites par hémisynthèse, sont classées en fonction de la nature du noyau entrant dans leur structure de base (**Cavallo et al., 2004**). Elles comprennent différentes familles, dont les principales utilisées en thérapeutique humaine sont brièvement présentées ci-après (Figure 4).

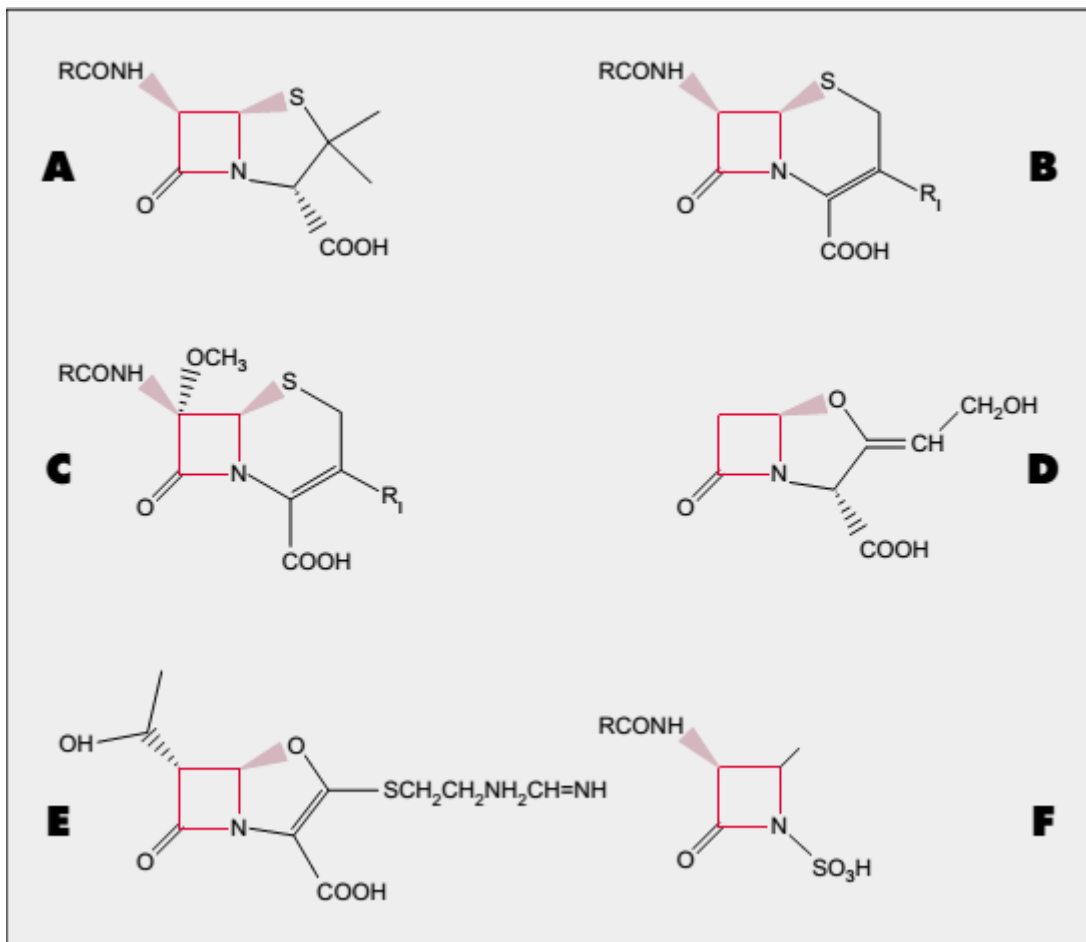


Figure 4: Structures de quelques β -lactamines. A : pénicillines ; B : céphalosporines ; C : céphamycines ; D : acide clavulanique ; E : imipénème (carbapénème) ; F : monobactames (Charlieret *al.*, 1998).

➤ Les pénicillines

Leur noyau de base associe un cycle β -lactame à un cycle thiazolidine, spécifique des pénicillines (Cavallo *et al.*, 2004). Selon la nature de ses différents substituants, on a défini plusieurs sous-classes, dont les plus utilisées sont les aminopénicillines (ampicilline, amoxicilline), les carboxypénicillines (ticarcilline) et les uréidopénicillines (pipéracilline). Le pivmécillinam (prologue du mécillinam) est une amidinopénicilline indiquée dans le traitement des infections urinaires (Ruppé, 2010).

➤ Les céphalosporines

Leur noyau de base associe un cycle β -lactame à un cycle dihydrothiazine pour former l'acide 7-aminocéphalosporanique ou 7-ACA (noyau céphème), qui distingue les

céphalosporines des pénicillines (**Cavallo et al., 2004**). On les classe en trois, voire quatre générations :

1. Les céphalosporines de première génération (C1G : céfalotine, céfalexine) sont plutôt actives sur les bactéries à Gram positif.
2. Les C2G (céfuroxime, céfamandole) ont un spectre étendu vers les bactéries à Gram négatif.
3. Les C3G ou oxyimino-céphalosporines (céfixime, céfotaxime, ceftazidime) ont un spectre étendu à la plupart des entérobactéries et sur *P. aeruginosa* pour la ceftazidime. Les C3G sont les antibiotiques de choix dans le traitement des infections sévères à entérobactéries.
4. Les C4G (céfépime et ceftpirome) sont des oxyimino-céphalosporines zwitterioniques relativement stables à l'hydrolyse des céphalosporinases de type AmpC (**Ruppé, 2010**).

➤ Les carbapénèmes

Les carbapénèmes, dérivés de la thiénamycine, ont un spectre très large et sont très stables à l'hydrolyse de la plupart des β -lactamases. Les molécules disponibles sont l'imipénème (en association avec la cilastatine, qui inhibe la dégradation rénale de l'imipénème), l'ertapénème et le méropénème. Le doripénème est le dernier carbapénème mis sur le marché en Europe (**Ruppé, 2010**). Ces antibiotiques sont actifs vis-à-vis de très nombreuses espèces de bacilles Gram négatif dont les entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*. Seule l'ertapénème n'est active que sur les entérobactéries (**Nordmann et Carrer, 2010**).

➤ Les monobactames

Ce sont des β -lactamines monocycliques, initialement découvertes dans des surnageants de culture de bactéries plutôt que de levures comme dans le cas des autres β -lactamines (**Ruppé, 2010**). Seul l'aztréonam est à l'heure actuelle prescrit (**Cavallo et al., 2004**), ce dernier n'est actif que sur les bactéries à Gram négatif (**Ruppé, 2010**).

➤ **Les inhibiteurs des β -lactamases**

Ce sont des β -lactamines de forte affinité pour certaines β -lactamases, mais qui ont une faible activité antibactérienne intrinsèque à l'exception de la bonne activité du sulbactam sur *Acinetobacter baumannii*. L'acide clavulanique est utilisé avec l'amoxicilline dans l'Augmentin¹ et la ticarcilline dans le Claventin¹, alors que le tazobactam est utilisé avec la pipéracilline dans la Tazocilline¹ (**Ruppé, 2010**).

3. La résistance aux β -lactamines

3.1 La résistance bactérienne

Selon la définition microbiologique du terme, une souche est dite résistante lorsqu'elle se cultive en présence de concentration plus élevée en antibiotique comparativement à d'autres souches qui lui sont phylogénétiquement liées (**Muylaert et Mainil, 2012**).

Chez les entérobactéries, la résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) peut être due à l'hyperproduction de céphalosporinase chromosomique (AmpC), à l'acquisition plasmidique d'une céphalosporinase (e.g. CMY) ou d'une BLSE (e.g. TEM, SHV, CTX-M) (**Cattoir, 2013**).

3.2 Types de résistance

➤ **Résistance naturelle**

La résistance naturelle ou intrinsèque est un caractère d'espèce qui touche toutes les bactéries de l'espèce considérée. Elle est stable, transmise à la descendance (elle a pour support génétique le chromosome bactérien) mais elle n'est pas ou peu transmissible sur un mode horizontal (d'une bactérie à l'autre au sein d'une même espèce ou entre espèces différentes) (**Lozniewski et al., 2010**).

Beaucoup de bactéries à Gram négatif produisent à l'état naturel des β -lactamases constitutives codées par un gène chromosomique. Ces enzymes, produites chez les souches sauvages à des niveaux variables suivant les espèces, contribuent à définir les phénotypes de résistance naturelle aux β -lactamines chez les souches sauvages (**Cavallo et al., 2004**).

➤ Résistance acquise

Il s'agit d'un caractère qui ne concerne alors que quelques (ou parfois de nombreuses) souches d'une espèce donnée. La résistance acquise est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérien. La résistance acquise résulte d'une modification du capital génétique de la bactérie (Lozniewski *et al.*, 2010), à savoir, les mutations responsables des résistances endogènes, et l'acquisition horizontale de matériel génétique étranger responsable des résistances exogènes (Muylaert et Mainil, 2012), permettant ainsi de tolérer une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce (Lozniewski *et al.*, 2010).

3.3 Mécanismes de résistance aux β -lactamines

La bactérie peut opposer un ou plusieurs moyens de défense (Figure 5). Ces mécanismes de résistance acquis aux β -lactamines sont de nature enzymatique ou non enzymatique (Cavallo *et al.*, 2004).

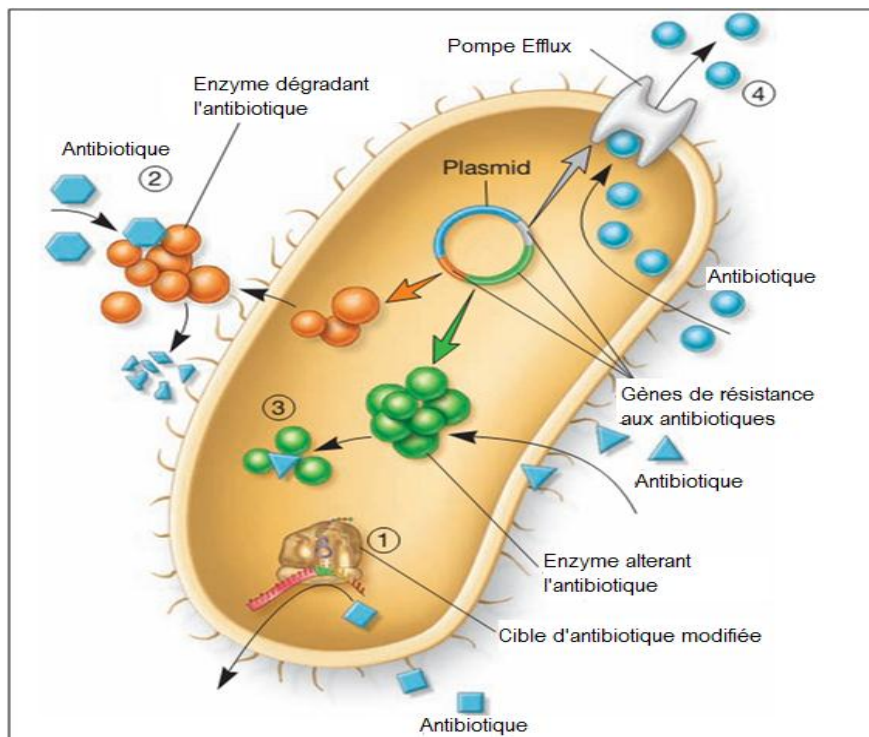


Figure 5: Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques (Willey *et al.*, 2008)

Les bactéries peuvent résister à l'action des antibiotiques (1) en empêchant l'accès (ou altérant) la cible de l'antibiotique, (2) dégradant l'antibiotique, (3) la modification de l'antibiotique, et / ou (4) l'extrusion rapide de l'antibiotique.

3.3.1 Mécanismes non enzymatiques

- **Imperméabilité de la membrane externe:** L'altération des porines par mutation est à l'origine de résistances acquises aux β -lactamines, soit par une modification structurale d'une des porines essentielles, ce qui a été décrit chez *E. coli*, soit par une diminution quantitative des porines, qui est la situation la plus fréquente (**Cavallo et al., 2004**).
- **L'hyperexpression des systèmes d'efflux:** Le second mécanisme non enzymatique est la sélection d'une mutation qui aboutit à une hyperexpression d'un système d'efflux actif (**Cavallo et al., 2004**), cet efflux conduit à une diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique (**Lozniewski et al., 2010**). (ex. résistance à l'imipénème causée par la surproduction d'AmpC pouvant être associée à des pertes de porines de la membrane externe et/ou la surexpression des pompes à efflux) (**Penteado et al., 2009**).
- **Modification des PLP :** Les PLP, qui sont les cibles de β -lactamines, sont des protéines dont le site actif enzymatique est enchâssé sur la face extérieure de la membrane cytoplasmique (**Cavallo et al., 2004**). La modification de la cible des β -lactamines (PLP) par mutation ou l'utilisation par la bactérie de transpeptidases alternatives pour la synthèse du peptidoglycane peuvent générer une résistance bactérienne (**Livermore et Williams, 1996**).

3.3.2 Mécanismes enzymatiques: Production de β -lactamases

Les β -lactamases constituent toujours le principal mécanisme de la résistance naturelle et acquise aux β -lactamines, en particulier chez les bactéries à Gram négatif (**Philippon et Arlet, 2006**).

➤ Généralités des β -lactamases

Les β -lactamases sont un groupe hétérogène d'enzymes d'origine bactérienne capables d'inactiver les β -lactamines par ouverture du cycle β -lactame, structure de base commune à toutes les β -lactamines (**Cavallo et al., 2004**).

La première bêta-lactamase a été décrite dans les années 1940, peu après la commercialisation de la pénicilline G (**Vodovar et al., 2012**), par Abraham et Chain, qui ont

mis en évidence une enzyme capable d'empêcher l'action de la pénicilline chez *E. coli* ; ils la nommèrent pénicillinase (**Abraham et Chain, 1940**).

Les gènes peuvent être portés par le chromosome ou des plasmides, parfois par des transposons ou des intégrons. La présence des gènes sur ces éléments génétiques transférables (plasmides, transposons, intégrons) facilite évidemment leur dispersion dans le monde bactérien. L'expression des gènes est constitutive ou inducible (**Frère, 1995**).

➤ Mode d'action

Les β -lactamases sont des enzymes d'inactivation hydrolysant le pont amide du cycle β -lactame (correspondant à la structure de base des β -lactamines) pour donner un acylenzyme qui sera ensuite dégradé en acide inactif (**Elhani, 2012**) (Figure 6).

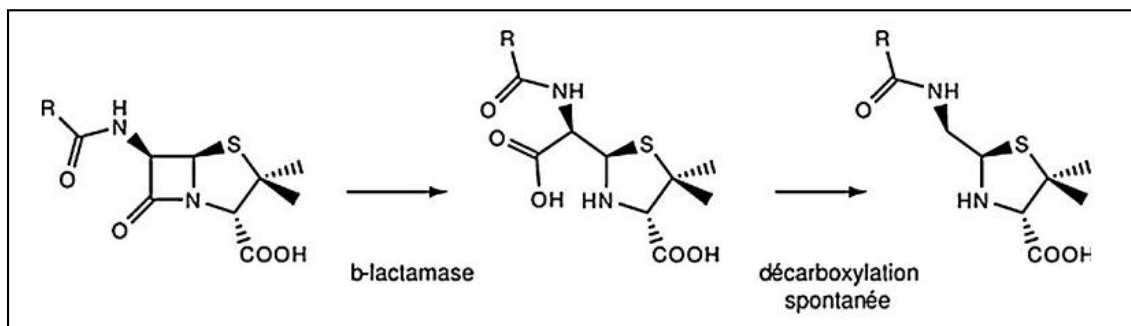


Figure 6: Mécanisme d'hydrolyse d'une β -lactamine par une β -lactamase (**Ruppé, 2010**).

➤ Classification

Les deux classifications couramment utilisées pour « classer » les bêta-lactamases sont celle d'Amblar et celle de Bush Jacoby et Medeiros (**Amblar, 1980**).

La classification fonctionnelle de Bush, Jacoby et Medeiros repose sur l'activité hydrolytique et la sensibilité des bêta-lactamases aux inhibiteurs (**Bush, 1995**).

La classification structurale d'Amblar est basée sur la séquence peptidique du site enzymatique (**Amblar, 1980**). Ces enzymes d'inactivation d'une extrême diversité (plus de 300 répertoriées) sont distribuées au sein de 4 classes A, B, C et D (Tableau1). Celles appartenant aux classes A, C et D sont des enzymes à sérine active, seule la classe B

regroupant les métallo- β -lactamases (MBL) nécessitant les ions Zn^{++} pour leur activité (Philippon et Arlet, 2006).

Tableau I: Classification simplifiée des β -lactamases. Selon Ambler (Cattoir, 2013).

Classe	Enzyme	Substrats préférentiels	Exemples
A	Pénicillinase β -lactamases à spectre étendu (BLSE) Pénicillinase résistante aux inhibiteurs Carbapénémase	Pén \pm Céph Pén, Céph, Mono Pén Pén, Céph, Mono, Carb	TEM-1, TEM-2, SHV-1 Dérivés de TEM/SHV CTX-M, PER, VEB TRI KPC
B	Métallo- β -lactamases	Tous (sauf Mono)	IMP, VIM, NDM-1
C	Céphalosporinase	Céph	AmpC, CMY
D	Oxacillinase	Pén (oxacilline) \pm Céph ou Carb	OXA (notamment OXA-48 chez Entér; OXA-23, -24, -58 chez Ab)

-Les β -lactamases de classe A: Les β -lactamases de classe A comprennent des pénicillinases, des BLSE et des carbapénémases (Cattoir, 2013), Schématiquement, les β -lactamases de classe A sont sensibles à l'action de l'acide clavulanique, du sulbactam et du tazobactam (Ruppé, 2010).

-Les β -lactamases de classe B : Les β -lactamases de classe B sont principalement des carbapénémases qui hydrolysent les carbapénèmes comme IMP et VIM, elles sont inhibées par l'EDTA (l'acide éthylène diamine tétra-acétique) (Ruppé, 2010).

-Les β -lactamases de classe C : Les β -lactamases de la classe C correspondent aux céphalosporinases, chromosomiques ou plasmidiques (Cattoir, 2013), elles sont de type AmpC, inhibées par la cloxacilline (Ruppé, 2010).

-Les β -lactamases de classe D : Les oxacillinases (OXA) de la classe D comprennent des enzymes avec des activités très variables (pénicillinases, BLSE, carbapénémases) (Cattoir, 2013).

3.3.3 Phénotypes de résistance enzymatique aux β -lactamines chez les BGN

3.3.3.1 Résistance naturelle ou phénotypes « sauvages »:

Classiquement, on classe les entérobactéries en groupes en fonction de leur sensibilité naturelle aux β -lactamines (Zogheib et Dupont, 2005).

- **Groupe 0: Phénotype « sensible » d'espèces dépourvues de gènes de β -lactamases**

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

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

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

- **Groupe 2 : Phénotype « pénicillinase de bas niveau »**

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

- **Groupe 3 : Phénotype « céphalosporinase de bas niveau »**

Des espèces comme *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Hafnia alvei*, *Yersinia enterocolitica*, *Providencia stuartii* et *Providencia rettgeri* possèdent une céphalosporinase inductible, leur conférant une résistance aux amino-pénicillines, aux céphalosporines de 1^{ère} génération et à l'action de l'acide clavulanique. Ce type d'expression est le fait d'un mécanisme complexe

faisant intervenir plusieurs gènes régulateurs (*ampR*, *ampD*, et *ampG*) (Philippon et Arlet, 2006).

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

Elles sont résistantes aux amino-pénicillines, uréido-pénicillines, carboxypénicillines et aux céphalosporines de 1^{ère} génération par l'action associée d'une pénicillinase et d'une céphalosporinase naturelle produite à bas niveau (Zomahoun, 2004).

- **Groupe 5 : Phénotype « céfuroximase »**

Proteus vulgaris et *Proteus penneri* possèdent une β -lactamase particulière parfois dénommée "céfuroximase" qui rend ces espèces résistantes aux pénicillines du groupe A et aux céphalosporines de 1^{ère} et 2^{ème} générations (à l'exception des céphamycines comme la céfoxitine) mais dont l'activité enzymatique est inhibée par l'action d'acide clavulanique (Denis et Ploy, 2007).

- **Groupe 6 : Phénotype « β -lactamase à spectre étendu chromosomique »**

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

3.3.3.2 Résistance acquise ou phénotypes « résistants »:

Toutes les entérobactéries, quel que soit leur groupe, sont capables d'intégrer des gènes de résistance codant pour une β -lactamase (Zogheib et Dupont, 2005). Les résistances acquises chez *P. aeruginosa* pour les antibiotiques sont très fréquentes, résultant de l'accumulation de mécanismes de résistance liés à des mutations chromosomiques et à l'acquisition de gènes exogènes (Sefraoui, 2015).

- **Phénotype « pénicillinase de haut niveau » ou « pénicillinase acquise »**

Les pénicillinases des bacilles à Gram négatif sont nombreuses (TEM-1, TEM-2, SHV-1...etc) et non inductibles. Environ 75% de β -lactamases isolées des entérobactéries sont des TEM-1 (Collignon et al., 2007). De très nombreuses pénicillinases ont été identifiées chez *P. aeruginosa*. La pénicillinase la plus fréquente en France est la carbénicillinase PSE-1 (Mérens et al., 2012).

Ces enzymes sont codées par des plasmides et donc facilement transférables. Elles confèrent aux bactéries, qui les produisent à haut niveau, une résistance aux aminopénicillines, carboxy-pénicillines, uréido-pénicillines, amidinopénicillines, C1G et de C2G. Cependant elles conservent leur sensibilité aux C3G, céfamycines, monobactames et carbapénèmes. Elles sont inhibées plus ou moins par les inhibiteurs enzymatiques (Collignon et al., 2007).

- **Phénotype « pénicillinase résistante aux inhibiteurs »**

Plus récemment, des β -lactamases dérivées de pénicillinases plasmidiques entraînant une résistance aux inhibiteurs suicides de β -lactamases ont été décrites. Elles sont produites par *Escherichia coli*, *Proteus* et *Klebsiella*. Elles confèrent une résistance à l'amoxicilline et à la ticarcilline, seules ou en association avec l'acide clavulanique et un bas niveau de résistance aux C1G. Pour la pipéracilline, le niveau de résistance est plus faible (Lavigne et al., 2002).

- **Phénotype « Hyper OXY »**

Chez *Klebsiella oxytoca*, des mutations ponctuelles dans la région du promoteur de transcription des enzymes chromosomiques K1 (type OXY-1 ou OXY-2), conduisent à augmentation du niveau d'expression et se traduisent in vivo par une résistance de haut niveau aux pénicillines, aux céphalosporines de 1^{ère} et 2^{ème} génération, ainsi qu'à l'aztréonam. Dans ce cas, une synergie peut être détectée entre les céphalosporines de 3^{ème} génération ou l'aztréonam, et le clavulanate (Sougakoff et Trystram, 2003).

- **Phénotype « 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 surexprimée (*Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Morganella morganii* et autres entérobactéries du même groupe) (Gueudet et al., 2010).

Depuis 1990, des céphalosporinases codées par des gènes plasmidiques ont été décrites. Parmi celles-ci, il y a MIR-1, BIL-1 et CMY-2 (Seck, 2005). Cette résistance a été retrouvée chez *Klebsiella pneumoniae* mais également chez d'autres entérobactéries. Ces enzymes à médiation plasmidique dérivent des céphalosporinases chromosomiques d'*Enterobacter* (ACT-1 et MIR-1), de *Citrobacter* (CMY), de *Morganella* (DHA), d'*Hafnia* (ACC-1) et d'autres entérobactéries (MOX, FOX. . .) (Philippon et Arlet, 2006).

Ce phénotype de résistance est très fréquent, c'est le mécanisme de résistance principal aux céphalosporines antipseudomonas chez *P. aeruginosa* (Mérens et al., 2012).

- **Les carbapénémases**

Commercialisés depuis plus de 15 ans, l'imipénème, ou encore le méropénème dans des pays autres que la France, restent toujours des molécules très actives, donc apparaissent souvent, pour le clinicien, le dernier recours thérapeutique. Cependant, quelques signes d'inquiétude montent, suite à la découverte d'enzymes nouvelles, majoritairement transférables, dénommées IMP (Imipenemase), VIM (Verona integron-encoded metallo- β -lactamase), SPM (São Paulo MBL), GIM (German imipenemase), KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapénémases), GES (Guiana Extended Spectrum β -lactamase), OXA (oxacillinasés) chez des bactéries opportunistes comme *P. aeruginosa* et *A. baumannii* (Philippon et Arlet, 2006).

Les carbapénémases sont des β -lactamases dont le spectre s'étend aux carbapénèmes (imipénème, méropénème et/ou doripénème) (Mérens et al., 2012). Les carbapénémases décrites chez les entérobactéries appartiennent aux quatre classes connues de bêta-lactamases (classe A, B, C, D de la classification d'Ambler). Les plus importantes, cliniquement, sont

actuellement les bêta-lactamases de type KPC, IMP (active on IMiPenem)/VIM (Verona Integron-encoded Metallo- β -lactamase) et OXA-48 (β -lactamase de classe D) (**Nordmann et Carrer, 2010**).

- **Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE)**

- **Définition**

Décrites pour la première fois en 1983 en Allemagne, puis en France et en Tunisie en 1984, la présence de bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE) a été signalée ensuite dans le monde entier, principalement chez des patients hospitalisés, en corrélation avec une importante utilisation des céphalosporines de troisième génération (C3G) et avec la nature plasmidique des BLSE (**Anastay et al., 2013**).

Elles sont des enzymes produites par les entérobactéries qui hydrolysent l'ensemble des pénicillines et les céphalosporines à l'exception des céphamycines (céfotixine, céfotétan) du moxalactam et des carbapénèmes. Elles sont inhibées partiellement par les inhibiteurs de bêta-lactamase (acide clavulanique, tazobactam, sulbactam), et portées par des plasmides conjugatifs, donc transférables (**Doit et al., 2010**).

- **Types de BLSE**

Plus de 200 BLSE ont été décrites, classées en 11 familles en fonction de leur séquence protéique (**Elhani, 2012**).

Les 4 familles majeures sont TEM, SHV, OXA et CTX-M, et sont le plus souvent d'origine plasmidique (**Géraldine, 2010**). Les BLSE de type TEM et SHV dérivent de TEM-1 et SHV-1 (bêta-lactamases à spectre étroit) ; en revanche les BLSE de type CTX-M retrouvées dans les entérobactéries dérivent des bêta-lactamases chromosomiques d'espèces du genre *Kluyvera* (**Vodovar et al., 2012**).

- **Epidémiologie**

Les BLSE de type TEM et SHV ont très rapidement et largement été diffusés dans le monde avec des prévalences variables selon les pays. Au cours des années 1990-98, elles ont été responsables de grandes épidémies de colonisations et d'infections nosocomiales en particulier dans les services de soins intensifs où l'utilisation des C3G est très commune. Elles

sont principalement liées aux espèces *K. pneumoniae* et *Enterobacter aerogenes* (**Paterson et Bonomo, 2005**).

A la fin des années 90, un renversement de situation avec l'émergence des CTX-M était noté. En effet, après une diminution significative des BLSE de type TEM et SHV, la prévalence des CTX-M a explosé. Ces dernières sont devenues endémiques sur tous les continents (**Canton et al., 2008**).

Depuis l'année 2000, *E. coli* représente l'espèce majoritaire chez laquelle les CTX-M ont été détectées et semble être un vrai pathogène communautaire producteur de BLSE et responsable principalement d'infections urinaires (**Elhani, 2012**).

Enfin, les BLSE plus rares, comme PER ou VEB, ont des répartitions géographiques différentes. Ainsi l'enzyme VEB-1 est très répandue dans le sud-est asiatique alors que PER-1 est prépondérante en Turquie et PER-2 n'a été décrite qu'en Argentine (**Quinteros et al., 2003**) et l'enzyme TLA-1 au Mexique (**Canton et al., 2008**). En Algérie, les enzymes PER-1 ou VEB-1 ont été observés de façon sporadique chez *Proteus* (**Iabadeneet al., 2009**), et *Enterobacter* (**Iabadene et al., 2008**).

Chapitre II
Matériel et Méthodes

1. Patients et prélèvements

Notre stage s'est déroulé durant une période de 04 mois: Février au Mai 2016 au niveau de l'Unité de Bactériologie Clinique du laboratoire de l'Etablissement Public et Hospitalier (EPH) de Boufarik, visant la détermination des profils de résistance aux β -lactamines chez les bacilles à Gram négatif.

➤ Matériel

• Matériel biologique

Cette étude porte sur 1778 prélèvements comportant les urines, LCR, pus et divers et le sang (Tableau II), issus des patients hospitalisés dans les différents services de cet hôpital (Néonatalogie, Pédiatrie, Maternité, Médecine interne, Maladies infectieuses, Chirurgie générale, Urgences) de la wilaya de Blida et aussi à des malades consultants à titre externe. Certains facteurs et données épidémiologiques ont été pris en considération lors de la réception des prélèvements, citant:

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

Tableau II: Répartition des prélèvements selon leurs natures.

Prélèvement	Urine	Pus et divers	LCR	Sang
Nombre d'échantillon	1271	91	159	257

• Matériel non biologique

Il est représenté par les instruments et l'appareillage, les milieux de culture et les réactifs ainsi que les différents antibiotiques disponibles. Ces derniers sont portés en **annexe 1 et 2**.

2. Techniques de prélèvement

Le prélèvement est une étape essentielle du diagnostic car c'est de sa qualité que dépend l'analyse bactériologique. Il nécessite des conditions d'asepsie et de stérilité, doit s'effectuer en absence d'antibiothérapie, à défaut ouvrir une fenêtre thérapeutique.

2.1 Prélèvement d'urine

Le prélèvement s'effectue après nettoyage du méat urinaire avec une solution antiseptique en recueillant les premières urines du matin en milieu du jet, selon la technique dite « du milieu de jet »

Les urines sont recueillies dans un tube stérile (environ 10 à 20 ml), le tube est fermé hermétiquement et porté au laboratoire dans une demi-heure, sinon il faut le placer dans de la glace (**Djennane et al., 2009**).

Chez le nourrisson, après une désinfection soignée de la région périnéale et afin d'éviter toute contamination fécale, un sac collecteur stérile spécifique, muni d'un adhésif est fixé à vulve chez la petite fille ou à la verge chez le petit garçon pendant une heure, ce dernier est acheminé dans les plus brefs délais au laboratoire.

Chez les personnes sondées, après clampage de la sonde, on ponctionne les urines avec une seringue et on les transvase dans un flacon stérile.

2.2 Prélèvement sanguin

Le sang est recueilli par ponction veineuse au niveau du pli de coude, la peau est désinfectée à l'aide de l'alcool on laisse agir pendant une minute. 10% de sang par apport à la quantité du bouillon est prélevé immédiatement dans les flacons d'hémoculture toute on évitant de les disposer sur des surfaces froides (**Granier et Denis, 2007**).

Le prélèvement doit être effectué au moment des pics fébriles ou de frissons.

2.3 Prélèvements de LCR (Liquide Céphalo-Rachidien)

L'examen cyto-bactériologique du LCR permet de faire le diagnostic des méningites purulentes grâce à l'étude du LCR obtenu par ponction lombaire.

La ponction lombaire (P.L.) est pratiquée entre L4 et L5 ou entre L3 et L4. Si le liquide céphalo-rachidien (L.C.R.) est hématurique, on le recueille dans trois tubes en freinant

son écoulement au moyen du mandrin. Le LCR est recueilli dans des flacons secs et stériles, conservé à la température ambiante et examiné dès son arrivée au Laboratoire (**Akiki et al ., 1991**).

2.4 Prélèvements de pus et divers

Le pus peut avoir diverses origines et les divers peuvent être:

- Liquides d'épanchements (liquide d'ascite, pleural, articulaire, péricardique, péritonéal).
- Prélèvement des lésions superficielles de la peau et des muqueuses.

Dans le cas où le pus est localisé dans un abcès superficiel fermé ou dans une cavité séreuse, le pus est récolté par ponction à l'aide d'une seringue stérile et cela après une désinfection soigneuse de la peau.

Dans le cas des abcès ouverts, plaies suppurées ou pustules et les fistules où le pus s'écoule à l'extérieur, le prélèvement alors se fait à l'aide d'un écouvillon après désinfection de la plaie. Le prélèvement est effectué dans la partie la plus profonde de la plaie tout en évitant la contamination par la flore cutanée saprophyte. L'écouvillon doit être acheminé au laboratoire et humidifié par un bouillon afin d'éviter la dessiccation de prélèvement (**Ploy et Denis, 2007**).

3. Méthodologie de diagnostic

Les milieux utilisés et l'interprétation des résultats dépendent de la nature du prélèvement à analyser.

3.1 Étude cyto bactériologique des urines

3.1.1 Examen macroscopique

-L'aspect des urines: l'urine normale est claire. Un aspect trouble peut être dû à une infection urinaire mais aussi à la présence de cristaux ou de sels amorphes (**Djennane et al., 2009**).

-La couleur: jaune paille, ambrée, ictérique, hématurique, éventuellement colorée par des médicaments (bleu de méthylène, rifampicine...etc.).

L'hématurie peut être macroscopique ou microscopique selon son intensité. Les traumatismes, les calculs, les tumeurs siégeant en un point quelconque de l'appareil urinaire,

la tuberculose, les troubles de la coagulation (traitements anticoagulants) peuvent être à l'origine d'hématurie, mais il existe aussi des cystites hématuriques (**Darbas et al., 2007**).

3.1.2 Examen microscopique

A l'état normal, l'urine est très pauvre en éléments cellulaires : environ 10^3 hématies et moins de 10^4 leucocytes /ml, des cellules de desquamation de la muqueuse, des cylindres hyalins ainsi que des cristaux (**Darbas et al., 2007**).

L'examen microscopique en bactériologie peut être effectué sans coloration de l'échantillon par observation directe entre lame et lamelle (technique de l'état frais) (**Denis et al., 2012**).

Cet examen doit être effectué dans les deux heures qui suivent le prélèvement afin de limiter l'altération des éléments cellulaires (**Djennane et al., 2009**).

- L'état frais: c'est un examen qui se fait entre lame et lamelle sur cellule hématimétrique ou sur cellule normale ; il présente de ce fait un double intérêt :
 - Quantitatif: Numération des éléments cellulaires.
 - Qualitatif : Description des différents éléments cellulaires (**Djennane et al., 2009**).

- Technique:

- Déposer une goutte d'urine non diluée sur la lame à l'aide d'une pipette Pasteur débouchée.
- Recouvrir de lamelle couvre-objet propre en évitant d'enfermer des bulles d'air.
- Le liquide ne doit pas déborder (sinon jeter la lame dans une solution désinfectante et recommencer).
- Observer au microscope à l'objectif 40x.

- Lecture

En cas d'infection urinaire, le processus inflammatoire se traduit le plus souvent par la présence de :

- > 5×10^4 leucocytes /ml
- > 10^4 hématies /ml

3.1.3 La mise en culture

La réalisation d'une culture est nécessaire pour le diagnostic de l'infection urinaire, elle permet de préciser l'espèce bactérienne, quantifier la bactériurie et effectuer un antibiogramme.

Les modes d'ensemencement les plus simples et les plus utilisés sont : méthode originale de Kass, méthode simplifiée de Véron, méthode à l'anse calibrée et la méthode de lame immergée. Nous avons utilisé pendant l'étude la méthode à l'anse calibrée.

Une anse calibrée à 10 µl est utilisée pour ensemercer les géloses nutritives. On prélève verticalement avec l'anse calibrée et par capillarité une goutte d'urine que l'on ensemece par stries sur la boîte de gélose : une strie centrale est ensemençée puis perpendiculairement réaliser un isolement de haut en bas de la boîte en desserrant légèrement les dernières stries (Djennane et al., 2009).

3.1.4 Incubation et dénombrement

Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 18h à 24h. Après l'incubation, Chaque colonie isolée correspond à une concentration de 10^3 Unités viables / ml urine. La numération bactérienne est comparée à l'abaque de lecture correspondant aux différentes concentrations de bactéries/ml d'urines (Djennane et al., 2009). (Figure 7)

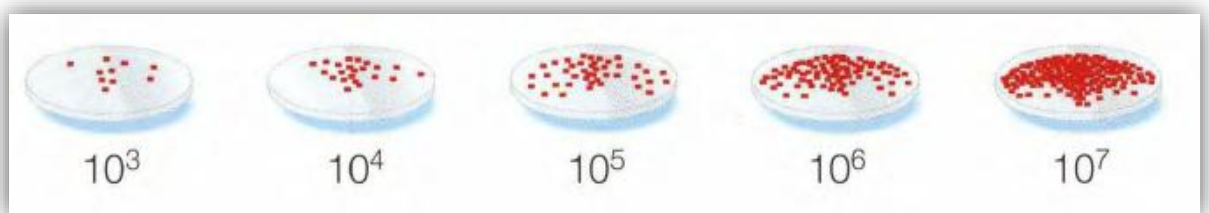


Figure 7: Dénombrement des colonies

L'interprétation s'effectue de la manière suivante pour confirmer la présence ou l'absence d'infection urinaire :

- Bactériurie < 10^3 UFC / ml : absence d'infection urinaire.
- Bactériurie > 10^5 UFC/ ml : présence d'infection urinaire.
- Entre 10^3 et 10^4 UFC / ml : zone d'incertitude (valeurs à contrôler si besoin).

3.2 Hémoculture

L'hémoculture consiste à mettre en culture, dans des flacons contenant un milieu stérile, du sang du malade à la recherche d'une septicémie.

Après désinfection du bouchon du flacon d'hémoculture, à l'aide d'une seringue stérile, on prélève quelques gouttes qu'on ensemence sur une gélose au sang cuit, les boîtes sont incubées dans une atmosphère enrichie de 5% à 10% de CO₂ à 35°C pendant 24h à 48h. Des repiquages sont réalisés pour J1, J3, J10 et pour tous les flacons présentent des signes de positivité macroscopique (trouble, hémolyse, dépôt, voile en surface) (**Granier et Denis, 2007**).

3.3 Étude cyto bactériologique du LCR

L'examen du LCR permet le diagnostic de méningite aiguë. Il est réalisé en urgence lorsqu'une méningite est suspectée. Il peut être également nécessaire au diagnostic d'autres infections du système nerveux central : méningo-encéphalites, abcès cérébraux, myélites.

L'analyse du LCR comporte plusieurs aspects :

- Analyse cytologique: recherche de cellules, en particulier globules blancs ;
- Analyse chimique: dosage du glucose, des protéines, des ions chlorure ;
- Analyse bactériologique: mise en culture pour identifier un éventuel germe en cause et réaliser un antibiogramme (voir ce terme) pour savoir quels antibiotiques seront efficaces sur ce germe.

3.3.1 Examen macroscopique

Le LCR normal ou sain, examiné à l'œil nu a un aspect de «l'eau de roche» ; mais en cas de pathologie, il se présente sous différents aspects (**Société Française de Microbiologie, 2004**):

- Rouge, hémorragique, xanthochromique en cas d'hémorragie ou de traumatisme,
- Jaune-citrin en cas d'ictère,
- Trouble, purulent, «eau de riz».

Un LCR clair ou «eau de roche» n'exclut pas le diagnostic de méningites (cas des méningites décapitées ou en phase de début).

3.3.2 Examen chimique du LCR

Cet examen direct est basé sur la mesure du taux de glucose (glycorachie), de protéine (proteïnorachie) et de chlorure (chlorurorachie) dans le LCR. Les valeurs de référence de ces différents éléments sont respectivement de 2,2-3 mmol/l, 0,15-0,5 g/l et 120 mmol/l.

La glycorachie doit toujours être interprétée en fonction de la glycémie. Ces valeurs sont toujours perturbées face à un syndrome méningé, en particulier la glycorachie et la protéinorachie. Ainsi, en cas de méningites purulentes, on assiste à une baisse du taux de glucose dans 70% des cas et à une augmentation du taux de protéine (**Lapeysonnie, 1963**). La chlorurorachie est en général normale et a très peu d'intérêt.

3.3.3 Examen microscopique

La numération des éléments cellulaires est réalisée dans un hématimètre en verre réutilisable de type cellule de Nageotte. Après agitation douce et homogénéisation du LCR :

- Remplir la cellule de comptage.
- Laisser au repos quelques minutes pour que les éléments sédimentent.
- Compter les éléments au microscope objectif x40.

➤ lecture

- Les hématies apparaissent parfaitement circulaires, brillantes (de petite taille).
- Les leucocytes sont de plus grande taille, avec un contour moins régulier et sont réfringents
- Pour éviter de compter 2 fois le même élément, seuls les éléments à cheval sur la limite supérieure et sur la limite droite de la bande envisagée sont comptabilisés (**Belabbass et al., 2010**).

3.3.3 La mise en culture

Après un examen macroscopique, numération sur cellule de Nagoette et un frottis coloré pour les LCR à cytologie positive, on prélève un volume qu'on ensemence sur une gélose au sang cuit, les boîtes sont incubées dans une atmosphère enrichie de 5% à 10% de CO₂ à 35°C pendant 24h à 48h.

3.4 Étude cytbactériologique du pus

L'écouvillon dont nous avons prélevé avec a été déchargé par stries serrées sur boîtes suivantes: une gélose au sang cuit (GSC), une gélose au sang frais (GSF) et une gélose

Hektoen, puis nous avons réensemencé par une pipette Pasteur toute la surface de la gélose aussi par des stries serrées, tout en réalisant un enrichissement dans un bouillon cœur-cerveau (B.H.I.B).

Après l'incubation, et à partir du bouillon d'enrichissement les mêmes milieux ont été ensemencés si la culture dans les boîtes d'origine été négative. L'incubation est faite à 35°C pendant 24h à 48h, les boîtes de GSC et GSF sont incubées dans une atmosphère enrichie de 5% à 10% de CO₂.

4. Identification

4.1 Etude morphologique

La morphologie des microorganismes est investiguée suivant deux examens, un examen macroscopique; présentant certains critères culturels observables à l'œil nu, et un examen microscopique; visant la détermination de la mobilité à l'état frais, la forme, le mode d'arrangement et le groupe bactérien (Gram+/Gram-) après une coloration permettant d'observer des bactéries tuées fixées sur une lame traitée par au moins un seul colorant, la plus adaptée est celle de Gram.

➤ Coloration différentielle de Gram

C'est la coloration de référence en bactériologie mise au point en 1884 par Hans Christian Gram et permettant la distinction entre les bactéries à Gram+, colorées en violet, ayant une paroi riche en peptidoglycane donc imperméable à l'alcool, et les bactéries à Gram-, colorées en rose, avec une paroi riche en lipides donc perméable à l'alcool qui décolore son cytoplasme, ainsi cette coloration permet de déterminer le mode d'arrangement.

La méthodologie de cette coloration est la suivante:

- Préparation d'un frottis: en prélevant, à l'aide de l'anse à ensemencement ou d'une pipette de Pasteur, une parcelle de la colonie à étudier et la déposer sur une goutte d'eau sur une lame propre et la bien étaler afin d'éviter les agglomérations des bactéries.
- Fixation du frottis: en passant la lame sur la flamme (le côté étalé avec l'échantillon est dirigé vers le haut) puis laisser refroidir.

- La coloration primaire: couvrir complètement la lame de violet de Gentiane pendant 30 secondes à 1 minute, puis rincer à l'eau.
- La fixation au Lugol: couvrir la lame de lugol pour 30secondes puis rincer à l'eau.
- La décoloration à l'alcool: verser quelques gouttes d'alcool sur le frottis tenu verticalement jusqu'à ce que l'alcool s'écoule non teinté (5 secondes environ), rincer à l'eau.
- La coloration secondaire: recolorer par la fuschine en versant le colorant en bout de lame et en le faisant glisser le long de la lame pour éviter une coloration trop intense.
- Observer la lame au microscope (avec une goutte d'huile à immersion, à grossissement 1000x).

4.2 Identification biochimique

L'identification biochimique repose sur l'utilisation de galeries spécifiques permettant d'identifier le genre et l'espèce bactérienne en s'appuyant sur ces caractères biochimiques après orientation à partir de caractères cultureux et morphologiques.

Nous avons utilisé la galerie biochimique miniaturisée Api20E et parfois la galerie classique selon la disponibilité.

4.2.1 La galerie biochimique classique

4.2.1.1 Test d'oxydase

Test de détection de l'enzyme « Phénylène diamine oxydase », chez les bactéries à Gram négatif, qui oxyde la forme réduite des dérivés de méthyle en donnant une couleur violette afin de différencier les Entérobactéries des *Pseudomonas*.

- **Technique:** Etaler sur le disque d'oxydase imprégné une colonie bactérienne. Un test positif se traduit par une coloration violet pourpre en 10secondes (**Larpen et Larpen-Gourgaud, 1997**).
- **Lecture**
 - Coloration violette foncée puis noire : Oxydase (+) ———→ *Pseudomonas*
 - Absence de coloration : Oxydase (-)———→ Entérobactéries.

4.2.1.2 Test d'ONPG (Ortho-Nitro-Phenyl- β .D.Galactosidase)

Ce test est réalisé pour étudier l'existence d'une Bêta-Galactosidase chez le germe, donc la possibilité de la fermentation effective du lactose indépendamment de la perméase bactérienne.

Pour déceler cette Bêta-galactosidase, on va mettre la bactérie en présence d'un réactif analogue au Lactose Ortho-Nitro-Phenyl- β .D.Galactosidase (ONPG) qui donne le Lactose et l'Orthonophényl présentant une coloration jaune.

Technique: Le test est pratiqué en réalisant une suspension dense de la bactérie testée dans de l'eau distillée puis à l'aide d'une pince flambée et refroidie nous avons ajouté un disque imprégné d'ONPG et nous avons mis le tube dans l'étuve pendant 15 à 20 minutes. La présence d'une bêta-galactosidase se traduit par la libération de l'orthophényle soluble de couleur jaune qui apparaît après la durée d'incubation (**Delarras, 2007**)

Lecture: -Couleur jaune : ONPG (+). -Pas de coloration : ONPG (-).

4.2.1.3 Milieux d'identification

- **T.S.I (Tree-Sugar-Iron)**

Milieu permettant la mise en évidence le dégagement ou non du gaz, la production de l' H_2S et la fermentation des trois sucres: Glucose (culot), Lactose et Saccharose (pente).

- **Technique:** D'abordensemencer la pente par des stries serrées avec une pipette Pasteur après avoir prélever la colonie à tester, puis le culot par une pique centrale, la lecture se fait après 24h d'incubation à 37°C.
- **Lecture:**
 - Virage de couleur de la pente vers le jaune : fermentation de lactose et saccharose.
 - Virage de couleur du culot vers le jaune : fermentation de glucose.
 - Noircissement de du milieu : production de H_2S .
 - Formation de bulles de gaz dans la masse du culot : production de gaz.

- **Citrate de Simmons**

Le milieu utilisé pour le test fermentation du citrate contient également des sels minéraux d'ammonium. En effet, un organisme capable d'utiliser le citrate métabolise également les sels d'ammonium comme seule source d'azote. L'alcalinisation du milieu provient de la libération de NH_3 à partir des sels (**Larpen et Larpen-Gourgaud, 1997**).

- **Technique** : La moitié du milieu sera ensemencée par des stries serrées ascendantes avec une goutte de la suspension bactérienne, l'autre moitié servira comme témoin, puis incuber à 37°C pour 24h.
- **Lecture**
 - Virage de couleur de vert au bleu : Citrate positive.
 - Le milieu reste vert : Citrate négative.

- **Urée-indole**

Le milieu Urée-tryptophane, improprement dit Urée-indole, permet de réaliser 3 tests :

- Test Uréase : démontrer la dégradation de l'urée en ammoniac par l'Uréase.
- Test d'Indole: certaines bactéries dégradent le tryptophane en indole grâce à une Tryptophanase.
- Test TDA: le « Tryptophane désaminase » agit sur le tryptophane en donnant l'acide indole pyruvique.
- **Technique**: Additionner quelques gouttes de la suspension bactérienne à étudiée dans le milieu puis incuber à 37°C pour 24h. Le lendemain, diviser le contenu du tube en deux :
 - L'un servira à la recherche de l'indole par l'ajout de quelques gouttes du « KOVACS ».
 - L'autre servira à la recherche de T.D.A par adjonction du réactif T.D.A.
- **Lecture**
 - Changement de coloration de jaune au rose : Uréase (+).
 - Absence de virage de couleur : Uréase (-).

- Formation d'anneau rouge après l'addition de Kovacs : Indole (+).
- Virage de couleur au rouge-brun après ajout du TDA : TDA(+).

- **Clark et Lubs**

Permettant de différencier entre deux voies fermentaires chez les Entérobactéries :

- Test au Rouge de Méthyle (RM) : met en évidence la voie des acides mixtes.
- Test de Voges Proskauer : met en évidence la voie du Butan-2,3-idiol.

- **Technique:** ensemencer le milieu avec quelques gouttes de la suspension bactérienne à étudier et incubé à 37°C pour 24h, puis diviser le contenu du tube en deux afin de réaliser les tests.
- **Lecture**

Test RM: après l'ajout du réactif RM :

- Milieu rouge: RM(+), Milieu reste jaune: RM(-).

Test VP: après l'ajout des réactifs VP1 et VP2 avec agitation

- Apparition d'une couleur brune rouge: VP+, sinon VP(-).

- **Métabolisme des acides aminés**

Certaines espèces microbiennes possèdent des enzymes dégradant certains acides aminés: L'Ornithine décarboxylase (ODC), la Lysine décarboxylase (LDC) et l'Arginine déshydrogénase (ADH). La mise en évidence de ces enzymes est utilisée en point de vue taxonomique en particulier pour les entérobactéries.

Dans le 1^{er} temps, la bactérie utilise le glucose du milieu qui s'acidifie en virant l'indicateur « le pourpre du romocrésol » au jaune. Dans un 2^{ème} temps, la décarboxylation de l'acide aminé alcalinise le milieu et refait virer l'indicateur au bleu violacé, alors que le tube témoin, sans acides aminés, reste jaune.

- **Technique:** Induire quelques gouttes de la suspension bactérienne à étudiée dans le milieu et les recouvrir d'une couche d'huile de vaseline stérile en favorisant que les réactions anaérobiques.

- **Lecture**

- ✓ Le témoin devient jaune et le tube d'acide aminé violet : décarboxylase positive.
- ✓ Le témoin devient jaune et le tube d'acide aminé jaune : décarboxylase négative.
- ✓ Si le témoin reste violet : test à refaire.

4.2.2 Galerie Api 20E

Après la coloration de Gram les souches sont identifiées selon les méthodes classiques en usage au laboratoire, à savoir, par les galeries biochimiques API 20E (Analytical Profile Index)

- **Principe**

Cette technique consiste à réaliser 20 tests avec la galerie, puis interpréter les résultats à l'aide de la base de données API 20E (Bio-Mérieux).

La galerie se compose de 20 microtubes contenant des substrats déshydratés pour la mise en évidence d'enzymes ou de fermentation de sucres. Les tests enzymatiques sont inoculés avec une suspension dense, réalisée à partir d'une culture pure, qui réhydrate les substrats. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par un changement spontané ou révélé par l'addition de réactifs. La fermentation des carbohydrates entraîne une acidification se traduisant par un virage spontané de l'indicateur coloré.

- **Technique**

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide, puis placer la galerie dans la boîte d'incubation.
- Prélever quelques colonies et préparer une suspension bactérienne dans l'eau distillée stérile.
- Remplir les tubes et cupules des tests CIT, VIP et GEL avec la suspension bactérienne et uniquement les tubes des autres tests.
- Réaliser une anaérobiose dans les tests ADH, LDC, ODC, H₂S, URE en remplissant leur cupule d'huile de vaseline.

- Refermer la galerie et l'incuber à 37°C pendant 24H.
- Après incubation, noter sur la fiche de résultat, toutes les réactions spontanées. La révélation des trois TDA, VP et indole est faite par l'ajout des réactifs nécessaires (TDA, VP1, VP2 et KOVACS).

L'identification est obtenue à l'aide d'un code formulé après la lecture de la galerie.

- **Lecture**

La lecture des galeries API se fait selon les indications du fournisseur. Après codification des réactions en un profil numérique :

- les tests seront regrouper en groupe de 3 prennent les chiffres (1,2ou 4) pour un test positive et le chiffre 0 pour un test négative.
- On obtient un nombre de 7 chiffres (profil numérique).

L'identification est alors obtenue en comparant avec le catalogue analytique.

5. Étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques

L'antibiogramme est l'examen biologique destiné à mesurer l'interaction entre chacune des molécules antibactériennes utilisables et une souche bactérienne susceptible d'être pathogène, isolée d'un patient. Le résultat contribue à évaluer la sensibilité de la souche bactérienne examinée ou sa résistance, ce qui signifie que la molécule sera probablement active au sens thérapeutique ou le traitement sera un échec. Le résultat numérique brut est accompagné d'une interprétation ou remplacé par elle: résistant, sensible, intermédiaire, ou (indéterminée) (**Scavizzi et al., 2000**).

Le but essentiel de l'antibiogramme est l'aide à la décision thérapeutique. Il sert également:

- A la surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne qui orientera ultérieurement l'antibiothérapie probabiliste.
- A la comparaison des phénotypes de résistance de souches présumées responsable d'infection nosocomiale.
- A l'identification bactérienne par la mise en évidence des résistances naturelles.

La sensibilité de toutes les souches *vis-à-vis* des β -lactamines et d'autres familles d'antibiotiques est testée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose

Mueller Hinton selon les recommandations du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute 2008).

- **Principe**

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé Mueller-Hinton selon les normes et les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de la microbiologie (**CASFM, 2008**).

Il consiste à disposer des disques de papier imprégnés de concentration déterminée d'antibiotique à la surface d'un milieu gélosé. Dès l'application des disques, l'antibiotique diffuse à partir du disque de manière uniforme dans la gélose. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture. (**Soude, 2005**)

- **Technique**

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne (inoculum à 0,5 Mac Farland de turbidité).
- L'essorer en le pressant fermement sur la paroi interne du tube pour le décharger.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée sèche de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même, puis le passer autour du bord.
- Recharger l'écouvillon pour chaque boîte de Pétri.
- Application des disques d'antibiotiques: elle se fait manuellement avec une pince stérile, utiles pour un rapprochement ou éloignement des disques, ou pour un choix positionnel comme l'emplacement des inhibiteurs. Les antibiotiques testés sont mentionnés dans Annexe N°4.
- Incubation : les boîtes sont mises à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24h.

- **Lecture**

La lecture a été faite par la mesure avec précision des différents diamètres des zones d'inhibition, en comparant ces résultats aux valeurs critiques figurant dans Annexe N°5, 6 et 7. Les bactéries ont été classées dans l'une des catégories: Sensible, Intermédiaire ou Résistance.

6. Recherche phénotypique de la production des BLSE

6.1 Quand rechercher une BLSE ?

La détection phénotypique d'une BLSE garde tout son intérêt dans les études épidémiologiques et en hygiène hospitalière. On recherche une BLSE devant un diamètre inférieur aux valeurs suivantes:

- Céfotaxime (CTX \leq 27mm). - Ceftazidime (CAZ \leq 22mm).
- Ceftriaxone (CRO \leq 25m). - Aztréonam (ATM \leq 27mm).

6.2 Méthode de détection des BLSE

6.2.1 Test de synergie (DD-test)

- Principe

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 céfépime) et l'aztréonam. Cette image est dite en "bouchon de champagne" (**Jarlier et al., 1988**)

- Technique

La production d'une β -lactamases à spectre élargi a été détectée par l'épreuve de la synergie qui consiste à placer des disques de cefotaxime (30 μ g) à une distance définie (centre à centre) d'un disque d'AMC (amoxicilline clavulanate) (20 μ g et 10 μ g, respectivement) pour les entérobactéries et TCC (Ticarcilline-clavulanate) (75 μ g et 10 μ g respectivement) pour les *Pseudomonas sp* et les *Acinetobacter ssp*.

- Lecture

La distance est déterminée en fonction de groupe bactérien et le diamètre d'inhibition *vis-à-vis* de la céphalosporine de 3^{ème} génération. L'apparition d'une image de synergie en « bouchon de champagne » ou en « entonnoir » entre le disque d'AMC ou TCC et les disques ceftazidime, cefotaxime, cefepime ou aztréonam indique la production d'une BLSE.

6.2.2 Test de confirmation (technique du double disque ou test espagnol)

- Principe

Ce test consiste à rechercher une augmentation de la zone d'inhibition d'un disque de C3G, précédé par l'application d'un disque contenant l'AMC, comparé à un autre disque portant la même céphalosporine et placé côte à côte sur la gélose de Mueller-Hinton (AARN, 2011).

- Technique

On procède de la même manière que la technique d'antibiogramme dans la préparation de l'inoculum et l'ensemencement, puis on place deux disques d'antibiotiques : un disque d'AMC et un disque de CTX (C3G) à une distance de 25 mm selon la figure 8. On laisse diffuser à la température ambiante du laboratoire pendant une heure de temps et on remplace le disque d'AMC par un disque de CTX (C3G). On incube pendant 18 h à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

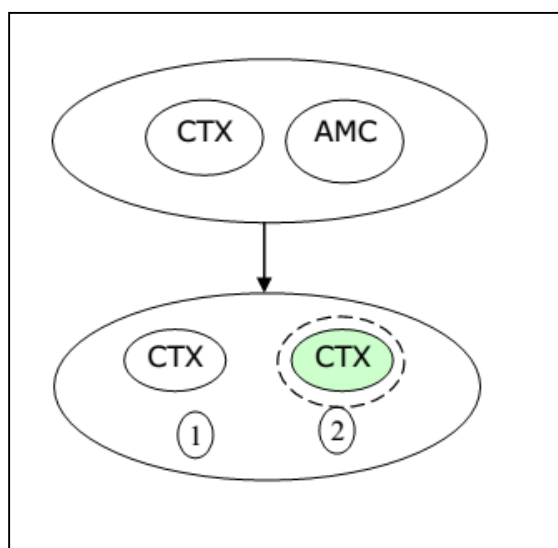


Figure 8 : Schéma de détection de BLSE par le test du double disque (Rahal et al., 2005).

- Lecture

Le test du double disque est positif quand le diamètre d'inhibition du disque de céphalosporine de 3eme génération appliqué après diffusion du disque AMC ou TCC est supérieur ou égal à 5mm par rapport au diamètre d'inhibition du disque de céphalosporine de 3eme génération, ce qui indique une production d'une BLSE (AARN, 2011).

Chapitre III

Résultats et discussion

1. Résultats

1.1 Répartition globale des prélèvements

Parmi 1778 Prélèvements reçus, l'examen bactériologique montre que 240 prélèvements se sont révélés positifs (**13.50%**), 1435 négatifs (**77.05%**), et 103 contaminés (**9.45%**).

La figure 9 représente la répartition globale des prélèvements.

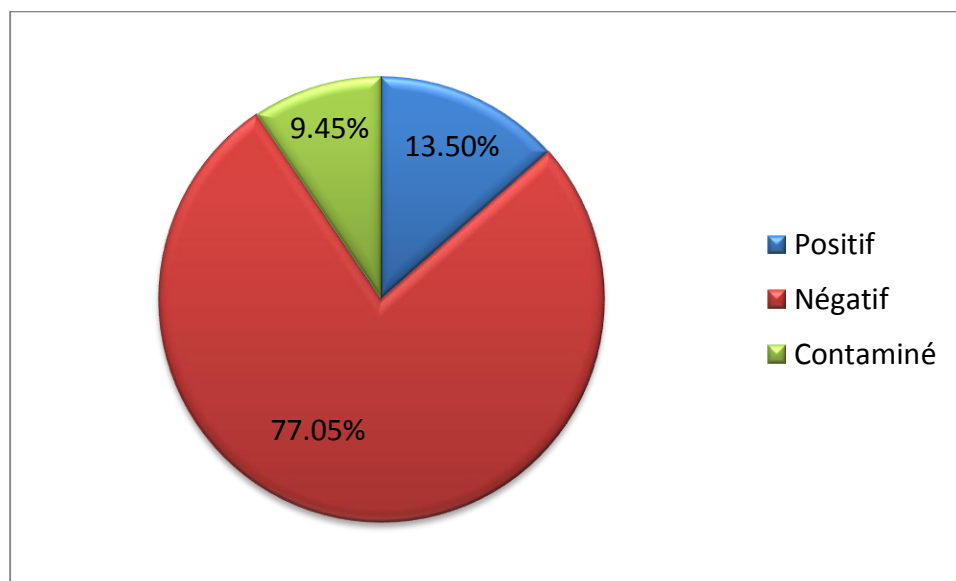


Figure 9 : Répartition globale des prélèvements.

1.2 Isolement et identification des souches

1.2.1 Répartition des souches par groupe bactérien

240 souches sont isolées et identifiées, dont **86,67%** (210 /240) sont des entérobactéries, **6.22%** (14/240) sont des *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* et *Pseudomonas sp*) et **0.44%** (1/240) sont des *Acinetobacter baumannii*. Cependant, **6.67%** (15/240) sont représentées par d'autres groupes bactériens.

La figure 10 montre la répartition des différents groupes bactériens.

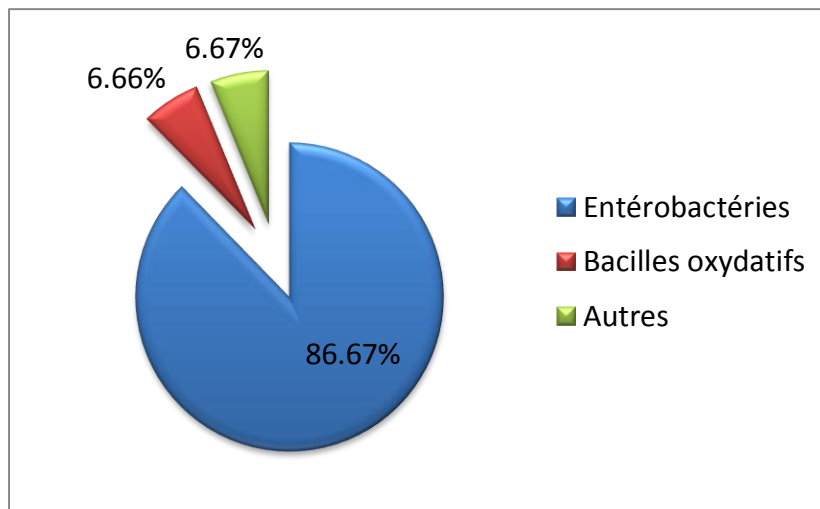


Figure 10: Répartition des souches par groupe bactérien.

1.2.2 Répartition des souches par espèces

A partir des 240 prélèvements positifs, on a identifié 225 bactéries à Gram négatif (BGN). La répartition des germes isolés est mentionnée dans le Tableau III récapitulatif ci-dessous.

Tableau III: Répartition des souches par espèces

Espèce	taux	Nombre
<i>Escherichia coli</i>	52,89%	119
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14,22%	32
<i>Proteus mirabilis</i>	13,78%	31
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5,78%	13
<i>Proteus vulgaris</i>	3,11%	7
<i>Enterobacter cloacae</i>	2,67%	6
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1,78%	4
<i>Morganella morganii</i>	1,33%	3
<i>Serratia marcescens</i>	1,33%	3
<i>Citrobacter freundii</i>	0,89%	2
<i>Serratia liquifaciens</i>	0,44%	1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0,44%	1
<i>Citrobacter koseri</i>	0,44%	1
<i>Proteus penneri</i>	0,44%	1
<i>Pseudomonas sp</i>	0,44%	1
Autres	6,67%	15
Total	100,00%	240

D'après le tableau II, *E. coli* est l'espèce la plus fréquemment isolée avec un taux de **52.89%**, suivi par *K. pneumoniae* et *P. mirabilis* avec des taux de **14.22%** et **13.78%** respectivement.

1.2.3 Répartition des souches par service

Nous avons isolé **53.33%** (120/225) BGN chez les patients non hospitalisés et **46.67%** (105/225) chez les patients hospitalisés.

Parmi les souches isolées en milieu hospitalier, le service de maladies infectieuses occupe la première place avec **28.00%** (63/225) des souches isolées, suivi par **10.67%** (21/229) en médecine interne, la figure 11 montre les différents taux.

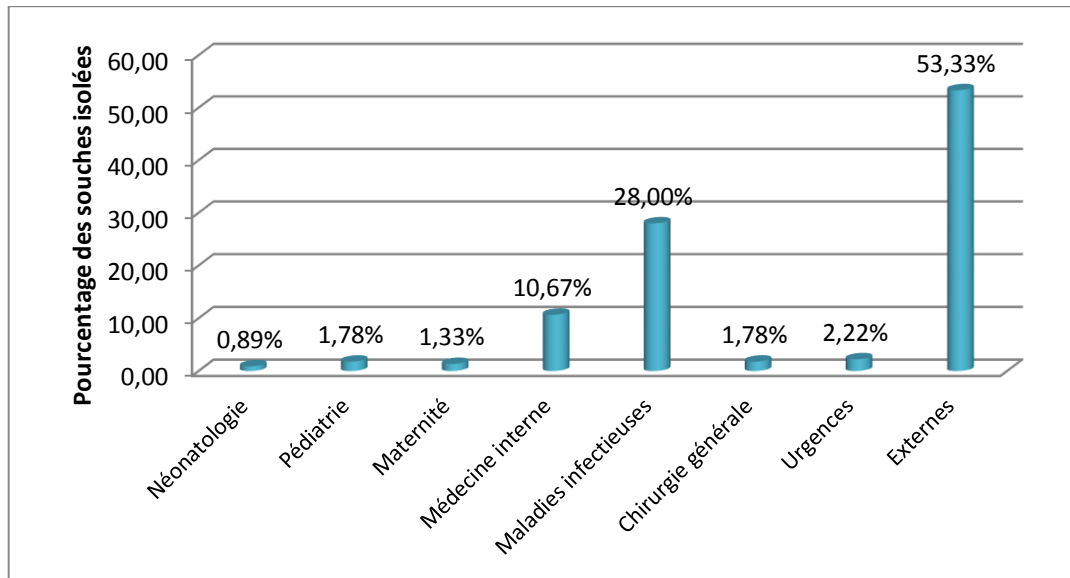


Figure11: Répartition des souches isolées par service

1.2.4 Répartition des souches selon la nature de prélèvement

La figure 12 montre que **70.22%** (158/225) des BGN sont isolées des urines et **26.67%** (60/225) sont isolées des pus et divers. Uniquement **2.22%** (5/225) et **0.89%** (2/225) des souches ont été isolées du sang et du LCR respectivement.

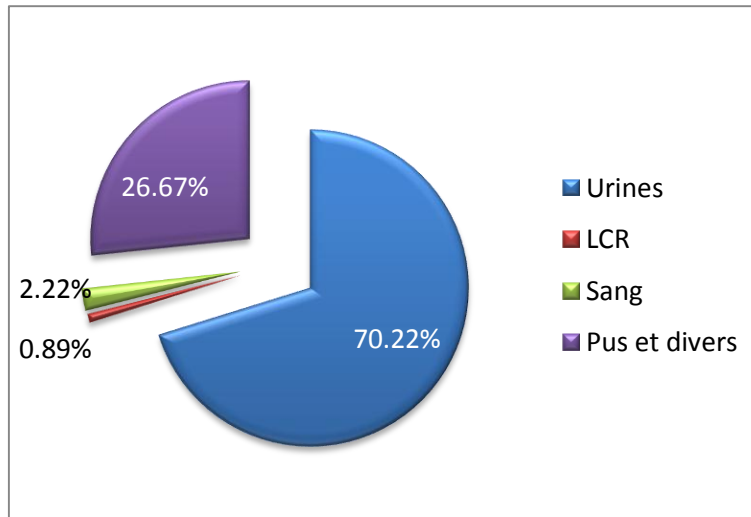


Figure12: Répartition des souches par nature de prélèvement

1.2.5 Répartition des souches par sexe

Nos résultats, présentés dans la figure 13, montrent une prédominance des BGN isolées chez les patients du sexe féminin avec **72.89%** (164/225) contre **27.11%** (61/225) des souches isolées chez les patients du sexe masculin.

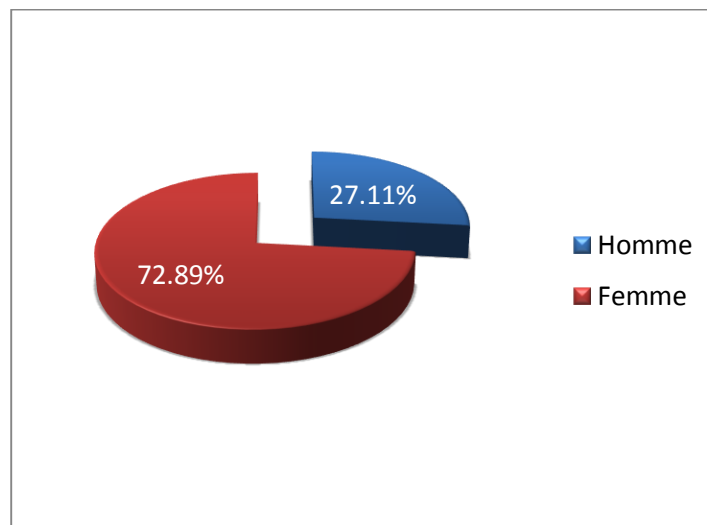


Figure 13: Répartition des souches par sexe

Le sex-ratio femme/homme = $164/61 = 2.68$. Il y'a donc presque trois fois plus de patient du sexe féminin que de patient du sexe masculin.

1.2.6 Répartition des souches par tranche d'âge

La figure 14 montre que le taux d'isolement le plus élevé a été observé dans la tranche d'âge 30<A≤60 ans avec **28,44%** (64/225) des BGN souches isolées, suivi par les tranches d'âge 60<A≤90ans, 15<A≤30ans et ayant **25,78%** (58/225) et **25,33%** (57/225) respectivement, tandis que le taux le plus faible d'isolement a été rapporté chez les nourrissons de 30J <A≤ 2ans avec **3,11%** (7/225).

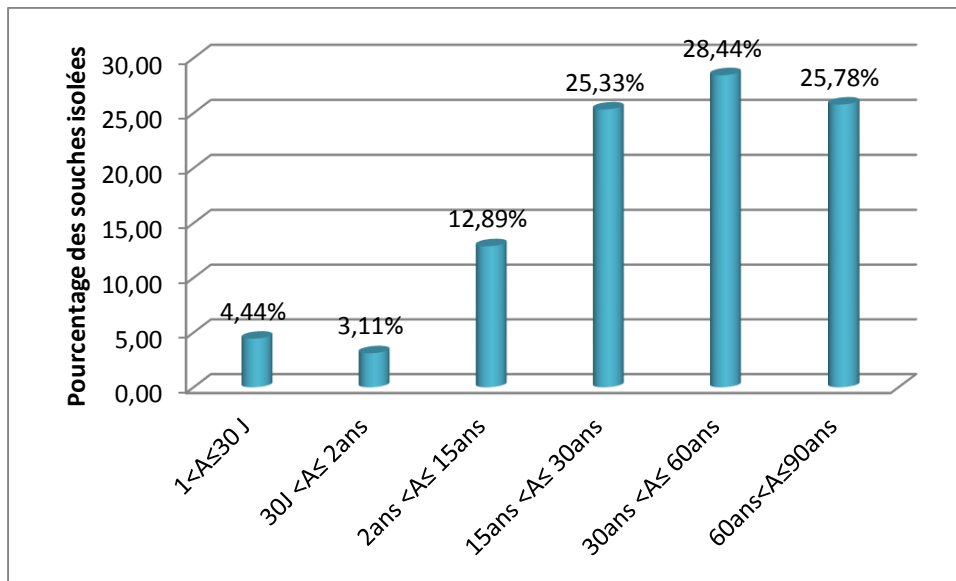


Figure 14: Répartition des souches par catégories d'âge

1.3 Résistance des souches a au moins une des β -lactamines

Selon les résultats des antibiogrammes, **80,00%** (180/225) des BGN sont retrouvées résistantes a au moins une des β -lactamines à large spectre (C3G, carbapénèmes), dont **176** souches sont des entérobactéries, **3** sont des *Pseudomonas aeruginosa* et **1** est une *Acinetobacter baumannii*.

1.3.1 Répartition des souches résistantes par service

Selon le tableau IV, certains services hospitaliers sont apparus plus concernés par le problème de la résistance bactérienne, notamment le service de la médecine interne qui présente le taux le plus élevé **95,83%** (23/24), suivi par celui des maladies infectieuses

90,48% (57/63). Cependant, un taux de **76.66%** (92/120) a été rapporté à partir des prélèvements externes.

Tableau IV: Présentation des taux de résistance par service

Service	Souches isolées	Souches résistantes	Taux
Néonatalogie	2	0	0%
Pédiatrie	4	1	25%
Maternité	3	0	0%
Médecine interne	24	23	95,83%
Maladies infectieuses	63	57	90,48%
Chirurgie générale	4	3	75%
Urgences	5	4	80%
Externes	120	92	76.67%

1.3.2 Répartition des souches résistantes par nature de prélèvement

La figure 15 donne les taux de résistance retrouvés pour chaque type de prélèvement. Les souches résistantes proviennent essentiellement des prélèvements d'urine avec **71,67%** (129/158) et présentent ainsi le taux le plus élevé, suivi par **25,00%** (45/60) des souches isolées à partir des pus et divers, tandis que les prélèvements du sang et d'LCR ont permis l'isolement de **2,22%** (4/5) et **1,11%** (2/2) souches résistantes respectivement.

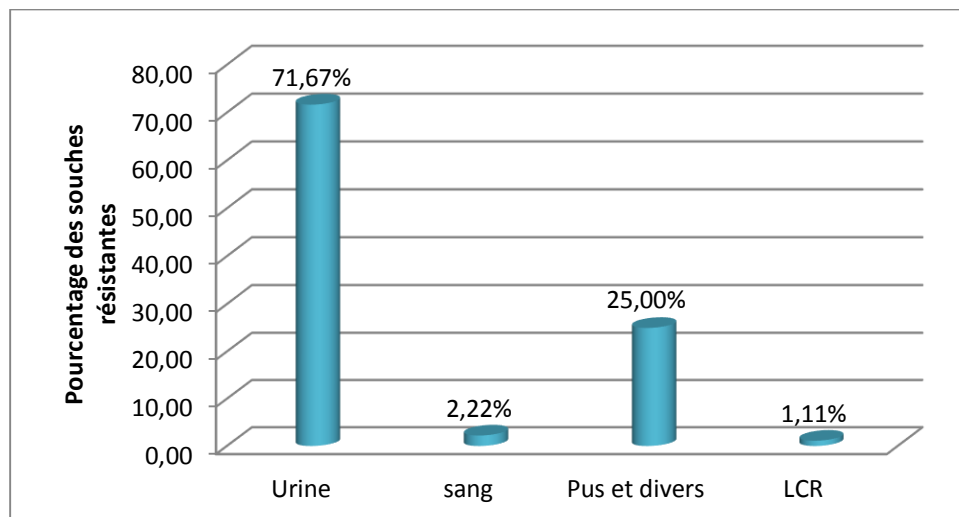


Figure 15: Répartition des souches résistantes par nature de prélèvement

1.3.3 Répartition des souches résistantes par tranches d'âge

Selon le tableau V, toutes les tranches d'âges sont touchées par le phénomène de la résistance bactérienne aux antibiotiques avec des taux qui varient selon les différentes catégories d'âge. Les personnes âgées, de 60 ans $A \leq 90 \text{ ans}$, semblent les plus touchés par ce phénomène avec un taux de **96.55%** (56/58). Les nourrissons de 30J $A \leq 2 \text{ ans}$ ont **28.57%** (2/7) et présentent le taux le plus faible.

Tableau V: Répartition des souches résistantes par tranches d'âge.

Age	Souches isolées	Souches résistantes	Taux de résistance
1 $A \leq 30 \text{ J}$	10	4	40%
30J $A \leq 2 \text{ ans}$	7	2	28,57%
2ans $A \leq 15 \text{ ans}$	29	24	82,76%
15ans $A \leq 30 \text{ ans}$	57	47	82,46%
30ans $A \leq 60 \text{ ans}$	64	47	73,44%
60ans $A \leq 90 \text{ ans}$	58	56	96,55%
Total	225	180	/

1.3.4 Répartition des souches résistantes par sexe

D'après la figure 16, le taux de résistance chez les patients du sexe féminin est plus élevé **68.33%** (123/180) que celui obtenu chez les patients du sexe masculin **31.7%** (57/180).

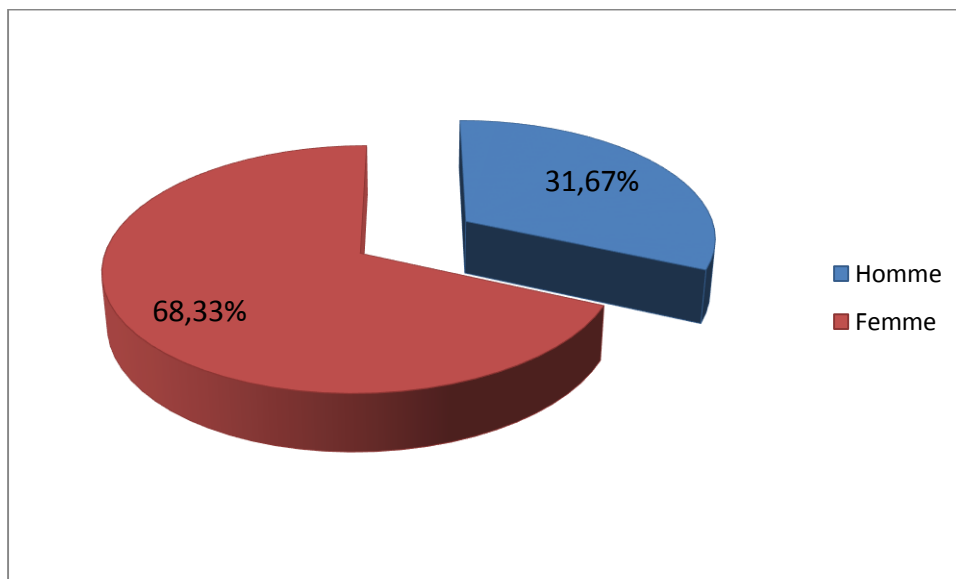


Figure 16: Taux de résistance par sexe

1.3.5 Étude de la résistance des principales souches d'entérobactéries aux β -lactamines

1.3.5.1 Étude de la résistance des souches d'*E. coli*

97/119 soit **81.51%** des souches d'*E. coli* isolées sont résistantes aux β -lactamines. Un taux de résistance important a été obtenu pour l'Ampicilline avec un pourcentage de **92.78%**, d'après se qui est représenté dans la figure 17. Nous avons noté également une résistance envers l'Amoxicilline+ Ac.clavulanique, la céfotaxime et la céfazoline avec **44.33%**, **16.49%** et **14.43%** respectivement. Pour ce qui est de la Céfoxitine, un très faible pourcentage de résistance de **2.06%** a été noté. Aucune résistance de ces souches n'a été observée *vis-à-vis* de l'imipènème.

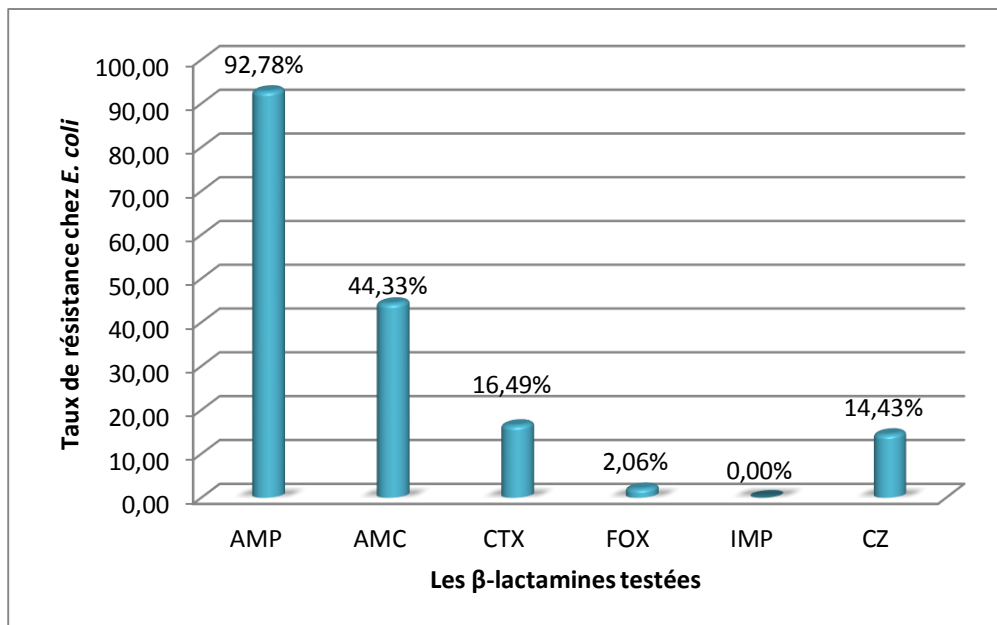


Figure 17 : Taux de résistance des souches d'*E. coli* aux β -lactamines

1.3.5.2 Étude de la résistance des souches de *K. pneumoniae*

En analysant les profils de résistance aux antibiotiques des 32 souches de *K. pneumoniae* étudiées, 30/32 des souches sont résistantes aux β -lactamines soit un pourcentage de **93.75%**.

D'après la figure 18, nous avons noté une résistance très élevée pour l'ampicilline avec un taux de **93.33%**, En revanche, toutes les souches (**100%**) étaient sensibles à l'imipènème

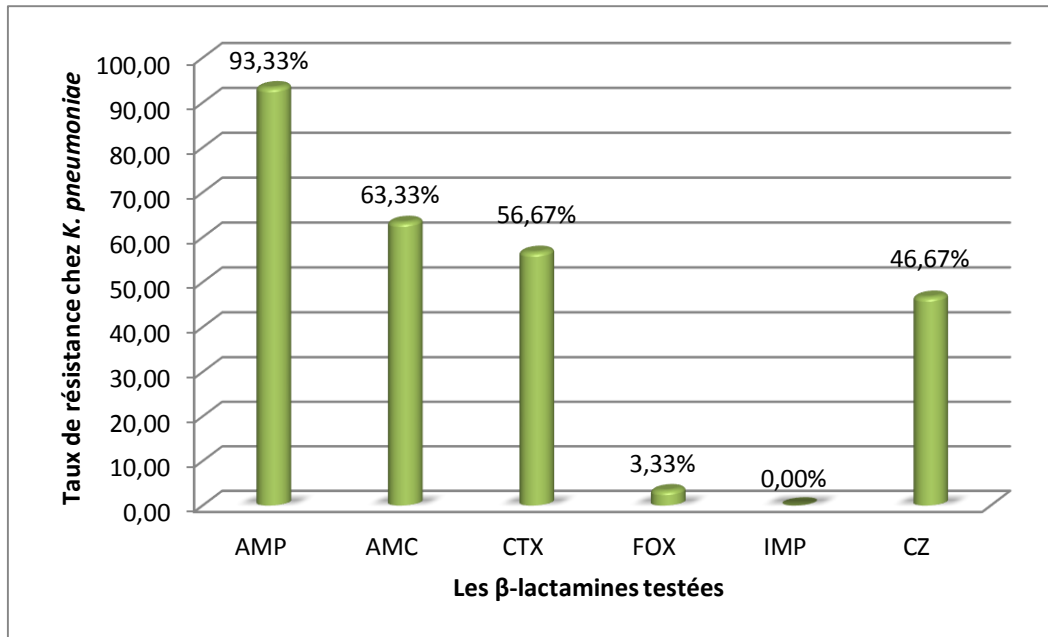


Figure 18: Taux de résistance des souches de *K. pneumoniae* aux β -lactamines

1.3.5.3 Étude de la résistance des souches de *P. mirabilis*

Parmi 31 souches de *P. mirabilis* isolées, 25 sont résistantes aux β -lactamines avec un taux de **80.64%**. Selon la figure 19, les souches de *P. mirabilis* ont montrées une très grande résistance *vis-à-vis* de l'Ampicilline (**76%**), cependant la céfazoline, l'Amoxicilline+ Ac.clavulanique, et la céfotaxime restent actives avec respectivement **28%**, **16%** et **8%** de résistance. Aussi la totalité de ses souches ont été sensibles à l'imipenème et à la céfoxitine.

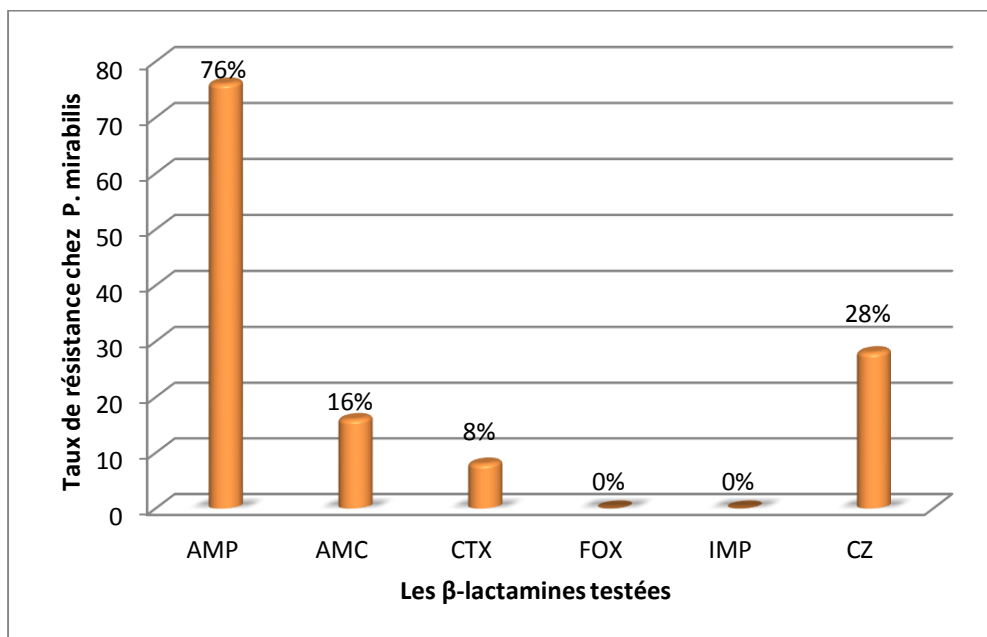


Figure 19: Taux de résistance des souches de *P. mirabilis* aux β -lactamines

1.3.6 Étude de la résistance des bacilles à Gram négatif non-fermentaires aux β -lactamines

3/14 souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont été retrouvées résistantes, soit un taux de **21.42%**, Tandis que 1/1 souche d'*A. baumannii* a été révélée résistante.

Le tableau VI montre les différents taux de résistance bacilles à Gram négatif non-fermentaires aux β -lactamines, on remarque que (2/3) des souches de *Pseudomonas aeruginosa* sont résistantes à la Ceftazidime, alors qu'*A. baumannii* est résistant à la ticarcilline.

Tableau VI: Taux de résistance des souches des bacilles à Gram négatif non-fermentaires vis-à-vis des β - lactamines. (EF: Echantillon Faible)

	ATB	PIP	TCC	TIC	FOX	CZ	CAZ	IMP	ATM
<i>P. aeruginosa</i>	Nombre	0	1	0	1	1	2	0	0
	Taux	0/3(EF)	1/3(EF)	0/3(EF)	1/3(EF)	1/3(EF)	2/3(EF)	0/3(EF)	0/3(EF)
<i>A. baumannii</i>	Nombre	0	0	1	0	0	0	0	0
	Taux	0/1(EF)	0/1(EF)	1/1(EF)	0/1(EF)	0/1(EF)	0/1(EF)	0/1(EF)	0/1(EF)

1.3.7 Analyse des phénotypes de résistance aux β -lactamines

Parmi 180 souches résistantes, Le DD-test nous a permis de relever la présence de 43 souches productrices de β -lactamase à spectre étendu présentant un taux de **23.88%** (Figure20).



Figure 20: DD-test positif

Pour les souches qui ne présentent pas une image de synergie, un double disque a été effectué pour confirmer la production d'une BLSE ou non (Figure 21).



Figure 21: Test espagnol positif

Les souches productrices de BLSE sont réparties comme suit: 20 *Escherichia coli*, 17 *Klebsiella pneumoniae*, 2 *Enterobacter cloacae*, alors que *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* et *Acinetobacter baumannii* présente chacune 1 seule souche (Figure 22).

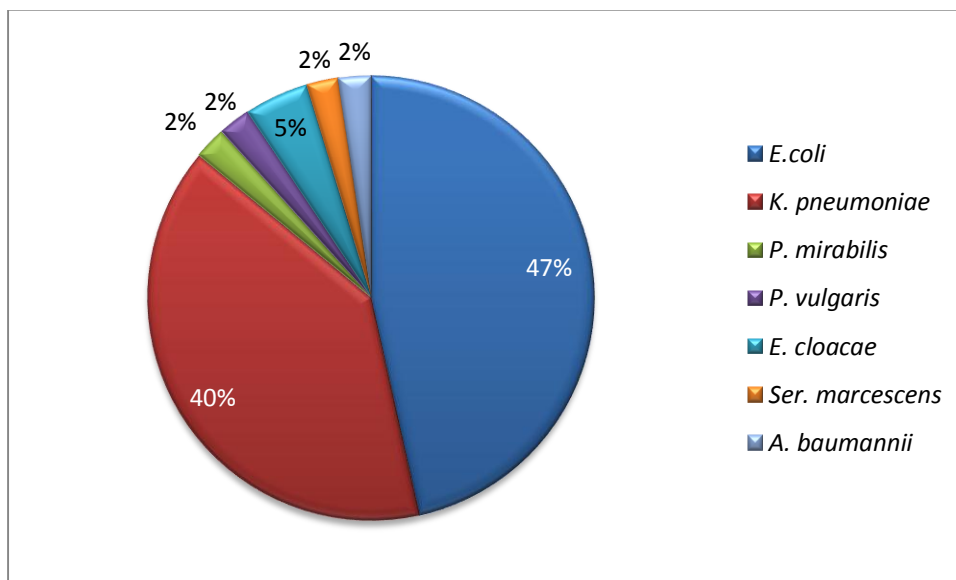


Figure 22: Répartition des souches productrices de BLSE

II-Discussion générale

Les bacilles à Gram négatif, dont les entérobactéries, restent les bactéries les plus isolées dans les infections, particulièrement dans les pays en voie de développement, dont on fait partie. Le traitement de choix pour ces infections reste les β -lactamines à large spectre, dont les céphalosporines de 3^{ème}, 4^{ème} génération et les carbapénèmes. L'habitat naturel de la plupart des entérobactéries est le tube digestif, qui reste le pourvoyeur des différentes infections, directement ou indirectement par les mains, le matériel hospitalier contaminés et par les aliments (**Denton, 2007 ; Sekhsokh et al., 2008**).

Les bacilles à Gram négatif non fermentaires (*Pseudomonas sp*, *Acinetobacter*ssp...etc), quant à eux, sont à l'origine des infections nosocomiales diverses notamment chez les immunodéprimés (VIH, leucémiques, cancéreux, greffés...). L'importance de ces bacilles à Gram négatif est liée à leur multi résistance aux antibiotiques actuellement disponibles. C'est pourquoi ces bacilles à Gram négatif ont suscité de nombreuses études ces dernières décennies (**Gueye, 2007**).

Notre étude consiste à déterminer les profils de résistance des bacilles à Gram négatif aux β -lactamines, durant laquelle 1778 prélèvements (urines, sang, LCR, pus et divers) sont recueillis, issus de différents services de l'EPH de Boufarik et aussi des malades consultants à titre externe, dont 53.44% des prélèvements provenant du milieu externe contre 46.56% provenant de milieu hospitalier.

Les prélèvements urinaires occupent la première place avec 71.48%, une étude réalisée en France en 2000, montre que 91,1% des prélèvements communautaires sont des prélèvements urinaires (**Péan et al., 2001**). En effet, ce résultat est expliqué par le fait que l'infection urinaire est l'une des infections communautaires les plus fréquentes notamment chez les femmes (**Sekhsokh et al., 2008**).

Dans notre étude, le taux des cultures négatives est très élevé avec 77.05%, Ce constat peut être dû à une mauvaise orientation du diagnostic médical (infection virale ou fongique), à la présence des germes exigeants telle que les anaérobies strictes qui nécessitent des milieux et des conditions d'incubation spécifiques ou à une antibiothérapie. Alors que le taux de culture contaminées est de 9.45%, ceci peut être expliqué par le non-respect des conditions idéales des prélèvements et de transport des échantillons, ou à une contamination par la prolifération d'une bactérie de souillure ou de l'environnement.

Les analyses bactériologiques nous a permis d'isoler 240 souches, dont 225 sont des bacilles à Gram négatif, représentant 93.33% des germes isolés. Parmi les BGN identifiés, un nombre important d'entérobactéries a été enregistré lui permettant d'occuper la 1^{ère} place avec 210 souches ou 86.67% des germes isolés. On constate une prévalence d'entérobactéries de 72.38% dans les urines. En effet cette famille de bactérie est souvent responsable de diverses infections hospitalières et communautaires surtout dans les pays en voie de développement, à cause de leur pouvoir uropathogène. Ainsi, cette dernière prédomine les pus et divers avec 86.66 % des souches isolées, cela peut être expliqué par le non-respect des conditions des prélèvements.

Parmi les entérobactéries, nous avons noté que *E. coli* est l'espèce la plus fréquemment isolée avec 52,89%, suivi par *K. pneumoniae* puis *P. mirabilis* avec 14.22% et 13.78% respectivement. En Tunisie *E. coli* occupe aussi la première place avec 81,7% suivi par *K. pneumoniae* avec 3.7% (**Péan et al., 2001**). Notre répartition concorde aussi avec celle de **Sauna** en 2011, dont *E. coli* présente un taux de 61,1%. En effet, *E. coli* représente 60 à 80% des infections urinaires communautaires (**Caracciolo et al., 2011**). Ainsi, cette bactérie possède des adhésines capables de la lier à l'épithélium urinaire et d'empêcher son élimination par les vidanges vésicales (**Sekhsokh et al., 2008**).

Cette étude montre une fréquence des BGN non fermentants de 6.66 % présenté par des *Pseudomonas* (*P.aeruginosa* et *Pseudomonas sp*) et *A. baumannii*, comparée à un taux plus faible de 4% chez *Pseudomonas sp* obtenu par **Touchene et Ghalmi** en 2015.

Pendant l'étude, 225 BGN sont isolées, dont 46,67% sont isolées en milieu hospitalier. Inférieurement à ce qui est rapporté en Tunisie en 2008 ; 65% des isolats provenaient de malades hospitalisés (**Mkaouar et al., 2008**).

La plus part des souches isolées chez les patients hospitalisés, sont issues de service des maladies infectieuses occupant la première place avec 28.00% des souches isolées, suivi par 10.67% en médecine interne, différemment a ce qui a été rapporté par **Medboua** en 2011 dont la 1^{ère} place a été occupée par le service de pédiatrie avec 38,51%.

Le site urinaire est le principal site d'infection, 70.22% des isolats proviennent des urines et 26,67% des pus et divers. En Tunisie, un taux de 60% des souches isolées dans les urines, est rapporté par **Mkaouar et al., 2008**. Les ECBU positifs sont expliqués par le fait que ces infections représentent le deuxième motif de consultation en pathologie infectieuse

après les infections respiratoires et la première cause d'infections nosocomiales (**Anglaret et al., 2002**).

Le sex-ratio femme/homme est de 2.68, montrant une prédominance des souches isolées chez les patients du sexe féminin avec 72.89% contre 27.11% des souches isolées chez les patients du sexe masculin. Ces résultats rejoignent ceux obtenus par **Touchene et Ghalmi** en 2015 avec des valeurs très proches dont la prédominance féminine présente 74% contre 26% pour le sexe masculin.

Les souches provenaient essentiellement de sujets féminins, cela peut s'expliquer par le fait que les prélèvements d'origine urogénitale étaient très largement majoritaires. En effet, les infections urinaires sont beaucoup plus fréquentes chez la femme que chez l'homme, pouvant être dues à l'absence d'activité antibactérienne des glandes périurétrales (contrairement au liquide prostatique). Aussi, l'infection chez la femme est favorisée par l'osmolarité faible des urines en particulier durant la grossesse (**Saighi et al., 2004**). Egalement, les rapports sexuels favorisent la progression des bactéries urétrales dans la vessie (**Flam, 2011**).

D'après nos résultats, les adultes sont plus touchés par les infections, ainsi le taux d'isolement le plus élevé a été observé chez les adultes de $30 < A \leq 60$ ans avec 28,44% des souches isolées, suivi par les personnes âgés de $60 < A \leq 90$ ans avec 25,78%. Différemment, à ce qui a été rapporté par **Medboua** en 2011 présentant 45,78% chez les enfants âgés plus de 2 ans.

En réponse à la pression de sélection antibiotique, les bactéries ont développé, tant sur le plan biochimique que génétique, de nombreux mécanismes conférant la résistance à la bactérie hôte, ainsi que sa capacité de transmission à d'autres bactéries. Ces microorganismes combinent notamment des mécanismes à large spectre de substrats, qui leur permettent de résister simultanément à diverses classes d'antibiotiques et de devenir ainsi multirésistantes (**Courvalin, 2008**).

L'étude de la sensibilité des bacilles à Gram négatif isolés aux β -lactamines testées (C3G, carbapénèmes), montre un taux de 80.00% (180/225) de résistance, des taux moins élevés, de 71% et 70,8% ont été rapporté par **Ben Romdhane et al., 2007**. et **Thabet et al., 2008** en réalisant des études sur les bacilles à Gram négatif multirésistantes dans des hôpitaux Tunisiens.

Parmi les 180 souches dites résistantes, 23/24 sont isolées du service de la médecine interne qui présente le taux le plus élevé avec 95,83%, suivi par 90,48% en maladies infectieuses. Cependant, le taux le plus élevé de souches résistantes a été observé en pédiatrie avec 23,47%, suivi par 19,05% en maternité d'après **Medboua** en 2011.

Le service de médecine interne occupe la 1^{ère} place en terme de résistance, ce dernier regroupe généralement des sujets âgés diabétiques qui sont prédisposés à développer des infections des plaies et des blessures. Le facteur de risque principal dans ce service est le diabète avec une fréquence élevée de lésions de pied diabétique qui constitue une complication grave avec un risque d'amputation et de mortalité après amputation (**Belbel, 2014**).

Les urines représentent le principal réservoir des souches résistantes avec 71,67%, comme il a été rapporté par d'autres études, qui montrent que les bactéries résistantes sont isolées principalement dans les urines avec 38.2% et 72% selon **Belmonte et al., 2010** et **Mayoral et al., 2010** respectivement, et contrairement à **Medboua** en 2011 dont les prélèvements du sang présentent le taux le plus élevé de la résistance avec 31,43%.

D'après nos résultats, les personnes âgées, de 60ans<A≤90ans, et les patients du sexe féminin, sont les plus touchés par le phénomène de résistance. L'âge et le sexe sont des facteurs de risque dans l'acquisition de la multirésistantes. Ces résultats sont expliqués par la fréquence élevée des infections urinaires chez la femme et la jeune fille en raison d'un urètre court s'ouvrant à la vulve au voisinage du vagin et de l'anus (**Denis et al., 2007**)

Il existe d'autres facteurs de risques telles que l'hospitalisation pour un motif infectieux, l'antibiothérapie préalable (aminopénicillines, céphalosporines et fluoroquinolones), le diabète et un âge supérieur à 60 ans (**Péan et al., 2001 ; D'escrivan et al., 2004 ; Barbe et al., 2010**).

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

Plusieurs études ont rapporté l'efficacité de cette molécule sur les souches d'entérobactéries productrices de BLSE: une sensibilité de 100 % a été rapportée par **Goossens et Grabein, 2005**. Cependant, et Selon le réseau national de la surveillance des bactéries résistantes aux antibiotiques, en 2009, la résistance aux carbapénèmes commence à disséminer dans les hôpitaux algériens, dont des carbapénémases ont été isolées, des métallob-lactamases dont VIM-19 ont été isolées à l'hôpital central de l'armée à Alger en 2008 et 2009, VIM-4 a été caractérisée en 2010 à l'hôpital de Bouloghine (**Benamrouche et al., 2009**).

K. pneumoniae est caractérisée par le taux le plus élevé de résistance qui est de 93.75%. Un taux plus faible de résistance de 39.02%, a été rapporté par **Medboua** en 2011, aussi par **Cao et al.**, qui est de 32% (**Cao et al., 2002**). Une résistance très élevée pour l'ampicilline a été notée avec un taux de 93.33%, car cette souche résiste naturellement à l'ampicilline et aux carbénicillines par production de pénicillinases chromosomiques (**Belbel, 2014**), lui permettant de rejoindre le groupe 2 « pénicillinase de bas niveau » (**Vedel, 1998**). Aussi nous avons noté une sensibilité totale (100%) à l'imipénème.

Cependant, la résistance de *K. pneumoniae* aux céphalosporines de 3^{ème} génération (représentaient dans notre étude par la céfotaxime) était de 56,67%, un taux très proche a été obtenu en Tunisie, selon le dernier rapport du réseau tunisien de surveillance, la fréquence de *K. pneumoniae* résistantes au C3G était de 51.5% en 2007 (**Ben Redjeb et Boutiba-Ben Boubaker, 2008**). Ce résultat est inférieure de ceux obtenus d'abord au Maroc par **Amhaouch et al.**, en 2013 et dont le taux était de 92,53%, ensuite par **Touchene et Ghalmi** en 2015 avec 86,67%.

Ce taux élevé chez *K. pneumoniae* est probablement dû au fait que cette souche est productrice des enzymes inactivant les C3G tel que les BLSE et les céphalosporinases (**Carrèr et Nordmann, 2009**). De plus, la « Céphalosporinase de haut niveau » est un phénotype correspond à une résistance plus ou moins marquée aux pénicillines, céphalosporines de 1^{er} et 2^{ème} génération et au moins à une C3G qui a été retrouvée chez *Klebsiella pneumoniae* mais également chez d'autres entérobactéries (**Philippon et Arlet, 2006**). *Klebsiella pneumoniae* a longtemps constitué l'espèce d'entérobactérie chez laquelle la production de BLSE était la plus fréquemment décrite (**Colodner et al., 2004**).

En analysant les profils de résistance des 119 souches d'*E. coli* étudiées, 81.51% des souches sont résistantes aux β -lactamines, Ce résultat est extrêmement élevé de celui obtenu

par **Touchene et Ghalmi** en 2015 dans le même laboratoire dont notre étude a été réalisée avec 15.78%, aussi par rapport à ce qui a été rapporté par Medboua en 2011 avec 2.64%.

Ces souches présentent un taux de résistance important pour l'Ampicilline avec un pourcentage de 92.78%, On note également une résistance envers l'Amoxicilline+ Ac.clavulanique, la céfotaxime et la céfazoline avec 44.33%, 16.49% et 14.43% respectivement, pouvant être due à une « pénicillinase résistante aux inhibiteurs » lui conférant une résistance à l'amoxicilline et à la ticarcilline, seules ou en association avec l'acide clavulanique et un bas niveau de résistance aux C1G (**Lavigne et al., 2002**).

Nos pourcentages sont inférieures de ceux rapporté par **Touchene et Ghalmi** en 2015 dont toutes les souches étaient résistantes (100%) pour l'Ampicilline et la Céfazoline, et présentant un taux de 95,56% envers la Céfotaxime.

Parmi 31 souches de *P. mirabilis* isolées, 25 sont résistantes aux β -lactamines avec un taux de 80.64%, comparé à 2% présenté par **Touchene et Ghalmi** en 2015 et 3.70% rapporté par **Medboua** en 2011. Les souches de *P. mirabilis* ont montré une très grande résistance vis-à-vis de l'Ampicilline (76%), cependant la céfazoline, l'Amoxicilline+ Ac.clavulanique, et la céfotaxime restent actives avec respectivement 28%, 16% et 8% de résistance.

En effet ces bactéries sont dépourvues de β -lactamases à l'état « sauvage » et sont naturellement sensibles aux amino-pénicillines, carboxypénicillines, uréido-pénicillines, à l'aztréonam, aux céphalosporines et aux carbapénèmes (**Bonnet, 2006**), mais pouvant être résistantes par l'acquisition d'une β -lactamase de type CTX-M qui est maintenant très largement répandu dans le monde (**Philippon et Arlet, 2006**). Suite à la sensibilité totale vis-à-vis les C2G (tel que FOX) on déduit alors l'absence du phénotype naturel « céfuroximase » représentant le groupe 05 (**Courvalin et al., 2006**).

Pour les taux de résistance des bacilles à Gram négatif non-fermentaires aux β -lactamines, parmi les 3 souches de *P. aeruginosa* résistantes, 2 soit (66.66%) sont résistantes à la ceftazidime, une soit (33.33%) à la ticarcilline+acide clavulanique, céfazoline, céfoxitine et aucune n'est résistante à l'imipénème, pipéracilline, aztreonam et ticarcilline. Différemment aux taux qui ont été rapportés d'abord par **Ben Abdallah et al.**, en 2008 en Tunisie avec 26%, 26,2% et 23,6% pour la ticarcilline, pipéracilline et ceftazidime respectivement, ensuite par le réseau national de la surveillance des bactéries résistantes aux antibiotiques, en 2009, avec 13,25% et 10,93% pour la ceftazidime et l'imipénème respectivement (**Benslimani, 2009**).

La résistance de *P. aeruginosa* à l'ensemble des β -lactamines excepté les carbapénèmes peut être traduite par l'acquisition d'un phénotype de résistance « céphalosporinase de haut niveau » (**Eyquem et Montagnier, 2000**). Ce phénotype de résistance est très fréquent, représente le mécanisme de résistance principal aux céphalosporines antipseudomonas chez *P. aeruginosa* (**Mérens et al., 2012**).

Récemment, **Touati et al.**, ont décrit la première diffusion de souches de *P. aeruginosa* productrices de MBL VIM-2 dans 14 isolats cliniques au niveau de Annaba, au nord-est algérien (**Touati et al., 2013**). Ainsi, cette étude représente la deuxième description de *P. aeruginosa* productrices de VIM- 2 en Algérie au cours de la même année. Cette constatation peut refléter la répartition actuelle de MBL dans les bactéries à Gram négatif cliniquement pertinentes dans l'Afrique du nord (**Sefraoui, 2015**).

En ce qui concerne *A. baumannii*, notre souche est résistante à la ticarcilline avec un taux de 100%, contrairement à ce qui a été présenté par **Medboua** en 2011, dont toutes les souches sont résistantes à la ceftazidime. De plus, une étude faite en Grèce a montré que >94% des souches *A. baumannii* sont résistantes à la ceftazidime, l'amikacine et à l'imipénème (**Enoch et al., 2007**). La résistance d'*A. baumannii* aux carbapénèmes a augmenté de manière alarmante ces dernières décennies, dû à l'usage abusif de cette classe d'antibiotique dans les services hospitaliers y a largement contribué. Cependant, la résistance à l'imipénème est variable selon les auteurs, allant de 3,1 à 60 % (**Chbani et al., 2004**).

Les phénotypes de résistance aux β -lactamines qui peuvent être observé sont variables à savoir l'imperméabilité, l'hyperproduction des céphalosporinases chromosomiques, production des céphalosporinases plasmidiques, production des carbapénémases ou l'association de ces mécanismes. En effet, les BLSE sont retrouvées chez une vaste proportion de bacilles à gram négatif, mais les entérobactéries représentent les germes les plus incriminés (**Gniadkowski, 2001**).

L'impact de la production de BLSE sur la mortalité, comparé aux infections à des organismes non BLSE, a montré que les infections causées par des entérobactéries produisant des BLSE sont plus virulentes et associées à des résultats cliniques indésirables, y compris l'augmentation de la mortalité, des hospitalisations prolongées et des coûts économiques plus élevés (**Schwaber et Carmeli, 2007**).

Parmi les 180 souches résistantes, 23.88% sont productrices des BLSE, dont ces derniers sont de 69.35% au CHU Beni-Messous d'Alger d'après **Medboua** en 2011. Le tableau VII montre une comparaison du nombre des souches productrices de BLSE dans les différents hôpitaux en Algérie avec nos souches.

Tableau VII: Comparaison du nombre des souches productrices de BLSE dans les différents hôpitaux en Algérie avec nos souches (**Benslimani, 2009**). (NP: Non Précisé).

	Entérobactéries	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>
Nos résultats	42/176	0/3	1/1
Résultats de même laboratoire en 2012	16/208	NP	NP
CHU Mustapha Bacha	66/202	0/111	23/60
CHU Tizi-Ouzou	154/744	2/172	1/24
HMRU Constantine	92/434	27/120	6/28
HMRU Oran	44/186	2/52	0/13

Le taux de production des BLSE chez nos souches d'entérobactéries isolées est de 20% (42/210). Une souche d'*A. baumannii* est productrice de BLSE, alors qu'aucune souche de *P. aeruginosa* ne les produits. Selon le réseau national de surveillance des bactéries résistantes en Algérie, en 2009, la production de BLSE était de 22,02% dans 16 laboratoires, et que le nombre des souches de d'*A. baumannii* et *P. aeruginosa* reste faible (**Benslimani, 2009**).

Dans cette étude, L'incidence des souches d'entérobactéries productrices de BLSE était 20% (42/210). Cette prévalence correspond à peu près à celles retrouvées dans certaines études nationales publiés jusqu'alors au Nord d'Algérie, soit 39.22% à Tlemcen (**Baba Ahmed-KaziTani et al., 2013**), et 31.4% à Annaba (**Nedjai et al., 2012**) et 31,76% selon **Benslimani et mehieddine** en 2010. Mais assez différente de celle faite dans le même laboratoire de l'EPH de Boufarik en 2012 par **Ahmia** avec 7,69%, et celle faite au Japon (6,4 %) et au Belgique (6.6%) (**Luvansharav et al., 2011 ; Rodriguez-Villalobos et al., 2011**).

Parmi les souches d'entérobactéries productrices de BLSE identifiées, on retrouvait majoritairement *E. coli* 47% puis *K. pneumoniae* 40% et *E. cloacae* 5%. Ces taux sont

relativement élevés, concernant les souches d'*E. coli* et *K. pneumoniae*, en comparaison à des taux de 37.8% et 21% respectivement trouvées par **Duval et al.** au Mali (**Duval et al., 2009**).

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

Conclusion

En résumé, nous avons obtenu au cours de notre étude les résultats suivants :

- Au total 240 souches ont été isolées et identifiées, dont 225 sont des bacilles à Gram négatif, avec 210 entérobactéries, 14 *Pseudomonas* (13 *P. aeruginosa* et *P.sp*) et une *A. baumannii*.
- Les profils de résistance aux β -lactamines ont mis en évidence des taux de résistance variables, dont le taux global est de 80% (180/225).
- 176/180 des souches résistantes sont des entérobactéries, 1/180 et une *A. baumannii* et 3/180 sont des *P. aeruginosa*.
- La plupart des souches résistantes ont été isolées en médecine interne avec un taux de 95,83%.
- Les personnes âgées sont les plus touchées par la résistance.
- 23.88% des souches résistent par la production des BLSE, ce qui reflète une épidémie à BLSE dans cet hôpital.
- La majorité des souches productrices des BLSE présentent des niveaux de résistance élevés à la plupart des β -lactamines sauf l'imipénème.

Une meilleure maîtrise en termes d'hygiène hospitalières (renforcement de la formation du personnel aux règles préventives, précocité du dépistage...etc.) et un meilleur contrôle de la consommation en antibiotique seraient toutefois des facteurs favorisant une meilleure maîtrise des risques. L'analyse moléculaire des clones détectés paraît indispensable à terme pour une compréhension et une réaction adaptée à l'émergence des BMR (Bactérie Multirésistante).

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

- Identification de type de β -lactamases par des réactions de PCR et séquençage des gènes.
- Élargir la période d'étude afin d'avoir des résultats représentatifs et significatifs, où sera pris en compte un nombre plus considérable de groupes bactériens à savoir les Gram positif et d'autre bactéries à Gram négatif.
- Suivre l'évolution de la résistance en médecine interne, afin d'évaluer mieux les facteurs de risque chez les personnes âgées.
- Une politique d'antibiothérapie justifiée et/ou d'une restriction dans la prescription des céphalosporines peut conduire à une diminution significative de la fréquence de BLSE.

Références bibliographiques

- **Algerian Antibiotic Resistance Network (AARN), 2011.** Le rapport original est librement disponible sur le lien: <http://www.sante.dz/aarn>
- **Abraham E.P. et Chain E. 1940.** An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. 146 : 837.
- **Ahmia A. 2012.** Etude de la résistance des Entérobactéries vis-à-vis des β -lactamines. Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention de diplôme d'études supérieures en Biologie.
- **Akiki C., Lamarre N. and Boulos E. 1991.** Méthode d'analyse du liquide céphalo-rachidien et surveillance des méningites purulentes. *Médecine d'Afrique Noire*. 38 (10).
- **Ambler RP. 1980.** The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 289 : 321–31.
- **Anastay M., Lagier E., Blanc V. and Chardon H. 2013.** Épidémiologie des bêtalactamases à spectre étendu (BLSE) chez les entérobactéries dans un hôpital du sud de la France, 1999–2007. *Pathologie Biologie*. 61, 38–43.
- **Anglaret Xavier et Mortier Emmanuel, 2002.** Maladies infectieuses, 3^{ème} édition, Edition ESTEM, édition MED-LINE. France.
- **Arpin C., Quentin C., Grobost F., Cambau E., Robert J., Dubois V., Coulange L. and André C. 2009.** Nationwide survey of extended-spectrum lactamase-producing Enterobacteriaceae in the French community setting. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 63 (6): 1205-14.
- **Arslan H., Azap O.K., Ergönül O., Timurkaynak F. 2005.** Risk factors for ciprofloxacin resistance among *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infections in Turkey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 56 : 914-918.
- **Avril J. M., Dabernat H. and Monteil D. H. 2000.** Bactériologie clinique. 3^{ème} Ed. Ed *Elsevier*. Paris. pp :602.
- **Baba Ahmed-Kazi Tani Z., Decré D., Genel, N., Boucherit-Otmani Z., Arlet G., and Drissi M. 2013.** Molecular and Epidemiological Characterization of Enterobacterial

Multidrug Resistant Strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008–2010). *Microbial Drug Resistance*. 19(3): 185-190.

- **Baditiou L., Licker M., Popovici E.D., Vaduva D.B., Draqomirescu L., Pivan R., Muntean D., Horhat F. and Moldovan R. 2009.** Risk factors involved in multiresistant infections with strains of enterobacteriaceae. *Bacteriology Virusology Parazitology Epidemiology*. 54 :31-39.

- **Barbe C., Fusellier A., Bureau Chalot F., Brasme L., Vernet G. V., De Champs C. and Bajolet O. 2010.** Étude des facteurs prédictifs d'acquisition d'une souche épidémique d'*Escherichia coli* productrice de bêta-lactamase à spectre étendu. *Pathologie Biologie*. 58 :25-28.

- **Belabbass H., Chakib A., El Mdaghri N., Joughadi Z., IMarhoum El Filali K., Najib J et al. 2010.** Guide de la lutte contre les méningites bactériennes communautaires. *Ministère de la Santé*. Maroc.

- **Belbel Z. 2014.** Evaluation de la résistance aux antibiotiques des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées dans les hôpitaux de la ville d'Annaba. Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat en microbiologie. Université Badji Mokhtar Annaba.

- **Belmonte O., Drouet D., Alba J., Moiton M-P., Kuli B., Lugagne-Delpon N., Mourlan C. and Jaffar-Bandjee M-C. 2010.** Evolution de la résistance des entérobactéries aux antibiotiques sur l'île de la Réunion : émergence des bêta-lactamases à spectre élargi. *Pathologie Biologie*. 58: 18-24.

- **Ben Abdallah H., Noomen S., Ben Elhadj Khélifa A., Sahnoun O., Elargoubi A. and Mastouri M. 2008.** Susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in the Monastir region, Tunisia. *Médecine et maladies infectieuses*. 38 :554-556.

- **Ben Romdhane F., Bougherra C.H., Sahnoun O., Loussaief C.H., Kacem B., Mastouri M., Tabka-Stambouli R., Chakroun M. and Bouzouaia N. 2007.** Les bactéries multirésistantes isolées chez les malades hospitalisés dans un service de maladies infectieuses. *Revue Tunisienne Infectiologie*. 1 :12-15.

- **Benamrouche N., Hadjila L. and Rahal K. 2009.** Mécanismes de résistance aux antibiotiques des bactéries résistantes en Algérie. *Revue bibliographique*. In : Surveillance de

la résistance des bactéries aux antibiotiques. 11^{ème} rapport d'évaluation (Janvier à Décembre 2009). pp :198.

- **Benslimani A. 2009.** MRSA, entérobactéries BLSE, Acinetobacter spp.et P. aeruginosa résistants à l'imipénème, à la ceftazidime et à la ciprofloxacine. *In* : Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 11eme rapport d'évaluation (Janvier à Décembre 2009). pp :198.

- **Ben Redjeb S. et Boutiba-Ben Boubaker I. 2007.** L'Antibio-Résistance en Tunisie. Publications du Laboratoire de Recherche. *LART 2004-2007.*

- **Bergmans D.C., Bonten M.J., VAN Tiel F.H., Gaillard C.A., van der Geest S., Wilting R.M. et al. 1998.** Cross-colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* of patients in an intensive care unit. *Thorax.* 53 : 1053-1058.

- **Bernet C et Laprugne-Garcia E. 2009.** Le risque de contamination à *Pseudomonas aeruginosa* à l'ouverture d'un établissement de santé, *in* Fiches conseils pour la prévention du risque infectieux – Environnement. *Centre de Coordination des actions de Lutte contre les Infections Nosocomiales Sud-Est.*

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

- **Bonnet R. 2006.** β -lactamines et entérobactéries. Chapitre 15. Livre antibiogramme. Paris. *ESKA : 2^{ème} édition.* pp : 143.

- **Bush K., Jacoby GA. and Medeiros AA. 1995.** A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 39(6):1211–33.

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

- **Bryskier, A. 1984.** Classification of beta-lactams. *Pathologie Biologie.* Paris. 32 :658-667.

- **Canton, R., Novais A., Valverde A., Machado E., Peixe L., Baquero F. and Coque T. M. 2008.** Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 14 Suppl 1:144-153.
- **Cao V., Lambert T., Nhu D. Q., Loan H. K., Hoang N. K., Arlet G. and Courvalin P. 2002.** Distribution of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Vietnam. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 46:3739-43.
- **Caracciolo A., Bettinelli A., Bonato C., Isimbaldi C., Tagliabue A., Longoni L. and Bianchetti M. 2011.** Antimicrobial resistance among *Escherichia coli* that cause childhood community-acquired urinary tract infections in Northern Italy. *Italian Journal of Pediatrics*. 37: 1-3.
- **Carrër A. et Nordmann P. 2009.** *Klebsiella pneumoniae* CTX-M-15 : vers une modification de l'épidémiologie des β -lactamases à spectre étendu. *Pathologie Biologie*. Article in Press.
- **CA-SFM. 2008.** Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. <http://www.sfm.asso.fr/>.
- **Cattoir V. 2013.** Infections à bacilles à Gram négatif résistants : nouvelles molécules, nouvelles associations. *Journal des Anti-infectieux*. 15, 159-165.
- **Cavallo, J.D., Fabre, R., Jehl, F., Rapp, C., and Garrabé, E. 2004.** Bêtalactamines. *EMCMaladies infectieuses*. 1 : 129-202.
- **Charlier P., Coyette J., Dehareng D., Dive G., Duez C., Dusart J., Fonzé E., Fraipont C., Frère J.M., Galleni M., Goffin C., Joris B., Lamotte-Brasseur J. and Nguyen-Distèche, M. 1998.** Résistance bactérienne aux β -lactamines. Synthèse. *Médecine/sciences*. 14 : 544-555.
- **Chbani F., Zoughaghi L., Taouragt K., Aarab H. and Benaouda A. 2004.** *Acinetobacter baumannii* : épidémiologie et résistance aux antibiotiques. *Revue du Pratcien*. 14(2):23-4.
- **Chong Y., Ito Y., Kamimura T. 2011.** Genetic evolution and clinical impact in extendedspectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection, Genetics and Evolution*. 11: 1499-1504.

- **Chraïti MN., Huttner B. and Iten A. 2015.** Procédure interdisciplinaire prévention et contrôle de l'infection, *in. Vigi-germe.*

- **Colodner R., Rock W., Chazan B., Keller N., Guy N., Sakran W. and Raz R. 2004.** Risk factors for the development of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in nonhospitalized patients. *Europe Journal of Clinical Microbiologie Infection Diseases.* 23:163-167.

- **Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber, D.R. and Lappin-Scott,H.M. 1995.** Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology* 49 : 711-745.

- **Collignon A., Beljean-Leymarie M., Farinotti R. et Doutremepuich C. 2007.** Infectiologie. Volume 3 de Collection Le Moniteur internat. *Le Moniteur des Pharmacies* N° 3. pp : 354-355.

- **Courvalin P., Lecleraq R., Binger E. 2006.** AntibioGramme. 2^{ème} édition. 141-163-395-133-117.

- **Courvalin P. 2008.** La résistance des bactéries aux antibiotiques : combinaisons de mécanismes biochimiques et génétiques. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France.* France. 161. 1.

- **D'Escrivan T., Faure K., Boussekey N., Soubrier S. and Guery B. 2004.** Facteurs de risque de bactéries multirésistantes chez les patients admis en réanimation pour une bactériémie nosocomiale. *Médecine et maladies infectieuses.* 34 : 130-169.

- **Delarras C. 2007.** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. *Edition Techniques et Documentation.* Paris. pp : 248-296.

- **Delmas C. 2008.** Fiche technique : *Acinetobacter baumannii.* Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique.France.

- **Datta N. et Kontomichalou P. 1965.** Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae.* *Nature.* 208 : 239-41.

- **Denis F. et Ploy M.-C. 2011.** Bactériologie Médicale. 2^{ème} édition largement revue et actualisée. *Elsevier Masson.*34: 331-372.

- Denis François., Bingen Edouard., Martin Christian., Ploy Marie-Cécile. and Quentin Roland. 2012. Bactériologie médicale. 2^{ème} édition revue et augmentée. *Elsevier Masson*.
- Djennane F., Mohammedi D., Tiouit D., Touati D. and Rahal K. 2009. Examen Cytobactériologique des Urines. Techniques Microbiologiques. Institut Pasteur d'Algérie.
- Doit C., Mariani-Kurkdjian P. and Bingen E. 2010. Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu. *Archives de Pédiatrie*. 17 : S133-S144.
- Duval V., Maiga I., Maiga A., Guillard T., Brasme L., Forte D., Madoux J., VernetGarnier V., and De Champs C. 2009. High prevalence of CTX-M-type beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Bamako, Mali. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53(11): 4957-4958.
- El Bouamri M.C., Arsalane L., Kamouni Y., Berraha M. and Zouhair S. 2014. Évolution récente du profil épidémiologique des entérobactéries uropathogènes productrices de β -lactamases à spectre élargi à Marrakech, Maroc. *Progrés en Urologie*.
- Elhani D. 2012. Les bêta-lactamases à spectre étendu: le défi s'accroît. *Annales de Biologie Clinique*. 70(2): 117-40.
- Enoch D.A., Birkett C.I. and Ludlam H.A. 2007. Non-fermentative Gram-negative bacteria. *Journal of Antimicrobial Agents*. 3: 33-41.
- Eisenstein B, Zaleznif D. 2000. Enterobacteriaceae. In : Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Vol 2. 5th edition, *Churchill Livingstone*. 2294-2310.
- Euzeby J.P. 2010. Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale à l'usage des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Le texte original est librement disponible sur: <http://www.bacteriologie.net/generale/resistancenaturelle.html>.
- Eyquem A. et Montagnier L. 2000. Traité de microbiologie clinique : deuxièmes mises à jour et compléments. *PICCIN*. pp: 33-34.
- Farmer J.J., Boatwright K.D. and Janda J.M. 2007. Enterobacteriaceae: Introduction and identification. *Manual of Clinical microbiology*. Washington, DC, USA: *American Society for Microbiology press*. 9th ed. 649-669.

- **Fisher, J.F., Meroueh, S.O., and Mobashery, S. 2005.** Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chemical Reviews*. 105: 395-424.

- **Flam T. 1999.** Uropage/Pr. Thierry Flam. France, 2000-2011, *édition, Maloine, Paris.*

- **François Jehl. 2012.** L'interprétation phénotypique de l'antibiogramme. *Revue francophone des laboratoires*. 445.

- **Frère JM. 1995.** β -Lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Molecular Microbiology*. 16: 385-95.

- **Garrity G. M., Bell J. A. and Lilburn T. 2010.** Pseudomonadales. *In: Brenner D. J., Krieg N. R. Staley T. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2^{ème} ED.* pp: 323-441.

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

- **Géraldine Jacob. 2010.** Émergence des entérobactéries sécrétrices de bêta-lactamases à spectre élargi. *Pratique microbiologie*. pp: 438.

- **Gessard, C. 1984.** Classics in infectious diseases. On the blue and green coloration that appears on bandages. *Reviews of infectious diseases* 6 Suppl 3: 775-776.

- **Giamarellou H., Antoniadou A. and Kanellakopoulou K. 2008.** *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 32:106-119

- **Gillespie S. H. et Hawkey P.M. 2006.** Principles and Practice of Clinical Bacteriology. *Edition wiley. 2^{ème} Edition.* London. pp: 604.

- **Gniadkowski, M. 2001.** Evolution and epidemiology of extended spectrum beta-lactamases and ESBL producing micro-organisms. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 7: 557-608.

- **Goldstein, F.W., Pean, Y., and Gertner, J. 1995.** Resistance to ceftriaxone and other betalactams in bacteria isolated in the community. The Vigil'Roc Study Group. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 39(11): 2516-2519.
- **Goossens H., et GrabeinB. 2005.** Prevalence and antimicrobial susceptibility data for extended-spectrum beta-lactamase- and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* from the MYSTIC Program in Europe and the United States (1997-2004). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* .53:257-64
- **Granier F. et Denis F. 2007.** Hemoculture. In : **Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E. and Quentin R.** Bactériologie médicale: Techniques usuelles. *Ed Elsevier Masson*. Paris. pp:107-115.
- **Gueudet T., Richter S., Szulc M. et Jehl F. 2010.** Les nouvelles formes de résistance des bactéries aux antibiotiques : deux cas de *Klebsiella pneumoniae* produisant une céphalosporinase plasmidique. *Médecine et maladies infectieuses* ; 40: 177-179.
- **Gueye O. 2007.** Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles a Gram négatif. Thèse doctorat. Université cheikh Anta Diop de Daka. pp :120.
- **Hafiane A. et Ravaoarino M. 2008.** Various typing methods of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients. *Médecine et maladies infectieuses*. 38: 238-247.
- **Iabadene H., Dallenne C., Messai Y., Geneste D., Bakour R. and G. Arlet. 2009.** Emergence of extended-spectrum beta-lactamase PER-1 in *Proteus vulgaris* and *Providencia stuartii* isolates from Algiers, Algeria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53:4043-4044.
- **Iabadene H., Messai Y., Ammari H., Ramdani-Bouguessa N., Lounes S., Bakour R. and Arlet G. 2008.** Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 62:133-136.
- **Isenberg H. 1992.** Enterobacteriaceae. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR: *Infectious Diseases.Saunders*. 1463-1478.
- **Jacoby G. A. 2006.** β -lactamase Nomenclature. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 50 (4): 1123–1129.

- **Jans B., Glupczynski Y., Suetens C. and Van Cleemput E. 2004.** Enquête épidémiologique relative à *ACINETOBACTER BAUMANNII* producteur de BLSE (Type VEB-1) en Belgique. *In: Institut Scientifique de la Santé Publique, ISP/EPI REPORTS N° 2004 – 18.*

- **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. *Reviews of infectious diseases.* 10: 867–878.

- **Larpent J.P. et Larpent-Gourgaud M. 1997.** Mémento de microbiologie. 3^{ème} édition. *Lavoisier.* Paris. pp :73.

- **Joly et Reynaud. 2002.** Entérobactéries : Systématique et méthodes de diagnostic. *Ed TEC & DOC et Ed médicales Inter Nationales.* Paris. pp: 356.

- **Kassis-Chikhani, N., Vimont, S., Asselat, K., Trivalle, C., Minassian, B., Sengelin, C., Gautier, V., Mathieu, D., Dussaix, E. and Arlet, G. 2004.** CTX-M β -lactamase-producing *Escherichia coli* in longterm care facilities, France. *Emerging Infectious Diseases.* 10: 1697–1698.

- **Lambert T. 2007.** *Acinetobacter.* *In :* Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E. et Quentin R. Bactériologie médicale: Techniques usuelles. *Ed Elsevier Masson.* Paris. pp: 344-346.

- **Lapeysonnie L, 1963.** La méningite cérébro-spinale en Afrique. *Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé* 28. Suppl: 1-110.

- **Laurent C., Rodriguez-Villalobos H., Rost F., Strale H., Vincent J.L., Deplano A., Struelens M.J. and Byl B. 2008.** Intensive care unit outbreak of extended-spectrum betalactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* controlled by cohorting patients and reinforcing infection control measures. *Infection Control & Hospital Epidemiology.* 29: 517-524.

- **Lautenbach, E., Patel, J.B., Bilker, W.B., Edelstein, P.H., and Fishman, N.O. 2001.** Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clinical Infectious Diseases.* 32: 1162–1171.

- **Lavigne J-P., Sotto A., Merle C., Jourdan J., Soussy C-J. et Sirot D. 2002.**

Résistance enzymatique d'*Escherichia coli* aux β -lactamines et prévalence en clinique. *Pathologie Biologie* ; 50: 388-93.

- **Liassine. 2000.** Problème des pathogènes à Gram négatif résistants aux antibiotiques en milieu hospitalier. *Schweizerische medizinische Wochenschrift journal*.130: 1930-1936.

- **Legeay C., Hilliquin D., Brunet M. and Zahar J.-R. 2016.** Les bêta-lactamases à spectre élargi, quel est le risque en oncopédiatrie?. *Revue d'oncologie hématologie pédiatrique*. 4, 25-34.

- **Lister P.D., Wolter D.J., and Hanson N.D. 2009.** Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 22: 582-610.

- **Livermore D. et Williams JD. 1996.** β -lactams: mode of action and mechanisms of bacterial resistance. In: *Lorian V, editor. Antibiotics in laboratory medicine*. Baltimore: Williams and Wilkins. pp: 502–578.

- **Lozniewski A., Rabaud C. and Nancy. 2010.** Résistance bactérienne aux antibiotiques. Infections associées aux soins. Fiches conseils pour la prévention du risque infectieux. *Centre de Coordination des actions de Lutte contre les Infections Nosocomiales Sud-Est*.

- **Luvsansharav U.O., Hirai I., Niki M., Nakata A., Yoshinaga A., Moriyama T., and Yamamoto Y. 2011.** Prevalence of fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae among healthy adult people in Japan. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 17(5): 722–725.

- **Mahenthalingam E., Campbell M.E., Foster J., Lam J.S., and Speert D.P. 1996.** Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 34: 1129-1135.

- **Mansour W., Bouallegue O., Dahmen S. and Boujaafar N. 2008** .Caractérisation des mécanismes enzymatiques de résistance aux β -lactamines chez des souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées à l'hôpital universitaire Sahloul, Sousse en Tunisie (2005). *Pathologie Biologie*. 56 :116–120.

- **Mariani-Kurkdjian P. et Bingen E. 2007b.** Diagnostic bactériologique et suivi biologiques des méningites bactériennes. *In* : Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E. et Quentin R. Bactériologie médicale : Techniques usuelles. *Ed Elsevier Masson*. Paris. pp: 145-154.
- **Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T, Yokota Y. and Mine Y. 1988.** Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 32: 1243-6.
- **Matewish M. et Lam J. S. 2004.** *Pseudomonas*. *In*: Carlton L. G., John F. P., Glenn J. S. et Charles O. T. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Third Edition. *Blackwell Publishing*. pp: 321-333.
- **Mayoral G., Ferreyra M., Eden A., Gueudet P., Miquel C. and Lecaillon E. 2010.** Evolution of third generation cephalosporins resistance in Enterobacteriaceae from 2000 to 2008 in Perpignan hospital. *Pathologie Biologie*. 58: 7-10.
- **Medboua C. 2011.** Caractérisation des phénotypes de résistance aux β -lactamines à large spectre des bacilles à Gram négatif isolés au niveau du laboratoire central mère et enfants du CHU Beni-Messous d'Alger. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister. Alger.
- **Mérens Audrey., Janvier Frédéric., Vu-Thien Hoan., Cavallo Jean-Didier. and Jeannot Katy. 2012.** Phénotypes de résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*. *Revue francophone des laboratoires*. pp:445.
- **Mkaouar D., Mahjoubi F., Mezghani S., Znazen A., Ktari S. and Hammami A. 2008.** Étude de la résistance des entérobactéries aux céphalosporines de troisième génération dans les hôpitaux de Sfax, Tunisie (1999–2005). *Médecine et maladies infectieuses*. 38 : 293-298.
- **Muylaert A. et Mainil J.g. 2012.** Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité ». *Annales De Medecine Veterinaire*. 156, 109- 123.
- **Nordmann P. et Carrer A. 2010.** Les carbapénèmases des entérobactéries. *Archives de Pédiatrie*.17: S154-S162.
- **Paterson DL. et Bonomo RA. 2005.** Extended spectrum beta-lactamases : a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*. 18: 657-86.

- **Péan Y., Goldstein F.W. and De Bels F. 2001.** Évolution de la sensibilité et épidémiologie de la résistance des entérobactéries de ville au cours des enquêtes Vigil'Roc. *Médecine et maladies infectieuses*. 31 : 609-21.

- **Pena, C., Pujol, M., Ricart, A., Ardanuy, C., Ayats, J., Linares, J., Garrigosa, F., Ariza, J., and Gudiol, F. 1997.** Risk factors for faecal carriage of *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum β -lactamase (ESBL-KP) in the intensive care unit. *Journal of Hospital Infection*. 35: 9–16.

- **Penteado A P., Castanheira M., Pignatari A.C.C., Guimarães T., Mamizuka E.M. and Gales A.C. 2009.** Dissemination of blaIMP-1-carrying integron In86 among *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring a new trimethoprim resistance gene *dfr27*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 63: 87-91.

- **Perrière G. 1992.** Application d'une présentation par objet des connaissances de modélisation de certains aspects de l'expression des gènes chez *E.coli* UCBL. Thèse Université de Lyon I, France. 14, 77.

- **Perez, F., Endimiani, A., Huje,r K.M. and Bonomo, R.A. 2007.** The continuing challenge of ESBLs. *Current Opinion in Pharmacology*. 7: 459-469.

- **Philippon A. 2005.** β -lactamases: généralités. Université Paris V - Faculté de Médecine Descartes, Service de Bactériologie - 75014 PARIS. Sur le lien :
www.microbesedu.org/mecanisme/bla/generalites.html - 63k.

- **Philippon A. et Arlet G. 2006.** β -Lactamases de bacilles à Gram négatif: le mouvement perpétuel. *Annales de biologie clinique*. 64 (1): 37-51.

- **Piednoir E., Thibon P., Borderan G.C., Godde F., Borgey F., Le Coutour X. and Parienti J.J. 2011.** Long-term clinical and economic benefits associated with the management of anosocomial outbreak resulting from extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Critical Care Medicine*.39: 2672-2677.

- **Pitout J.D., Nordmann P., Laupland KB. and Poirel L. 2005.** Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum betalactamases (ESBLs) in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 56:52-9.

- **Ploy M-C. et Denis F. 2007.** Analyse cyto bactériologique des pus. *In : Denis F., Ploy M-C., Martin C., Bingen E. and Quentin R.* Bactériologie médicale: Techniques usuelles. *Ed Elsevier Masson.* Paris. pp: 165-169.
- **Quinteros M., Radice M., Gardella N., Rodriguez M. M., Costa N., Korbenfeld D., Couto E. and Gutkind G. 2003.** Extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, public hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 47:2864-2867.
- **Rahal K., Belouni R. and Benslimani A. 2005.** Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale. *Rec de L'OMS. 4^{ème} édition.* Algérie. pp:46-52.
- **Rahal K., Benslimani A., Tali-Maamar H., Missoum M. F. K., Kechih- Bounar S., Ammari H. et al. 2011.** Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire). *6^{ème} édition.* Algérie. pp:159-161.
- **Robin F., Gibold L. and Bonnet R. 2012.** Résistances naturelles et acquises aux β -lactamines chez les entérobactéries : comment les identifier en pratique quotidienne. *Revue Francophone des laboratoires.* 445 : 47-58.
- **Rodriguez-Villalobos H., Bogaerts P., Berhin C., Bauraing C., Deplano A., Montesinos I., de Mendonca R., Jans B. and Glupczynski, Y. 2011.** Trends in production of extended spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* of clinical interest: results of a nationwide survey in Belgian hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 66: 37-47.
- **Ruppé E. 2010.** Épidémiologie des bêta-lactamases à spectre élargi : l'avènement des CTX-M. *Antibiotiques.* 12, 3-16.
- **Saighi D., Peyromaure M. and Debré D. 2004.** Urologie. *Ed Masson.* Belgique. pp:191.
- **Sauna Djahida. 2011.** Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries au niveau du C.H.U de Sidi Bel Abbes. Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du Magister. Université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen.
- **Scavizzi M, Labia R, Petitjean O. and Elbhar A. 2000.** L'antibiogramme de l'analyse des populations bactériennes à la thérapeutique. *Antibiotiques.* 2: 122-134.

- **Schwaber M. J. et Y. Carmeli. 2007.** Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae* bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 60:913-920.

- **Sefraoui I. 2015.** Etude de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau de différents hôpitaux de l'ouest algérien. Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat en biologie. Université Abou Bekr Belkaid. Telemcen.

- **Seck R. 2005.** Résistance des souches d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* isolées d'infections urinaires. Thèse de doctorat. Université Cheikh Anta Diop de Dakar. Faculté de médecine, de pharmacie et d'Odonto-Stomatologie. Département de pharmacie.

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

- **Siegrist H.S. 2000.** *Acinetobacter spp* : Infection nosocomiales, épidémiologie et résistance aux antibiotiques. *Swiss-Noso*. Suisse.

- **Sirof, J. 1989.** Prospective survey of colonization and infection caused by expanded spectrum-beta-lactamase-producing members of the family Enterobacteriaceae in an intensive care unit. *Journal Clinique de Microbiologie*. 27(12): 2887-2890.

- **Société Française de Microbiologie. 2004.** Examen cytochimique et bactériologique du liquide céphalorachidien. In: RÉMIC 2^{ème} édition: par le groupe de la Société Française de Microbiologie (Ed). Référentiel en microbiologie médicale (bactériologie et mycologie). 2M2-Demande du RÉMIC 7, rue Bastienne 95160 Montmorency. pp: 57-60.

- **Songa J., Thamlikitkulb V., Hsuehc P. 2011.** Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia amongst adults in the Asia-Pacific region. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 38: 108-117.

- **Soude S.G.A.A. 2005.** Bactéries isolées des hémocultures au laboratoire du centre national hospitalier et universitaire Hubert Koutoukou Maga De Cotonou. Thèse pour l'obtention du grade de Docteur en pharmacie diplôme d'état. République du Mali, université de Bamako, faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.

- Sougakoff W. et Trystram D. 2003.** Résistances aux β -lactamines. Service de Bactériologie-Hygiène du CHU Pitié-Salpêtrière. Université Paris-VI.
- **Talon D., Capellier G., Boillot A., and Michel-Briand Y. 1995.** Use of pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiologic tool during an outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* lung infections in an intensive care unit. *Intensive Care Médecine*. 21: 996-1002.
- **Thabet L., Messadi A.A., Mbarek M., Turki A., Meddeb B. and Ben Redjeb S. 2008.** Surveillance of multidrug resistant bacteria in a Tunisian hospital. *Journal Antimicrobial Agents*. 86: 992-995.
- **Touati M., Diene S M., Dekhil M., Djahoudi A., Racherache A., and Rolain J M. 2013.** Dissemination of a class I integron carrying VIM-2 carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital intensive care unit in Annaba, Algeria. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 57: 2426-2427.
- **Touati A. 2006.** Caractérisation des phénotypes de résistances des entérobactéries aux β -lactamines isolées en milieu hospitalier : cas de deux hôpitaux de la wilaya de Bejaia. Thèse de doctorat. Université A/Mira de Bejaia. pp: 91.
- **Touchene M. et Ghalmi M. 2015.** Isolement, identification et antibiorésistance des souches d'entérobactéries productrices de β -lactamases isolées à partir des urines. Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de master en biologie. Université de Blida 1.
- **Van Alst N.E., Wellington M., Clark V.L., Haidaris C.G. and Iglewski B.H. 2009.** Nitrite reductase NirS is required for type III secretion system expression and virulence in the human monocyte cell line THP-1 by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity* **77** : 4446-4454.
- **Vedel G. 1998.** Lecture interprétative de l'antibiogramme (interprétation phénotypique). In outil d'investigation microbiologique en réanimation. *Edition Arnette*. pp : 183-188.
- **Vodovar D., Marcadé G., Raskine L., Malissin I. and Megarban B. 2012.** Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi : épidémiologie, facteurs de risque et mesures de prévention. *Revue de Médecine Interne*.

- **Wiener, J., Quinn, J.P., Bradford, P.A., Goering, R.V., Nathan, C., Bush, K., and Weinstein, R.A. 1999.** Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. *Journal of the American Medical Association*. 281(6): 517–523.

- **Wiley Joanne M., Sherwood Linda M. and Woolverton Christopher J. 2008.** Prescott, Harley, and Klein's Microbiology -7th ed. New York. pp: 852.

- **Williams E.P., et Cameron K. 1894.** Infection by the *Bacillus Pyocyaneus* a Cause of Infantile Mortality. *Public Health Papers and Reports*. 20: 355-360.

- **Zomahoun C. I. N. P. 2004.** Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées des infections urinaires au laboratoire de bactériologie du centre national hospitalier universitaire – HUBERT KOUTOUKOU MAGA (C.N.H.U.-H.K.M.) DE COTONOU. Faculté de médecine de pharmacie et d'odontostomatologie.

- **Zogheib E. et Dupont H. 2005.** Entérobactéries multirésistantes. *Elsevier SAS*. P : 153-165. Sur le lien : http://www.sfar.org/sfar_actu/ca05/html/ca05_13/ca05_13.htm#94992.

Annexes

Annexe N°1

Antibiotiques testés sur les Bacilles à Gram négatif

Familles d'antibiotiques	Antibiotiques testés	Signes	Charge des disques (µg)
β-Lactamines	Amoxicilline/ Ampicilline	AML/AMP	25
	Amoxicilline + Ac.clavulanique	AMC	20/10
	Ticarcilline	TIC	75
	Ticarcilline + Ac.clavulanique	TCC	75/10
	Pipéracilline	PIP	75
	Céfazoline	CZN	30
	Céfoxitine	FOX	30
	Céfotaxime	CTX	30
	Ceftazidime	CAZ	30
	Imipenème	IMP	10
	Aztréonam	ATM	30
Aminosides	Gentamycine	GN	15
	Amikacine	AKN	30
Sulfamides- Triméthoprimes	Triméthoprime/ Sulfamethoxasole	SXT	1,25/23,75
Autres	Chloramphénicol	C	30
	Fosfomycine	FOS	50
	Colistine	CS	50

Annexe N°2

Matériel de laboratoire et appareillage

Equipements, fournitures et verrerie :

Equipements	Fournitures	Verrerie
<ul style="list-style-type: none"> - Bec bensen - Anse de platine - Seringue - Poire - Pince métallique - Four Pasteur - Four poupinelle - Sécheuse - Etuve d'incubation - Réfrigérateur - Congélateur - Microscope optique - Densitomètre - Agitateur 	<ul style="list-style-type: none"> - Disques d'ATB - Ecouillons en coton stérile. - Boite de Pétrie 90mm de diamètre en plastiques - Cellule Nageotte 	<ul style="list-style-type: none"> - Lame et lamelle - Pipettes Pasteur - Tubes à essai stériles - Tubes secs

Milieux de cultures, colorants et réactifs :

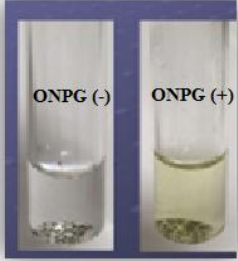
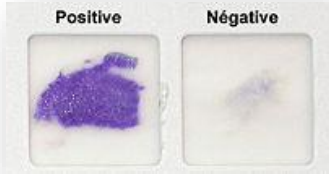
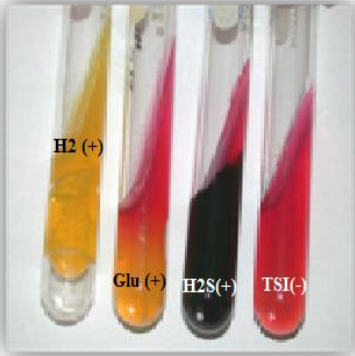
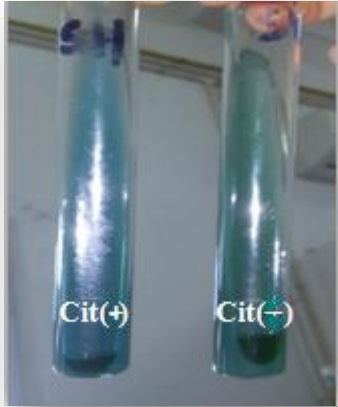
Milieux de cultures	Colorants	Réactifs et solutions
<ul style="list-style-type: none"> - Gélose ordinaire - Gélose Haktoen - Gélose au sang cuit - Gélose au sang frais - Bouillon cœur cerveau BHIB - Milieu Miller Hinton - Mannitol – mobilité - Milieu T.S.I (Triple Sugar Iron) - Milieu au citrate de simmons - Eau peptonée exempt d'indole - Milieu Urée – Tryptophane (Urée-Indole) - Milieu LDC (lysine Décarboxylase) - Milieu ODC (Ornithine- Décarboxylase) - Milieu ADH (Arginine Dihydrolase) - Milieu Clark et Lubs. 	<ul style="list-style-type: none"> - Violet de Gentiane - Lugol - Fushine - Alcool 	<ul style="list-style-type: none"> - Réactifs de VP - Réactifs pour TDA - Réactifs de Kovacs - L'huile à immersion - L'huile de vaseline - Disques d'ONPG (Ortho-Nitro-Phénol- Galactosidase) - Eau physiologique - Eau oxygénée


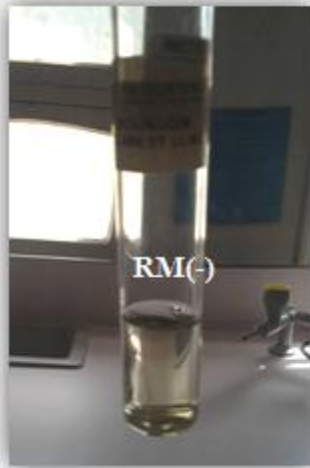
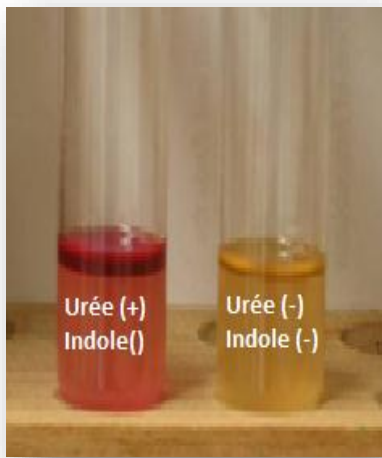
Annexe N°3
Lecture de la galerie miniaturisée Api 20^E

MICROTUBE	REACTION	
	Positive	Négative
ONPG	Jaune	Jaune
ADH	Rouge ou orange	Jaune
LDC	Rouge ou orange	Jaune
ODC	Rouge ou orange	Jaune
CIT	Bleu	Vert
H ₂ S	Dépôt noir	Aucun dépôt
URE	Rouge	Jaune
TDA	Brun-rouge	Jaune
IND	Anneau rouge	Jaune
VP	Rose foncé ou rouge	Incolore
GEL	Diffusion de pigment	Incolore
GLU MAN INO SOR RHA SAC MEL AMY ARA	Jaune	Bleu

Annexe N°4

La galerie biochimique classique

Test	Lecture et interprétation	Illustration
ONPG(Ortho-Nitro-Phenyl pyrano-Galactoside)	-Virage vers le jaune clair: ONPG (+). - Incolore: ONPG (-)	
Oxydase	- Couleur bleu ou violette: Oxydase (+) - Incolore: Oxydase (-)	
Gélose TSI (Three Sugar Iron)	- Culot jaune: Fermentation du Glucose. - Pente jaune: Fermentation du Lactose et Saccharose. - Présence de bulles d'air ou décollement de la gélose: H ₂ (+) -Noircissement du milieu: H ₂ S (+)	
Citrate de Simmons	-Croissance bactérienne et virage au bleu: Citrate (+) -Absence de croissance et le milieu reste vert: Citrate (-)	

<p>Métabolisme protéique : LDC, ODC et ADH</p>	<p>Si le témoin vire au jaune, continuer la lecture.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Coloration violette du tube: réaction positive. - Coloration jaune du milieu: réaction négatives. <p>Si le témoin reste violet, refaire le test.</p>	
<p>Clak et Lubs</p>	<p>Test RM: après l'ajout du RM</p> <ul style="list-style-type: none"> - Milieu rouge: RM(+) - Milieu reste jaune: RM(-). <p>Test VP: après l'ajout du VP1 et VP2 avec agitation</p> <ul style="list-style-type: none"> - Apparition d'une couleur brune rouge: VP+, sinon VP(-). 	
<p>Urée Indole (ou urée tryptophane)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Virage de la couleur au rose fuschia : Uréase (+), sinon : Uréase (-) <p>1^{er} tube, après ajout du Kovacs :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Apparition d'anneau rouge : Indole(+), sinon: Indole(-) <p>2^{ème} tube, après ajout du TDA:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Couleur brun rouge: TDA(+), sinon TDA(-). 	

Annexe N°5

Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Entérobactéries*
(Rahal et al., 2011).

Antibiotiques testés	Charge des Disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)		
		R	I	S	R	I	S
Ampicilline	10µg	≤ 13	14 – 16	≥ 17	≥ 32	16	≤ 8
Amoxicilline +Ac.clavulanique	20/10µg	≤ 13	14 – 17	≥ 18	≥ 32/16	16/8	≤ 8/4
Céfazoline	30µg	≤ 19	20 – 22	≥ 23	≥ 8	4	≤ 2
Céfalotine	30µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Cefoxitine	30µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Céfotaxime	30µg	≤ 22	23 – 25	≥ 26	≥ 4	2	≤ 1
Ceftriaxone	30µg	≤ 19	20 – 22	≥ 23	≥ 4	2	≤ 1
Imipénème/Meropénème	10µg	≤ 19	20 - 22	≥ 23	≥ 4	2	≤ 1
Ertapénème	10µg	≤ 19	20 - 22	≥ 23	≥ 1	0,5	≤ 0,25
Amikacine	30µg	≤ 14	15 – 16	≥ 17	≥ 64	32	≤ 16
Gentamicine	10µg	≤ 12	13 – 14	≥ 15	≥ 16	8	≤ 4
Acide nalidixique	30µg	≤ 13	14 – 18	≥ 19	≥ 32	---	≤ 16
Ciprofloxacine	5µg	≤ 15	16 – 20	≥ 21	≥ 4	2	≤ 1
Chloramphénicol	30µg	≤ 12	13 – 17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Colistine	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Furanes	300µg	≤ 14	15 – 16	≥ 17	≥ 128	64	≤ 32
Fosfomycine	200µg	≤ 12	13 – 15	≥ 16	≥ 256	128	≤ 64
Triméthoprim+ Sulfaméthoxazole	1.25/23.75µg	≤ 10	11 – 15	≥ 16	≥ 4/76	-----	≤ 2/38

Annexe N°6

Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Pseudomonas aeruginosa*. (Rahal et al., 2011).

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)		
		R	I	S	R	I	S
Ticarilline	75 µg	14	---	15	128	----	64
Ticarilline + ac.clavulanique	75/10µg	14	---	15	128/2	----	64/2
Pipéracilline	100 µg	17	---	18	128	----	64
Ceftazidime	30 µg	14	15 – 17	18	32	16	8
Aztréonam	30 µg	15	16 – 21	22	32	16	8
Imipénème	10 µg	13	14 – 15	16	16	8	4
Amikacine	30 µg	14	15 – 16	17	64	32	16
Gentamicine	10 µg	12	13 – 14	15	16	8	4
Nétilmicine	30 µg	12	13 – 14	15	32	16	8
Tobramycine	10 µg	12	13 - 14	15	16	8	4
Ciprofloxacine	5µg	15	16 - 20	21	4	2	1
Lévofloxacine	5µg	13	14 - 16	17	8	4	2
Fosfomycine **	50µg + 50µg G6P	< 14	-----	≥ 14	> 32	----	≤ 32
Rifampicine **	30 µg	< 14	14 - 18	≥ 19	> 16	16-8	≤ 4
Colistine	10µg	10	-----	11	8	4	2

Annexe N°7

Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Acinetobacter spp.* (Rahal et al., 2011).

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)		
		R	I	S	R	I	S
Ticarcilline	75 µg	14	15 - 19	20	128	32-64	16
Ticarcilline + ac.clavulanique	75/10µg	14	15 - 19	20	128/2	32/2-64/2	16/2
Pipéracilline	100 µg	17	18 – 20	21	128	32-64	16
Céftazidime	30 µg	14	15 – 17	18	32	16	8
Imipénème	10 µg	13	14 - 15	16	16	8	4
Amikacine	30 µg	14	15 – 16	17	64	32	16
Gentamicine	10 µg	12	13 – 14	15	16	8	4
Tobramycine	10 µg	12	13 – 14	15	16	8	4
Nétilmicine	CMI	----	-----	-----	32	16	8
Ciprofloxacine	5µg	15	16 – 20	21	4	2	1
Lévofloxacine	5µg	≤ 13	14 – 16	≥ 17	≥ 8	4	≤ 2
Doxycycline	30µg	9	10 – 12	13	16	8	4
Triméthoprim+ sulfaméthoxazole	1.25/23.75µg	10	11 – 15	16	4/76	-----	2/38
Colistine	-----	-----	-----	-----	> 2		2
Rifampicine**	30µg	<14	14 – 18	≥19	> 16	16-8	≤ 4