



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم: الميكروبيولوجيا

Département : Microbiologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie Moléculaire des microorganismes.

Intitulé :

**LES ENTÉROBACTÉRIES : ÉPIDÉMIOLOGIE ET  
RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES**

Préparé par : ZRARDI Mohamed Elhadi

Le : 02/09/2020

Jury d'évaluation :

Président : Mme. ARABET D (MCA-UFM Constantine 1)

Examineurs : Mme. ABDELAZIZ W (MCA-UFM Constantine 1)

Encadreur : Mme. HECINI-HANNACHI A. (MCA – U Saleh boubnider Constantine 3)

*Année universitaire  
2019 – 2020*



# Dédicaces

*En ce moment particulier de ma vie, je tiens à dédier ce modeste travail :*

***A mes chers parents :***

*Pour votre soutien moral et matériel sans faille,*

*Pour vos mains qui ont tant travaillé,*

*Pour votre cœur qui m'a tant donné,*

*Pour votre sourire qui m'a tant réchauffé,*

*Pour vos yeux qui furent parfois mouillés,*

*Pour vous qui m'avez tant aimé.*

*Pour le bon déroulement de mes études. Sans votre aide, je ne serais pas ce que je suis aujourd'hui.*

*Et sur tout votre amour sans compter. Que ce modeste travail soit pour vous le fruit de tout votre*

*Effort et l'expression de mon admiration et de ma profonde gratitude.*

***A mes sœurs :*** *Rayenne et yousra merci de me supporter dans tous les moments difficiles.*

***A ceux qui sont chers à mon cœur que dieu les protège :*** *Walid, Aymen, Skander, Abdou, Chemsou, Billel, Badro, Seif, Ayoub, Islem et Oussama.*

***A ma promotrice,*** *pour son aide et ses connaissances qu'elle m'a données pour l'achèvement de ce modeste travail.*

***A tous mes enseignants et toutes mes enseignantes. . .***

*Il vous revient le mérite de m'avoir prodigué un enseignement profitable et une formation complète, veuillez accepter mes remerciements les plus sincères.*



# Remerciements

*Avant tout, je remercie le grand Dieu le tout puissant qui m'a donné la force, le courage, la santé et qui m'a permis d'arriver à ce stade-là.*

*Ce mémoire n'aurait pas pu être réalisé sans la contribution de nombreuses personnes que je tiens à remercier en ces quelques lignes.*

*Je tiens à remercier mon encadreur Mme. HECINI-HANNACHI ABLA pour ses conseils chaleureux, ses soutiens et son bon encadrement afin de réaliser ce modeste travail. Pour son aide, ses suggestions sur la rédaction de ce mémoire ainsi que la Confiance qu'elle m'a témoigné tout au long de cette étude. Pour sa Patience, sa gentillesse, et son esprit responsable.*

*Mes vifs remerciements vont également aux membres de jury qui ont bien voulu accepter d'examiner mon travail.*

*La présidente du jury Mme. ARABET DALLEL qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.*

*À Mme. ABDELAZIZ WIDED pour avoir accepté d'examiner ce travail. Veuillez trouver ici mes remerciements les plus sincères.*

*Enfin je remercie toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail. Sans oublier la grande famille de biologie :*

*Enseignants, étudiants, administrateurs et techniciens.*

\*

# RÉSUMÉ

### **Résumé :**

La diffusion des souches multi-résistantes d'Entérobactéries connaît à ce jour une évolution mondiale préoccupante, réduisant de manière importante les alternatives thérapeutiques. Cependant, la résistance liée à la production de Béta-lactamases à spectre étendu (BLSE) est un problème particulier dans le traitement des infections à Entérobactéries, mais d'autres mécanismes ont également émergé, conduisant à la multirésistance. Ces E-BLSE sont aujourd'hui les BMR majoritaires, souvent associées à des maladies de gravité très variable.

De ce fait notre étude a porté sur une recherche bibliographique concernant les Entérobactéries et leur résistance aux antibiotiques dans Le but de donner une vue générale sur les phénomènes émergents en termes de résistance.

Dans la première partie, nous avons abordé les principaux caractères des Entérobactéries, la classification des principaux antibiotiques avec leurs modes d'action et les mécanismes de résistance des Entérobactéries.

Le deuxième chapitre décrit les méthodes utilisées dans le diagnostic des infections à Entérobactéries y compris les méthodes d'étude de la résistance aux antibiotiques.

Enfin, le troisième chapitre, analytique, traite différents résultats obtenus d'après les données de la littérature afin de pouvoir faire le point sur l'épidémiologie et l'état actuel de la résistance aux antibiotiques chez les Entérobactéries.

**Mots clés :** Entérobactéries, EBLSE, BMR, Antibiotiques, Antibiorésistance.

**Abstract :**

The spread of multi-resistant strains of *Enterobacteriaceae* is currently undergoing a worrying global evolution, significantly reducing therapeutic alternatives. However, resistance associated with the production of Extended Spectrum Beta-lactamases (BLSE) is a particular problem in the treatment of *Enterobacteriaceae* infections, but other mechanisms have also emerged, leading to multi-resistance. These E-BLSEs are now the majority BMRs, often associated with diseases of very variable severity.

As a result, our study focused on a bibliographical research on *Enterobacteriaceae* and their resistance to antibiotics in order to give a general view of emerging phenomena in terms of resistance.

In the first part, we discussed the main traits of *Enterobacteriaceae*, the classification of the main antibiotics with their modes of action and the mechanisms of resistance of *Enterobacteriaceae*.

The second chapter describes the methods used in diagnosing *Enterobacteriaceae* infections including methods for studying antibiotic resistance.

Finally, the third analytical chapter discusses different results from the literature in order to provide an update on the epidemiology and current state of antibiotic resistance in *Enterobacteriaceae*.

**Key words :** Enterobacteria, EBLSE, BMR, Antibiotics, Antibiotic resistance

## الملخص:

إن انتشار سلالات البكتيريا المعوية المتعددة المقاومة يمر حالياً بتطور عالمي مثير للقلق، مما يقلل بشكل كبير من البدائل العلاجية. ومع ذلك، فإن المقاومة المرتبطة بإنتاج البيبتالاكتاماز ذات المجال الواسع هي مشكلة خاصة في علاج التهابات الناتجة عن البكتيريا المعوية، ولكن ظهرت أيضاً آليات أخرى، تؤدي إلى المقاومة المتعددة. هذه البكتيريا المعوية المنتجة للبيبتالاكتاماز ذات المجال الواسع تمثل الآن غالبية البكتيريا متعددة المقاومة، وغالبا ما ترتبط مع أمراض ذات شدة متغيرة جدا.

ونتيجة لذلك، ركزت دراستنا على بحث بيليوغرافي خاص بالبكتيريا المعوية ومقاومتها للمضادات الحيوية من أجل إعطاء نظرة عامة للظواهر الناشئة من حيث المقاومة.

في الجزء الأول، ناقشنا السمات الرئيسية للبكتيريا المعوية، تصنيف المضادات الحيوية الرئيسية مع طرق عملها وآليات المقاومة.

ويصف الفصل الثاني الطرق المستخدمة في تشخيص الالتهابات الناتجة عن البكتيريا المعوية بما في ذلك طرق دراسة مقاومة المضادات الحيوية.

وأخيراً، يتناول الفصل التحليلي الثالث النتائج المختلفة التي تم الحصول عليها من بيانات الدراسات السابقة من أجل تقييم علم الأوبئة والحالة الحالية لمقاومة المضادات الحيوية عند البكتيريا المعوية.

**الكلمات المفتاحية:** بكتيريا الأمعاء، البيبتالاكتاماز ذات المجال الواسع، البكتيريا المتعددة المقاومة، المضادات الحيوية، مقاومة المضادات الحيوية.

*TABLE DES  
MATIERES*



**Liste des tableaux et figures**

**Liste des abréviations**

**Liste des annexes**

**Introduction**

**Partie 01 : SYHNTHSE BIBLIOGRAPHIQUE**

<b>1</b>	<b>LES ENTEROBACTERIES</b>	<b>2</b>
1.1	Définition	2
1.2	Habitat	2
1.3	Taxonomie	3
1.4	Caractères morphologiques	3
1.5	Caractères culturaux	3
1.6	Caractères antigéniques	4
1.6.1	Antigènes O (ou somatiques)	4
1.6.2	Antigènes H	5
1.6.3	Antigènes capsulaires K	5
1.6.4	L'antigène Kunin	5
1.7	Caractères biochimiques	6
1.8	Pouvoir Pathogène	8
1.8.1	<i>Escherichia</i>	8
1.8.2	<i>shigella</i>	8
1.8.3	<i>Klebsiella</i>	8
1.8.4	<i>Salmonella</i>	8
1.8.5	<i>Proteus- Providencia</i>	9
1.8.6	<i>Enterobacter</i>	9
1.8.7	<i>Serratia</i>	9

<b>2</b>	<b>ANTIBIOTIQUES</b> .....	10
2.1	Définition .....	10
2.2	Classification .....	10
2.3	Mode d'action .....	11
2.4	Principaux antibiotiques utilisés et leurs modes d'action .....	12
2.4.1	Béta-lactamines .....	12
2.4.2	Aminosides .....	16
2.4.3	Quinolones .....	17
<b>3</b>	<b>ENTEROBACTERIES ET RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES</b> .....	18
3.1	Définition de la résistance bactérienne .....	18
3.1.1	Résistance naturelle (ou intrinsèque ou insensibilité).....	18
3.1.2	Résistance acquise .....	18
3.2	Mécanismes de résistance des Entérobactéries.....	19
3.2.1	Résistance aux $\beta$ -lactamines .....	19
3.2.1.1	Résistance non enzymatique .....	19
3.2.1.2	Résistance enzymatique .....	20
3.2.2	Résistance des Entérobactéries aux aminosides .....	23
3.2.3	Résistance des Entérobactéries aux quinolones .....	23

## **Partie 02 : METHODOLOGIE DE DIAGNOSTIC**

1	Analyse des prélèvements et isolement .....	24
2	Identification des Entérobactéries .....	26
2.1	Identification morphologique .....	26
2.2	Identification biochimique après culture .....	27
2.2.1	Identification par galerie biochimique .....	27
2.2.2	Galerie biochimique classique .....	29
2.2.3	Tests complémentaires de l'identification biochimique .....	29
2.2.3.1	Test de l'oxydase .....	29

2.2.3.2	Test de catalase .....	30
3	Détermination de la résistance aux antibiotiques « Antibiogramme » :.....	30
3.1	Antibiogramme .....	30
3.2	Tests de détection de BLSE .....	32
3.2.1	Test de synergie .....	33
3.2.2	Test de confirmation ou du double disque (test espagnol) .....	33
3.3	Détermination de la CMI en milieu solide .....	34

### **PARTIE 03 : RESULTATS ET DISCUSSION.**

1	Caractéristiques épidémiologiques.....	35
1.1	Répartition des souches isolées par espèce .....	35
1.2	Répartition des souches isolées selon la nature de prélèvement .....	35
1.3	Répartition des souches par sexe .....	36
1.4	Répartition des patients selon les tranches d'âge .....	36
2	Sensibilité aux antibiotiques .....	37
	<b>Conclusion</b> .....	40

### **Références bibliographiques**

### **Annexes**

## LISTES DES TABLEAUX ET FIGURES

### Liste des Tableaux :

<b>Tableau 01</b> : Principaux groupes d'Entérobactéries.....	05
<b>Tableau02</b> : Caractères biochimiques de quelques Entérobactéries.....	07
<b>Tableau 03</b> : Principales familles d'antibiotiques.....	11
<b>Tableau 04</b> : Antibiotiques testés pour les Entérobactéries.....	33

## Liste des figures :

<b>Figure 01</b> : Structure et aspect microscopique des <i>Enterobacteriaceae</i> .....	06
<b>Figure 02</b> : Cibles des principaux antibiotiques.....	12
<b>Figure 03</b> : Cycle $\beta$ -lactame.....	13
<b>Figure 04</b> : Classification des $\beta$ -lactamines.....	14
<b>Figure 05</b> : Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle $\beta$ -lactame.....	21
<b>Figure 06</b> : Galerie API20E.....	27
<b>Figure 07</b> : Représentation de l'ensemencement d'une galerie API20.....	28
<b>Figure 08</b> : Schéma de détection de BLSE par le test du double disque.....	34

## LISTE DES ABREVIATIONS

- ❖ **ADH** : Arginine déshydrogénase
- ❖ **ADN** : Acide désoxyribonucléique
- ❖ **AK** : Amikacine
- ❖ **AMC** : Amoxicilline +Acide clavulanique
- ❖ **AMP** : Ampicilline
- ❖ **AMX** : Amoxicilline
- ❖ **AMY** : Amygdaline
- ❖ **API 20 E** : Appareillage Et Procédé D'Identification
- ❖ **ARA** : Arabinose
- ❖ **ARNm** : Acide ribonucléique messenger
- ❖ **ARNr** : Acide ribonucléique ribosomique
- ❖ **ARNt** : Acide ribonucléique de transfert
- ❖ **ATB** : Antibiotique
- ❖ **ATM** : Aztréonam
- ❖ **BGN** : Bactéries à Gram négatif
- ❖ **BMR** : Bactéries Multi-Résistantes
- ❖ **C1G** : Céphalosporine de première génération
- ❖ **C2G** : Céphalosporine de deuxième génération
- ❖ **C3G** : Céphalosporine de troisième génération
- ❖ **CASFM** : Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
- ❖ **CAZ** : Céfotazidime
- ❖ **CIP** : Ciprofloxacine
- ❖ **Cit** : Citrate
- ❖ **CLED** : Déficiante en Electrolyte, Lactose et Cystine
- ❖ **CMI** : Concentration minimale inhibitrice
- ❖ **CN** : Gentamycine
- ❖ **CT** : Colistine
- ❖ **CTX** : Céfotaxime
- ❖ **CTX-M** : Céfotaximase-Munich
- ❖ **CZ** : Céfazoline
- ❖ **EBLSE** : Entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à Spectre Etendu
- ❖ **ECA** : *Enterobacterial Common Antigen*
- ❖ **ECBU** : Examen cytobactériologique des urines
- ❖ **EDP** : *Energy dependent phase*

- ❖ **EDTA** : Acide éthylène diamine tétra-acétique
- ❖ **EHEC** : Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*
- ❖ **EIEC** : Enteroinvasive *Escherichia coli*
- ❖ **EPEC** : Enteropathogen *Escherichia coli*
- ❖ **ETEC** : Enterotoxinogen *Escherichia coli*
- ❖ **FF** : Fosfomycine
- ❖ **GEL** : Gélatinase
- ❖ **Glu** : Glucose
- ❖ **GN** : Gélose Nutritive
- ❖ **H<sub>2</sub>S** : Hydrogène sulfuré
- ❖ **I** : Intermédiaire
- ❖ **IND** : Indole
- ❖ **INO** : Inositol
- ❖ **IPM** : Imipénème
- ❖ **K** : Antigène capsulaire
- ❖ **Lac** : Lactose
- ❖ **LCR** : Liquide céphalo-rachidien
- ❖ **LDC** : Lysine-Décarboxylase
- ❖ **LPS** : Lipopolysaccharides
- ❖ **MAN** : Mannitol
- ❖ **MEL** : melibiose
- ❖ **MF** : Mac Farland
- ❖ **MH** : Muller-Hinton
- ❖ **MOB** : Mobilité
- ❖ **NA** : Acide Nalidixique
- ❖ **NIT** : Nitrate réductase
- ❖ **ODC** : Ornithine décarboxylase
- ❖ **ONPG** : Orthonitrophénol-bêta-galactosidase
- ❖ **PBP** : Penicillin Binding Protein
- ❖ **PI** : Pipéracilline
- ❖ **QRDR** : quinolone resistance determining region
- ❖ **R** : Résistante
- ❖ **RHA** : Rhamnose
- ❖ **RM** : Rouge De Méthyle

- ❖ **S** : Sensible
- ❖ **SAC** : Saccharose
- ❖ **SHV** : Sulfhydryl variable
- ❖ **SOR** : Sorbitol
- ❖ **TC** : Ticarcilline
- ❖ **TCC** : Ticarcilline + acide clavulanique
- ❖ **TDA**:Tryptophane désaminase
- ❖ **TE** : Tétracycline
- ❖ **TEM** : Temoniera
- ❖ **TOB** : Tobramycine
- ❖ **TSI** : Triple Sugar-Ironagar
- ❖ **UFC** : Unité formant colonie
- ❖ **URE** : Uréase
- ❖ **VP** : Voges-Proskauer



## LISTE DES ANNEXES

**Annexe 1 :** Examens après coloration

**Annexe 2 :** Figure 09 fiche d'identification de la galerie API 20E

**Annexe 3 :** Tableau 05 de lecture de la galerie API 20E

**Annexe 4 :** Milieux d'identification

**Annexe 5 :** Tableau 06 des Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour les Entérobactéries

**Annexe 6 :** Tableau 07 Préparation des solutions d'antibiotiques

\*

# *INTRODUCTION*

## INTRODUCTION

Depuis la découverte et l'utilisation des antibiotiques, l'antibiothérapie a permis le traitement d'un grand nombre d'infections bactériennes et d'améliorer l'espérance de vie humaine. Ceci nous a laissé croire que le combat contre les infections bactériennes était gagné. Malheureusement, avec l'utilisation abusive et parfois injustifiée de ces molécules, les bactéries ont appris à se défendre et à s'adapter et certaines sont devenues résistantes aux antibiotiques par le développement de nombreux mécanismes que ce soit d'origine chromosomique ou plasmidique (**Aires, 2011**). La pression de sélection exercée par l'utilisation importante de l'antibiothérapie et la diffusion épidémique des souches résistantes sont les deux facteurs principaux conditionnant cette évolution.

Aujourd'hui, la dissémination des bactéries résistantes aux agents antimicrobiens est à l'origine d'un problème majeur de santé publique extrêmement préoccupant par son impact sur la morbidité et la mortalité, par les choix thérapeutiques de plus en plus difficiles et incertains, ainsi par une augmentation des coûts du système de santé (**Verhagen, 2002**).

Parmi les germes responsables d'infections bactériennes, on retrouve les Entérobactéries. Qui constituent une vaste famille de bactéries d'un intérêt médical du fait de leurs interventions dans la majorité des pathologies infectieuses humaines, causant des infections nosocomiales ou communautaires telles que les infections pulmonaires, urinaires, des septicémies mais également d'autres infections intra-abdominales (**Gharout-Sait, 2016**).

Ces bactéries représentent l'un des groupes les plus redoutables et le plus fréquemment isolé surtout en milieu hospitalier, car elles sont productrices de bêta-lactamases et possèdent d'autres mécanismes de résistance à de nombreux antibiotiques (**Carattoli, 2009**). Les Entérobactéries productrices de BLSE (EBLSE) ne sont pas plus pathogènes que d'autres Entérobactéries, mais les infections qu'elles provoquent sont plus difficiles à traiter vu leur résistance à de nombreux antibiotiques (**Soussy, 2007**).

La diversité des espèces de cette famille est accompagnée par une diversité de comportements vis-à-vis des antibiotiques.

Dans ces conditions et afin d'envisager d'enrayer ce phénomène d'antibiorésistance, la connaissance de la fréquence des infections nosocomiales et communautaires dues aux Entérobactéries, la compréhension des mécanismes de résistance, ainsi que la détermination de leurs profils de résistance aux antibiotiques, représentent un atout majeur pour mettre en jeu des méthodes de prévention d'efficacité prouvée, ralentir la diffusion de souches multirésistantes et optimiser le choix de l'antibiothérapie.

C'est à la lumière de ce qui précède que notre travail, théorique, basé sur une recherche bibliographique, comporte les parties suivantes :

- Une première partie représentant une synthèse bibliographique composée de trois chapitres :
  - ✓ Le premier chapitre comporte des généralités sur les Entérobactéries, comme l'habitat, la taxonomie, les caractères morphologiques, culturels, biochimiques et antigéniques pour terminer avec des notions sur le pouvoir pathogène des principales espèces comme *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*.
  - ✓ Nous avons abordé succinctement en deuxième lieu, le chapitre antibiotiques, en soulignant les principaux antibiotiques utilisés, leur classification et leurs modes d'action comme les  $\beta$ -lactamines et les aminosides.
  - ✓ Le troisième volet consiste en l'étude des mécanismes de résistance des Entérobactéries à certains antibiotiques les plus utilisés dans le traitement des infections causées par ces germes, comme La résistance aux céphalosporines de troisième génération (C3G) et aux carbapénèmes grâce aux  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) et aux carbapénémases.
- Concernant la deuxième partie, elle intéresse également une recherche bibliographique sur la méthodologie du diagnostic des infections à Entérobactéries :
  - ✓ Nous avons procédé en premier lieu à l'étude des techniques de l'analyse des prélèvements, de l'isolement, de l'identification et de la conservation des Entérobactéries.
  - ✓ Ensuite nous avons abordé l'étude de la résistance des Entérobactéries aux antibiotiques, la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion des disques d'antibiotiques sur gélose est celle mentionnée dans notre recherche. Ensuite, pour la recherche du mécanisme de résistance aux  $\beta$ -lactamines, le test de détection de BLSE évoqué est le test de synergie. Cette partie s'est soldée par l'étude de la technique de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu solide pour apprécier les niveaux de résistance.
- Quant au contenu de la troisième partie, il s'agit d'une présentation succincte de quelques données de la littérature concernant d'un côté, les caractéristiques épidémiologiques des infections à Entérobactéries notamment la nature du prélèvement, l'âge, le sexe.....etc... .) et d'un autre côté, l'état actuel des taux de résistance des Entérobactéries aux antibiotiques.

*SYNTHESE*  
*BIBLIOGRAPHIQUE*

# 1 LES ENTEROBACTERIES

## 1.1 Définition

Les Entérobactéries ou (*Enterobacteriaceae*) constituent une famille bactérienne hétérogène très importante, qui regroupe plus d'une quarantaine de genres et de plusieurs dizaines d'espèces. Le nom d'Entérobactéries fait référence aux Entérocytes (cellules intestinales), car les bactéries appartenant à cette famille sont généralement des hôtes commensaux ou pathogènes (**pilly, 2013**).

La famille des *Enterobacteriaceae* comprend de nombreux genres bactériens répondant à la définition suivante :

- ce sont des bacilles à Gram négatif
- mobiles par une ciliature péritriche ou immobiles
- aéro ou anaérobie facultatifs
- fermentent le glucose avec ou sans production de gaz
- réduisent les nitrates en nitrites
- possédant une catalase à l'exception de l'espèce *Shigella dysenteriae*
- ne possèdent pas d'oxydase
- ne formant pas de spores
- possèdent un antigène commun appelé antigène de Kunitz ou ECA (enterobacterial common antigen).

Les différences entre ces nombreuses espèces bactériennes viennent de critères plus précis, tels que la fermentation des sucres, la production ou non de sulfures et la production d'enzymes du métabolisme (Exemple : les désaminases et les décarboxylases) (**Delarras, 2014**).

## 1.2 Habitat

Les Entérobactéries sont ubiquitaires avec un habitat très diversifié. On les trouve dans le sol, dans l'eau, dans certaines denrées alimentaires et aussi dans la cavité buccale, au niveau des voies aériennes supérieures et sur les organes génitaux. Ce sont des hôtes normaux ou pathogènes du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. (**Moussa et Moussaoui, 2016**). Dans l'intestin terminal, ces bactéries représentent plus de 10% de la flore totale (**Guiraud, 2012**).

### 1.3 Taxonomie

Les Entérobactéries sont des Eubactéries, elles appartiennent à l'embranchement des Protéobacteria, à la classe des *Gamma-protéobacteria*, à l'ordre des *Enterobacteriales* et à la famille des *Enterobacteriaceae*.

Plus de 40 genres et plus de 1700 espèces différents sont décrits au sein de cette famille et la classification est basée sur l'étude de leurs caractères phénotypiques (fermentation de différents sucres, production ou non de sulfures, présence ou absence de certains enzymes du métabolisme et ou génotypiques (ribotypage, hybridation ADN/ADN) (Denis, 2007).

Actuellement, la famille des *Enterobacteriaceae* comprend 100 espèces répertoriées. Les plus fréquemment isolées en bactériologie clinique appartiennent à 12 genres : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* et *Yersinia*. (Pilet et al., 1979)

**Tableau 01 : Principaux groupes d'Entérobactéries (Perriere, 1992)**

Groupes	Familles	Genres	Espèces
<b>GROUPE I</b>	<i>Edwardsiellae</i>	<i>Edwardsiella</i>	
	<i>Salmonelleae</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella typhi</i> <i>S. paratyphi</i> <i>S. enteritidis</i>
<b>GROUPE II</b>	<i>Escherichiea</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
		<i>Shigella</i>	<i>Shigella dysenteriae</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Shigella boydii</i> <i>Shigella sonnei</i>
	<i>Levineae</i>	<i>Levinea</i>	
<b>GROUPE III</b>	<i>Klebsielleae</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxymore</i>
		<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter aerogen</i> <i>Enterobacter cloaceae</i>
		<i>Serratia</i>	<i>Serratia marcescens</i>

## PARTIE 01 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

		<i>Erwinia</i>	
<b>GROUPE IV</b>	<i>Proteae</i>	<i>Proteus</i>	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Proteus rettgerii</i>
		<i>Providencia</i>	
<b>GROUPE V</b>	<i>Yersinieae</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Y. enterocolitica</i> <i>Y. pseudotuberculosis</i>

### 1.4 Caractères morphologiques

Les Entérobactéries représentent les caractères morphologiques suivants :

- Ce sont des bacilles à Gram négatif de 2 à 3 micromètres de long sur 0,6 de large.
- Les *Proteus* sont très polymorphes : formes longues et filamenteuses ou petits bacilles droits.
- Les espèces mobiles - les plus nombreuses - le sont grâce à une ciliature péritriche.
- D'autres sont immobiles, telles que (*Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia pestis*).
- Les *Klebsiella* sont capsulées.
- La plupart des espèces pathogènes pour l'homme possèdent des facteurs d'adhésion : fimbriae ou pili communs (**Le Minor et Veron ,1989**).

### 1.5 Caractères cultureux

La plupart des espèces d'Entérobactéries sont cultivées sur milieu minimal sans facteurs de croissance. La température optimale de croissance est habituellement entre 35° à 37°C mais la culture est possible entre 20° et 40°C. Leur temps de division varie de 20 à 40 minutes avec donc un maximum de culture atteint habituellement en moins de 24h d'incubation (**El bouamri, 2017**).

En milieu gélosé, les colonies sont lisses et régulières et atteignent 2 millimètres de large sauf celles des *Yersinia* qui sont plus petites. Les *Proteus* ont tendance à envahir la gélose et à y former un tapis uniforme. Les colonies entièrement muqueuses sont particulièrement fréquentes chez les cultures de *Klebsiella*. Dans un bouillon de culture, les Entérobactéries donnent un trouble homogène avec des ondes moirées (avec des reflets changeants) quand on agite le tube (**Joly et Reynaud, 2002**).



### 1.6 Caractères antigéniques :

L'étude des différents caractères antigéniques permet de classer en sérotypes les souches appartenant à une même espèce ou au même genre. (Avril et al., 2000). Les Entérobactéries possèdent différents types d'antigènes (Ndiaye, 2005), dont les principaux sont :

#### 1.6.1 Antigènes O (ou somatiques) :

Ce sont des antigènes de paroi présents chez toutes les Entérobactéries, constitués de lipopolysaccharides (LPS) qui sont thermostables à 100°C et résistent à l'alcool ou l'acide. Les réactions d'agglutination se produisent lentement et sont constituées d'agglutinats granulaires difficilement dissociables par agitation. La spécificité O est perdue par les souches R qui sont auto-agglutinables en eau distillée.

#### 1.6.2 Antigènes H :

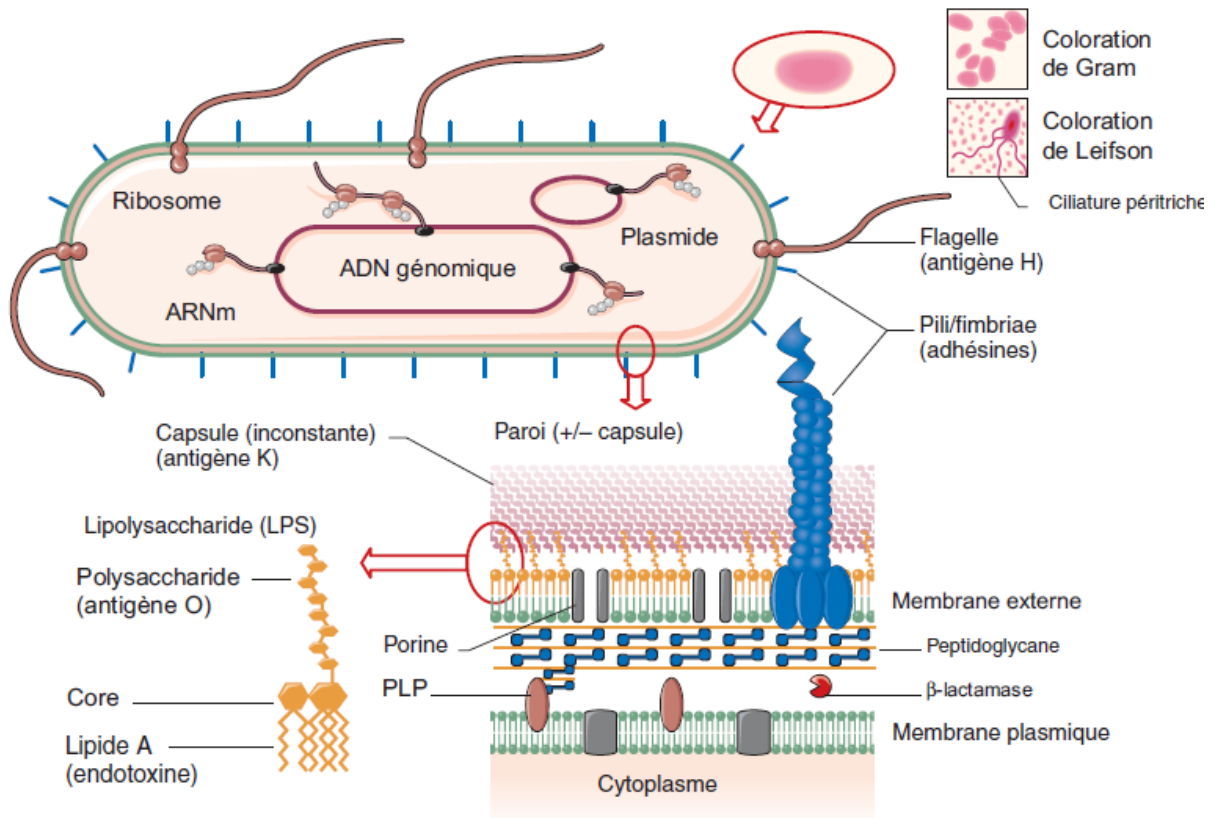
Ce sont des antigènes flagellaires qui ne sont donc présents que chez les souches d'Entérobactéries mobiles. Constitués d'une protéine, la flagelline, ils sont thermolabiles et inactivés par l'alcool. Les réactions d'agglutination se produisent rapidement et sont constituées d'agglutinats floconneux, facilement dissociables par agitation.

#### 1.6.3 Antigènes capsulaires K

Ces antigènes capsulaires (de l'enveloppe) sont généralement constitués d'une couche externe polysaccharidique. Parmi les antigènes K, se trouvent les antigènes : L, A, B de *E. coli* et l'antigène Vi de certaines *Salmonella* ou *Citrobacter*. Ces antigènes peuvent rendre la souche qui les possède inagglutinable par les antisérums O. Ce sont des antigènes solubles et thermolabiles détruits par une ébullition de 2 heures. Les antigènes d'adhérence ou adhésines, de nature protéique, en relation avec la présence de pili sont classés parmi les antigènes K (K88, K99).

#### 1.6.4 L'antigène Kunitz :

Cet antigène commun des *Enterobacteriaceae* n'est pratiquement retrouvé que dans cette famille et a un intérêt taxonomique.



**Figure 01** : Structure et aspect microscopique des *Enterobacteriaceae* (Denis et al., 2007).

### 1.7 Caractères biochimiques :

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

L'identification se produit dans des tubes, assurant à la fois la croissance et la réaction biochimique. De nouvelles approches à cette méthode notamment par l'élaboration des galeries API 20E, premières galeries mises au point pour les Entérobactéries et aussi la création d'automate comme le MINI API (Yassine, 2011).

Le tableau ci-dessous résume les caractères d'identification des genres des Entérobactéries les plus fréquemment rencontrés.

## PARTIE 01 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

**Tableau 02 :** Caractères biochimiques de quelques Entérobactéries (**Kassama et Hamadi, 2013**).

	<i>Escherichia</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Serratia</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Providencia</i>	<i>Yersinia</i>
<b>Glu</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Lac</b>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<b>ONPG</b>	+	+	+	+	+	-	+/-	-	-	+
<b>Indole</b>	+	-	-	+/-	-	-	+/-	+/-	+	+/-
<b>VP</b>	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
<b>Cit</b>	-	+	+	+	+	+/-	-	+/-	+	-
<b>Mob</b>	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
<b>Urée</b>	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
<b>H<sub>2</sub>S</b>	-	+/-	-	-	-	+	-	+/-	-	-

**Glu** : Glucose ; **Lac** : Lactose ; **ONPG** : Orthonitrophénol-bêta-galactosidase ;

**VP** : Voges-Proskauer; **Cit** : Citrate; **Mob**: Mobilité; **H<sub>2</sub>S**: Sulfure d'hydrogène

### 1.8 Pouvoir Pathogène :

Les Entérobactéries sont à l'origine de maladies de gravité très variable, en raison de mécanismes pathogéniques distincts (**Livermor, 1995**).

#### 1.8.1 *Escherichia* : (Leclercq, 2006)

Il existe différents types d'*Escherichia coli* responsables d'infections intestinales :

- **ETEC** : Enterotoxinogène *Escherichia coli*, responsable de la « diarrhée des voyageurs » ou « turista » et des syndromes épidémiques dans les pays du Tiers-monde.
- **EIEC** : Entero-invasive *Escherichia coli*, encore appelé *Escherichia coli Shigella-like*, responsable de syndromes dysentériques avec invasion de la muqueuse intestinale.
- **EHEC** : Entero-haémorragique *Escherichia coli*, responsable de diarrhées sanglantes liées à la production de toxines.
- **EPEC** : Entero-pathogène *Escherichia coli*, responsable de gastro-entérites infantiles.

#### 1.8.2 *Shigella* : (Le Minor et Veron, 1989).

Les shigelles sont des bactéries strictement humaines. Elles ne font pas partie de la flore intestinale normale. On ne les retrouve que chez les malades, les convalescents et les rares porteurs sains. Elles sont responsables de l'historique « dysenterie bacillaire » qui décimait les armées en campagne.

Actuellement, elles sont la cause chez l'adulte de colites infectieuses et chez l'enfant de Gastro-entérites sévères avec diarrhée mucopurulente et sanglante, fièvre et déshydratation. Elles détruisent l'épithélium de côlon et provoquent la production d'une micro-ulcération

#### 1.8.3 *Klebsiella* :

Au sein des Entérobactéries, les bactéries du genre *Klebsiella* se distinguent par leur immobilité constante, leur groupement en diplobacilles généralement encapsulés. On distingue cependant plusieurs espèces mais *Klebsiella pneumoniae* est la plus fréquemment retrouvée en clinique humaine.

Chez l'homme, elle est l'agent des pneumopathies aiguës, d'angines, d'otites, de cystites et d'affections rénales (**Ould Baba Ali & Taibi, 2019**).

#### 1.8.4 *Salmonella* :

Les salmonelloses peuvent donner lieu à trois types de manifestations cliniques :

- **Formes septicémiques** : ce sont les fièvres typhoïdes et para typhoïdes qui sont des maladies à déclaration obligatoire. Elles sont dues aux salmonelles majeures : *S. typhi* et

*S. paratyphi* A, B et rarement C, qui ne se rencontrent que chez l'homme, qui en est le seul réservoir.

- **Formes digestives** : il s'agit des toxi-infections alimentaires et des gastro-entérites dues aux salmonelles ubiquistes, dont les hôtes naturels sont les animaux, qui peuvent contaminer l'homme.
- **Formes extra-digestives** : elles sont plus rares : infections urinaires, méningites, infections pulmonaires... (Avril *et al.*, 1992 ; Flandrois, 1997).

### 1.8.5 *Proteus-Providencia* :

Ce sont des hôtes normaux du tube digestif de l'homme et des animaux, ils peuvent dans certains cas se montrer pathogènes et provoquer des infections très diverses : entérites, cystites, otites, méningites. Ces infections sont de plus en plus fréquentes (Bennani, 2014). Ces bactéries ont la capacité d'acquérir facilement de nombreux caractères de résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques, expliquant qu'elles soient souvent sélectionnées dans le tube digestif des malades soumis à une antibiothérapie (Berche *et al.*, 1988).

### 1.8.6 *Enterobacter* :

Les *Enterobacter cloacae* sont des espèces du genre *Enterobacter*, 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).

### 1.8.7 *Serratia* :

Les espèces de *Serratia* sont des agents pathogènes opportunistes. *Serratia marcescens* est à l'origine d'une multitude d'infections, elle colonise les systèmes respiratoires, digestifs et urinaires, cause des bactériémies, des infections des voies respiratoires inférieures, des infections urinaires et cutanées (Van *et al.*, 2007).

## 2 LES ANTIBIOTIQUES

### 2.1 Définition :

Le terme d'**antibiose** est créé par **Vuillemin** (France) en **1889** pour décrire une situation dans laquelle un micro-organisme détruit un autre (**Paolozzi et Liebart, 2015**).

Les antibiotiques (Du grec **anti** : « **contre** », et **bios** : « **la vie** ») sont des substances élaborées par des micro-organismes (procaryotes ou eucaryotes) ou obtenues à l'heure actuelle par synthèse ou hémisynthèse et capables d'inhiber spécifiquement la croissance d'autres micro-organismes par un mécanisme particulier jouant sur les mécanismes vitaux du germe (**Gogny, 2001**). Pour qu'il soit actif, un antibiotique doit pénétrer dans la bactérie, sans être détruit ni être modifié, se fixer sur une cible et perturber la physiologie bactérienne (**Ogwara, 1981**).

### 2.2 Classification :

Les antibiotiques sont classés en familles dont la distinction repose sur la structure chimique, le mode d'action, le spectre d'activité (**Tableau 03**), c'est-à-dire l'ensemble des espèces microbiennes sensibles à cette action (**Michel, 1981**). Il existe sept classes majeures d'antibiotiques bactériens utilisés en milieu clinique : Les  $\beta$ -lactamines, les glycolipides, les aminoglycosides, les tétracyclines, les macrolides, les quinolones et les sulfonamides (**Nukaga et al., 2003**).

### 2.3 Mode d'action (Talbert et al., 2015) :

Chaque famille d'antibiotique possède son propre site d'action, les structures et les fonctions bactériennes les plus communément ciblées sont :

- **la paroi cellulaire** (peptidoglycane) : inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne ( $\beta$ -lactamines, fosfomycines, glycopeptides)
- **la membrane cytoplasmique** : inhibition de la synthèse de la membrane (polymyxines)
- **Le chromosome** : inhibition de la synthèse de l'ADN (quinolones, rifampicines)
- **Le ribosome** : inhibition de la synthèse protéique (tétracyclines, aminosides, macrolides).

## PARTIE 01 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

**Tableau 03 : Principales familles d'antibiotiques (Paolozzi et Liebart, 2015).**

Familles	Caractéristiques chimiques	Sous familles
<b>β-lactamines</b>	Cycle à 4, 5 ou 6 atomes de C avec un –NH fixé au C-β	Pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes, monobactames
<b>Glycopeptides</b>	Heptapeptide cyclique liant un sucre (mannose, glucisamine ou glucose)	Téicoplanine, vancosamine, vancomycine
<b>Tétracyclines</b>	Noyau naphtacène-carboxamidetétracyclique lié à des substituants en position 5, 6, 7	
<b>Macrolides</b>	Anneau macrolactonique modifié par un ou plusieurs sucres	
<b>Phénicolés</b>	Dérivés de l'acide dichloroacétique et d'un phénylsubstitué	Chloramphénicoles, thiamphénicoles
<b>Aminosides</b>	Aminocyclitol, lié à 2 ou rarement 3 oses	Streptomycine
<b>Ansamycines</b>	2 cycles aromatiques liés par une longue chaîne constituée d'un aminocyclitol auquel sont liés des oses	Rifampycine, rifamycine, rifabutine
<b>Sulfamides</b>	Para-aminobenzène sulfamide	
<b>Triméthoprime</b>	diaminopyrimide	Inhibiteur compétitif la dihydrofolate-réductase
<b>Polymyxines</b>	Antibiotiques peptidiques cycliques	Polymyxines B et E

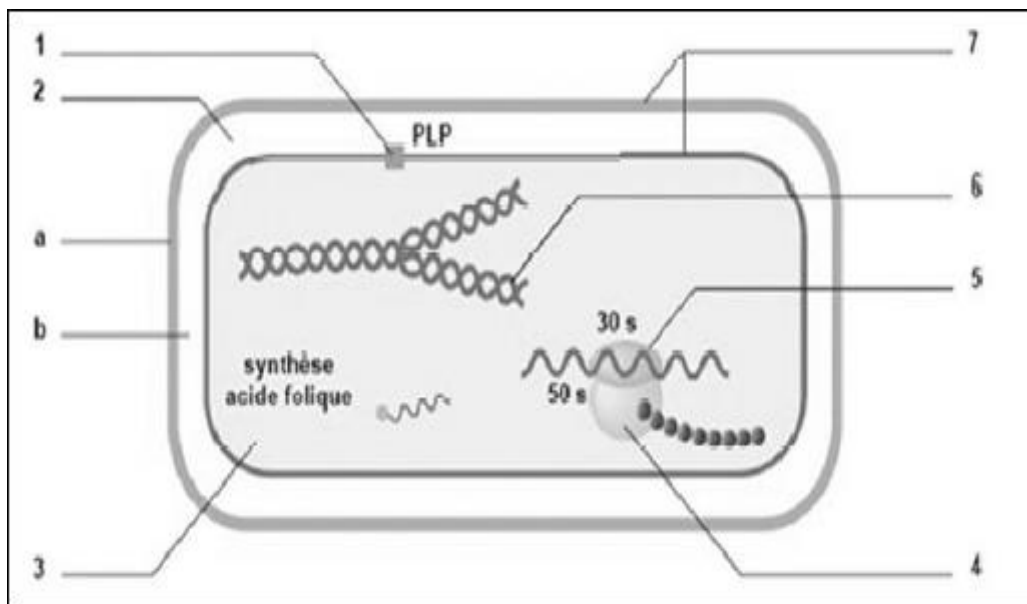


Figure 02 : Cibles des principaux antibiotiques (Benmouden et Hakkou, 2007).

a. Paroi bactérienne, b. Espace périplasmique,

1.  $\beta$ -lactamine (PLP), 2. Glycopeptides, 3. Dihydroptérorate synthétase (sulfamides)
4. Fixation à la sous-unité 50 S du ribosome (macrolides, synergistines, lincosamides, phénicolés)
5. Fixation à la sous-unité 30 S du ribosome (aminosides, tétracyclines)
6. Acides nucléiques (quinolones, rifamycines, nitroimidazolés)
7. Membranes cytoplasmiques (polymyxines)

## 2.4 Principaux antibiotiques utilisés et leurs modes d'action :

Les principaux antibiotiques sont les  $\beta$ -lactamines, les aminosides et les quinolones.

### 2.4.1 Béta-lactamines :

#### A. Généralités :

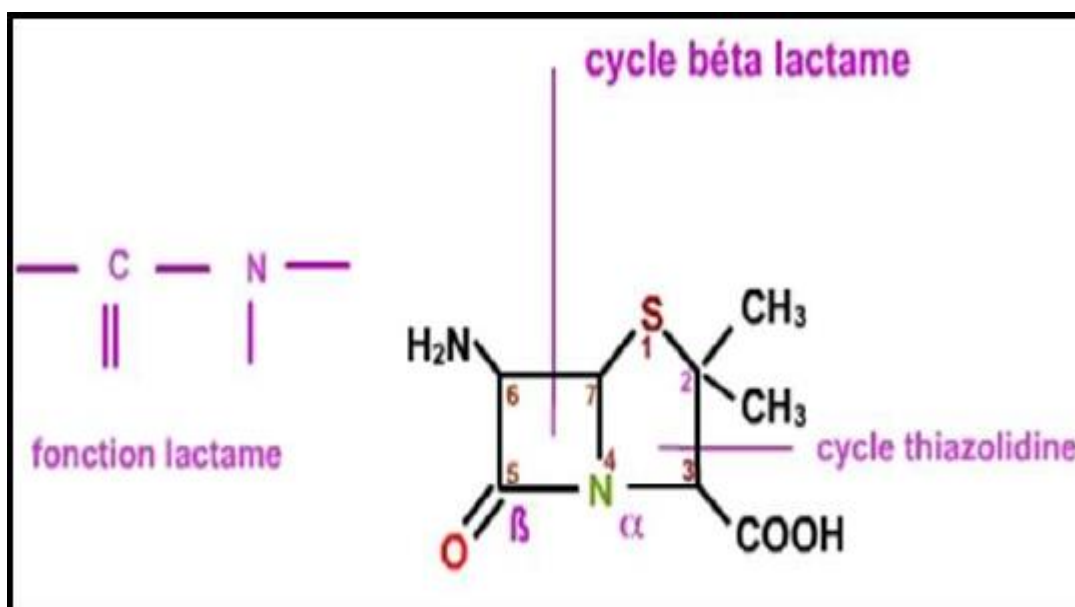
Les  $\beta$ -lactamines ont un effet bactéricide sur les bactéries en voie de croissance et sont considérés comme la famille d'antibiotiques la plus développée et la plus utilisée dans la pratique clinique courante (Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006) surtout dans le traitement des infections dues aux Entérobactéries. Cette large utilisation est due à :



## PARTIE 01 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

- leur large spectre antibactérien.
- leur faible toxicité et le vaste choix de molécules disponibles (**Ferech et Coenen, 2006 ; Livermore, 1995 ; Vander-Stichele et al, 2006**).
- leur activité bactéricide temps-dépendante.
- Leur utilisation pour le traitement d'environ 55 % de toutes les infections bactériennes (**Fisher et al, 2005 ; Matagne et al., 1999 ; Schroeder et al., 2002**).

Cette famille comprend un grand nombre de molécules, toutes caractérisées par une structure de base : le noyau de base est le cycle  $\beta$ -lactame indispensable à l'activité antibiotique (**Figure 03**).



**Figure 03 : Cycle  $\beta$ -lactame (Bessard, 2004).**

### **B. Classification :**

Ce sont des antibiotiques caractérisés par la structure de base : le noyau  $\beta$ -lactame dont le représentant le plus ancien est la pénicilline G. La famille des  $\beta$ -lactamines est répartie en quatre principaux groupes : les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes (**Bryskier, 1999**).

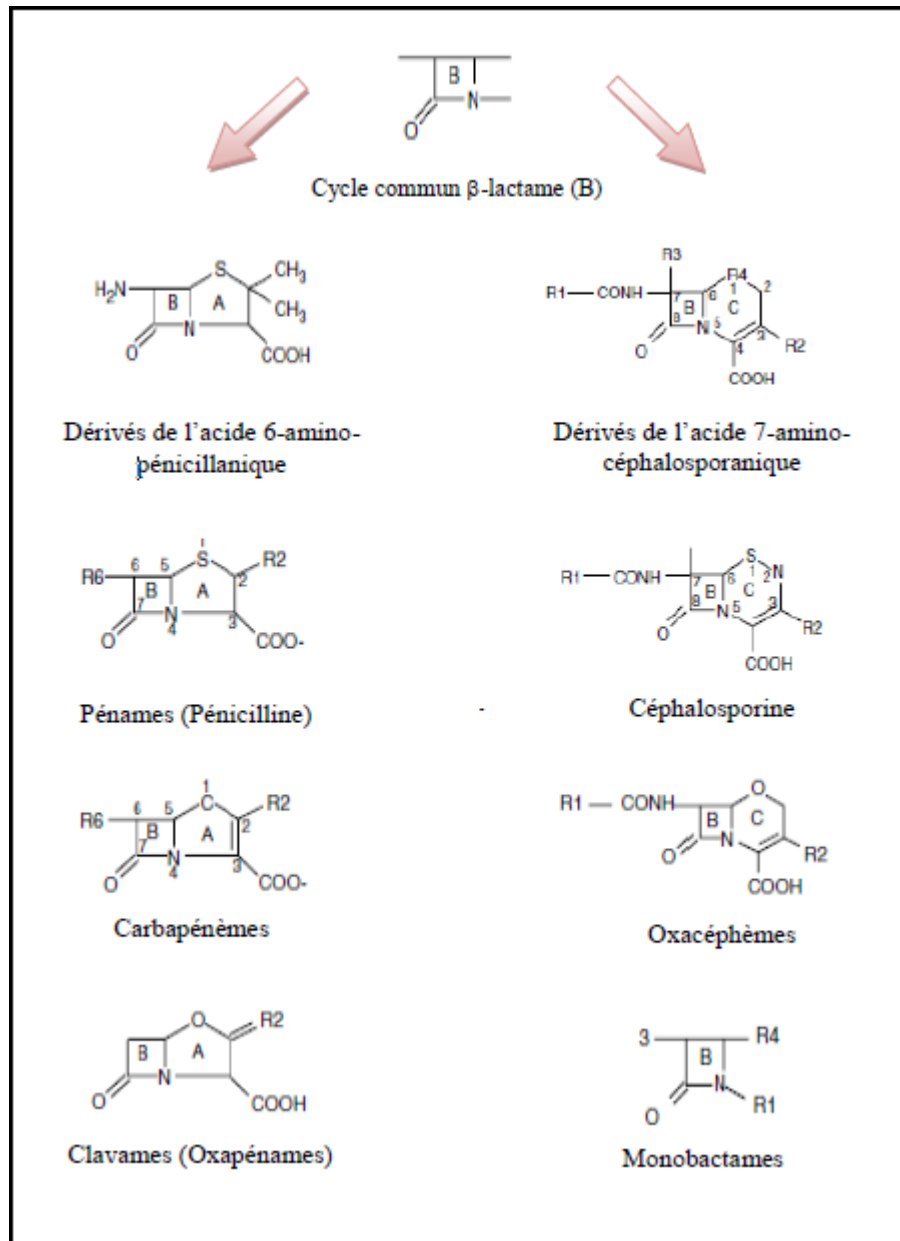


Figure 04 : Classification des  $\beta$ -lactamines (Cavallo *et al.*, 2004).

**a. Les pénicillines (noyau pénème) :**

Dont font partie la pénicilline G, la méticilline, les amino-benzyl pénicillines (ampicilline et amoxicilline), les uréido-pénicillines (pipéracilline), les carboxy-pénicillines (ticarcilline) et les amidino-pénicillines (mécillinam). (Paul, 2005).

**b. Les céphalosporines (noyau céphème) :**

Elles sont produites par un champignon dénommé *Cephalosporium acremonium*. Ces  $\beta$ -lactamines sont toutes à large spectre et leur intérêt réside surtout dans leur activité sur les bacilles à Gram négatif. (Lagha, 2015).

Actuellement, il existe quatre générations de céphalosporines classées selon leur date de mise sur le marché et leur spectre d'activité : la première (céfalotine, céfalaridine), la deuxième (céfamandole, céfoxitine), la troisième (céfotaxime, ceftazidime) et la quatrième génération (céfépime, cefpirome) (cavallo *et al.*, 2004).

### c. Les carbapénèmes : (noyau pénème)

Qui sont les plus efficaces actuellement, exemples : imipénème, méropénème. Ce sont les  $\beta$ -lactamines ayant le spectre le plus large, ils sont actifs vis-à-vis de très nombreuses espèces de bacilles à Gram négatif dont les Entérobactéries (Dortet *et al.*, 2013). L'activité de ces carbapénèmes est liée en particulier à la rapidité de leur pénétration à travers la paroi externe des bacilles à Gram négatif et à leur stabilité vis-à-vis de la plupart des  $\beta$ -lactamases naturelles ou acquises (Nordmann *et al.*, 2010). Pour cette raison, ils font partie des antibiotiques utilisés en première ligne au cours du traitement probabiliste des infections nosocomiales sévères (Wolff *et al.*, 2008).

### d. Les monobactames (noyau azétidine) :

Ce sont des  $\beta$ -lactamines monocycliques, représentés par l'aztréonam qui a une activité sur les bacilles à Gram négatif comparable à celles des céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, mais n'est pas actif sur les bactéries à Gram positif et les anaérobies (Le Noc, 1999).

### C. Mode d'action des $\beta$ -lactamines :

Toutes les  $\beta$ -lactamines ont le même mécanisme d'action, elles inhibent la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne en se fixant de façon covalente sur certaines enzymes, des transpeptidases et des carboxypeptidases responsables de la synthèse et du remodelage du peptidoglycane et qui sont également appelées protéines de fixation de la pénicilline (PBP, pour Penicillin Binding Protein) (Ghuysen, 1991; Mouton *et al.*, 1991), cette liaison est due à une analogie structurale entre le substrat naturel de ces enzymes, l'acyl-D -alanyl- D-alanine et le cycle  $\beta$  -lactame (Lagha, 2015). Ce dernier se lie de manière covalente et irréversible au site actif de l'enzyme provoquant son inactivation, l'inhibition de ces enzymes fait accumuler des précurseurs du peptidoglycane qui activent le système autolytique de la bactérie (Stratton, 2000).

#### 2.4.2 Aminosides :

##### A. Généralités :

Les aminosides, également appelés aminoglycosides sont des molécules bactéricides à large spectre, naturellement élaborés par des actinomycètes ou en sont dérivées par hémisynthèse. Ils sont constitués de deux ou plusieurs sucres aminés liés par une fonction

glycosidique à un noyau hexose. Leurs fonctions amines sont ionisées formant des polycations. Les premiers aminosides étaient la streptomycine et la néomycine, suivies de la gentamicine, l'amikacine, la netilmicine et la tobramycine (**Belabbaci, 2014**).

Ils sont réservés au traitement des infections sévères à bactéries à Gram négatif et à staphylocoques notamment dans leurs manifestations pulmonaires, endocardites, rénales et bactériémiques. Ils sont souvent employés dans le traitement probabiliste de ces infections en association avec une bêta-lactamine ou une fluoroquinolone (**Martin, 2008**).

### **B. Mode d'action :**

Les aminosides agissent d'habitude comme un inhibiteur de la synthèse des protéines, mais perturbent aussi la paroi cellulaire. Malgré leur taille petite et leur caractère hydrophile, seulement une petite quantité des aminoglycosides est transportée par les porines (**Molitor, 2010**). Donc ils doivent pénétrer dans les membranes externe et cytoplasmique. Cette entrée est divisée en deux étapes EDP I et EDP II (Energy dependent phase I et II) (**Tankovic, 2000**). Pendant EDP I une accumulation d'aminoglycosides sur la membrane extérieure où la structure polycationique de l'aminoglycoside aide à interférer avec le LPS, cette étape a déjà un effet bactériostatique. EDP II finit en accumulation plus rapide et l'aminoglycoside crée des fissures dans la membrane extérieure aboutissant à une assimilation plus rapide d'antibiotique, et la sortie de contenu intracellulaire. Cette action rapide représente l'activité bactéricide (**Tankovic, 2000**).

Une fois dans le cytoplasme, les aminoglycosides causent un taux accru d'erreur pendant la synthèse protéique, ils se fixent au site aminoacyl de l'ARN ribosomal 16S (ARNr), dans la sous-unité 30S du ribosome (**Durante-Mangoni et al., 2009**) et provoquent :

- l'inhibition de l'étape d'élongation (en empêchant le transfert du peptidyl- ARNt depuis le site A vers le site P) conduisant à un arrêt de la synthèse protéique ;
- l'introduction d'erreurs dans la lecture des codons de l'ARNm, engendrant la production de protéines aberrantes.

C'est l'accumulation des protéines erronées synthétisées qui est responsable de la létalité induite par les aminosides (**Faure, 2009**).

### **2.4.3 Quinolones :**

#### **A. Généralités :**

Les quinolones, découvertes en 1962 par Lesher, sont des agents synthétiques à activité bactéricide qui inhibent des enzymes (Topoisomérase ou ADN gyrase). Du fait de leur bonne

diffusion tissulaire, ces antibiotiques sont largement utilisés en médecine humaine et vétérinaire, notamment dans le cas d'infections urinaires et respiratoires (**Meradi et al., 2009**).

### **B. Mode d'action :**

Elles inhibent des topoisomérases, enzymes intervenant dans la conformation de l'ADN et plus particulièrement la topoisomérase II (ou ADN gyrase) et la topoisomérase IV. Elles se fixent sur le complexe formé par la topoisomérase et l'ADN ce qui empêche la progression de la fourche de réplication (**Guillard et al., 2008**).

Les quinolones de 1<sup>ère</sup> génération, dont le chef de file est l'acide nalidixique, n'agissent que sur les bacilles à Gram négatif et ne sont utilisées que dans le traitement des infections urinaires. Les quinolones de 2<sup>ème</sup> génération ou fluoroquinolones, utilisées depuis les années 80, comprennent principalement la pefloxacilline, l'ofloxacine, la ciprofloxacilline. Elles sont beaucoup plus actives que les quinolones de 1<sup>ère</sup> génération (**Nseir et al., 2005; Nauciel, 2000**).

### 3 ENTEROBACTERIES ET RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

L'efficacité des antibiotiques utilisés dans le traitement des infections causées par les *Enterobacteriaceae* dépend des facteurs suivants :

- ✓ la quantité d'antibiotique au contact de la cible.
- ✓ l'affinité de l'antibiotique pour la cible.
- ✓ la production d'enzyme inactivant l'antibiotique.

Ces facteurs sont responsables soit d'une résistance naturelle, soit d'une résistance acquise (**Courvalin et al., 2005**).

#### 3.1 Définition de la résistance bactérienne :

Une souche bactérienne est dite résistante à un antibiotique donné, quand elle est capable de se développer en présence d'une concentration en antibiotique significativement plus élevée que celle habituellement active sur les souches de cette espèce (**Leclerc et al., 1995**).

La résistance aux antibiotiques des bactéries peut être naturelle ou acquise.

##### 3.1.1 Résistance naturelle : (ou intrinsèque ou insensibilité) :

La résistance naturelle est un caractère d'espèce qui touche toutes les souches de l'espèce considérée. Elle est portée par le chromosome, stable, et transmise à la descendance (transmission verticale) lors de la division cellulaire, mais elle n'est généralement pas transférable d'une bactérie à l'autre (transmission horizontale) (**Lozniewski et Rabaud, 2010**).

Ce type de résistance détermine le phénotype sauvage d'une espèce vis-à-vis d'un antibiotique. Par exemple : *Klebsiella pneumoniae*, grâce à sa pénicillinase naturelle de bas niveau, est naturellement résistante aux aminopénicillines (Par exemple : l'amoxicilline) et aux carboxypénicillines (Par exemple : la ticarcilline) par sécrétion de pénicillinases.

Les Entérobactéries sont naturellement résistantes aux pénicillines G et M, Macrolides, Lincosamides, Synergistines et Glycopeptides. Elles sont habituellement sensibles aux  $\beta$ -Lactamines, Phénicolés, Tétracyclines, Sulfamides, Triméthoprime, Nitrofuranes, Fosfomysine, Colistine et Aminoside (Kanamycine, Gentamicine, Tobramycine, Amikacine, et Nétilmicine) (**Pina et al., 2000**).

##### 3.1.2 Résistance acquise :

La résistance acquise ne concerne que certaines souches bactériennes au sein d'une espèce donnée. Variable dans le temps et dans l'espace, elle se propage de façon importante. Elle est

moins stable, imprévisible, évolutive et observée *in vivo et in vitro* pour la plupart des bactéries et des antibiotiques connus. Elle résulte d'une modification du capital génétique de la bactérie (**Lozniewski et Rabaud, 2010**).

Sur le plan génétique, la résistance peut être acquise par deux voies totalement distinctes, soit des mutations affectant des gènes présents sur le chromosome (résistance chromosomique), soit l'acquisition de gènes étrangers (résistance extra-chromosomique). Ces gènes peuvent provenir du chromosome d'espèces différentes ou être véhiculés par des éléments génétiques mobiles pouvant être transférés d'une bactérie à l'autre, on parle alors de transmission horizontale (**Galimand et al., 2005**). L'ADN exogène peut provenir de cellules bactériennes appartenant à une autre souche de la même espèce ou même d'une espèce, voire d'un genre différent (**Fauchère et Avril, 2002**). Le transfert horizontal est le principal mécanisme responsable de la dissémination des gènes de résistance au sein du monde bactérien et concerne 80 % des cas de résistances aux antibiotiques rencontrés en médecine humaine. Le plus souvent, lors de ce transfert, les gènes sont véhiculés par des éléments génétiques mobiles, plasmides ou transposons (**Ploy et al., 2005**).

### 3.2 Mécanismes de résistance des Entérobactéries

#### 3.2.1 Résistance aux $\beta$ -lactamines :

Les entérobactéries peuvent résister aux  $\beta$ -lactamines selon différents mécanismes, enzymatique ou non enzymatique :

##### 3.2.1.1 Résistance non enzymatique :

###### a. Imperméabilité :

Pour atteindre leurs cibles situées à la surface de la membrane cytoplasmique, les  $\beta$ -lactamines doivent diffuser aux travers de canaux spécialisés appelés porines. La diffusion est en fonction de la charge, de la masse moléculaire et de la polarité des molécules, Une diminution de la perméabilité résulte souvent d'une mutation affectant la structure des porines ou diminuant la synthèse des porines par lesquelles l'antibiotique peut pénétrer dans la bactérie (**Kumar et Schweizer, 2005**). C'est chez *Escherichia coli*, *Enterobacter spp*, *Serratia spp*, *Klebsiella spp*. que ce mécanisme a le plus d'importance : une ou plusieurs modifications des porines sont à l'origine d'une résistance acquise aux bêta-lactamines. La disparition de porine provoque l'augmentation des concentrations minimales inhibitrices de certaines  $\beta$ -lactamines comme cela a été mis en évidence chez certaines Entérobactéries (*Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli*) (**Nicaïdo, 2000**).

### **b. Excrétion de l'antibiotique par un mécanisme d'efflux :**

Il existe chez les bactéries des systèmes permettant d'excréter certains antibiotiques hors de la cellule. Ces systèmes jouent un rôle dans la résistance naturelle. Sous l'effet de mutations, leur niveau d'expression peut augmenter et faire apparaître une résistance acquise pouvant toucher simultanément plusieurs familles d'antibiotiques (fluoroquinolones et  $\beta$ -lactamines) (Nauciel et Vilde, 2005). Chez les bactéries à Gram négatif, les systèmes d'efflux sont souvent des complexes protéiques ternaires avec une pompe transmembranaire, une protéine périplasmique de jonction et une porine de la membrane externe. (Blair et Piddock, 2009).

La résistance aux tétracyclines ou aux macrolides est due le plus souvent à un mécanisme d'efflux.

### **c. Modification des protéines liée aux pénicillines (PLP) :**

Cette résistance peut avoir lieu par des mutations dans les gènes chromosomiques codant pour les PLPs ou par l'acquisition de gènes étrangers codant pour des nouveaux PLPs ayant une affinité différente aux  $\beta$ -lactamines (Lagha, 2015).

#### **3.2.1.2 Résistance enzymatique :**

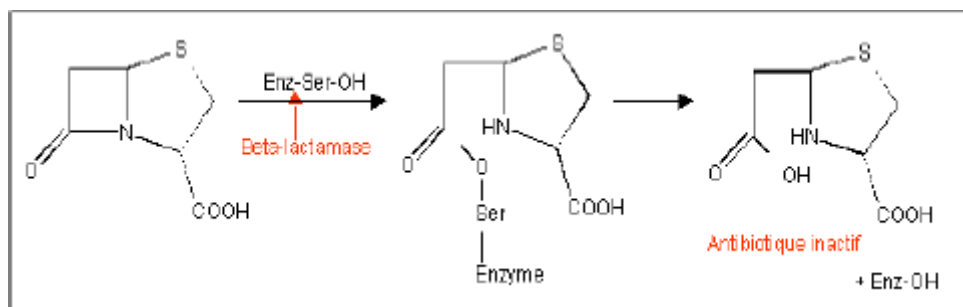
C'est le mécanisme prédominant de résistance acquise des Entérobactéries aux  $\beta$ -lactamines. Les Entérobactéries ont une capacité de produire des bêta-lactamases, enzymes qui inactivent les  $\beta$ -lactamines par ouverture du cycle bêta-lactame.

##### **a. Bêta-lactamases :**

- **Définition :**

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes bactériennes capables d'inactiver de nombreuses  $\beta$ -lactamines par ouverture du cycle bêta-lactame. Elles catalysent de manière efficace et irréversible l'hydrolyse de la liaison amide du cycle  $\beta$ -lactame des pénicillines, des céphalosporines, des monobactames et des carbapénèmes, pour donner un acyl-enzyme qui sera ensuite dégradé en acide inactif (Figure 05). Ces enzymes sont localisées au niveau de l'espace périplasmique chez les bactéries Gram négatif (Medeiros, 1984). Les gènes de résistance de ces enzymes se situent soit au niveau du chromosome bactérien, soit sur des éléments extra-chromosomiques (Livermor, 1995 ; Abbassi et al., 2010)





**Figure 05** : Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle  $\beta$ -lactame

(Lagha, 2015)

- **Classification :**

Deux types de classification sont principalement utilisés pour ces enzymes : la classification structurale proposée par Ambler et la classification fonctionnelle de Bush.

- ❖ **Classification d'Ambler :**

En 1980, Ambler a proposé une classification basée sur la structure primaire des  $\beta$ -Lactamases qui divise les  $\beta$ -lactamases en quatre groupes (de A à D).

Sur la base du mécanisme catalytique, on distingue :

- ✓ Les enzymes à sérine active réparties en classes A, C et D ont en commun un résidu sérine dans le site actif.
- ✓ Les métallo-enzymes : les enzymes de classe B ont besoins d'un ion métallique  $Zn^{2+}$  catalysant leurs activités (Materon et al., 2004).
- **Classe A** : elle comprend des pénicillinases, des céphalosporinases inductibles (AmpA) chromosomiques ou plasmidiques, et des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE), sensibles à l'acide clavulanique.
- **Classe B** : cette classe constitue le groupe des métallo-enzymes zinc-dépendantes (AmpB), pouvant être inhibées par acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA).
- **Classe C** : elle est constituée de céphalosporinases (AmpC) chromosomiques ou plasmidiques, résistantes à l'acide clavulanique.
- **Classe D** : oxacillinases (AmpD), le plus souvent plasmidiques, de phénotype pénicillinases peu sensibles aux inhibiteurs, pouvant être inhibées par le NaCl (Bush et al., 1995).

- ❖ **Classification de Bush, Jacoby et Medeiros :**

Elle est établie selon les propriétés fonctionnelles de l'enzyme définies par son substrat préférentiel et son profil d'hydrolyse (Bush et al., 1995).

### b. $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) :

- **Définition :**

Les BLSE ont été décrites pour la première fois en 1983, en Allemagne et constituent un groupe d'enzymes à large spectre d'action, appartenant à la classe A ou D de la classification d'Ambler (**Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006**), capables d'hydrolyser les pénicillines, toutes les générations de céphalosporines et les monobactames (aztréonam) mais pas les céphamycines (céfoxitine et céfotetan) ou les carbapénèmes (imipénème, méropénème, doripénème et ertapénème).

Ces enzymes sont inhibés par les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases telle que l'acide clavulanique, le sulbactam et le tazobactam (**Peirano et Pitout, 2010**). Les bactéries productrices de BLSE peuvent occasionner des infections hospitalières et communautaires.

- **Type des BLSE :**

Actuellement plus de 400 BLSE naturelles ont été décrites ; elles ont été classées en 11 familles différentes sur la base de leur séquence d'acides aminés : TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES, SFO, FEC et OXA.

Les 3 majeures familles sont :

- ✓ **BLSE de type TEM (TEMONEIRA - nom du patient) :**

Les BLSE de types TEM dérivent de TEM-1 et TEM-2 par substitution d'un ou de plusieurs acides aminés. Bien que fréquemment retrouvées chez *E. coli* et *K. pneumoniae*, les BLSE de type TEM ont aussi été rapportées chez d'autres espèces d'Entérobactéries comme *E. cloacae*, *P. mirabilis*. Jusqu'à 90% de la résistance à l'ampicilline chez *E. coli* est due à la production de TEM-1, qui est capable d'hydrolyser l'ampicilline, et à un degré moindre l'oxacilline ou la céfalotine (**Bouazza et Bouakka, 2016**)

- ✓ **BLSE de type CTX-M (CEFOTAXIMASE-MUNICH) :**

Ce sont des  $\beta$ -lactamases non-TEM et non-SHV de la classe A d'Ambler qui tiennent leur nom de par leur hydrolyse préférentielle du céfotaxime par rapport à la ceftazidime « CTX » et « M » pour leur lieu d'isolement (Munich). (**Philippon et al., 2006**).

Le gène de CTX-M a été retrouvé chez de nombreuses Entérobactéries et tout particulièrement chez *E. coli* (**Marilyse, 2015**). Les BLSE de ce type sont fortement inhibées par le tazobactam que par l'acide clavulanique. (**Lagha, 2015**).

- ✓ **BLSE de type SHV (Sulfhydryl variable) :**

Est une  $\beta$ -lactamase codée par le gène blaSHV chromosomique, les BLSE de ce type se retrouvent plus fréquemment mais pas exclusivement, dans le genre *Klebsiella*. La majorité de

ces enzymes ont été décrites chez les souches de *K. pneumoniae*, mais aussi peut se trouver chez *Citrobacter freundii*, *C. diversus*, *E.coli*, *Enterobacter cloacae* et *P.aeruginosa*. (Bradford,2001)

### 3.2.2 Résistance des Entérobactéries aux aminosides :

La résistance des Entérobactéries à cette famille d'antibiotique est devenue un grave problème de santé publique. . Le mécanisme de résistance principal aux aminoglycosides est l'acquisition d'enzymes bactériennes inactivatrices qui modifient les antibiotiques : phosphotransférases (APH), nucléotidyltransférases (ANT) et acétylstranférases (AAC) qui catalysent la phosphorylation des groupements hydroxyles (OH), la nucléotidylation des groupements hydroxyle, et l'acétylation des groupements aminés (NH<sub>2</sub>), respectivement. Ces enzymes sont majoritairement codées par des gènes portés sur des plasmides. (Fauchere, 1997).

### 3.2.3 Résistance des Entérobactéries aux quinolones :

La résistance acquise à ces antibiotiques est le résultat de la combinaison de plusieurs mécanismes. Pendant plus de 30 ans, les seuls mécanismes de résistance aux quinolones connus avaient un support chromosomique (Skurnik et Andremont, 2006)

Les mutations responsables sont localisées dans des gènes qui conduisent soit à :

- La perte d'affinité de l'antibiotique pour sa cible (mutation de la topoisomérase dans la région *quinolone resistance determining region* [QRDR].
- Une augmentation de son excrétion hors du cytoplasme (par surexpression des systèmes d'efflux).
- Une diminution de sa pénétration transmembranaire (par déficit quantitatif ou qualitatif de la synthèse des porines) (Nordmann et Mammeri, 2007).

En 1998, Martinez et al. Ont décrit la première souche (*Klebsiella pneumoniae* UAB1) dont le support de la résistance est un plasmide transférable (pMG252). Le déterminant génétique de cette résistance est le gène *qnr* dont la caractéristique est d'être porté par différents types d'intégrons. L'importance de ce support est sa transférabilité et sa capacité à accélérer la diffusion de la résistance aux quinolones. Les gènes *qnr*, codant des protéines qui protègent les topoisomérases de l'action des quinolones, Cependant plusieurs types de gènes *qnr* ont été décrits (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* et *qnrS*) avec différents variants. Les gènes *qnr* ont été identifiés dans différentes espèces d'Entérobactéries et souvent associés à la production de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (Guessennd et al., 2008).

*METHODOLOGIE DE  
DIAGNOSTIC*

### 1. Analyse des prélèvements et isolement :

Dès la réception d'un prélèvement et afin d'éviter les éventuelles contaminations, le prélèvement est rapidement mis en culture.

L'ensemencement se fait sur un ou plusieurs milieux de culture [de base : Gélose nutritive (GN), gélose CLED (très utilisée dans l'étude des bactéries connues dans l'urine), sélectifs : Chapman, Hektoen, d'enrichissement : gélose au sang frais, gélose au sang cuit (chocolat)], bouillon nutritif et sélénite qui sont destinés à l'enrichissement.

La manipulation du prélèvement s'effectue à proximité du bec Bunsen à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, l'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre quadrants.

L'incubation des boîtes ensemencées se fait à 37°C pendant 24h en aérobose à l'exception des milieux gélose au sang frais et gélose au sang cuit qui sont incubés en anaérobose.

La recherche des Entérobactéries dépend de la nature du prélèvement traité :

#### 1.1. Analyse cytotbactériologique des urines (ECBU), liquide céphalo-rachidien (LCR) et crachat :

Pour le crachat, faire tout d'abord une dilution décimale jusqu'à  $10^{-6}$

##### ❖ Technique :

- ✓ **Appréciation macroscopique** : clair, trouble, hématurique.
- ✓ **Examen microscopique** : La numération cellulaire permet l'orientation du diagnostic.

La numération se fait sur les cellules de Nageotte. Le but de cet examen est le dénombrement des leucocytes, des polynucléaires, la recherche des hématies, des cellules épithéliales, des levures, des cristaux et la présence ou absence de bactéries.

##### ✓ **Mise en culture**

- Homogénéiser les prélèvements d'urine, LCR et crachat.
- Ensemencer l'urine (2 gouttes) sur les boîtes de GN (gélose nutritive) et CLED (Déficiente en Electrolyte, Lactose et Cystine) selon la méthode des 4 quadrants.
- Ensemencer LCR et crachat (2 gouttes) sur les quatre milieux de culture [gélose au sang frais, gélose au sang cuit (gélose Chocolat), Hektoen et Chapman] selon la méthode des quatre quadrants.
- Incuber à 37°C pendant 18 à 24h.

### 1.2. Pus et prélèvement cutané :

#### ❖ Technique

- Prendre l'écouvillon de pus ou de prélèvement cutané et l'ensemencer selon la méthode des quatre quadrants sur les quatre milieux de culture [gélose au sang frais, gélose au sang cuit (gélose Chocolat), Hektoen et Chapman].
- Incuber à 37°C pendant 18 à 24h.

### 1.3. Selles :

#### ❖ Technique

- A l'aide d'une pipette Pasteur stérile prendre une noix des selles et l'ensemencer directement sur les quatre milieux de culture [gélose au sang frais, gélose au sang cuit (gélose Chocolat), Hektoen et Chapman] selon la méthode des quatre quadrants.
- Incuber à 37°C pendant 18 à 24h.

### 1.4. Hémoculture :

C'est la culture du sang dans deux flacons Castaneda diphasiques devant tout syndrome infectieux dont on suspecte une septicémie, ou une bactériémie pour la mise en évidence de l'agent bactérien causal.

#### ❖ Technique

##### 1<sup>er</sup> jour

- Incuber les deux flacons Castaneda diphasiques le jour même à 37°C pendant 48h.

##### Après 48h :

- Faire un repiquage : quelques gouttes sont ensemencées (selon la méthode des quatre quadrants) sur les milieux de culture Chocolat et Hektoen.
- Incuber à 37°C 24h.

##### Après l'incubation, lecture des boîtes :

- Si la culture est positive : identifier le germe et lancer l'antibiogramme.
- Si la culture est négative : incuber les flacons pendant 8 jours.

##### Après les 8 jours d'incubation : observer les flacons réincubés :

- Si le résultat est positif : le germe sera identifié avec la réalisation d'antibiogramme.
- Si le résultat est négatif : on conclura avec une absence de germes.

### ❖ Purification

- Repiquer chaque type de colonies sur le même milieu d'isolement, en faisant des stries éloignées par l'anse de platine ou par une pipette Pasteur.
- Incuber pendant 24 à 48 h à 37 °C.
- Après incubation, vérifier si les colonies présentent le même aspect macroscopique et microscopique que celui présenté dans le premier isolement.
- Poursuivre le repiquage si nécessaire, jusqu'à l'obtention d'un isolat pur présentant les mêmes caractéristiques que celui obtenu en premier isolement.

### ❖ Conservation des isolats

- A partir de chaque isolat pur, repiquer en stries, sur la pente d'une gélose nutritive (GN) inclinée en tube.
- Après incubation à 37°C pendant 24 h, conserver les cultures au réfrigérateur à 4°C.

## 2. Identification des Entérobactéries :

L'identification des isolats est basée sur plusieurs tests : détermination de leurs caractères morphologiques et biochimiques.

### 2.1. Identification morphologique :

#### 2.1.1. Appréciation macroscopique (colonies) :

Après incubation, le premier critère d'identification sur lequel on se base est celui de l'aspect macroscopique des colonies vu à l'œil nu, taille, forme du relief (bombées, semi bombées, plates), couleur, aspect (collant, filamenteux...), odeur, transparence (opaques, translucides), allure des contours (réguliers, dentelés), pigmentation (virage des milieux de cultures sélectifs utilisés) et aspect de la surface (lisse ou rugueuse).

#### 2.1.2. Aspect microscopique (Examen après coloration) :

##### ✓ Observation à l'état frais :

C'est une observation entre lame et lamelle à l'objectif x40, elle permet d'observer la forme, la mobilité et le type de regroupement cellulaire (**Guillaume, 2004**).

##### ✓ Coloration non différentielle : coloration simple au Bleu de Méthylène

Elle permet d'observer les bactéries (forme, taille, mode de regroupement) et la détection de certaines cellules sanguines (polynucléaires neutrophiles, lymphocytes). Les étapes de cette coloration sont représentées dans l'**Annexe 1**.

### ✓ Coloration différentielle : coloration de Gram

La réponse différente des bactéries vis-à-vis de la coloration de Gram s'explique par une différence d'accessibilité de leurs cellules, déterminées par la structure particulière de la paroi cellulaire de chacun des deux groupes de bactéries. Cette technique a été mise au point en **1884 par Hans Christian Gram** et elle garde toute sa pertinence même dans un laboratoire plus sophistiqué en raison de sa rapidité et de l'orientation diagnostique qu'elle donne.

Les étapes de coloration de Gram sont détaillées dans l'**Annexe 1**.

### 2.2. Identification biochimique après culture :

L'identification des souches retenues est obtenue grâce à la galerie biochimique classique et la galerie API 20 E + tests complémentaires.

#### 2.2.1. Identification par galerie biochimique API 20E

##### Principe et description de la galerie API 20E

La galerie API 20 E (Appareillage et Procédé D'Identification) 20E BioMérieux est un système miniaturisé d'identification biochimique qui comporte 20 micro-tubes de substrats déshydratés, la suspension bactérienne est répartie dans les micro-tubes (**Murray et al., 1999**).

Après incubation pendant (24h), les réactions sont mises en évidence par les virages colorés spontanés ou par l'ajout de réactif. La lecture de la galerie est faite à l'aide d'un codeur qui transforme automatiquement les 20 résultats des tests biochimiques en nombre de 7 chiffres appelé « profil numérique » (**Annexe 2**).



**Figure 06** : Galerie API20E

#### • Mode opératoire : (Murray et al., 1999) :

##### ➤ Préparation de la galerie

Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide et on place la galerie dans la boîte d'incubation



## PARTIE 02 : METHODOLOGIE DE DIAGNOSTIC

### ➤ Préparation de l'inoculum

Préparer une suspension bactérienne dense dans 10 ml d'eau physiologique stérile à partir d'une culture pure et jeune de 18 à 24 h, faite sur GN.

### ➤ Ensemencement de la galerie

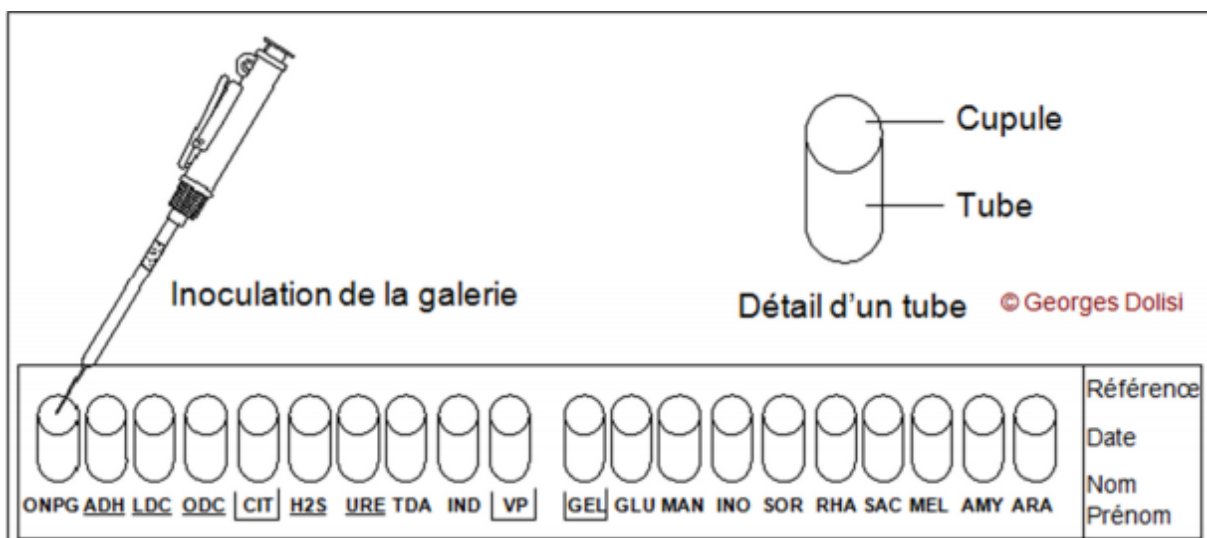
- Introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, pointe appuyée à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation de bulles d'air.

- Pour les caractères soulignés : ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE, ensemercer le tubule par la suspension et la cupule par l'huile de vaseline stérile.

- Pour les caractères encadrés VP, CIT, GEL, ensemercer le tubule et la cupule par la suspension.

- Pour les caractères non encadrés, non soulignés, ensemercer uniquement le tubule par la suspension.

- Refermer la boîte d'incubation et la placer à 37°C pendant 18 à 24 heures.



**Figure 07 :** Représentation de l'ensemencement d'une galerie API20 (Mebarki, 2019).

### ➤ Lecture de la galerie

Après incubation, La lecture de ces réactions est réalisée à l'aide du tableau de lecture (Annexe 3), noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

- ✓ Test TDA : ajouter 1 goutte de réactif TDA.
- ✓ Test IND : ajouter 1 goutte de réactif KOVACS.
- ✓ Test VP : ajouter 1 goutte de réactifs VP I et VP 2.

L'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification (Moustardier, 1972).

### 2.2.2. Galerie biochimique classique : (Denis, 2007)

Cette galerie permet l'étude de plusieurs caractères biochimiques essentiellement utiles pour la différenciation des Entérobactéries dont :

- ✓ La fermentation des sucres et la production de gaz et d'H<sub>2</sub>S.
- ✓ La recherche de la nitrate-réductase.
- ✓ La recherche d'uréase et la production d'indole.
- ✓ L'étude du type fermentaire (réaction de Voges-Proskauer et RM).
- ✓ L'utilisation du mannitol et recherche de mobilité.
- ✓ L'utilisation du citrate comme seule source de carbone.

Les différents tests sont représentés dans l'Annexe 4.

- **Technique :**

- **Préparation de l'inoculum**

Une colonie bactérienne est prélevée, à partir d'une culture jeune de 18-24 h, et est transférée dans l'eau physiologique stérile. Bien homogénéiser la suspension bactérienne.

- **Inoculation de la galerie**

A l'aide d'une pipette pasteur, les tubes sont inoculés par la suspension bactérienne déjà préparés en évitant d'introduire les bulles d'air.

### 2.2.3. Tests complémentaires de l'identification biochimique :

- ❖ **Test de l'oxydase : (Joffin et Leyral, 2006)**

Ce test est à la base de l'identification des bactéries à Gram négatif. Il est fondé sur la production bactérienne de l'enzyme « cytochrome oxydase » (plus précisément « la phénylène-diamine-oxydase ») qui entre dans les chaînes respiratoires.

- **Principe :**

Le 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.

- **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 cultivée sur un milieu solide et la déposer doucement sur le papier

- **Résultat :**

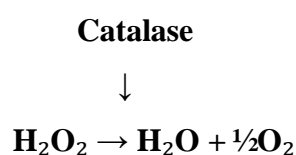
- ✓ Si la colonie prend une teinte rose, violette, le germe possède une oxydase : le test est positif.
- ✓ Si la colonie reste incolore, le germe ne possède pas d'oxydase : le test est négatif.

- ❖ **Test de catalase : (Joffin et Leyral, 2006)**

La recherche de la catalase est un test fondamental pour l'identification des bactéries à Gram positif.

- **Principe :**

Il permet la détection de l'enzyme « catalase » qui décompose le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) avec dégagement d'oxygène selon la réaction suivante :



- **Technique :**

Ce test s'effectue sur une lame porte objet propre sur laquelle une colonie bactérienne est déposée à laquelle on ajoute de l'eau oxygénée (à 10 volumes) à l'aide d'une pipette Pasteur.

- **Lecture :**

- ✓ Dégagement gazeux : Production d' $O_2$  provenant de la dégradation d' $H_2O_2$  : souche catalase positive.
- ✓ Absence de dégagement gazeux : Absence de production d' $O_2$  provenant de la dégradation d' $H_2O_2$  : souche catalase négative.

### 3. Détermination de la résistance aux antibiotiques « Antibiogramme » :

#### 3.1. Antibiogramme :

Pour déterminer la sensibilité des Entérobactéries vis-à-vis des  $\beta$ -Lactamines et autres familles d'antibiotiques (**Tableau 04**), on utilise la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion des disques d'antibiotiques sur gélose Mueller Hinton. C'est une technique rapide basée sur l'observation de la croissance bactérienne en présence d'un gradient de concentration de l'antibiotique après sa diffusion à partir du disque de manière uniforme. La multiplication des bactéries s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique égale à la concentration minimale inhibitrice (CMI). Les caractères de sensibilité ou de résistance de la souche en seront déduits (**Rahal et al., 2014**).

➤ **Technique : (Rahal *et al.*, 2014).**

• **Milieu pour antibiogramme :**

Le milieu Mueller- Hinton (MH) doit être coulé en boîte de Pétri sur une épaisseur de 4 mm, les géloses doivent être séchées avant l'emploi.

• **Préparation de l'inoculum**

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

- Bien décharger l'écouvillon dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile.

- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mac Farland (MF).

• **Ensemencement**

- Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum.

- L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.

- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.

- Répéter l'opération 2 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**

Appliquer les disques à l'aide d'une pince préalablement flambée, en appuyant légèrement. Les disques doivent être parfaitement appliqués à plat sans glissement. Une distance minimale de 15 mm doit séparer un disque périphérique du bord de la boîte, et chaque disque doit être éloigné au minimum de 30 mm des autres. Laisser diffuser les disques après leur application à température ambiante pendant 15 min puis incuber les boîtes dans l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures, couvercle en bas.

➤ **Lecture et interprétation**

La lecture de l'antibiogramme se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition circulaires à l'aide du pied à coulisse ou par une règle graduée.

## PARTIE 02 : METHODOLOGIE DE DIAGNOSTIC

Les résultats sont comparés aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes (**Annexe 5**), pour classer les bactéries dans l'une des catégories : Sensible (S), Intermédiaire (I), Résistante (R).

Selon le comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) les définitions de bactérie sensible, intermédiaire ou résistante sont les suivantes :

- Une souche sensible est une souche pour laquelle la probabilité de succès thérapeutique est forte dans le cas d'un traitement par voie systémique avec la posologie recommandée.
- Une souche de sensibilité intermédiaire est une souche pour laquelle le succès thérapeutique est imprévisible. La catégorie intermédiaire est aussi une zone tampon qui tient compte des incertitudes techniques et biologiques.
- Une souche résistante est une souche pour laquelle il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quel que soit le type de traitement et la dose thérapeutique utilisée (**Brahimi, 2013**).

**Tableau 04** : Antibiotiques testés pour les Entérobactéries.

	La famille	Les antibiotiques	La charge
Les β-lactamines	Pénicilline A	Amoxicilline (AML)	25 µg
		Amoxicilline+Acide clavulanique (AMC)	30 µg
	Carboxypénicilline	Ticarcilline (TIC)	75 µg
		Ticarcilline+Acide clavulanique (TCC)	75+10 µg
	Uréidopénicilline	Pipéracilline (PRL)	100 µg
	C1G	Céfalotine (KF)	30 µg
	C2G	Céfoxitine (FOX)	30 µg
	C3G	Céfotaxime (CTX)	30 µg
		Céftazidime (CAZ)	30 µg
	Carbapénème	Imipinème (IMP)	10 µg
Monobactame	Aztréoname (AT)	30 µg	
Les Aminosides		Gentamycine (CN)	10 µg
		Tobramycine (TOB)	10 µg
		Amikacine (AK)	20 µg
	Fosfomycine	Fosfomycine (FF)	200 µg
	Cycline	Tétracycline (TE)	30 µg
	fluoroquinolone	Ciprofloxacine (CIP)	5 µg
	Polymyxine	Colistine (CT)	10 µg

### 3.2. Tests de détection de BLSE :

La détection de BLSE est réalisée selon deux tests : le test de synergie et le test de double disque :

### 3.2.1. Test de synergie (Rahal *et al.*, 2014):

- **Principe :**

Il consiste à rechercher une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de  $\beta$ -lactamase, des disques de céphalosporines de troisième génération (cefotaxime, ceftazidime et céfepime) et l'aztréonam, cette image est dite en "bouchon de champagne".

- **Technique**

Un inoculum est préparé à partir d'une culture jeune de 18 à 24 h. La gélose Muller-Hinton estensemencée par la méthode d'écouvillonnage. Un disque d'amoxiciline/acide clavulanique est placé au centre de la boîte de Pétri distant de 30 mm de disques de céfotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ) et aztréonam (AO). Les boîtes sont incubées pendant 18 h à 37°C.

- **Lecture :**

La production des BLSE peut se traduire par l'apparition d'une image de synergie en « Bouchon de champagne » entre les disques d'AMC et les C3G.

En l'absence d'une image de synergie, la production de BLSE sera suspectée devant toute diminution du diamètre autour des disques C3G ou de monobactame. On recherchera donc une BLSE devant un diamètre inférieur aux valeurs suivantes : CTX = 27 mm, CAZ= 22 mm et ATM = 27 mm. Dans ce cas, il faut pratiquer un test de confirmation de production de BLSE.

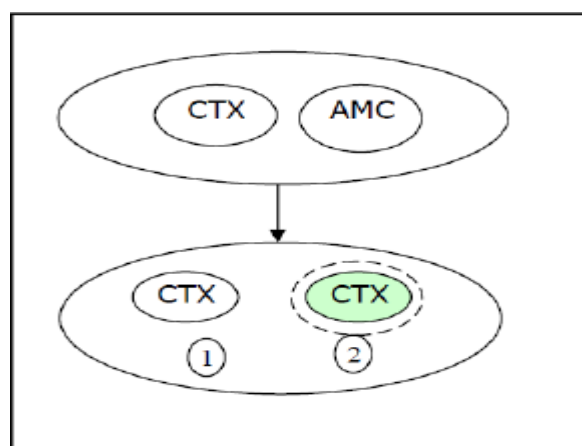
### 3.2.2. Test de confirmation ou du double disque (test espagnol) :

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

- **Technique**

- Ensemencer une boîte de MH selon la technique d'antibiogramme à 0,5 MF.
- Déposer un disque d'AMC et un disque de C3G (Céfotaxime) à une distance de 30 mm.
- Laisser diffuser les antibiotiques une heure à température ambiante le couvercle vers le haut.
- Après une heure, ôter le disque d'AMC et le remplacer d'un disque de céfotaxime (CTX).
- Incuber la boîte 18-24 H à 37°C.

Le test du double disque est positif quand le diamètre d'inhibition du disque de C3G appliqué après diffusion du disque AMC est supérieur ou égal à 5mm par rapport au diamètre d'inhibition du disque de C3G, ce qui indique une production d'une BLSE.



**Figure 08** : Schéma de détection de BLSE par le test du double disque (Rahal *et al.*, 2005).

### 3.3. Détermination de la CMI en milieu solide : (Ploy, 2007 ; CA-SFM, 2010)

La méthode de dilution successive en milieu solide est la méthode quantitative qui permet d'évaluer la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques. Elle consiste à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'antibiotiques (Annexe6).

- **Technique :**

- **Préparation des solutions d'antibiotiques**

Pour chacun des antibiotiques préparer une solution mère de concentration 5120  $\mu\text{g/ml}$  puis réaliser des dilutions semi-logarithmiques de raison 2 dans le solvant approprié jusqu'à la concentration de 1.25  $\mu\text{g/ml}$ .

- **Préparation des boîtes**

- Distribuer 2ml de chaque dilution dans des boîtes.
- Ajouter 18 ml de Mueller-Hinton gélosé maintenu en surfusion à 45°C.
- Homogénéiser et laisser les boîtes se solidifier à la température du laboratoire.
- Sécher les boîtes à 37°C pendant 30 minutes à l'étuve.

- **Préparation de l'inoculum**

Préparer des suspensions de densité de  $10^8$  UFC/ml pour chacune des souches à tester.

- **Ensemencement**

- Déposer sous forme de spots à la surface de la gélose, 2  $\mu\text{l}$  soit  $10^4$  UFC/spot.
- Incuber Les boîtes à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24h.

- **Lecture**

La CMI est la plus faible concentration pour laquelle la croissance est inhibée.

*RÉSULTATS  
ET  
DISCUSSION*



## 1. Caractéristiques épidémiologiques :

### 1.1. Répartition des souches isolées par espèce :

A travers plusieurs études menées, l'analyse des espèces identifiées par rapport à l'ensemble des souches d'Entérobactéries isolées, a montré que l'espèce *Escherichia coli* est prédominante suivie de *Klebsiella pneumoniae* comme cela était rapporté dans plusieurs études (**Ahmanach et kaci, 2019 ; Slimi et Boucefiane, 2019**). Alors que *Proteus mirabilis* occupe la troisième place suivie de l'espèce *Enterobacter cloacae* avec des taux d'isolement pratiquement proches.

Cette prédominance est en rapport avec leurs caractères de virulence Ainsi, *E. coli* possède des adhésines, capables de lier la bactérie à l'épithélium urinaire et d'empêcher son élimination par les vidanges vésicales. Les autres espèces sont faiblement représentées avec une répartition plus ou moins homogène.

Une étude au Maroc a montré qu'*Escherichia coli* représentait l'espèce prédominante dans 80% des cas, suivie de *Klebsiella pneumoniae* (10 %) (**Lahlou et al., 2009**).

En Tunisie *Escherichia coli* occupait aussi la première place mais avec un pourcentage plus élevé (81.7 %) suivie de *Klebsiella pneumoniae* avec un taux de 3.7 % (**Péan et al., 2001**).

### 1.2. Répartition des souches isolées selon la nature de prélèvement :

La distribution des espèces isolées en fonction des sites de prélèvement révèle que la majorité des souches d'Entérobactéries provenait des urines, suivi des pus, puis par celle des autres prélèvements. Cependant la fréquence des infections urinaires causées par *E. coli* représente un pourcentage élevé par rapport aux infections causées par d'autres germes. Cela peut probablement s'expliquer par le fait que cette espèce est la plus dominante de la flore intestinale et qu'elle peut migrer vers l'intestin puis vers l'appareil urinaire.

Par ailleurs *E. coli* fait partie des coliformes fécaux, donc un mauvais nettoyage de la partie intime peu facilement provoquer l'entrée de la bactérie dans la vessie. Par contre *Klebsiella* et *Proteus* sécrètent une uréase qui alcalinise l'urine dont le pH, naturellement acide, empêche la prolifération des germes (**Sekhsokh, 2008**).

Il a été noté que les Entérobactéries (particulièrement *E. coli*) représentaient plus de 80 % des germes responsables des infections urinaires. En Tunisie, un taux de 60 % des souches isolées dans les urines, est rapporté par **Mkaouar et al en 2008**. Ces résultats concordent avec

ceux observés dans certaines études récentes (**Chekroud et Fathi, 2017 ; Ould Baba ali et Taibi, 2019**).

### 1.3. Répartition des souches par sexe :

Nous remarquons que le sexe féminin est plus exposé à des infections aux Entérobactéries que le sexe masculin. Les souches provenaient essentiellement de sujets féminins. Cette prédominance féminine pourrait s'expliquer par le fait que les prélèvements d'origine urogénitale étaient très largement majoritaires.

En effet, les infections urinaires sont beaucoup plus fréquentes chez la femme que chez l'homme cela s'explique par le fait que :

- Les glandes périurétrales n'ont pas d'activité antibactérienne contrairement au liquide prostatique.
- La fréquence des rapports sexuels qui favorisent l'ouverture du méat urétral favorisant ainsi l'accès des germes à la vessie
- Des caractéristiques anatomiques de l'urètre féminin qui est court, large, droit et proche de la région péri-anale
- La grossesse est aussi un facteur favorisant l'infection car la compression de l'utérus entraîne une dilatation voire une certaine obstruction des uretères, la ménopause et le manque d'hygiène.

En Algérie, cette prédominance féminine est confirmée par plusieurs auteurs (**Balahouane, 2013 ; Ould Baba ali et Taibi, 2019 ; Nadmi et al., 2010**) avec une fréquence de 71,62 %, 54 % et 85 % respectivement.

### 1.4. Répartition des patients selon les tranches d'âge :

La fréquence de l'infection en général, semble augmenter avec l'âge, Il y a donc un rapport entre le risque infectieux et l'âge. Les facteurs intervenant dans l'augmentation de l'incidence des infections aux Entérobactéries sont multiples chez les personnes âgées : La baisse des défenses immunitaires, alitement, effet des médicaments, déshydratation (particulièrement pour les infections urinaires), présence de beaucoup de dispositifs médicaux...etc.

La plupart des études montre que les taux d'infection obtenus sont variables chez les différentes catégories d'âge, la tranche d'âge allant de 35 ans à 60 ans renferme le plus de patients. Ceci rejoint les résultats de l'étude faite à Dakar (**Dia et al., 2015**).

L'hospitalisation est un facteur de risque majeur pour les infections nosocomiales, en fait le milieu au sein de l'hôpital est chargé en différents germes, la transmission est souvent inévitables entre les malades ou par l'intermédiaire des personnel de santé ou les objets et dispositifs médicaux. Les conditions d'hygiène, l'utilisation du matériel de soins, favorisent les infections avec l'émergence des bactéries multi-résistantes.

### **2. Sensibilité aux antibiotiques :**

Les Entérobactéries sont un groupe de bactéries fréquemment isolées dans les laboratoires de bactériologie, *E. coli* et *Klebsiella spp* étant les espèces revenant le plus souvent (**Bao et al., 2013 ; Rangaiahagari et al., 2013**).

Les  $\beta$ - lactamines étaient depuis longtemps couramment utilisées dans le traitement des infections à Entérobactéries. Actuellement, l'augmentation de la résistance à cette famille d'antibiotiques est de plus en plus inquiétante.

Concernant cette famille, les Entérobactéries étaient fréquemment résistantes aux pénicillines. Au Cameroun Gangoué-Piéboji retrouvait 87 % des souches d'Entérobactéries résistantes à l'amoxicilline (**Gangoué-Piéboji et al., 2006**). La hausse de la résistance à l'amoxicilline a été notée à l'échelle mondiale amenant à l'élimination de cette molécule de la liste des traitements probabilistes recommandés.

Une grande variabilité est rapportée dans la fréquence de la résistance aux associations  $\beta$ -lactamines et inhibiteur de  $\beta$ -lactamases (amoxicilline + acide clavulanique). En raison de cette résistance élevée, ces antibiotiques ne sont plus des premiers choix dans le traitement des infections à Entérobactéries (**Ferdjani et al., 2010**).

L'activité supérieure de l'association pipéracilline + tazobactam est remarquée (**Guembe et al., 2008**).

Quant aux céphalosporines de troisième génération, plus de 25 % de résistance a été observée dans l'étude de Hashemi surtout pour les deux molécules céfotaxime et ceftazidime (**Hashemi et al., 2013**).

En effet, les céphalosporines de troisième génération sont les antibiotiques les plus utilisés dans les services à risque, notamment dans les services de réanimation et de soins intensifs, épicerie de la résistance aux antibiotiques, qui sont et resteront le lieu où les infections à Entérobactéries multi résistantes sont les plus fréquentes, malgré les mesures de prévention en vigueur.

Une tendance régulière à l'augmentation des taux de résistance à la céfoxitine et aux autres C3G est remarquée au fil des années. Cette augmentation pourrait être due à la pression de sélection.

La résistance des Entérobactéries aux C3G s'est amplifiée surtout par la production d'une  $\beta$ -lactamase à spectre étendu qui a un déterminisme plasmidique et donc un grand pouvoir de dissémination.

Les aminosides, notamment l'amikacine et la gentamycine, demeurent parmi les antibiotiques les plus actifs sur toutes les Entérobactéries, bien que leur prescription hospitalière soit en augmentation devant l'émergence d'infections à bactéries multirésistantes sans autre alternative thérapeutique. l'amikacine avait une bonne activité sur les souches d'Entérobactéries (**Guembe *et al.*, 2008**) mais elle a commencé à présenter une baisse de son activité au fil des années. Cette molécule est de plus en plus utilisée à cause de l'inefficacité des autres aminosides (gentamicine et tobramycine), notamment dans les infections sévères en néonatalogie.

Le taux de résistance au cotrimoxazole est en augmentation, un taux de 73 % a été rapporté dans l'étude de **Gangoue-Piéboji *et al* en 2006**. La prescription de cette molécule devrait être discutée.

L'utilisation abusive des fluoroquinolones en médecine humaine et vétérinaire a fait augmenter la résistance des Entérobactéries aux fluoroquinolones, notamment chez *E. coli*, au cours de la dernière décennie (**Tagajdid *et al.*, 2010**).

Une progression du taux de résistance des Entérobactéries à la ciprofloxacine a été rapportée par Guembe en Espagne (**Guembe *et al.*, 2008**). Cette résistance trouve sa justification dans le fait que ces molécules sont les plus prescrites dans le traitement des infections urinaires. Ceci se confirme par des niveaux de résistance aux quinolones plus élevés dans les urines que les autres antibiotiques majeurs (céphalosporines et aminosides).

La prévalence croissante des BLSE pose un problème inédit qui est l'afflux des bactéries multirésistantes de l'hôpital vers la communauté et vice versa. Cette dissémination est un phénomène de plus en plus signalé partout dans le monde, y compris dans les pays développés.

Les Co-résistances aux autres familles d'antibiotiques sont souvent élevées chez les Entérobactéries productrices de BLSE. L'émergence de la multirésistance expose à de sérieux problèmes de prise en charge thérapeutiques ce qui mène à l'usage des carbapénèmes, souvent seule alternative. C'est ainsi que la résistance à ces molécules a vu le jour. Hashemi et al.

Retrouvaient des taux élevés de résistance de l'ordre de 19 % pour l'imipénème (**Hashemi *et al.*, 2013**).

Il est donc impératif de limiter la prescription de cette famille d'antibiotiques qui doit être systématiquement guidée.

Une nouvelle molécule appartenant à la famille des polymyxines a été utilisée dans le traitement des infections à Entérobactéries, il s'agit de la colistine, mais des taux de résistance ont été observés dans plusieurs études (**Hadjou et Sedrati, 2018 ; Nouri et Ziadi Chibane, 2015**).

Donc la résistance des Entérobactéries aux céphalosporines de troisième génération (C3G) et aux carbapénèmes constitue une menace de santé publique majeure à l'échelle mondiale. Ces  $\beta$ -lactamines à large spectre d'action sont spécifiquement utilisées dans le traitement des infections résistantes potentiellement mortelles causées par des bactéries multirésistantes. Le principal mécanisme de résistance aux C3G et aux carbapénèmes est l'acquisition de gènes encodant respectivement des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) et des carbapénémases.

Plusieurs études ont répertorié les principales  $\beta$ -lactamases responsables des épidémies dans de nombreux pays à savoir les types TEM, SHV et CTXM pour les bactéries productrices de BLSE, et plus récemment les types IM/P, KPC, NDM, OXA-48 et VIM pour les bactéries productrices de carbapénémases (**Aribi et Baziz, 2019**).

L'Organisation Mondiale de la Santé a recommandé des mesures de contrôle et de prévention afin de réduire le risque de transmission des bactéries à Gram négatif productrices de BLSE ou de carbapénémases. Ces stratégies incluent l'identification des bactéries productrices de BLSE et de carbapénémases par des méthodes diagnostiques rapides de même que la mise en place d'une surveillance épidémiologique des principaux gènes de résistance encodant à ces enzymes.

*CONCLUSION*

## CONCLUSION

Un niveau de résistance très élevé des Entérobactéries vis-à-vis d'antibiotiques majeurs est observé dans le monde. Des souches présentant un haut niveau de résistance aux bétalactamines et au cotrimoxazole sont majoritaires. Seuls les carbapénèmes gardent une excellente activité.

La surveillance de la multi résistance bactérienne est une nécessité en milieu hospitalier, surtout dans les services à risques, pourvoyeurs d'infections nosocomiales.

La maîtrise de la prescription des antibiotiques, l'application des règles élémentaires d'hygiène hospitalière et le dépistage des patients porteurs de bactéries multi résistantes sont autant de stratégies à mettre en œuvre pour limiter la dissémination de ces souches.

Les infections causées par les bactéries multi-résistantes ont conduit non seulement à une augmentation de la mortalité, de la morbidité et du coût de traitement, mais aussi continuent à mettre en danger la vie des patients surtout immunodéprimés. L'utilisation abusive et non contrôlée des antibiotiques a grandement contribué à la large diffusion de la résistance aux antibiotiques.

Ainsi, face à cette préoccupation mondiale et suite à de nombreuses recommandations, plusieurs études épidémiologiques et moléculaires ont été rapportées afin de surveiller la diffusion et la dissémination de la résistance aux antibiotiques.

*REFERENCES*  
*BIBLIOGRAPHIQUES*



-A-

**Abbassi M S. (2010).** *Escherichia coli* d'origine aviaire productrice de bêta-lactamases à spectre étendu en Tunisie : sur le chemin mondial de propagation des gènes blaCTXM. These de doctorat : Sciences Vétérinaires. Tunisie : Université Degli Studi di Modena e Reggio Emilia.

**Ahmanach S, kaci O. (2019).** Etude de la résistance des bacilles à Gram négatif aux  $\beta$ -lactamines à partir de divers prélèvements pathologiques. Mémoire de master : Microbiologie appliquée. Bouira, Algérie : Université Akli Mohand Oulhadj, 81p.

**Aires J. (2011).** Les systèmes d'efflux actifs bactériens : caractérisation et modélisation pour quelles perspectives. Bull. Acad. Vét ; 164 (3) : 265.

**Aribi M, 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 : Biologie Moléculaire des microorganismes. Constantine, Algérie : Université des Frères Mentouri, 97p.

**Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil H. (1992).** Bactériologie clinique. Ed Ellipses, paris, 2<sup>ème</sup> édition, Paris, 511p.

**Avril JL, Dabernat H., Denis F., Monteil H. (2000).** Bactériologie Clinique, Ed Ellipses, paris, 2<sup>ème</sup> édition : 171-177.

-B-

**Balahouane N. (2013).** Étude de la résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries isolées à partir de divers prélèvements pathologiques au niveau de l'hôpital de Koléa. Mémoire de master : Microbiologie. Blida, Algérie : Université Saad Dahlab, 76p.

**Bao L, Peng R, Ren X, et al. (2013).** Analysis of some common pathogens and their drug resistance to antibiotics. Pakistan Journal of Medical Sciences ; 29(1) :135–139.

**Belabbeci A. (2014):** Profil de résistance aux aminosides de souches communautaires d'*E.coli*. Mémoire de Master. Contrôle de développement microbien. Tlemcen, Algérie : Université Abou Bekr Belkaid, 32p.

**Benmouden A, Hakkou F. (2007).** Antibiotiques : Mécanismes d'action et de résistance. Service de Pharmacologie, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Casablanca, Maroc. La Chronique Ibn Rochd. 1: 46-54.

**Bennani M. (2014).** Recherche d'Entérobactéries productrices de Bêta-lactamases à spectre étendu isolées dans les selles. Projet de fin d'études. Licence Sciences et Techniques en Biologie et Santé. Fes, Maroc : Université Sidi Mohammed ben Abdellah, 31p.

**Berche P, Gaillard JL, Simonet M (1988).** Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. 1<sup>ère</sup> édition. Médecine-sciences Ed Flammarion, 660p.

**Bessard G. (2004).** Pharmacologie des antibiotiques. Faculté de médecine de Grenoble. Université Joseph Fourier. DCEM I. Sur le lien : [www-sante.ujfgrenoble.fr/SANTE/pharma/site.fac/diaporama/antibio2.ppt](http://www-sante.ujfgrenoble.fr/SANTE/pharma/site.fac/diaporama/antibio2.ppt).

**Blair JM, Piddock LJ. (2009).** Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Curr.Opin.Microbiol.* ; 12, 512-519.

**Bouazza S, Bouakka N. (2016).** Recherche des entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi dans la viande rouge. Mémoire de master : Sciences biologiques. Tébessa, Algérie : Université de Tébessa. 92p.

**Bradford P. (2001).** Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clinical MicrobiologyReviews.* 933-951.

**Brahimi L. (2013).** Sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries isolées d'infections urinaires. Thèse de Doctorat. Microbiologie. Rabat, Maroc : Université Mohammed V. 93P.

**Bryskier A. (1999).** Evolution de la chimiothérapie antibactérienne. Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques. Ellipses Ed. Paris. 747.

**Bush K, Jacoby A . (1995).** A fonctionnal classification schème for betalactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1211- 1233.

-C-

**Carattoli A. (2000).** Resistance Plasmid Families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial agents and chemotherapy* ; 53(6) : 2227–2238.

**Cavallo JD, Fabre R, Jehl F et al. (2004).** Bêtalactamines. *EMC Maladies infectieuses* ; 1: 129-202.

**Chekroud R, Fathi R. (2017).** Étude du profil bactériologique et de la sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries responsables des infections urinaires. Mémoire de Master en Hygiène Hospitalière et Santé. Constantine, Algérie. Université des Frères Mentouri, 130p.

**Courvalin P, Leclerq R, Bingen E. (2006).** Antibiogramme 2<sup>ème</sup> édition. Paris: Editions ESKA; 27,44,63, 141,350-349.

**-D-**

**Delarras C. (2014).** Pratique en Microbiologie de Laboratoire. Recherche de Bactéries et de levures-moisissures. Edition Lavoisier, Paris, p 257- 235.

**Delarras C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Edition Lavoisier Paris,

**Denis F, Ploy MC. (2007).** Bactériologie médicale : techniques usuelles. Elsevier Masson. p 316-318.

**Dia ML, Chabouny H, Diagne R. (2015).** Profil antibiotypique des bactéries uropathogènes isolées au CHU de Dakar. Revue Africaine d'Urologie et d'Andrologie ; 1(4) : 112- 17.

**Dortet L, Poirel L, Nordmann P. (2013).** Epidémiologie, détection et identification des entérobactéries productrices de carbapénèmes. Feuillet de Biologie, 312.

**Durante-Mangoni E, Grammatikos A, Utili R, Falagas M.E. (2009).** Do we still need the aminoglycosides ? International Journal of Antimicrobial Agents ; 33: 201-205.

**-E-**

**El bouamri MC. (2017).** Etude épidémiologique des Entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi au CHU de Marrakech. Thèse de Doctorat : Faculté de Médecine et de Pharmacie. Rabat, Maroc : université Mohammed V, 131p.

**-F-**

**Fauchere J L. (1997).** Techniques en bactériologie clinique. Bacteriofiches : Editions Ellipses. Paris ; 39, 43p.

**Fauchère JL, Avril JL. (2002).** Bactériologie générale et médicale : Edition Ellipses Marketing. Paris. 250-260.

**Faure S. (2009).** Les aminosides. Actualités pharmaceutiques ; 480 : 49-53.

**Ferech M, Coenen S. (2006).** "European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient antibiotic use in Europe". J Antimicrob Chemother ; 58(2) : 401-407.

**Ferjani A, Marzouk M, Ben Moussa F, et al. (2010)** Résistance des souches *d'Escherichia coli* isolées de prélèvements d'origine urinaire vis-à-vis de l'association amoxicilline-acide clavulanique et divers antibiotiques. J Med Mal Infect; 40(3) : 129-84.

**Fisher JF, Meroueh SO, Mobashery S. (2005).** Bacterial resistance to bêta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chem Rev* ; 105: 395-424.

**Flandrois JP. (1997).** Bactériologie Médicale. Presses universitaires de Lyon, 309p.

**-G-**

**Galimand M, Sabtcheva S, Courvalin P, Lambert T. (2005).** Worldwide disseminated armA aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrob Agents Chemother*; 49: 2949-2953.

**Gangoue-Piéboji J, Koulla-Shiro S, Ngassam P, et al. (2006).** Antimicrobial activity against gram negative bacilli from Yaounde Central Hospital, Cameroon. *African Health Sciences* ; 6(4):232–5.

**Gharout-Sait A. (2016).** Etude de la résistance aux antibiotiques des souches d'Entérobactéries Hospitalières et Communautaires. Thèse de doctorat. Bejaia, Algérie. Université A.MIRA. 195P.

**Ghuysen JM. (1991).** Serine bêta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu Rev Microbiol* ; 45: 37-67.

**Gogny M. (2001).** Classification des principes actifs. L'arsenal thérapeutique vétérinaire. Edition le point vétérinaire. 165-168.

**Guembe M, Cercenado E, Alcalá L, et al. (2008).** Evolution of antimicrobial susceptibility patterns of aerobic and facultative gram-negative bacilli causing intra-abdominal infections : results from the SMART studies 2003-2007. *Revista Espanolade Quimioterapia* ; 21(3) :166–73.

**Guessennd N, Bremont S, Gbonon V et al. (2008).** Résistance aux quinolones de type qnr chez les entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi à Abidjan en Côte d'Ivoire. *Pathologie Biologie* ; 56 : 439-446.

**Guillaume PY. (2004).** Les tests en Microbiologie.

[http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/microbio/tests\\_microbiologie2.htm](http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/microbio/tests_microbiologie2.htm).

**Guiraud P J. (2012).** Microbiologie alimentaire. Les presses ISBN ; 22 : 80- 171.

**-H-**

**Hadjou I, Sedrati I. (2018).** Evaluation de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries : cas de Beta–Lactamases à spectre étendu (BLSE). Mémoire de master : Microbiologie appliquée. Oum El Bouaghi, Algérie: Université Larbi Ben M'hidi, 48p.

**Hart CA. (2006).** *Klebsiella, Citrobacter, Enterobacter and Serratia spp.* Principales practice of clinical bacteriology. England,UK : John wiley and sons Ltd. 2 nd ed :377-386p.

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

**-J-**

**Joffin JN, Leyral G. (2006).** Microbiologie technique. Centre Régional de Documentation Pédagogique d'Aquitaine 4<sup>ème</sup> édition, Bordeaux cedex, 36-354.

**Joly B, Reynaud A. (2002).** Entérobactéries : Systématique et Méthodes de Diagnostic. Editions DOC et Editions Médicales Inter Nationales. Paris. 356P.

**-K-**

**kassama M, Hamadi S. (2013).** Evaluation de la résistance aux antibiotiques des souches d'Entérobactéries isolées à l'Etablissement Hospitalier Spécialisé de Constantine. Mémoire de Master : Microbiologie et Hygiène Hospitalière : Constantine, Algérie. Université des Frères Mentouri, Constantine 1, 62p.

**Kumar A, Schweizer HP. (2005).** Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. Adv Drug Delivery Rev ; 57: 1486-1513.

**-L-**

**Lagha N. (2015).** Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) isolées de l'hôpital de laghouat. Thèse de Doctorat : Sciences. Tlemcen, Algérie : Université Abou bekr Belkaïd. 80 p.

**Lahlou A, Chegri M, L'Kassmi H. (2009).** Épidémiologie et résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées d'infections urinaires à l'hôpital militaire Moulay-Ismail de Meknès .J.antib ; 11(2) :90-96.

**Lanotte, P, Garnier, F, Mereghitti L. (2016).** Du prélèvement à la caractérisation des souches. In : F. Denis, M-C. Ploy, C. Mortin, V. Cattoir, Bactériologie médicale : techniques usuelles. 3ème édition. Elsevier Masson SAS. 16-34.

**Le Minor C, Richard C. (1993).** Méthodes de laboratoire pour l'identification des entérobactéries. Institut Pasteur, France.

**Le Minor I, Veron N. (1989).** Bactériologie Médicale Med. Science, Edition Flammarion Paris, 333-318 ; 773-823.

**Le Noc P. (1999).** Monobactames in Antibiotiques agents antibactériens et antifongiques. Ed Ellipses. 374-391.

**Leclerc H, Gaillard JL, Simonet M. (1995).** Microbiologie générale : La bactérie et le monde bactérien, Edition DOIN, Paris, 517.

**Leclercq M. (2006).** *Enterobacter sakazakii*. Agence Française de Sécurité Sanitaire des aliments AFSSA, 1-6.

**Livermor DM. (1995).**  $\beta$  -Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev ; 8(4): 557-584.

**Livermor DM. (1995).**  $\beta$ -lactamases mediated resistance: past, present and future, J. infect. Dis ; 6: 75-83.

**Lozniewski A, Rabaud C. (2010).** Résistance bactérienne aux antibiotiques .Infections associées aux soins .Nancy : CCLIN Sud-Est ; 4 :1.

#### -M-

**Marchal N, Bourdon JL, Richard C. (1982).** Milieux et techniques réservés à l'étude de certains genres bactériens. In : Les Milieux de Culture pour l'Isolement et l'Identification Biochimique des Bactéries. Edition Doin, Paris, p 235, 248, 273-283.

**Marilyse V. (2015).** Résistance aux  $\beta$ -lactamines à large spectre chez les bactéries à Gram négatif Épidémiologie et diagnostic .Mémoire de master : microbiologie-immunologie. Québec, Canada : Université LAVAL. Canada.98p

**Martin C. (2008).** Urgences et infections : Guide du bon usage des antibiotiques, antifongiques, antiviraux, antiseptiques. Edition Arnette, p 41-42.

**Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby GA. (1998).** Quinolone resistance from a transferable plasmid. Lancet ; 351: 797-9.

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

**Materon I C, Beharry Z, Huang W et al. (2004).** Analysis of the context dependent sequence requirements of active site residues in the metallo- $\beta$ -lactamase IMP-1. *J. Mol. Biol.*; 344: 653-663.

**Mebarki M. (2019).** Isolement et caractérisation des bactéries impliquées dans les infections communautaires à la région de M'CHEDALLAH. Mémoire de master : Microbiologie Appliquée. Bouira, Algérie : Université Akli Mohand Oulhadj, 27p.

**Meradi L, Djahoudi A, Abdi A et al. (2009).** Résistance aux quinolones de types qnr, aac (60)-Ib-cr chez les entérobactéries isolées à Annaba en Algérie. *Pathologie Biologie* ; 1-6.

**Michel C. (1981).** Utilisation des antibiotiques en pisciculture. *Laboratoire d'Ichtyopathologie* ; 11:125-127.

**Mkaouar D, Mahjoubi F, Mezghani, et al. (2008).** Étude de la résistance des entérobactéries aux céphalosporines de troisième génération dans les hôpitaux de Sfax, Tunisie (1999–2005). *Méd mal infect* ; 38 : 293-298.

**Molitor A. (2010).** Régulation de la perméabilité membranaire chez les bactéries à Gram négatif et la relation avec la sensibilité aux antibiotiques. Thèse de Doctorat : Marseille, France. Université de Médecine.

**Moussa N, Moussaoui F. (2016).** Recherche des Entérobactéries productrices de Beta-lactamases à spectre élargi dans les viandes de volaille. Mémoire de Master : Microbiologie appliquée à la santé et à l'environnement .Tébessa, Algérie : Université de Tébessa, 57p.

**Moustardier G. (1972).** Bactériologie médicale ; 4<sup>ème</sup> édition, librairie Maloine. S.A. éditeur, Paris.

**Mouton Y, Deboscker Y, Dubreuil L, Bingen E. (2000).** Antibiotiques antiviraux anti infectieux, édition John Libbey Eurotext .285 p

**Murray PV, Baron J, Pfaller MA et al. (1999).** Manual of clinical microbiologie, 7<sup>ème</sup> édition, Amer. Soc. Microbial; Washing, D.C.

-N-

**Nadmi H, Elotmani F, Talmi M, Zerouali K, et al. (2010).** Profil de résistance aux antibiotiques des entérobactéries uropathogènes communautaires à El Jadida (Maroc). *Médecine et maladies infectieuses* ; 40(5), 303-305.

**Nauciel C. (2000).** Bactériologie Médicale : connaissances et pratiques. Edition Elsevier Masson. Paris, 125-146.

**Nauciel C, Vilde J L. (2005).** Bactériologie Médicale : Abrégés connaissances et pratiques. Edition Elsevier Masson, 2<sup>ème</sup> édition. Paris. 59-64.

**Ndiaye A. (2005).** Les Entérobactéries sécrétrices de bêta –lactamases à spectre élargi. Thèse de Doctorat en Pharmacie : Dakar, Sénégal. Université Cheikh Anta Aiop, 65p.

**Nicaido H. (2000).** Crossing the envelope: how cephalosporin reach their targets. Clin Microbiol Infect ; 6: 22-26.

**Nordmann P, Carrer A. (2010).** Les carbapénèmases des entérobactéries. Archives de pédiatrie ; 17, 154-162.

**Nordmann P, Mammeri H. (2007).** Résistance plasmidique aux quinolones. Antibiotiques ; 9: 246-53.

**Nouri M, Ziadi Chibane F. (2015).** Etude bactériologique et résistance aux antibiotiques de *Klebsiella pneumoniae*. Mémoire de master : Génétique Moléculaire. Constantine Algérie : Université des Frères Mentouri, 69p.

**Nseir S, Ader F, Marquette CH, Durocher A. (2005).** Impact de l'utilisation des fluoroquinolones sur l'émergence des bactéries multirésistantes. Pathologie Biologie; 53: 470-475.

**Nukaga M, Mayama K, Hujer AM et al. (2003).** Ultrahigh resolution of class A bêta-lactamase: on the mechanism and specificity of the extended spectrum SHV-2 enzyme. Journal in Molecular Biology ; 328: 289-301.

**-O-**

**Ogawara H. (1981).** Antibiotic resistance in pathogenic and producing bacteria with special reference to betalactam antibiotics. Microbial. Rev ; 45(4) : 591-619.

**Ould Baba Ali R, Taibi K. (2019).** Etude de l'antibio-résistance des Entérobactéries productrices de Beta-lactamases à spectre étendu isolées à l'Hopital de Boufarik. Mémoire de Master : Microbiologie. Blida, Algérie. Université de Blida 1, 76p.

**-P-**

**Pagotto FJ, Nazarowec-White M, Bidawid S, Farber JM. (2003).** *Enterobacter sakazakii* : infectivity and enterotoxin production in vitro and in vivo. J Food Protect ; 66(3): 370-375.



- Paolozzi L, Liebart JC. (2015).** Microbiologie : Biologie des procaryotes et de leurs virus. Paris : Les presses d'Épargne par Unigraf S.L ; 449, 452- 453.
- Paul S (2005).** Bactériologie. 6<sup>ème</sup> édition. Dunod.Paris. 515 p.
- Péan Y, Goldstein FW, De Bels F. (2001).** Évolution de la sensibilité et épidémiologie de la résistance des entérobactéries de ville au cours des enquêtes Vigil'Roc. Méd Mal Infect ; 31 : 609-621.
- Peirano G, Pitout JD. (2010).** Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M  $\beta$ -lactamases: the worldwide emergence of clone ST131. International Journal of Antimicrobial Agents ; 35: 316-321.
- Perriere G. (1992).** Application d'une présentation par objet des connaissances de modélisation de certains aspects de l'expression des gènes chez *E. coli* UCBL. Thèse de Doctorat : Lyon, France : Université de Lyon I. 14, 77.
- Philippon A. (2006).**  $\beta$ -lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel. Ann Biol Clin. 37-51.
- Pilet C, Bourdon J, Thomas B et al. (1979).** Les Entérobactéries : Bactériologie médicale et vétérinaire : Systématique bactérienne. Edition Doins. Paris. 109-187.
- Pilly E. (2013).** Maladies Infectieuses Tropicales, 24<sup>ème</sup> édition, Paris : Groupe Burlat ; P227.
- Pina P. (2000).** Sensibilité des Entérobactéries aux antibiotiques en Unités de soins intensifs. J Path Biol ; 48: 485-489.
- Ploy MC, Gassama A, Chainier D, Denis F. (2005).** Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques. Intégrons : an antibiotic resistance gene capture system. Immuno-analyse & Biologie spécialisée ; 20: 343-352.

**-R-**

- Rahal K., Belouni R., Benslimani A. (2005).** Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale. Rec de L'OMS. 4<sup>ème</sup> édition. Algérie.46-52.
- Rahal K, Benslimani A, Tali-Maamar H et al. (2014).** Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale (Médecine Humaine et vétérinaire).7<sup>ème</sup> édition, p.179. [http://www.sante.dz/aarn/Standardisation\\_2016.pdf](http://www.sante.dz/aarn/Standardisation_2016.pdf).
- Rangaiahagari A, Uwizeyimana JP, Nyirabanzi J, et al. (2013).** Antibiotic sensitivity patterns of Enterobacteriaceae isolated at king Faisal hospital, Kigali - a three years study. Rwanda Medical Journal. 70:11-4.

**Rodriguez-Villalobos H & Struelens MJ. (2006).** Résistance bactérienne par  $\beta$ -lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimateur. *Réanimation* ; 15: 205-213.

**-S-**

**Schroeder WA, Locke TR, Jensen SE. (2002).** Resistance to bêta-lactamase inhibitor protein does not parallel resistance to clavulanic acid in TEM bêta-lactamase mutants. *Antimicrob. Agents Chemother* ; 46: 3568-3573.

**Sekhsokh Y, Chadli M, El Hamzaoui SA. (2008).** Fréquence et sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées dans les urines. *Méd mal infect* ; 38 : 324-327.

**Skurnik D, Andremont A. (2006).** Antibiothérapie sélectionnante: de la théorie à la pratique. *Réanimation* ; 15: 198–204.

**Slimi C, Boucefiane L. (2019).** Etude du profil épidémiologique des entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) isolées dans la région d'Ain Defla. Mémoire de master : Microbiologie appliquée. Khemis miliana, Algérie : Université djilali bounaama, 108p.

**Soussy CJ. (2007).** Résistance bactérienne aux antibiotiques. Les infections urinaires. Springer, Paris. 21-46.

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

**-T-**

**Tagajdid MR, Boumhil L, Iken M, et al. (2010).** Étude de la résistance des souches d'*Escherichia coli* isolées dans les urines aux fluoroquinolones et aux céphalosporines de troisième génération. *Méd et Mal Infect* ; 40(2) : 70-73.

**Talbert M, Willoquet G, Gervais R. (2015).** Guide pharmaco clinique. Italie : Les presses d'imprimer LEGOPRINT ; 1060,1068, 1077,1091p.

**Tankovic J. (2000).** Antibacterial antibiotics. General data on mode of action and mechanisms of resistance. *Rev.Prat* ; 50, 425-432.

-V-

**Van R, Givskov M. (2007).** Quorum sensing in Serratia. FEMS Microbiology Reviews.407-424P.

**Vander-Stichele RH, Elseviers MM, Ferech M, et al. European Surveillance of Antibiotic Consumption (ESAC) Project Group. (2006).** "Hospital consumption of antibiotics in 15 European countries : results of the ESAC Retrospective Data Collection (1997-2002)". J Antimicrob Chemother ; 58(1) : 159-167.

**Verhaegen J. (2002).** Cours de bactériologie : les entérobactéries.  
[www.kuleuven.be/vesaliusonline/UNIKEN%20KONGO.doc](http://www.kuleuven.be/vesaliusonline/UNIKEN%20KONGO.doc)

-W-

**Wolff M, Joly-Guillou ML, Pajot O. (2008).** Le point sur les carbapénèmes, Comparative review of carbapenems. Réanimation ; 17: 242-250.

-Y-

**Yassine K. (2011).** Comportement des Entérobactéries isolées des urines vis-a-vis de l'amoxicilline – acide clavulanique, l'imipénème et l'ertapénème. Thèse de Doctorat : Pharmacie. Rabat, Maroc. Université Mohammed V Rabat, 79p.

# *ANNEXES*

## Annexe 1 : Examens après coloration

### Etape 1 :

Noter tout d'abord la référence de l'échantillon sur une lame propre.

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

### Etape 2 : Coloration

#### ✚ Coloration au bleu de méthylène (Coloration simple)

##### ❖ Technique :

Sur le frottis fixé et refroidi :

1. Faire couler la solution de bleu de méthylène jusqu'à ce que toute la lame soit recouverte.
2. Laisser agir Cinq minutes.
3. Rincer la lame avec une pissette d'eau distillée, jusqu'à élimination des colorants en excès.
4. Sécher à l'air ou sur une platine chauffante, puis examiner au microscope à l'immersion au grossissement x100.

#### ✚ Coloration de Gram (coloration différentielle)

##### ❖ Technique :

Sur le frottis fixé et refroidi :

1. La coloration primaire : Couvrir complètement la lame de violet de gentiane pendant 30 secondes à 1 minute puis rincer à l'eau.
2. La fixation au Lugol : Couvrir la lame de Lugol pendant 30 secondes puis rincer à l'eau.
3. La décoloration à l'alcool : Verser quelques gouttes d'alcool sur le frottis tenu verticalement jusqu'à ce que l'alcool s'écoule non teinté (5 secondes environ). Rincer à l'eau.
4. La coloration secondaire : Recolorer par de la Fuchsine en versant le colorant en bout de lame et en le faisant glisser le long de la lame. Ne pas verser la Fuchsine sur le frottis pour éviter une coloration trop intense. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Rincer à l'eau et laisser sécher.

## LISTE DES ANNEXES

- **Lecture :**

Lire à l'objectif x100 à l'aide de l'huile à immersion. On peut observer deux types de cellules les bactéries à Gram négatif sont de couleur rose et les bactéries à Gram positif sont colorées en violet.



## LISTE DES ANNEXES

### Annexe 3 : tableau de lecture de la galerie API 20E (Bio Mérieux).

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	Ortho-nitro-phenyl-Galactosidase	Beta- galactosidase	Incolore	Jaune
ADH	L-arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orangé
LDC	L-lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orangé
ODC	L-ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orangé
CIT	Citrate de sodium	Utilisation du citrate	Vert pâle/jaune	Bleu-vert/vert
H2S	Thiosulfate de sodium	Production d'H2S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/fin liseré
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orangé
TDA	L-tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA / immédiat	
			Jaune	Marron foncé
IND	L-tryptophane	Production d'indole	James/ 2 mn	
			Jaune	Anneau rouge
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VP 1 + VP 2/ 10mn	
			Incolore	Rosé-rouge
GEL	Gélatine de kohn	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MAN	D-mannitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SOR	D-sorbitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
RHA	L-rhamnose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SAC	D-saccharose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MEL	D-melibiose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
ARA	L-arabinose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
Nitrate réductase Tube	Potassium nitrate	Production de NO <sub>2</sub>	NIT1 + NIT2 / 2-3 mn	
			Jaune	Rouge
GLU		Réduction au stade N <sub>2</sub>	Zinc / 5mn	
			Rouge/orangé	Jaune



#### Annexe 4 : Milieux d'identification (Le Minor et Richard, 1993)

##### Milieu TSI (Triple Sugar Iron) :

- **Principe :**

Le milieu TSI est un milieu glucosé saccharosé, contenant du citrate de fer ammoniacal. Le principe de ce milieu différentiel repose sur l'aptitude ou l'incapacité des Entérobactéries à fermenter le glucose (avec ou sans dégagement de gaz), le lactose, le saccharose et à réduire les sulfates en sulfures qui, en présence de fer, donne un précipité noir de sulfure de fer. Il est très utilisé dans l'identification des *Enterobacteriaceae*.

- **Technique d'ensemencement :**

L'ensemencement est réalisé par piqûre centrale dans le culot puis par stries sur la pente, la lecture se fait après 24 heures d'incubation à 37°C.

L'utilisation de l'un des sucres se traduit par un virage au jaune de l'indicateur (rouge de phénol).

- **Lecture et interprétation :**

- ✓ Fermentation positive du lactose : virage au jaune de la pente
- ✓ Fermentation positive du saccharose : virage au jaune de la région médiane
- ✓ Fermentation positive de glucose dans le culot se traduit par : virage au jaune
- ✓ Production de gaz : présence de bulle d'air et décollement du culot.
- ✓ Production de H<sub>2</sub>S : qui se traduit par noircissement du tube.

##### Milieu Mannitol Mobilité : (Marchal et al., 1982)

- **Principe :**

Le mannitol-mobilité est un milieu semi solide qui contient de mannitol et de rouge de phénol comme indicateur de couleur, Il permet l'étude de la dégradation du mannitol, et la mobilité bactérienne. Ce milieu est utilisé seulement pour les bactéries fermentatives.

- **Technique d'ensemencement :**

L'ensemencement est effectué par piqure centrale à l'aide d'une pipette pasteur, suivit d'une incubation à 37°C pendant 24 h.

- **Lecture et interprétation :**

- ✓ Coloration jaune du milieu signifie la fermentation du mannitol (virage du milieu rouge au jaune).

## LISTE DES ANNEXES

✓ Observation d'une diffusion homogène dans tout le tube signifie que les bactéries ont diffusé dans tout le milieu (mobilité +).

✓ Une culture uniquement au niveau de la pique centrale signifie que les bactéries sont immobiles (mobilité -) (**Lanotte et al., 2016**).

### Milieu Citrate de Simmons : (**Delarras , 2007**).

#### • Principe :

Le milieu citrate de sodium (simmons) est un milieu solide qui permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate comme seule source de carbone et d'énergie. Ce milieu contient du citrate de sodium et du sel d'ammonium ainsi que du bleu de bromothymol comme indicateur de pH (**Lanotte et al., 2016**).

#### • Technique d'ensemencement :

-Ensemencer par des stries le long de la pente à l'aide de la pipette pasteur.

-Mettre à l'étuve 24h à 37°C.

#### • Lecture et interprétation :

Croissance sur la pente et virage du milieu du vert au bleu signifie l'utilisation du citrate de sodium et qu'il y a eu une alcalinisation du milieu (citrate+). Par exemple, *Klebsiella pneumoniae* entraîne une croissance et une coloration bleue du milieu. L'absence de virage de couleur signifie que la bactérie n'est pas capable d'utiliser le citrate comme seule source de carbone et elle ne possède pas le citrate perméase (**Lanotte et al., 2016**).

### Milieu Clark et Lubs :

#### • Principe :

Ce milieu permet l'étude de la voie de fermentation de glucose chez les BGN, soit par l'utilisation de la voie de fermentation des acides mixtes qui sont mis en évidence par le test de RM (Rouge de méthyle) ce qui conduit à la formation de nombreux acides, soit par l'utilisation de la bactérie de la voie de fermentation butanediolique qui est mis en évidence par le test de VP (Voges-Proskauer), ce qui contribue à la production d'acétoïne .

#### • Technique :

-A l'aide d'une pipette pasteur ensemencer le milieu Clark et Lubs, En ajoutant quelques gouttes de suspension bactérienne.

-Incuber pendant 24heures à 37°C.

-Après incubation, partager le milieu en deux tubes d'hémolyse pour pratiquer les deux tests.

-rajouter au premier tube 2 à 3 gouttes de RM puis observer immédiatement.

## LISTE DES ANNEXES

-rajouter au second tube quelques gouttes de VP1 et VP2, agiter le tube pour favoriser l'oxygénation, lire au bout de quelques minutes.

- **Lecture et interprétation :**

- Test RM :**

- ✓ Milieu rouge : RM positif.
  - ✓ Milieu marron : RM négatif.

- Test VP :**

- ✓ Apparition d'un anneau rouge : VP (+).
  - ✓ Absence d'un anneau rouge (pas de coloration) : VP (-).

- **Milieu urée-indole :**

Appelé aussi milieu urée tryptophane. Ce milieu complexe fournit un ensemble de résultats utiles pour l'identification des Entérobactéries. Il permet de rechercher :

- **L'uréase directement lisible par l'alcalinisation :**

Les Entérobactéries peuvent dégrader l'urée qui est un composé organique et qui peut servir de source d'azote unique aux bactéries possédant une uréase très active. En présence de cette enzyme, les bactéries uréolytiques peuvent transformer l'urée en ammoniac et en carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu, et qui fait virer l'indicateur coloré de pH (le rouge de phénol) du jaune au rouge en milieu basique.

- **La production d'indole :**

Après l'addition du réactif de Kovacs, le diméthyl-amino-4 benzaldéhyde peut réagir avec l'indole et forme un anneau coloré en rouge ; ce qui signifie que la bactérie est indole positive. Par contre l'absence d'un anneau rouge signifie que la bactérie est indole négative.

- **Le tryptophane désaminase (TDA) :**

Par contre certaines bactéries dégradent le tryptophane grâce à l'enzyme tryptophane désaminase (test TDA) et ce dernier conduit à la désamination de cet acide aminé en produisant l'ammoniac et l'acide indole -3-pyruvique. Ce dernier est révélé par l'apparition d'une couleur brune en présence de perchlorure de fer.

- **Technique**

- Mettre 2 à 3 gouttes de la suspension bactérienne dans le milieu urée-indole.
    - Incuber à 37°C pendant 18 à 24h.

Après avoir constaté la couleur du milieu :

- Ajouter 2 à 3 gouttes de réactif de Kovacs pour la mise en évidence de l'indole.

## LISTE DES ANNEXES

- Ajouter 2 à 3 gouttes de perchlorure de fer (réactif de TDA) pour la mise en évidence du tryptophane désaminase.

### • Lecture

Noter dans l'ordre :

- ✓ Virage du milieu au rose-rouge : uréase positive.
- ✓ Le milieu a une teinte jaune : uréase négative.

Après ajout du réactif de Kovacs :

- ✓ Formation d'un anneau rouge à l'interface : indole positif.
- ✓ Absence d'anneau rouge (anneau marron) : indole négatif.

Après ajout du perchlorure de fer (réactif de TDA) :

- ✓ formation d'un précipité brun-noir : bactérie TDA positive.
- ✓ Coloration jaune : bactérie TDA négative.

### ✚ Nitrate réductase :

Les bactéries, lorsqu'elles possèdent un nitrate réductase, sont capables de transformer les nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) en nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) et éventuellement en azote ( $\text{N}_2$ ).

### • Technique :

Un bouillon nitrate (bouillon nutritif supplémenté de 1,5 % de nitrates de potassium) est ensemencé avec la bactérie à étudier et incubé 18 h à 37 °C.

### • Lecture :

Après incubation, 3 gouttes d'une solution d'acide sulfanilique (Griess A) et 3 gouttes d'une solution de naphtylamine (Griess B) sont ajoutées au bouillon. Si une coloration rose fugace apparaît, les nitrates ont été réduits au stade nitrites. En l'absence de coloration, soit les nitrates ont été réduits au stade azote, soit la bactérie ne possède pas de nitrate réductase. L'addition de poudre de Zinc (réactif de Zobel, qui va réduire les nitrates en nitrites) permet de trancher. Si une coloration rose apparaît, alors la bactérie ne possède pas de nitrate réductase. Si aucune modification de coloration n'est visible après ajout de zinc, alors les nitrates avaient été réduits au stade azote.

## LISTE DES ANNEXES

**Annexe 5 : Tableau des Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour les Entérobactéries (CLSI, 2014).**

Antibiotique testé	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critique (µg/ml)		
		R	I	S	R	I	S
Ampicilline	10 µg	≤13	14-16	≥17	≥32	16	≤8
Amoxicilline+Ac clavulanique	20/10 µg	≤13	14-17	≥18	≥32/16	16/8	≤8/4
Céfazoline	30 µg	≤19	20-22	≥23	≥8	4	≤2
Céfoxitine	30 µg	≤14	15-17	≥18	≥32	16	≤8
Cefotaxime	30 µg	≤22	23-25	≥26	≥4	2	≤1
Céftazidime	30 µg	≤17	18-20	≥21	≥16	8	≤4
Azteronam	30 µg	≤17	18-20	≥21	≥16	8	≤4
Amikacine	30 µg	≤14	14-16	≥17	≥64	32	≤16
Gentamicine	10 µg	≤12	13-14	≥15	≥16	8	≤4
Acide nalidixique	30 µg	≤13	14-18	≥19	≥32	---	≤16
Ciprofloxacine	5 µg	<15	16-20	≥21	≥4	2	≤1
Chloramphénicol	30 µg	<12	13-17	≥18	≥32	16	≤8
Fosfomycine	200 µg	≤12	13-15	≥16	≥256	126	≤64

## LISTE DES ANNEXES

### Annexe 6 : Tableau des solutions d'antibiotiques (CMI)

Solution initiale (µg/ml)	Solution mère (ml)	Eau distillée (ml)	Concentration obtenue (µg/ml)	Concentration finale dans le milieu (µg/ml)
5120	2	2	2560	256
5120	1	3	1280	128
5120	0,5	3,5	640	64
5120	0,5	7,5	320	32
320	2	2	160	16
320	1	3	80	8
320	0,5	3,5	40	4
320	0,5	7,5	20	2
20	2	2	10	1
20	1	3	5	0,5
20	0,5	3,5	2,5	0,25

## Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

**Filière :** Sciences Biologiques

**Spécialité :** Biologie Moléculaire des microorganismes

### LES ENTEROBACTERIES : EPIDEMIOLOGIE ET RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

#### Résumé :

La diffusion des souches multi-résistantes d'Entérobactéries connaît à ce jour une évolution mondiale préoccupante, réduisant de manière importante les alternatives thérapeutiques. Cependant, la résistance liée à la production de Béta-lactamases à spectre étendu (BLSE) est un problème particulier dans le traitement des infections à Entérobactéries, mais d'autres mécanismes ont également émergé, conduisant à la multirésistance. Ces E-BLSE sont aujourd'hui les BMR majoritaires, souvent associées à des maladies de gravité très variable.

De ce fait notre étude a porté sur une recherche bibliographique concernant les Entérobactéries et leur résistance aux antibiotiques dans Le but de donner une vue générale sur les phénomènes émergents en termes de résistance.

Dans la première partie, nous avons abordé les principaux caractères des Entérobactéries, la classification des principaux antibiotiques avec leurs modes d'action et les mécanismes de résistance des Entérobactéries.

Le deuxième chapitre décrit les méthodes utilisées dans le diagnostic des infections à Entérobactéries y compris les méthodes d'étude de la résistance aux antibiotiques.

Enfin, le troisième chapitre, analytique, traite différents résultats obtenus d'après les données de la littérature afin de pouvoir faire le point sur l'épidémiologie et l'état actuel de la résistance aux antibiotiques chez les Entérobactéries.

**Mot clés :** Entérobactéries, EBLSE, BMR, Antibiotiques, Antibiorésistance.

#### Membre du jury :

**Président du jury :** *Mme. ARABET D* (MCA-UFM Constantine 1)

**Rapporteur :** *Mme. HECINI-HANNACHI A.* (MCA – U Saleh boubnider Constantine 3)

**Examinatrice :** *Mme. ABDELAZIZ W.* (MCA-UFM Constantine 1)

**Présenté par :** ZRARDI mohamed elhadi

**Année universitaire :** 2019 -2020