

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université d'Ibn Khaldoun –Tiaret
Faculté des sciences de la nature et de vie
Département des sciences de la nature et de la vie



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : sciences de la nature et de la vie

Filière : sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Thème:

Caractérisation des bacilles Gram négatifs résistants aux carbapénèmes isolés des spécimens environnementaux et cliniques dans les hôpitaux de Tiaret

Présenté et soutenu publiquement par

-KADDOUR Fatima
- KHEROUF Fatima
-HAMEURLAINE Ilham

Devant le jury :

-Président : Mme MIHOUB. F
-Promotrice : Mme: CHAALAL. W
-Examineur : Melle ABDI. F.Z.

Année universitaire : 2017-2018

Remerciements

Nous remercions ALLAH tout puissant qui nous a donné le courage et la volonté et de nous avoir bénie pour la réalisation de ce travail.

Nos vifs remerciements s'adressent à notre promotrice et directrice de mémoire madame « CHAALAL Wafaa » qui trouve ici le témoignage de notre profonde gratitude pour sa gentillesse, sa disponibilité, sa patience, sa bienveillance et ces conseils.

Nous remercions également : Madame « MIHOUB.F » pour l'honneur qu'elle nous a fait en présidant ce jury. Qu'elle trouve ici l'expression de notre profond respect.

Nous adressons nos sincères remerciements à Melle « ABDI.F.Z » pour avoir accepté d'examiner et juger ce travail.

Nous remercions également tout le personnel de laboratoire de microbiologie de la faculté SNV pour leur accueil et leur contribution dans ce travail.

Merci

À ceux et celles qui nous ont aidé d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin dans notre travail, nous les remercions du fond du cœur.

Dédicace

Je dédie cette mémoire

*A la mémoire de ma mère que dieu vous accueillir dans ses
Vastes Paradis.*

A mon père,

*Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous
Les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et
même à l'âge d'adulte.*

Puisse dieu te garder et te procurer santé et longue vie.

A mes grands-mères,

*Pour avoir toujours été là, de ma naissance jusqu'à aujourd'hui, j'espère pour encore
longtemps. Pour m'avoir soutenu dans tous mes choix, les bons comme les mauvais. Tellement
fière que vous soyez là pour me voir réaliser mon rêve de devenir biologiste. Vous êtes à jamais
gravés dans mon cœur et dans mon âme.*

A mes frères et mes sœurs

Djilali, Mohamed, Sid Ahmed, Amine, Afia, Oumria et Djemaa

*Votre amour et vos encouragements ont été pour moi d'un grand réconfort. J'espère que vous
trouverez dans ce travail l'expression de mes*

Sentiments les plus chaleureux,

A mes amis de toujours,

Pour tous les bons moments passés ensemble, et pour tous ceux à venir.

Kaddour Fatima

Dédicace

Je dédie ce modeste travail, fruit de mes études

A la mémoire de mon père

Je souhaite au dieu vous accueillir dans ses vastes Paradies.

A ma mère

Ma douce et tendre maman. Quoique je fasse, je ne pourrais te rendre ce que tu as fait pour moi. Si je suis arrivée là, c'est bien grâce à toi. Que dieu te donne longue vie et te protège pour moi.

A mes très chers frères

En témoignage de mon profond attachement, je vous souhaite une vie pleine de bonheur, santé et réussite. Puisse Dieu vous protéger, garder et renforcer notre fraternité.

A mes très chères sœurs

A notre fraternité qui m'est très chère. Avec mon grand amour et toute ma tendresse, je vous souhaite un avenir plein de joie, de réussite et surtout de santé.

A toutes mes amies

Au souvenir des moments qu'on a passé ensemble.

Vous m'avez offert ce qu'il y a de plus cher : l'amitié.

Je vous souhaite beaucoup de succès, de réussite et de bonheur

Et à tous mes proches.

Kherouf fatima

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A mes très chers et adorables parents Mostefa et Talia

qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique model de labeur et de persévérance, de la tendresse, de l'amour et de la force et dont je suis fière et reconnaissante de les avoir comme parents.

A ma unique sœur Assilnour el yaqin

Que dieu la garde et la protège.

A mes très chers frères Oussama et FaresMaàmour

Qui ont été très patient avec moi et qui m'ont toujours encouragé afin d'aller toujours plus loin.

A ma grande mère maternelle Masouda ,

Que dieu la garde pour nous.

*A tous mes amies en particulier Fatima, Sabrin, Sakina , Rachida, Fatima , Mouna , Ikram , Kheira ,
Pour leur présence, leur compréhension et leur bonne humeur de tous les jours. et a mon amour Abdo.*

A mon très cher binôme Fatima Kherouf, Fatima Kaddour.

A l'ensemble de la famille Hameurlaine et à tous mes proches. A tous ceux qui ont contribués de prés ou de loin à la réalisation de ce modeste mémoire de fin d'étude.

Table des matières	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Résumé	
Introduction	

Partie I : synthèse bibliographie

I. Les bacilles à Gram négatif	2
I.1. Les entérobactéries	2
I.1.1- <i>Escherichia coli</i>	2
I.1.2- <i>Klebsiella pneumoniae</i>	2
I.1.3- <i>Enterobacter cloacae</i>	2
I.1.4- <i>Citrobacter freundii</i>	2
I.1.5- <i>Proteus</i>	2
I.1.6- <i>Serratia marcescens</i>	3
I.2-Bacilles à Gram négatif aérobies strictes ou non fermentant	3
I.2.1- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
I.2.2- <i>Acinetobacter baumannii</i>	3
II. Les B-lactamines	3
II.1-Mécanismes d'action des B-lactamines	3
II.2-Famille des B-lactamines	3
II.2.1-Les pénicillines	3
II.2.2-Les céphalosporines	4
II.2.3-Les carbapénèmes	4
II.3.4 Les monobactames	4
III. Résistance aux B-lactamines	4
III.3-Mécanismes de résistance aux B-lactamines	4

Partie II Matériels ET Méthodes

II.1- Objectifs	6
II.2- le protocole expérimental	7
II.3- Méthodologie	8
II.3.1- Nature des prélèvements	8
II.3.2-Méthodes de prélèvement	8
II.4- Recherche des bactéries Gram négatif résistantes aux carbapénèmes	8
II.4.1-Enrichissement :	8
II.4.2-Isolement et purification	9
II.4.3- Identification	9
II.4.3.1 - Coloration de GRAM	9
II.4.3.2 - Tests biochimiques :	10
II.4.3.3 - Galerie API 20NE	13
II.4.3.4 -Identification par la spectrométrie de masse de types MALDI-TOF-MS	14
II.4.3.5-Détermination de la sensibilité aux antibiotiques	15

Partie III: Résultats et discussion

Sommaire

III.1.Prélèvements.....	16
III.2. Identification des bactéries isolées	17
Discussion.....	19
Conclusion	24
Références bibliographie	
Annexe	

Liste des figures

Figure 1 : Protocol expérimental	7
Figure 2 : Milieu bouillon nutritif	8
Figure 3: Milieu Mac Conkey	9
Figure 4 : Un frottis fixé sur une lame	9
Figure 5 : le milieu TSI	11
Figure 6 : Milieu citrate de Simmons.....	11
Figure 7 : Milieu Mannitol mobilité.....	12
Figure 8 : Mise en évidence d'ONPG.....	13
Figure 9 : Galerie API20NE.....	14
Figure 10 : Technique de dépôt sur la cible et MALDI TOF.....	15
Figure 11 : Répartition des souches selon la nature de prélèvement.....	16
Figure 12 : Répartition des isolats résistants aux carbapénèmes en fonction des prélèvements.....	17
Figure 13 : Aspect microscopique des bacilles gram négatif.....	17
Figure 14 : Mise en évidences des caractères biochimiques par galerie API 20 NE.....	19
Figure 15 : La fréquence de sensibilité des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux différents antibiotiques	20

Liste des tableaux

Tableau 1 : pourcentage de développement des prélèvements dans le bouillon nutritif. 16

Tableau2 : Répartition des isolats résistants aux carbapénèmes en fonction des Prélèvements 17

Tableau 3 : Résultats d'identification classique des bactéries isolées. 18

Tableau 4 : résultat d'identification des isolats à l'aide de galerie API 20NE en associant avec la spectrométrie de masse. 18

Tableau 5 :L'interprétation des diamètres des zones d'inhibition..... 19

Liste des abréviations

BGN : Bacille à Gram négatif
BLSE : β -Lactamase à Spectre Etendu
BMR : Bactériemultirésistante
C1G : Céphalosporines de première génération
C2G : Céphalosporines de deuxième génération
C3G : Céphalosporines de troisième génération
C4G : Céphalosporines de quatrième génération
IMP: Imipénème
PLP : protéines liant les pénicillines
spp : espèce
TSI : Triple Sugar Iron Agar
ONPG : (2-NitrophenylB-D-galactopyranoside).
TIC: Ticarcilline + Acide clavulanique
CT: Colistine
GN: Gentamicine
SXT :triméthoprimesulphamethoxazole
AMC : Amoxicilline+ acide clavulanique
CTX :Cefotaxime
AX :Amoxicilline
AK :Amikacine
CAZ :Ceftazidime
CRO :céftriaxone
RA: Rifampicine
TOB :Tobramycine
ADH : argininedihydrolase
LDC : lysine décarboxylase
ODC:ornithine décarboxylase
URE:urée
H₂S: sulfure d'hydrogène
CIT:citrate
GEL:gélatine
RM : rouge de méthyle
VP :VogesProskauer

Résumé

L'objectif de ce travail est de caractériser phénotypiquement les bactéries Gram négatives résistantes aux carbapénèmes dans le milieu hospitalier à Tiaret. Un total de 34 prélèvements étaient analysés. L'isolement est réalisé à partir de prélèvement d'urine, pertes, selles et matériel de soin, des tests phénotypiques pour l'identification des isolats ont été réalisés : coloration de Gram, galerie biochimique classique et galerie API ainsi que la spectrométrie de masse de types MALDI-TOF-MS. La sensibilité aux antibiotiques a été étudiée par la méthode de diffusion sur gélose Mueller Hinton.

Au total 9(26,24 %) des isolats ont montré une résistance aux carbapénèmes appartenant toutes à l'espèce de *Pseudomonace aeruginosa*.

La sensibilité aux antibiotiques testés montre une résistance de 100% aux bêta-lactamines, ainsi qu'une résistance aux Aminosides et à la polymexine.

Cette étude rapporte la première détection d'isolats de *Pseudomonace aeruginosa* épidémiques résistantes aux carbapénèmes ainsi à la colistine dans l'environnement hospitalier à Tiaret. L'émergence de telle résistance, nécessite la mise en place urgente d'un système de surveillance de la résistance à ces antibiotiques à Tiaret.

Mots clés : bacilles Gram négatifs, résistance, carbapénèmes, environnement hospitalier, Tiaret.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو توصيف صفات البكتيريا المقاوم للكربابينيم سالبة لصبغة غرام في المحيط الاستشفائي لولاية تيارت. تم تحليل ما مجموعه 34 عينة. العزل تم من خلال البول ، البراز و أدوات الفحص، تم اجراء اختبارات ظاهرية لتحديد العزلات: صبغ غرام ، خصائص البكتريولوجية الكلاسيكية و معرض API فضلا عن مطياف الكتلة من نوع MALDI-TOF-MS. تمت دراسة حساسية السلالات البكتيرية المعزولة للمضادات الحيوية بطريقة الانتشار في الاقراص. أظهرت 9 عزلات مقاومة للكربابينيم ، و جميعها تنتمي إلى نوع بسودوموناس ايروجينوزا أظهرت الحساسية للمضادات الحيوية التي تم اختبارها مقاومة بنسبة 100 للبيتاكتامين ،بلاضافة إلى مقاومة الامينوزيد و البوليمكسين .

أفادت هذه الدراسة بالكشف الأول عن العزلات بسودوموناس ايروجينوزا للوبائية ،المقاومة للكربابينام و الكولستين في المحيط الاستشفائي في تيارت.

يتطلب ظهور مثل هذه المقاومة إنشاء نظام مراقبة عاجل للحد من المقاومة للمضادات الحيوية بتيارت .

الكلمات المفتاحية :

عصيات سالبة لصبغة غرام،مقاومة،كاربابينام،المحيط الاستشفائي،تيارت.

Introduction

Au cours des dernières décennies, la résistance des bactéries vis-à-vis des antibiotiques a été croissante, notamment en raison de la pression de sélection exercée par l'utilisation importante et parfois inadéquate des antibiotiques. Les bactéries pathogènes continuent d'accumuler des altérations génomiques qui les rendent insensibles aux antibiotiques utilisés pour traiter les infections (German et *al.*, 2018).

La multi-résistance observée chez certains pathogènes est particulièrement préoccupante constituant un problème majeur de santé publique, et préoccupante particulièrement en milieu hospitalier (Curcio, 2014).

Durant de nombreuses années, les carbapénèmes par la suite la colistine considérés comme antibiotiques de dernier recours (Lerner et *al.*, 2016), ont été utilisés pour le traitement d'infections nosocomiales dues à des bactéries à Gram négatif multi-résistantes (Yigit et *al.*, 2001)

Très vite l'émergence de la résistance à ces familles d'antibiotiques a été décelée. L'acquisition de gènes de résistance à ces derniers est l'un des mécanismes les plus courants pour les bactéries Gram négatif. Résistantes aux antibiotiques carbapénèmes et colistine (Yigit et *al.* 2001).

Face à l'émergence incessante de bactéries Gram négatif multi-résistantes qui posent un problème mondial majeur de santé publique, Le but de cette étude était d'étudier la prévalence ainsi que la caractérisation phénotypique des isolats cliniques résistants au carbapénèmes et à la colistine dans les hôpitaux de Tiaret.

C'est dans ce contexte que ce travail de master s'inscrit avec comme objectif principal d'étudier la résistance aux antibiotiques d'isolats cliniques selon les étapes suivantes :

- L'isolement et purification des souches résistantes aux carbapénèmes et à la colistine ;
- Identification phénotypique des souches ;
- Etude de profil de sensibilité aux antibiotiques.

I. Les bacilles à Gram négatif

I.1. Les entérobactéries

Les entérobactéries sont des bacilles Gram négatif qui font partie de la flore gastro-intestinale normale de tout être humain. Ce sont d'ailleurs les bactéries les plus fréquemment isolées dans les spécimens cliniques (Boivin *et al.*, 2016), (aéro-anaérobies facultatifs, Omniprésentes).

Elles comprennent un nombre important de genres et d'espèces. Leur abondance dans l'intestin, leur mobilité, la rapidité de leur multiplication, l'acquisition fréquente de mécanisme de résistance aux antibiotiques expliquent qu'elles soient les bactéries les plus impliquées en pathologie infectieuse humaine surtout en milieu hospitalier.

I.1.1-*Escherichia coli*

Le genre *Escherichia* compte cinq espèces : *E. coli*, *E. Alberti*, *E. Ferguson*, *E. hermannii*, *E. vulneris*, *E. blattae*. Isolées pour la première fois par Escheriche en 1885, *Escherichia coli* est trouvé dans le tube digestif de l'homme (Savadogo et Boubkeir, 2016).

Plusieurs infections sont causées par *E. coli* ; infections urinaires, infection du tractus digestif, L'incidence de ces infections est plus marquée chez les femmes en milieu extrahospitalier à cause de la colonisation de la région péri-urétrale et de la longueur de l'urètre (El mahi, 2013).

I.1.2-*Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae est une bactérie saprophyte qui est très connue dans la nature. Cependant, elle se trouve à l'état commensal dans le tube digestif et les cavités naturelles en particulier les voies respiratoires de l'homme (Chekroud, R et Fathi, 2017). Ce germe est principalement isolé dans les hôpitaux, le portage étant fortement accru chez les patients hospitalisés de longues périodes ou bénéficiant de traitements antibiotiques au long court (El mahi, 2013)

I.1.3-*Enterobacter cloacae*

Les *Enterobacter cloacae* sont des bacilles à Gram négatif, anaérobies facultatifs, associés à des épidémies nosocomiales, ils sont considérés comme des pathogènes opportunistes (Lagha, 2015). C'est un germe qui colonise souvent les patients hospitalisés et plus particulièrement ceux traités par antibiotique, et peut causer des infections urinaires, de pneumonies, ainsi que d'infection cutanées. Il peut également être responsable de bactériémies. (El mahi, 2013). *Enterobacter cloacae* est isolé de fèces. On le trouve dans les eaux usées, le sol, les aliments et l'environnement hospitalier (Chekroud et Fathi, 2017).

I.1.4-*Citrobacter freundii*

Ils sont des bacilles ou de coccobacilles Gram négatif, ils se déplacent par des flagelles péritriches. Ils se trouvent dans l'intestin de l'humain et des animaux, sol, eau, eaux usées et aliments. Les *Citrobacter freundii* sont des agents pathogènes nosocomiaux opportunistes rares, qui entraînent normalement des infections des voies urinaires, des bactériémies, des sepsis abdominaux et des abcès cérébraux ainsi que des pneumonies (Chekroud et Fathi, 2017).

I.1.5-*Proteus*

P. mirabilis est l'espèce la plus fréquemment isolée au sein de ce genre ; en particulier des urines, elle est très sensible aux antibiotiques.

Proteus vulgaris est un bacille assez court, de 1 à 3 µ de long sur 0,8 µ de large possède nombreux cils, très mobile, dépourvu de spores et se colore facilement par les matières colorantes basiques (le Guyon, 1960).

I.1.6-Serratia marcescens

Serratia marcescens se trouve dans système digestif, respiratoire et urinaire des patients (Chekroud et Fathi, 2017).

I.2-Bacilles à Gram négatif aérobie strictes ou non fermentant

Les bacilles à Gram négatif non fermentant sont des bactéries aérobies strictes qui se développent généralement sur milieu ordinaire et qui sont caractérisées par un mode de production énergétique ne faisant pas intervenir la fermentation. Ce sont des bactéries ubiquitaires retrouvées dans l'environnement (sols, eaux...) et pouvant être responsables d'infections cliniques (Boukhatem, 2013).

I.2.1-Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa est un bacille à Gram négatif opportuniste vivant à l'état saprophyte dans l'eau, le sol humide et les végétaux, mais qui peut également vivre à l'état commensale sur la peau ou à l'intérieur du système digestif. Cette bactérie est la plus rencontrée en pathologie infectieuse (Miloudi et Khelifa, 2017).

I.2.2-Acinetobacter baumannii

Acinetobacter baumannii est une espèce pathogène opportuniste habituellement résistant aux plusieurs antibiotiques et il est impliqué dans des infections nosocomiales. Il est généralement isolé au niveau de la flore intestinale et de la flore cutanée. Cette bactérie adhère facilement à des surfaces biotiques et abiotiques clinique du malade et elle est capable de multiplier dans des flacons de désinfectants. Elle résiste à la dessiccation pendant plusieurs semaines (Deghrar et Ghalem, K, 2016).

II. Les B-lactamines

Les β-lactamines composent la famille d'antibiotiques la plus utilisée en antibioprophylaxie et en antibiothérapie; grâce à leur spectre d'action, la grande variété de leurs modes d'administration, leur faible toxicité, une bonne diffusion tissulaire et à leur efficacité thérapeutique. Les antibiotiques de cette famille sont bactéricides et se caractérisent par la présence du cycle β-Lactame lié à des cycles et des chaînes latérales variables (Chekroud et Fathi 2017).

II.1-Mécanismes d'action des B-lactamines

Les β-lactamines adhèrent sur des protéines de la membrane cytoplasmique : les protéines liant les pénicillines (PLP) qui sont les enzymes utilisés dans la synthèse du peptidoglycane. Les β-lactamines présentent une similitude structurale avec un constituant de peptidoglycane, le dipeptide D-alanine-D-alanine qui est le substrat naturel de PLP. Ces antibiotiques agissent en «substrat suicide » et bloquent la fonction de ces enzymes, inhibant ainsi la formation du peptidoglycane et enfin la lyse bactérienne (Chekroud et Fathi, 2017).

II.2-Famille des B-lactamines

II.2.1-Les pénicillines

Les pénicillines sont les antibiotiques les plus actifs, les moins toxiques et les plus utilisés en clinique. Ces groupe est constitué des : pénicilline G, pénicilline M, pénicillines A, carboxypénicilline et uréidopénicilline (Chekroud et Fathi 2017).

II.2.2-Les céphalosporines

Les céphalosporines diffèrent chimiquement des pénicillines par la présence du cycle dihydrothiazine «noyau céphème» au lieu d'un cycle thiazolidine.

Elles ont une meilleure stabilité vis-à-vis des β -lactamase par rapport aux pénicillines (Chekroud et Fathi, 2017).

En fonction de leur date d'apparition, qui correspond à chaque fois à l'acquisition de nouvelles propriétés, il y a quatre générations de céphalosporines (Chekroud et Fathi, 2017).

-Céphalosporines de première génération (C1G) : Céfaclor, Céfadroxil, Céfalexine

-Céphalosporines de deuxième génération (C2G) : céfuroxime, céfoxitine

-Céphalosporines de troisième génération (C3G) : le Cefotaxime, la Ceftazidime, le ceftriaxone, le céfopérazone

-Céphalosporines de quatrième génération (C4G) : le céfépime, le ceftiprome

II.2.3-Les carbapénèmes

Par définition, les carbapénèmes sont hydrolysés par les carbapénémases, et leur utilisation est compromise dans les infections graves à BGN producteurs de ces enzymes. La concentration critique définissant les souches sensibles a été fixée à 2 mg/l pour l'imipénème et le méropénem, et à 1 mg/l pour le doripénem. (Ferry et Richard, 2013).

Actuellement quatre molécules sont exploitées : l'imipénème, méropénème, l'ertapénème et le doripénème (Chekroud et Fathi, 2017).

II.3.4 Les monobactames

Les monobactames sont des β -lactamines monocycliques très actifs sur les bacilles à Gram négatif aérobies. De plus, les monobactames forment les seules β -lactamines non hydrolysées par les métallo- β -lactamases (Chekroud et Fathi, 2017).

III. Résistance aux B-lactamines

III.3-Mécanismes de résistance aux B-lactamines

En générale, les entérobactéries utilisent différents mécanismes pour une résistance aux β -lactamines : il peut s'agir de troubles de perméabilité pour les antibiotiques, ce qui ralentit la pénétration de l'antibiotique dans la bactérie, de systèmes d'efflux qui permettent d'évacuer les antibiotiques qui auraient pénétré dans la bactérie, ou de modification de la cible bactérienne de l'antibiotique. Mais le plus reconnu, il s'agit d'enzymes détruisant les β -lactamines ; les β -lactamases (Chekroud et Fathi, 2017).

Les entérobactéries expriment leur résistance aux carbapénèmes par différents mécanismes. Parmi ces mécanismes, la production d'une catégorie d'enzymes dénommée carbapénémases (d'où le nom d'entérobactéries productrices de carbapénémases), qui leur permet de rendre inactifs les antibiotiques de la classe des carbapénèmes (Boivin *et al.*, 2016).

-Diminution de la perméabilité

La pénétration des β -lactamines dans la membrane externe s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau. Ainsi, la sensibilité aux β -lactamines dépend du nombre de porines fonctionnelles. L'altération de ces derniers par mutation est à l'origine de résistances acquises aux β -lactamines, soit par une modification structurale d'une porine essentielle, ou par une diminution quantitative des porines, qui est la situation la plus fréquente. Bien que rarement, La disparition de porine cause l'augmentation des concentrations minimales inhibitrices de certaines β -lactamines comme cela a été mis en évidence chez

certaines entérobactéries (*Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli*) (Chekroud et Fathi, 2017).

-Hyperproduction de système d'efflux

Le système d'efflux actif est efficace grâce aux protéines transmembranaires fixées dans la membrane plasmique et aussi dans la membrane externe des bactéries Gram négatif tel que les entérobactéries .Des mutations dans les régions régulatrices des opérons des systèmes d'efflux multi-drogues peuvent provoquer une surexpression des systèmes d'efflux constitutifs, associée ou non à une perte des porines, et conférer une multi-résistance aux antibiotiques(Chekroud et Fathi,2017).

II. 1. Objectifs

L'étude que nous avons menée est sur la caractérisation de l'antibiorésistance des isolats du groupe des bacilles à Gram négatif rendu responsables d'infection chez des patients hospitalisés à l'hôpital Youcef DAMARDJI et de l'hôpital d'hémodialyse Salah BELKHOUDJA. de Tiaret, sur une période de 4 mois (Décembre 2017 à Mars 2018).

Au courant de cette période, un total de 34prélèvements, 30 prélèvements recueillis aux niveaux du laboratoire central de l'hôpital Youcef DAMARDJI et 4 prélèvements à partir de matériel de soin de l'hôpital d'hémodialyse Salah BELKHOUDJA.

Par le présent travail, nous voulons étudier la résistance des bacilles à Gram négatif isolés des prélèvements (urine, selles, pertes, prélèvement sur matériels de soin) des patients hospitalisés au niveau des différents services de l'hôpital de Tiaret-Algérie. On a alors effectué l'identification des souches isolées, puis la détermination de leur profil de sensibilité a un panel d'antibiotiques.

Les examens bactériologiques ont été réalisés au niveau du laboratoire de microbiologie de la faculté SNV, Université Ibn KHALDOUN.

Durant notre étude, nous ont apparu intéressants à étudier et à analyser la résistance aux carbapénèmes.

Nous avons effectué ce travail dont l'objectif d'évaluer le niveau de résistance à ces antibiotiques dans nos unités de soin car ils sont utilisés en première intention dans les infections surtout nosocomiales et aussi à cause de leur émergence en Algérie et dans le monde.

II.2- le protocole expérimental

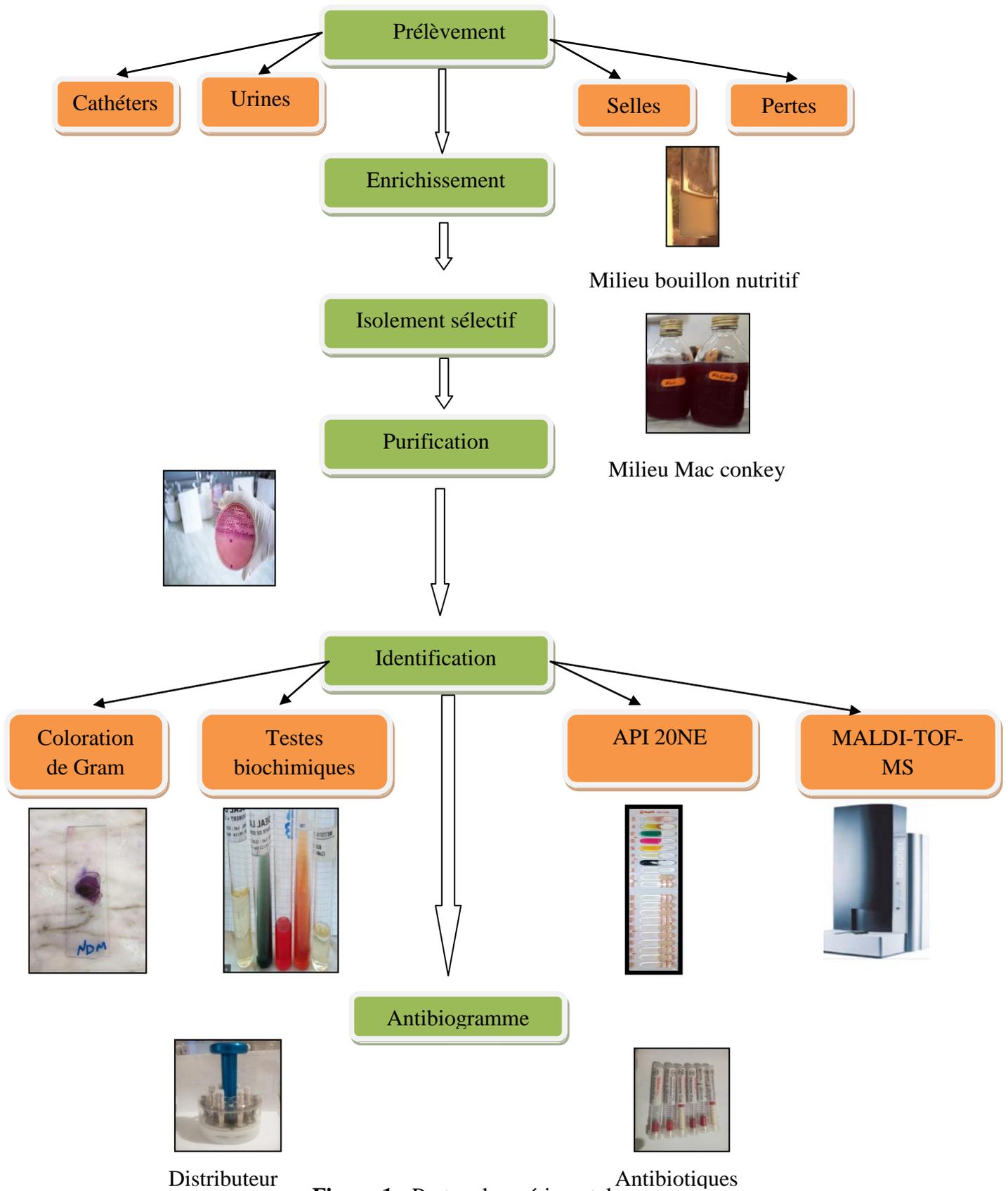


Figure 1 : Protocole expérimental

II.3. Méthodologie

II.3.1- Nature des prélèvements

II.3.2-Méthodes de prélèvement

- **Prélèvement de l'urine**

Après lavage hygiénique des mains et toilette soignée des organes génitaux externes et après élimination du premier jet, les urines, sont recueillies dans un tube stérile (environ 10 à 20 ml), le tube est fermé hermétiquement et acheminé au laboratoire dans la demi-heure qui suit le prélèvement.

- **Prélèvement sur cathéter**

On a utilisée des écouvillons stériles qui sont probablement humidifiés avec du bouillon nutritif pour écouvillonnage sur le cathéter. Après ces écouvillons son acheminés ver le laboratoire et analysés le même jour (Zenati *et al.*, 2017).

- **Prélèvement des selles**

Une noix de selles dans un récipient stérile, Mettre les gants à usage unique. Pour recueillir les selles à l'émission sans les récupérer dans l'eau des toilettes si possible, puis remplir le pot au minimum au 1/3.après nettoyer si nécessaire l'extérieur du pot. Jeter les gants et mettre le pot dans le sachet pour examen.

II.4- Recherche des bactéries Gram négatif résistances aux carbapénèmes

II.4.1-Enrichissement :

Chaque échantillon est introduit dans 5 ml de bouillon nutritif (cœur –cervelle), il permet après une incubation à 37 °C pendant 24 h d'obtenir une multiplication des microorganismes (Marchal et Bourdon, 1973)



Figure 2 : Milieu bouillon nutritif

II.4.2-Isolement et purification

L'isolement des souches a été réalisé sur le milieu Mac Conkey additionnée à l'Ertapénème puis incubé à 37°C pendant 24 heures. La purification des colonies bactériennes est procédée par repiquage successif sur le même milieu afin d'obtenir de souches pures (Bakour *et al.*, 2014).



Figure 3: Milieu Mac Conkey

II.4.3- Identification

II.4.3.1- Coloration de GRAM

But :

Distinguer et classer les bactéries à partir des propriétés de leur paroi bactérienne.



Figure 4 : Un frottis fixé sur une lame

II.4.3.2- Tests biochimiques

a. Recherche de l'oxydase

-Principe

Consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée à oxyder la forme réduite incolore de dérivés méthyles du paraphénylène diamine, en leur forme oxydée semiquinoniquerosse violacé. (Meziani, 2012).

-Technique

Déposer, sur une lame porte-objet propre, un disque oxydase et l'imbiber avec une goutte d'eau distillée ou d'eau physiologique stérile. Prélever une partie de la colonie à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée stérile et l'écrasé sur le disque (Savadogo et Boubkeur,2016).

- Lecture

Résultat positive : virement de la couleur du disque vers le violet.

Résultat négative : le disque reste incolore.

b.Recherche de la catalase

-Principe

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. La fonction principale de la catalase dans les cellules est de prévenir l'accumulation de niveaux toxiques de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) formé comme sous-produit de processus métaboliques. Elle catalyse la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène qui se dégage selon :



-Technique

Une colonie est prélevée à partir de la boîte de Pétri et déposée sur une lame. Une goutte de H₂O₂ (10 volumes) est déversée sur cette colonie.

-Lecture

La présence de la catalase se matérialise par la production de bulles.

c.Recherche de l'utilisation du glucose, lactose, production de gaz et H₂S sur le milieu TSI

-Principe

Le milieu TSI est utilisé principalement pour orienter l'identification des entérobactéries. Il permet de révéler les fermentations du glucose, du lactose et du saccharose, la production d'hydrogène sulfuré (H₂S) et de gaz (Meskine et Benabdelkader, 2016).

-technique

-Ensemencer abondamment la surface par des stries ou par inondation, puis le culot par simple pique, à l'aide de la même pipette boutonnée

-Mettre à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

-Lecture

-La fermentation des glucides (glucose, saccharose, lactose) provoque une production d'acide qui est détectée par l'indicateur rouge de phénol, le milieu vire vers le jaune.

-La présence de bulles et le déplacement du milieu vers le haut signifie qu'il y a production de gaz. La production d' H_2S se traduit par un précipité noir.



Figure 5 : le milieu TSI

d. Recherche de l'utilisation du citrate :**-Principe**

Le milieu citrate de Simmons est un milieu solide incliné, qui permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate comme seule source de carbone et d'énergie (Meskine et Benabdelkader, 2016).

-technique

-La pente estensemencée par une strie longitudinale, réalisée à l'anse, à partir d'une suspension de la culture solide en eau distillée stérile.

-Mettre à l'étuve 24h à 37°C

-Lecture

Le virage de l'indicateur de pH du vert au bleu signifie une alcalinisation du milieu ; la souche est citrate positive

-Pas de virage de couleur signifie que la souche n'a pas utilisé le citrate.



Figure 6 : Milieu citrate de Simmons

e. Test de Mannitol Mobilité :**-Principe**

Le milieu mannitol mobilité est un milieu semi solide qui permet d'étudier simultanément la mobilité et la dégradation du mannitol (la dégradation en anaérobiose du mannose) (Savado et Boubkeir, 2016).

-Technique

L'ensemencement du milieu s'est fait par piqûre centrale jusqu'au fond du tube avec la souche à tester à l'aide d'une anse de platine (fil droit sans boucle). Incubation à 37°C durant 24 heures.

-Lecture

Le virage de la couleur du milieu, du rouge vers le jaunes explique par l'acidification du milieu à cause de la dégradation du mannitol par la bactérie testée.

La mobilité est déduite par rapport au déplacement de la bactérie testée dans la gélose semi molle du milieu Mannitol Mobilité.



Figure 7 : Milieu Mannitol mobilité.

i. Test du Rouge de Méthyle (RM)**-Principe**

Le milieu Clark et Lubs permet de rechercher les voies fermentaires des entérobactéries et de différencier la fermentation « acides mixtes » et la fermentation « butylène glycolique ». Le test RM : permet la mise en évidence grâce au rouge de méthyle, de la fermentation acide mixte par acidification du milieu glucosé après fermentation du glucose (Savado et Boubkeir, 2016).

-Technique

Ensemencer un milieu Clark et Lubs avec quelques gouttes de la suspension bactérienne et étuver 24 à 48 heures à 37°C. Après incubation le Ajouter 2 à 3 gouttes de rouge de méthyle, La lecture est immédiate.

-Lecture

Une coloration rouge du milieu, correspondant à un pH inférieur à 4,2, est considérée comme positive. Une coloration jaune du milieu, correspondant à un pH supérieur à 6,3, est considérée comme négative.

J. Recherche de la β -galactosidase : test ONPG

- Principe:

Le test ONPG consiste à rechercher la présence de β -galactosidase. On utilise comme substrat, non pas le lactose, mais un autre β -galactoside : l'ortho-nitro-phenyl-galactoside. Permet la recherche d'une enzyme (la β galactosidase) capable de scinder le lactose en glucose et galactose (Chekroud et Fathi, 2017).

-Technique:

- Réaliser une suspension bactérienne dense dans 0,5mL d'eau stérile. Les bactéries provenir d'une culture sur un milieu MacConkey.
- Introduire aseptiquement un disque de papier imprégné du substrat ONPG.
- Mettre à 37°C, observer toutes les 15 min pendant 1h.

-Lecture :

Présence d'ONP dans le milieu résultant de l'hydrolyse de l'ONPG est révéler par coloration jaune stable et l'absence d'ONP dans le milieu ; l'ONPG n'a pas été hydrolysé, pas de coloration jaune



Figure 8 : Mise en évidence d'ONPG.

II. 4. 3.3- Galerie API 20NE**-Principe:**

L'identification a été faite par la galerie rapide API système (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France)(Analytical profil index).API 20E est un système pour l'identification des entérobactéries et autres bacilles à Gram négatifs non fastidieux et l'API 20NE pour l'identification des non-entérobactéries, les deux systèmes utilisent 20 tests biochimiques standardisés et miniaturisés.

-Technique:

- On réunie fond et couvercle d'une boîte d'incubation avec la répartition environ 5ml d'eau distillé dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide, sans oublié d'inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- On retire la galerie de son emballage individuel et on la dépose dans la boîte d'incubation, puis on prépare l'inoculum bactérien: une colonie dans 5ml d'eau physiologique, Pour inoculer la galerie,
- Remplir à l'aide d'une micropipette les tubes et les cupules des tests CIT, VP et GEL avec la suspension bactérienne,
- Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) avec la création d'une anaérobiose dans les tests: ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leur cupule par l'huile de paraffine.
- Incube à 37 C° ± 1C° pendant 18-24 heures.

-Lecture:

La lecture des galeries API 20NE se fait selon les indications du fournisseur. Après codification des réactions en un profil numérique, on se réfère à un catalogue analytique.



Figure 9 : Galerie API20NE

II.4. 3.4-Identification par la spectrométrie de masse de types MALDI-TOF-MS

-Principe

La spectrométrie de masse MALDI-TOF est une nouvelle technologie apparue ces dernières années en microbiologie. Si les techniques conventionnelles d'identification des différents germes se basent sur leurs aspects phénotypiques, il est possible aujourd'hui d'identifier les microorganismes en analysant directement leurs protéines. La spectrométrie de masse consiste à séparer et identifier des molécules selon leur masse et leur charge (Senget *al.*, 2009).

-Technique**a. Préparation des souches**

L'identification par la spectrométrie de masse de types MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) a été faite en ensemencant les souches sur gélose Columbia au sang de mouton à 5 % (bioMérieux) et les incubant pendant 24 heures à 37 °C

b. Préparation de la cible.

En utilisant des embouts stériles, prendre une colonie et l'étaler sur le cercle graver sur la cible (BrukerDaltonics, Bremen, Allemagne). Ensuite, deux microlitres de la solution de la matrice ont été ajoutés sur les taches cibles de l'analyse. Après que la cible est sèche, elle est placée dans l'appareil (MALDI-TOF-MS BrukerMicroflexDaltonics, Bremen, Allemagne). L'analyse des données MALDI-TOF-MS et le typage des souches résistantes et sensibles des isolats ont été réalisées en comparant la position des pics et l'intensité des spectres résultants, un dendrogramme est généré par le logiciel Biotyper 2.0 (Senget *al.*, 2009).

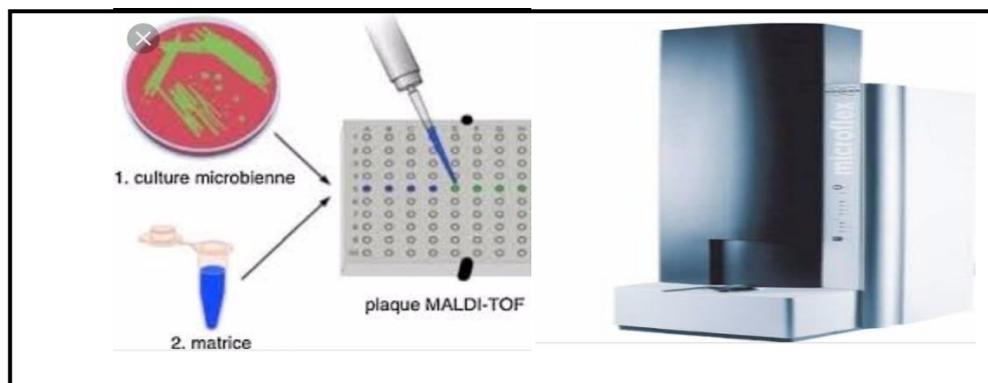


Figure 10 : Technique de dépôt sur la cible et MALDI TOF

II. 4. 3.5-Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

La méthode utilisée est la technique de la diffusion des disques, sur un milieu gélosé. Les antibiogrammes des souches ont été réalisés sur des boites de Muller-Hinton suivant la technique recommandée par le comité de l'antibiogramme, de la société Française de microbiologie (CA-SFM).

Les géloses ont été ensemencées à l'aide d'un écouvillon à partir d'une suspension de germes à 0.5 Mac Farland (une densité optique égale 0.2 à 650 nm) diluée au 1/10 de façon à obtenir une concentration finale de 10^7 UFC/ml, conformément aux recommandations de la CA-SFM (www.sfm.asso.fr). Des disques d'antibiotiques ont été déposés à la surface des géloses, à l'aide d'un distributeur automatique. Les antibiotiques testés sont les suivants : amoxicilline +acide clavulanique, **T**icarilline, **A**mpicilline,**C**efoxitine,**C**efotaxime,**C**eftazidime, gentamicine,**A**mikacine,**T**obramycine, colistine,Triméthopprime-sulfaméthoxazole.

Les boites ont été mises à incuber pendant 18 à 24 heures à 37 °C.

À l'aide d'un pied à coulisse, les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques sont mesurés par deux fois. L'interprétation en Sensible (S) Intermédiaire (I) ou Résistante (R) est effectuée selon les critères définis par le CA-SFM

III.1.Prélèvements

Durant notre étude, 34 prélèvements ont été réalisés au niveau laboratoire central de l'hôpital Youcef DAMARDJI et au niveau de l'unité d'hémodialyse SALLEH BELKHOUDJA. À savoir 16 prélèvements urinaires, 12 prélèvements de pertes, 02 prélèvements de selles et 04 prélèvements de matériels de soin de l'unité d'hémodialyse.

➤ Enrichissement :

Tableau 1 : pourcentage de développement des prélèvements dans le bouillon nutritif.

Origine	nombre	Pourcentage %	Résultat(+)
urines	16	47%	Apparition des troubles 
Pertes	12	35,2%	
selles	2	5,8 %	
cathéter	4	11,7%	
Total	34	100%	

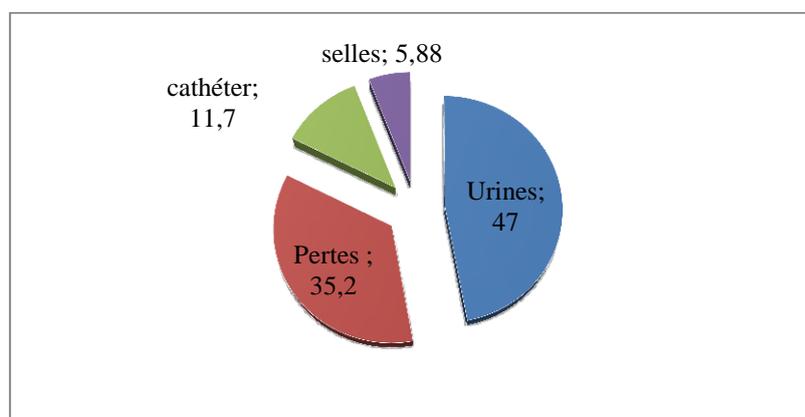


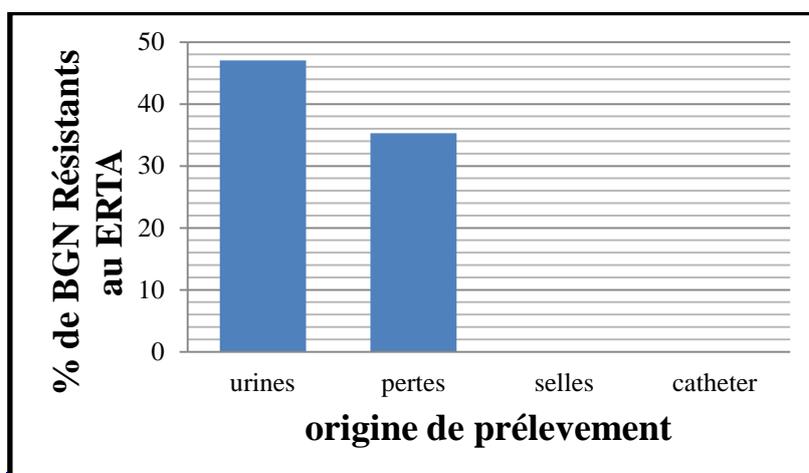
Figure 11 : Répartition des souches selon la nature de prélèvement.

➤ Isolement sélectif

Sur un total de 34 souches de bacilles à Gram négatif (BGN), 09 isolats manifestent une résistance aux carbapénèmes soit un taux de 26,4% (9/34), toutes isolées des prélèvements de selles et d'urines prélevés du laboratoire central de l'hôpital Youcef DAMARDJI.

Tableau 2 : Répartition des isolats résistants aux carbapénèmes en fonction des Prélèvements

Origine des prélèvements	Nb de prélèvements	Nb et (%) BGN isolées
Urine	16	6 (47,06%)
Pertes	12	3 (35,29%)
Selles	2	0
Cathéter	4	0
Total	34	9(26,47%)

**Figure 12** : Répartition des isolats résistants aux carbapénèmes en fonction des prélèvements.

III.2. Identification des bactéries isolées

➤ Coloration de gram

**Figure 13** : Aspect microscopique des bacilles gram négatif.

➤ **Testes biochimiques**

Tableau 3 : Résultats d'identification classique des bactéries isolées.

Teste	Résultats positives	Résultats négatives
TSI	rouge au jaune	
ONPG	Virage de couleur au jaune	
Mannitol mobilité	Milieu rouge	Milieu jaune
Citrate de Simmons	Milieu bleu Culture	Milieu vert Sans culture

➤ **Galleries API 20NE**

A l'aide de galerie API 20NE et la spectrométrie de masse de types MALDI-TOF-MSL l'identification des souches isolées nous a permis de caractériser 09 isolats de la famille des *Pseudomonadaceae* (*P.aeruginosa*).

Tableau 4 : résultat d'identification des isolats à l'aide de galerie API 20NE en associant avec la spectrométrie de masse.

Origine du prélèvement	Nombre	espèce
urines	6	<i>P.aeruginosa</i>
pertes	3	

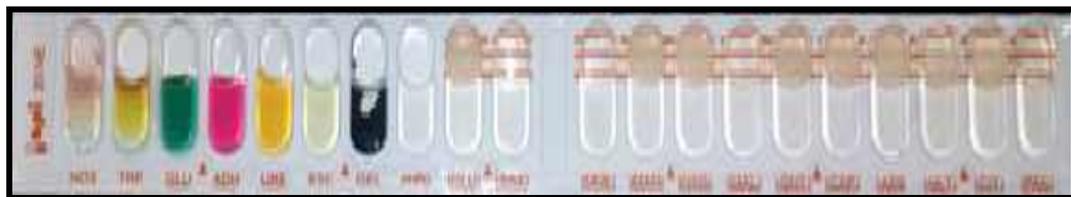


Figure 14 : Mise en évidence des caractères biochimiques par galerie API 20 NE.

➤ **Résistance aux antibiotiques :**

Résultat de l'antibiogramme :

Les isolats de *Pseudomonas aeruginosa* étaient testés vis à vis de 13 molécules d'antibiotiques dont 8 antibiotiques appartenant à la famille des β -lactamines (amoxicilline +acide clavulanique, Ticarcilline, Ampicilline, Cefoxitine, Cefotaxime, Ceftazidime, Imipénème ,Ertapénème) et trois molécules appartenant à la famille des aminosides (gentamicine, Amikacine, Tobramycine). et vis-à-vis d'autres molécules (colistine, Trimetho-sulfa).

Tableau 5 : L'interprétation des diamètres des zones d'inhibition

Code	espèce	AM C	TIC	AX	CTX	CRO	SXT	TOB	CT	AK	ERT	IMP	CN	CAZ
ERTA30	<i>P.aeruginosa</i>	S	S	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R	S
ERTA34	<i>P.aeruginosa</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
ERTA12	<i>P.aeruginosa</i>	R	S	R	S	R	R	S	S	S	R	R	R	S
ERTA33	<i>P.aeruginosa</i>	S	S	R	R	S	R	S	R	S	R	R	S	R
ERTA 17	<i>P.aeruginosa</i>	R	R	R	S	R	S	R	S	S	R	R	R	R
ERTA26	<i>P.aeruginosa</i>	R	S	R	S	R	S	R	S	S	R	R	R	R
ERTA 6	<i>P.aeruginosa</i>	S	S	R	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S
ERTA 16	<i>P.aeruginosa</i>	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R
ERTA 27	<i>P.aeruginosa</i>	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S

AMC: Amoxicilline+acide clavulanique, TIC: Ticarcilline, AX: Ampicilline, CTX: Cefotaxime, CRO: Ceftriaxone, SXT: Trimethosulfa, TOB: Tobramycine, CT: Colistine, AK: Amikacine, CN: Gentamicine, CAZ: Ceftazidime. R: Résistante, S: Sensible, I : Intermédiaire.

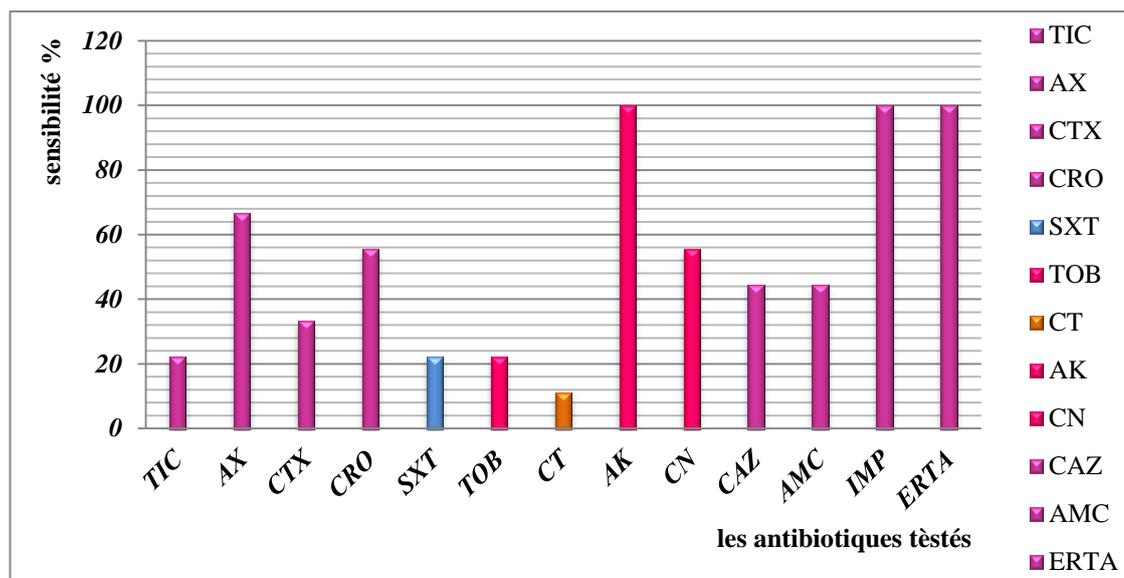


Figure 15 : La fréquence de sensibilité des souches de *Pseudomonas aeruginosa* aux différents antibiotiques

L'antibiogramme des isolats de *P. aeruginosa* (Tableau 5), (Figure 15) montre une résistance aux antibiotiques testés, particulièrement aux β -lactamines.

Parmi les résistances les plus élevées aux β -lactamines, on note le groupe des carbapénèmes avec une résistance à l'imipénème de 100 %, suivi par le groupe des cephèmes avec une résistance à la ceftazidime de (44,4%), le groupe des pénèmes avec une résistance de 22,2 %. La résistance la plus faible est le groupe de monobactame avec 3.3%.

Après la résistance aux β -lactamines, vient la résistance aux Aminosides avec une résistance qui varie de 22,2% à 55%.

Devant ces résistances élevées aux β -lactamines et particulièrement à l'imipénème qui est l'un des antibiotiques de choix il est impératif de rechercher les supports génétiques et le type de résistance permettant l'actualisation des données locales sur le profil épidémiologique de ce germe ainsi de mettre en place une stratégie de contrôle régulier de toute prescription d'antibiotiques.

-Discussion

Les hôpitaux sont connus comme des réservoirs potentiels des bacilles à Gram négatifs (Zenati *et al.*, 2017). Les infections à *Pseudomonas aeruginosa* sont le plus souvent des infections d'origine nosocomiale, en particulier dans les services de réanimation. Dans la majorité des cas, l'infection à *P. aeruginosa* est opportuniste. Elle survient chez les patients fragilisés (opéré récent, patient sous assistance respiratoire...). Cette bactérie peut-être responsable d'infections graves (pulmonaires, septicémiques, urinaires) nécessitant l'utilisation d'antibiotiques coûteux et le plus souvent en association (Bertrand *et al.*, 2003). L'émergence incessante de la résistance aux antibiotiques cause un problème réel en thérapeutique, notamment la résistance des BGNs aux carbapénèmes qui c'est émergée rapidement dans plusieurs pays (Bourafa *et al.*, 2018).

Aux Etats-Unis, *Pseudomonas aeruginosa* occupe la cinquième place parmi les espèces responsables d'infections nosocomiales en réanimation.

En Europe, *P. aeruginosa* occupe la troisième place dans les infections nosocomiales en réanimation, après *Staphylococcus aureus* et *Enterobacteriaceae* essentiellement les genres *Klebsiella* et *Enterobacter* (Allegranzi *et al.*, 2011)

En Algérie, *P. aeruginosa* occupe la troisième place après *Staphylococcus aureus* et *Enterobacteriaceae* dans les infections nosocomiales au niveau des soins intensifs (Rahal *et al.*, 2012).

Le *P. aeruginosa* est résistant naturellement à un grand nombre d'antibiotiques. Les fluoroquinolones, les aminosides, quelques β -lactamines dont les carbapénèmes, et la colistine sont efficaces contre cette bactérie. Les résistances acquises contre ces quelques antibiotiques sont fréquentes, rendant la prise en charge des infections à *P. aeruginosa* de plus en plus compliquée.

Au Maroc, en 2005 une étude dans un hôpital à Rabat a montré une résistance de 23% à l'imipénème, sur une série de souches *P. aeruginosa*. Ces souches sont également résistantes aux fluoroquinolones, aminosides et rifampicine.

En Tunisie, Hammami *et al.*, montre sur une étude de *P. aeruginosa* de 2002 à 2006 au niveau de l'hôpital Charles Nicolas, une résistance à l'imipénème est de 43,9%. Cessouches montrent également une résistance très élevée aux fluoroquinolones, aminosides et rifampicine (Hammami *et al.*, 2010).

En Algérie, selon son 12ème rapport, le réseau Algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques (AARN), montre qu'au niveau des services de réanimation sur tout le territoire national, que des souches de *P. aeruginosa*, présentent une résistance élevée aux β -lactamines, avec un taux de 17.3% des carbapénèmes. Ce groupe représente le taux le plus résistant des groupes des β -lactamines, suivi par le groupe pénames avec 16%. Le groupe cephèmes est de 15.2%, et pour les monobactames 16.9% (Rahal *et al.*, 2012).

A Tiaret, notre travail rejoint les résultats du réseau AARN mais avec de légères différences. Ces différences découlent du petit échantillonnage utilisé au cours de notre investigation comparé à celui de l'AARN. Nous avons enregistré une résistance aux β -lactamines des groupes des cephèmes, pénames, en moyenne de 33,2%. Quant à l'imipénème du groupe carbapénèmes, une résistance de 100%, ce qui représente le taux le plus élevé. Pour les aminosides 38,7%.

Les résultats obtenus nous confirment que nous sommes en présence de bactéries multi-résistantes (BMR). Durant, ces dernières décennies, les souches *P. aeruginosa* résistent à un nombre croissant d'antibiotiques et d'une manière de plus en plus fréquente. L'imipénème est alors considéré comme un antibiotique de première intention, dans les infections nosocomiales enrénation, car c'est l'antibiotique le plus efficace.

L'abondance de *Pseudomonas aeruginosa* en milieu hospitalier explique leur capacité à résister à de nombreux antibiotiques et antiseptiques (Debabza, 2015).

Chez *P. aeruginosa*, la modification de la protéine de membrane externe OprD reste le mécanisme le plus fréquent de résistance à l'imipénème (Nordman *et al.*, 2010), la perte ou la diminution de l'expression des porines limite l'entrée de certaines bêta-lactamines dans l'espace périplasmique et donc l'accès à la membrane interne où sont situées les PLP. Cette diminution de la perméabilité contribue au développement de résistance aux bêta-lactamines, d'autant plus si elle est associée à d'autres mécanismes de résistance comme la production des enzymes, (β -lactamases responsables à la résistance aux β -lactamines). (Batraud *et al.*, 2017). De nombreuses carbapénémases ont été décrites chez *P. aeruginosa*, de type KPC, GES et métallo-bêta-

lactamases. Ces enzymes sont présentes dans des souches multirésistantes, nosocomiales et épidémiques (Nordman *et al.*, 2010).

Face à l'émergence de nouvelles résistances aux antibiotiques chez BGN, au niveau des unités de soins l'évaluation de la sensibilité vis à vis de ces antibiotiques est devenue indispensable.

La résistance au carbapénème qui est une classe de bêta-lactamines peut être due à l'utilisation injustifiée et massive de ce dernier, ce qui pose un problème majeur pour la santé humaine, car il est considéré comme un antibiotique de dernier recours.

Alors il est indispensable de caractériser les bactéries présentes dans les établissements de soins, et être conscient de ses mécanismes de résistance, ainsi tester leur comportement vis-à-vis des autres antibiotiques afin de trouver une solution thérapeutique à ce problème de santé publique (Elimai, 2013).

CONCLUSION

Pseudomonas aeruginosa est l'un des plus fréquents pathogènes associés à des infections nosocomiales, elle peut donner lieu à divers types d'infections: infections pulmonaires, infections uro-génitales, infections ostéo-articulaires, infections oculaires, infections ORL, infections méningées, infections cutanées et septicémies. Les bêta-lactamines sont la principale famille d'antibiotiques pour traiter une infection grave causée par ce pathogène cependant la production de bêta-lactamases comme les carbapénémases, a été signalée intensivement parmi les isolats cliniques de *Pseudomonas aeruginosa*.

Notre étude montre que l'environnement hospitalier dans la région de Tiaret est fréquemment contaminé par les BGN en particulier *Pseudomonas aeruginosa*, qui a toujours été considéré comme un agent pathogène difficile à traiter en raison de sa résistance aux antibiotiques, il n'est sensible naturellement qu'à un nombre restreint d'antibiotique. *Pseudomonas aeruginosa* possède une résistance naturelle à un grand nombre d'antibiotiques en raison de la production d'une β -lactamase chromosomique inductible de classe C. Cette enzyme n'est pas inhibée par le canulante. Cette résistance naturelle est due aussi à une mauvaise perméabilité membranaire. Il est donc naturellement résistant aux pénicillines des groupes V, G, M, et A, à la plus part des céphalosporines de troisième génération et aux quinolones de première génération. Face à cette situation inquiétante, représentée par l'augmentation de la résistance aux antibiotiques, la problématique essentielle reste de trouver les solutions à proposer pour lutter contre la diffusion de la résistance aux antibiotiques.

References bibliographiques**-A-**

Antibiogram Committee of the French Society for Microbiology/European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing.CA-SFM/ Eucast. 2017- Version 1.0. Available from: http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM_EUCAST_V1_2017.pdf.

Allegranzi, B. Bagheri , NS. Combescure, C. et al. (2011).Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. Lancet,n°377:228-41.

-B-

Bakour, S. Touati, A. Bachiri, T. Sahli, F. Tiouit, D. Naim, M. et al. (2014).First report of 16S rRNAmethylaseArmA-producing Acinetobacter baumannii and rapid spread of metallo-b-lactamase NDM-1 in Algerian hospitals.J Infect Chemother,n°20:696–701.

Battraud, P. (2017).La résistance aux antibiotiques, un mythe ou une réalité ?,Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie , université de Lille 2 ,Lille.

Bertrand ,X. Blasco ,G. Belle, E. et al. (2003). [Pseudomonas aeruginosa epidemiology in intensive care units: importance of cross-transmission]. Ann FrAnesth Reanim,n°22: 505-9.

Boivin,S. ICS-PCI, Caux,C. Ph.D., Soucy,C. ICS-PCI, et Allard,A. M.D., M.Sc., FRCPC. (2016). Les entérobactéries productrices de carbapénémases. Prévention des infections s'unir pour prévenir, vol13.n °5,53-55

Boukhatem, L. (2013) .Etude de la sensibilité aux antibiotiques des bacilles à Gram négatif non fermentants isolés au niveau du service de réanimation du CHU de Tlemcen.Mémoire, Université

Bourafa,N. Chaalal,W. Bakour,S. Lalaoui,R. Boutefnouchet,N. M Diene,S. Rolain,J.M. (2018) Molecular characterization of carbapenemresistant Gram-negative bacilli clinical isolates in Algeria, Infection and Drug Resistance 2018:11 ,735–742.

-C-

Chekroud, R et Fathi, R. (2017). Étude du profil bactériologique et de la sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries responsables des infections urinaires. Mémoire, Université des Frères Mentouri Constantine.Constantine.

Codjoe, F. et Donkor, (2018)E.Carbapenem Resistance: A Review Med. Sci., n°6, v:1,1-28. Communiqué du CA-SFM, 2017.

-D-

Dali Ali(2015).Infections nosocomiales a bactéries multi-résistantes (BMR) en réanimation adulte a l'EHO Profils épidémiologique facteurs de risque et facteurs pronostiques. Thèse de doctorat, université d'Oran1Ahmed BENBELLA, Oran.

Debabza, M. (2015).Emergence en milieu hospitalier des bacilles Gram négatif smultirésistants aux antibiotiques : étude bactériologique et moléculaire.These de doctorat, Université Badji Mokhtar-Annaba, Annaba.

Deghrar,A et Ghalem, K. (2016). Etude de la résistance d' Acinetobacter baumannii aux antibiotiques. Mémoire, université Hassiba BEN BOUALI Chlef, Chlef.

-E-

Elaiboud,N.(2013) . Prévalence des souches d' Acinitobacter baumanii et Pseudomonace aeruginosa résistantes a l'imipénème isolées au C.H.U Ibn Sina de RABAT.Mémoire, Mohamed V-Souissi Rabat.

Elmahi,F. (2013).Profil épidémiologique des entérobactéries productrices de carbapénémases diagnostiquées au laboratoire de microbiologie du CHU de RABAT. Thèse de Doctorat en Pharmacie,université Mohamed V-Souissi ,Rabat .

-F-

Ferry, T., Richard, J.C. (2013). Traitement systémique des infections à bacilles Gram négatif producteurs de carbapénémases. La Lettre de l'Infectiologue • Tome XXVIII, no4 ,142-149.

-G-

German, GJ., Gilmour, M., Tipples, G., Adam, HJ., Almohri, H., Bullard, J., Dingle, T. Farrell, D. Girouard, G. Haldane, D. Hoang, L. Levett, PN.Melano, R. Minion, R.Needle, SN. Patel, R. Rennie, R. Reyes, RC. Longtin, J. Mulvey, MR.(2018). Énoncé canadien définissant la multi-résistance et l'ultra-résistancechez les souches d'entérobactéries, d'*Acinetobacter* spp et de *Pseudomonas aeruginosa* pour les laboratoires médicaux. DÉCLARATION DU COMITÉ CONSULTATIF, Le 4 janvier 2018 • Volume 44-1.

Grosjean,J.,Clavè , D., Archambaud , M.,Pasquier , C. (2011) . Bactériologie et virologie pratique .2ème édition.

-H-

Hammami S, Gautier V, Ghozzi R, et al. (2010). Diversity in VIM-2-encoding class 1 integrons and occasional blaSHV2a carriage in isolates of a persistent, multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone from Tunis. Clin Microbiol Infect,n°16, 189-93.

-L-

Lagha, N.(2015).Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) isolées de l'hôpital de Laghouat. Thèse de doctorat, Université Abou BekrBelkaïd Tlemcen, Tlemcen.

-M-

Marchal, N. et Bourdon, JL. (1973). Milieux de culture et identification biochimique des bactéries. DOIN. Paris. 99-105.

Meskine, A. Benabdelkader,L, L. (2016).Etude de la résistance et la multirésistance aux antibiotique de souches isolées du milieu hospitalier.Mémoire, Université des Frères Mentouri Constantine, Constantine.

Miloudi, S.et Khelifa, S. (2017). Caractérisation de la résistance aux carbapénèmes des souches de bacilles à Gram négatif isolées des résidences universitaires Targa Ouzemour et Ireyahen.Mémoire, Université A. MIRA – Bejaia, Bejaia.

-N-

Norman, P(2010).Résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif,n° 11, vol. 26,950-959.

-R-

RAHAL KBRT-MHBMMFKBAAA, (2012).Réseau Algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques.

-S-

Savado,M., M., Boubkeir,Y, Y, Y.(2016). Isolement et Etude de quelques Entérobactéries pathogènes dans les eaux usées d'Oued Boumerzoug à Constantine.Mémoire, Université des Frères Mentouri Constantine, Constantine.

Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P.E., Rolain, Jean M., Raoult, D., 2009.Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria byMatrix-Assisted

LaserDesorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clinical Infectious Diseases* 49, 543-551.

-T-

Toval,F.,Guzman-

Marte,A.,Madriz,V.,Somogyi,T.Rodri'guezL,C.,etGarcí'al,F.(2015).Predominance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying blaIMP and blaVIM metallo-b-lactamases in a major hospital in Costa Rica, *Journal of Medical Microbiology*, 64, 37–43.

-Z-

Zenati, K., Sahli, F. Garcia, V. Bakour, S. Belhadi,D, D. Rolain, J.M. Touati, A. (2017). Occurrence and clonal diversity of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* recovered from inanimate surfaces in Algerian hospital environment: First report of *armA*, *nab* and *aac (60)-Ib-cr* genes, K. Zenati et al. / *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 10 (2017) 148–153.

Coloration de Gram

- Préparer un frottis fixé : déposer une goutte d'eau stérile sur une lame puis ajouter à l'anse de platine stérilisée une colonie isolée. Etaler et fixer à la flamme jusqu'à obtenir une lame sèche.
- Recouvrir la lame de violet de gentiane et laisser agir pendant 1minute. Rejeter le colorant et rincer à l'eau distillée.
- Mordançage au Lugo : recouvrir la lame de Lugo et laisser agir pendant 1minute. Rincer à l'eau distillée.
- Décoloration : recouvrir la lame d'éthanol et laisser agir 30 secondes. Rincer rapidement à l'eau distillée.
- Recoloration : recouvrir la lame de safranine et laisser agir pendant 1minute. Rejeter le colorant et rincer légèrement à l'eau distillée. Sécher délicatement la lame avec du papier.
- Observation au microscope. Ajouter une goutte d'huile à immersion sur la lame pour l'observation à l'objectif 100.

Gélose Mac Conkey

➤ Composition

- Peptone de caséine 7g
- Peptone de viande 3g
- Lactose 10g
- Mélange de sels biliaries 1.5g
- Chlorure de sodium 5.0
- Rouge neutre 0.03g
- Cristal violet 0.001g
- Agar agar 13.5g

Gélose Mueller-Hinton

➤ Composition

- Infusion de viande de boeuf 300g
- Hydrolysate de caséine 17.5g
- Amidon 1.5g
- Gélose 17g