

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie et de la Physiologie Cellulaire  
LABORATOIRE DE RECHERCHE : BIOTECHNOLOGIES, ENVIRONNEMENT  
ET SANTE

Mémoire de Fin d'Etudes  
Pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie  
Option : « Microbiologie »

Thème :

**Isolement et identification des souches d'entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) et évaluation de leur sensibilité vis-à-vis des antibiotiques et d'un extrait de *Quercus ilex.L.***

Soutenu le : 12/09/2020.

Réalisé et présenté par :

M<sup>elle</sup> Abbas Asma

M<sup>elle</sup> Guerbi Ibtissam

M<sup>me</sup> Khalladi Manar

Devant le jury :

M<sup>me</sup> HAMAIDI F.

Professeur

Université de Blida 1

Présidente

M<sup>me</sup> MOHAMMED MAHMOUD F.

M.C.B

Université de Blida 1

Examinatrice

M<sup>me</sup> DEBIB A.

M.C.A

Université de Tipaza

Promotrice

Année 2019-2020

## *Remerciements*

Avant tous nous remercions **Dieu** le tout Puissant de nous avoir guidés toutes ces années d'étude car il nous a donné la volonté, la patience, la santé et le courage pour terminer ce travail.

Tous d'abord, nous remercions chaleureusement notre promotrice **Mme DEBIB.A** sans qui ce travail n'aurait pas vu le jour. Pour l'honneur qu'elle nous a fait en dirigeant ce travail, de nous avoir permis de travailler sur un projet des plus intéressants, ainsi que ses suggestions à améliorer la qualité de ce mémoire, pour tous ses conseils et ses encouragements, pour la disponibilité aux moments les plus difficiles, sa sympathie, sa simplicité et sa patience et ces remarques pertinentes et éclairées. Soyez rassuré de notre profonde gratitude et notre respectueuse considération vos qualités scientifiques et humaines resteront à jamais pour nous l'exemple.

Nos vifs remerciements vont pour les membres du jury.

A **Mme Hamaidi F.** de nous avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de ce travail.

A **Mme Mohammad Mahmoud F.** d'avoir accepté de participer d'examiner ce travail de l'enrichir par ses propositions

Nous leur témoignons toute notre gratitude.

Nous tient également à remercier Amou Djamel, un grand merci pour son aide scientifique et ces orientations qui nous ont permis de progresser dans la réalisation de cette étude, merci pour ses encouragements et son amitié.

Enfin, Nous n'oublions pas aussi d'exprimer nos remerciements à tous amis, nos collègues et à tous les personnes qui ont participés de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## *Dédicace*

*Avec l'aide d'Allah le tout Puissant, j'ai pu achever ce modeste travail que je dédie :*

*A mes chers parents, mon père ABBAS NOURREDINE et ma mère FARIDA.*

*Symbole de reconnaissance et de remerciement sur tout ce qu'ils m'ont donné dans ma vie et leur exprime ma profonde gratitude pour leur soutien moral et financier ainsi pour leurs encouragements durant tout mon parcours vers un avenir meilleur, je dédie ce travail en gage de mon amour et mon respect les plus profonds*

*A mes chères sœurs ma jumelle SALMA, SAFIA et KHAOULA, qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail, merci pour votre présence.*

*J'espère avoir été à la hauteur de vos estime.*

*A ma grande mère que dieu la garde.*

*A toute la famille paternelle et maternelle, et à ce qui me donnent de l'amour et de vivacité.*

*A mes chers trinômes, IBTISSAM et MANAR et à toutes ses familles, avec qui j'ai partagé les meilleurs moments, qui m'ont beaucoup aidé, à qui je dis bon courage et bon continuation.*

*A tous mes amies qui m'ont toujours encouragé et à qui je souhaite plus de succès.*

***ASMA***

## *Dédicace*

*Avec l'aide d'Allah le tout Puissant, j'ai pu achever ce modeste travail que je dédie :*

*A mon grand-père que j'aurais aimé qu'il soit parmi nous, que dieu l'accueille dans son paradis.*

*A mon père AHMED et ma mère MESSAOUDA,*

*Symbole de reconnaissance et de remerciement sur tout ce qu'ils m'ont donné dans ma vie et leur exprime ma profonde gratitude pour leur soutien moral et financier ainsi pour leurs encouragements durant tout mon parcours vers un avenir meilleur, je dédie ce travail en gage de mon amour et mon respect les plus profonds*

*A mes sœurs SAFIA, HAFSA et mon frère HOUSSEM, qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail, merci pour votre présence. J'espère avoir été à la hauteur de vos estimations.*

*A mon grand-père et mes grande mère que dieu les garde.*

*A toute la famille GUERBI, et à ce qui me donnent de l'amour et de vivacité.*

*A mes chers trinômes, ASMA et MANAR et à toutes ses familles, avec qui j'ai partagé les meilleurs moments, qui m'ont beaucoup aidé, à qui je dis bon courage et bon continuation.*

*A tous mes amis qui m'ont toujours encouragé et à qui je souhaite plus de succès.*

**IBTISSAM**

## *Dédicace*

*Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est tout simplement que : je dédie cette thèse à :*

*Ma Mère YAMINA : Tu présentes pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.*

*Mon Père RACHID : Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours pour vous. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation le long de ces années.*

*Mon mari MALIK : Aucun mot ne saurait t'exprimer mon profond attachement et ma reconnaissance pour l'amour, la tendresse et la gentillesse dont tu m'as toujours entouré. Je te remercie pour ton soutien moral, ton aide m'ont permis de réussir mes études.*

*Ma petite fille BAYLASSEN : je te remercie d'avoir été gentil et patient durant mes nuits d'études, je t'aime énormément.*

*A Mes chers frères : DIRAR et AYMEN, et mes belles sœurs : NOURHENE et RAWNEK je vous remercie pour vos encouragements, votre soutien et je vous souhaite tous ce qu'il y a de meilleur.*

*A Ma belle-famille surtout ma tante FATMA je vous remercie tout particulièrement pour votre soutien et affection. Puissiez – vous trouver dans ce travail le témoin de mon affection et estime.*

*A Mes très chers binôme ASMA et IBTISSEM et A ces familles je vous remercie pour votre amitié, je vous souhaite tout le bonheur de monde.*

*A tous mes chers amis*

**MANAR**

## Résumé

Les entérobactéries productrices de bêtalactamases à spectre étendu sont les plus isolées au niveau des hôpitaux. Ces bêtalactamases sont capables de détruire le noyau des bêtalactamines et d'inactiver leur effet bactéricide. Notamment avec l'émergence récente ces dernières années, de nouveaux types de BLSE responsables d'infections nosocomiales et communautaires. Cette émergence est devenue aujourd'hui un problème de santé publique qui affecte de nombreux pays. L'objectif de notre étude était d'isoler et d'identifier les entérobactéries productrices de bêtalactamases à spectre étendu (EBLSE) en premier lieu et d'étudier leur sensibilité vis-à-vis des antibiotiques et des extraits naturels des feuilles de chêne vert (*Quercus ilex*) en second lieu, mais à cause de la pandémie COVID-19 on n'a pas pu terminer notre partie expérimentale et les résultats discutés dans ce mémoire sont des résultats des travaux antérieurs. Nous avons pu isoler et identifier que 5 souches d'entérobactéries à partir de 35 prélèvements, ces prélèvements sont issus d'un laboratoire d'analyse médicale privé de Blida et ils ont été analysés au niveau du laboratoire d'hygiène de Blida. Selon les études antérieures, *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* constituent les EBLSE les plus isolées au niveau des hôpitaux et la résistance de ces souches aux bêta-lactamines est croisée avec d'autres familles d'antibiotiques. Concernant l'effet antibactérien des extraits de feuilles de *Quercus ilex* peu d'études ont été consacrées à évaluer leur sensibilité vis-à-vis des EBLSE, mais il faut noter que ces extraits sont riches en composés phénoliques et sont caractérisés par un effet antibactérien à large spectre.

### Mots clés :

Entérobactéries, bêtalactamases, EBLSE, *Quercus ilex*, composés phénoliques, activité antibactérienne.

## **Abstract**

Enterobacteriaceae producing extended-spectrum betalactamases are the most isolated at the hospital level. These betalactamases are capable of destroying the nucleus of betalactamines and inactivating their bactericidal effect. Notably with the recent emergence in recent years of new types of ESBLs responsible for nosocomial and community infections. This emergence has now become a public health problem affecting many countries. The objective of our study was to isolate and identify extended spectrum beta-lactamase producing enterobacteria (EBLSE) in the first place and to study their sensitivity to antibiotics and natural extracts of holm oak (*Quercus ilex*) leaves in the second place, but due to the COVID-19 pandemic we were not able to complete our experimental part and the results discussed in this paper are results of previous work. We were able to isolate and identify 5 strains of enterobacteria from 35 samples, these samples were taken from a private medical analysis laboratory in Blida and analysed in the Blida Hygiene Laboratory. According to previous studies, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* are the most isolated EBLSEs at hospital level and the beta-lactam resistance of these strains is cross-referenced with other families of antibiotics. Concerning the antibacterial effect of *Quercus ilex* leaf extracts, few studies have been devoted to evaluating their sensitivity to EBLSE, but it should be noted that these extracts are rich in phenolic compounds and are characterised by a broad-spectrum antibacterial effect.

### **Key words:**

Enterobacteriaceae, betalactamases, EBLSE, *Quercus ilex*, phenolic compounds, antibacterial activity.

## ملخص

تعد البكتيريا المعوية المنتجة لإنزيم بيتالاکتامااز واسعة الطيف هي الأكثر عزلة في المستشفيات. هذه *betalactamases* قادرة على تدمير نواة *betalactamines* وتعطيل تأثيرها للجراثيم. خاصة مع ظهورها الكثير في السنوات الأخيرة لأنواع جديدة من *ESBLs* المسؤولة عن العدوى داخل المستشفيات وخارجها. لقد أصبح هذا الظهور اليوم مشكلة صحية عامة تؤثر على العديد من البلدان. كان الهدف الأول من دراستنا هو العزل والتعرف على البكتيريا المعوية المنتجة للبيتالاکتامااز (*EBLSE*) ودراسة حساسيتها للمضادات الحيوية والمستخلصات الطبيعية من أوراق البلوط (*Quercus ilex*) ثانيًا ، ولكن بسبب وباء *COVID-19* لم تتمكن من إكمال الجزء التجريبي والنتائج التي تمت مناقشتها في هذه الأطروحة هي نتائج لدراسات سابقة. تمكنا من عزل وتحديد 5 سلالات فقط من البكتيريا المعوية من 35 عينة تم أخذها من مخبر التحاليل الطبية الخاص المتواجد في البلدة وتم تحليلها على مستوى معمل النظافة بالبلدة. وفقاً للدراسات السابقة ، تشكل *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumoniae* أكثر أنواع *EBLSEs* عزلاً على مستوى المستشفيات ، وتتقاطع مقاومة هذه السلالات تجاه بيتا لاکتام مع عائلات أخرى من المضادات الحيوية. فيما يتعلق بالتأثير المضاد للبكتيريا لمستخلصات أوراق *Quercus ilex* ، فقد تم تخصيص القليل من الدراسات لتقييم حساسيتها تجاه *EBLSEs* ، ولكن تجدر الإشارة إلى أن هذه المستخلصات غنية بالمركبات الفينولية وتتميز بتأثيرها المضاد ذات الطيف الواسع للبكتيريا.

### الكلمات المفتاحية :

- المركبات الفينولية – النشاط المضاد للبكتيريا- *EBLSE -Quercus ilex* – بيتالاکتامااز – *Entérobactéries*



## Liste des abréviations

**GLASS** : Global Antimicrobien Resistance Surveillance.

**EBLSE** : Entérobactéries productrices de Bêtalactamase à spectre étendu.

**API 20<sup>E</sup>** : Analytical Profile Index 20 (E= Entérobactéries).

**BGN** : Bacille à Gram Négatif.

**SNC** : Système Nerveux Central.

**C3G** : Céphalosporine de troisième génération.

**SHV** : Sulfhydrile variable.

**CTX-M** : Céfotaximase-Munich.

**KPC** : *Klebsiella pneumoniae* Carbapénémase.

**OXA** : Oxacilline.

**NDM** : Nordmann.

**TEM** : Temoneira- nom du patient.

**MS** : Matière Sucrée.

**MG** : Matière Grasse.

**CRAPC** : Centre de Recherche Scientifique et Technologique en Analyse Physicochimique.

**ATCC**: American Type Culture Collection.

**SS** : Milieu Salmonella-Shigella.

**EMB** : Eosine Bleu de Méthylène.

**CIT** : Citrate.

**VP** : Réaction de Voges-Proskauer.

**GEL** : Gélatinase.

**ADH** : Arginine déshydrogénase.

**LDC** : Lysine décarboxylase.

**ODC** : Ornithine décarboxylase.

**TDA** : Tryptophane désaminase.

**MF** : Mac Frland.

**CLSI**: Clinical and Laboratory Standards institute.

**CMT** : Complexe Mutans TEM.

**DMSO** : Diméthylesulfoxyde.

**H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>4</sub>** : acide phosphotungstique.

**H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>4</sub>**: Acide phosphomolybdique.

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** : Carbonate de Sodium.

## Liste des figures

<b>Figure 01:</b>	Structure chimique des principaux bêta-lactamines.....	08
<b>Figure 02:</b>	Mode d'action des bêtalactamines.....	09
<b>Figure 03:</b>	Mécanismes de résistance aux antimicrobiens chez les entérobactéries.....	10
<b>Figure 04:</b>	Hydrolyse des pénicillines et des céphalosporines par les bêtalactamases.....	11
<b>Figure 05:</b>	Distribution géographique du chêne vert ( <i>Quercus ilex l.</i> ) en Algérie.....	15
<b>Figure 06:</b>	Les différentes appellations de <i>Quercus ilex l.</i> .....	16
<b>Figure 07:</b>	Les différentes parties de l'arbre de <i>Quercus ilex l.</i> .....	17
<b>Figure 08:</b>	Chromatogramme HPLC de l'extrait méthanolique de <i>Quercus ilex</i> .....	24
<b>Figure 09:</b>	Représentation d'une feuille de <i>Quercus ilex l.</i> .....	28
<b>Figure 10:</b>	Aspect des urines selon la turbidité.....	29
<b>Figure 11:</b>	Protocole expérimental pour l'évaluation de l'activité antibactérienne.....	30
<b>Figure 12:</b>	Localisation du site d'échantillonnage .....	37
<b>Figure 13:</b>	Echantillons d'urines analysés.....	39
<b>Figure 14:</b>	Aspect macroscopique des souches isolées.....	41
<b>Figure 15:</b>	Aspect microscopique d' <i>Escherichia coli</i> après coloration de Gram, (A) grossissement 40X et (B) grossissement 100X.....	42
<b>Figure 16:</b>	Résultat de la microgalerie API 20 E des souches isolées avant l'ensemencement (B) <i>Klebsiella pneumoniae</i> , (C) <i>Escherichia coli</i> .....	43
<b>Figure17 :</b>	Fréquence d'isolement des entérobactéries.....	43
<b>Figure18 :</b>	Répartition des entérobactéries selon le sexe.....	44
<b>Figure19 :</b>	Répartition des entérobactéries selon l'âge.....	45
<b>Figure20 :</b>	Répartition des entérobactéries selon la nature de prélèvement.....	45
<b>Figure21 :</b>	Répartition des entérobactéries selon l'espèce.....	46
<b>Figure 22:</b>	Prévalence des EBLSE(+) selon les études précédentes.....	50
<b>Figure 23:</b>	Prévalence des EBLSE selon le sexe.....	51
<b>Figure 24:</b>	Prévalence des EBLSE selon l'âge.....	52
<b>Figure 25:</b>	Répartition des EBLSE selon l'espèce.....	55

## Liste des tableaux

<b>Tableau I :</b>	Les caractères biochimiques de différentes souches.....	04
<b>Tableau II :</b>	Surfaces forestières occupées par le chêne vert dans quelque pays.....	14
<b>Tableau III :</b>	Les structures des phénols isolés à partir des feuilles de <i>Quercus ilex L</i> .....	19
<b>Tableau IV :</b>	Contenu en composés phénoliques et en acide ascorbique dans l'extrait des feuilles de <i>Quercus ilex</i> .....	22
<b>Tableau V :</b>	Composés phénoliques déterminés par HPLC-TOF/MS dans l'extrait de <i>Quercus ilex</i> .....	23
<b>Tableau VI :</b>	Diamètres des zones d'inhibition de l'extrait des feuilles de <i>Quercus ilex</i> vis- à-vis des souches d'entérobactéries.....	25
<b>Tableau VII:</b>	Les valeurs CMI ( $\mu\text{g/mL}$ ) de l'extrait des feuilles de <i>Quercus ilex</i> vis-à-vis les souches d'entérobactéries.....	26
<b>Tableau VIII:</b>	Couleurs de l'urine à l'état normal et pathologique.....	31
<b>Tableau IX :</b>	Description de différentes colonies isolées.....	40
<b>Tableau X :</b>	Répartition des entérobactéries selon l'espèce.....	46
<b>Tableau XI :</b>	Prévalence des EBLSE(+) selon les études précédentes.....	46
<b>Tableau XII :</b>	Comparaison de pourcentage des EBLSE entre trois types de prélèvements....	53
<b>Tableau XIII :</b>	Comparaison de pourcentage des EBLSE entre les trois services.....	54
<b>Tableau XIV :</b>	Comparaison des pourcentages de résistances des EBLSE.....	56

## Glossaire

- **L'extraction** : est une technique de séparation en génie chimique. Cette technique utilise un moyen d'extraction pour séparer sélectivement un ou plusieurs composés d'un mélange sur la base de propriétés chimique ou physiques (**Eckart, 2008**).
- **Les composés phénoliques ou poly phénols** : sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines e bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits(**Ribéreau G P et al., 1968**).
- **Le réactif de Folin Ciocalteu** : est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (**Ribéreau G P et al., 1968**).
- **Les flavonoïdes** : Le nom flavonoïde proviendrait du terme « flavedo », désignant la couche externe des écorces d'orange (**Piquemal., 2008**), cependant d'autres supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du « flavus » qui signifie jaune, (flavus=jaune) (**Karaali et al ., 2004 ; Malešev et Kuntić ., 2007**). c'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques, qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles.
- **L'HPLC** : signifie chromatographie liquide haute pression (le terme haute performance est également employé). Elle se distingue des systèmes classiques par une augmentation de la vitesse d'échange entre phase solide et liquide et l'accroissement du nombre des plateaux théoriques (**Audigié et al ., 1995**).
- **Evaporateur rotatif** : est un appareil de laboratoire utilisé généralement en chimie organique pour évaporer rapidement des solvants après avoir été utilisés dans une extraction ou dans un milieu réactionnel .Le plus souvent , l'évaporation du solvant est menée sous pression réduite (afin d'accélérer l'étape)que l'on obtient au moyen d'une trompe à eau ou d'une pompe à vide .L'évaporateur rotatif est souvent appelé , par abus de langage , Rotavapor ou "Büchi "(noms de deux marques très courantes )  
**Science amusante (2012) .**
- **Le DMSO** ou diméthylsulfoxyde : est une molécule organique très polaire qui forme un liquide peu volatil .Fortement hygroscopique, il est soluble à la fois dans l'eau et

dans la plupart des solvants. Il solubilise de nombreux composés organiques, y compris certaines résines et polymères, et certains composés inorganiques. (**Denis et al ., 2002**).

# Table de matière

Remerciements

Dédicaces

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Glossaire

Introduction ..... 01

## Chapitre I : Synthèse bibliographique

**I-Les entérobactéries productrices de bêtalactamases à spectre étendu(BLSE)..... 03**

I-1- Définition des entérobactéries ..... 03

I-1-1- Caractères morphologiques..... 03

I-1-2- Caractères culturels..... 03

I-1-3- Caractères biochimiques..... 04

I-1-4- Caractères antigéniques..... 05

I-2-Principales entérobactéries d'intérêt clinique..... 06

I-2-1-*Escherichia coli* ..... 06

I-2-3-*Salmonella* ..... 06

I-2-4-*Shigella* ..... 06

I-2-5- *Citrobacter freundii* ..... 06

I-2-6- *Klebsiella, Enterobacter, Serratia* ..... 07

I-2-7- *Proteus-Morganella-Providencia*..... 07

I-3- Les  $\beta$ -lactamines..... 08

- Mode d'action des bêtalactamines..... 08

I-4- Mécanismes de résistance aux  $\beta$ - lactamines..... 09

I-5- Définition des BLSE..... 10

I-6- Historique des BLSE..... 11

I-7- Classification des BLSE..... 12

**II- Généralités sur *Quercus ilex l.*..... 14**

II-1- Origine et répartition géographique.....	14
II-2- Systématique et nomenclature.....	16
II-3- Description botanique.....	17
II-4- Valeurs nutritives et usage.....	18
II-4-1- Composition chimique .....	18
II-4-2- Utilisation médicinale.....	18
II-4-3- Les composants bioactifs de <i>Quercus ilex l</i> .....	19
II-5- Extraction des composés phénoliques.....	20
II-5-1- Dosage des polyphénols totaux.....	21
II-5-2- Contenu en flavonoïdes.....	21
II-5-3- Analyse HPLC.....	23
II-6- Etude de l'activité antibactérienne des extraits de feuilles de <i>Quercus ilex L</i> .....	24
<b>Chapitre II : Matériel et méthodes .....</b>	<b>27</b>
II-1- Objectifs.....	27
II-2- Centre et durée de l'étude .....	27
II-3- Matériel.....	27
II-3-1- Matériel biologique.....	27
II-3-2- Matériel non biologique.....	28
II-4- Méthodes .....	28
II-4-1- Examen macroscopique.....	28
II-4-2- Mise en culture .....	32
II-4-3- Isolement et identification .....	33
➤ Urine .....	33
➤ Les selles.....	34
II-4-5- Identification biochimique .....	34
II-4-6- les tests complémentaires.....	35
II-5- Extraction des polyphénols de <i>Quercus ilex l</i> .....	37
II-5-1- Echantillonnage.....	37
II-5-2- préparation et conservation du matériel végétal.....	37
<b>Chapitre III : Résultats et discussion .....</b>	<b>39</b>
III-1-Résultats de notre étude.....	39
III-1- 1- Examen macroscopique des souches isolées.....	39
III-1-2- l'observation de l'état frais et coloration de Gram.....	41

III-1-3- Identification biochimique.....	42
III-1-4- Fréquence d'isolement des entérobactéries.....	43
III-1-5- Répartition des entérobactéries selon le sexe.....	44
III-1-6- Répartition des entérobactéries selon l'âge.....	44
III-1-7- Répartition des entérobactéries selon la nature de prélèvement.....	45
III-1-8- Répartition des entérobactéries selon les espèces.....	46
III-2- Analyse détaillée des études antérieures.....	46
III-2-1- Prévalence des souches d'entérobactéries BLSE(+) par étude.....	50
III-2-2- Prévalence des EBLSE selon le sexe.....	51
III-2-3- Prévalence des EBLSE selon l'âge.....	52
III-2-4- Prévalence des EBLSE selon la provenance.....	53
✚ La prévalence des EBLSE selon la nature de prélèvement.....	53
✚ La prévalence des EBLSE selon l'origine des patients.....	54
✚ Prévalence des EBLSE selon la répartition des espèces.....	54
III-2-5- Résistance des souches EBLSE aux antibiotiques.....	56
<b>Conclusion.....</b>	<b>58</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>59</b>
<b>Annexe.....</b>	<b>75</b>



# **Introduction générale**

Depuis leur découverte en 1928, Les antibiotiques ont permis de faire considérablement reculer la mortalité associée aux maladies infectieuses au cours du XXe siècle. Cependant, le monde microbien a rapidement fait la preuve de son immense aptitude à évoluer, et les bactéries ont acquis de nombreux types de mécanismes de résistance (**Lagha, 2015**). En effet, son usage abusif ou excessif a accéléré le phénomène de la résistance, de même que de mauvaises pratiques de prévention et de lutte contre l'infection.

L'Organisation Mondiale de la Santé a ainsi dédié en 2011 la journée mondiale de la santé à la résistance aux antibiotiques, avec pour titre "pas d'action aujourd'hui, pas de traitement demain". L'O.M.S a aussi mis à la disposition des pays un système mondial de surveillance de la résistance aux antimicrobiens, intitulé « GLASS » (Global Antimicrobial Resistance Surveillance). Ce système permet de partager les données de chaque pays au niveau mondial (**AARN, 2019**).

Des estimations alarmantes émises dans le rapport du secrétariat d'État du Royaume-Uni en 2016 faisaient état de 10 millions de morts par an dans le monde à l'horizon 2050 en l'absence de mesures adaptées. L'antibiorésistance pourrait ainsi devenir la première cause de décès dans le monde devant les cancers (8,2 millions de décès), le diabète (1,5 millions de décès), les diarrhées (1,4 millions de décès), et les accidents de la route (1,2 millions de décès) (**O'Neill, 2016**).

Parmi les bactéries les plus résistantes on distingue les entérobactéries productrices de bêtalactamases à spectre étendu (EBLSE). Selon le 19ème Rapport d'évaluation du Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des bactéries aux antibiotiques, le taux des EBLSE était environ 27,66 % en 2017 (**AARN, 2019**). Ceci exprime un besoin urgent pour la recherche de nouvelles molécules antibactériennes et l'implantation d'un système de surveillance efficace pour lutter contre cette émergence alarmante.

Dans le cas des espèces de la famille des *Enterobacteriaceae*, la résistance bactérienne aux bêta-lactamines est due principalement à la production d'enzymes (bêta-lactamases) capables d'hydrolyser l'anneau bêta-lactame commun à cette classe d'antibiotiques (pénicillines, céphalosporines, monobactams, carbapénèmes. La répartition de ces enzymes est aujourd'hui mondiale (**Giani et al., 2017 ; Van Hout, 2020**).

Les infections causées par les souches productrices de BLSE sont associées à une morbidité et une mortalité élevée (on estime à 700000 par an le nombre de décès suite aux infections résistantes aux antibiotiques), à une prolongation de la durée de l'hospitalisation et à une augmentation des coûts d'hospitalisation (**Chanoine, 2012 ; Doit et al., 2010**).

L'usage d'extraits de plantes contenant des constituants bioactifs est devenu une approche très importante dans la médecine préventive, recommandée d'ailleurs par l'OMS. Les composés phénoliques issus des végétaux génèrent actuellement beaucoup d'intérêt en raison de leur activité antibactérienne prononcée vis-à-vis des souches sensibles et résistantes aux antibiotiques. En plus de leur action directe sur les bactéries, les polyphénols sont capables d'inhiber les systèmes de résistances aux antibiotiques (**Hatano et al., 2008 ; Hemaiswarya et al., 2008**).

Dans ce contexte s'inscrit notre étude qui vise à faire l'état des lieux des infections dues aux EBLSE au niveau du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida, où nous avons fixé les objectifs suivants :

1. Isolement et identification des souches d'entérobactéries à partir de différents types de prélèvements.
2. Etude de la prévalence des souches d'EBLSE.

Mais malheureusement à cause de la pandémie de Covid-19, on n'a pas pu terminer la réalisation des objectifs suivants :

- 1- Évaluation de la sensibilité des souches isolées *vis-à-vis* des antibiotiques.
- 2- Extraction et dosage des polyphénols des extraits de feuilles de *Quercus ilex L.*
3. Évaluation de la sensibilité des souches isolées *vis-à-vis* des extraits préparés.
4. Recherche d'un éventuel effet synergétique entre les extraits préparés et les antibiotiques testés.

**Chapitre I**  
**Synthèse Bibliographique**

## I- Les entérobactéries productrices des $\beta$ - lactamases à spectre étendu (BLSE)

### I-1- Généralités :

Les entérobactéries forment une vaste famille de bactéries Gram-négatif, qui sont à l'origine de maladies de gravité très variable, en raison de mécanismes pathogéniques distincts. Elles sont souvent responsables d'infections urinaires, pulmonaires, de septicémies mais également d'autres infections intra-abdominales (**Paterson, 2006**).

Les espèces qui composent la famille des entérobactéries sont en effet soit parasites (*Shigella*, *Yersinia pestis*), soit commensales (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*), soit saprophytes (*Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*) (**Gadou, 2019**).

#### I-1-1- Caractères morphologiques

Les entérobactéries sont des bacilles ayant en moyenne 2 à 3  $\mu\text{m}$  de longueur et 0.6 $\mu\text{m}$  de largeur. Ces dimensions varient selon l'âge de la culture, l'espèce, voir la souche. Elles sont généralement mobiles par ciliature péri triches. Certaines entérobactéries peuvent produire des exo-polysaccharides à leurs surfaces qui forment soit une capsule, soit une couche visqueuse fluides appelée « slim » (**Costeron, 1981**).

Quelques-unes possèdent une capsule visible au microscope et la plupart des espèces pathogènes pour l'homme possèdent des fimbriae ou pili qui sont des facteurs d'adhésion (**Drame, 2001 ; Bakhoum, 2004**).

#### I-1-2- Caractères culturels :

Les entérobactéries se développent rapidement in vitro sur des milieux ordinaires en aéro-anaérobiose. La température optimale de croissance est de 37°C mais la culture est possible entre 20 et 40°C. Leurs exigences nutritionnelles sont, en général, réduites et la plupart se multiplient en milieu synthétique avec une source de carbone simple comme le glucose. Sur milieux gélosées, les colonies d'entérobactéries sont habituellement lisses, brillantes, de structure homogène (Type « smooth » ou S). Cet aspect peut évoluer après cultures successives pour donner des colonies à surface sèche rugueuse (type « rough » ou R). Les *Klebsiella* forment des colonies souvent très muqueuses, larges et luisantes. Les *Proteus* tendance à envahir la gélose et à y former un tapis uniforme. En milieu liquide, les

entérobactéries occasionnent un trouble uniforme du bouillon (Morice, 2003 ; Avril et al., 2000 ; Decoster, 2005).

### I-1-3-Caractères biochimiques

Les entérobactéries sont : chimio-organotrophes, fermentent le glucose (avec ou sans production de gaz), possèdent à la fois un métabolisme respiratoire et fermentatif. (Bourjilat, 2009).

Malgré leur diversité enzymatique, ces bactéries possèdent en commun les caractères biochimiques suivants :

- Oxydase négative
- Catalase positive
- Nitrate réductase positive
- Fermentation du glucose avec ou sans gaz (glucose +)

L'identification par des techniques de biologie moléculaire n'est pas encore à la portée de tous les laboratoires. La recherche des caractères généraux de la famille et la recherche des caractères biochimiques demeurent les moyens d'identification couramment mis en œuvre. C'est dans le domaine des *Enterobacteriaceae* que l'évolution technologique a été la plus importante en bactériologie médicale. L'ère des galeries d'identification en tubes est quasi révolue en pratiques quotidienne pour faire place à celle des galeries miniaturisées (système API) (Ait Kaci, 2019).

**Tableau I** : les caractères biochimiques de différentes souches.

	<i>Esch</i>	<i>Citro</i>	<i>Entero</i>	<i>Kleb</i>	<i>Serr</i>	<i>Salm</i>	<i>Shig</i>	<i>Prot</i>	<i>Prov</i>	<i>Yers</i>	<i>Morg</i>
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	+	-	+/-	-	-	+	-
Indole	+	-	-	+/-	-	-	+/-	+/-	+	+/-	+
VP	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
Citr	-	+	+	+	+	+/-	-	+/-	+	-	-
Mob	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
Urée	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
TDA	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+

H <sub>2</sub> S	-	+/-	-	-	-	+	-	+/-	-	-	+
------------------	---	-----	---	---	---	---	---	-----	---	---	---

ONPG = Ortho NitroPhényl Galactoside ; VP = VogesProskauer ; Citr = citrate ; Mob = mobilité ; TDA = Tryptophane désaminase ; H<sub>2</sub>S = Hydrogène sulfureux ; *Esch* = Escherichia ; *Citro* = Citrobacter ; *Entero* = Enterobacter ; *Kleb* = Klebsiella ; *Serr* = Serratia ; *Salm* = Salmonella ; *Shig* = Shigella ; *Prot* = Proteus ; *Prov* = Providencia ; *Yers* = Yersinia ; *Morg* = Morganella ; (+) = positif ; (+/-) = variable ; (-) = négatif (**Decoster et Lahieu, 2006**).

#### I-1-4-Caractères antigéniques

Les entérobactéries possèdent différents antigènes.

- **Antigène de Kunitz ou Enterobacterial Common Antigen (ECA):** C'est un antigène commun des entérobactéries, c'est une molécule invariante dérivée des glucides qui est présente dans la membrane externe et le périplasme des membranes des entérobactériaceae (**Mitchel et al., 2018**). C'est un antigène qui n'existe que chez les entérobactéries et de ce fait a un intérêt taxonomique (**Morice, 2003 ; Decoster, 2005**).
- **Les antigènes O ou somatiques:** Très toxiques, ils correspondent aux polysides fixés sur les lipopolysaccharides (LPS). Ils sont thermostables et résistent à l'alcool. Les bactéries portant des antigènes O sont agglutinées par les anticorps correspondants (**Morice, 2003 ; Decoster, 2005**).
- **L'antigène R :** Correspond au polysaccharide du core central. La disparition de l'antigène O le démasque et rend les souches "rough" (colonies rugueuses) auto agglutinables dans l'eau physiologique, plus sensibles aux substances bactéricides du sérum, facilement phagocytées et moins pathogènes (**Morice, 2003 ; Decoster, 2005**).
- **Les antigènes H ou flagellaires :** Ils n'existent que chez les souches mobiles. Constitués de protéines spécifiques dénommées flagelline, ils sont thermolabiles et inactivés par l'alcool. On peut les mettre en évidence par agglutination sur lame avec des sérums spécifiques (**Morice, 2003 ; Decoster, 2005**).
- **Les antigènes K, capsulaires :** De nature polysaccharidique. Ils masquent l'agglutination par les anticorps anti O qui peut être restituée après chauffage de la souche car ils sont détruits par ébullition. Ce sont des antigènes de surface (**Morice, 2003 ; Decoster, 2005**).

## I-2-Principales entérobactéries d'intérêt cliniques

### I-2-1- *Escherichia coli*

*Escherichia coli* est une entérobactérie mobile capable de fermenter le lactose et de produire de l'indole. C'est un hôte commun du microbiote intestinal de l'humain et des animaux homéothermes, elle peut causer des infections à l'intérieur et en dehors du tube digestif. Elle est au premier rang des bactéries à BGN. Les infections systémiques à cette bactérie sont favorisées par la présence de l'endotoxine et de la capsule, et ayant le plus souvent l'infection urinaire comme porte d'entrée (Levinson, 2014 ; Nauciel et Validé, 2005 ; CMIT, 2018). *Escherichia coli* est aussi la major cause avec *Streptococcus agalactiae* de méningite et de bactériémie chez les nouveau-nés (Levinson, 2014 ; Rayan et al., 2004 ; Carroll et al., 2015).

### I-2-2- *Salmonella*

Les espèces de ce genre sont impliqués dans différents types d'infection principalement les gastroentérites et les fièvres entériques dont la fièvre typhoïde et paratyphoïde, pouvant évoluer vers une bactériémie avec infections métastatiques dont les ostéomyélites (Levinson, 2014). Elles possèdent deux antigènes principaux : somatique O et flagellaire H (Avril et al., 2000 ; Elliott et al., 2012).

### I-2-3- *Shigella*

Les *Shigella* sont des entérobactéries immobiles extrêmement proches d'*Escherichia coli* mais qui ne fermentent pas le lactose. Elles n'ont pas d'uréase et ne produisent pas de gaz. Elles sont parasites de l'homme et entraînent une colite infectieuse endémo-épidémique, la dysenterie bacillaires (Shigellose) (Lampel et Maurelli, 2003 ; Levine et al., 2007).

### I-2-4- *Citrobacter freundii*

C'est un agent pathogène opportuniste qui peut provoquer des infections du système nerveux central (SNC), des infections des voies urinaires et des bactériémies (Liu et al., 2018).

Il se caractérise par sa mobilité, la fermentation du glucose avec production de gaz, la production du citrate, la bêta-galactosidase et l'H<sub>2</sub>S (Avril et al., 1992).



### ***I-2-5-Klebsiella, Enterobacter, Serratia***

#### ❖ *Klebsiella*

Les espèces du genre *Klebsiella* se distinguent par leur immobilité constante, leur groupement en diplobacilles, et leur volumineuse capsule d'aspect muqueux, qui est assez typique de ce genre (Najiby, 2012 ; Sekhri-Arafa, 2011).

#### ❖ *Enterobacter*

Les *Enterobacter cloacae* sont des espèces du genre *Enterobacter* qui font partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Ils sont des bacilles à Gram négatif, anaérobies facultatifs, mesurant 0,6µm de diamètre et 1,2 à 3 µm de longueur, ils se déplacent grâce à un flagelle péritriche et sont dotés de pilus de classe 1 (Paterson et al., 2005 ; Hart, 2006).

Les *Enterobacter cloacae* sont des germes qui colonisent souvent les patients hospitalisés et plus particulièrement ceux traités par antibiotiques. Ils ont été associés à des épidémies nosocomiales et sont considérés comme des pathogènes opportunistes (Pagotto et al., 2003 ; Hart, 2006).

#### ❖ *Serratia*

Les espèces de *Serratia* sont des agents pathogènes opportunistes. Elles sont à l'origine d'une multitude d'infections, dont la bactériémie, la pneumonie, les infections liées aux cathéters intraveineux, l'ostéomyélite, l'endocardite, mais elles sont rares. En médecine vétérinaire, *Serratia marcescens* est un agent des mammites chez la vache laitière (Van et al., 2007).

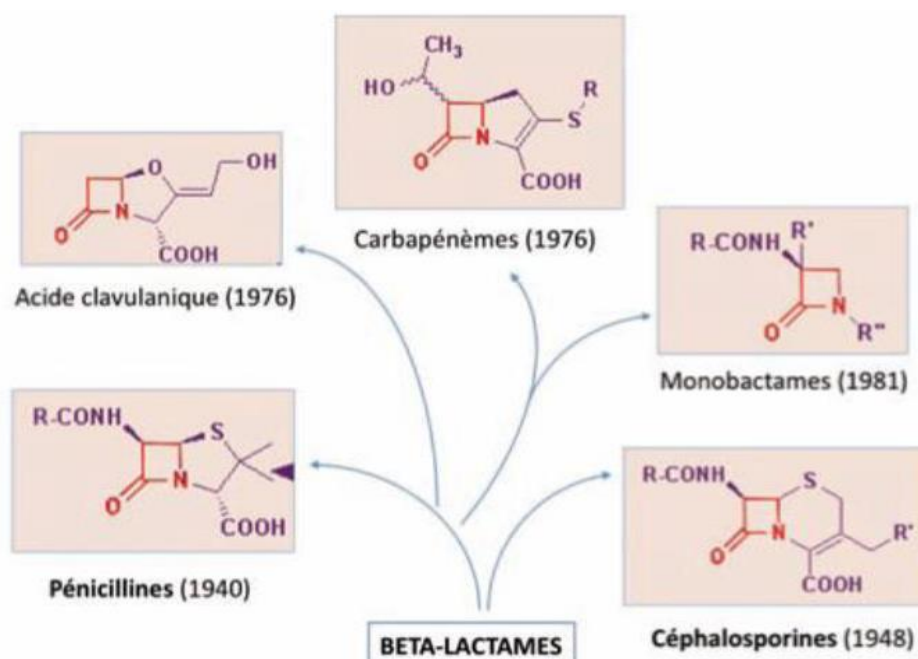
### ***I-2-6- Proteus-Morganella-Providencia***

Au sein de la famille des *Enterobacteriaceae* le groupe *Proteus-Morganella-Providencia* se distingue essentiellement par les deux caractères suivants :

Présence d'un tryptophane désaminase ; envahissement constant de la gélose nutritive. Ce sont des hôtes normaux du tube digestif de l'homme et des animaux, elles peuvent dans certains cas se montrer pathogènes et provoquer des infections très diverses : entérites, cystites, otites, méningites (Bennani, 2014).

### I-3- Les $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines constituent la famille la plus fréquemment utilisée dans le monde, pour leur large spectre antibactérien, leur faible toxicité et le vaste choix de molécules disponibles. Les antibiotiques formant la famille des  $\beta$ -lactamines, sont utilisés pour le traitement d'environ 55 % de toutes les infections bactériennes, en raison de leur grande efficacité et au peu d'effets secondaires qui leur sont attribués, les  $\beta$ -lactamines ont un effet bactéricide sur les bactéries en voie de croissance. Il existe de nombreuses variétés de  $\beta$ -lactamines, ayant toutes en commun le cycle  $\beta$ -lactame (**Figure 1**) (**Lagha, 2015**).

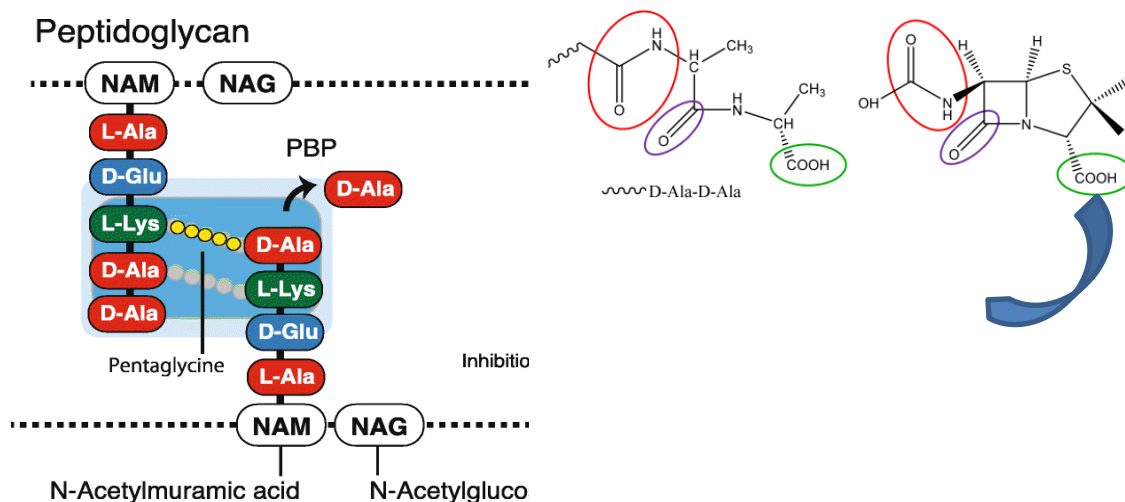


**Figure 01** : Structure chimique des principaux bêta-lactamines (**Comte et al., 2012**).

#### ❖ Mode d'action des $\beta$ -lactamines

Les bêta lactamines sont actifs sur des bactéries en phase de croissance et agissent en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne (synthèse du peptidoglycane) par inactivation des principales enzymes impliquées dans cette construction : les PLP, Protéines Liant les Pénicillines (Penicillin-Binding Protein (PBP)) (**Marylyse, 2015**).

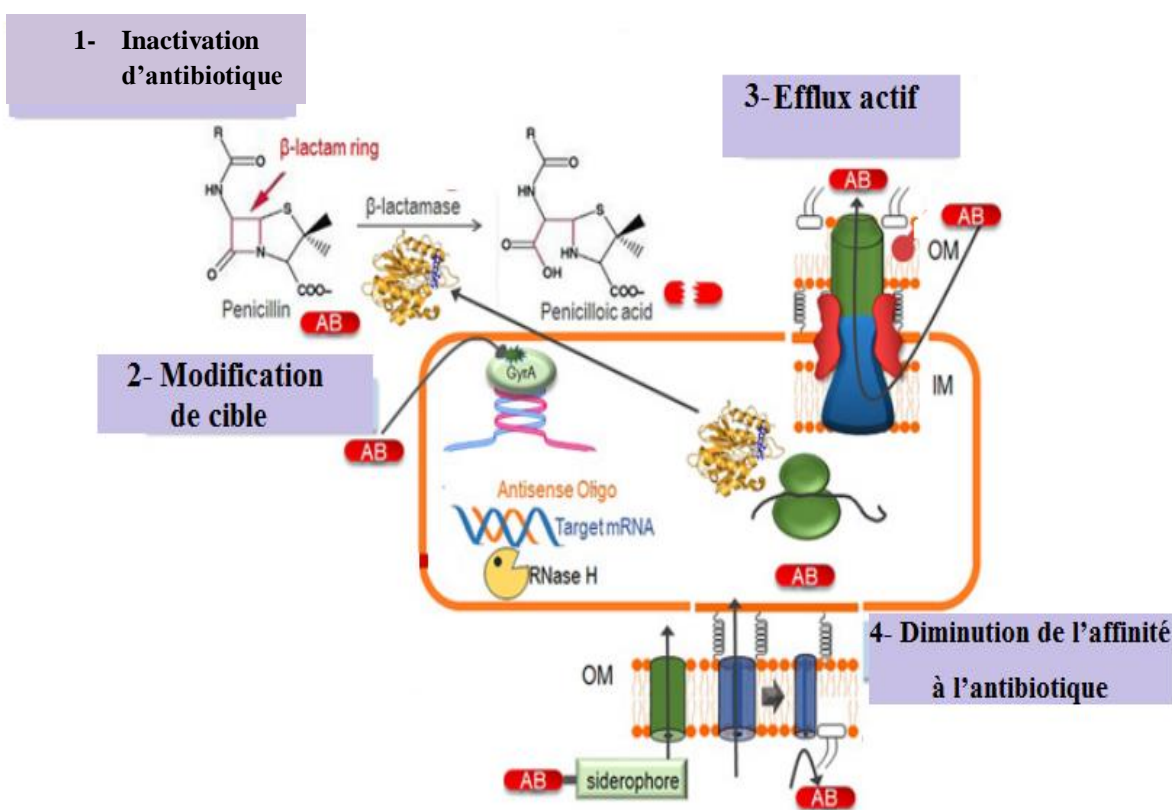
Les lactames se fixent très facilement sur ces PLP parce qu'elles possèdent une analogie structurale avec un constituant du peptidoglycane en formation qui est un substrat naturel de ces enzymes. Il s'agit du dipeptide D-alanyl-D-alanine : D-ala-D-ala (**Figure 02**) (Sawa, 2020).



**Figure 02:** Mode d'action des bêta-lactamines (Sawa, 2020).

#### I-4- Mécanisme de résistance aux Bêta-lactamines

Les bêta-lactamines peuvent perdre leur efficacité du fait de l'apparition d'une résistance bactérienne. 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 bêta-lactamases (Courvalin et Bingen, 2006).



**Figure03** : Mécanismes de résistance aux antimicrobiens chez les entérobactéries (Venter, 2019)

### 1-5-Définition des BLSE

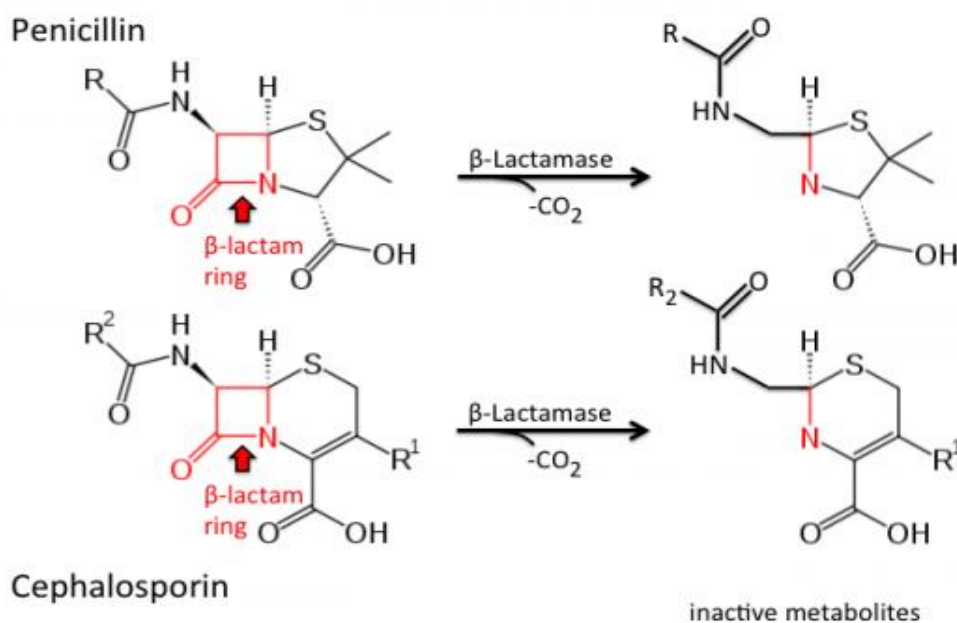
C'est le mécanisme prédominant de la résistance aux bêta lactamines chez les entérobactéries. Ce sont des enzymes capables d'ouvrir le cycle  $\beta$ - lactame en créant un intermédiaire acyl-enzyme instable, menant au final à la perte d'un groupement carboxyle (Ruppé, 2010).

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

Les BLSE confèrent donc une résistance à l'ensemble des bêta-lactamines à l'exception des céphamycines (céfoxitine et céfotétan) et des carbapénèmes (imipénème,

ertapénème,...etc.). Cependant, Elles peuvent être inhibées *in vitro* par l'acide clavulanique, le tazobactam ou le sulbactam (Vodovar et al., 2013).

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



**Figure 04 :** Hydrolyse des pénicillines et des céphalosporines par les bêta-lactamases (Zeng et Lin, 2013).

## I-6- Historique des BLSE

L'apparition des bêta-lactamases s'est rapidement et mondialement répandue, après le début de l'utilisation massive des bêta-lactamines dans les années 1940.

- 1963 : première souche d'*E. coli* productrice de pénicillinase mise en évidence à Londres (Royaume Uni).
- L'émergence des premières BLSE, dans les années 1980, a été observée peu de temps après l'introduction des céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G).
- 1983 : première description chez *Klebsiella ozaenae* en Allemagne, principalement chez des patients hospitalisés (type SHV).
- 1984 : première BLSE décrite en France chez *Klebsiella pneumoniae*.

- Dans les années suivantes, apparaissent chez toutes les espèces d'entérobactéries des BLSE en rapport avec l'augmentation importante de l'utilisation des C3G, et avec la nature plasmidique dans la transmission d'espèce à espèce (type CTX-M).
- Depuis les années 2000, des bêta-lactamases hydrolysant quasiment l'ensemble des bêtalactamines, y compris les carbapénèmes : les carbapénémases ont été Décrites. Ces enzymes sont d'une grande diversité moléculaire (types KPC, OXA, NDM essentiellement) (Poirel et al., 2007).

## I-7- Classification des BLSE

Les BLSE sont classées selon leurs types moléculaires, les plus fréquents étant les types TEM (Temoneira- nom du patient), SHV (Sulfhydryl variable) et CTX-M (Céfotaximase-Munich) (Jacoby et Munoz-Price, 2005).

### ❖ BLSE de type TEM

La première bêta-lactamase plasmidique de type TEM a été isolée à partir d'une souche d'*Escherichia coli* isolée chez un patient nommée Temoneira, d'où leur nomination (Paterson et Bonomo, 2005). La majorité de BLSE de ce type dérivent de quatre à sept mutations ponctuelles de l'enzyme originale (TEM-1, TEM-2) (Shaikh et al., 2015).

La substitution les plus courantes sont le glutamate en lysine en position 104, l'arginine en sérine en position 164, la glycine en sérine en position 238 et le glutamate en lysine en position 140 (Kasango et al., 2018).

Les BLSE de ce type sont le plus souvent produites par *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*. (Bradford, 2001).

### ❖ BLSE de type SHV (Sulfhydryl Variable)

La majorité des BLSE de type SHV (très fréquentes chez *Klebsiella pneumoniae*) est caractérisée par la substitution d'acides aminés de la glycine en sérine en position 238 qui transforme le phénotype non-BLSE en phénotype BLSE, la substitution du glutamate en lysine en position 240 qui ne fait qu'augmenter l'activité de l'enzyme (Gangoue-pieboji, 2007 ; Lagha, 2015).

**❖ BLSE de type CTX-M (Céfotaximase-Munich)**

Les CTX, d'où leur nom, se caractérise par leur activité hydrolytique potentielle sur le céfotaxime (**Paterson et Bonomo, 2005**).

Les BLSE de type CTX-M ont été décrites initialement au milieu des années 1986, et ont depuis lors disséminé largement dans le monde (**Naseer et Sundsfjord, 2011**).

Depuis les années 90, leur diffusion rapide a fait que les enzymes de ce type représentent aujourd'hui les BLSE les plus fréquentes au niveau mondial (**Livermore et al., 2007**). Il existe plus de 150 variantes des enzymes de ce type qui ont été récemment décrits, elles diffèrent des autres types par le fait qu'elles sont plus fortement inhibées par le tazobactam que l'acide clavulanique.

A cause de ce mécanisme de résistance aux antibiotiques qui est la production des bêta-lactamases à spectre étendu, nous avons réfléchi de faire la recherche sur les composés phénoliques de la plante de *Quercus ilex L.* qui peuvent être une alternative pour combattre ce phénomène de l'antibiorésistance.

## II-Généralité sur *Quercus ilex L.*

### II-1- Origine et répartition géographique

#### ✚ Dans le monde

Le chêne vert (*Quercus ilex L.*) est une espèce d'arbre dont la répartition est très vaste et que l'on trouve depuis l'Himalaya jusqu'en grande Bretagne, il occupe aussi une grande partie du bassin méditerranéen. Cette espèce constitue avec son abondance, l'un des arbres les plus importants. Il se trouve, principalement dans la partie occidentale de la région méditerranéenne (**Benia, 2010**).

En Afrique du Nord, le chêne vert figure parmi les espèces les plus prépondérantes du patrimoine forestier, où il forme le fond de la forêt de montagne (**Benia, 2010**).

**Tableau II:** Surfaces forestières occupées par le chêne vert dans quelques pays.

Pays	Surfaces
Espagne	2890.000 ha
Portugal	530.000 ha
France	350.000 ha
Italie	380.000 ha
Tunisie	80.000 ha
Algérie	680.000 ha
Maroc	134.000 ha

Source : (**Haichour, 2009**).

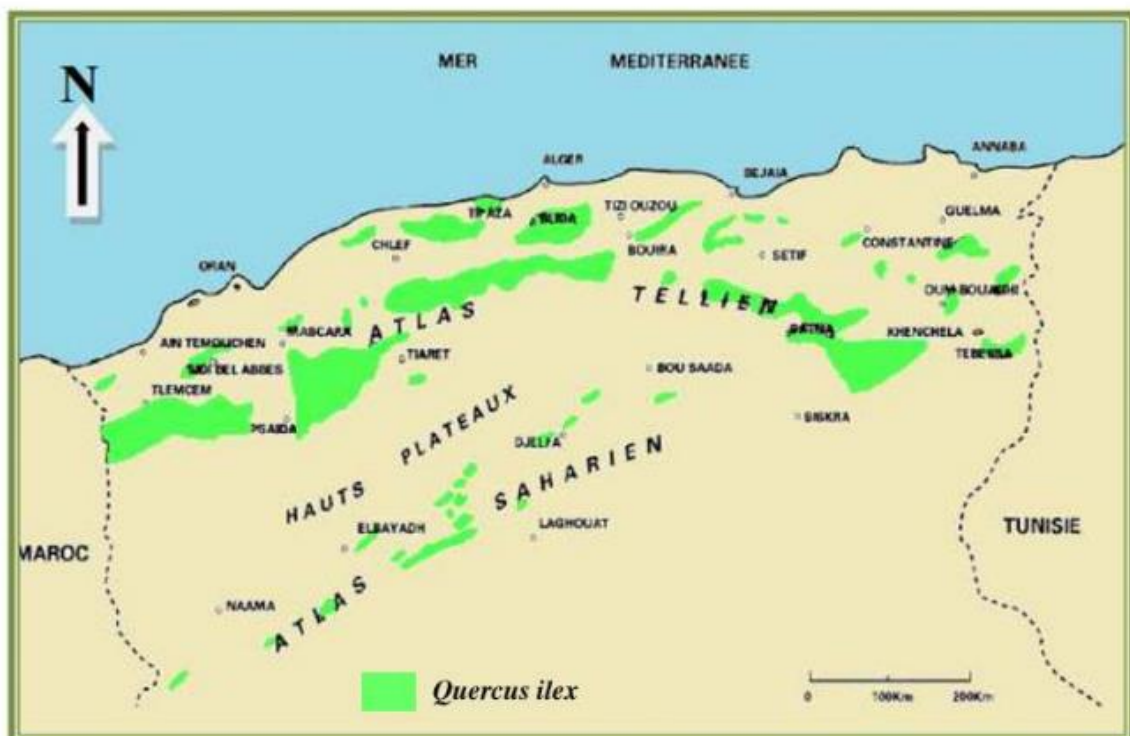


## En Algérie

En Algérie, le chêne vert occupe une très grande partie de la surface forestière, près de 680.000 ha. On le trouve partout, aussi bien sur l'Atlas saharien que l'Atlas tellien où il forme de belles forêts en Kabylie et sur les monts de Tlemcen.

Les plus importantes chênaies sont localisées en Oranie, en peuplements purs ou mélangés avec le pin d'Alep dans la région de Tiaret et de Saïda. Il se trouve sous forme de futaies âgées dans la région de Tlemcen (**Figure 05**) (**Koumiche, 2016**).

A l'Est, on le trouve dans Djebel Aurès, où il est en mélange avec le pin d'Alep, tel est le cas de la forêt de Belezma, de Bou-Arif, de Sgag et de l'Oued Fedala (**Benia, 2010**). Au centre du pays où il est en concurrence avec le pin d'Alep ; il recouvre les versants de l'Atlas méridjien en taillis dégradés. Il forme des taillis médiocres dans les régions de Tablat et Sour-El Ghozlan, par contre à Tenès il est possible de trouver de belles futaies qu'il faut bien traiter afin de les conserver (**Haichour, 2009**).



**Figure 05** : Distribution géographique du Chêne vert (*Q. ilex*) en Algérie (**Haichour, 2009**).

## II-2- Systématique et nomenclature

De nombreux travaux ont été consacrés à la taxonomie du Chêne vert. Les caractères très polymorphes de cette espèce ont conduit à une division systématique très confuse et loin d'être tranchée (**Barbero, 1980**).

Nous avons retenus la classification suivante (**Nixon, 1993**).

**Règne :** *Plantae*

**Embranchement :** *Spermatophyta*

**Sous-embranchement :** *Angiospermes*

**Classe :** *Dicotylédones*

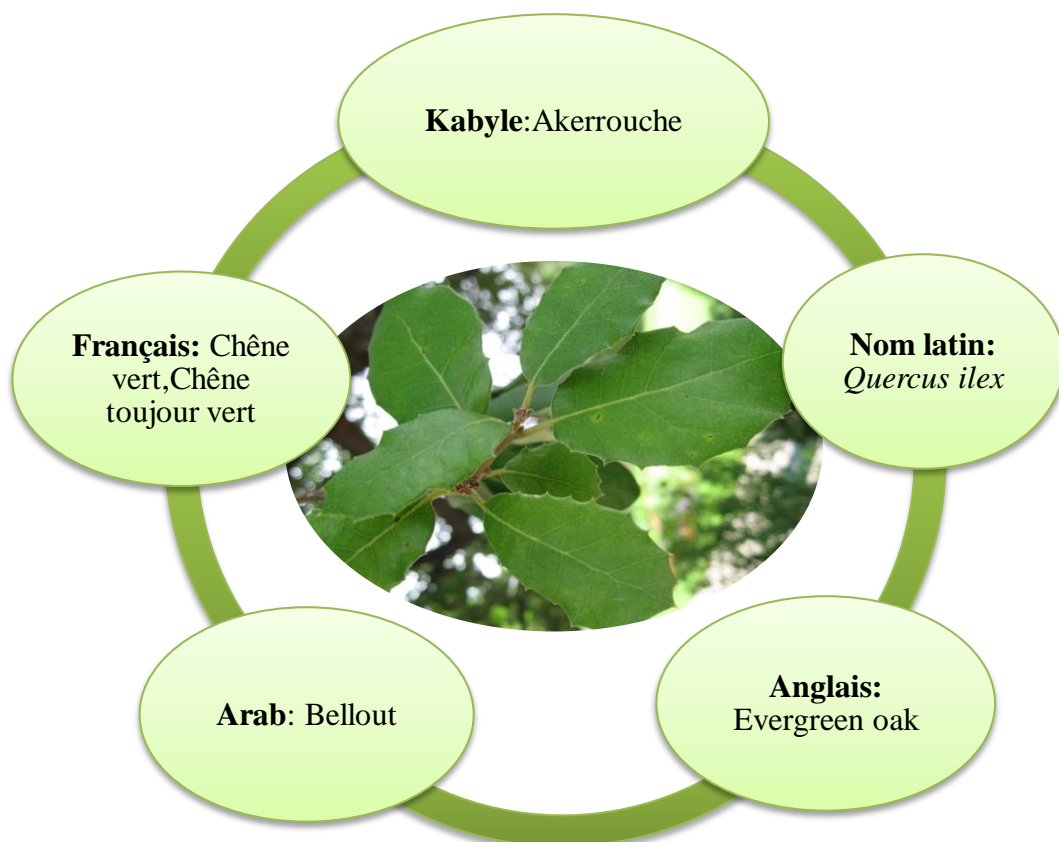
**Sous-classe :** *Archichlamydeae*

**Ordre :** *Fagales*

**Famille :** *Fagaceae*

**Genre :** *Quercus*

**Espèce :** *Quercus ilex L.*



**Figure06 :** Les différentes appellations de *Quercus ilex L.*

### II-3-Description botanique de *Quercus ilex* L.

Le chêne vert est un arbre originaire du bassin méditerranéen à feuillage persistant pouvant atteindre jusqu'à 25m de haut. L'écorce est de couleur grise. Les feuilles sont ovoïdes à lancéolées, pointues, jusqu'à 7cm de long, dures, dentées, de couleur vert foncé et brillantes sur la face supérieure et à poils gris-vert sur la face inférieure. Les fleurs sont très petites en chatons. Les fruits sont des glands étroits et pointus dans des cupules courtes et écailleuses (Bayer et al., 2005).



A : Arbre de *Quercus ilex*.

B : Les fleurs.

C : Le fruit.

D : Ecorce.

**Figure 07:** Les différentes parties de l'arbre de *Quercus ilex* L. (Benia, 2010).

## II-4- Valeurs nutritives et usage

### II-4-1-Composition chimique

#### ✓ Les glands de chêne vert

Le fruit de chêne vert constitue une source nutritionnelle très importante. Ils sont très riches en lipides et pauvres en vitamine B1, B2 (Ait Saada et al., 2017).

✓ **Teneur en sucres** : Le gland de chêne vert est un aliment énergétique vu sa richesse en amidon 71.37% MS (Sadoun et al., 2016).

✓ **Teneur en matière grasse** : La teneur en MG (matière grasse) du gland de chêne vert rapportée par la littérature est très variable. Il semble que les variétés de gland algérien sont plus riches en lipide (Foudhil, 1990; Belarbi, 1990). Cette particularité est susceptible d'influencer favorablement leur efficacité énergétique mais peut s'avérer néfaste à leur conservation (Boudroua, 1995). La teneur de gland de chêne vert en lipide varie de 7 à 14.4% (Sadoun et al., 2016).

✓ **Teneur en tanin** : La teneur en tanin dans l'espèce *Quercus ilex* varie de 0.70 à 8.90% (MS) (Ait Saada, 1997; Boudroua, 1995; Kekor et Kaukios, 1985). Les tanins existent en quantité importante à côté des glucides, notamment dans les fruits verts au cours de la maturation, ils dispersent en même temps que les sucres s'accumulent (Leraillez, 1952).

### II-4-2-Utilisation médicinales

Les espèces du genre *Quercus* ont été utilisées depuis longtemps en médecine traditionnelle comme un hémostatique, pour le traitement des troubles gastro-intestinales, les multiples inflammations buccales, muqueuses génitales et anales et aussi pour les inflammations de la peau (Karioti et al., 2009).

Dans les inflammations de la muqueuse buccale et de la gorge, la décoction s'applique en rinçages ou en gargarismes, plusieurs fois par jour ; elle soulage la sensation de picotement ou de brûlure et a une action antiseptique et cicatrisante. Les glands vus leur richesse en Vit A pourraient jouer un rôle vital contre les maladies où les déficiences en Vit A sont très répandues telle que la cécité et diverses maladies des yeux (Bonfils, 2012).

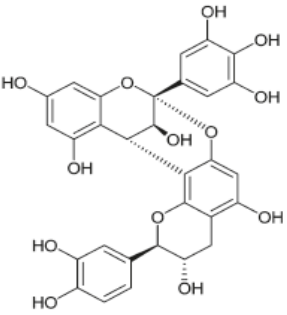
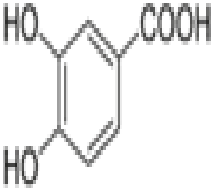
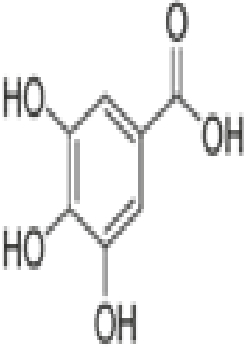
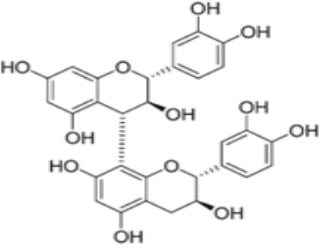
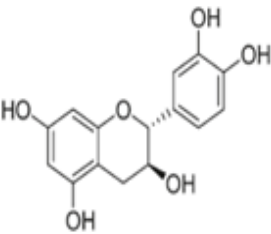
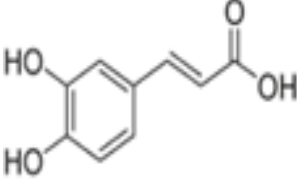
L'écorce de tous les arbres du genre *Quercus* est très riche en tanins (jusqu'à 20 %) parmi lesquels ressort l'acide tannique. Les tanins sont astringents, c'est-à-dire qu'ils assèchent les muqueuses enflammées et précipitent ou coagulent les protéines des tissus

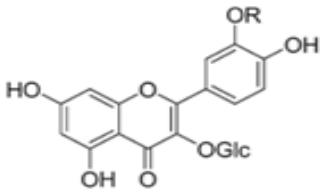
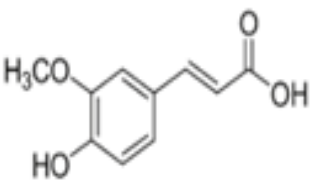
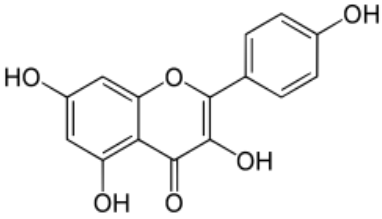
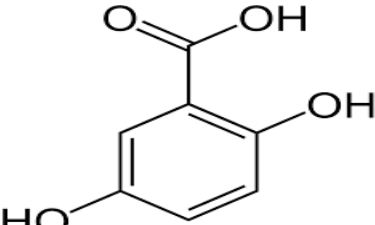
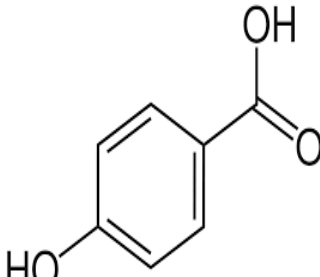
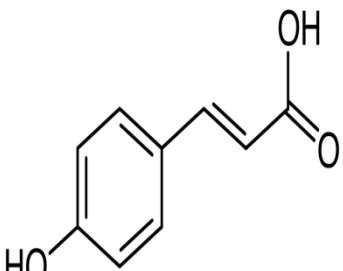
animaux. C'est pour cela, précisément, qu'ils sont employés comme agents de tannage. Les glands contiennent eux aussi du tanin, ainsi que des glucides (hydrates de carbone) et des lipides (graisses) de haute valeur biologique. Ils sont astringents et constituent un aliment idéal en cas de diarrhées par gastro-entérite, en particulier chez les enfants (Aissa, 1983).

### II-4-3- Les composants bioactifs de *Quercus ilex L.*

*Quercus ilex.L* est un produit naturel qui est considéré comme une source très riche en molécules bioactives. Beaucoup d'études ont montré qu'il contient de: phénols, flavonoïdes, orthodiphénols, proanthocyanidine, flavonols, tanins, polyacylate flavonoïdes glycosidiques, caroténoïdes...etc. (Ochmoukh et al., 2017).

**Tableau III:** Les structures des phénols isolés à partir des feuilles de *Quercus ilex L.*

 <p>Proanthocyanidine</p>	 <p>Acide protocatechuique</p>	 <p>Acide gallique</p>
 <p>Prodelphinidine C</p>	 <p>Catechine</p>	 <p>Acide caféique</p>

 <p>6 R = H Quercetin-3-O-glucoside</p>	 <p>Acide ferulique</p>	 <p>Kaempférol</p>
 <p>Gentisic acid</p>	 <p>4-Hydroxybenzoic acid</p>	 <p>Coumaric acid</p>

(Meziti *et al.*, 2019).

## II-5- Extraction des composés phénoliques :

L'utilisation de différents solvants à polarité différente permet de séparer des composés selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction. Ces méthodes d'extraction menées à température ambiante, permettent d'extraire le maximum des composants bioactifs et de prévenir leur dénaturation ou modification probable, dont la température élevée provoque l'inactivation des composés phénoliques, la diminution de leur extractibilité dans le solvant et affecte leur quantification (Hagermann *et al.*, 2000).

Plusieurs études ont indiqué que le méthanol est le meilleur solvant pour une extraction plus cohérente des substances antimicrobiennes provenant de plantes médicinales par rapport à d'autres solvants tels que l'eau, l'éthanol et l'hexane (Ahmad *et al.*, 1998; Eloff, 1998; Lin *et al.*, 1999).

D'après (Ksouri et al., 2009), l'activité antibactérienne des polyphénols dépend de leur nature, de leurs structures, de leurs interactions synergétiques ainsi que de leurs méthodes d'extractions.

(Thongson et al., 2004), ont rapporté que l'extraction par ultrasons ne prenait que cinq minutes pour obtenir les composants bioactifs qui présentaient l'activité antimicrobienne d'une plante médicinale (Thongson et al., 2004).

### II-5-1- Dosage des polyphénols totaux :

Les polyphénols sont l'un des groupes les plus importants de métabolites secondaires des plantes. Il y a très peu d'études dans la littérature qui se sont concentrées sur la teneur phénolique des feuilles de *Quercus ilex*.

D'après l'étude (Meziti et al., 2019), l'extrait des feuilles de *Quercus ilex* a présenté une teneur en composés phénolique élevée de  $490,81 \pm 29,62$  µg GAE/mg d'extrait sec, Cette valeur est plus au moins élevée par rapport à celle rapporté par (Hamadache, 2011) dans l'extrait méthanolique (110.8mg EAG/g d'extrait) et à celle révélée par (Glyphis et Puttick, 1989) dans l'extrait aqueux des feuilles de *Quercus ilex*.

Ces différences pourraient être liées à la divergence des conditions climatiques (Tolié, 2017).

### II-5-2- Contenu en flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont l'un des groupes les plus divers, les plus répandus et les plus importants des composés phénoliques. La plus part de ces composés possèdent un large éventail d'activités biologiques, y compris l'activité antibactérienne (Djeridane et al., 2010).

Les résultats de l'étude (Meziti et al., 2019), ont montré que, la teneur en flavonoïdes de l'extrait sec de *Quercus ilex* est  $3,11 \pm 0,04$  µg QE/mg extrait sec).

Dans une autre étude récente réalisée par (Amessis-Ouchemoukh et al., 2017), plusieurs groupes phénoliques ont été identifiés et quantifiés ; les polyphénols totaux, les flavonoïdes, les ortho-diphénols et l'acide ascorbique (Tableau IV).

Parmi toutes les espèces étudiées, *Quercus ilex*, était le plus riche en tanin et en flavonoïdes glycosélés (Cantos et al., 2003; Karioti et al., 2010; Custódio et al., 2013).

Le taux de l'acide ascorbique a atteint une valeur de  $35.56 \pm 0.26$  mg/100 g de matière fraîche. Cette valeur est plus élevée que celle trouvé par (Gubbuk et al., 2010), dans l'étude

sur la caroube (8.07–10.41 mg/100 g). La variation des quantités des composés bioactifs pourrait être attribuée à plusieurs raisons comme la solubilité des composés phénoliques qui sont directement liés au type de solvant utilisé et l'interaction de ces composés avec d'autres composants dans l'extrait menant à la formation d'un complexe insoluble (**Amessis-Ouchemoukh et al., 2017**).

**Tableau IV** : Contenu en composés phénoliques et en acide ascorbique dans l'extrait des feuilles de *Quercus ilex* (**Amessis-Ouchemoukh et al., 2017**).

	Phénoliques totaux (mg CE/100 g DW)	Flavonoïdes (mg QE/100 g DW)	Flavonols (mg QE/100 g DW)	Proanthocyanidines (mg CE/100 g DW)	Ortho-diphénols (mg GAE/100 g DW)	Acide ascorbique (mg AAE/100 g DW)
<i>Quercus ilex</i>	37908.80 ± 34.97a	3863.310 ± 25.60a	20.308 ± 0.32b	254.53 ± 2.78b	7734.87 ± 25.03a	35.56 ± 0.26b

CE : Équivalents catéchin / QE: Équivalents quercétin / GAE : Équivalents d'acide galique / AAE : Équivalents acides ascorbiques. DW: Poids sec)

Selon (**Seidel, 2005**), l'eau et le méthanol sont deux solvants polaires qui extraient particulièrement les flavonoïdes glycosylés et les tannins. Tandis que les flavonoïdes aglycones sont extraits par les alcools ou les mélanges eau-alcool.

En général, la teneur en phénols totaux ainsi que la nature des composés présents dans l'extrait végétal sont fortement influencées par :

- Des facteurs climatiques et environnementaux : la zone géographique, sécheresse, sol, agressions et maladies... etc. (**Ebrahimi et al., 2008**).
- Le patrimoine génétique, la période de la récolte et le stade de développement de la plante, le type de polyphénol, l'état de santé du fruit, la méthode de récolte et de stockage (**Stratil et al., 2007 ; Lombardo et al., 2010**).
- La méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux (**Lee et al., 2003**).



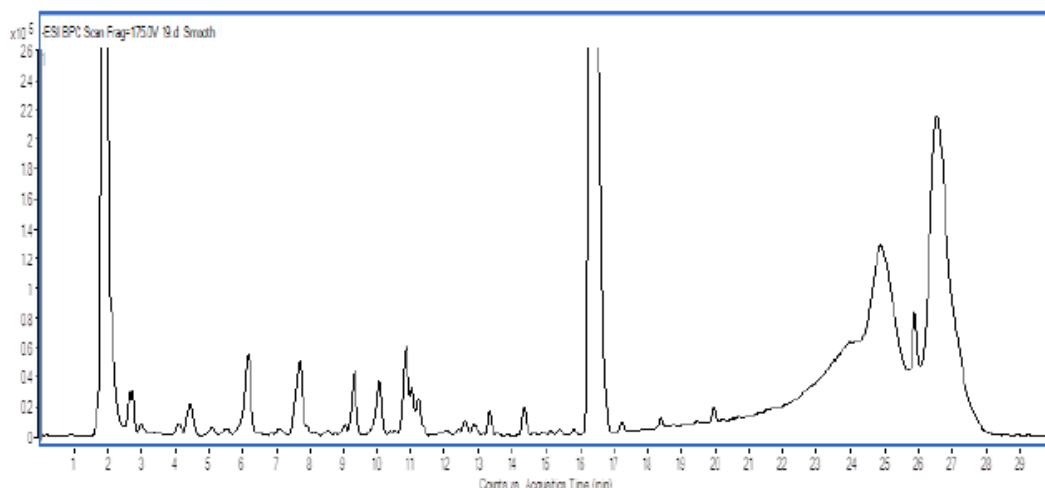
Toutefois, il faut noter que la faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu est l'inconvénient principal du dosage colorimétrique. Le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes d'hydroxyles non seulement celles des composés phénoliques, mais également de certains sucres et de protéines etc. (Vuorela, 2005). Ainsi, le solvant d'extraction élu des substances non phénoliques comme les sucres, les protéines et les colorants qui peuvent interférer pendant toute évaluation phénolique (Georgé et al., 2005).

### II-5-3- Analyse HPLC :

Le profil phénolique obtenu par l'analyse HPLC de l'extrait méthanoïque des feuilles de *Quercus ilex* effectué par (Meziti et al., 2019) a révélé la richesse de cette plante en composés bioactifs. Le chromatogramme de cet extrait (Figure 08) a permis d'identifier six composés phénoliques. La catéchine était le composé le plus important suivi de l'acide caféique. Les acides gentisiques et hydroxybenzoïques étaient des composés mineurs dans l'extrait de *Quercus ilex*.

**Tableau V :** Composés phénoliques déterminés par HPLC-TOF/MS dans l'extrait de *Quercus ilex* (Meziti et al., 2019)

Composés phénoliques	Temps de rétention (min)	<i>Quercus ilex</i> (extrait de µg/g)
Acide ferulique	1,076	606,16
Acide gentisique	4,4	59,12
Catéchine	6,16	7359,44
Acide 4-Hydroxybenzoïque	6,606	335,26
Acide caféique	7,69	2374,82
Acide coumarique	9,97	861,348
Acide cinnamique	166,04	--



**Figure 08:** Chromatogramme HPLC de l'extrait méthanolique de *Quercus ilex* (Meziti et al., 2019)

Ces résultats sont en partie en concordance avec l'étude phytochimique de (García-Villalba et al., 2017) qui a étudié la composition foliaire de différentes espèces de *Quercus* et ils ont identifié, neuf acides phénoliques (acide gallique, acide 3,4-dihydroxybenzoïque, acide chlorogénique, acide 4-hydroxybenzoïque, acide 4-O-caffeoylquinique, acide caféique, acide coumarique, acide ferulique et l'acide salicylique).

Ils ont également signalé que les flavonoïdes prédominants dans toutes les espèces de *Quercus* étaient la catéchine et la galloocatechine.

## II-6- étude de l'activité antibactérienne des extraits de feuilles de *Quercus ilex.L* :

Selon (Hamadache, 2011), l'extrait méthanolique des feuilles de *Quercus ilex.L* s'est avéré le plus efficace présentant un effet inhibiteur très prononcé que ce soit vis-à-vis des souches à Gram positif ou à Gram négatif (zones d'inhibition allant de 13 à 28.5mm avec 20µl d'extrait et de 16.5 à 30mm avec 50µl d'extrait). Cet effet est dû à la richesse des cet extrait en composés phénoliques (Berahou et al., 2007). Ces résultats concordent avec ceux rapportés par (Moghadam et al., 2010).

Selon les résultats d'une autre étude réalisée en Turquie (Gulluce et al., 2004) l'extrait de méthanol des feuilles de *Quercus ilex.L* possède une activité antimicrobienne

contre un large éventail de microorganismes humains et phytosanitaires. En effet 97 souches bactériennes (74%) ont été résistantes à l'extrait de *Quercus ilex.L* et les 35 autres souches (27%) ont été sensibles y compris, *Enterobacter pyrinus*, *Escherichia coli* et *Enterobacter pyrinus* (**Tableau VI**). En revanche *Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella trevisanii* s'est révélé résistante à l'extrait de *Quercus ilex.L* Cette résistance est probablement liée au phénomène d'imperméabilité, soit à une production de capsule (**Adwan et al., 2006 ; Alka et Siddarth, 2017**).

Les résultats de cette étude révèlent des réponses variables en fonction des souches et de type de l'extrait testé. Plusieurs classes de polyphénols telles que les acides phénoliques, flavonoïdes et les tannins servent de mécanisme de défense des plantes contre les microorganismes, les insectes, et les herbivores pathogènes (**Falleh et al., 2008 ; Debib et al., 2014**). Les Polyphénols, tels que les tannins et les flavonoïdes comme l'epigallocatechine, la catéchine, la myricétine, la quercétine, (**Shan et al., 2007**) sont des substances antibactériennes importantes.

**Tableau VI :** Diamètres des zones d'inhibition de l'extrait des feuilles de *Quercus ilex* vis-à-vis des souches d'entérobactéries (**Gulluce et al., 2004**).

Souche bactérienne	Origine	Extrait MeOH	Contrôle négatif MeOH	Contrôle positif
<i>Escherichia coli</i>	Clinique	17–19 mm	00	ND
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Clinique	00	00	32 mm FOX
<i>Klebsiella trevisanii</i>	Clinique	00	00	23 mm FOX
<i>Enterobacter pyrinus</i>	Clinique	25 mm	00	ND
<i>Salmonella typhimurium</i>	Clinique	00	00	ND
<i>Serratia spp.</i>	Clinique	00	00	27 mm (SCF)
<i>Enterobacter intermedius</i>	Plante	13-20 mm	00	27 mm (SCF)
<i>Enterobacter pyrinus</i>	Clinique	25 mm	00	12 mm (FOX)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Clinique	00	00	12 mm (FOX)
<i>Enterobacter cloacae</i>	Clinique	00	00	10 mm (FOX)

**Tableau VII :** Les valeurs CMI ( $\mu\text{g/mL}$ ) de l'extrait des feuilles de *Quercus ilex* vis-à-vis les souches d'entérobactéries (Gulluce et al., 2004).

	Extrait de <i>Quercus ilex</i>	Médicament standard (Maxipime)
<i>Enterobacterpyrinus</i>	250	250
<i>Enterobacter intermedius</i>	250	250
<i>Escherichia coli</i>	250	15.62

# **Chapitre II**

## **Matériel et méthodes**

## II-1- Objectif

Notre travail vise à étudier la prévalence des souches d'entérobactéries productrices de bêta-lactamases (EBLSE) à partir de différents types de prélèvements et évaluer leur sensibilité vis-à-vis des antibiotiques et des extraits phénoliques préparés à partir des feuilles de Chêne vert *Quercus ilex L* et finalement, rechercher un éventuel effet synergétique entre les extraits préparés et les antibiotiques testés.

## II-2- Centre et durée de l'étude

Notre étude c'était prévu d'être réalisée pendant une durée de trois mois, allant du 01/03/2020 au 30/06/2020 au niveau :

- Du laboratoire d'Hygiène de la wilaya de Blida pour la collection des entérobactéries BLSE.
- Au niveau du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-chimiques (CRAPC) de Bou-Ismaïl pour l'extraction des polyphénols, mais à cause de la situation sanitaire de l'épidémie du COVID-19 nous n'avons pu réaliser que 15 jours de pratique ou nous avons analysé 35 échantillons (28 urines et 7 selles).

Chaque prélèvement reçu au laboratoire était accompagné d'une fiche technique qui comporte :

- Nom et prénom.
- Age et sexe
- Nature de prélèvement
- Antibiothérapie en cours

## II-3- Matériel

### II-3-1- Matériel biologique

- ✓ 35 prélèvements issus d'un laboratoire d'analyses médicales privé de Blida, ces prélèvements ont été transportés dans une glacière avec une température de 4°C.
- ✓ **Souches de références** : *E.coli* ATCC 25922 sensible à tous les antibiotiques qui sont dans le spectre des Bacille à Gram Négatif (BGN), utilisée pour valider les tests effectués.

### ✓ Matériel végétal

Les feuilles de *Quercus ilex* qui sont récoltées dans la région de Kolea.



**Figure 09:** Représentation d'une feuille de *Quercus ilex*. (Original, 2020).

### II-3-2- Matériel non biologique

Le matériel non biologique est représenté par : la verrerie, l'appareillage, les colorants et les réactifs, les milieux de culture ainsi que les disques d'antibiotiques utilisés (voir Annexe I).

### II-4- Méthodes

La (figure 11) résume notre protocole expérimental.

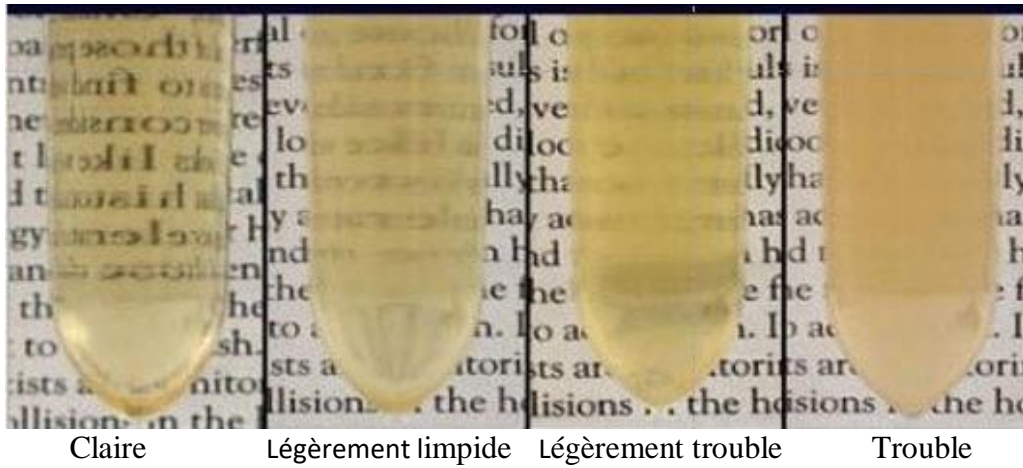
#### II-4-1- Examen macroscopique

##### ❖ Les urines

Cet examen permet d'observer à l'œil nu s'il y'a des modifications des caractères physiques de l'urine. Il se base sur plusieurs paramètres qui varient selon l'état de santé ainsi que le régime alimentaire de l'individu.

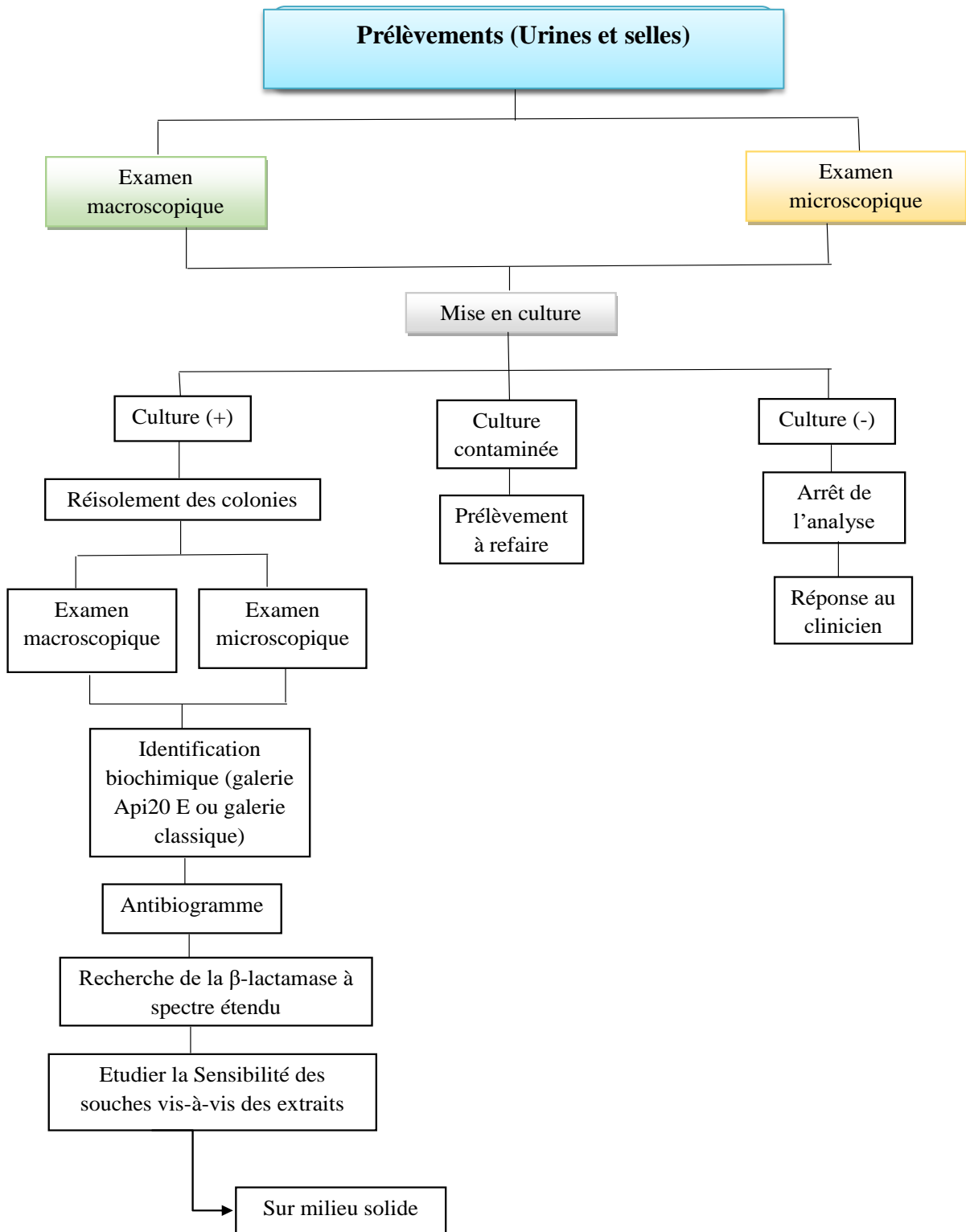
### ✓ L'aspect

Alors que l'urine normale est claire, limpide, d'aspect jaune citrin, l'urine infectée peut être trouble, ictérique, hématurique ou purulente. On note parfois la présence de sédiments : blanchâtre (phosphate), rouge brique (acide urique), rose (urates). La turbidité est évaluée en déposant l'échantillon d'urine sur un papier imprimé. On peut déterminer quatre aspects : claire, légèrement limpide, légèrement trouble et trouble.



**Figure 10 :** Aspect des urines selon la turbidité (Baig, 2011).





**Figure 11:** Protocole expérimental pour l'évaluation de l'activité antibactérienne.

✓ **La couleur**

L'urine prend différentes colorations à l'état normal et à l'état pathologique (**Tableau VIII**).

**Tableau VIII** : Couleurs de l'urine à l'état normal et pathologique.

Etat	Couleur	Causes
<b>Normal</b>	- Jaune très clair (diluée)	-Prise de diurétiques
	- Jaune foncé (concentrée)	-Restriction hydrique nocturne -Etats fébriles -Sueurs abondantes
<b>Pathologique</b>	- Blanche	-Pyurie -Cristaux de phosphate
	- Mousseuse	-Protéinurie abondante
	- Lactescente	-Chylurie (présence de globules graisseux), cas de parasitoses
	- Jaune orangé	-Maladies fébriles aigue
	- Verte	-Prise de bleu de méthylène ou d'amitriptyline (antidépresseur)
	- Rouge ou brunâtre	-Hématurie macroscopique, myoglobinurie et hémoglobinurie, excrétion de pigments endogènes, colorants alimentaires (betteraverie) ou médicamenteux.
	- Brun foncé	-Méthémoglobines (oxydation de l'atome de fer ferreux (ion $Fe^{2+}$ ) de l'hémoglobine en fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) -Pigments alimentaires -Prise de médicaments
	- Brun verdâtre	-Présence de pigments biliaires
- Noire	-Cancers -Ochronose (Alcaptonurie)	

(Lebret Thierry, 1999 ; Baig, 2011)

### ✓ L'odeur

A l'état normal, l'odeur des urines provient de certains composés volatiles à doses très faibles comme l'ammoniac.

A l'état pathologique et dans certaines maladies, l'urine peut dégager l'une des odeurs suivantes (**Touchane et Ghalmi, 2015**) :

- Odeur acétonique : diabète ;
- Odeur de sirop d'érable : leucinose ;
- Odeur fétide : fièvre grave, cancer du rein ou de la vessie ;
- Odeur de pieds en sueur : acidémie (diminution du pH sanguin <7.38)
- Odeur de choux bouillis : tyrosinose ; (accumulation de tyrosine dans l'organisme)
- Odeurs particulières : affections métaboliques héréditaires de l'enfant.

### ❖ Selle

On notera la consistance des selles (liquides, molles, moulées), la présence de glaires, de pus et de sang, la couleur.

## II-4-2- Mise en culture

### ❖ Urine

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.

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

### ❖ Selle

La recherche des salmonelles et des shigelles commence toujours par un pré-enrichissement suivie par un isolement sur un milieu SS (Salmonelles –Shigelles).

### II-4-3- Isolement et identification

A l'aide d'une anse de platine ou d'une pipette Pasteur stérile, on prélève une colonie que nous ensemençons par épuisement sur une gélose sélective (gélose SS, gélose Hecktoen, Mac konkey ou gélose E.M.B) en boîte de Pétri, de façon à obtenir des colonies bien isolées après une incubation à 37°C pendant 24 heures.

#### ➤ Urine

##### -Etat frais

Après homogénéisation des urines avec un agitateur de type vortex, on procède à la numération des différents éléments grâce à un hématimètre ou « cellule » en verre calibrée (Nageotte, Laumar, Malassez) (**Denis et al., 2009**).

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.

Les cylindres hyalins ne sont pas pathologiques. Lorsque ces derniers sont associés à des hématies (cylindres hématiques), des leucocytes ou des globules graisseux, ils deviennent pathologiques. Les cristaux ne sont pas pathologiques lorsqu'ils sont constitués de substances normalement présentes dans l'urine (acide oxalique, urate ou sels de calcium). Seuls les cristaux de phosphate ammoniaco-magnésien ont un intérêt dans le diagnostic d'une infection urinaire (bactérie uréasique). Une leucocyturie ( $>5 \cdot 10^4$  leucocytes/ml) est observée en cas d'infection urinaire. Toutefois, il existe des leucocyturies négatives ( $<10^3$  leucocytes/ml) ou faiblement positives notamment chez les patients dont les défenses immunitaires sont affaiblies (nouveaux nés, femmes enceintes...) (**Touchane et Ghalmi, 2015**).

#### ✚ Mode opératoire

- 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 :

- $>5 \times 10^4$  leucocyte/ml.
- $>10^4$  hématies/ml.

### ➤ **Les selles**

Faire une suspension homogène des selles dans l'eau physiologique et examiner entre lame et lamelle à l'objectif x40. À ce propos, la dilution doit être suffisante pour apprécier la mobilité des bactéries.

#### - **Coloration de Gram**

Elle nous a permis de différencier entre les bactéries Gram positive et les bactéries Gram négatif, et de connaître la morphologie et le mode de regroupement de ces bactéries (**voir annexe II**).

## **II-4-5- Identification biochimique**

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

#### - **Galerie API 20<sup>E</sup>**

API 20<sup>E</sup> est un système pour l'identification des entérobactéries et autres bacilles à Gram négatifs, en utilisant 20 microtubes contenant des substances déshydratés. Au-dessous de chaque tube, un sigle indique la nature du test .les tubes sontensemencés avec une suspension bactérienne effectuée en eau distillée stérile.la réaction produite au cours du procédé d'incubation se traduit par les virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactif (**Freney et al., 2007**).

La lecture de ces réactions se fait à l'aide d'un tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide de la base de données API 20E (Bio-Mérieux).

## ✚ Technique

### ➤ Préparation de la galerie

- On place de l'eau distillée dans les alvéoles présentes dans le fond de la boîte afin de créer une atmosphère humide.
- On dépose aseptiquement la galerie dans la boîte d'incubation.

### ➤ Préparation de l'inoculum

On prélève à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée une colonie suspecte parfaitement isolée puis la dissocie soigneusement dans le tube contenant préalablement l'eau distillée stérile.

### ➤ Inoculation de la galerie

- Remplir les tubes et cupules des tests CIT, VP et GEL avec la suspension bactérienne et uniquement les tubes des autres tests.
- Réaliser une anaérobiose dans les tests ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE en remplissant leur cupules d'huile de vaseline stérile.
- Refermer la galerie et l'incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures.
- 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).

## ✚ Lecture

- La lecture des galeries API 20<sup>E</sup> se fait selon les indications du fournisseur. Après codification des réactions en un profil numérique.
- Les tests seront regroupés en groupe de 3 prennent les chiffres (1, 2 ou 3) pour un test positif et le chiffre 0 pour un test négatif.
- Un nombre de 7 chiffres (profil numérique) est obtenu et l'identification est alors déterminée en comparant avec le catalogue analytique.

## II-4-6- Les tests complémentaires

### ➤ Test d'oxydase

Ce test consiste à mettre en évidence la capacité que possède la bactérie à oxyder un réactif incolore (la NN-diméthyl-paraphénylène diamine) en un dérivé rose violacé. Le but de ce test est de différencier les Entérobactéries des *Pseudomonas*.

### ✚ Technique

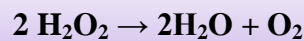
- Placer un morceau de papier imprégné de la NN-diméthyl-paraphénylène diamine sur une lame à l'aide d'une pince flambée.
- Avec une pipette Pasteur, prélever une colonie sur milieu solide et la déposer doucement sur le papier.

### ✚ Résultats

- Si la colonie prend une teinte rose, violette, le germe possède une oxydase : le test est positif.
- Si la colonie reste incolore, le germe ne possède pas d'oxydase, le test est négatif.

### ➤ Test de catalase

Il permet la détection de l'enzyme (Catalase) qui décompose le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) avec dégagement d'oxygène.



### ✚ Technique

- Déposer sur une lame propre et sèche une goutte d'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 10 volumes.
- Ajouter à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée l'inoculum bactérien.

### ✚ Résultats

Le résultat positif se traduit par l'apparition de bulles gazeuses (Catalase positive).

## II-5- Extraction des polyphénols de *Quercus ilex.L*

### II-5-1- Echantillonnage :

Les feuilles de *Quercus ilex* ont été récolté au niveau de Kolea. La recolte est faite d'une manière aléatoire a partir de plusieurs sites en Mars 2020 et la confirmation de l'espèce est réalisée au niveau du laboratoire de phytopharmacie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université de Blida 1. Le positionnement géographique de site de récolte est montré dans la (Figure 12).

La plante a été sélectionnée sur la base de sa richesse en composés phénoliques, peu d'études qui se sont intéressées aux extraits phénoliques de cette plante.



Figure 12 : Localisation du site d'échantillonnage (Original, 2020).

### II-5-2- Préparation et conservation du matériel végétal

Le matériel végétal est débarrassé des débris, lavé à l'eau est séché à l'air libre, à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant une dizaine de jours. Toutes ces opérations permettent de pallier la dégradation des composés phénoliques présents.

Bien séchées, ils sont réduits en poudre assez fine à l'aide d'un broyeur électrique. Cette dernière est tamisée pour obtenir des particules de tailles plus ou moins homogènes. La



poudre ainsi obtenue est conservée dans des bocaux hermétiquement fermés à l'abri de la lumière et de l'humidité en vue d'une utilisation ultérieure.

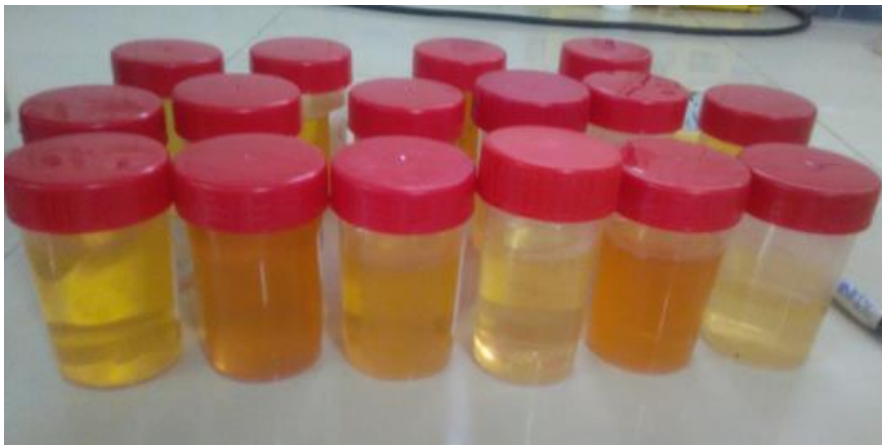
Malheureusement à cause de la pandémie de corona virus (COVID-19), nous n'avons pas pu continuer notre partie expérimentale, exactement pour les méthodes d'antibiogramme, l'identification phénotypique des BLSE même pour les méthodes de l'extraction des feuilles de *Quercus ilex*, le dosage des polyphénols et l'étude de la sensibilité des EBLSE vis-à-vis de l'extrait de *Quercus ilex*, mais on va décrire ces méthodes au niveau des annexes.

# **Chapitre III**

## **Résultats et discussion**

Ce chapitre est divisé en deux parties la première partie comportant les tests bactériologiques réalisés pour l'identification des souches d'entérobactéries productrices de bêta-lactamases (EBLSE) que nous avons effectué au niveau du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida, ou nous avons analysé 35 échantillons (28 urines et 7 selles).

La deuxième partie est théorique comportant les résultats attendus de notre étude, que nous n'avons pas terminé à cause de la pandémie de Corona virus (Covid-19), donc on a essayé d'analyser les résultats des travaux antérieurs sur notre sujet.



**Figure 13** : Echantillons d'urines analysés (Photo originale, 2020)

### III.1. Résultats de notre étude

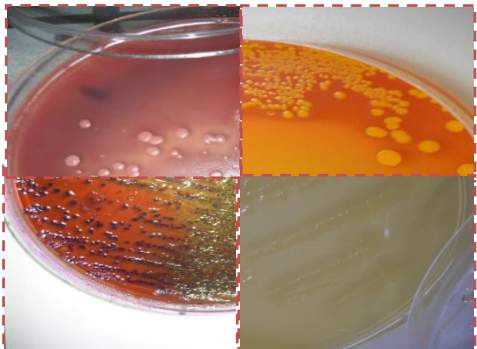
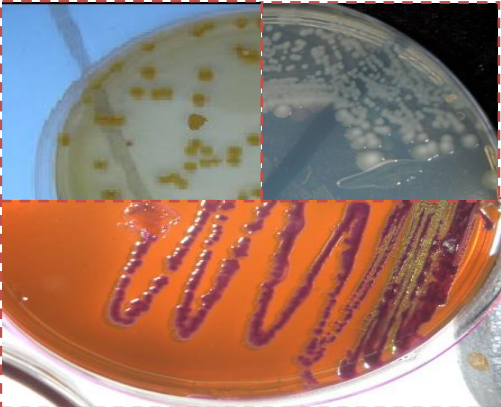
#### III.1.1. Examen macroscopiques des souches isolées

A partir de différents échantillons, l'isolement des souches sur les milieux : gélose EMB, Hektoen, et gélose SS, a permis d'examiner la morphologie des colonies. Certaines colonies se présentent sous une forme granulaire et d'autres ont un aspect muqueux. Leur diamètre est compris entre 1 et 2,5mm, exception faite pour *Escherichia coli* qui donne parfois des colonies naines sur gélose nutritive (**Tableau IX**).

L'observation macroscopique des colonies sur ces milieux sélectifs nous a permis d'orienter l'identification qui a été confirmée par la galerie biochimique API 20<sup>E</sup>.

**Tableau IX :** Description de différentes colonies isolées.

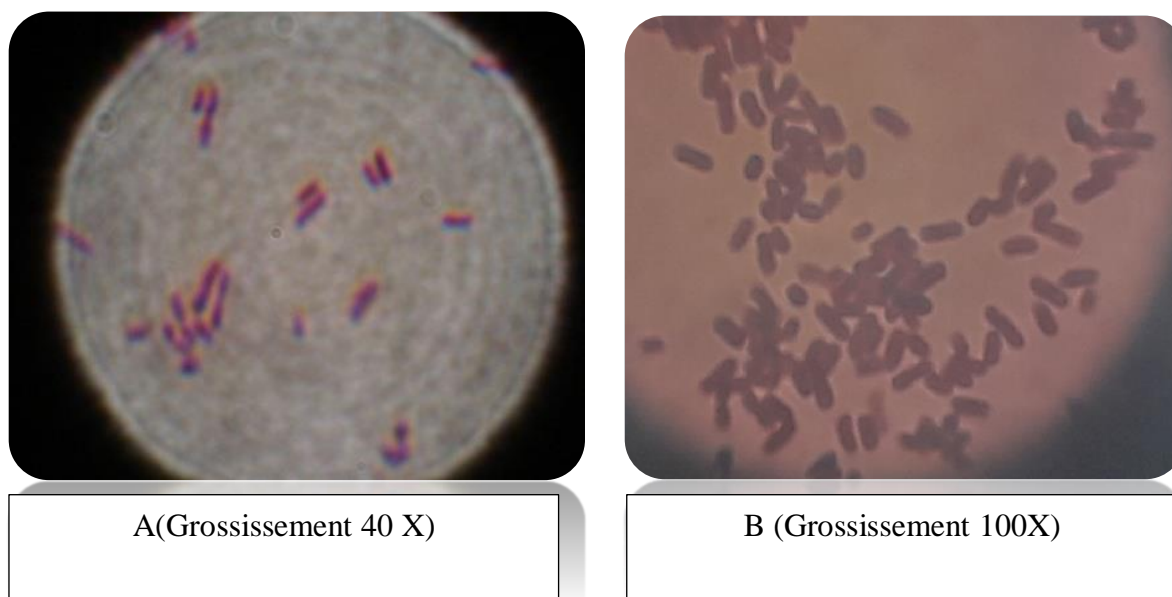
Milieux de cultures	Identification phénotypique des colonies				
	Couleur	Forme Relief	Opacité Consistance	Contour Bords	Taille
<b>EMB</b>	-violet foncé Avec reflet métallique	-Ronde plate	-Opaque Sèche	-lisse	~ 2-3mm
	-rose pigmenté en violet	-ronde convexe	-opaque muqueuse	-Rugueux régulière	~ 4-6mm
	-incolore	-ronde plate	-translucide Sèche	-Lisse Régulier	~1mm
<b>Hektoen</b>	-Saumons + virage vers l'orange	-Ronde, Plate	-Opaque sèche	-Régulière irrégulier rugueux	~ 1-2mm
	-Verdâtre	-Ronde, Bombé	-Opaque crémeuse	-Régulière Lisse	~ 1mm
<b>SS</b>	-incolore	-Ronde convexe	-Opaque crémeuse	-Lisse régulier	~2mm
	-Rose	-Ronde Plate	-Transparente Visqueuse		~1-2mm

<p>➤ <i>Eschérichia coli</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sur EMB : les colonies apparaissent plates d'une couleur violette à reflet métallique, plus ou moins petite.</li> <li>• sur milieu SS : les colonies apparaissent plates, d'une couleur rose – rouge, plus on moins petite.</li> <li>• Sur Hektoen : les colonies apparaissent plates d'une couleur rouge brique (saumon) d'un diamètre de 1-2mm. plus ou moins petite.</li> </ul>	 <p>1) Aspect macroscopique d'<i>E.coli</i> sur différents milieux sélectifs.</p>
<p>➤ <i>Klebseilla SP</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sur EMB : des grosses colonies, convexe, rose au centre violet d'un aspect muqueux peut métallique.</li> <li>• Sur Hektoen : les colonies apparaissent bombé et lisse d'une couleur saumons, contour régulièrement ronde.</li> </ul>	 <p>2) Aspect macroscopique de <i>Klebseilla sp</i> sur milieu Hektoen, EMB, GN.</p>

**Figure 14 :** Aspect macroscopique des souches isolées (originale, 2020).

### III.1.2. L'observation de l'état frais et coloration de Gram

L'observation microscopique a montré que nos souches sont soit mobiles soit immobiles possèdent une forme bâtonnet plus ou moins petite avec des extrémités arrondies. D'après la coloration de Gram, ces derniers apparaissent avec une couleur rose ; ce qui signifie qu'ils font partie des Gram négatifs.



**Figure 15 :** Aspect microscopique d'*Escherichia coli* après coloration de Gram, (A) grossissement 40X et (B) grossissement 100X (**originale, 2020**).

### III.1.3. Identification biochimique

L'identification biochimique en utilisant la galerie API 20<sup>E</sup> (**Figure 15**), nous a permis d'isoler quatre souches d'*E.coli* et une souches de *Klebsiella pneumoniae*.

*Escherichia coli* : ONPG(+); LDC, ODC(+); CIT(-); H<sub>2</sub>S(-); URE(-); TDA(-); IND(+); VP(-) GLU(+) (**Figure 16 C**)

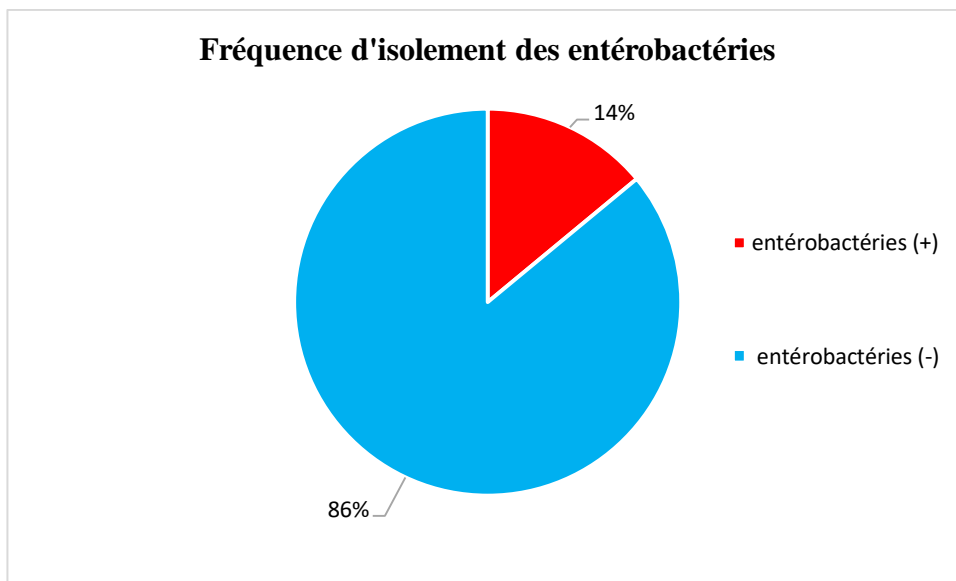
*Klebsiella pneumoniae*: ONPG(+); LDC(+); ODC(+); CIT(+); H<sub>2</sub>S(-); URE(+); TDA(-); IND(-); VP(+) GLU(+)



**Figure 16** : Résultat de la microgalérie API 20<sup>E</sup> des souches isolées (A) avant l'ensemencement, (B) *Klebsiella pneumoniae*, (C) *Escherichia coli* (originale, 2020).

### III.1.4. Fréquence d'isolement des entérobactéries

Parmi 35 prélèvements analysés, 5 souches ont été isolées et identifiées avec une fréquence d'isolement qui est de 14% (5/35) et le reste des prélèvements qui présente 86% (30/35), absence de germe dans les prélèvements.



**Figure 17** : Fréquence d'isolement des entérobactéries.

### III.1.5. Répartition des entérobactéries selon le sexe

D'après les résultats, les infections aux entérobactéries touchent plus la population féminine avec une fréquence de 80%, par rapport à la population masculine qui représente 20%.

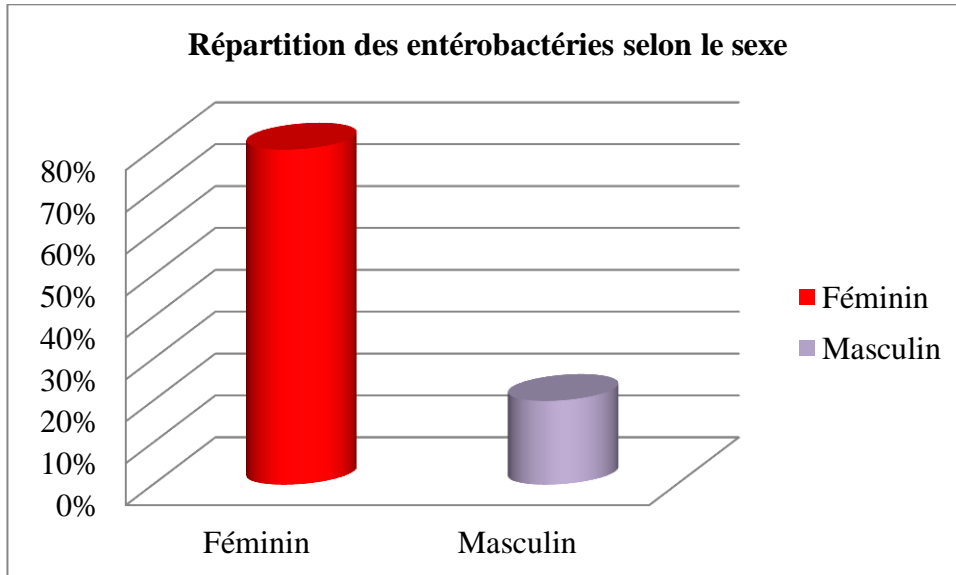
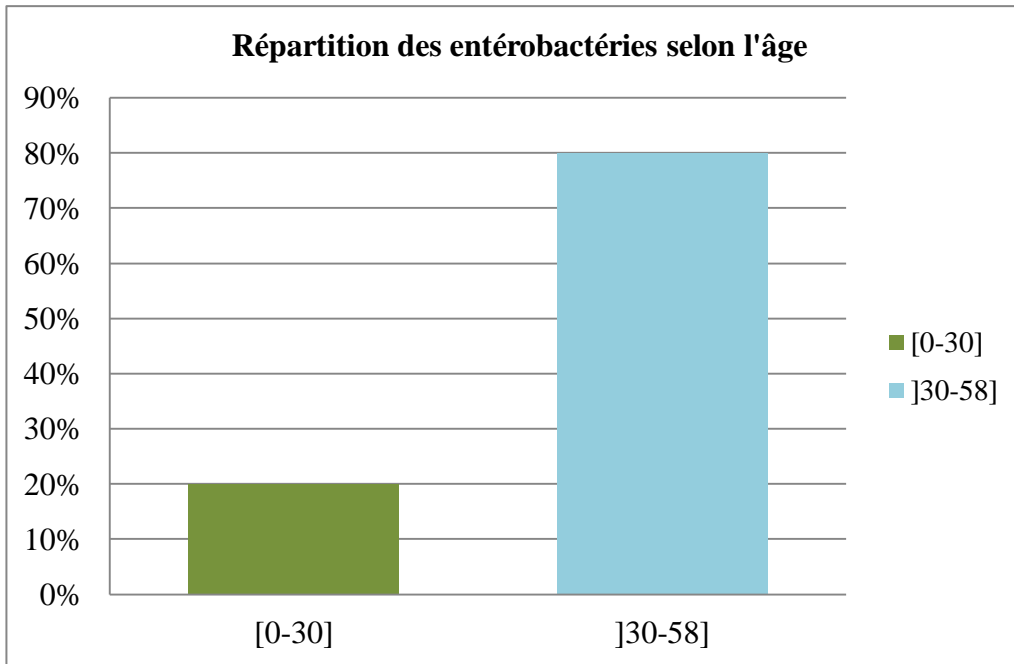


Figure 17: Répartition des entérobactéries selon le sexe.

### III.1.6. Répartition des entérobactéries selon l'âge

Le taux le plus élevée des entérobactéries est enregistré chez la tranche d'âge] 30-58] avec un pourcentage de 80%, suivi de la tranche d'âge [0-30], avec un pourcentage de 20%.

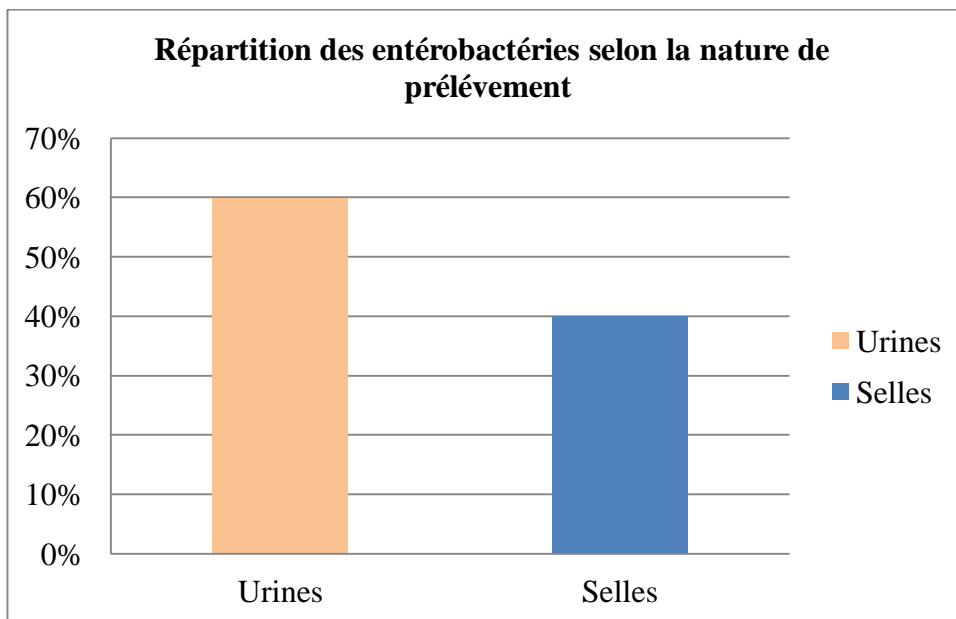




**Figure 19 :** Répartition des entérobactéries selon l'âge.

### III.1.7. Répartition des entérobactéries selon la nature de prélèvement

Le taux le plus élevé des entérobactéries est représenté dans les prélèvements urinaires 60%, Suivi par les prélèvements des selles avec 40%.



**Figure 20 :** Répartition des entérobactéries selon la nature de prélèvement.

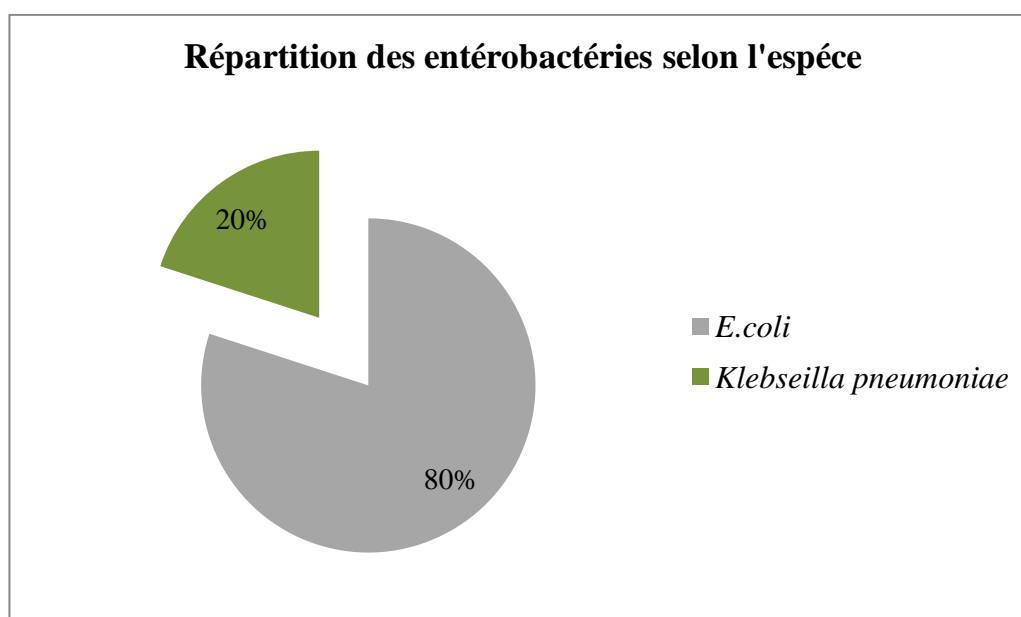
### III.1.8. Répartition des entérobactéries selon les espèces

D'après le tableau ci-dessous, *E.coli* est l'espèce la plus fréquemment isolée avec un taux de 80% suivi par *Klebsiella pneumoniae* avec un taux de 20%.

A partir de 35 échantillons analysés on a isolé 4 souches d'*E.coli*, et une seule souche de *Klebsiella pneumoniae* (Tableau X).

**Tableau X** : Répartition des entérobactéries selon l'espèce.

Espèces	Le nombre	Le taux
<i>E.coli</i>	4	80%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	20%



**Figure 21**: Répartition des entérobactéries selon l'espèce.

### III.2. Analyse détaillée des études antérieures

Pour étudier la prévalence des souches EBLSE nous avons comparé les résultats de douze études antérieures (Tableau XI).

**Tableau XI** : Prévalence des EBLSE(+) selon les études précédentes.

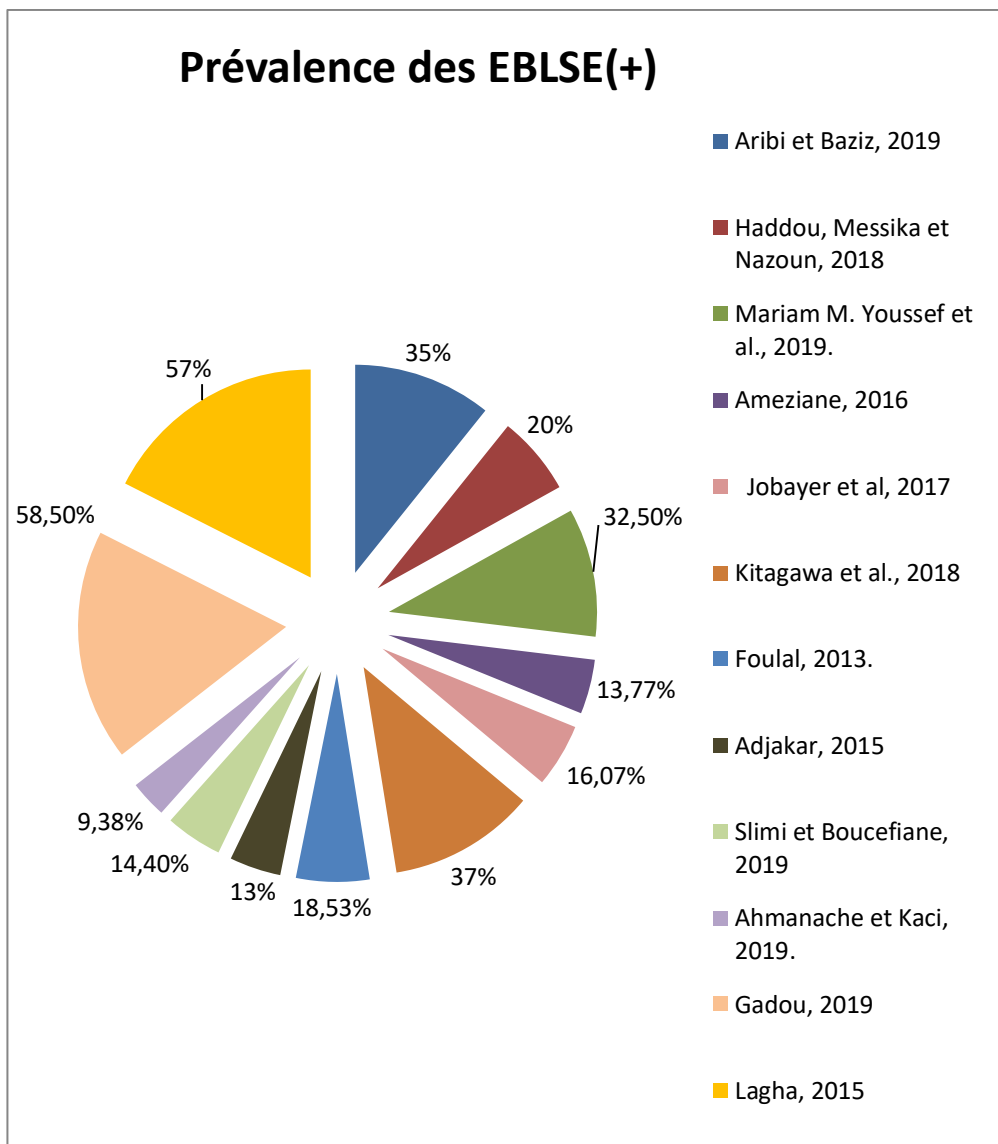
	Lieu d'étude	Taille de l'échantillon	Nature de prélèvement	Prévalence des EBLSE	Espèces impliquées	Service d'isolement
<b>(Aribi et Baziz, 2019)</b>	Constantine Algérie	751	Urines Pus	261 (35%)	<i>E. coli</i> (40%) <i>Klebsiella pneumoniae</i> (43%) <i>Enterobacter spp.</i> (5%) <i>Citrobacter spp</i> (4%) <i>Proteus spp</i> (4%) <i>Serratia spp</i> (2%) <i>Morganella morganii</i> (2%)	chirurgie générale (18%) orthopédie (17%) médecine interne (17%) réanimation (8%) pédiatrie (7%) urgences (5%) Néphrologie (4%) Externe (10%)
<b>(Haddou et al., 2018)</b>	Blida Algérie CHU. D'EL KETTAR)	2487 prélèvements	Urines Pus LCR	62 (20%)	<i>E. coli</i> (43%) <i>Klebsiella pneumoniae</i> (42%) <i>Klebsiella oxytoca</i> (5%) <i>Enterobacter cloacea</i> (8%) <i>Citrobacter koseri</i> (2%)	Non déterminé
<b>(Mariam et al., 2019)</b>	Egypte	310	Urines	26 (32,50%)	<i>E. coli</i> (76.9%) <i>Klebsiella pneumoniae</i> (19.2%) <i>Enterobacter spp</i> (3.8%)	Gynécologie
<b>(Ameziane, 2016)</b>	Maroc	668	Urines	92 (13.77 %)	<i>E. coli</i> (11.36%) <i>Klebsiella pneumoniae</i> (28.26%) <i>Klebsiella oxytoca</i> (24.24%) <i>Enterobacter cloacea</i> (20%)	Urologie (79.36%) Chirurgie viscérale (7.93%) Réanimation (4.76%) médecine Externes
<b>(Jobayer et al., 2017)</b>	Bangladesh Dhaka,	1114	Sang Pus autres	179 (16,07%)	<i>Escherichia coli</i> (15.75%) <i>Pseudomonas</i> (14.01%) <i>Proteus</i> (36.84%) <i>Klebsiella</i> (18.57%)	chirurgie générale, médecine interne, urgences Gynécologie.

					<i>Acinetobacter</i> (4%)	
<b>(Kitagawa et al., 2018)</b>	Indonesia and Japan	Non déterminé	Urines	37%	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>	N.D
<b>(Foulal, 2013)</b>	RABAT(Maroc)	1721	Respiratoires Pus des plaies opératoires Urines Cathéter LCR Hémocultures Ecouvillonnage anal, buccal, et vaginal.	319 (18.53%)	<i>Citrobacter freundii</i> (1%) <i>Enterobacter spp</i> (15%) <i>Escherichia coli</i> (26%) <i>Klebsiella oxytoca</i> (4%) <i>Klebsiella pneumoniae</i> (45%) <i>Proteus mirabilis</i> (1%) <i>Providencia stuartii</i> (1%) <i>Serratia spp</i> (7%) <i>Morganella morganii</i> (0%) <i>Proteus vulgaris</i> (0%)	Bloc opératoire (17.56%) Cardiologie (20%) Chirurgie (21.36%) Dermatologie (10%) Endocrinologie (8.70%) Gynécologie (6.38%) Médecine (19.54%) Néphrologiehemodialyse (14.86%) Neurologie (20.70%) Pneumologie (16.67%) Réanimation (32.75%) Rhumatologie (4.08%) Urologie (14.71%) Externe (6.02%)
<b>(Adjakar, 2015)</b>	Merrakech (Maroc)	2563	ECBU Prélèvement distal protégé Pus Hémoculture Autres	345 (13%)	<i>Kelbsiella pneumoniae</i> (18%) <i>Escherichia coli</i> (65%) <i>Enterobacter cloacae</i> (5%) <i>Klebsiella oxytoca</i> (2%) <i>Proteus mirabilis</i> (5%)	Non déterminé
<b>(Slimi et Boucefiane, 2019)</b>	Ain defla (alger)	1018	Urines Selles Pus Perte vaginale	14.4%	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherischia coli</i> <i>Enterobacter spp</i>	Non déterminé

<b>(Ahmanache et Kaci, 2019)</b>	Bouira, Laboratoire privé (Algérie)	64	Urines Pus Selles Liquide de ponction	9.38%	<i>Escherichia coli</i> (50%) <i>Enterobacter sp</i> (33.33%) <i>Klebsiella pneumoniae</i> (17%)	Non déterminé.
<b>(Gadou, 2019)</b>	Cote d'Ivoire	153	Urines Sang Liquide pleural LCR Liquid d'ascite Pus	90 (58.5%)	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	Diabétologie Urologie
<b>(Lagha, 2015)</b>	Tlemcen (Algérie)	806	Urines Catheter Pus Hémoculture	405 (57%)	<i>Escherichia coli</i> (43%) <i>Klebsiella pneumonia</i> (30%) <i>Enterobacter cloacae</i> (20%) <i>Citrobacter freundii</i> (7%)	Orthopédie (30%) Réanimation (27%) Médecine femme (20%) Pneumologie (7%) Gynéco-obstétrique (7%) Pédiatrie (3%) Chirurgie générale (3%) Médecine homme (3%)

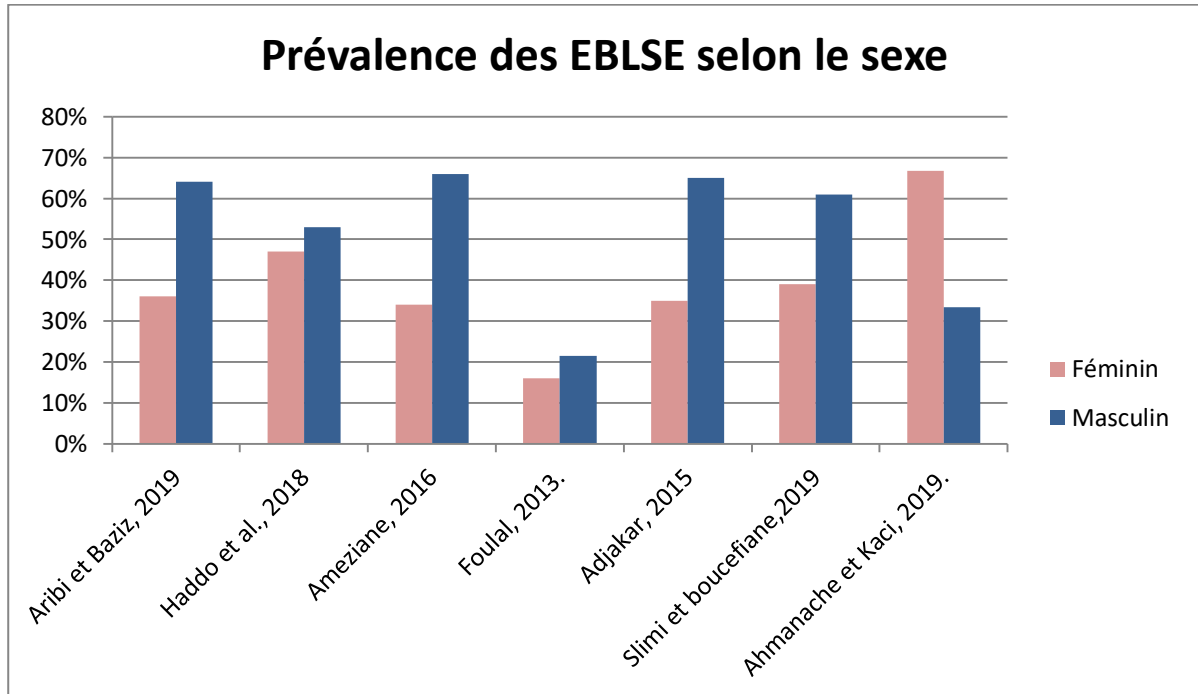
### III.2.1. Prévalence des souches d'entérobactéries BLSE (+) par étude

Selon les résultats schématisés dans la (figure 20), les fréquences diffèrent d'une étude à une autre. Elle varie de 9.31% (Ahmanache et Kaci, 2019) en Bouira à 58.5% en Côte d'Ivoire selon (Gadou, 2019). On remarque qu'il y a des études qui ont enregistré des fréquences très élevées par rapport aux autres. (Gadou, 2019) et (Lagha, 2015), ils ont enregistré des prévalences de 58.5% et 57% respectivement. En revanche d'autres études ont enregistré des taux plus au mois faibles (Ahmanache et Kaci, 2019 ; Adjakar, 2015).



**Figure22:** Prévalence des EBLSE(+) selon les études précédentes.

### III.2.2. Prévalence des EBLSE selon le sexe



**Figure 23** : Prévalence des EBLSE selon le sexe.

D'après les résultats des études analysées (**Figure 23**), on remarque une prédominance masculine à l'exception de l'étude (**Ahmanache et Kaci, 2019**). Ces résultats corroborent avec celles de (**Touchane et Ghalmi, 2015**) qui ont révélé une prédominance féminine avec un taux de 74% contre 26% pour le sexe masculin.

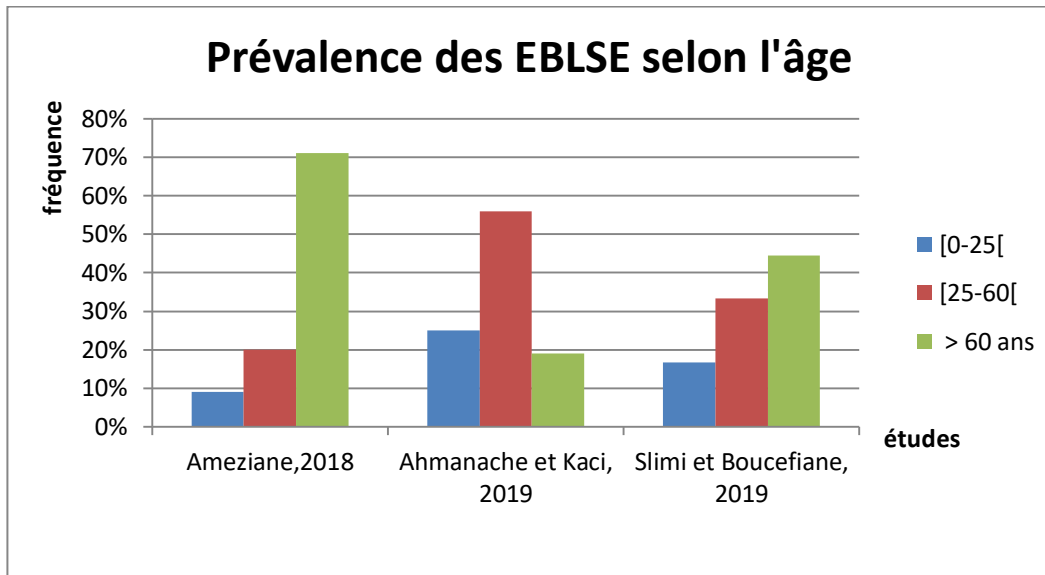
Les résultats de ces deux études sont expliqués peut être par le fait que la plus part des échantillons analysés ce sont des urines. Selon (**Denis, 2007**), la fréquence élevée des infections urinaires chez la femme et la jeune fille est expliquée par des causes anatomiques et physiologiques ;

- 1- L'urètre court s'ouvrant à la vulve au voisinage du vagin et de l'anus.
- 2- Les glandes périurétrales n'ont pas d'activité antibactérienne contrairement au liquide prostatique (**Saighi et al., 2004**).
- 3- Les rapports sexuels favorisant la progression des bactéries urétrales dans la vessie (**Flam, 2011**).

### III.2.3. Prévalence des EBLSE selon l'âge

La comparaison de la prévalence des EBLSE c'était difficile car les tranches d'âge étudiées diffèrent d'une étude à une autre. Globalement les résultats ont montré une prédominance chez les patients plus de 60 ans par rapport aux autres tranches d'âges (**Figure 24**) avec une fréquence de 71% d'après l'étude (**Ameziane, 2016**), et de 44,44% d'après celle de (**Slimi et Boucefiane, 2019**).

En revanche, (**Ahmanche et Kaci, 2019**), a révélé que la tranche d'âge [25 et 60[était la plus touchée. Ces résultats ont été expliqués par le fait que les personnes âgées cumulent plusieurs facteurs de risque : vieillissement, fragilité du système immunitaire, alitement, hospitalisation, sonde urinaire, troubles neurologiques et maladies chroniques.



**Figure 24** : Prévalence des EBLSE selon l'âge.



### III.2.4.Prévalence des EBLSE selon la provenance

En se basant sur l'analyse des résultats fournis par ces études et leur comparaison (Tableau XI), on remarque que la provenance des EBLSE dépend de : la nature de prélèvement et le service d'origine des patients et l'espèce bactérienne causée.

#### ✚ La prévalence des EBLSE selon la nature de prélèvement

D'après les résultats résumés dans le (tableau XII), on note que le type de prélèvement joue un rôle très important à la provenance des souches d'EBLSE (+).

Malgré la variété des prélèvements (urines, pus, LCR, selles, cathéters,...), on remarque que les urines possède une fréquence très élevée des EBLSE (+) par rapport aux autres prélèvements ce qui montre que les urines sont la source principale des souches d'EBLSE (+).

Toutes les études antérieures confirment que l'urine présente une fréquence très élevée, suivi par le pus. Par contre (Jo bayer et al., 2017), ont montré que 53% des EBLSE proviennent des écouvillonnages de plaies.

**Tableau XII :** Comparaison de pourcentage des EBLSE entre trois types de prélèvements.

Etude	Urines	Pus	Hémoculture
(Aribi et Baziz, 2019)	45%	45%	-
(Haddou et al., 2018)	76%	16%	-
(Mariam et al., 2019)	32,%	-	-
(Ameziane, 2016)	13 ,77%	-	-
(Foulal, 2013)	48%	9%	11%
(Kitagawa et al., 2018)	37%	-	-
(Slimi et Boucefiane, 2019)	77%	3%	-
(Gadou, 2019)	63 ,6%	-	80%
(Ahmanache et Kaci, 2019)	92,19%	6 ,25%	-
(Lagha, 2015)	40%	13%	7%

### ✚ La prévalence des EBLSE selon le service d'origine des patients

La prévalence des souches d'EBLSE (+) dépend aussi de service où le patient est soignée. A partir d'analyse des résultats antérieurs, nous avons remarquées une variété des services ce qui explique que les BLSE se trouvent partout dans le milieu hospitalier.

La fréquence des souches EBLSE (+) dans les service diffère d'une étude à une autre et d'un hôpital à un autre, mais on note que presque tous les services hospitaliers sont contaminés par ces germes pathogènes même des service où on a un nombre de patients plus au moins faible comme le service d'orthopédie qui a présenté un taux de 30% selon (**Lagha, 2015**) et le service rhumatologie qui a enregistré une fréquence de 40,8% selon (**Foulal, 2015**).

**Tableau XIII** : Comparaison de pourcentage des EBLSE entre les trois services.

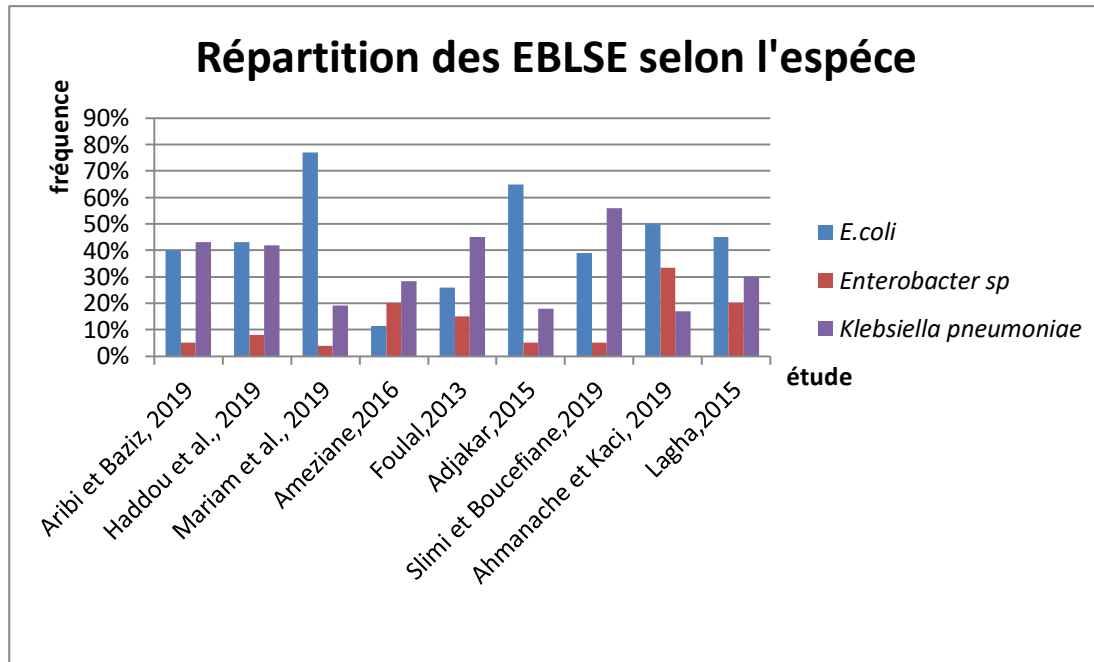
Etudes	Chirurgie générale	Réanimation	Orthopédie
( <b>Aribi et Baziz, 2019</b> )	18%	8%	17%
( <b>Ameziane, 2016</b> )	7,93%	4,76%	-
( <b>Foulal, 2013</b> )	17,56%	32,75%	-
( <b>Lagha, 2015</b> )	3%	27%	30

### ✚ Prévalence des EBLSE selon la répartition des espèces

Dans l'ensemble des entérobactéries isolées, *Escherichia coli* domine nettement le profil épidémiologique des EBLSE dans la plus part des études avec une fréquence de 77% selon (**Mariam et al., 2019**) et de 65% selon (**Adjakar, 2015**), suivi par l'espèce *Klebsiella pneumoniae* et *Enterobacter sp* (**Tableau XI**).

Au contraire, les trois études (**Foulal, 2013 ; Slimi et Boucefiane, 2019 ; Ameziane, 2016**) ont révélé une prédominance de l'espèce *Klebsiella pneumoniae*.

Enfin, (**Aribi et Baziz, 2019**) ont enregistré des fréquences presque similaires d'*Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*, 40% et 43% respectivement.



**Figure 25 :** Répartition des EBLSE selon l'espèce.

En effet, la pathogénicité d'*Escherichia coli* est due aux adhésines qui lui permettent de se lier aux épithéliums et aux muqueuses (**Le minor et al., 1989**), mais aussi à d'autres facteurs de virulence variant d'une souche à une autre.

Les infections causées par les *Klebsiella* BLSE présentent un risque accru d'échec thérapeutique et sont associées à des hospitalisations prolongées et des surcoûts liés aux soins (**Rodriguez et Struelens, 2006**). Les bactériémies causées par les souches *Klebsiella* BLSE+ sont retrouvées associées à une mortalité plus élevée que celle causées par des souches *klebsiella* non productrices de BLSE.

Cette mortalité élevée est en partie due d'une part à la non détection de la production de la BLSE (**Navon-Venezia et al., 2004**) et d'autre part, la présence de plasmides conjugatifs qui peuvent porter plus d'un gène codant pour ces BLSE, comme c'est le cas de l'épidémie à *Klebsiella pneumoniae* BLSE+ au Brésil où des gènes codant pour les enzymes CTX-M et TEM ont été identifiés sur le même plasmide (**Rafales et al., 2003**).

### III.2.5. Résistance des souches EBLSE aux antibiotiques

Tableau XIV: Comparaison des pourcentages de résistances des EBLSE.

Etude	Pays	Ciprofloxacine	Amikacine	Gentamycine	Fosfomycine	Imipénème
(Ben Haj Khalifa <i>et al.</i> , 2009)	Tunisie	67.5 %	10%	92.5%	17.5%	0%
(Fouquet M <i>et al.</i> , 2005-2009)	France	74 %	-	41%	-	0%
(Hailaji N.S.M <i>et al.</i> , 2016)	Mauritanie	33.6 %	-	19.5%	21.2%	0%
(Zohreh <i>et al.</i> , 2007)	Iran	35 %	10%	33.5%	50%	0%
(EL Bouamri .M.C. <i>et al.</i> , 2008-2012)	Maroc (Marrakech)	82%	51%	74%	13%	10%
(Romli <i>et al.</i> , 2010)	Maroc (Rabat)	76%	26 %	86%	20%	0%
(Lahlou <i>et al.</i> , 2006-2008)	Maroc (Meknès)	80%	60 %	95%	-	0%
(Aribi <i>et Baziz</i> , 2019)	Constantine Algérie	28%	5%	25%	-	1%
(Haddou <i>et al.</i> , 2018)	Blida Algérie C.H.U. D'El KETTAR	30%	1%	30%	-	1%
(Mariam <i>et al.</i> , 2019)	Egypte	45%	0%	-	5%	0%
(Ameziane, 2016)	Maroc(Meknés)	91,3%	1,1%	62%	5,4%	5,4%
(Foulal, 2013)	Rabat (Maroc)	75,55%	15.92%	75%	-	3,44%
(Ahmanache <i>et Kaci</i> , 2019)	Bouira (Algérie)	-	-	-	-	0%
(Slimi <i>et Boucefiane</i> , 2019)	Ain defla (Alger)	44,44%	0%	30%	0%	0%

---

Selon les études observées dans le tableau au-dessus, on remarque que les EBLSEs sont très résistantes vis-à-vis de la gentamycine, la ciprofloxacine et elles sont moins résistantes par rapport à l'imipénème.

D'après (**Lahlou et al., 2006-2008**), la fréquence de résistance des EBLSE à la gentamycine est très significative avec une fréquence de 95%, ce qui était remarquable aussi par rapport à l'étude de (**Ben Haj Khalifa et al., 2009**) avec une fréquence de 92.5%. L'antibiotique qui marque aussi une résistance très élevée est celui de ciprofloxacine avec une fréquence de 91.3% selon l'étude (**Ameziane, 2016**) suivie par l'étude (**EL Bouamri .M.C. et al., 2008-2012**) avec une fréquence de 82%.

Par contre EBLSEs marquent une résistance très faible vis-à-vis l'imipénème par rapport aux autres antibiotiques. Selon l'étude (**EL Bouamri .M.C. et al., 2008-2012**), les EBLSEs sont résistantes avec une fréquence de 10% suivie par l'étude (**Ameziane, 2016**) avec une fréquence de 5.4%. Certaines études ont marqué une fréquence de 0% de résistance à cet antibiotique comme celle (**Ahmanache et Kaci, 2019 ; Slimi et Boucefiane, 2019 ; Mariam et al., 2019**).

# **Conclusion**

## Conclusion

De nos jours, un grand nombre de composés d'origine végétale sont utilisés en médecine moderne et une majorité de ceux-ci le sont selon leur usage traditionnel. Des 25 composés pharmaceutiques les plus vendus à travers le monde, 12 proviennent de produits naturels, mais jusqu'ici, environ 10% seulement des 250 000 espèces de plantes inventoriées sont fait l'objet de recherches de molécules bioactives.

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'activité antibactérienne des extraits phénoliques de feuilles de la plante médicinale *Quercus ilex*.L vis-à-vis des souches d'entérobactéries productrices de Béta-lactamases EBLSE qui posent un grand problème de santé publique.

D'après notre étude et à partir des résultats des études antérieures, on a pu affirmer que les extraits de feuilles de *Quercus ilex* peuvent être une alternative de traitement des infections causées par ces germes pathogènes.

Ces feuilles sont très riches en composés phénoliques et beaucoup d'études ont montré que les différents constituants de la plante de *Quercus ilex* ont une activité antimicrobienne, donc il est très important de valoriser cette plante et de l'utiliser comme un remède naturel soit seul soit en association avec les antibiotiques pour minimiser les conséquences de l'émergence de l'antibiorésistance.

Les perspectives sont :

- Il est souhaitable d'étudier l'activité antibactérienne des extraits de *Quercus ilex* L.
- Etude de l'effet inhibiteur de ces extraits sur différentes  $\beta$ -lactamases in vitro.
- La recherche de l'activité antioxydante de *Quercus ilex* l.
- Isolement et identification des molécules bioactives.
- Recherche l'effet synergétique entre les bétalactamines et les extraits de *Quercus ilex*.L.

# **Références Bibliographiques**



## Références bibliographiques

- **AARN. Algerian Antimicrobial Resistance Network. (2019).** 18<sup>ème</sup> rapport de la surveillance des bactéries aux antibiotiques », Ministère de la santé et de la population Algérie. <http://www.sante.dz/aarn/documents/rapports/Rapport2017.pdf>[consulté le 01/07/2020].
- **Adjakar S. (2015).** Les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) : Profil épidémiologique actuel et conséquences thérapeutiques. Thèse de médecine, Université Cadi Ayyad, Faculté de médecine et de pharmacie Marrakech.
- **Adwan G., Abu-Shanab B., Adwan K. et Abu-Shanab F. (2006).** Antibacterial Effects of Nutraceutical Plants Growing in Palestine on *Pseudomonas aeruginosa*. *Turkisch Journal of Biology*. 30:239-242.
- **Ahmad I., Mehmood Z .et Mohammad F. (1998).** Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. *Ethnopharmacology* 62: 183–193.
- **Ahmanache S. et Kaci O. (2019).** Etude de la résistance des bacilles à Gram négatif aux  $\beta$ -lactamines à partir de divers prélèvements pathologiques. Mémoire de master, Université Akli Mohand Oulhadj-Bouira, Faculté des Science de la Nature et de la Vie et des Sciences de la terre, p 32-34.
- **Aissa D. (1983).** Étude sur la germination des semences de chêne vert (*Quercus ilex* L.) I.- Influence de l'arbre producteur et de la taille des semences, *Rev. Cytol. Biol. Végét. Bot.* 6 : 5–14.
- **Ait Kaci O. (2019).** Portage-dépistage des entérobactéries multi-résistantes chez les sujets admis en réanimation, et des sujets atteints d'hémopathies malignes. Thèse de pharmacie, Université Saad Dahlab –Blida 1, Faculté de médecine.
- **Ait saada D. (1997).** Essai nutritionnels des farines de gland en alimentation du poulet de chair.
- **Ait Saada D., Ait Chabane O., Selselet-Attou G., Bouderoua K. et Kedam R. (2017).** Essais nutritionnels de la farine des glands en alimentation du poulet de chair (caractéristiques organoleptiques- biochimiques- digestives et diététiques). 1-29.

- **Alka C.et Siddarth NR. (2017).** Antibacterial Activity of *Punica granatum* (Pomegranate) Fruit Peel Extract against Pathogenic and Drug Resistance Bacterial Strains. *J.Curr.Microbiol.App.Sci.* Volume (n°12) .pp: 3802-3807
- **Amessis-Ouchemoukh N., Ouchemoukh S., Mezianta N., Idiria Y., Hernanzc D., Stincod CM., Rodriguez-Pulido FJ., Heredia FJ., Madania K . et Luis J .(2017).** Bioactive metabolites involved in the antioxidant, anticancer and anti calpain activities of *Ficus carica* L., *Ceratonia siliqua* L. and *Quercus ilex* L. extracts. *Ind Crops Prod* 95: 6–17.
- **Ameziane A. (2016).** Profil épidémiologique des entérobactéries productrices de BLSE uropathogènes au sein de l'hôpital militaire Moulay Ismail de Meknès durant l'année 2015.thèse de doctorat, p 26-33.
- **Aribi M. et Baziz M. (2019).** Caractérisation des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi isolées à l'Hôpital Militaire Régional Universitaire de Constantine (HMRUC).Mémoire de master ,Université des Frères Mentouri Constantine ,p 31-40.
- **Audigié CL., Dupont G.et Zonszain F.(1995).** Principes des méthodes d'analyse biochimiques , Doin Editeurs Paris tome 1 , p44.
- **Avril J.M., Dabernat H. et Monteil D.H. (2000).**Bacteriologie Clinique.3ème Ed.
- **Avril JL.,Dabernat H., Denis F., et Monteil H.(1992).**Bactériologie clinique. Paris : ELLIPSES ,602P .
- **Baig A. (2011).** Biochemical Composition of Normal Urine. *Nat. Precedings*.
- **Bakhoum I.M.N.S. (2004).** Contrôle de qualité et validation de différentes méthodes d'identification bactérienne. Thèse de Pharmacie, Université Cheikh AntaDiop.
- **Barbero M. (1980).** Les fructifères de la zone bioclimatique méditerranéenne à chêne pubescent: structure, dynamique, zonage, utilisation et protection, biomasse. *Forêt méditerranéenne*.3. N 2, pp 101-
- **Bayer E., Buttler K.P., Finkenzeller X. et Grau J. (2005).**Guide de la flore méditerranéenne. Caractéristiques, habitat, distribution et particularités de 536 espèces. (Ed.) Del chaux et Nestlé. 287p.
- **Belarbi M. (1990).**Contribution à l'étude des composés chimiques des glands des différentes espèces. Mémoire de Magistère en biologie. Université de Tlemcen. P187.

- **Ben Haj K . et Khedher .M. (2009).** Epidémiologie des souches de *Klebsiella spp.* uropathogènes productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi dans un hôpital universitaire Tunisien .Pathologie biologique .60(2) :1-5.
- **Benia F. (2010).** Étude de la faune entomologique associée au chêne vert (*Quercus ilex* L.) dans la forêt de Tafat (Sétif, Nord-est d'Algérie) et bio-écologie des espèces les plus représentatives. Thèse de doctorat, Université Ferhat Abbas, Sétif.
- **Bennani M. (2014).** Recherche d'entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu isolées dans les selles .Projet de Fin d'étude (licence Science et Technologies Biologique et Santé). Université Sidi Mohammed Ben Abdallah.
- **Berahou A., Auhmanib A., Fdil N., Benharref A., Jana M. et Gadhi CA. (2007)** .Antibacterial activity of *Quercus ilex* barks extracts. J Ethnopharmacol 112: 426–429.
- **Bonfils M. (2012).** Les glands de chêne. Las Encatadas011300 Festes ST. André. France.P12.
- **Bouderoua K. (1995).** Caractéristique biochimique et aptitudes nutritionnelles des glands de chêne vert et de chêne liège en alimentation des poulets de chair ; Thèse de Magistère en science agronomie l'INA Alger. P 107.
- **Bradford PA. (2001).** Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews* **14**(4): 51–933. Casablanca ; Thèse de pharmacie ; *Université* Cheikh Anta Diop de Dakar, 2005, N° 28.souches d'entérobactéries productrices de BLSE au CHU Ibn Rochd.
- **Cantos E., Espin J., Carlos Lopez-Bote C., De La Hoz L., Ordonez J.A. et Tomas-Barberan F.A. (2003).** Phenolic compounds and fatty acids from acorns (*Quercus spp.*): the main dietary constituent of free ranged iberian pigs. J. Agric.Food Chem. 51, 6248–6255.
- **Carrol K.C., Butel J.S. et Morse S.A.(2015).** Jawetz melnick et adelbergs madical microbiology. McGraw-Hill Education,Edition 27,880p.
- **Chanoine N. (2012).** Les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi : où sont les dangers de Réanimation 21(3), 260–267.
- **CMIT. (2018).** Maladies infectieuses et Tropicales-Préparation d'ECN –Tous les items d'infectiologie .Alinéa Plus-CMIT ,Edition 5,324 p.Item 154.

- **Comte D., Petitpierre S., Spertini F. et Bart P-A. (2012).** Allergie aux b-lactamines. *Revue Médicale Suisse* **8** : 836-42. Confiture de datte, de sirop de datte et de confiture de gland de chêne vert. Thèse de master. Université M'hamed Bougara Boumerdes. 55 p.
  - **Costeron J.w. et Irvin R.T. (1981).**The bacterial glycocalyx . In: nature and disease .Ann. Rev. Microbiol .35:299-324.
  - **Courvalin P LR. et Bingen E. (2006).** Antibiogramme. ESKA, Paris.
  - **Custódio L., Patarra J., Albericio F., Neng N.R., Nogueira J.M.F.et Romano A. (2013).** Extracts from *Quercus sp*: acorns exhibit in vitro neuro protective features through inhibition of cholinesterase and protection of the humandop aminergic cell line SH-SY5Y from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity.Ind. Crops Prod. 45, 114–120.
  - **Debib A., Tir-Touil A ., Mothana R.A., Meddah B. et Sonnet P. (2014).** Phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of two fruit varieties of Algerian *Ficus carica* L. J. Food Biochem. 38, 207–215.
  - **Decoster A. (2005).** Entérobactéries [Internet]. FLM. 2005. p. 1–16. Available from: <http://anne.decoster.free.fr/btelechar/bpoly/enteroba05.pdf>
  - **Decoster A. et Lahieu N. (2006).** Entérobactéries [Internet]. FLM. p. 1–16. Available from: <http://anne.decoster.free.fr/btelechar/bpoly/enteroba05.pdf>.
- 1- **Decoster A.**Entérobactéries [Internet].FM.2005.P.1-16.Available from :<http://anne.decoster.free.fr/btelechar/bpoly/enteroba05.pdf>.
- **Denis B.,jérôme L.et Michel G.(2002).** La substitution des solvants par le diméthylsulfoxyde .IRSST-Direction des communications 505 ,boul. de maisonneuve ouest Montréal(Québec). Institut de recherche Robert-sauvé en santé en en sécurité du travail .
  - **Denis F. et Ploy M.-C. (2007).** Bactériologie médicale: techniques usuelles. Elsevier Masson. p 316-318.
  - **Denis F. et Ploy M.-C. (2009).** Bactériologie médicale: techniques usuelles. Elsevier Masson. p 316-318.

- **Djennane F., Mohammedi D., Tiouit D., Touati D. et Rahal K. (2009).** Institut Pasteur d'Algérie : techniques microbiologiques (examen cytobactériologique des urines) « E.C.B.U », édition 2009.
- **Djeridane A., Yousfi M., Brunel JM. et Stocker P. (2010).** Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the *in vitro* antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food Chem Toxicol* 48: 2599–2606.
- **Doit C., Mariani-Kurkdjian P. et Bingen E. (2010).** Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu. *Archives de Pédiatrie* 17: S140–S144.
- **Drame B. (2001).** Micro-méthodes d'identification et d'étude de la sensibilité des entérobactéries : intérêts thérapeutiques et diagnostiques. Thèse de Pharmacie, Université Cheikh Anta DIOP, Dakar, Sénégal. 115 p.
- **Ebrahimi NS., Hadian J., Mirjalili MH., Sonboli A. et Yousefzadi M. (2008).** Essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food chemistry*. Volume (n°110). pp: 927-931.
- **Eckart M., Rosemarie B., Eckhart B., Domien. et Andreas Pfennig. (2008).** *Liquid-Liquid Extraction, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- **El Bouamri MC., Arsalane L., Kamoun Y., Berraha M. et Zouhair S. (2008-2012).** Evolution récente du profil épidémiologique des entérobactéries uropathogènes productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi à Marrakech, Maroc. *Prog Urol*. 24(7):451–5.
- **Elliott T., Casey A., Lambert P.A., et Sandoe J.(2012).** Lecture Notes:medical microbiology and infection.Wiley, Edition 2.288p.EMC Maladies infectieuses.1:129-202.
- **Eloff JN. (1998).** which extract should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *J Ethnopharmacol* 60: 1–8. 2ème édition.8-22 P.
- **Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M .et Abdely C. (2008)** .Phenolic composition of *Cynaracardunculus*L, organs and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*. Volume (n°331). pp:372-379.

- **Flam T. (1999).** Uropage/Pr. Thierry Flam. France, 2000-2011, édition, Maloine, Paris
- **Foudihl M. (1990).** Contribution à l'étude de la valeur nutritionnelle du gland. Possibilité de son incorporation dans l'alimentation animale. Mémoire d'ingénieur agronome I.N.E.S de biologie Tizi-Ouzou. P 98.
- **Foulal L. (2013).** Profil épidémiologique des entérobactéries sécrétrices des bêta-lactamase à spectre élargi diagnostique au sein de laboratoire de microbiologie CHU du Rabat .thèse de doctorat, p 75-82.
- **Fouquet M., Morange V. et Bruyère F. (2005-2009).** Évolution sur cinq ans des infections à germes produisant une  $\beta$ -lactamase à spectre étendu. Progrès en urologie
- **Freney J., Renaud P., Leclercq R. et Riegl P. (2007).** Précis de bactériologie clinique. 2 ème Ed : ESKA. p153.
- **Gadou V. (2019).** Epidémiologie moléculaire des entérobactéries productrices de bêta- lactamases à spectre élargi résistantes aux aminosides et aux fluoroquinolones dans le district d'Abidjan, Côte d'ivoire. Thèse de doctorat. Université Félix HOUPHOUET BOIGNY.
- **Gangoue-pieboji J. (2007).** Caractérisation des bêta-lactamase et leur inhibition par les extraits des plantes médicinales [En ligne]. Thèse de doctorat : biochimies. France : Université de liège, 104p.
- **García Villalba R., Espín JC., Tomás-Barberán FA. et Rocha-Guzmán NE. (2017).** Comprehensive characterization by LC-DAD-MS/MS of the phenolic composition of seven Quercus leaf teas. *J Food Compos Anal* 63: 38–46.
- **Georgé S., Brat P., Alter P .et Amiot MJ. (2005).** Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant derived products. *J. Agric. Food Chem.* Volume (n°53). pp: 1370-1373.
- **Giani T., Antonelli A., Caltagirone M., Mauri C., Nicchi J., Arena1 F., Nucleo E., Bracco S. et Pantosti A. (2017).** Evolving bêta-lactamase epidemiology in *Enterobacteriaceae* from Italian nationwide surveillance, October 2013: KPC-carbapenemase spreading among outpatients. *Euro Surveillance* 22(31): 84–90.
- **Glyphis J.P. et Puttick G.M. (1989).** Phenolics, nutrition and insect herbivory in some garrigue and maquis plants. *Oecologia.* 78:259-63.

- **Gubbuk H., Kafkas E., Guven D. et Gunes E. (2010).** Physical and phytochemical profile of wild and domesticated carob (*Ceratonia siliqua L.*) genotypes. *Span. J. Agric. Res.* 8 (4), 1129–1136.
- **Gulluce A., Adıguzel H., O:utcu M., Tengul I. et Karaman F. (2004).** Tahin Antimicrobial Effects of *Quercus ilex L.* Extract .PHYTOTHERAPY RESEARCH *Phytother. Res.* **18**, 208–211.
- **Haddou S., Messika A. et Nazoun S. (2018).** Etude de l’effet antibactérien in vitro des extrais poly phénoliques de la peau de grenade « *Pinica granatum* » vis-à-vis des souches d’entérobactéries productrices de bêta-lactamase à Spectre Etendu. Mémoire de master, Université de Blida 01, p 50-53.
- **Hagerman AE., Muller-Harvey I .et Makkar HPS. (2000).** Quantification of tannins in tree foliage. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. Vienna.p: 26.
- **Haichour R. (2009).** Stress thermique et limite écologique du Chêne vert en Algérie. Mémoire de magister en Ecophysiologie et biotechnologie des végétaux. Université Mentouri. Constantine. 180 p.
- **Hailaji NSM., Ould Salema ML. et Ghabera SM.(2016).** Sensitivity to antibiotics uropathogens bacteriain Nouakchott Mauritania. *Prog Urol.* 26(6):346–52
- **Hamadache N. (2011).** Criblage des extraits phénoliques d’origine végétale doués d’activité antibactérienne : recherche des inhibiteurs naturels de  $\beta$ -lactamases. Mémoire de Magister, université A/MIRA de Bejaia (UAMB).
- **Hart C.A. (2006).** *Klebsiella, Citrobacter, Enterobacter* and *Serratia spp.* Principles and practice of Clinical Bacteriology. England, UK: John Wiley and Sons Ltd. 2nd ed: 377-386.
- **Hatano T., Tsugawa M., Kusuda M., Taniguchi S., Yoshida T., Shiota S. et Tsuchiya T. (2008).** Enhancement of antibacterial effects of epigallocatechin gallate, using ascorbic acid. *Phytochemistry.* **69**:3111-6.
- **Hemaiswarya S., Kruthiventib A.K. et Doble M. (2008).** Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine.* 15:639-52.
- **Jacoby G.A. et Munoz-Price L.S. (2005).** The New  $\beta$ -Lactamases. *New England Journal of Medicine* 352(4): 380–391.

- **Jobayer M., Afroz Z., Nahar S.S., Begum A., Begum S.A. et Shamsuzzaman S.M.(2017).** Antimicrobial susceptibility pattern of extended-spectrum bêta-lactamases producing organisms isolated in tertiary care hospital, Bengladesh. *Int J App Basic Med Res* 2017 ; 7 :189-92.
- **Karaali A., Boyacioălu D., Gőnez G. et Őzçelik B. (2004).** Flavonoids in fruit and vegetables : their impact on food quality, nutrition and health-STREP or CA.European commission’s the 6<sup>th</sup> framework programme for research. Istanbul technical university Turkey.
- **Karioti A., Bilia A.R., Gabbiani C., Messori L. et Skaltsa H. (2009).** Proanthocyanidin glycosides from the leaves of *Quercus ilex L.* (Fagaceae).
- **Karioti A., Sokovic M., Ciric A., Koukoultsa C., Bilia A.R. et Skaltsa H.(2011).** Antimicrobial Properties of *Quercus ilex L.* ProanthocyanidinDimers and Simple Phenolics: Evaluation of Their Synergistic Activity with Conventional Antimicrobials and Prediction of Their Pharmacokinetic Profile. *Journal of agricultural and food chemistry*.
- **Kasango S.D., Lutoti S., Wewedru I., Aboce E. et Angol D.C. (2018) .**Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Pattern of Extended Spectrum Beta Lactamase Producers in Gram-negative Urine Isolates at MBN Clinical Laboratories, Kampala Uganda. *Archives of Microbiology & Immunology* 2: 042-052.
- **Kekor D. et Kaukios B. (1985).** Acid hydrolysate of acorn polysacharid.
- **Khayar Y. (2011).** Comportement des entérobactéries isolées des urines vis-à-vis de l’amoxicilline–acide clavulanique l’imipenème et l’ertapénème. Thèse de doctorat : Pharmacie. Rabat : Université Mohammed V, 81p.
- **Kitagawa K., Shigemura K., Yamamichi F., Alimsardjono L., Rahardjo D., Kuntaman K. et al. (2018).** International comparison of causative bacteria and antimicrobial susceptibilities of urinary tract infections between Kobe, Japan, and Surabaya, Indonesia. *Jpn J Infect Dis.* 23; 71(1):8–13.
- **Eckart M., Rosemarie B., Eckhart B., Domien et Andreas Pfennig .(2008).** *Liquid–Liquid Extraction, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry,* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.



- **Koumiche F. (2016).** Effet de quelques traitements physiques sur la germination des glands et la croissance ultérieure des plants de chêne vert (*Quercus ilex*).Thèse de master en protection des forêts. Université de Tlemcen. 57 p.
- **Ksouri R., Falleh H., Megdiche W., Trabelsi N., Mhamdi B., Chaieb K., Bakrouf A.,Magné C. et Abdelly C. (2009).** Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food Chem.Toxicol.* **47**: 2083-91.
- **Lagha N. (2015).** Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamses à spectre étendu (BLSE) isolées de l'hôpital de Laghouat .Thèse de doctorat, Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers 37-38.
- **Lahlou Amine I., Chegri M.et L'Kassmi H. (2009).** Épidémiologie et résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées d'infections urinaire à l'hôpital militaire Moulay-Ismail de Meknès. *Antibiotiques.* 11:90–96.
- **Lampel KA. et Maurelli AT. (2003).** *Shigella* species .Ch 11 In : Miliotis MD,Bier JW (eds) international handbook of food borne pathogens. Marcel Dekker,New York,p.167-180.
- **Le minor L. et Veron M. (1989).** Editors. bacteriologie Médicale. Paris : Flammarion.
- **Lebret Thierry. (1999).** Le manuel du généraliste : néphrologie-urologie. Encycl méd chir (Elsevier, Paris), édition Tsunami. France.
- **Lee C.Y., Jeong S.W. et Kim D. (2003).** Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem.* **81**: 321-6.
- **Leraillez P. (1952).** La conservation des fruits. Ed. J. B. Baillere et fils Paris. 400p.
- **Levin MM., Kotloff KL.,Barry EM., Pasetti,MF. et Sztein,MB. (2007).**Clinical trials of Shigella vaccines: Two steps forward and one step back on a long,hard.Nature Reviews Microbiology.5:540-553.
- **Levinson W. (2014).**Review of medical microbiology and immunology.SMART BOOKTM, McGraw-Hill Education,Edition 13,800p.
- **Lin J., Opoku AR., Geheeb-Keller M., Hutchings AD., Terblanche SE., Jager AK. et Van Staden J. (1999).** Preliminary screening of some traditional Zulu

- medicinal plants for anti-inflammatory and anti-microbial activities. *J Ethnopharmacol* **68**: 267–274.
- **Liu L H., Wang N-Y., Wu A Y-J., Lin C C., Lee C M. et Liu C P. (2018).** *Citrobacter freundii* bacteremia: Risk factors of mortality and prevalence of resistance genes, *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 51(4):565-572.
  - **Livermore D.M., Canton R., Gniadkowski M., Nordmann P., Rossolini G.M., Arlet G., Poirel L. et Woodford N. (2007).** CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **59**(2): 165-174.
  - **Lombardo S., Pandino G., Mauromicale G., Knödler M., Carle R. et Schieber A. (2010).** Influence of genotype, harvest time and plant part on polyphenolic composition of globeartichoke [*Cynaracardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori]. *Food Chem.* **119**:1175-81.
  - **Malešev D. et Kuntić V. (2007).** Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian chemical society.*, 72(10):921-939.
  - **Mariam M., Youssef, Hazim A., Rizk, Noha A. et Hassuna. (2019).** Phenotypic and Genotypic Characterization of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Asymptomatic Bacteriuria in Pregnancy Microbial Drug Resistance. 4.731-738.
  - **Marylyse V. (2015).** Résistance aux B-Lactamines à large Spectre chez les bactéries à gram negative. *Epidémiologie et diagnostic. Université LAVAL. Canada.*
  - **Meziti H., Bouriche H., Kada K., Demirtas I., Kizil M. et Senator A. (2019).** Phytochemical analysis, antioxidant, anti-hemolytic and genoprotective effects of *Quercus ilex* L. and *Pinus halepensis* Mill. Methanolic extracts. *J Pharm Pharmacognes* (2019) 7(4): 261 .
  - **Mitchell A.M., Srikumar T. et Silhavy T.J. (2018).** Cyclic enterobacterial common antigen maintains the outer membrane permeability barrier of *Escherichia coli* in a manner controlled by YhdP. *mBio* 9:e01321-18.
  - **Moghaddam AH., Nabavi SM., Nabavi SF., Bigdellou R., Mohammadzadeh S. et Ebrahimzadeh MA. (2010).** Antioxidant, antihemolytic and nephroprotective activity of aqueous extract of *Diospyros lotus* seeds. *Acta Pol Pharm* 69: 687–692.

- **Morice V. (2003).**Chapitre 7 - Entérobactéries et autres bacilles à Gram négatif non exigeants [Internet] .Available from:<http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/POLY.Chp.7.html>.
- **Najiby K-C. (2012).** *Klebsiella Pneumoniae* pathogène nosocomial, résistance et virulence. Thèse de doctorat : Microbiologie et Pathologie. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, 190p.
- **Naseer U.et Sundsfjord A. (2011).** The CTX-M Conundrum: Dissemination of Plasmids and *Escherichia coli* Clones. *Microbial Drug Resistance* **17**(1): 83–97.
- **Nauciel C.et Vildé J.L. (2005).** Bactériologie médicale: Abrégés.Connaissances et pratique. Masson,Édition 2,257 p.
- **Navon-Venezia S., Ben-Ami R., Schwaber M.J., Leavitt A., Schwartz D. et Carmeli Y.( 2004).** Protocol for the Accelerated Detection of Extended-Spectrum  $\beta$ -LactamaseProducing *Escherichia coli* and *Klebsiellapneumoniae* Strains from Blood Cultures. *Eur J clin Microbiol Infect Dis* **23**: 200-202.
- **Nixon K.C. (1993).** Infrageneric classification of *Quercus*(Fagaceae). 104.
- **O’NEILL J. (2016)** .Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations.
- **Ouchemoukh N.A., Ouchemoukh S., Meziat N., Idiri Y., Hernanz D., Stinco C.M., Francisco J .R.P., Francisco J.H., Madani K. et Luis J. (2017).** Bioactive metabolites involved in the antioxidant, anticancer and anticalpain activities of *Ficus carica L.*, *Ceratonia siliqua L.* and *Quercus ilex L.* extracts. *Industrial Crops and Products*.
- **Pagotto F.J., Nazarowec WhiteM., Bidawid S. et Farber J.M.(2003).** Enterobacter sakazakii:infectivity and enterotoxin production in vitro and in vivo.*J Food Protect.***66** (3) :370-375 P.
- **Paterson D.L. (2006).** Resistance in Gram negativebacteria: enterobacteriaceae. *The American Journal of Medecine* **119**(6): 62–70.
- **Paterson D.L. et Bonomo R.A. (2005).** Extended-Spectrum beta-Lactamases: a Clinical Update. *ClinicalMicrobiologyReviews***18**(4): 657–686.
- **Piquemal G.( 2008).** Les flavonoïdes (en ligne) : <http://www.detoursante.com/index.php>.
- **Poirel L., Pitout J D. et Nordmann P. (October 2007).** “Carbapenemases Molecular Diversity and Clinical Consequences”,*Future Microbiology* **25**: 501–512.

- **Prescott, Harley, Klein, Willey, Sherwood et Woolverton.(2010).** Microbiologie.3<sup>ème</sup> édition.p165 des CTX-M. Antibiotique.12, 3-16.
- **Rafales C.A., Carmo J.R., Sader H.S., Medeiros E.A., Vicentim E.et Silva R.M. (2003).** Première description de CTX-M  $\beta$ -lactamase de *Klebsiella pneumoniae* au Brésil. *J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* 43: 52-4.
- **Rayan K.J., C.G. et Sherris J.C. (2004).** Sherris medical microbiology :an introduction to infectious diseases.Lange basic science,McGraw-Hill,Edition 4,979p.
- **Rodriguez-Bernaldo A. et Costa H.S. (2006).** Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: a review.*J.Food Comp.Anal.*19,97-111.
- **Romli A., Derfoufi O., Omar C., Hajjam Z. et Zouhdi M. (2010).** Les entérobactéries BLSE des infections urinaires : épidémiologie et résistance. *Maroc Med.*1(33):12–6.
- **Rupé E. (2010).** Epidémiologie des bêta –lactamases à spectre élargi : évènement.
- **Sadoun N. et Arar A. (2016).**Essais d'élaboration de yaourts brassés à base de date.
- **Saighi D., Peyromaure M. et Debré D. (2004).** Urologie. Ed Masson. Belgique.191P.
- **Sawa T., Kooguchi K. et Moriyama K. (2020).** Molecular diversity of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *j intensive care* 8, 13 (2020).
- **Seidel V. (2005).** Initial and Bulk Extraction. Natural products isolation. Humana Press (Totowa). pp: 27-37
- **Sekhri-Arafa N. (2011).** Fréquence et marqueurs épidémiologiques de *Klebsiella pneumoniae* dans les services à haut risque infectieux au niveau du CHU Benbadis de Constantine. Thèse de doctorat. Constantine : Université Mentouri Constantine, 186p.
- **Shaikh S., Fatima J., Shakil S., Rizvi S.M.D. et Kamal M.A. (2015).** Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences* 22(1): 90–101.
- **Shan B., Cai YZ., Brooks JD et Corke H. (2007).** In vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International.Journal of Food Microbiology.*Volume (n°117). p:112-119.
- **Slimi C. et Boucefiane L. (2019).** Etude de profil épidémiologique des entérobactéries productrices de bêtalactamases à spectre étendu (BLSE) isolées dans

la région de Ain defla. Mémoire de Master. Université Djilali Bounaama, Khemis Miliana.

- **Stratil P., Klejdus B .et Kouban V. (2007).** Détermination des composés phénoliques et leurs propriétés antioxydantes l'activité dans les fruits et céréales. *Talanta*. Volume (n°71). pp: 1741-1751.
- **Thongson C., Davidson PM., Mahakarnchanakul W. et Weiss J. (2004).** Antimicrobial activity of ultrasound-assisted solvent-extracted spices. *Letters in Applied Microbiology*. pp: 401-406.
- **Tolić I.M. (2017).** Mitotic spindle: kinetochore fibers hold on tight to interpolar bundles. *Eur. Biophys. J.* 2017.
- **Touchane M., et Ghalmi M. (2015).** Isolement, identification et antibiorésistance des souches d'entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases isolées à partir des urines. Mémoire de Master, université de Blida 1, p. 55.
- **Van Hout D., Verschuuren T. D., Bruijning-Verhagen P., Bosch T., Schürch A. C., Willems R., Bonten, M. et Kluytmans J. (2020).** Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing and non-ESBL-producing *Escherichia coli* isolates causing bacteremia in the Netherlands (2014 - 2016) differ in clonal distribution, antimicrobial resistance gene and virulence gene content. *PloS one*, 15(1), e0227604. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227604> .
- **Van R., Givskov M. et al. (2007).** Quorum sensing in *Serratia*. *FEMS microbiology Reviews*.407-424P.
- **Venter H. (2019).** Reversing resistance to counter antimicrobial resistance in the World Health Organisation's critical priority of most dangerous pathogens, *Bioscience Reports* (2019) 39 BSR 20180474 .
- **Vodovar D., Marcadé G., Raskine L., Malissin I. et Mégarbane B. (2013).** Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi : épidémiologie, facteurs de risque et mesures de prévention. *La Revue de Médecine Interne* 34(11): 687–693.
- **Vuorela S. (2005).** Analysis, isolation and bioactivities of rapeseed phenolics. Ed. University of Helsinki, Helsinki. pp: 76.
- **Zeng X. et Lin J., (2013).** Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria *Front. Microbiol.*, 22 May 2013 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00128>.

- **Zohreh A., Kashi M.S.et Shaabani M .(2007).** Bacteriuria by extended-spectrum beta-lactamase- producing *Escherichia Coli* and *Kleibsiella Pneumoniae* isolates in a governmental hospital in south of Tehran ,Iran . Iranian Journal of kidney Diseases (IJKD).2(4):197-200.
- **Morice V.**Chapitre 7- Entérobactéries et autres bacilles à Gram négatif non exigénats [Internet].2003.Available from :[http ://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/POLY.Chp.7.html](http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/POLY.Chp.7.html).

# **Annexes**

## Annexe I

### Matériel non biologique

#### Appareillage et verrerie

- Liquide désinfectant
- Fiche de renseignement
- Gants jetables
- Etiquettes, marqueur, registre
- Seringues en plastique
- Boite de Pétri
- Ecouvillon stériles
- Bec bunsen
- Lame et lamelle
- Pipette Pasteur stériles
- Microscope optique
- Agitateur
- Barreau magnétique
- Réfrigérateur à 4°C
- Etuve à 37 °C
- Bicher
- Papier aluminium
- Balance
- Bain-marie

#### **Réactif, solution et solvant**

- Eau physiologique stérile à 0,9 %
- Eau distillé stérile
- Huile à immersion



- Papier Wattman
- Violet de gentiane
- Lugol
- Méthanol
- Ethanol
- DMSO
- Réactif VP1
- Réactif VP2
- Réactif de KOVACS

#### ❖ Violet de gentiane

<b>Composition</b>	
-Phénol.....	2 ,0g
-Violet de gentiane.....	1, 0g
-Ethanol à 90° .....	10ml
-Eau distillée.....	100ml

#### ❖ Lugol

<b>Composition</b>	
-Iodure de Potassium.....	2,0g
-Iode métalloïde.....	1, 0g
-Eau distillée.....	300ml

❖ **Fuchsine de Ziehl**

Composition	
-Fuchsine basique.....	1,0g
- Phénol.....	5g
-Ethanol à 90°.....	10ml
-Eau distillée.....	100ml

❖ **Réactif VP1**

- $\alpha$ - naphthol.....	6g
-Alcool à 90(qsp).....	100ml

❖ **Réactif de Voges-Proskauer (VP 2)**

-NaOH <sub>4</sub> N	
- $\alpha$ -Naphthylamine.....	6g
-Acide acétique 5N.....	1L

❖ **Réactif de KOVACS**


-Alcool amylique.....	5g
-Paradiméthylamino-benzaldéhyde.....	75g
-Hcl pur.....	25ml

❖ **Milieux de culture**


- Gélose nutritive
- Gélose Hektoen
- Gélose Muller-Hinton
- Milieu EMB
- Gélose Mac Conkey
- Milieu SS

## Composition des quelques milieux de culture utilisées en g/l d'eau distillée

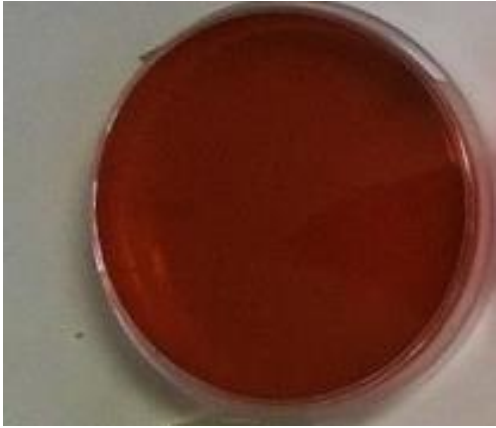
### ❖ Gélose Nutritive (GN)

Composition	
-Peptone ..... 5g - Extrait de viande..... 3g -Gélatine.....13g -PH= 6,8	


### ❖ Gélose Muller-Hinton (MH)

Composition	
-Infusion de viande bœuf.....300 g - Hydrolysate de caséine.....17,5g - Amidon.....1,5g -Gélose.....10g - PH=7,4	


## ❖ Milieu EMB

Composition	
-Peptone..... 10g -Lactose.....10g -Eosine.....0,4g -Bleu de méthylène.....0,062g -Hydrogénophosphate de Potassium.....2g -Agar.....15g	


## ❖ Gélose Mac-Conky

Composition	
-Peptone de Caséine.....17g -Peptone de viande.....3g -Sels biliaires.....1,5g -Cristal Violet.....0,0075g -Lactose.....10g -Rouge neutre.....0,03g -Na Cl.....5g -Agar.....12g PH= 7,4±0,2	

## ❖ Milieu SS

Composition	
-Extrait de viande de bœuf.....5g -Poly peptone.....5g -Sels biliaires.....8, 5g -Thiosulfate de Sodium.....8,5g -Citrate de Sodium.....10g -Lactose.....10g -Vert brillant.....0,00033g -Rouge neutre.....0,025g -Agar.....13, 5g PH=7	

❖ **Gélose Hektoen**

Composition	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Protéose-peptone.....12,0g</li> <li>- Extrait de levure : facteur de croissance.....3,0g</li> <li>- Lactose : critère de différenciation.....12,0g</li> <li>- Saccharose : critère de différenciation.....12,0g</li> <li>- Salicine : critère de différenciation.....2,0g</li> <li>- Citrate de fer III et d'ammonium revelate d'H<sub>2</sub>S.....1,5g</li> <li>- Sels biliaires : inhibiteur.....9,0g</li> <li>- Fuchsine-acide : inhibite .....0,1g</li> <li>- Bleu de bromothymol indicateur de PH.....0 ,065g</li> <li>- Chlorure de sodium : maintien de la pression osmotique.....5, 0g</li> <li>- Thiosulfate de sodium : précurseur d'H<sub>2</sub>S.....5, 0g</li> <li>- Agar.....14, 0g</li> <li>- PH=7,6</li> </ul>	

## Annexe II

### Coloration de Gram

#### Coloration de Gram

Elle nous a permis de différencier entre les bactéries Gram positif et les bactéries Gram négatif, et de connaître la morphologie et le mode de regroupement de ces bactéries.

#### Mode opératoire

**1- Réalisation d'un frottis :** à partir d'une suspension bactérienne puis en faisant des rotations jusqu'à séchage.

**2- Fixation :** soit avec de l'éthanol à 90° (5 minutes) puis on enflamme la lame ou on passe directement 3 fois la lame dans la flamme du bec benzène.

**3- La coloration au violet de Gentiane (colorant basique) :** la lame est plongée pendant 2 à 3 minutes dans la coloration au violet de gentiane. Toutes les bactéries sont colorées en violet puis rincer à l'eau distillée.

**4- Mordantage au lugol (solution iodo-iodurée) :** étaler le lugol et laisser agir 20 secondes, rincer à l'eau déminéralisée, cette étape permet de stabiliser la coloration violette.

**5- Décoloration à l'alcool :** verser goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement .surveiller la décoloration (5 à 10 secondes).le filet doit être claire à la fin de la décoloration .rincer sous un filet d'eau déminéralisée. L'alcool pénètre dans la bactéries.la coloration au violet de Gentiane disparaît.les bactéries décolorées sont des bactéries Gram -.si l'alcool ne traverse pas la paroi, on est en présence de bactéries Gram +.

**6- Contre coloration avec de la Fuchsine ou de la safranine :** laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à L'eau déminéralisée. Sécher la lame sur une platine chauffante à 40°C ,10 à 15 minutes.les bactéries Gram – sont colorées en rose.

Pour l'antibiogramme standard, voilà la liste des antibiotiques recommandée par le réseau Algérien de surveillance de l'antibiorésistance (AARN, 2019) pour l'étude des entérobactéries.

**Tableau :** Liste des Antibiotiques utilisés dans le cadre de notre étude.

Antibiotiques	Abréviations	Charge ( $\mu\text{g}$ )	Famille
Amoxicilline + Acide clavulanique	AMC	20+10	$\beta$ -lactamines
Céfalotine	CF	30	
Céfotaxime	CTX	30	
Ampicilline	AMP	30	
Ceftriaxone	CRO	30	
Aztréonam	ATM	30	
Ceftazidime	CAZ	30	
Céfoxitine	FOX	30	
Imipénème	IPM	10	
Céfazoline	CZ	30	
Acide nalidixique	NAL	30	
Ofloxacin	OFX	5	
Ciprofloxacine	CIP	5	
Gentamicine	GEN	10	Aminosides
Amikacine	AMK	30	
Triméthoprime- sulfaméthoxazole	SXT	25	Sulfamides

### Technique

L'antibiogramme se fait sur gélose Mueller-Hinton, coulée en boîte de pétri sur une épaisseur de 4mm.

#### ➤ Inoculum

- A partir d'une culture pure de 18 à 24h sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées parfaitement identiques.



- Bien décharger l'anse ou l'écouvillon dans 5 à 10 ml d'eau physiologie stérile à 0.9%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0.5 MF ou une DO de 0.08 à 0.10 lue à 625nm.
- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique s'il est trop fort.
- L'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum.

➤ **Ensemencement**

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- 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. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

➤ **Application des disques d'antibiotiques**

- Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90mm de diamètre. Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24mm, centre à centre.
- Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de pinces bactériologique stériles pour s'assurer de son application. Une fois appliqué, le disque ne doit pas être déplacé.
- Incuber les boîtes de Pétri pendant 18 heures à 37°C.

➤ **Lecture**

- Mesurer avec précision, les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boîte fermée.
- Comparer les résultats obtenus aux valeurs critiques figurant dans les tables de lectures fournis par l'OMS.

## Recherche phénotypique de la production des BLSE

Selon les recommandations du **CLSI (2014)**, la recherche de la BLSE pour l'interprétation de la sensibilité des entérobactéries aux céphalosporines n'est plus obligatoire. La détection phénotypique de la 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 a 27mm).
- Ceftazidime (CAZ a 22mm).
- Ceftriaxone (CRO a 25mm).
- Aztréonam (ATM a 27mm).

### ❖ Test de synergie

Il consiste à rechercher une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de bêta-lactamases et un disque C3G (céftriaxone, ceftazidime, et céfotaxime) ou un monobactame (aztréonam). L'image de synergie dite en bouchon de champagne est caractéristique de la présence de BLSE.

### ✚ Technique

Un inoculum est préparé à partir d'une culture jeune de 18h. La gélose Mueller-Hinton estensemencée selon la méthode préconisée par CLSI, puis deux disques, l'un contenant l'association amoxicilline-acide clavulanique et l'autre une céphalosporine de troisième génération, sont placés côte à côte à 3cm de distance mesurés centre à centre. Les boîtes de Pétri sont incubées 18h à 37°C.

### ✚ Lecture

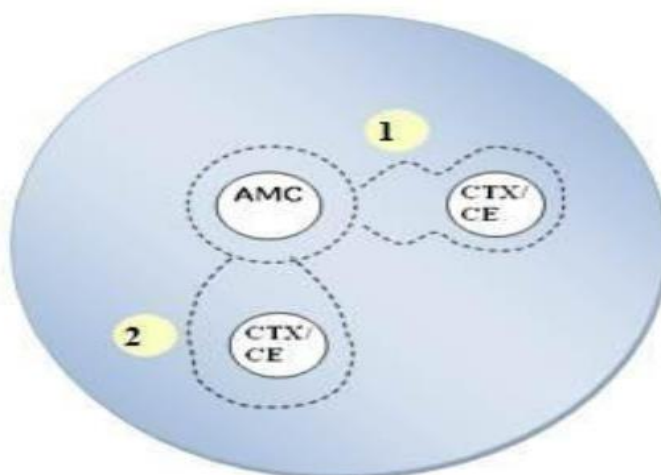
La production d'enzyme peut se traduire par l'apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne entre les disques :

- AMC et CTX
- AMC et CAZ
- AMC et ATM.

En absence d'une image de synergie, la production de BLSE sera devant toute diminution du diamètre autour des disques de C3G.

Elle peut être dû à :

- la synthèse d'une BLSE de type CMT (Complexe Mutants TEM).
- l'association de plusieurs mécanismes : BLSE+Case hyper produite (entérobactérie).
- la recherche de CMT : se fera en rapprochant les disques CTX-AMC de 20mm et 25mm au lieu de 30mm.



**Figure 12** : Description de l'image de synergie.

(1 : synergie en entonnoir. 2 : synergie en bouchon de champagne).

#### ❖ Méthode des tests combinés

Cette méthode consiste à placer sur une gélose Mueller-Hinton préalablement inoculée avec une suspension bactérienne ajustée à 0,5 Mac Farland, 2 couples d'antibiotiques ; un disque de CTX en regard d'un disque de CTX / acide clavulanique à une distance de 25 mm (de centre à centre), et un disque de CAZ en regard d'un disque de CAZ / Acide clavulanique (même distance).

Une augmentation  $\geq$  à 5 mm du diamètre d'inhibition des disques contenant l'acide clavulanique par rapport à ceux qui n'en contiennent pas, est en faveur de la présence d'une BLSE.



**Figure 13 :** Méthode des disques combinés (Test positif).

#### ❖ Méthode iodométrique

Cette méthode est utilisée pour la recherche de la production des bêtalactamases.

#### ✚ Technique

- Préparer une solution de pénicilline G à 6 mg/ml dans un tampon phosphate 0.1M et pH 6.0. répartir des quantités de 0.1ml de cette solution dans des tubes à hémolyse stériles.
- Prélever à l'aide d'une anse de platine 3 à 5 colonies sur gélose et les émulsionner dans la solution précédente.
- Cette suspension est laissée à température du laboratoire pendant 30 à 60 minutes.
- Ajouter des volumes de 20 µl d'amidon à 1% (p/v).
- Des volumes de 20µl de solution d'iode à 2% (p/v) sont additionnés.
- Une décoloration qui apparaît avant 5 minutes indique une réaction positive.
- Réaliser en parallèle un témoin positif et un autre négatif.

## Annexe III

## La liste des antibiotiques Utilisées

Antibiotiques testés	Charge de disque	Valeurs critique des diamètres d'inhibition (mm)			CMI critiques ( $\mu\text{g/ml}$ )		
		Résistant	Intermédiaire	Sensible	Résistant	Intermédiaire	Sensible
Amoxicilline +acide clavulanique (AMC)	$\mu\text{g}30$	$\leq 13$	14-17	$\geq 18$	$\geq 32$	16	$\leq 8$
Amoxicilline (AML)	$\mu\text{g} 10$	$\leq 13$	14-16	$\geq 17$	$\geq 32/16$	4	$\leq 2$
Céfazoline (CZN)	$\mu\text{g} 30$	$\leq 19$	20-22	$\geq 23$	$\geq 8$	4	$\leq 2$
Céphalotine (CF)	$\mu\text{g} 30$	$\leq 14$	15-17	$\geq 18$	$\geq$		$\leq$
Céfoxitine (FOX)	$\mu\text{g} 30$	$\leq 14$	15-17	$\geq 18$	$\geq 32$	16	$\leq 8$
Céfotaxime (CTX)	$\mu\text{g} 30$	$\leq 22$	23-25	$\geq 26$	$\geq 4$	2	$\leq 1$
Céfixime (CFM)	$\mu\text{g} 5$	$\leq 15$	16-18	$\geq 19$	4	2	$\leq 1$
Céftazidime (CAZ)	$\mu\text{g} 30$	$\leq 17$	18-20	$\geq 21$	8	-	$\leq 1$
Céfpime (CPE)	$\mu\text{g} 30$	$\leq 14$	15-17	$\geq 18$	8	-	$\leq 1$
Ticarcilline (TIC)	$\mu\text{g} 75$	$\leq 14$	15-19	$\geq 20$	128	-	$\leq 64$
Pipéracilline (PIP)	$\mu\text{g} 100$	$\leq 17$	18-20	$\geq 21$	128	-	$\leq 64$
Ticarcilline –acide clavulanique (TTC)	$\mu\text{g} 85$	$\leq 22$	-	$\geq 23$	128 /2	-	$\leq 64/2$
Aztréonam (ATM)	$\mu\text{g} 30$	$\leq 17$	18-20	$\geq 21$	32	16	$\leq 8$
Imipénème (IMP)/ Méropénème (MER)	$\mu\text{g} 10$	$\leq 19$	20-22	$\geq 23$	4	2	$\leq 1$
Ertapénème (ERT)	$\mu\text{g} 10$	$\leq 19$	20-22	$\geq 23$	1	0,5	$\leq 0,25$

(OMS, 2011)

### Extraction

Le protocole d'extraction des composés phénoliques consiste à macérer 50g de poudre végétale sèche dans 500ml de solvant (méthanol, éthanol et éther de pétrole) suivi par une agitation mécanique pendant 1 heure. L'extraction est réalisée dans un bain ultrasonique pendant 2 heures. Les solutions sont ensuite filtrées sur un papier filtre pour séparer le filtrat du marc. Celle-ci est réextraite avec 100 ml du solvant selon le même protocole pendant 1 heure.

Finalement 50 ml pendant 30 min, les trois fractions d'extraction sont combinées dans un volume final de 400 ml. Le solvant est évaporé au rotavapour et les résidus secs obtenus sont dans du Diméthylsulfoxyde (DMSO) à raison de 100mg/ml pour les tests microbiologiques et dans le méthanol pour le dosage des polyphénols. Les extraits ainsi préparés seront conservés à 4°C.

Le rendement d'extraction a été calculé selon la formule suivante :

$$R = \frac{\text{Masse d'extrait obtenue}}{\text{Prise d'essais}} \times 100$$

### Conservation

Très volatiles dans la nature, les extraits phénoliques peuvent rapidement perdre leurs propriétés. Très vite, elles commencent à vieillir, généralement au bout de 6 mois. Au mieux, elles peuvent conserver leurs propriétés thérapeutiques. Pour cela, elles doivent être impérativement gardées à l'abri de l'air, de la lumière et de la chaleur et contenues dans des flacons en verre opaques ou teintés (en bleu ou brun) hermétiquement clos, entreposés debout.

## Dosage des polyphénols

### ➤ Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols sont estimés par la méthode de **Folin-Ciocalteu** décrite dès 1965 par Singleton et Rossi. Et modifiée ensuite par plusieurs auteurs.

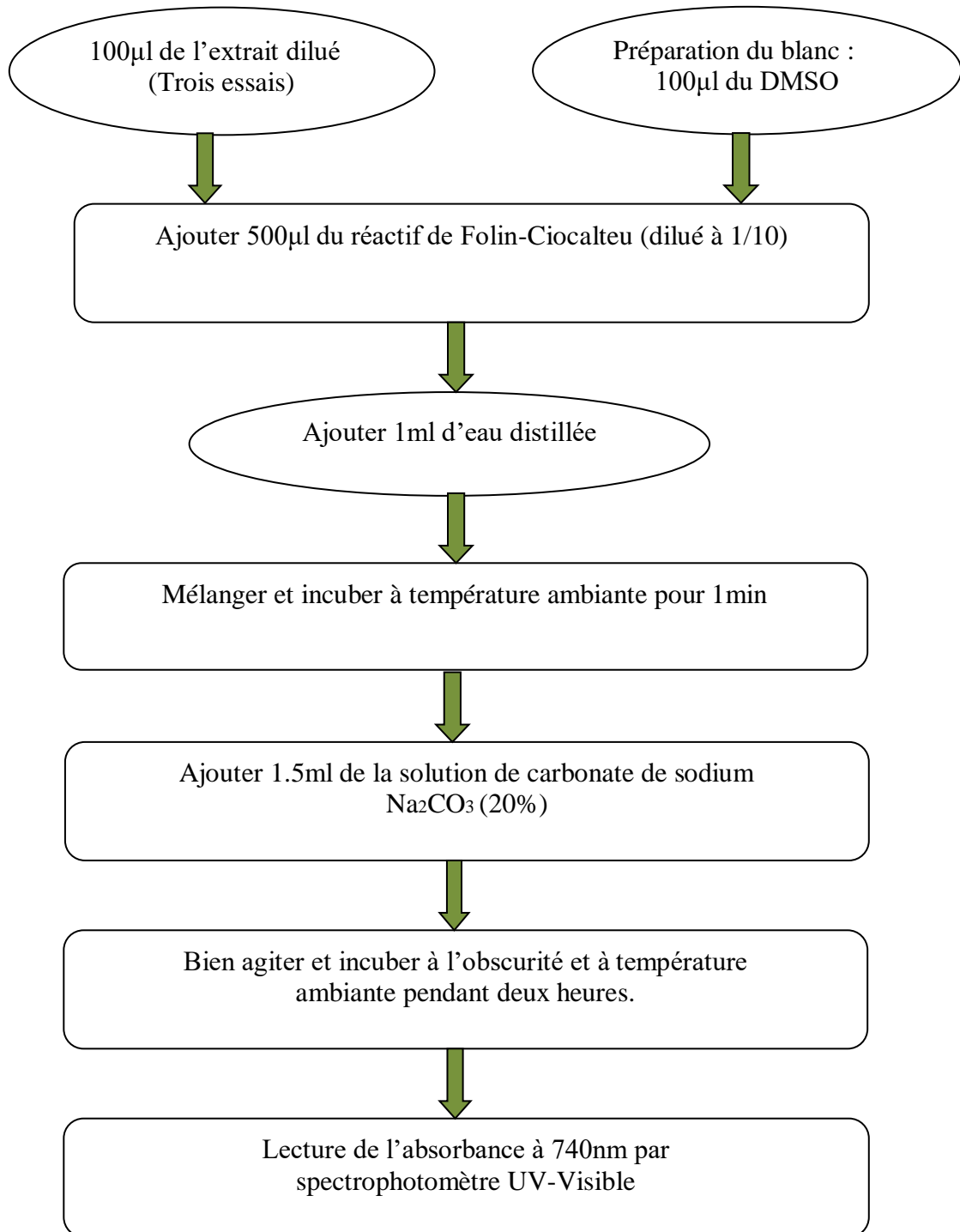
### ➤ Principe :

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange bleu d'oxyde de tungstène et de molybdène. La coloration bleuâtre obtenue est proportionnelle à la quantité des phénols présents.

### ➤ Mode opératoire

Le protocole de dosage des polyphénols totaux est comme suit :

- Les extraits des plantes sont dilués pour avoir une absorbance comprise entre 0.8 et 1.
- Ensuite, 500 $\mu$ l du réactif de Folin-Ciocalteu (dilué à 1/10) et 1ml d'eau distillée sont ajoutés à 100 $\mu$ l de l'extrait végétal dilué. Les solutions sont bien mixées et incubées à température ambiante. Après 1min, 1.5ml d'une solution de carbonate de Sodium ( $Na_2CO_3$ ) à 20 % sont ajoutés.
- Bien agiter et incuber les mélanges à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant deux heures.
- Enfin, la lecture de l'absorbance des échantillons est réalisée à 740nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible. Le blanc est préparé en remplaçant les extraits des plantes par 100 $\mu$ l du DMSO.
- Les mêmes solutions sont préparées en utilisant un standard, l'acide gallique au lieu de l'extrait végétal, pour la réalisation de la courbe d'étalonnage.
- Toutes les expériences sont répétées trois fois et les résultats sont déterminés par l'équation de régression de la courbe d'étalonnage, et sont exprimés sous forme de moyennes en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g d'extrait). Le protocole de dosage des composés phénoliques est représenté par la figure ci-dessous.



**Figure :** Protocole de dosage des composés phénoliques.



## Sensibilité des souches isolées aux extraits de *Quercus ilex L.*

### En milieu solide

- **Souches bactériennes testées**

Les entérobactéries BLSE.

- **Préparation des inocula**

Les souches bactériennes sont ré-isolées sur gélose nutritive. Quelques colonies sont prélevées d'une culture de 18 à 24 heures et diluées dans 5ml d'eau physiologique stérile. Les suspensions bactériennes sont ajustées par spectrophotométrie pour obtenir un inoculum de  $10^8$ UFC/ml, ensuite une dilution de  $10^{-1}$  est réalisée.

- **Réalisation des tests d'activité antibactérienne**

Les activités antibactériennes des différents extraits phénoliques sont déterminées par la technique de diffusion sur gélose Mueller-Hinton. Le mode opératoire est celui décrit par (Debib et al., 2014) avec quelques modifications. Les milieux (gélose Mueller-Hinton) sont ensemencés par écouvillonnage par des inocula bactériens standardisés ( $10^7$ UFC/ml). Des disques stériles de papier filtre ayant un diamètre de 6mm sont déposés aseptiquement sur la gélose ensemencée et sont immédiatement imprégnés par une quantité d'extrait phénolique ayant une concentration de 100mg/ml. Deux séries de tests antibactériens sont réalisées : l'une à 20µl d'extrait végétal et l'autre à 50µl (soit 2mg ou 5mg d'extrait sec par disque). Le contrôle négatif est représenté par des disques contenant les mêmes quantités (20 ou 50µl) de DMSO. Des disques d'antibiotiques auxquelles les souches sont sensibles sont utilisés comme contrôles positifs, ces derniers sont déterminés après réalisation des antibiogrammes standards pour les cinq souches testées. Incuber les boîtes de Pétri à 37°C pendant 24h. L'activité antibactérienne des extraits phénoliques est évaluée par mesure des diamètres des zones d'inhibition formées autour des disques en prenant en compte le diamètre du disque.

### En milieu liquide

➤ **Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)**

✓ **Principe**

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est la plus faible concentration d'antimicrobien capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 18

à 24 heures. Ici sa détermination s'est effectuée à partir de la mesure de la turbidité induite par la croissance des germes étudiés dans une microplaque de 96puits.

La CMI correspondra donc à la plus petite concentration pour laquelle il y a absence de turbidité.

#### ✓ Préparation de la gamme de concentration des extraits

La gamme de concentrations de l'extrait a été préparée par la méthode d'une dilution selon une progression géométrique de raison 2 pour chaque extrait.

#### ✓ Préparation de l'inoculum

Pour chacune des souches un inoculum a été réalisé à partir de quelques colonies dispersées dans du bouillon nutritif régénéré de manière à obtenir une densité équivalente à 1McFarland (inoculum bactérien optiquement invisible soit  $2 \times 10^8$  UFC/ml). 20 $\mu$ L de chaque souche est diluée dans 5ml du bouillon Mueller-Hinton.

**Tableau:** Méthode d'ensemencement de la microplaque.

Numéro des puits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Bouillon nutritif ( $\mu$ L)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
solution d'extrait ( $\mu$ L)	50	0	50	-	-	-	-	-	-	-	-	
Redistribuer du tube précédent (mL) :	-	-	-	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Inoculum ( $\mu$ L) :	0	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Facteur de dilution			1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
Concentration finale de polyphénols dans EAc. en $\mu$ g/MI	C1	0	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11

(Debib et al., 2014).

#### ➤ Lecture

La lecture des résultats s'est faite à la lumière du jour et à l'œil nu. La limpidité du milieu implique l'effet antimicrobien de l'extrait testé tandis que la présence d'un trouble indique son inefficacité (signe de croissance bactérienne). La CMI correspond donc à la plus faible concentration d'extrait à laquelle on n'observe pas de croissance visible.



Microtube	Substrat	Caractère recherché	Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	$\beta$ -galactosidase	Lecture directe		
ADH LDC ODH	Arginine Lysine Ornithine	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H <sub>2</sub> S	Thiosulfate de sodium	Production d'H <sub>2</sub> S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d' $\alpha$ -naphthol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		
NO <sub>2</sub> / N <sub>2</sub>	Nitrates (NO <sub>3</sub> )	Nitrate réductase	Lecture indirecte dans la cupule GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif		

Recommandations : Au terme de notre étude et au regard des résultats obtenus il est impératif de formuler ces quelques recommandations : Aux techniciens de laboratoire : Respecter toujours les bonnes pratiques de laboratoire ; Privilégier la solidarité dans le travail. Aux prescripteurs : Eviter de prescrire de façon systématique les céphalosporines de troisième génération qui favorisent la sélection de mutants résistants ; Adapter l'antibiothérapie à un antibiogramme dans la mesure du possible ; Accentuer les demandes d'analyses bactériologiques pour une meilleure mise en évidence de la production des BLSE dans le temps et dans l'espace.