

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun-Tiaret

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie (D04)

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

BENCHERIF Rabia Amel

BENSIDI AISSA Fatima

Thème

**Prévalence des bacilles Gram négatifs multirésistants
isolés des infections utérines chez la femme**

Soutenu publiquement le 26/06/2019

Jury:

Présidente: Mme MIHOUB F.

Encadreur: Mme CHAALAL W.

Examinatrice: Mlle ABDI F.

Grade

MCA

MCB

Année universitaire 2018-2019

Remerciements

Nous tenons d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail. Nos remerciements s'adressent également :

A madame CHAALAL W. d'avoir accepté de nous encadrer et de nous avoir permis de partager son savoir durant ces mois. On ne vous remerciera jamais assez pour tout ce que vous nous avez apporté. Votre disponibilité et votre implication dans ce travail étaient très rassurantes. On est très honorées d'avoir pu travailler avec vous. On en gardera un très bon souvenir.

A madame MIHOUB F. C'est un grand honneur de vous trouver parmi nos jury. Nous vous remercions pour l'amabilité avec laquelle vous avez accepté de siéger à la présidence de notre jury.

A madame ABDI F. Nous sommes particulièrement reconnaissants pour l'honneur que vous nous faites en acceptant d'examiner ce travail.

A monsieur HOCINE L. responsable de la spécialité.

Au personnel du Laboratoire de Microbiologie de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie pour leur disponibilité et leur compréhension.

A nos amies et camarades merci pour tous les bons moments passés à vos côtés. Nous espérons qu'ils seront encore nombreux, nous les remercions pour le sourire qu'elles ont su toujours dessiner sur nos visage.

Enfin, nos remerciements s'adressent à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail ou qui nous ont encouragé et soutenu à tout moment en particulier Elyes et Rostom.

Dédicace

A la mémoire de mon oncle Nourredine

Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde

A mes très chers parents

Vous avez été pour moi au long de mes études le plus grand symbole d'amour, de dévouement qui n'ont ni cessé ni diminué. Votre bonté et votre générosité sont sans limite. Vos prières m'ont été d'un grand soutien au cours de ce long parcours. J'espère de tout mon cœur qu'en ce jour vous soyez fière de moi, et que je réalise l'un de vos rêves. J'espère être la fille que vous aviez voulu que je sois, et je m'efforcerai d'être digne de ce que vous auriez souhaité que je sois. Puisse Dieu vous procurer bonheur, santé, longue vie et vous garder à mes côtés le plus longtemps possible.

A mes très chères amies

Fatima, Manel, Yasmine, Djihen, Nesrine, Rania, Wafaa et Nabila

Je ne vous remercierai jamais assez pour les souvenirs et les bons moments que vous m'aviez offerts, je vous souhaite beaucoup de succès, de réussite et surtout du bonheur.

Amel

Dédicaces

A mes très chers parents

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation.

A mon très cher mari Bakir

Tes sacrifices, ton soutien moral et matériel, ta gentillesse sans égal, ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études.

A mes frères Yacine et Elyes et ma sœur Yasmine

Et à toute personne ayant contribué à la réussite de ce travail

Falima

المخلص

إنتشار عصيات سلبية مقاومة للمضادات الحيوية معزولة من الالتهابات الرحمية بمنطقة تيارت

السياق : تعد مقاومة المضادات الحيوية عند الميكروبات سلبية الغرام المسؤولة عن العديد من الإصابات المستشعرة و حتى المكتسبة في المجتمع تهديدا عالميا حيث تجاوز تطور المقاومة الأبحاث و الدراسات لإيجاد جزيئات جديدة مضادة للجراثيم مما أدى إلى حدوث عوائق علاجية.

الهدف : تشخيص المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية عند العصيات سالبة الغرام المعزولة من الالتهابات الرحمية لدى النساء بتيارت.

الطريقة : تم جمع 50 عينة من العينات المهبلية من نساء بمتوسط عمر 5، 39 سنة على مستوى عيادة مجاهد صادق. تم العزل البكتيري على الوسط ماك كونكي مضاف إليه اما المضاد الحيوي ارتابينيم أو الكوليسيتين ثم تحديد البكتيريا الموجودة من خلال الاختبارات الكيميوحيوية ، API 20NE و MALDI-TOF ثم تعريض السلالات المعزولة إلى مضادات حيوية وفقا لتوصيات (CASFM).

النتيجة: أظهرت الدراسة هيمنة البكتيريا المعوية (11/50) مقارنة مع بكتيريا بسودوموناس ابروجينوزا (2/50). أتاحت نتائج قابلية المضادات الحيوية تحديد المقاومة المتعددة ضد العقاقير التي وجد أنه كلها قد اكتسبت عدة مقاومات حيوية ، التي وجد أنه كلها قد اكتسبت عدة مقاومات حيوية منها سلالة واحدة (1/13) اظهرت إنتاج الكاربابينيماز من نوع (KPC) و(1/13) اظهرت انتاج الانزيم السابق من النوع (OXA-48). و أخيرا (4/13) فهم مقاومين للكوليسيتين وتم عزل مقاومة أخرى غير متوقعة عند البروتي ضد التيجيسكلين.

الخاتمة : تشير هذه الدراسة إلى أول تحديد لمقاومة المضاد الحيوي الكوليسيتين في الجزائر فيما يتعلق بالالتهابات الرحمية.

الكلمات الرئيسية : عصيات، سالبة الغرام، المقاومة المتعددة، الالتهابات المجتمعية ، الكاربانيم ، الكوليسيتين.

Résumé

Prévalence des bacilles gram négatifs isolés des infections utérines dans la région de Tiaret.

Contexte : L'antibiorésistance des bacilles à Gram négatif responsables de plusieurs infections nosocomiales et même communautaires est une menace mondiale alarmante où l'évolution de la résistance a dépassé la recherche et le développement de nouvelles molécules antibactériennes et cela a conduit à des impasses thérapeutiques.

Objectif : Caractérisation de la multirésistance aux antibiotiques dans les bacilles à Gram négatif isolés des infections utérines chez une population de femmes dans la région de Tiaret.

Méthodes : 50 échantillons de prélèvements vaginaux sont collectés chez des femmes d'une moyenne d'âge de 39,5 ans au niveau de la polyclinique Moudjahid Sadek à Tiaret. L'isolement est effectué sur milieu Mac Conkey additionné d'Ertapénème ou de Colistine. L'identification des souches est réalisée par des tests biochimiques, par la galerie API 20NE et par MALDI-TOF. Les souches isolées sont soumises à un antibiogramme standard selon les recommandations du (CASFM).

Résultat : L'étude a montré que la famille des *Enterobacteriaceae* est la plus dominante dans les échantillons analysés (11/50) par rapport à *Pseudomonas aeruginosa* (2/50). Toutes les souches isolées se sont révélées toutes multirésistantes avec production de BLSE, production de carbapénémase de type (KPC) et de type (OXA-48), cependant 11 souches étaient résistantes à la colistine, comme on a marqué une sensibilité à l'Imipénème et une autre inattendue par rapport à la Tygécycline chez les *Proteae*.

Conclusion : Cette étude rapporte la première détection de résistance à la Colistine en Algérie en ce qui concerne les infections utérines communautaires.

Mots clés : bacilles, Gram négatif, multirésistance, infections communautaires. Carbapénème, Colistine.

Abstract

Prevalence of gram-negative bacilli isolated from uterine infections in the Tiaret region.

Context : The antimicrobial resistance of Gram-negative bacilli responsible for several nosocomial and even community-acquired infections is an alarming global threat where the evolution of the resistant has exceeded the research and development of new antibacterial molecules and this has led to therapeutic impasses.

Objective : Characterization of multidrug resistance in Gram-negative bacilli isolated from uterine infections in women in the Tiaret region.

Methods : 50 samples of vaginal samples were collected from women with an average age of 39.5 years at the polyclinic Mujahid Sadek in Tiaret. Isolation is carried out on Mac Conkey medium supplemented with Ertapenem or colistin. Strains are identified by biochemical tests, API 20NE and MALDI-TOF. The isolated strains are submitted to a standard antibiogram according to the recommendations of the (CASFM).

Result : The study showed that the family Enterobacteriaceae is the most dominant in the samples analyzed (11/50) compared to *Pseudomonas aeruginosa* (2/50). All isolated strains were all multiresistant with ESBL production, (KPC) and (OXA-48) type carbapenemase production, however, 11 strains were resistant to colistin, all strains were sensitive to Imipenem including *Proteaeae* that were unexpectedly sensitive to Tygecycline.

Conclusion : This study reports the first detection of colistin resistance in Algeria with regard to community uterine infections.

Key words : Gram negative, bacilli, multidrug resistance, community infections. Carbapenem, Colistine.

Liste abréviation

ADH : arginine dihydrolase

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AF : Acide fusidique

AMC : Amoxicilline + Acide clavulanique

Api 20NE : Analytical Profile Index 20 NON-Enterobacteriaceae

ATB : antibiotique

AX : Amixycine

BGN : bacille Gram négatif

BGN-MR : bacille Gram négatif multirésistant.

BGN-nf : bacille Gram négatif non fermentaire

BLSE : β -lactamase à spectre élargie

BMR : bactérie multirésistante.

BN : bouillon nutritif

C3G : Céphalosporine de troisième génération

CASFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de la Microbiologie

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIT : citrate.

CT : Colistine

CTX : Céfotaxime

E : Erythromycine

EPH : Etablissement Hospitalier Publique

GEL : gélatine.

IPM : Imipenème

K : Kanamycine

KPC : *klebsiella pneumonia* carbapénèmase

LDC : lysine décarboxylase.

MALDI-TOF : Matrix Assisted Lazer Desorption ionization - Time Of Flight.

MALDI-TOF-MS : Mass Assisted Lazer Desorption Ionization- Time Of Flight
Mass Spectrometry

ODC : ornithine décarboxylase

OMS : Organisation Mondiale de Santé.

ONP : Ortho-Nitro-Phényl.

ONPG : Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside.

P : Pénicilline G / Benzylpénicilline

RM : rouge de méthyle.

Spp : espèce

SXT : Triméthoprime-sulfaméthoxazole

TIC : Ticaracilline

TIG : Tigecycline

TSI : Triple Sugar Iron

URE : urée.

VP : Voges Proskauer

Liste des tableaux

Tableau I : Résultat de l'isolement sélectif des BGN.....	20
Tableau II : Résultats des tests biochimiques.....	24
Tableau III : Profil de sensibilité des souches isolées.....	27

Liste de figure

Figure 01 Ecologie des antibiotiques et de l'antibiorésistance.....	05
Figure02 Mécanismes d'antibiorésistance chez les BGN.....	07
Figure 03 Schéma du protocole expérimental.....	09
Figure 04 Bouillon nutritif.....	10
Figure 05 Ensemencement par épuisement sur 3 cadrans.....	11
Figure 06 Milieu TSI.....	12
Figure 07 Milieu Mannitol mobilité.....	13
Figure 08 Milieu de citrate de Simmons.....	14
Figure 09 Mise en évidence d'ONPG.....	14
Figure 10 Milieu Clark et Lubs.....	15
Figure 11 Milieu de Moeller.....	16
Figure 12 Micro-galerie API 20NE avant incubation.....	17
Figure 13 Technique et principe de dépôt sur la cible de MALDI-TOF.....	18
Figure 14 Distribution des antibiorésistances au sein des souches isolées.....	21
Figure 15 Aspect des BGN non fermentant sur Mac Conkey.....	21
Figure 16 Aspect des BGN fermentant sur Mac Conkey.....	21
Figure 17 Aspect macroscopique particulier sur Mac Conkey.....	22
Figure 18 Aspect microscopique après coloration de gram des BGN.....	22
Figure 19 Aspect microscopique particulier après coloration de Gram.....	23
Figure 20 Mise en évidence des caractères biochimiques par galerie API 20NE.....	23
Figure 21 : Résultats de l'identification des BGN par MALDI-TOF.....	25

Figure 22 Fréquence d'identification des entérobactéries et des BGN-nf.....	25
Figure 23 Répartition des souches identifiées par genre et espèce.....	26
Figure24 Profile de résistance d'une souche multirésistante (<i>K. pneumoniae</i>) série 1	27
Figure 25 Profile de résistance d'une souche multirésistante (<i>K. pneumoniae</i>) série 2.....	27
Figure 26 Fréquence de résistance des souches de BGN aux différents antibiotiques.....	28
Figure 27 Sensibilité des entérobactéries isolées aux antibiotiques testés.....	28
Figure 28 Sensibilité des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolées aux antibiotiques...	31

Liste des annexes

Annexe 1 : Composition des milieux de culture

Annexe 2 : Antibiotiques testés

Annexe 3 : Diamètres des zones d'inhibition chez les souches isolées

Sommaire

Résumé	
Liste des tableaux	I
Liste des figures.....	II
Liste des abréviations.....	III
Introduction.....	1
Chapitre I Synthèse bibliographique	
I. Les bacilles Gram négatifs	3
1.1 Les entérobactéries	3
I.2 Les bacilles Gram négatifs non fermentant.....	4
I.2.1- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
I.2.2. <i>Acinetobacter baumannii</i>	4
II. L'antibiorésistance	4
II.1. Les types de résistance	4
II.1.1 Résistance naturelle	4
II.1.2. Résistance acquise	5
II.2. Antibiorésistance chez les bacilles Gram négatif.....	5
II.2.1 Les résistances des BGN.....	5
II.2.2. Les mécanismes de résistance chez les BGN	5
Chapitre II Matériels et méthodes	
II. Matériels et méthodes.....	8
1- Rappel sur les objectifs.....	8
2- Durée et lieu de stage.....	8
3- Données descriptives.....	8
4- Milieux et réactifs utilisés.....	8
5- Protocole expérimental.....	9
6- Méthodologie	10
6.1. Prélèvements vaginaux.....	10
6.2. Enrichissement.....	10
6.3. Isolement sélectif et purification	11
6.4. Identification des souches	11

6.4.1. Caractérisation macroscopique	11
6.4.2. Caractérisation physiologique et cellulaire.....	11
6.4.3. Identification biochimique	11
6.4.4. Galerie API 20NE.....	16
6.4.5 Identification par la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF-MS	17
7- Antibiogramme	18
Chapitre III Résultats et discussion	
III. Résultats et discussion	20
1- Prélèvements	20
1.1- Culture des prélèvements	20
1.2- Taux d'isolement de bacille Gram négatifs à partir de culture positive.....	20
1.3- Répartition et fréquence des antibiorésistances au sein des isolats	20
1.4- Identification des BGN.....	21
1.4.1- Aspect macroscopique des isolats.....	22
1.4.2- Aspect microscopique des isolats.....	23
1.4.3- Résultats de la galerie API 20NE.....	23
1.4.4- Résultats de l'identification par MALDI-TOF.....	25
1.5- Etude de la résistance des souches isolées aux antibiotiques	26
1.5.1 Sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques	28
1.5.2- Phénotypes de résistance observés chez les entérobacteries	30
1.5.3- Antibiorésistance chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
1.5.4- Phénotype de résistance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
II. Discussion générale.....	33
Conclusion.....	36
Références bibliographiques	38
Annexes.....	42

Introduction

Introduction

Introduction

Auparavant, les maladies d'origine bactérienne étaient considérées comme étant la première cause de mortalité dans le monde, ce phénomène a régressé suite à l'apparition des antibiotiques. Depuis, ils sont de plus en plus utilisés pour lutter contre les maladies d'origine bactérienne notamment durant la deuxième guerre mondiale, par la suite plusieurs antibiotiques furent découverts et purifiés. Leur utilisation devient excessive notamment en médecine humaine et vétérinaire et même en élevage industriel comme des promoteurs de croissance. Le monde bactérien s'est adapté aux antibiotiques, et des espèces résistantes apparaissent et émergent grâce aux gènes de résistance présent dans l'environnement et le résultat le plus effrayant est l'apparition de souches multi-résistantes pour la première fois au Japon en 1950 (Guillot, 1989).

Cette résistance a connu une augmentation importante en particulier chez les bacilles à Gram négatif, les défis majeurs de cette dernière ont été rencontrés principalement chez différentes espèces d'entérobactéries, d'*Acinetobacter* et chez *Pseudomonas aeruginosa*, qui sont responsables d'infections nosocomiales sévères et conduisent à des impasses thérapeutiques graves, d'autant plus elles sont responsable d'infections communautaires urogénitales, pulmonaires, et de septicémies dont le contrôle et la thérapie s'avère particulièrement difficile et coûteux. Les infections causées par les BGN sont plus difficile à traiter puisqu'ils sont intrinsèquement résistants à plusieurs antibiotiques et par conséquent elles ont des options thérapeutiques limitées et des taux de mortalité élevés. Cette résistance intrinsèque est due à leur double membrane protectrice et à leurs systèmes d'efflux qui leurs permettent de prévenir l'antibiotique d'atteindre sa concentration cellulaire optimale. De plus les BGN sont connus pour être résistant aux Beta-lactamines, aux aminoglycosides, aux quinolones et à la colistine avec différents mécanismes, Cette accumulation de mécanismes de résistance est devenue problématique car elle conduit, à l'extrême, à une impasse thérapeutique en raison de l'émergence de souches dites totorésistantes vis-à-vis du panel d'antibiotiques actuellement disponibles sur le marché (Ruppé et *al.*, 2015).

La situation est très inquiétante pour les BGN multi-résistant, l'OMS les a classés de priorité critique dans son rapport de priorisation des pathogènes pour guider la recherche, la découverte et le développement de nouveaux antibiotiques, ils constituent le problème majeur de santé publique dans le monde (Tacconelli et *al.*, 2018). En regard de cette évolution, la littérature sur la maîtrise de ces résistances est pauvre, particulièrement dans les infections

Introduction

communautaires et notamment en Algérie. D'avantages d'études doivent être effectuées pour établir un état des lieux sur l'épidémiologie, jeter une lumière crue sur les mécanismes de résistance et viser ainsi la recherche de nouvelles molécules antibactériennes, et pour améliorer les politiques d'antibiothérapies afin de faire face à ce problème et de contrôler la dissémination de ces antibiorésistance.

Dans ce contexte notre étude s'inscrit dans le cadre d'un projet de fin d'étude piloté par le laboratoire de Microbiologie, et qui vise à déterminer la prévalence des bacilles à Gram négatif multi résistant chez la femme dans la région de Tiaret, ayant pour finalités :

-Isolement et purification des bacilles gram négatif multi-résistants à partir des prélèvements vaginaux.

-Identification des isolats par MALDI-TOF.

-Détermination de leurs profils de sensibilité vis-à-vis certaines familles d'antibiotiques

- Mise en évidence du caractère multirésistant des souches selon leurs profils de résistance.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

I. Les bacilles à Gram négatif

L'émergence des bactéries multirésistantes aux antibiotiques est l'un des problèmes de santé publique les plus inquiétants dans le monde médical, selon l'OMS 700000 personnes sont mortes chaque année à cause de cette antibiorésistance, ce chiffre devrait atteindre les 10 millions en 2050. Ce problème est notamment observé chez les bacilles à Gram négatif, en particulier les entérobactéries et les espèces *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* (Nordmann et Poirel, 2014).

Les infections aux bacilles à Gram négatif multirésistants deviennent de plus en plus fréquentes aussi bien en milieu hospitalier qu'en milieu communautaire, avec des taux de morbidité et de mortalité importants (Cattoir, 2013).

Parmi les bacilles à Gram négatif 2 grands groupes représentent la quasi-totalité des isolats cliniques, il s'agit des entérobactéries et des bacilles non-fermentant (Oliveira et Reygaert, 2019).

1.1 Les entérobactéries

Les entérobactéries sont des hôtes normaux ou pathologiques, suivant les espèces microbiennes, du tube digestif de l'homme et des animaux, elles sont largement dispersées dans la nature et peuvent être à l'origine de plusieurs infections urinaires, infections intra-abdominales, bactériémies et de pneumonies (Boivin et al., 2016).

Certaines espèces d'entérobactéries sont à la source d'infections typiquement nosocomiales (*K. pneumoniae*), alors que d'autres sont responsables d'infections nosocomiales et communautaires (*E. coli*). Ce différentiel nosocomial/communautaire revêt une importance particulière car le contrôle des épidémies de souches multirésistantes communautaires est beaucoup plus difficile que leur contrôle en milieu hospitalier. Le problème de la résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries est dominé actuellement par celui de la résistance aux Carbapénèmes (Dortet et Poirel, 2013).

Ce sont des bacilles, non sporulés, à mobilité variable, aéro-anaérobie facultatifs, fermentant le glucose, ne possédant pas une cytochrome oxydase et réduisant les nitrates en nitrite. Ce groupe hétérogène de bactéries est composé de 12 genres bactériens qui représentent

80% des isolats cliniques des bacilles gram négatif responsables de maladies, parmi ces genres on cite *Escherichia*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Yersinia*, *Shigella* et *Salmonella* (Paterson, 2006 ; Oliveira et Reygaert, 2019).

I.2 Les bacilles à Gram négatif non fermentant

Les bacilles à Gram négatifs non fermentaires sont des bactéries aérobies strictes caractérisées par un métabolisme oxydatif ne faisant pas intervenir la fermentation, présentes partout dans l'environnement. Ce sont des opportunistes responsables de plusieurs infections nosocomiales, notamment *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* qui sont responsable de 80% des infections aux bacilles gram négatifs non fermentant (Sade et Jones, 2005). Ils sont naturellement résistants à plusieurs antibiotiques et ils constituent la première cause d'infections nosocomiales dans les Etats Unies (Lupo *et al.*, 2018).

I.2.1- *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie non fermentaire, aérobic stricte, sous forme de bâtonnet, produisant un ou plusieurs pigments notamment les pyocyanines, les pyoverdines et pyorubines. Elle a une apparence nacré, elle pousse bien entre 25 et 37 ° et sa capacité de croissance à 42 ° C permet de le distinguer de nombreuses autres espèces de *Pseudomonas* (Wu *et al.*, 2015).

C'est un pathogène opportuniste avec plusieurs résistances intrinsèques. Il peut être responsable d'infections sévères telles que les bactériémies, les pneumonies, les infections urinaires et les infections de la peau, notamment chez les personnes fragiles comme les immunodéprimés et les hospitalisés, c'est un pathogène nosocomial majeur. Ce bacille à Gram négatif est responsable de 10 % à 15 % de l'ensemble des infections nosocomiales avec des taux de mortalité élevés. La sélection de la bonne stratégie thérapeutique réduit ces taux élevés, par contre une mauvaise stratégie mène au développement de la résistance (Pragasam *et al.*, 2018).

I.2.2. *Acinetobacter baumannii*

L'espèce *Acinetobacter baumannii* est hautement résistante, d'ailleurs elle est classée de priorité critique par l'OMS dans le rapport de priorisation des pathogène pour la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques (Tacconelli *et al.*, 2018). Parmi les infections causées par les *Acinetobacter spp*, *A. baumannii* est la plus prévalente, responsable de 95 % des

infections et la plus létale avec un taux de mortalité de 50 %, mais ces dernières sont rares et ne sont retrouvées qu'en réanimation où elles ne représentaient que 2 % des micro-organismes responsables d'infections nosocomiales dans l'enquête nationale de prévalence en France en 2006 (Lucet et Birgand, 2011).

A. baumannii est typiquement saprophyte et ubiquiste, elle peut être trouvée dans l'eau, le sol et également dans la flore cutanée de l'homme, elle est capable de tolérer une large gamme de températures, de croître sur les surfaces abiotiques et de résister à la dessiccation pendant des semaines notamment dans l'environnement hospitalier et dans les unités de réanimation constituant ainsi un réservoir de transmission à d'autres patients (Lucet et Birgand, 2011).

II. L'antibiorésistance

La résistance aux antibiotiques correspond à la capacité d'un genre microbien ou d'une souche de résister à une concentration de l'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des souches de la même espèce. La résistance aux antibiotiques est un phénomène naturel, mais elle est accélérée par l'antibiothérapie inadaptée et irrationnelle (Guillot, 1989).

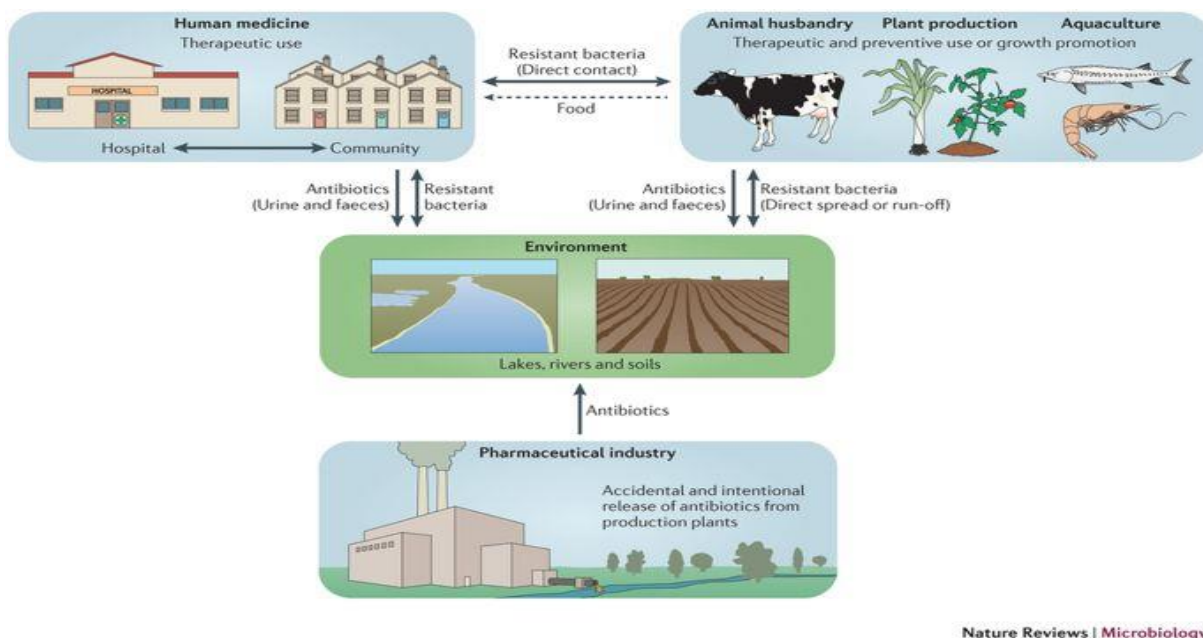


Figure 01 : Ecologie des antibiotiques et de l'antibiorésistance (Caspar, 2019).

Le mésusage/ surutilisation des antibiotiques sélectionnent les résistances et conduisent à leur passage de souches environnementales aux souches cliniques (Anderson et Hughes, 2014).

II.1. Les types de résistance

On peut avoir 2 types de résistance

II.1.1 Résistance naturelle

Résistance de toutes les souches d'une même espèce bactérienne à un antibiotique. Elle est aussi appelée résistance intrinsèque. Elle peut avoir plusieurs mécanismes mais elle est souvent chromosomique.

II.1.2. Résistance acquise

Elle correspond à l'acquisition de la résistance à un antibiotique par une souche bactérienne sensible, elle peut être chromosomique (20%) ou extra-chromosomique par acquisition de gènes (80%) (Anderson et Hughes, 2014).

II.2. Antibiorésistance chez les bacilles à Gram négatif

Les bacilles à Gram négatifs multirésistants sont des bactéries résistantes à la plupart des antibiotiques utilisables en clinique. Ces bactéries sont dites multirésistantes (BMR) aux antibiotiques lorsque, du fait de l'accumulation des résistances naturelles et/ou acquises à plusieurs familles d'antibiotique (au moins 3 familles), elles ne sont alors plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques utilisables en thérapeutique (Nordmann et Poirel, 2014).

II.2.1 Les résistances des BGN

Les souches les plus multirésistantes chez les bacilles gram négatif sont les entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter spp* responsables de multiples infections nosocomiales et communautaires, elles deviennent de plus en plus résistantes aux carbapénèmes : des antibiotiques de dernier recours. Cette résistance est dominée actuellement par la production de carbapénémases. On peut citer d'autres résistances, entre autre la résistance aux β -lactamines par inactivation enzymatique : production de β -lactamases telles que les pénicillinase, les céphalosporinases et les β -lactamases à spectre élargi BLSE, la résistance aux aminosides est assurée par différents mécanismes incluant les enzymes-modifiant les aminosides, la diminution de la perméabilité membranaire, l'altération structurale de la cible ribosomale et l'expulsion de l'antibiotique par le système d'efflux et enfin la résistance aux quinolones via des plasmides (plasmid-mediated quinolones resistance) qui codent pour la modification de la cible (Baba Ahmed et Arlet, 2014 ; Bourafa et al., 2018)

Récemment, en raison de l'émergence de ces résistances, la colistine (polymyxine E) qui est néphrotoxique est de plus en plus utilisée en tant que dernière option thérapeutique. *Pseudomonas aeruginosa* qui est hautement multirésistante devient résistante à la colistine ce qui fait craindre la panrésistance dans un avenir proche (Barbier et Wolff, 2010).

II.2.2. Les mécanismes de résistance chez les BGN

La structure de la paroi bactérienne des BGN qui est composée de 2 couches de lipopolysaccharide leur confère à une imperméabilité et donc une résistance intrinsèque aux β -lactamines hydrophobes et aux antibiotiques de haut poids moléculaire.

4 principaux mécanismes d'antibiorésistance sont impliqués chez les bacilles gram négatifs. Ceux-ci sont illustrés dans le schéma suivant.

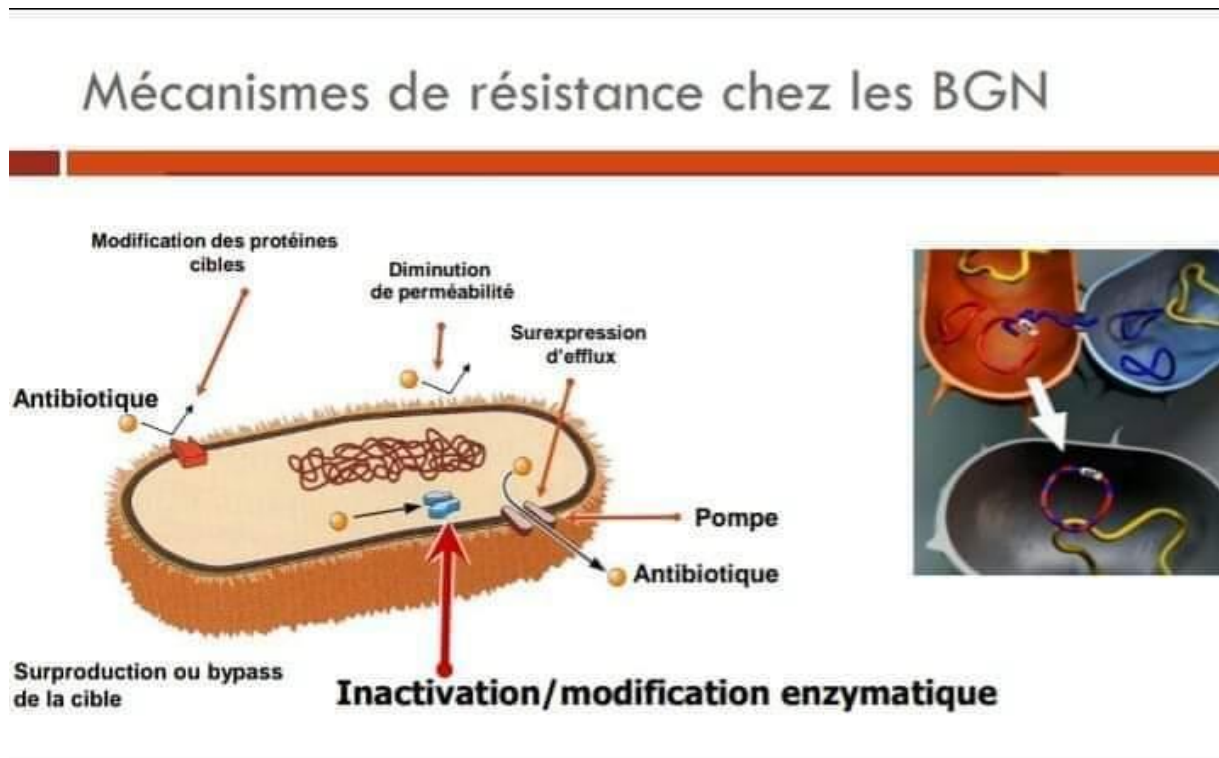


Figure 02 : Mécanismes d'antibiorésistance chez les BGN (Caspar, 2019).

Chapitre 2

Matériels et méthodes

II. Matériel et méthodes

1- Rappel sur les objectifs

C'est dans le but de rapporter la prévalence des bacilles gram négatifs multirésistants dans des prélèvements vaginaux de femmes, dans la wilaya de Tiaret que notre étude est entreprise. Pour ce faire on a procédé à l'isolement et à l'identification de ces bacilles puis à la détermination de leurs profils de résistance.

2- Durée et lieu de stage

Notre étude a été réalisée dans la période allant du 10 février au 20 mars 2019 au niveau du laboratoire de Microbiologie au niveau de la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université IBN KHALDOUN Tiaret.

50 échantillons de prélèvement vaginaux collectés dans la période allant du 01 au 18 Février 2019 ont fait l'objet de notre étude. Les échantillons ont été collecté à partir de la polyclinique Moudjahid Sadek à Karman, Tiaret.

3- Données descriptives

Un total de 50 prélèvements a été prélevé pendant 18 jours, d'une moyenne de 2 prélèvements par jour, de femmes âgées de 23 ans à 56 ans souffrant d'infections utérines.

4- Milieux et réactifs utilisés

- Les différents milieux de culture utilisés et leurs compositions sont donnés en annexe I.
- La galerie API 20NE utilisée pour l'identification des souches, provient du laboratoire Bio Mérieux de France.
- Les antibiotiques en poudre utilisés sont l'Ertapénème, la Colistine et le Vancolon. Les concentrations utilisées sont données en annexe II.
- Les antibiotiques en disque utilisés pour l'antibiogramme sont cités dans annexe II ainsi que la charge et la famille de chaque antibiotique

5- Protocole expérimentale

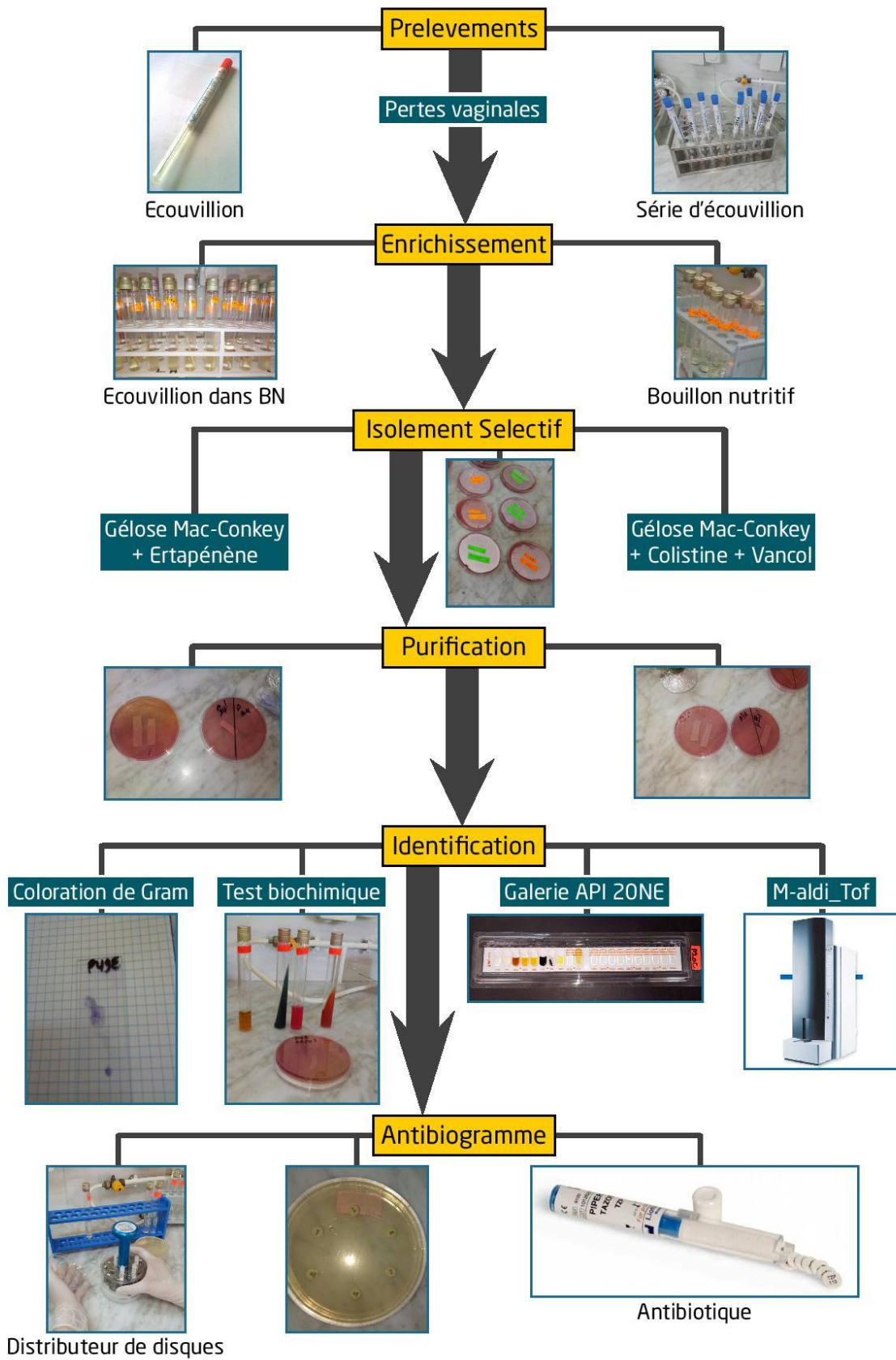


Figure 03 : Schéma du protocole expérimental.

6- Méthodologie

6.1. Prélèvements vaginaux

Après lavage hygiénique des mains et port de gants, les prélèvements sont réalisés par une sage-femme qui procède à nettoyer soigneusement l'exocol avec un antiseptique et le rincer avec de l'eau physiologique stérile, puis écouillonner l'endocol de façon appuyée et prolongée pour ramener des cellules avec la glaire cervicale.

Les prélèvements vaginaux sont par la suite recueillis dans des écouillons stériles, bien fermés puis conservés à 4°C dans une glacière ou ils seront acheminés au laboratoire.

6.2. Enrichissement

Chaque échantillon est introduit dans 5 ml de bouillon nutritif permettant après incubation à 37 °C pendant 24 heures un développement ou autrement dit une multiplication de tous les microorganismes présents (Marchal et Bourdon, 1973).

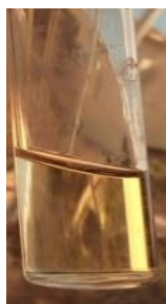


Figure 04 : Bouillon nutritif

6.3. Isolement sélectif et purification

A partir des bouillons d'enrichissement positifs, on ensemence 1ml de la culture bactérienne, sur une gélose sélective de Mac Conkey supplémentée de 0,4µg/ml d'Ertapénème pour la sélection des bacilles à Gram négatif (BGN) résistant aux carbapénèmes et sur une autre gélose de Mac Conkey supplémentée de 2µg/ml de Colistine pour la sélection des BGN résistant à la Colistine. La vancomycine est également additionnée à raison de 5µg/ml à la deuxième gélose à fin d'éliminer les bactéries à Gram positif. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures (Zenati et *al.*, 2016).

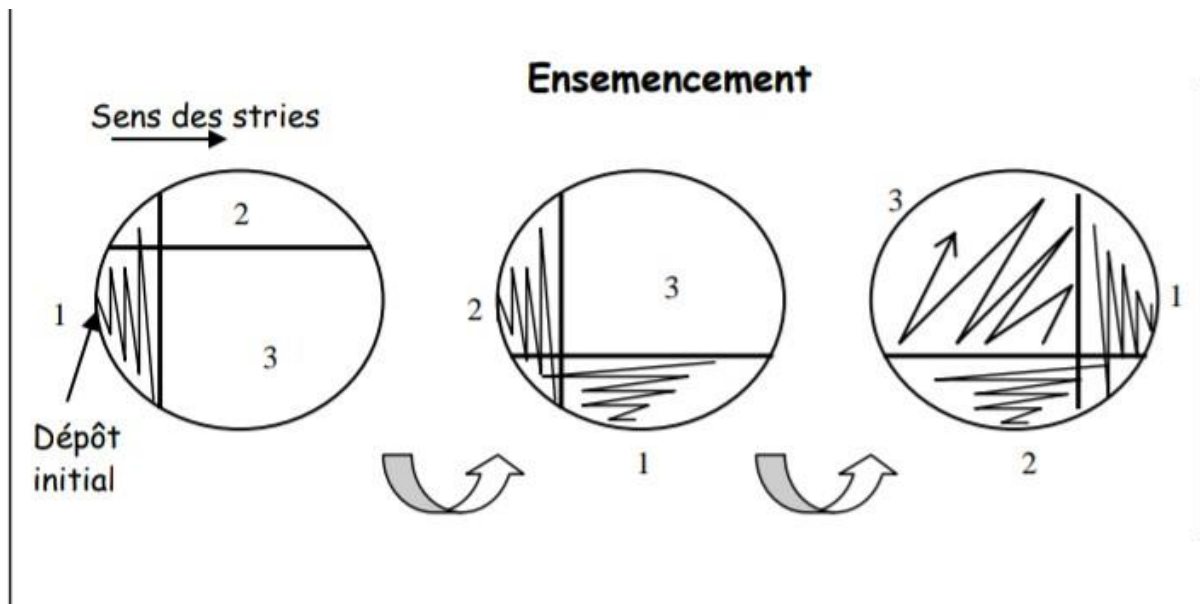


Figure 05 : Ensemencement par épuisement sur 3 quadrants

Les souches isolées ont fait l'objet d'une purification en choisissant des colonies de couleurs et de formes distinctes puis des repiquages successifs sont réalisés sur les mêmes milieux suivant les caractères morphologiques et culturaux visés jusqu'à l'obtention de souches pures (Guezlane-Tebibel et *al.*, 2008).

6.4. Identification des souches

L'identification des souches est basée sur plusieurs techniques.

6.4.1. Caractérisation macroscopique

Suivant les caractères culturaux (taille, couleur, aspect, contour des colonies).

6.4.2. Caractérisation physiologique et cellulaire

La coloration de Gram est réalisée afin de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne et de déterminer la forme et la disposition des bactéries.

6.4.3. Identification biochimique

- **Test catalase**

La catalase est une enzyme trouvée chez les bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives, empêchant l'accumulation du peroxyde d'hydrogène, un agent oxydant potentiellement dangereux, en catalysant sa dismutation en eau et en dioxygène.

- Technique

Sur une lame, on dépose une colonie prélevée de la boîte de Pétri qu'on met en contact avec le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Lavoisier, 2007).

- Lecture

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

• Test TSI

Le milieu TSI est un milieu à trois sucres Glucose, Lactose et Saccharose. Il permet la mise évidence de la fermentation de ces 3 sucres grâce à la présence d'un indicateur de pH. Ce milieu permet de différencier les bactéries lactose négatif et saccharose négatif des bactéries lactose et saccharose positif qui provoquent l'acidification de la pente et plus précisément Salmonella et Proteus des entérobactéries (Roy et Laliberté, 1969).

- Technique

Ensemencer la surface abondamment, puis le culot par pique (à la pipette pasteur ou au fil droit). Incuber à 37°C pendant 24 heures

- Lecture

Glucose+ : culot jauni

Glucose - : culot inchangé

Lactose+ : pente virant au jaune

Lactose- : pente alcalinisée (rouge groseille)

Gaz : bulles dans la masse du milieu ou contre les parois ou poche gazeuse décollant le culot.

H₂S+ : noircissement du milieu dans la zone joignant la pente et le culot.



Figure 06 : Le milieu TSI.

- **Test Mannitol-mobilité**

C'est un milieu semi solide permettant d'étudier la mobilité et la dégradation du mannitol (Marchal et Bourdon, 1973).

- **Technique**

L'ensemencement se fait par piqûre centrale jusqu'au fond du tube à l'aide d'une anse de patine à fil droit sans boucle. Incubation réalisée à 37° durant 24 heures.

- **Lecture**

Le virage de la couleur, du rouge au jaune fait preuve de l'acidification du milieu suite à la dégradation de mannitol par la bactérie testée et la mobilité est déduite par rapport au déplacement de la bactérie au niveau de la gélose semi molle du mannitol mobilité.



Figure 07 : Milieu Mannitol mobilité.

- **Test Citrate de Simmons**

Un milieu solide incliné permettant l'identification de l'utilisation du citrate comme seule et unique source de carbone et d'énergie (Marchal et Bourdon, 1973).

- **Technique**

L'ensemencement est réalisé sur la pente par des stries longitudinales au moyen d'une anse contenant la colonie à tester. Incuber à 37°C pendant 24 heures.

- **Lecture**

Citrate + : virage de la couleur du milieu du vert au bleu (alcalinisation du milieu).

Citrate - : pas de virage.



Figure 08 : Milieu de citrate de Simmons.

- **Test ONPG**

Ce test consiste à rechercher la présence de la β -galactosidase, enzyme qui réalise l'hydrolyse du lactose en glucose et en galactose sous la dépendance d'une perméase. Un β -galactoside est utilisé comme substrat et non pas le lactose, la recherche de cette enzyme se fait par : l'Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside (Roy et Laliberté, 1969)

- **Technique** : réaliser une suspension bactérienne dense dans 0,5ml d'eau physiologique stérile puis introduire aseptiquement un disque de papier imprégné du substrat ONPG, puis incuber à 37°C et observer toutes les 15 min pendant 1heure.

- **Lecture** : La présence d'ONP dans le milieu résulte de l'hydrolyse de l'ONPG est détecté par la coloration jaune stable et l'absence de l'ONPG par la non coloration jaune.



Figure 09 : Mise en évidence d'ONPG.

• Etude des produits de la fermentation du glucose

Le milieu Clark et Lubs permet la recherche des voies fermentaires chez les entérobactéries et permet de différencier la fermentation des acides mixtes et la fermentation butylène glycolique (Roy et Laliberté, 1969 ; Marchal et Bourdon, 1973).

- Technique

L'encensement du milieu se fait par l'ajout de quelques gouttes de la suspension bactérienne à tester et puis étuver pendant 24 à 48 heures à 37°C. Répartir le milieu en 2 tubes à essai :

-Dans le premier tube ajouter quelques gouttes du réactif (VPI) et le même volume du réactif (VPII) pour déceler la production d'acétoïne au cours de la fermentation par la voie de butane diol.

- Lecture

VP+ : coloration rouge violacée prédominante en surface.

VP- : coloration jaune.

-Dans le deuxième tube ajouter 2 à 3 gouttes du réactif rouge de méthyle (RM) afin de mettre en évidence de la fermentation des acides mixtes par l'acidification du milieu glucosé.

- Lecture

Résultat négatif : coloration jaune : pH supérieur à 6,3.

Résultat positif : coloration rouge : pH inférieur à 4,2.



Figure 10 : milieu Clark et Lubs.

• Tests ODC, LDC, ADH

Les enzymes ODC, LDC et ADH catalysent respectivement la décarboxylation de l'ornithine de la lysine et de l'arginine présents dans le milieu. Cette dégradation aboutit à la

formation de produits basiques.

On opère en milieu anaérobie et contenant une faible concentration de glucose. L'acidification (due à l'utilisation du glucose) et l'anaérobiose sont des conditions favorables à la synthèse des décarboxylases. Dans un premier temps, la bactérie dégrade le glucose entraînant ainsi une acidification, dans un second temps, si elle possède l'enzyme correspondante, elle utilise l'arginine ou la lysine ou l'ornithine, entraînant une alcalinisation du milieu (Marchal et Bourdon,1973).

- **Technique**

Ensemencer le milieu avec une goutte de suspension bactérienne dense, agiter, ajouter quelques gouttes de de l'huile de paraffine et Incuber 24 heures à 37°C.

- **Lecture**

- Une bactérie non décarboxylante utilisera les peptones du milieu, et produira des acides organiques ainsi que des bases faibles comme l'ammoniac. Le milieu deviendra jaune.
- Une bactérie décarboxylante après avoir utilisé le glucose va produire du dioxyde de carbone et des amines. L'alcalinité des amines est importante, et le virage de l'indicateur de pH sera obtenu : le milieu restera violet.



Figure 11 : milieu de Moeller.

6.4.4. Galerie API 20NE

- **Principe**

L'identification a été faite par la galerie rapide Api système. L'Api 20NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux, combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation, et une base de données.

- Technique

-On réunit 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 oublier 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 stérilement dans la boîte d'incubation.

-Une suspension bactérienne est préparée dans un tube de 5ml d'eau physiologique stérile, à une opacité de 0,5 McFarland avec une seule colonie prélevée d'une culture jeune de 18 heures sur une gélose nutritive.

La suspension bactérienne est introduite dans les tubes de la galerie à l'aide d'une micropipette :

- Remplir les tubules (et non les cupules) des tests NO₃ à PNPG.
- Remplir les tubules et les cupules des tests GLU à PAC.
- Remplir avec l'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) pour la création d'une anaérobiose.
- Refermer la boîte d'incubation et incuber à 37°C pendant 24 heures

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 12 : Micro-galerie API 20NE avant incubation.

6.4.5 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. Cette

technique été effectuée en France (Carbonnelle et *al.*, 2011).

- Technique

a. Préparation des souches

L'identification par la spectrométrie de masse de types MALDI-TOF-MS a été faite en ensemençant 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, 2µL 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.

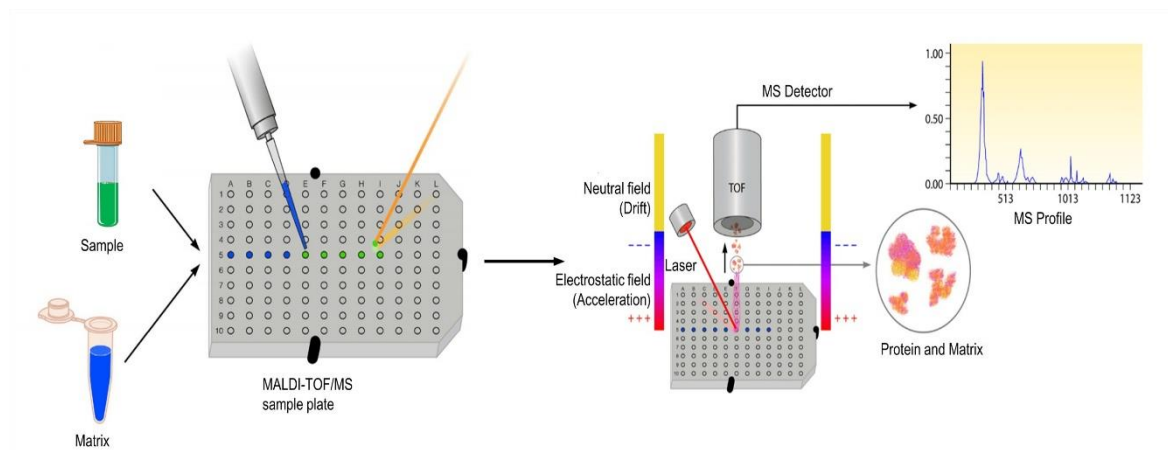


Figure 13 : Technique et principe de dépôt sur la cible de MALDI-TOF.

7- Antibiogramme

La sensibilité des souches vis -à-vis des différentes familles d'antibiotiques est évaluée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du comité d'antibiogramme de la société française de microbiologie (CASFM, 2019).

1 -Préparation d'inoculum : Des suspensions bactériennes sont préparées à partir d'une culture fraîche en prélevant des colonies bien isolées et les mettre en suspension dans 5ml d'eau physiologique stérile pour obtenir la même opacité que l'étalon Mac Farland 0.5 (10^7 UFC/ ml).

2 -Ensemencement : L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage en faisant des stries serrées du bout au bout par un écouvillon imbibé de la suspension bactérienne et essoré en le pressant sur la paroi interne de tube. L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60° en pivotant toujours l'écouvillon sur lui-même puis le passer sur la périphérie de la boîte.

3 - Application des disques : Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface de la gélose à l'aide d'un distributeur de disque. Les boîtes sont ensuite incubées pendant 24h à 37°C. Les antibiotiques étaient testés en 2 séries.

- Première série : Kanamycine, Ticarcilline, Imipénème, Colistine, Tigecycline, Céfotaxime.
- Deuxième série : Erythromycine, Triméthoprime-sulfaméthoxazole, Acide fusidique, Amixycine, Benzylpénicilline, Amoxicilline+ acide clavulanique.

L'interprétation en sensible (S), intermédiaire (I) et résistant (R) est effectuée selon les critères définis par CASFM (2019) en mesurant le diamètre des zones d'inhibition au tour des disques.

Chapitre 3

Résultats Et Discussion

I. Résultats et discussion

1- Prélèvements

L'étude est basée sur l'analyse de 50 échantillons de prélèvements vaginaux provenant de femmes souffrant d'infections utérines.

1.1- Culture des prélèvements

L'enrichissement des échantillons dans le bouillon nutritif a montré des résultats positifs à 100%. Sur 50 échantillons cultivés, 50 se sont révélés positifs (développement bactérien qui se traduit par l'apparition de trouble).

Ce taux élevé est dû au fait que tous les échantillons proviennent de patientes avec des infections utérines diagnostiquées.

1.2- Taux d'isolement de bacille à Gram négatif à partir de culture positive

La culture sur milieu Mac Conkey des résultats positifs a permis d'isoler 15 échantillons de bacille à Gram négatif, soit un taux de 30% d'isolement des BGN. Les résultats de l'isolement sélectif sont représentés dans le tableau suivant.

Tableau I : résultat de l'isolement sélectif des BGN.

Culture	Nombre de prélèvements	Résultats positif	Pourcentage	Résultat négatif	Pourcentage
Mac Conkey additionné d'ertapénème.	50	5	10 %	45	90%
Mac Conkey additionné de Colistine+ Vancolon	50	10	20%	40	80%

1.3- Répartition et fréquence des antibiorésistances au sein des isolats

Parmi les 15 BGN isolés, 10 sont résistants à la Colistine et 5 sont résistants à l'Ertapénème.

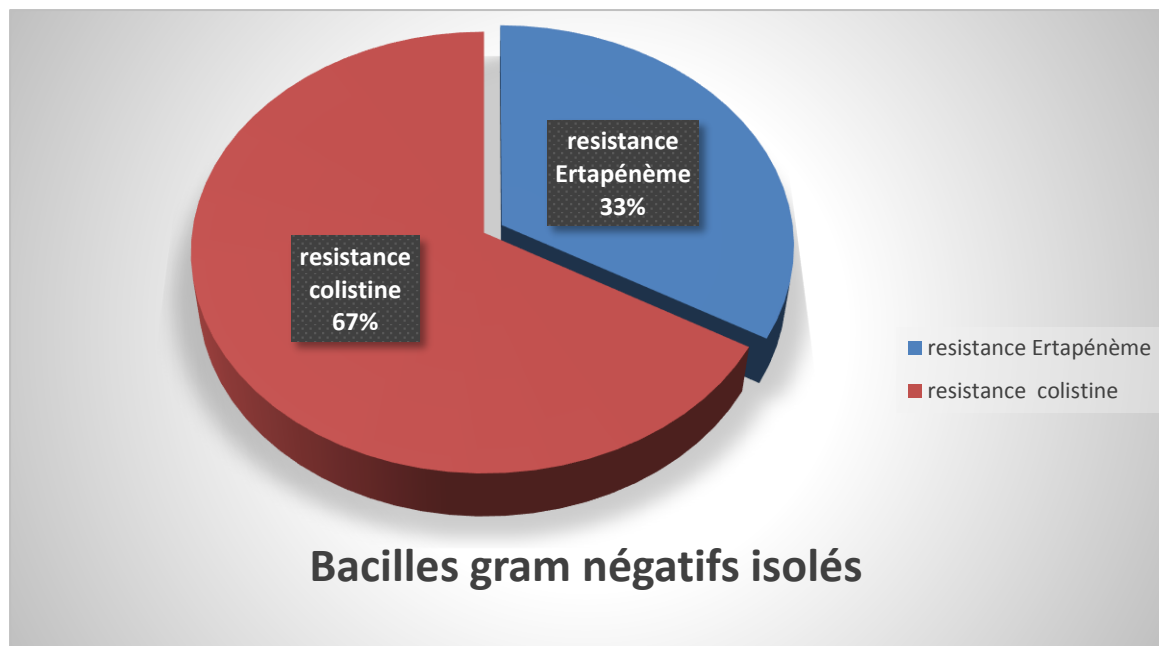


Figure 14 : Distribution des antibiorésistances au sein des souches isolées.

1.4- Identification des BGN

1.4.1- Aspect macroscopique des isolats

La totalité des souches isolées présentaient des caractères morphologiques et cultureux correspondants à ceux des BGN sur milieu Mac Conkey en ce qui concerne la forme, la couleur et la taille des colonies.

Des colonies de couleur jaune sont constatées, correspondant à des BGN non fermentant, alors que des colonies roses avec/ ou sans précipitation dans le milieu correspondant à des BGN fermentant le lactose présent dans le milieu Mac Conkey (Marchal et Bourdon, 1973).

Colonie jaune

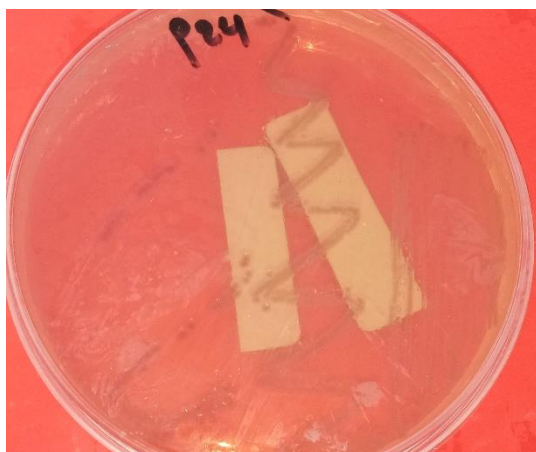


Figure 15 : Aspect des BGN non fermentant sur Mac Conkey

Colonie rose

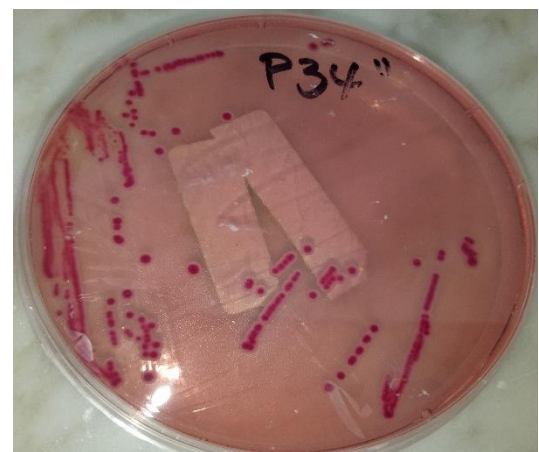


Figure16 : Aspect des BGN fermentant sur Mac Conkey.

Mais, il est à noter qu'un nombre de 2 isolats présentaient des caractéristiques spécifiques et différentes, avec une croissance lente et faible et des colonies petites et blanchâtres.



Figure 17 : Aspect macroscopique particulier sur Mac Conkey.

1.4.2- Aspect microscopique des isolats

Deux profils microscopiques ont été observés suite à la coloration de Gram des souches isolées et purifiées. Le premier correspondant à des bacilles à Gram négatif colorés en rose.

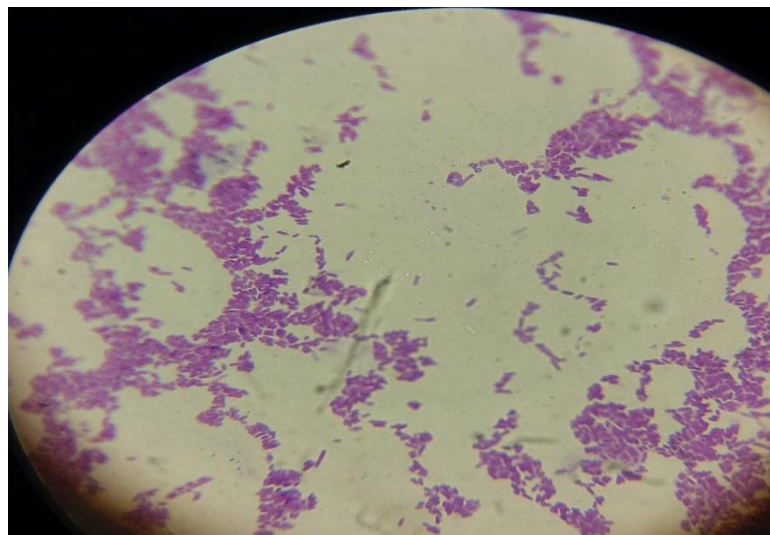


Figure 18 : Aspect microscopique des BGN après coloration de Gram.

Le deuxième correspondant à des spores ovoïdes bourgeonnantes et à des filaments colorés en violet, ce qui implique la présence de levures.

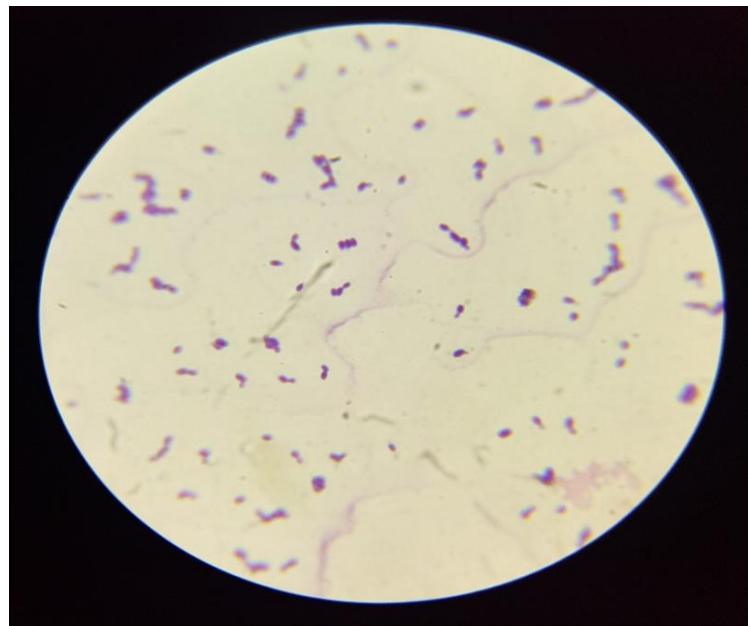


Figure 19 : Aspect microscopique particulier après coloration de Gram.

1.4.3- Résultats de la galerie API 20NE

L'identification par le système api 20NE a donné 2 souches de *Pseudomonas aeruginosa*.













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

1.4.3- Résultats des tests biochimiques

Les résultats des tests biochimiques sont regroupés dans le tableau suivant.

Tableau II : Résultats des tests biochimiques.

Test biochimique	Résultat positif	Résultat négatif
Test TSI	 <p>Changement de couleur, production de gaz.</p>	
Mannitol-mobilité	 <p>Couleur jaune, production de gaz.</p>	
Citrate de Simmons	 <p>Couleur bleu avec culture.</p>	
Rouge de méthyle	 <p>Couleur rouge.</p>	
ADH/ LDC/ODC	 <p>Pas de changement de couleur.</p>	

1.4.4- Résultats de l'identification par MALDI-TOF

AE0482_0001_1D3[c]	99.90	Morganella	morganii	124
AE0482_0001_1D2[c]	0.00			61
AE0482_0001_1D1[c]	96.30	Klebsiella	pneumoniae	151
AE0482_0001_1C4[c]	0.00			82
AE0482_0001_1C3[c]	75.50	Klebsiella	pneumoniae	137
AE0482_0001_1C2[c]	99.90	Candida	parapsilosis	94
AE0482_0001_1C1[c]	0.00			109
AE0482_0001_1B4[c]	92.00	Candida	parapsilosis	111
AE0482_0001_1B3[c]	99.90	Candida	parapsilosis	52
AE0482_0001_1B2[c]	77.50	Klebsiella	pneumoniae	63
AE0482_0001_1B1[c]	75.80	Klebsiella	pneumoniae	149
AE0482_0001_1A4[c]	99.90	Klebsiella	pneumoniae	109
AE0482_0001_1A3[c]	75.60	Klebsiella	pneumoniae	117
AE0482_0001_1A2[c]	97.50	Klebsiella	pneumoniae	155
AE0482_0001_1A1[c]	0.00			135
AE0481_0001_1H2[c]	76.00			180

Figure 21 : Résultats de l'identification des BGN par MALDI-TOF.

Les 15 souches isolées et purifiées étaient correctement identifiées par MALDI-TOF-MS, révélant les résultats suivants.

- 11 isolats appartenaient à la famille des entérobactéries, soit une fréquence de 73,3%.
- 2 isolats de BGN non fermentant des *Pseudomonadaceae*, soit une fréquence de 13,3 %.
- 2 isolats étant des levures du genre *Candida*, soit un taux de 13,3 %.

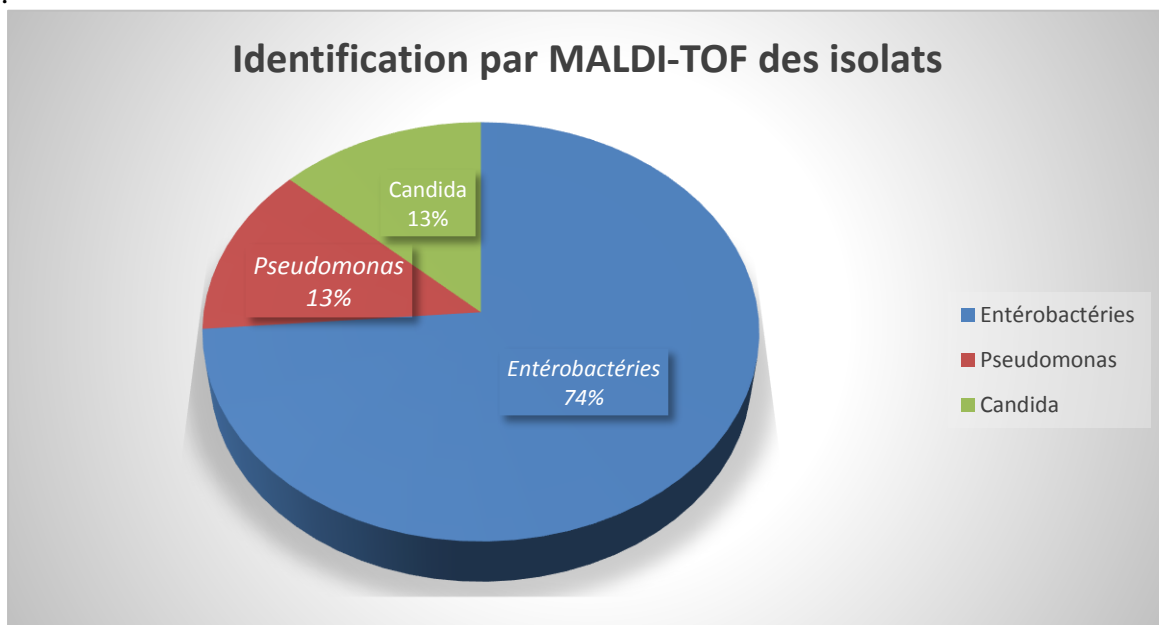


Figure 22 : Fréquence d'identification des entérobactéries et des BGN-nf

Les résultats obtenus montrent une prédominance des souches d'entérobactéries par rapport aux BGN-non fermentaire. La présence de taux élevés d'entérobactéries témoigne de contamination d'origine fécale et/ou une défaillance de pratiques d'hygiène.

Les résultats détaillés des genres et des espèces sont représentés dans la figure (21), ainsi que la fréquence de chaque souche identifiée.

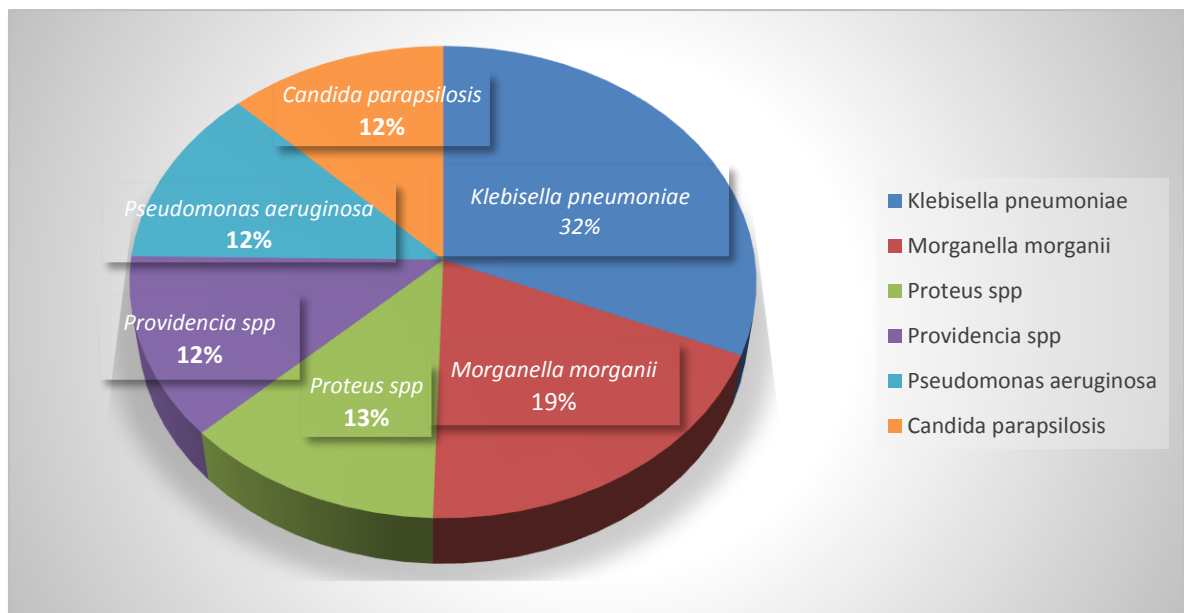


Figure 23 : Répartition des souches identifiées par genre et espèce.

On constate que *Klebsiella pneumoniae* est l'espèce la plus fréquente, avec un taux d'isolement de 33%.

La détection de *Candida parapsilosis* confirme les doutes exprimés par rapport à l'aspect microscopique et macroscopique des isolats. Le développement de *Candida parapsilosis* est dû au pouvoir des levures à croître sur le milieu Mac Conkey et cela a été prouvé par Gilad et *al.*, qui rapporta en 2007 une mauvaise identification de *Candida* comme étant des bacilles à Gram négatif en raison de leur morphologie sur la gélose mentionnée (Gilad et *al.*, 2007).

1.5- Etude de la résistance des souches isolées aux antibiotiques

Les 13 souches de BGN isolées étaient testées vis-à-vis un panel d'antibiotiques appartenant à différentes familles, l'interprétation des diamètres de zones d'inhibition exprimés est représentée dans le tableau (III). Les profils de sensibilité des souches isolées sont déterminés selon les valeurs critiques décrites par le Comité de l'Antibiogramme de la Société

Française de la Microbiologie (CASFM, 2019).

Tableau III : Profil de sensibilité des souches isolées.

Code	Souches	K	TIC	IPM	CT	TIG	CTX	E	SXT	AF	AX	P	AMC
P20C	<i>Providencia spp</i>	R	R	S	R	S	S	R	S	R	R	R	R
P24C	<i>P.aeruginosa</i>	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R
P31C	<i>P.aeruginosa</i>	R	R	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R
P32C	<i>K.pneumoniae</i>	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
P34C	<i>Proteus spp</i>	R	R	S	R	S	S	R	S	R	R	R	R
P40C	<i>K.pneumoniae</i>	R	R	S	R	S	S	R	S	R	R	R	R
P42C	<i>Providencia spp</i>	R	R	S	R	S	S	R	S	R	R	R	R
P43C	<i>Proteus spp</i>	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
P48C	<i>Morganella morganii</i>	R	R	S	R	S	S	R	S	R	R	R	R
P49C	<i>Moganella morganii</i>	R	R	S	R	S	S	R	S	R	R	R	R
P34E	<i>K.pneumoniae</i>	R	R	I	S	S	S	R	S	R	R	R	R
P48E	<i>k. pneumoniae</i>	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R
P49E	<i>k.pneumoniae</i>	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R

Kanamycine, TIC : Ticarcilline, IPM : Imipénème, CT : Colistine, TIG : Tigecycline, CTX : Cefotaxime, E : Erythromycine, SXT : Trimethoprime/sulfamétoazole, AF : Acide Fusidique, AX : Amoxicilline, P : Benzyl Penicilline, AMC : Amoxicilline+ acide clavulanique. R : Résistant, S : Sensible, I : Intermédiaire.

D'après les résultats du tableau (3), on constate que les 13 souches étudiées expriment une résistance vis-à-vis la majorité des antibiotiques testés, particulièrement les β -Lactamines.

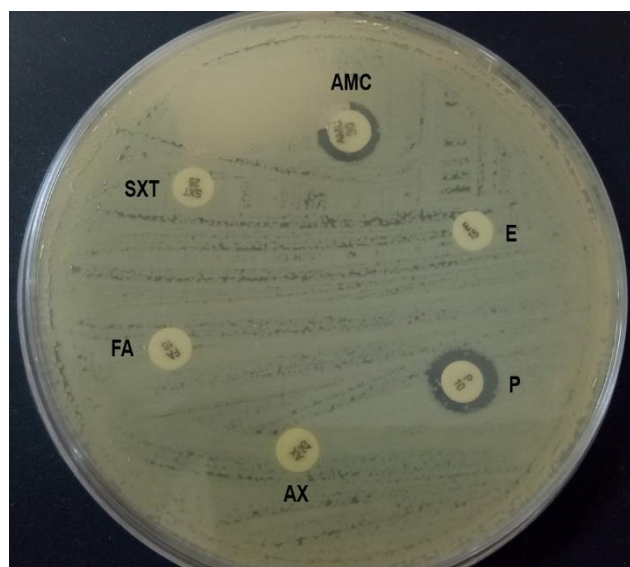


Figure24 : Profil de résistance d'une souche multirésistante (*Klebsiella pneumoniae*) première série.

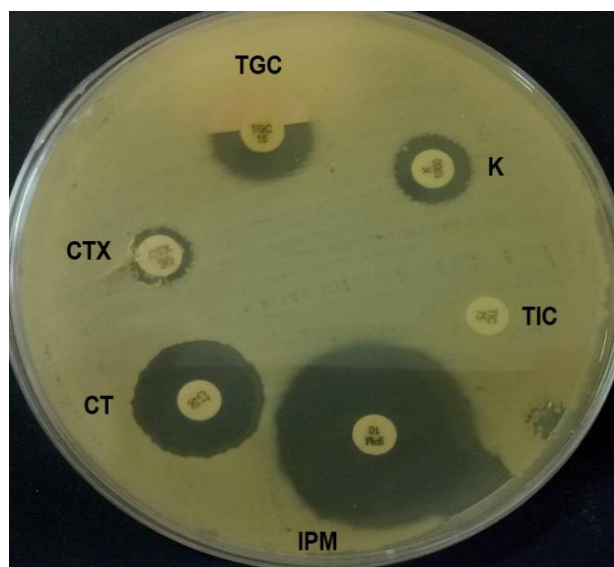


Figure25 : Profil de résistance d'une souche multirésistante (*Klebsiella pneumoniae*) deuxième série.

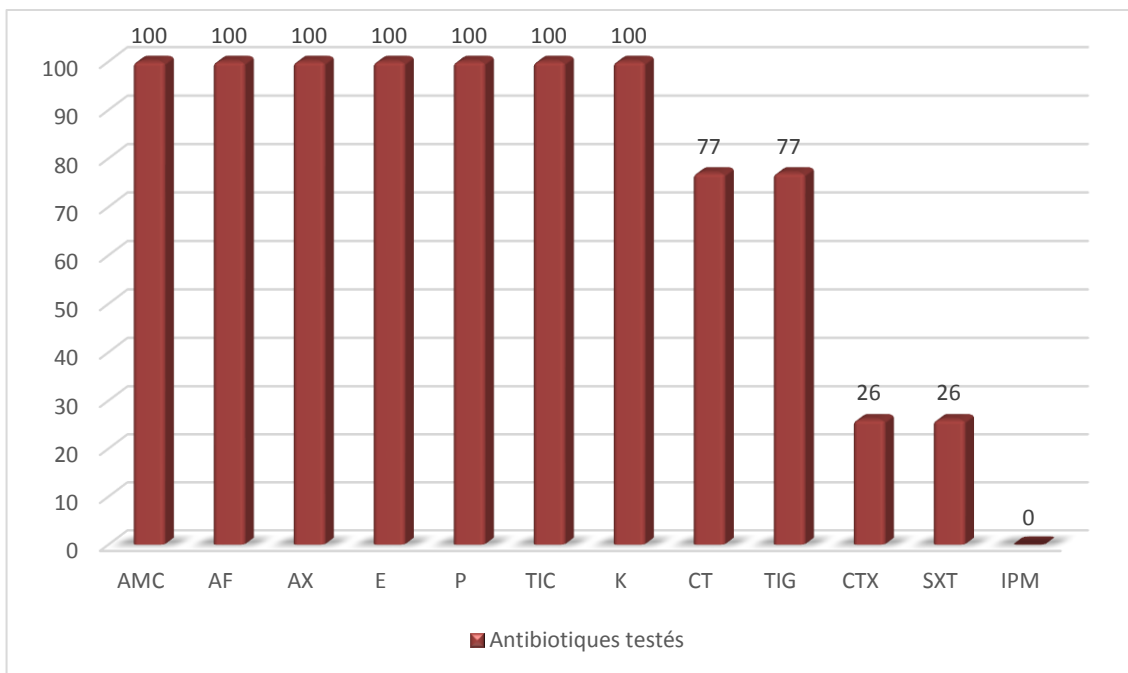


Figure 26 : Fréquence de résistance des souches de BGN aux différents antibiotiques.

D’après la figure (26), on remarque des taux de résistance élevée aux β -lactamines : 100% (13/13) vis-à-vis du benzylpenicilline (P), de l’amoxicilline (AX), de l’amoxicilline+acide clavulanique (AMC) et de la ticarcilline (TIC). L’imipénème (IPM) reste l’antibiotique le plus efficace avec un taux de sensibilité de 92 %, suivi de triméthoprime/sulfaméthoxazole et de céfotaxime avec un taux de 74%.

1.5.1 Sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques

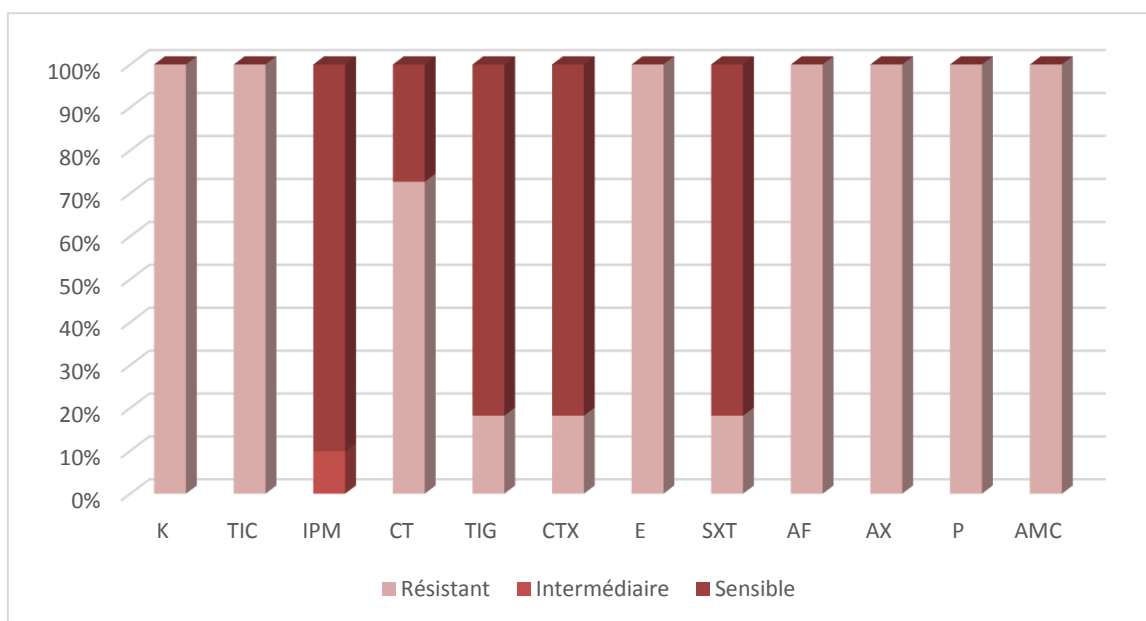


Figure 27 : Sensibilité des entérobactéries isolées aux antibiotiques testés.

L'analyse des résultats de notre étude montre une prédominance des entérobactéries au sein des souches isolées. Ces résultats rejoignent ceux décrits par Ayad (2011) et Derguini et Messaouden (2014), qui expriment une fréquence d'isolement des entérobactéries de 43,6% et de 79,3%, mais ces fréquences sont inférieures aux nôtres 84,6%.

Aux vues des résultats obtenues nous avons constaté que les antibiogrammes ont montré une hétérogénéité des souches. Généralement, les entérobactéries ont exprimé une résistance à tous les antibiotiques des différentes familles mais à des degrés variables. Les taux de résistance les plus élevés 100% ont été marqués à l'égard des aminosides (Kanamycine), des macrolides (Erythromycine), de l'Acide fusidique et des différentes β -lactamines (Amoxicilline, Amoxicilline + acide clavulanique, Benzylpénicilline et Ticarcilline) à l'exception de l'imipénème et du cefotaxime qui montrent des taux d'efficacité remarquables de l'ordre de 92% et de 81,8% respectivement, vis-à-vis les entérobactéries. Comme on a remarqué un taux de résistance de 72,7% aux polymyxines (Colistine). Par contre l'antibiogramme des tétracyclines (Tigécycline) a rapporté un taux de sensibilité important 82%.

L'imipénème est l'antibiotique le plus efficace sur les entérobactéries isolées avec un taux de sensibilité de 92%. Nos résultats sont en concordance avec ceux de Ebongue et *al.*, qui confirme en 2018 dans une étude d'évolution de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolés à l'hôpital général de Douala- Cameroun de 2005 à 2012 que l'imipénème est la molécule la plus active sur les entérobactéries avec un taux d'efficacité de 98,7%, ainsi que Souna qui marque l'imipénème comme l'antibiotique le plus efficace sur les entérobactéries en 2011.

Dans notre étude, le taux de résistance des entérobactéries aux C3G observé est de 18,18%, ce dernier est élevé par rapport à ce qui est rapporté dans les hôpitaux de Bejaia en Algérie 5,8% et au niveau du laboratoire central mère et enfants du CHU Beni-Messous d'Alger 10,43% (Touati et *al.*, 2006)

Un taux de résistance de 18,2% est observé pour l'association sulfaméthazole + triméthoprime, résultat différent de celui de Sekhri, qui rapporte en 2011, un taux de résistance de 65,38% pour cette association (Sekhri, 2011).

1.5.2- Phénotypes de résistance observés chez les entérobactéries

Toutes les souches de *K. pneumoniae* isolées sont résistantes à l'amoxicilline, à la ticarcilline et à l'association pénicilline-inhibiteur de β -lactamase amoxicilline + acide clavulinique, elles sont naturellement productrices de pénicillinases de bas niveau, le fait que cette pénicillinase ne soit pas inhibée par l'inhibiteur de β -lactamase en association implique que ces souches possèdent une pénicillinase de haut niveau de type (TEM) ou (SHV) (Baba Ahmed et Arlet, 2014).

Il est à noter qu'une souche de *K. pneumoniae*, soit un taux de 20% (soit 1/5), est résistante au Céfotaxime, son phénotype devient alors AX/AMC/TIC/CTX et la souche est productrice de β -lactamase à spectre élargi (BLSE), enzyme de type (CTX-M), un test de synergie reste nécessaire pour confirmer la présence de cette enzyme. (Nordman et Poirel, 2014). Les résultats de cette étude sont différents de ceux de Sekhri qui rapporte en 2011 une dominance des BLSE dans 62% des souches de *k. pneumoniae* isolées, suivi du type sauvage dans 27% des cas. La fréquence des BLSE dans notre étude est nettement inférieure à celle retrouvée au niveau du C.H.U de Sidi Bel Abbes qui est de 80% (Souna ,2011), et égale à celle obtenue dans l'EPH de Laghouat en 2015 qui est de 7,4% (Lagha, 2015).

Trois souches de *K. pneumoniae* sont résistantes à l'ertapénème, par production de carbapénémase de type (KPC), l'une d'elles montre une sensibilité diminuée à l'imipénème, cela peut être due au fait que la carbapénémase produit est de type (OXA 48), un test de caractérisation moléculaire est nécessaire pour mettre en évidence cette carbapénémase (Paterson, 2003).

Les souches appartenant aux *Proteae* (*Proteus spp*, *Morganella spp* et *Providencia spp*) sont naturellement résistante à la colistine, La tigécycline qui a une activité diminuée in vitro vis-à-vis des *Proteae* a montré une efficacité inattendue. La tigécycline est sensible aux pompes d'efflux multidrogués codées par des gènes chromosomiques de *Pseudomonas aeruginosa* et des *Proteae*. La surexpression des pompes d'efflux AcrAB est responsable de la diminution de la sensibilité chez ces derniers (Mohapatra et al., 2018).

1.5.3- Antibiorésistance chez *Pseudomonas aeruginosa* :

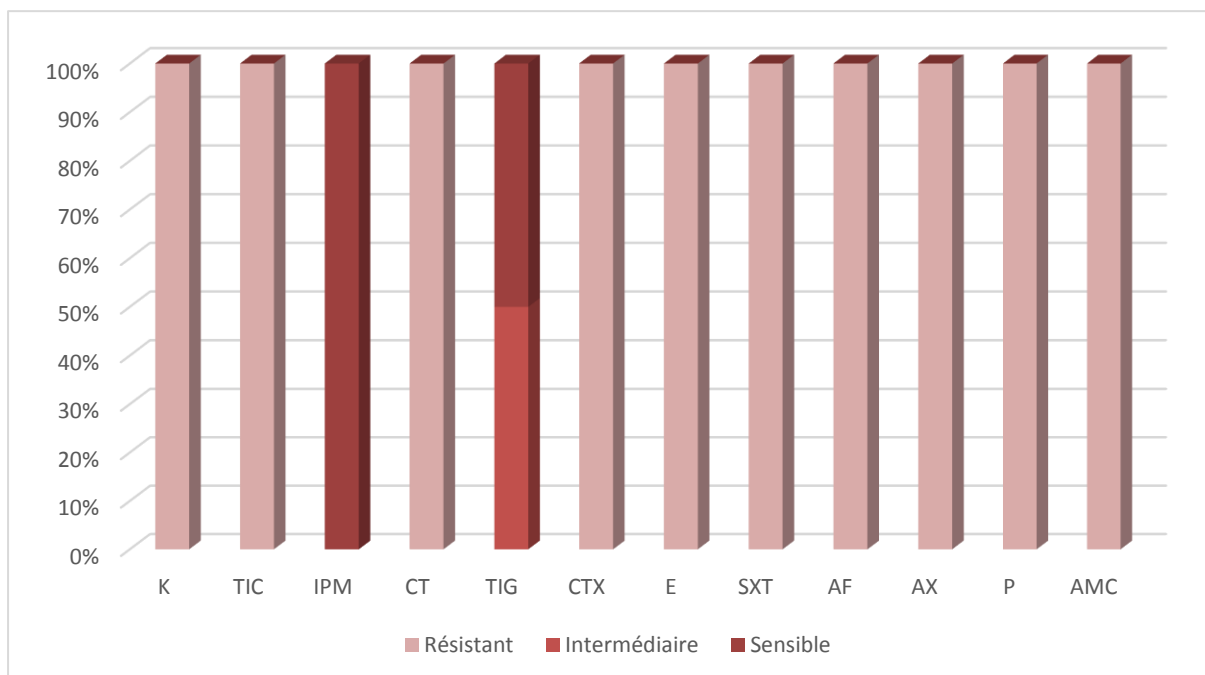


Figure 28 : Sensibilité des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées aux antibiotiques.

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées sont résistantes à tous les antibiotiques testés sauf l'Imipeneme avec un taux de sensibilité de 100 % et tigecycline 50%.

1.5.4- Phénotype de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* :

On note la présence de 2 souches multirésistantes (100% soit 2/2) résistantes aux macrolides, aux aminosides et à la Colistine.

Les 2 souches isolés de *Pseudomonas aeruginosa* sont de phénotype sauvage AX/AMC/CTX/SXT, elles possèdent une céphalosporinase inductible (AmpC) et une enzyme modifiatrices des aminosides, APH(3['])-IIb.

Les résultats montrent que ces 2 souches sont de phénotype Ery/Tet. La résistance à l'érythromycine et aux aminoside (kanamycine) est due à l'hyperexpression des systèmes d'efflux résistance croisée de type (MexXY-Opr M). Ce phénotype d'efflux actif a été observé et se caractérise par une diminution de l'activité de la ticarcilline. L'analyse des phénotypes de résistance aux β -lactamines des souches de *Pseudomonas aeruginosa* montre une nette

dominance des souches présentant le phénotype d'efflux 100%, un taux supérieur que celui décrit par Liazid qui indique un taux de 50 % en 2012 au niveau du CHU de Tlemcen (Liazid, 2012).

Cependant, au cours de cette étude, contrairement à celle de Mesli (2010) et de Benbouziane (2017), qui n'ont pas isolés des BGN résistants à la colistine aux seins de populations hospitalières en Algérie et à Tlemcen, respectivement, 4 souches résistantes à la colistine ont été isolée. Ceci est en accord avec les études de Berrazeg *et al.* et de Yanat *et al.* qui isolèrent en 2016 des souches nosocomiales d'*Escherichia coli* résistantes à la colistine en Algérie. La résistance à la colistine est due à la modification du lipide A du LPS ou à la diminution des charges négatives de la membrane externe ou à la baisse de l'interaction des polymyxines avec la membrane externe. Une autre analyse génotypique par PCR doit être effectué pour déterminer le phénotype en cause (Falagas *et al.*, 2005).

II. Discussion générale

Notre étude qui est basée sur l'analyse de 50 échantillons de prélèvements vaginaux constitue une tentative pour rapporter la prévalence des bacilles à Gram négatifs multirésistants dans les infections utérines en Algérie. Les résultats obtenus montrent que les 13 souches BGN isolées sont toutes multirésistantes avec une accumulation de résistances acquise à au moins 3 familles d'antibiotiques, soit une prévalence de 26 %.

La diffusion à l'échelle mondiale des bacilles à Gram négatif (BGN) producteurs de carbapénémases rend l'incidence des infections graves à ces bactéries en augmentation et risque de se poursuivre dans les prochaines années, Ces infections sont associées à une morbi-mortalité et des coûts élevés et sont difficile à contrôler aussi bien en milieu hospitalier que communautaire en raison de la difficulté d'identification de cette enzyme par des méthodes phénotypique et de l'absence de culture sur milieu classiques de dépistage des bactéries multirésistantes (Boyer et *al.*, 2013 ; Ferry et Richard, 2013).

Plusieurs types de carbapénémases sont produit par les BGN (KPC, OXA-48, IMP, VIM ou NDM), mais leur isolement reste rare en Algérie, notamment chez les souches d'enterobacteries et chez *Pseudomonas* (Baba Ahmed et Arlet, 2014).

La présente étude nous a permis d'isoler 2 souches de *Klebsiella pneumoniae* productrices de carbapénémases de types (KPC) soit 4% et une souche productrice de carbapénémase (OXA-48) soit 2%.

Le traitement des infections à bactéries productrices de carbapénémases pose des problèmes majeurs du fait du nombre limité des alternatives thérapeutiques, et du manque de données, seules quelques études cliniques de taille limitée sont disponibles. L'antibiothérapie systémique doit être réservée aux infections grave et associées à des morbidité lourdes, il paraît dangereux de traiter des infections superficielles ou une colonisation urinaire digestive à ces bactéries en raison du risque d'apparition de résistances additionnelles pouvant compromettre tout traitement médical en cas d'infection grave survenant ultérieurement (Cattoir, 2014).

Suite à l'émergence de bactéries productrices de carbapénémases et l'absence de nouveaux antibiotiques pour les combattre, la Colistine est de nouveau réutilisable, malgré sa

néphrotoxicité, comme un antibiotique prescrit pour le traitement d'infections humaines sévères liées à des bactéries résistantes à toutes les autres options thérapeutiques. L'augmentation actuelle de l'incidence des souches résistantes à la colistine est généralement observée dans les pays où la prévalence des bactéries productrices de carbapénèmes est importante, tels que la Grèce ou l'Italie. En France, la prévalence de la colistine reste rare, avec un taux de 4,6%, mais tend à progresser.

Cette résistance est essentiellement liée à des mutations chromosomiques de divers gènes conduisant à des modifications de charge du LPS, ce qui va empêcher la fixation de la colistine. Récemment, des gènes de résistance plasmidiques à la colistine, *mcr-1* et *mcr-2* ont été décrits chez de nombreuses espèces d'entérobactéries isolées en Asie du Sud-est, la résistance à la colistine plasmidique est donc transférable de façon horizontale (Dortet et *al.*, 2016).

En Algérie, la prévalence de la résistance à la colistine reste basse avec seulement 2 études rétrospectives qui ont rapporté l'existence d'une résistance plasmidique à la colistine parmi des souches d'*Escherichia coli* isolées en milieu hospitalier dans deux de l'ouest algérien (Berrazeg et *al.*, 2016 ; Yanat et *al.*, 2016), et 2 autres études qui ont rapporté l'existence de souches résistantes à la colistines (Aimene et Haddadi, 2017 ; Saoudi et Saoudi, 2014).

A notre connaissance notre étude est la première étude en Algérie à isoler des souches résistantes à la colistine dans les infections utérines en milieu communautaire avec une prévalence de 8%. Des méthodes de séquençage/clonage sont nécessaires pour la mise en évidence des résistances par mutation alors qu'une PCR révèle la résistance plasmidique et d'autres mécanismes restent à être découverts. On constate que 50% des souches résistantes à la colistine sont des *Pseudomonas aeruginosa* soit 4 % de la prévalence totale. Ce pathogène nosocomial majeur est naturellement résistant à plusieurs antibiotiques, il cumule constamment plusieurs mécanismes de résistance aux antibiotiques (efflux, imperméabilité, modification du site d'action ou inactivation enzymatique).

L'augmentation de l'incidence de ces souches multirésistantes et l'émergence de la résistance à la colistine font cependant craindre une évolution vers la panrésistance dans un avenir proche (Barbier et Wolff, 2010).

Le dépistage peut contrôler la dissémination de cette résistance en milieu hospitalier, mais pas en milieu communautaire. Il faut veiller à déterminer la CMI de la colistine par la

méthode de référence de la microdilution, selon les recommandations de la CASFM, de plus de nouvelles molécules qui sont dérivées de la polymyxine (NAB739 et NAB815) présentent une meilleure efficacité sur des souches d'*E. coli* par rapport à la polymyxine B, et avec une toxicité rénale moindre. Des études supplémentaires sont nécessaires et devraient inclure des souches résistantes à la colistine (Plésiat, 2018).

La tigécycline est capable de surmonter les deux principaux mécanismes de résistance aux tétracyclines : la protection ribosomiale et l'efflux. Il a été montré que la résistance croisée entre la tigécycline et la minocycline pour les *Enterobacteriaceae* est due aux pompes d'efflux multi-drogues. Il n'y a pas de résistance croisée au niveau du site d'action entre la tigécycline et la plupart des classes antibiotiques (Mohapatra et al., 2018 ; CASFM, 2019).

Candida parapsilosis est un important agent pathogène humain qui a considérablement augmenté en importance et en prévalence au cours des dernières décennies. Elle est responsable de candidémies et de plusieurs infections urinaires, génitales et utérines. La croissance des espèces du genre *Candida* sur milieu Mac Conkey est due au pouvoir de levure à croître sur ce dernier. Le milieu Mac Conkey n'est pas destiné à soutenir la croissance des levures, mais des espèces du genre *Candida* peuvent y cultiver avec différents taux de croissance et de densité. En effet la composition de ce milieu n'affecte pas la croissance fongique, cependant la coloration de gram doit être effectuée avec tout échantillon présentant une croissance, mais cela est difficile à réaliser dans le flux de travail, alors il est utile d'ajouter la gélose avec des additifs afin d'éviter la croissance des levures sur ce milieu (Gilad, 2008 ; Trofa et al., 2008).

La tigécycline est capable de surmonter les deux principaux mécanismes de résistance aux tétracyclines : la protection ribosomiale et l'efflux. Il a été montré que la résistance croisée entre la tigécycline et la minocycline pour les *Enterobacteriaceae* est due aux pompes d'efflux multi-drogues. Il n'y a pas de résistance croisée au niveau du site d'action entre la tigécycline et la plupart des classes antibiotiques. Cependant la diminution de leur sensibilité à ce dernier est principalement due à la surexpression des pompes d'efflux AcrAB et AdeABC sont responsables de la diminution de la sensibilité des *Proteaeae* (Mohapatra et al., 2018).

Conclusion

Conclusion

Conclusion

Les maladies pharmacorésistantes causent environ 700 000 décès annuellement d'après l'OMS en avril 2019, cette dernière a publié sa deuxième liste d'agents pathogènes prioritaires résistants aux antibiotiques et depuis janvier 2017, les bactéries Gram négatif multirésistantes sont toujours considérées comme étant la première et majeure menace universelle. Cette résistance aux antibiotiques est devenue un problème de santé publique à travers le monde et en Algérie plus particulièrement, cette dernière a assisté à une augmentation de résistance aux antibiotiques spécialement chez les BGN (Driss et *al.*, 2008 ; Touati, 2012 ; Berrazeg et *al.*, 2014).

La capacité intégrée des bacilles Gram négatif à trouver de nouveaux moyens pour résister au traitement et leurs pouvoirs à transmettre leurs matériels génétiques aux autres bactéries pour qu'elles deviennent aussi à leurs tours résistantes voire multirésistantes. Les études passées ont montré que leur prévalence en milieu hospitalier est importante mais il ne faut pas oublier que leur diffusion en milieu communautaire est également un fait préoccupant.

Dans le cas étudié dans ce projet, on a travaillé sur 50 échantillons dont la prévalence des BGN-MR a marqué un taux de 26% avec une dominance des entérobactéries 84,6% par rapport au BGN-nf. Les souches isolées ont démontré des niveaux de résistance inquiétants vis-à-vis les AB testés avec des phénotypes de résistance intéressants chez les entérobactéries, la β -lactamase à spectre élargi de type (CTX-M) représentant une fréquence de 7% , Carbapénèmase de type (KPC) et de type (OXA-48), d'une fréquence 15% et de 7% respectivement et chez *Pseudomonas aeruginosa* par un système d'efflux à résistance croisée (MexXY-OprM) d'un taux de 15% .La résistance commune entre ces deux groupes est celle de la Colistine avec une fréquence de 26%. Par ailleurs ces BMR ont présenté une grande sensibilité à l'Imipénème et une sensibilité inattendue à la Tigécycline chez les *Proteaeae*.

Ces résultats restent toujours alarmants et ce phénomène ne régresse facilement et le risque d'impasse thérapeutique est réel sachant qu'il n'existe pas de perspectives proches de mise sur le marché de nouvelles molécules anti-Gram négatifs. Il est donc légitime de redouter la dissémination des souches multirésistantes en Algérie. Face à cette crainte, la vente et l'usage des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire devrait absolument être mieux réglementés afin de diminuer et limiter cette dissémination dans la communauté et même chez les animaux, comme il est nécessaire de sensibiliser les malades d'en consommer si nécessaire seulement et sous prescription du médecin et d'instaurer des réseaux de surveillance à fin de

Conclusion

limiter l'émergence et la diffusion des souches multirésistantes et de préserver les molécules les plus actives.

Notre étude est la première à isoler des souches résistantes à la colistine et à marquer une sensibilité à la Tigécycline au milieu communautaire en Algérie, mais elle ne reste que préliminaires et mérite d'être approfondit et compléter par :

- Une étude moléculaire pour déterminer les mécanismes impliqués dans cette résistance
- Étude d'un grand nombre de souches et une recherche sur leurs environnement génétique.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Aimene, H., Haddadi, H. (2017).** Etude de la sensibilité à la colistine et à d'autres familles d'antibiotiques chez les entérobactéries uropathogènes d'origine hospitalière et communautaire. Université A. MIRA-Bejaia.
- Anderson, D., Hughes, D. (2014).** Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*, 12, 465-478.
- Ayad, A. (2012).** Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries au CHU de Tlemcen. Mémoire de magister. Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen.
- Baba Ahmed, Z., Arlet, G. (2014).** Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie. *Pathologie Biologie*, 62, 169–178.
- Barbier, F., Wolff, M. (2010).** Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa* Vers l'impasse thérapeutique ? *Médecine/Sciences*, 26(11), 960-968.
- Benbouziane, M. (2017).** Etude de la résistance à la colistine de souches hospitalières d'*Escherichia coli*. Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen.
- Berrazeg M., Hadjadj L., Ayad A., Drissi M., R. J. (2016).** First Detected Human Case in Algeria of mcr-1 Plasmid-Mediated Colistin Resistance in a 2011 *Escherichia coli* Isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(11), 6996-6997.
- Berrazeg, M., Diene, S., Drissi, M., Kempf, M., Richert, H., Landaud, L., Rolain, J. (2013).** Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. *PLOS One*, 8(4): e61428.
- Boivin, S., Caux, C., Soucy, C., Allard, A. (2016).** Entérobactéries productrices de carbapénemases. *Prévention Des Infections*, 13(5), 53-54.
- Bonnet , R., Bru, J. P., Caron, F., Cattoen, C., Cattoir, V., Chardon, H., . . . Waber, P. (2019).** Comité de l'antibiogramme : Société Française de Microbiologie.
- Bourafa, N., Chaalal, W., Bakour, S., Lalaoui, R., Boutefnouchet, N., Diene, S., Rolain, J. (2018).** Molecular characterization of carbapenem- resistant Gram-negative bacilli clinical isolates in Algeria. *Infection and Drug Resistance*, 11, 735–742. Récupéré sur <https://www.dovepress.com/> by 105.104.52.228
- Boyer, A., Mzali, F., Clouzeau, B., Gruson, D. (2013).** Bactéries multiresistante dans les unités d'urgence C'est au pied du mur qu'on voit mieux le mur. Récupéré sur https://sfmu.org/upload/70_formation/02congres/Urgences2013.

Références bibliographiques

- Caspar, Y. (2019).** Les résistances des bacilles gram négatifs. *DU Thérapeutiques Anti-Infectieuses*. Récupéré sur <http://www.infectiologie.com/File/formation/du/grenoble/resistances-des-bgn-ycaspar-du-grenoble-2018-19.pdf>
- Cattoir, V. (2013).** Infections caused by resistant Gram-negative bacilli: New molecules and combinations. *Journal Des Anti-Infectieux*, 15, 159–165.
- Derguini, L., Messaoudene, C. (2014).** Caractérisation de la résistance aux bêta-lactamines chez les bacilles à Gram négatif isolés de surfaces de l'environnement hospitalier du C.H.U de Constantine. Université Abderrahmane Mira-Bejaia.
- Dortet, L., Bonnin, R., Jousset, A., Gauthier, L., Naas, T. (2016).** Émergence de la résistance à la colistine chez les entérobactéries : une brèche dans le dernier rempart contre la pan-résistance. *Journal Des Anti-Infectieux*, 18(4), 139-159.
- Dortet, P., Poirel, L. (2013).** Multirésistance aux antibiotiques : l'émergence des entérobactéries productrices de carbapénémases. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 12, 35–37.
- Carrara E., Savoldi A., Harbarth S., Mendelson M., Monnet DL., Pulcini C....Cox W. (2018).** Patel Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*, Vol. 18(3), 318–327.
- Ebongue, C., Tsiazok, M., Ngaba, J., Beyiha, G. et D. A. (2012).** Evolution of antibiotic resistance of *Enterobacteriaceae* isolated at the Douala General Hospital from 2005 to 2012. *Pan Afr Med J*, 20, 227-234.
- Falagas, M., Kasiakou, S. (2005).** Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial. *Infections. Clinical Infectious Diseases*, 40, 1333– 1344.
- Ferry, T., Richard, J. (2013).** Traitement systémique des infections à bacilles Gram négatif producteurs de carbapénémases. *La Lettre de l'Infectiologue*, 28(4), 145-149.
- Gilad, J., Giladi, M., Schwartz, D. (2007).** Candida albicans masquerading as Gram negative bacilli in the clinical laboratory. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 39, 907–910.
- Guillot, J. F. (1989).** Apparition et évolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques. *Annales de Recherches Vétérinaires, INRA Editions.*, 20(1), 3–16.
- 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. Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen.

Références bibliographiques

- Liaizid, A. (2012).** Etude de la résistance aux antibiotiques des bactéries à Gram négatif non fermentants au niveau du C.H.U de Tlemcen. Mémoire de magister. Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen.
- Lucet, C., Birgand, G. (2011).** Les bacilles à Gram négatif multi-résistants : où va-t-on ? *Journal Des Anti-Infectieux*, 13, 122-132.
- Lupo, A., Haenni, A., Madec, J. (2018).** Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter spp.* And *Pseudomonas spp.* *Microbiol Spectrum*, 6(3), 1-7.
- Medbouba, C. (2011).** Caractérisation des phénotypes de résistance aux β -lactamines à large spectre des bacilles à Gram négatif isolés au niveau du laboratoire central mère et enfants du CHU Beni-Messous d'Alger. Université Abderrahmane MIRA-Béjaïa.
- Mesli, E., Berrazag, M., Drissi, M., Bekkhoucha, S., Rolain J.M. (2013).** Prevalance of carbapenemase-encoding genes including New Delhi metallo-b-lactamase in *Acinetobacter* species, Algeria. *International Journal of Infectious Diseases*, 17, 739-743.
- Mohapatra, S., Kafle, A., Panigrahi, S., Ganguly, S. (2018).** Tigecycline: A brief review. *Journal of Biological and Scientific Opinion*, 6, 4-9.
- Nordmann, P., Poirel, L. (2014).** Résistances aux antibiotiques émergentes et importantes chez les bactéries Gram négatif : épidémiologie, aspects théoriques et détection. *Rev Med Suisse*, 10, 902–907.
- Oliveira J., Reygaert W. (2019).** Gram negative bacteria. *StatPearls Publishing, Treasure Island*. Récupéré sur <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30855801>.
- Paterson, D. L. (2006).** Resistance in Gram-Negative Bacteria: *Enterobacteriaceae*. *The American Journal of Medicine*, 19(6), 20–28.
- Plésiat, P. (2018).** Stratégies 2018 de détection des bactéries multirésistantes à Gram négatif : Résistance aux polymyxines. Disponible sur https://programme.europa-organisation.com/slides/programme_ricai-2018/20181217/59-20181217_1630_Salle_352A. [Consulté le 20/05/2019 à 16.30 h].
- Pragasam, A., Veeraraghavan, B., Nalini, E., Anandan, S., Kaye, S. (2018).** An update on antimicrobial resistance and the role of newer antimicrobial agents for *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 36(3), 303-316.
- Ruppé, É., Woerther, P.L., Barbier, F. (2015).** Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Ann Intensive Care*, 5(1), 61.

Références bibliographiques

- Sade, H., Jones, R. (2005).** Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric Gram-negative bacilli. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25, 95-109.
- Saoudi, K., Saoudi, S. (2014).** Caractérisation des mécanismes de résistance aux β -lactamines des souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées au niveau du CHU de Beni Messous, Alger. Mémoire de master. Université Abderrahmane MIRA-Béjaia.
- Sekhri, N. (2011).** Fréquence et marqueurs épidémiologiques de *Klebsiella pneumoniae* dans les services à haut risque infectieux au niveau du CHU Ben Badis de Constantine. Thèse de doctorat. Université Frères Mentouri-Constantine.
- Souna, D. (2011).** Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries au niveau du CHU de Sidi Bel Abbès. Mémoire de magister. Université Frères Mentouri-Constantine.
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D., ... Magrini, S. (2018).** Patel Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*, 18(3), 318-327.
- Touati, A., Benallaoua, S., Forte, D., Madoux J., Brasme, L. (2006).** First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 beta -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Bejaia, Algeria. *Antimicrobial Agents Journal*, 20, 397-402.
- Trofa, D., Gácsér, A., Nosanchuk, J. (2008).** *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 21(4), 606–625.
- Wu, W., Jin, Y., Bai, F., Jin, S. (2015).** *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Medical Microbiology*, 2, 753–767.
- Yanat B., Machuca J., Dali Yahia R., Touati A., Pascual A., José-Manuel, M. (2016).** First report of the plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in a clinical *Escherichia coli* isolate in Algeria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48(6), 760-761.

Annexes

Annexe 01

Composition des milieux de culture (g/l d'eau distillée)

Gélose Mac Conckey

Peptone de caséine.....	17g
Peptone de viande.....	03g
Lactose.....	10g
Mélange de sels biliaires.....	1,5g
Rouge neutre.....	0, 03g
Chlorure de sodium.....	05g
Cristal violet.....	0, 001g
Agar.....	13,5g

PH=7,1

Gélose de Mueller Hinton

Infusion de viande de bœuf.....	2g
Hydrolysate de caséine.....	17,5g
Amidon.....	1,5g
Agar.....	17g

PH=7,4

Gélose TSI

Extrait de viande.....	03g
Extrait de levure.....	03g
Peptone tryptique.....	20g
Chlorure de sodium.....	05g
Lactose.....	10g

Glucose.....	01g
Thiosulfate de sodium.....	0,3g
Rouge de phénol.....	0,025g
Sulfate ferrique.....	0,2g
Agar.....	12g
PH=7,3	

Milieu Citrate de Simmons

Phosphate d'ammonium.....	01g
Phosphate bipotassique.....	01g
Chlorure de sodium.....	05g
Citrate de sodium.....	05g
Sulfate de magnésium.....	0,20g
Bleu de bromothymol.....	0,80g
Agar.....	18g
PH=6,9	

Bouillon nutritif

Macération de viande.....	10g
Peptone.....	05g
Chlorure de sodium.....	05g
pH=7,3	

Milieu Clarck-lubs

Peptone trypsine de viande.....
Glucose.....06g
pH=7

Composition des réactifs utilisés

Rouge de méthyl(RM)

Rouge de méthyl.....0,5ml
Alcool éthylique à 60 %.....100ml

3) Réactifs de Voges-Proskauer (VP) :

VP I :

- Hydroxyde de potassium40 g
- Eau100 ml

VP II :

- α naphtho.....16 g
- Ethanol100 ml

Annexe 02
Antibiotiques testés

Famille d'antibiotique	Antibiotque testé	Signe	Charge du disque (µg)
β-lactamines	Amoxicilline ;	AX	25
	Amoxicilline + acide clavulanique ;	AMC	30
	Benzyl Pénicilline	P	10
	Céfotaxime ;	CTX	30
	Imipénème ;	IMP	10
	Ticarcilline.	TIC	75
Aminosides	Kanamycine	K	1000
Macrolides	Erythromycine	E	15
Polymixines	Colistine	CS	50
Tétracyclines	Tigécycline	TGC	15
Divers	Acide fusidique ;	AF	10
	Trimethoprim/sulfaméthoxasole.	SXT	25

µg : microgamme.

Annexe 03

Diamètres des zones d'inhibition chez les souches isolées (en cm)

	Souche	KANA	TIC	IMP	CT	TIG	CTX	E	STX	AF	AX	P	AMC
P20C	<i>Providencia</i>	2,8	0	3,4	1,8	2,3	3,2	0	2,9	0	0	1	1
P24C	<i>P.aeruginosa</i>	1,2	0	1,9	0	2,2	2,9	0	0	0	0	0	0,8
P31C	<i>P.aeruginosa</i>	3	0	3,2	1,9	1,7	2,9	0	1,6	0	0,9	1,3	1,4
P32C	<i>K.pneumoniae</i>	1,1	0	2,9	1,8	1,5	0,9	0	0	0	0	1	1
P34C	<i>Proteus</i>	2,7	0	2,9	1,4	1,9	3,1	0	2,2	0	1,1	1,3	1,6
P40C	<i>K.pneumoniae</i>	2,7	0	2,8	1,6	1,8	2,9	0	2,3	0	0	1,1	0
P42C	<i>Providencia</i>	2,8	0	2	1,6	2	2,4	0	2,2	0	0	0,9	0
P43C	<i>Proteus</i>	1,8	0	2,1	1,6	1,5	0,9	0	0	0	0	1,2	0
P48C	<i>Morganella morganii</i>	2,8	0	2,9	1,8	2,5	2,5	0	2,9	0	0	1,2	0
P49C	<i>Moganella morganii</i>	2,8	0	2,4	1,9	2,3	2,4	0	2,9	0	0	1,4	0
P34E	<i>K.pneumoniae</i>	2,7	0	2,1	1,8	1,9	2,4	0	2,8	0	0	1,8	0
P48E	<i>k.pneumoniae</i>	2,7	0	3,1	1,4	2,1	2,5	0	2,7	0	0	0	0
P49E	<i>k.pneumoniae</i>	2,7	0	2,6	1,7	2	2,4	0	2,9	0	0	0,7	0