

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Béjaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Spécialité Microbiologie Fondamentale



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Recherche de bacilles à Gram négatif résistants
aux carbapénèmes en milieu communautaire**

Présenté par :

BOUZAD Soria & DRISSOU Meriem.

Soutenu le: 30 Juin 2019.

Devant le jury composé de :

Mr AMIR N.	MCA	Président
Mme GHAROUT A.	MCB	Encadreur
Mme TAFOUKT R.	MAA	Examineur

Année universitaire : 2018/2019

Remerciements

*Louange à Allah, le tout puissant et miséricordieux qui nous a prodigué le
Courage et la Santé afin d'entamer et d'achever notre travail.*

*Nos remerciements les plus sincères s'adressent particulièrement à notre exemple de
droiture et de rigueur Mme Gharout Alima, pour ses efforts fournis pour l'encadrement
et l'accomplissement de ce travail.*

*Nous remercions les membres de jury d'avoir bien agré d'examiner et de juger ce
travail.*

*Nous remercions également Mme Belhadi Karima pour ses conseils et son aide
généreuse, Mme Rahmani Dalila et Mme Amrani pour leur aide et leur compréhension.*

*Nous remercions particulièrement les responsables des restaurants pour leur
collaboration*

Dédicace

Je dédie ce travail à mes précieuses parents, malgré que rien ne puisse récompenser ma dette envers eux

À mon père mon model de raideur, de sagesse et de modestie qui a su me conduire à ce jour

À ma mère, la lumière de ma vie et la fleur de mon âme qui a su éclairé mon chemin

Je dédie ce travail

À mes frères et sœurs en guise de remerciement pour leurs conseils et leurs aides

À mon fiancé, l'homme qui m'a toujours soutenu et encouragé

À toutes mes amies

Que ce mémoire soit un symbole de fierté pour tout ceux qui me sont chers

Meriem.

Dédicace

Je tiens tous d'abord à remercier dieu le tout puissant pour son aide et le courage qu'il m'a prodigué pour élaborer ce modeste travail.

Avec mes des sentiments profonds que je dédie ce travail à mes très chers parents, Symbole de l'amour et d'affection que le dieu leur réserve la bonne santé, une longue vie et les adoucir dans sont vaste paradis qui m'ont toujours soutenu dans mes choix et je dis Merci pour tous leurs sacrifices et leurs efforts

Je tiens également à remercier mes adorables chères sœurs et frères qui occupent une grande place dans ma vie, je n'oublierai jamais votre soutien, votre encouragement, je vous souhaite beaucoup de réussite dans votre travail.

Pour clore ces remerciements, Je tiens également à remercier mon fiancé à qui je suis plus confiante chaque jours et qui m'a donné l'espoir. Et mes amies surtout ma chère Sihem, toute ma familles et à ceux qui me sont chers.

A Toute les personnes qui nous ont aidé à faire ce travail.

Soria.

Tables de matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction et problématique.....	1
Matériel et méthodes.....	10
I. Objectif et présentation de l'étude.....	10
II. Collection des échantillons.....	10
III. Pré-enrichissement.....	11
IV. Recherche de bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes.....	11
V. Recherche de bacilles à Gram négatif producteurs de carbapénèmases.....	12
VI. Criblage de bacilles à Gram négatif résistants à la colistine.....	15
VII. Identification des souches.....	15
Résultats.....	20
I. Isolement des souches.....	20
II. Bacilles à Gram négatif producteurs de carbapénèmases.....	21
III. Criblage des bacilles à Gram négatif résistants à la colistine.....	23
Discussion.....	27
Conclusion.....	29
Références bibliographiques	

Liste des tableaux

Tableau I: la répartition des échantillons par régions, restauration et date de prélèvements.....	10
Tableau II: liste des antibiotiques testés et les diamètres critiques selon les recommandations CA-SFM 2019.....	14
Tableau III: Identification des souches par les galeries biochimiques.....	16
Tableau IV: Aspect des colonies sur milieu chromagar (CHROMagar™ Orientation).....	19
Tableau V: Répartition des souches isolées selon la région de prélèvement.....	20
Tableau VI: Les caractéristiques des souches probablement productrices de carbapénèmases.....	21
Tableau VII: Résultats de l'antibiogramme avec et sans cloxaciline des souche probablement productrices d'une carbapénèmase.....	22
Tableau VIII: Caractéristique des souches probablement résistantes à la colistine.....	23

Liste des figures

Figure 01: Structure chimique des molécules de la famille des β -lactamines.....	2
Figure 02: Structure de la polymyxine.....	6
Figure 03: Etapes de test CIM.....	13
Figure 04: Antibiogramme avec cloxacilline.....	15
Figure 05: Exemple du test CIM.....	21
Figure 06: (A) Antibiogramme avec cloxacilline et (B) Antibiogramme sans cloxacilline pour la souche FE13G (BGNNF).....	23

Liste des abréviations

AMC: Amoxicilline et acide clavulanique

BGN: Bacille à Gram Négatif

BHIB: bouillon au cœur cerveau

BLSE: Les β -lactamase à spectre étendu

BN: bouillon nutritif

CA-SFM: Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de microbiologie

CAZ: Ceftazidime

CIM: Méthode Inactivation des Carbapénème.

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice.

CTX: Céfotaxime.

C3G: Céphalosporine de troisième génération.

C4G: Céphalosporine de quatrième génération.

EMB: Eosine Bleu de Méthylène.

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FEP: Céfépime.

FOX: Céfoxitine.

GN: Gélose Nutritive.

MH: Muller Hinton.

MBL: Métallo- β -lactamase

MRP: Meropénème.

NDM: New Delhi métallo- β -lactamase.

OXA: Oxacillinase.

PLP: protéines liant la pénicilline

R: Résistant.

RM: Rouge de Méthyle.

S: Sensible

SHV: Sulfhydryl Variable

TSB: Bouillon Tryptone Soja.

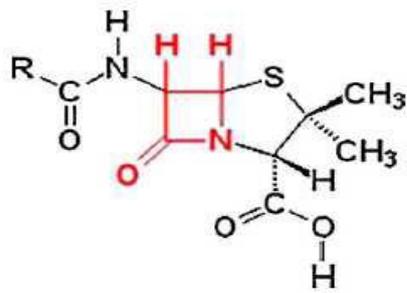
TSI: Triple Sugar Iron

VP: Voges- Proskauer.

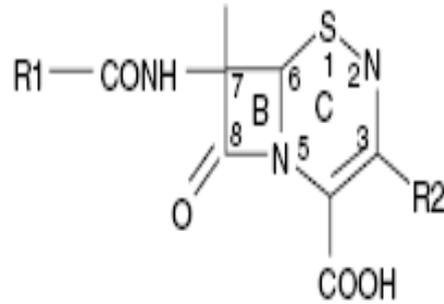
Introduction

L'ère des antibiotiques est marquée par l'avènement de la pénicilline G en 1928, isolée chez *Penicillium notatum* par Alexander Fleming. Cet événement prodigieux a bouleversé l'humanité et a révolutionné le monde, peu de temps après de nombreuses molécules ont submergé le domaine médical ce qui a permis de réduire rigoureusement le taux de mortalité infectieuse (Elhani, 2011). Cependant, l'antibiothérapie a connu une utilisation massive durant la deuxième moitié du XX^e siècle, ce qui a accéléré l'apparition de la résistance aux antibiotiques, et parfois l'utilisation excessive et démesurée des biocides industriels chimiquement proches aux antibiotiques agissent sur l'apparition de nouvelles résistances en exerçant une pression sélective sur les bactéries qui sont exposées à ces substances chimiques (Hawkey, 2008). La résistance progressive à l'égard de divers molécules d'antibiotiques constitue un obstacle dont le monde s'offusque dans sa lutte contre les microorganismes ; réellement ce phénomène existait bien avant l'utilisation des antibiotiques. Les gènes de résistances peuvent être transmis verticalement au sein de la même espèce ou par le mécanisme de transfert entre les bactéries des espèces distinctes (Elhani, 2011).

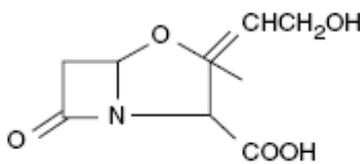
Les β -lactamines constituent la famille d'antibiotiques la plus importante, aussi bien par le nombre et la diversité des molécules utilisables que par leurs indications en thérapeutique et en prophylaxie des infections bactériennes. Cette famille est caractérisée par la présence constante du cycle β -lactame (azetid-2-one) associé à des cycles et des chaînes latérales variables qui expliquent les propriétés pharmacocinétiques et le spectre d'activité des différents produits. La grande variété de leurs modes d'administration, leur large spectre d'activité antibactérien associé à une action bactéricide, une bonne diffusion tissulaire, une bonne tolérance et un faible nombre d'interactions médicamenteuses expliquent leur popularité et l'importance de leur utilisation, seules ou en associations (Cavallo *et al.*, 2004). Elles regroupent : les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les inhibiteurs des β -lactamases (figure 1).



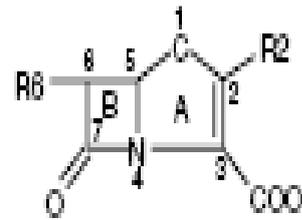
β -lactamine



Céphalosporine



Acide clavulanique



Carbapénème

Figure 1: Structure chimique des molécules de la famille des β -lactamines (Ruppé, 2010).

Elles sont utilisées couramment en clinique ce qui a favorisé les bactéries sensibles soumises à leur action au fil du temps à acquérir des mécanismes de résistance envers ces molécules. Cette résistance est liée à une imperméabilité, à un efflux de l'antibiotique, à des modifications des protéines liant la pénicilline (PLP) ou à la production d'enzymes inactivatrices appelées β -lactamases (Ruppé *et al.*, 2015).

Les β -lactamases de classe A appartiennent au groupe fonctionnel 2, correspondant aux pénicillinases et aux β -lactamases chromosomiques ou plasmidiques sensibles à l'acide clavulanique incluant le sous-groupe 2be β -lactamase à spectre étendu (BLSE) et le sous-groupe 2f (carbapénémases à serine) (Bush *et al.*, 2013). Les premières β -lactamases décrites chez les bactéries à Gram négatif sont de types TEM-1, TEM-2 et SHV-1 caractérisées par leur capacité à hydrolyser les pénicillines et les céphalosporines de première génération (C1G) (Sibhghatulla *et al.*, 2015). Ces enzymes étaient prédominantes au cours des années 1980 et 1990 (Cantón *et al.*, 2012). Les enzymes CTX-Ms sont des céfotaximases acquises, à médiation plasmidique, issues d'une lignée phylogénétique distincte des BLSE de type TEM et SHV (40% homologie) (Cantón *et al.* 2012). Les analyses génétiques ont montré que les souches progénitrices des gènes *bla*CTX-M appartiennent au genre *Kluyvera*, une entérobactérie d'isolement très rare en bactériologie médicale. Ces microorganismes

producteurs de BLSE sont isolés des infections nosocomiales, mais également des infections communautaires (Jobayer *et al.*, 2017).

Les BLSE confèrent la résistance aux pénicillines, aux C1G, C2G, C3G et l'aztréonam mais elles ne disposent d'aucune activité hydrolytique sur les carbapénèmes et les céphamycines. Elles sont inhibées par les inhibiteurs de β -lactamases tels que l'acide clavulanique, sulbactam et tazobactam (Bush et Jacoby, 2010).

Les carbapénèmes sont utilisés dans le traitement des infections dues à des bactéries productrices de BLSE comme antibiotique alternative (Grall, 2011). Ce sont des antibiotiques de la famille des β -lactamines tels que l'imipénème, le méropénème, l'ertapénème et le doripénème qui agissent sur la majorité des bacilles à Gram négatif, l'ertapénème en particulier n'agit que sur les entérobactéries. Elles visent exceptionnellement les PLP_{1a}, PLP_{1b} et les PLP2 (Wolff *et al.*, 2009). Elles sont réputées pour leur excellente activité du fait qu'elles sont stables vis-à-vis de la plupart des β -lactamases naturelles ou acquises et pour leur capacité de pénétrer aisément à travers la paroi externe des bacilles à Gram négatif. Leur usage est strictement hospitalier et dédié aux traitements d'infections sévères (Nordmann et Carrer, 2010).

L'émergence de la résistance aux carbapénèmes chez les entérobactéries met en péril la santé humaine, elle représente une menace pour l'efficacité de ces antibiotiques (Nüesch-Inderbinnen *et al.*, 2013). Ce type de résistance a diffusé dans le monde ces dernières années et les métallo- β -lactamines de type VIM et NDM sont considérés comme les enzymes les plus efficaces pour l'hydrolyse des carbapénèmes. Sachant que les plasmides codants pour la résistance aux carbapénèmes portent souvent des caractéristiques de la résistance à d'autres classes d'antibiotiques comme les aminosides et les fluoroquinolones, cela favorise considérablement la multirésistance aux antibiotiques (Ruppé *et al.*, 2015).

Deux mécanismes impliquant les β -lactamases sont connus dans la contribution à la résistance aux carbapénèmes. Le premier a été observé il y a plus de vingt ans chez *Enterobacter spp*, qui consiste en la production d'une céphalosporinase chromosomique ou plasmidique ou d'une BLSE associée à une imperméabilité. L'expression de carbapénémases, β -lactamases à forte activité hydrolytique vis-à-vis des carbapénèmes constitue un second mécanisme qui survient souvent chez les souches multirésistantes et exerce une activité chez toutes les β -lactamines (Nordmann et Carrer, 2010).

Les carbapénémases appartiennent à 3 classes (A, B et D) selon la classification d'Ambler. Les carbapénémases de la classe A sont caractérisées par une activité hydrolytique

inhibée par l'acide clavulanique. Ce sont des enzymes rapportées fréquemment dans des souches d'entérobactéries, les carbapénémase de types NmcA, Sme-1, Sme-2/Sme-3, IMI-1/IMI-2, ou SFC-1 sont les plus souvent décrites chez *Serratia*, et *Enterobacter*, et sont exprimées par des gènes chromosomiques ou plasmidiques ; d'autres de type GES (GES-4, GES-5 et GES-6) dont la structure ne se distingue que peu de BLSE GES-1 hydrolysent faiblement les carbapénèmes. Par contre, les carbapénémases du type KPC sont les plus redoutables en cliniques vue leur capacité à dégrader toutes les β -lactamines. Elles sont apparues la première fois chez *K. pneumoniae* en 1996, aux États-Unis (Caroline du Nord) ; l'acide clavulanique et le tazobactam peuvent inhiber proportionnellement leur activité (Nordmann et Carrer, 2010) par contre elles sont totalement inhibées par l'acide boronique (Pitout, 2015).

Les métallo- β -lactamases (M β Ls) sont des métallo-enzymes qui contiennent des ions zinc dans leur site actif, elles font partie de la classe B d'Ambler. Les β -lactamases de type IMP et VIM, GIM-1, KHM-1 et NDM-1 ont été isolées chez des souches dans le monde entier et sont capables d'hydrolyser toutes les β -lactamases excepté l'aztreonam. Leur activité n'est inhibée ni par l'acide clavulanique ni par le tazobactam (Nordmann et Carrer, 2010) mais par l'EDTA, qui chélate les ions zinc présents au niveau du site actif (Daikos *et al.*, 2009). L'acquisition de gènes codant pour les carbapénémases demeure le mécanisme de résistance le plus commun chez les bacilles à Gram négatif non fermentaires (BGN-NF) telles les M β Ls de *P. aeruginosa* où les gènes les plus fréquemment rapportés sont VIM, IMP, GIM et SPM (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2009). VIM-2 est la métallo- β -lactamase dominante en Afrique du Nord ainsi que partout dans le monde (Toumi *et al.*, 2018). Les variants VIM-2 et VIM-19 ont été respectivement identifiés chez des souches de *P. aeruginosa* et d'entérobactéries (Baba-Ahmed *et al.*, 2014), mais la modification de la protéine de membrane externe OprD reste le mécanisme de résistance à l'imipénème le plus fréquemment retrouvé chez *P. aeruginosa* (Nordmann, 2010).

Les carbapénémases décrites chez les entérobactéries, OXA-48 et dérivés, de la classe D d'Ambler hydrolysent les carbapénèmes et n'ont par contre aucun effet sur les céphalosporines de troisième génération, l'acide clavulanique est incapable d'inhiber l'activité hydrolytique de cette classe de β -lactamases (Djahmi *et al.*, 2014); l'association d'OXA-48 avec une BLSE chez une souche bactérienne lui confère une multirésistance (Carrèr *et al.*, 2010) mais l'expression d'OXA-48 uniquement n'aboutit qu'à une légère réduction de la sensibilité aux carbapénèmes (Aktas *et al.*, 2008). Le réservoir naturel de ce

gène *bla*_{OXA-48} a été identifié; il s'agit de *Shewanella* sp, ce qui suggère le transfert de ce gène de résistance en milieu aqueux (Nordmann et Carrer, 2010).

Chez *Acinetobacter*, le mécanisme le plus répandu de résistance aux carbapénèmes est l'expression de gènes de type OXA, comprenant principalement les gènes acquis de type *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24} et *bla*_{OXA-58}. Les gènes de type *bla*_{OXA-58} et de type *bla*_{OXA-24} sont beaucoup moins détectés que ceux de type *bla*_{OXA-23} (Kuo *et al.*, 2018). L'OXA-51-like avait disséminé dans des isolats d'*Acinetobacter*. En outre, la détection du gène *bla*_{OXA-51} a été utilisée en tant que méthode d'identification de *A. baumannii* (Lee *et al.*, 2019).

L'apparition de résistances à la plupart des antibiotiques a incité les cliniciens à avoir recours à la colistine dans le traitement des infections dues aux BGN multirésistants bien que cet antibiotique a été délaissé et réservé uniquement à la médecine vétérinaire pour sa faible diffusion tissulaire et son effet néphrotoxique et neurotoxique. Cependant, il est utilisé comme antibiotique de dernier recours (Aghapour *et al.*, 2019).

La colistine connue sous le nom de polymyxine E (Figure 2) a été isolée chez *Paenibacillus polymyxa subsp.colistinusen* 1947, cependant, l'émergence d'isolats qui lui sont résistants a été aussi tôt rapportée au cours de ces dernières années (Aghapour *et al.*, 2019).

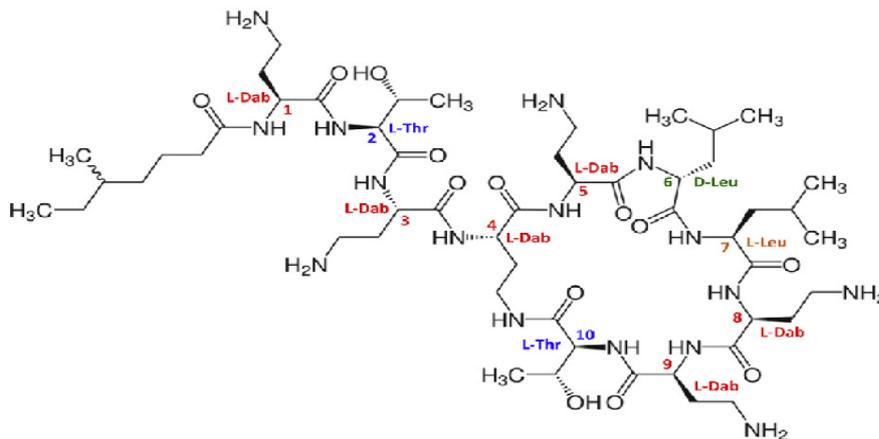


Figure 2: Structure de la polymyxine E (Dortet *et al.*, 2016).

Certaines espèces de BGN sont inconstamment sensibles comme *Enterobacter* spp, *Stenotrophomonas maltophilia* ou *Achromobacter xylosoxidans*. D'autres espèces sont naturellement résistantes à la colistine dont *Proteus* spp, *Morganella morganii*, *Providencia* spp, *Serratiamarcescens*, *Burkholderia cepacia*, *Chromobacterium* spp, *Edwardsiella* spp, *Brucella*, *Legionella*, *Campylobacter* spp., *Vibrio cholerae* (Cannetelli *et al.*, 2013).

Les polymyxines ont comme cible la membrane externe de la paroi des BGN dont le composant essentiel est le lipopolysaccharide (LPS). Une interaction électrostatique entre les résidus acide α,γ -diaminobutyrique (Dab) chargés positivement des polymyxines et les groupements phosphates chargés négativement du lipide A du LPS entraîne un déplacement des ions divalents (Mg^{2+} et Ca^{2+}) et ainsi une déstabilisation du LPS. L'extrémité hydrophobe des polymyxines interagit alors avec le LPS permettant ainsi leur insertion dans la membrane externe. Ceci entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire et une fuite du contenu intracellulaire conduisant à la lyse bactérienne et à la mort cellulaire (Aghapour *et al.*, 2019). Une fois à l'intérieur de la membrane interne, les polymyxines inhibent l'activité d'une enzyme respiratoire, la NADH-quinone oxydoréductase (NDH-2), ce qui constitue un deuxième mécanisme conduisant à la mort cellulaire (Dortet *et al.*, 2016).

Plusieurs mécanismes de résistance sont révélés dans des études antécédentes ; la manifestation de la résistance naturelle intrinsèque à la colistine peut être due à la modification des LPS_s par substitution cationique chez certaines souches telles que *Proteus mirabilis*, *Providencia*, *Morganella* et *Serratia marcescens*. L'activation constitutive de l'expression de l'opéron *pmrHFIJKLM* et du gène *eptB* permet l'ajout de groupements cationiques le phosphoéthanolamine et/ou 4-amino-4-deoxy-L-arabinose sur le lipide A, ce qui réduit l'affinité de l'antibiotique au LPS bactérien. Par contre, l'hétérorésistance à la colistine chez *Enterobacter cloacae* et *Enterobacter asburiae* est due à l'hyperexpression du système d'efflux *acrAB-tolC* induite par l'hyperexpression du régulateur transcriptionnel *soxRS* (Aghapour *et al.*, 2019). Cependant, des gènes de résistance plasmidiques à la colistine, (*mcr-1* et *mcr-2*) ont été détectés dans plusieurs régions du monde, chez de nombreuses espèces d'entérobactéries isolées surtout chez l'animal mais plus rarement chez l'homme (Dortet *et al.*, 2016).

La multirésistance dans les isolats cliniques est devenue un grave problème dû à une diminution progressive du nombre d'antibiotiques qui sont efficaces pour le traitement des infections humaines. Il a été suggéré qu'il existait un lien entre la résistance aux antibiotiques d'origine animale, la résistance aux antibiotiques des isolats cliniques et la santé de la communauté. Cette question reste toutefois controversée car l'écologie de la résistance aux antibiotiques et des gènes de virulence dans l'environnement n'est pas bien comprise.

Matériel et méthodes

I. Objectif et présentation de l'étude

Notre travail est réalisé dans l'objectif d'étudier la résistance aux antibiotiques notamment la résistance aux carbapénèmes ainsi qu'à la colistine chez les bacilles à Gram négatif dans le milieu communautaire. Cette étude est étalée sur une période allant de décembre 2018 au Juin 2019, le travail expérimental est effectué au niveau de deux laboratoires, celui de la microbiologie de la Faculté Science de la Nature et de la Vie de l'Université Abderrahmane Mira et laboratoire communal d'hygiène de Bejaia.

II. Collection des échantillons

Les prélèvements effectués sont rapportés dans le tableau I.

Tableau N° I. : Répartition des échantillons par région, restauration et date de prélèvement.

Wilaya	Région	Date de prélèvement	Nombre d'échantillons	Nombre de restaurant
Alger	Bir Touta	05-05-2019	31	1
Sétif	Amoucha	25-12-2018	55	2
		05-03-2019	5	
Bejaia	300 logements	28-02-2019	6	1
	Kherrata	12-05-2019	19	1
	Porte Sarasine	28-04-2019	20	1

IV. Recherche de bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes.

IV.1. Enrichissement.

Un bouillon d'enrichissement (BHIB/BN ou TSB) additionné de méropénème à raison de 1µg/ml pour sélectionner les bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes et de

vancomycine avec une concentration finale de 64µg/ml pour éliminer les bactéries à Gram positif.

L'enrichissement est effectué en ajoutant 400µl de bouillon pré-enrichissement (BHIB/BN/TSB) dans 1600µl du bouillon d'enrichissement additionné de méropénème et de vancomycine. L'incubation est effectuée à 37C° pour 24h. La procédure est similaire pour les deux flores interne et externe.

IV.2. Isolement et purification des souches.

L'isolement des bacilles à Gram négatif est réalisé en ensemençant 50µl du bouillon d'enrichissement sur la gélose Mc Conkey additionnée de méropénème à 1µg/ml et de vancomycine à 64µg/ml. Les boîtes sont incubés à 37°C/24h. Au terme de la période d'incubation, les colonies ont fait l'objet d'une purification jusqu'à obtention d'une culture bactérienne pure.

V. Recherche de bacilles à Gram négatif producteurs de carbapénèmase.

V.1. Méthode de CIM (Carbapenem Inactivation Method).

Le test CIM est un test de dépistage phénotypique de production des carbapénèmases chez les bactéries à Gram négatif. Ce test est considéré comme étant positif lorsque la zone autour des disques d'antibiotique méropénème (10 µg) est inférieure ou égale à 18 mm selon les recommandations de CA-SFM/EUCAST, 2019.

Les étapes sont résumées comme suit (**Figure 03**) (Van der Zwaluw *et al.*, 2015) : Une suspension bactérienne est réalisée en dissociant une ose bactérienne de 03 souches (un témoin positif *K.pneumoniae* KPC-3, un témoin négatif *E.coli* ATCC 25922 sensible aux antibiotiques et la souche à tester) dans des eppendorfs stériles contenant 500µl d'eau physiologique stérile. Ensuite, un disque de méropénème est introduit dans chaque suspension et homogénéisées à l'aide d'un vortex, puis les tubes sont incubés 2 à 3 heures à 37C°. Après incubation, les disques sont retirés des suspensions à l'aide d'une anse de platine stérile et placés sur une boîte de gélose MH préalablement inoculée avec une souche bactérienne *E. coli* sensible à tous les antibiotiques. L'incubation est effectuée à 37C°/ 24h.

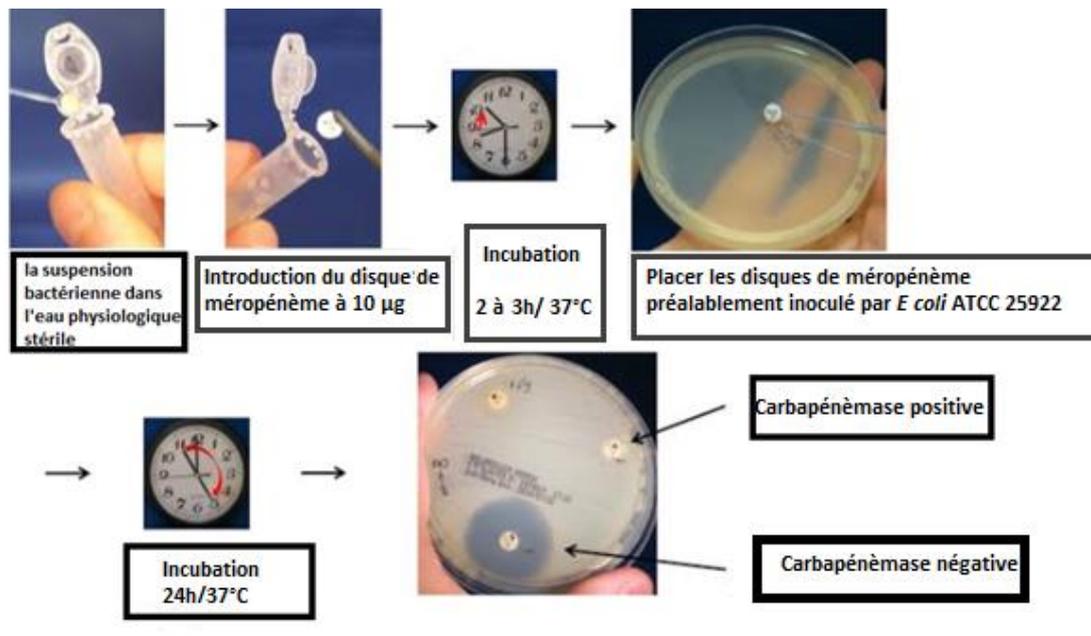


Figure 03: Etapes du test CIM (Van der Zwaluw *et al.*, 2015).

V.2.Étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques

La sensibilité des souches sélectionnées (CIM positif) aux β -lactamines est déterminée par la méthode d'antibiogramme par diffusion sur la gélose MH selon les recommandations du comité d'antibiogramme de la société Française de microbiologie (CA-SFM-EUCAST, 2019). Cette méthode d'antibiogramme nécessite la préparation d'un inoculum de 10^8 UFC/ml à partir d'une culture fraîche de 18 à 24 h. L'ensemencement se fait par la méthode d'écouvillonnage par des stries serrées sur la totalité de la surface de la gélose. Les disques d'antibiotiques sont déposés à l'aide d'une pince stérile, par la suite les boîtes sont incubées à 37°C/24 h.

La lecture des boîtes est basée sur l'apparition ou l'absence des zones d'inhibitions autour des disques d'antibiotiques. Ces dernières sont mesurées par l'utilisation d'une règle et l'interprétation des résultats se fait selon les recommandations du CA-SFM /EUCAST 2019, à l'exception des céphalosporines de 3^{ème} génération (CAZ et CTX) dont l'interprétation est faite selon les recommandations du CA-SFM, 2013.

Tableau N° II: Liste des antibiotiques testés et les diamètres critiques.

Antibiotique	Abréviation	La charge	La marque	Les diamètres critiques		La classe
				Sensible ≥S	Résistante <R	
Méropénème	MER	10 µg	CYPRESS Diagnostic et Bio-rad	21mm	18mm	Carbapénèmes
Amoxicilline/AC. Clavulanique	AMC	30 µg (20µg+10µg)	CYPRESS Diagnostic	19mm	19mm	Aminopinicilline
Céfoxitine	FOX	30 µg	CYPRESS Diagnostic	19mm	15mm	Céphamycine
Céftazidime	CAZ	30 µg	Liofilchem	26mm	21mm	Céphalosporine de 3 ^{ème} génération (C3G)
Céfotaxime	CTX	30 µg	Liofilchem	20mm	17mm	Céphalosporine de 3 ^{ème} génération (C3G)
Céfépime	FEP	30 µg	Liofilchem	27mm	21mm	Céphalosporine de 4 ^{ème} génération(C4G)

Le test de synergie (DD-test) est effectué sur les mêmes boîtes selon le protocole décrit par Jarlier et ses collaborateurs en 1988 qui consiste à déposer les disques d'Augmentin (acide clavulanique (10µg) et amoxicilline (20µg), les disques de céphalosporine de 3^{ème} génération (CTX (30 µg) et CAZ (30µg)) à une distance de 30 mm sur les boîtes de Petri (**Figure 04**). L'incubation est réalisée à 37C°/ 24h.

Afin d'inhiber l'activité de la céphalosporinase naturelle ou plasmidique, le test de synergie est refait sur gélose MH additionnée de 250µg/ml de cloxacilline. La comparaison des diamètres des zones d'inhibitions entre les boîtes avec et sans cloxacilline permet de mettre en évidence la présence d'une BLSE (Drieux *et al.*, 2008).

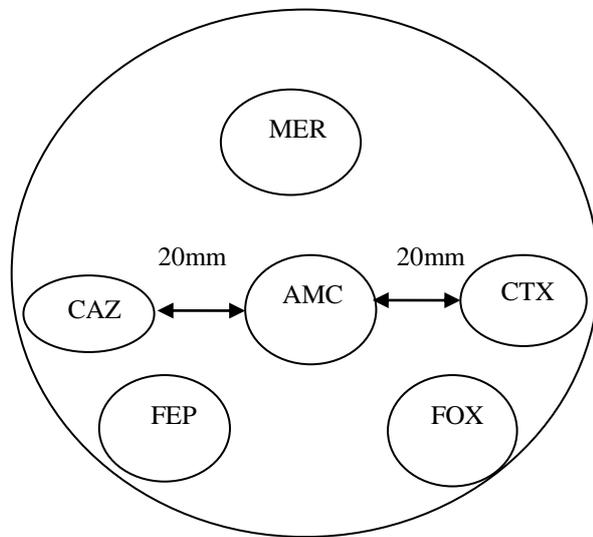


Figure 04: Antibiogramme

VI. Criblage de bacilles à Gram négatif résistants à la colistine.

Au cours de ce travail, nous avons réalisé un criblage de bacille à Gram négatif résistants à la colistine en utilisant le protocole modifié de Nordmann et ses collaborateurs en 2016. Nous avons utilisé le milieu EMB à deux concentrations de colistine (4µg/ml et 8µg/ml). Par souci d'économie, nous avons testé par stries 4 souches par boîtes. À noter que le témoin positif *E.coli* MCR-1 et un témoin négatif (*E. coli* ATCC 25922) sont testés sur la même boîte.

VII. Identification des souches

L'identification des souches est faite par l'utilisation d'une galerie biochimique et le milieu Chromagar orientation.

VIII.1. Galerie biochimique

Les différents tests réalisés sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau N° III: Identification des souches par les galeries biochimiques.

Milieu	Principe	Ensemencement	La lecture et l'interprétation
TSI : Three Sugar Iron	Révèle la fermentation du lactose, saccharose et du glucose avec ou sans production de gaz et la production de sulfure	Se fait par une piqûre centrale au niveau du culot avec des stries serrées sur la pente. Incubation à 24h à	Virage de couleur sur la pente au jaune: fermentation du lactose. Virage de couleur sur le culot au jaune: fermentation du

	d'hydrogène H ₂ S.	48h /37C°.	glucose. Formation ou apparition des bulles d'air: production de gaz. Noircissement du milieu: production d'H ₂ S.
Milieu Citrate de simmons.	Déterminer l'utilisation de citrate comme seule source de carbone.	L'ensemencement par des stries sur la pente. Incubation de 24h à 7 jours à 37C°.	Virage du vert au bleu et observation d'une croissance sur le milieu: les bactéries utilisent le citrate comme seule source de carbone (citrate de simmons+).
Milieu bouillon nitraté.	Recherche du nitrate réductase.	L'ensemencement à l'aide d'une suspension bactérienne. Incubation pendant 24h/ 37C°.	Une Coloration rouge après ajout de réactifs NR1 et NR2: signifie que la bactérie possède la nitrate réductase et réduit les nitrates en nitrite. Milieu reste incolore, on ajouter la poudre de zinc (réducteur du nitrate) : L'apparition d'une coloration rouge : présence de nitrate dans le milieu alors la bactérie ne possède pas de nitrate réductase. Absence de coloration ou milieu incolore montre l'absence de nitrate donc la bactérie possède une nitrate réductase et a réduit les nitrates jusqu'au stade diazote (N ₂).

<p>Milieu urée indole</p>	<p>Recherche d'une uréase et la production d'indole, et on peut aussi rechercher la TDA (tryptophane désaminase).</p> <p>Étude les voies de fermentation de glucose.</p> <p>-fermentation des acides mixtes mise en évidence par le test RM (Rouge Méthylène)</p> <p>-fermentation de butanediolique qui conduit à la production d'acétoine et mise en évidence par test VP (Vogel-Proskauer).</p>	<p>L'ensemencement à partir de quelque colonie de la souche bactérienne étudiée.</p> <p>Incubation à 24h /37C°.</p> <p>L'ensemencement se fait à partir de quelques colonies de la souche bactérienne à étudiée</p> <p>Incubation à 24h/37C°.</p> <p>4ml de la suspension bactérienne est devisée dans 02 tubes contenant chacun 2 ml.</p>	<p>Uréase :</p> <p>-virage du milieu au rouge, alcalinisation du milieu : la souche bactérienne possède une uréase.</p> <p>-absence du virage de milieu au rouge: la souche bactérienne et dépourvue d'une uréase.</p> <p>Indole :</p> <p>formation d'un anneau rouge en surface de tube après l'ajout de 2 à 3 gouttes du réactif de kovacs : La souche est productrice d'indole.</p> <p>-absence de l'anneau rouge : la souche ne produit pas l'indole.</p> <p>Test de VP :</p> <p>Après l'ajout des réactifs VP1 et VP2</p> <p>-virage de couleur au rouge : VP+</p> <p>-Milieu incolore : VP-</p> <p>Test RM :</p> <p>On ajoute deux gouttes du réactif RM au milieu.</p> <p>-virage de la couleur en rouge: la souche est dite (RM+).</p> <p>-absence de virage de couleur : la souche est dite (RM-).</p>
<p>Milieu Clark et Lubs.</p>			

VII.2. Milieu chromagar orientation.

Milieu nom sélectif servant à l'isolement, identification et différenciation des agents pathogènes. Ce milieu composé des substances chromogènes qui libèrent des composés de divers couleur lors de leur dégradation par des enzymes bactériennes spécifiques.

Tableau N°IV: Aspect des colonies sur milieu chromagar (CHROMagar™ Orientation).

Les souches	La couleur des colonies
<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Morganella</i> , <i>Providencia</i>	Colonies pâles à beiges, cernées d'une auréole ambre à marron.
<i>Escherichia coli</i>	Colonies rose à pourpre
KES-C (<i>Klebsiella</i> , <i>Entérobactère</i> , <i>Serratia</i> , <i>Citrobacter</i>).	Colonies bleues vert à bleues avec ou sans auréole violette
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Colonies muqueuses blanches brunâtres
<i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i>	Colonies muqueuses blanches opaques.
<i>Enterococcus</i> sp	Petites colonies bleues turquoise.

Résultats

I. Isolement des souches

Un total de 231 souches sont isolées sur la gélose de Mac Conkey additionnée d'antibiotiques méropénème et vancomycine. La répartition des souches selon le type des mouches et la région de prélèvements est indiquée dans **tableau N°V**.

Tableau N° V: Répartition des souches isolées selon la région de prélèvement

Wilaya	Alger	Bejaia		Sétif		
Région	Bir Touta	300 logements	Kherrata	Amoucha Restaurant A	Amoucha Restaurant B	
Total	62	36	12	38	73	10

L'identification des souches isolées est réalisée sur la base des caractères biochimiques et l'aspect sur le milieu chromagar. Nous avons enregistré la présence de bacilles à Gram négatif fermentaires et les non fermentaires **tableau N°IV** (Annexe IV).

II. Bacilles à Gram négatif producteurs de carbapénèmases.

II.1. Test CIM.

Le test CIM réalisé sur les 231 souches a montré des diamètres inférieurs à 18 mm chez 06 souches indiquant ainsi la production probable de carbapénémase.

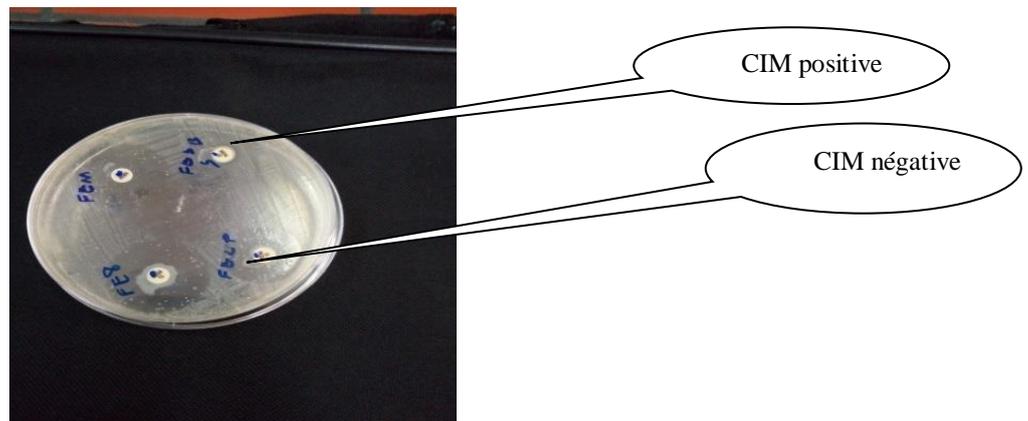


Figure 05: Exemple du test CIM.

Les caractéristiques des 06 souches productrices de carbapénèmases sont résumées dans le tableau ci-après.

Tableau N°VI: Les caractéristiques des souches probablement productrices de carbapénèmases.

Code	Identification bactérienne	Wilaya	Région	Date de prélèvement	Diamètre MEM Test CIM (mm)
FI8PSAA	Autres BGNNF	Sétif	Amoucha	25-12-2018	15 mm (R)
FI8GSAA	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Sétif	Amoucha	25-12-2018	6mm (R)
FI9GSAA	Autres BGNNF	Sétif	Amoucha	25-12-2018	6mm(R)
FI13GSAA	BGNNF	Sétif	Amoucha	25-12-2018	10mm(R)
FE3BGSAA	Serratia sp	Sétif	Amoucha	25-12-2018	10mm(R)
FE13GSAA	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Sétif	Amoucha	25-12-2018	13mm(R)

Légende : BGNNF : Bacille à Gram négatif nom fermentaire ; **R** : Résistante

II.2. Antibiogramme.

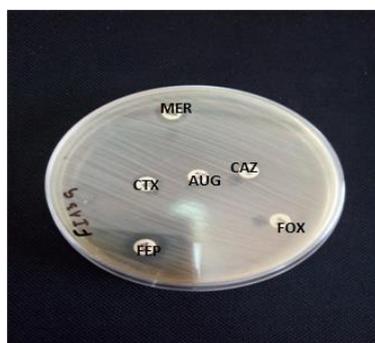
Les 06 souches sélectionnées dans le test CIM sont testées vis-à-vis de plusieurs β -lactamines en l'absence et en présence de cloxacilline. Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau suivant.

Tableau N°VII : Résultats de l'antibiogramme avec et sans cloxacilline des souches probablement productrices de carbapénèmases.

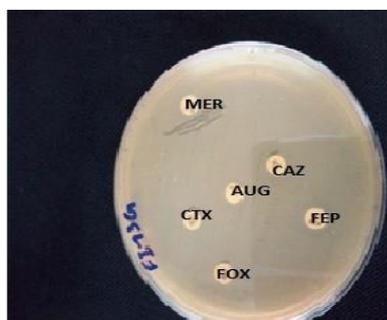
Code	Espèce	Antibiogramme	AMC (30 μ g)	CTX (30 μ g)	CAZ (30 μ g)	FOX (30 μ g)	FEP (30 μ g)	MER (10 μ g)	Image de synergie
FI8P SAA	BGNNF	Sans cloxacilline	6mm	11 mm	12mm	6 mm	12mm	6mm	-
		Avec cloxacilline	6mm R	-					
FI8G SAA	<i>S. maltophilia</i>	Sans cloxacilline	6mm	12mm	11mm	6mm	13mm	6mm	-
		Avec cloxacilline	6mm R	-					
FI9GSAA	BGNNF	Sans cloxacilline	6mm R	-					
		Avec cloxacilline	6mm R	-					
FI13GSAA	BGNNF	Sans cloxacilline	6mm R	-					
		Avec cloxacilline	6mm R	-					
FE13G	<i>S. maltophilia</i>	Sans cloxacilline	6mm R	10mm R	6mm R	6mm R	13mm R	6mm R	-
		Avec cloxacilline	6mm R	-					
FE3BG		Sans cloxacilline	6mm R	-					

		Avec cloxacilline	6mm R	-					
--	--	-------------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	---

Les résultats obtenus montrent que les 06 souches testées sont résistantes à l'égard des antibiotiques testés. L'utilisation de la cloxacilline n'a pas permis de révéler la présence d'image de synergie chez ces souches (**Figure 06**).



(A) Antibiogramme sans cloxacilline.



(B) Antibiogramme avec cloxacilline.

Figure 06: (A) Antibiogramme avec cloxacilline et (B) Antibiogramme son cloxacilline de la souche FI13G.

Les souches identifiées sont des bacilles à Gram négatif non fermentaires, une concentration de 500µg/ml de cloxacilline est nécessaire pour inhiber leurs céphalosporinases naturelles.

III. Criblage des bacilles à Gram négatif résistants à la colistine.

Les résultats du criblage de bacilles à Gram négatif résistants à la colistine sont montrés dans le **Tableau N° VIII**.

Tableau N° VIII: Caractéristiques des souches probablement résistantes à la colistine.

Code	Wilaya	Région	Type de restaurant	Date de prélèvement	Aspect sur chromagar	Identification probable	Croissance sur gélose 4µg/ml	Croissance sur gélose 8µg/ml	CMI probable µg/ml
FE13BPS	Bejaia	Porte sarasine	R	28-04-2019	Blanche	<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	-	= 8
FI11SB(14)	Sétif	Amoucha	RB	05-03-2019	Blanche	<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	-	=8
FE10KH	Bejaia	Kherrata	FD	12-05-2019	Blanche	<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	+	> 8
FI7BPS	Bejaia	Porte	R	28-04-2019	Blanche	<i>Acinetobacter</i>	+	+	>8

		sarasine				<i>baumanii</i>			
FE5MP	Bejaia	300Lgmt	P	28-02-2019	Blanche	<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	+	> 8
FE9AL	Alger	Bir Touta	R	05-05-2019	Blanche	<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	+	> 8
FE12AL	Alger	Bir Touta	R	05-05-2019	Blanche	<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	+	> 8
FI2BAL	Alger	Bir Touta	R	05-05-2019	Blanche	<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	+	> 8
FI6AL	Alger	Bir Touta	R	05-05-2019	Blanche	<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	+	> 8
FI7AL	Alger	Bir Touta	R	05-05-2019	Blanche	<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	-	=8
FI10ALR	Alger	Bir touta	R	05-05-2019	Blanche	<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	+	> 8
FE1MP	Bejaia	300Lgmt	P	28-02-2019	Blanche	<i>Aeromonas hydrophila</i>	+	+	>8
FE23AL	Alger	Bir Touta	R	05-05-2019	Blanche	<i>Aeromonas hydrophila</i>	+	+	>8
FI8PSAA	Sétif	Amoucha	RA	25-12-2018	Blanche	BGNMF	+	+	>8
FI9GSAA	Sétif	Amoucha	RA	25-12-2018	Blanche	BGNMF	+	+	>8
FI13GSAA	Sétif	Amoucha	RA	25-12-2018	Blanche	BGNMF	+	-	=8
FE3BGR	Sétif	Amoucha	RA	25-12-2018	Blanche	BGNMF	+	+	> 8
FE11S	Sétif	Amoucha	RA	25-12-2018	Blanche	BGNMF	+	+	>8
FE4S	Sétif	Amoucha	RA	25-12-2018	Blanche	BGNMF	-	-	=4
FE7S(14)	Sétif	Amoucha	RB	05-03-2019	Blanche	BGNMF	+	+	> 8
FE2BPS	Bejaia	Porte sarasine	R	28-04-2019	Blanche	BGNMF	+	+	>8
FE4BPS	Bejaia	Porte sarasine	R	28-04-2019	Blanche	BGNMF	+	+	>8
FI5BPS	Bejaia	Porte sarasine	R	28-04-2019	Blanche	BGNMF	+	+	>8
FE3AL	Alger	Bir Touta	R	05-05-2019	Blanche	BGNMF	+	+	>8
FE7AL	Alger	Bir Touta	R	05-05-2019	Blanche	<i>Burkholderia</i>	+	+	>8
FE6SB(14)	Sétif	Amoucha	RA	25-12-2018	Blanche	<i>Chromobacterium spp</i>	+	-	=8
FI16S(20)	Sétif	Amoucha	RA	25-12-2018	Blanche	<i>Chromobacterium spp</i>	+	+	>8
FI7S(14)	Sétif	Amoucha	RA	25-12-2018	Blanche	<i>Chromobacterium spp</i>	+	+	> 8
FE6S(11)	Sétif	Amoucha	RA	25-12-2018	Blanche	<i>Chromobacterium spp</i>	+	-	=8

FE12SB	Sétif	Amoucha	RB	05-03-2019	Blanche	<i>Chromobacterium spp</i>	+	+	>8
FI4BKH	Bejaia	Kherrata	FD	12-05-2019	Blanche	<i>Chromobacterium spp</i>	+	+	>8
FE3BPS	Bejaia	Porte sarasine	R	28-04-2019	Blanche	<i>Chromobacterium spp</i>	+	+	>8
FE6BPS	Bejaia	Porte sarasine	R	28-04-2019	Blanche	<i>Chromobacterium spp</i>	+	+	>8
FI3GBPS	Bejaia	Porte sarasine	R	28-04-2019	Blanche	<i>Chromobacterium spp</i>	+	+	>8
FE3MP	Bejaia	300Lgmt	P	28-02-2019	Blanche	<i>Chromobacterium spp</i>	+	+	>8
FE4MP	Bejaia	300Lgmt	P	28-02-2019	Blanche	<i>Chromobacterium spp</i>	+	+	>8
FI1MP	Bejaia	300Lgmt	P	28-02-2019	Blanche	<i>Chromobacterium spp</i>	+	-	=8
FI4ALB	Alger	Bir Touta	R	05-05-2019	Blanche	<i>Chromobacterium spp</i>	+	+	>8
FI4GBPS	Bejaia	Porte sarasine	R	28-04-2019	Bleu	<i>K. oxytoca</i>	+	+	>8
FI6S	Sétif	Amoucha	RA	25-12-2018	Blanche	<i>Moraxilla</i>	+	+	>8
FE10S	Sétif	Amoucha	RA	25-12-2018	Blanche	<i>P. aeruginosa</i>	+	-	=8
FE13S(11)	Sétif	Amoucha	RA	25-12-2018	Blanche	<i>P.aeruginosa</i>	+	+	>8
FE5S(11)	Sétif	Amoucha	RA	25-12-2018	Blanche	<i>P. aeruginosa</i>	+	-	=8
FI4KH	Bejaia	Kherrata	FD	12-05-2019	Blanche	<i>P. aeruginosa</i>	+	+	>8
FE2AL	Alger	Bir Touta	R	05-05-2019	Blanche	<i>P.aeruginosa</i>	+	-	=8
FE10AL	Alger	Bir Touta	R	05-05-2019	Blanche	<i>P. aeruginosa</i>	+	+	>8
FE15AL	Alger	Bir Touta	R	05-05-2019	Blanche	<i>P. aeruginosa</i>	+	+	>8
FE16AL	Alger	Bir Touta	R	05-05-2019	Blanche	<i>P. aeruginosa</i>	+	+	>8
FI9BAL	Alger	Bir Touta	R	05-05-2019	Blanche	<i>P. aeruginosa</i>	+	-	=8
FI9AL	Alger	Bir Touta	R	05-05-2019	Blanche	<i>P. aeruginosa</i>	+	+	>8
FI8RAL	Alger	Bir Touta	R	05-05-2019	Blanche	<i>Proteus sp</i>	+	+	>8
FI9BPSG	Bejaia	Porte sarasine	R	28-04-2019	Blanche	<i>Proteus sp</i>	+	+	>8
FE6MP	Bejaia	300Lgmt	P	28-02-2019	Blanche	<i>Proteus sp</i>	+	+	>8
FI8GSAA	Sétif	Amoucha	RA	25-12-2018	Blanche	<i>S.maltophilia</i>	+	+	>8
FE13G	Sétif	Amoucha	RA	25-12-2018	Blanche	<i>S.maltophilia</i>	+	+	>8
FE3BG	Sétif	Amoucha	RA	25-12-2018	Blanche	<i>Serratia sp</i>	+	+	>8
FE14SB(14)	Sétif	Amoucha	RB	05-03-2019	Bleu	<i>Serratia sp</i>	+	+	>8
FE5S(11)	Sétif	Amoucha	RA	25-12-2018	Bleu	<i>Serratia sp</i>	+	-	=4
FE8S(14)	Sétif	Amoucha	RB	05-03-2019	Bleu	<i>Serratia sp</i>	+	+	>8

FI5ALR	Alger	Bir Touta	R	05-05-2019	Bleu	<i>Serratia sp</i>	+	+	> 8
--------	-------	-----------	---	------------	------	--------------------	---	---	-----

Légende : **R:** restaurant, **FD:** Fast Food, **P:** Pezziria, +: croissance, - : pas de croissance

D'après les résultats obtenus et en fonction de l'identification probable, on note la présence de souches naturellement résistantes à la colistine telles que: les *Proteae*, *Serratia sp*, *Chromobacterium spp*, *Burkholderia*. Il est à rappeler que nous avons réalisé un criblage sur gélose EMB. Il est nécessaire de faire des CMI en milieu liquide avec la colistine pure (à usage laboratoire) pour en tirer des conclusions concernant les autres souches qui sont naturellement sensibles.

Discussion

Khamesipour et ses collaborateurs en 2018, dans leur synthèse bibliographique ont rapporté que sont porteuses de bactéries sur la surface du corps et à l'intérieur du tube digestif. L'étude de Ranjbar et ses collaborateurs (2016) réalisée au niveau de plusieurs niches (cuisines, fermes, hôpitaux, hôpitaux vétérinaires, abattoirs) en Iran a enregistré le portage de *K. pneumoniae* résistantes aux antibiotiques (dont les β -lactamines) dans les cuisines (6%).

Dans notre étude, nous nous sommes intéressées aux bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes et/ou à la colistine. Ainsi, des souches appartenant à plusieurs genres ont été identifiées. Ces observations peuvent être interprétées en fonction de la présence de déchets organiques dans ces espaces (restaurants). Sur les 231 souches isolées, 6 bacilles à Gram négatif non fermentaires sont probablement producteurs de carbapénémases. Il faut noter que nous avons réalisé une identification présomptive des souches bactériennes. Ainsi, les souches des BGN-NF dont 2 sont des *Stenotrophomonas maltophilia* et une *Serratia sp*, connues pour leur résistance naturelle aux carbapénèmes. *Stenotrophomonas maltophilia* résiste naturellement à la plupart des β -lactamines par production d'une M β L (L1) de classe B et d'une β -lactamase à sérine active (L2) de classe A hydrolysant les pénicillines et les céphalosporines en particulier le céfotaxime (Sougakoff *et al.*, 2003). La résistance aux carbapénèmes chez *S.marcescens* est due à la production d'enzyme SME-1, une β -lactamases de classe A.

Plusieurs sources de contaminations peuvent être impliquées. En outre, une corrélation significative a été signalée entre la prévalence de maladies gastro-intestinales, telle que la diarrhée, elles peuvent considérablement véhiculer des bactéries résistantes aux antibiotiques des environnements hospitaliers vers le milieu communautaire. Zurek et Ghosh ont démontré la relation entre l'aliment et l'acquisition de bactéries résistantes aux antibiotiques (Macovei et Zurek 2006). Une autre source de contamination peut être les effluents hospitaliers. Ainsi, ces déchets hospitaliers sont évacués sans traitement antérieur vers le réseau d'assainissement communal qui se réintègre dans les eaux de surfaces le contact perpétuel avec ces eaux usées leurs permet incontestablement de transporter des bactéries éventuellement résistantes et de les déposer dans des endroits fréquentés par l'Homme et cela se fait principalement par l'attachement de ces microorganismes sur la surface du corps ou sur la trompe buccale. L'étude de Tafoukt et ses collaborateurs faite en 2017 sur les eaux

de rivières en Algérie a mis en évidence la présence des souches d'entérobactéries productrices d'OXA-48 sur les prélèvements collectés en oued Soumam.

L'émergence de la multirésistance et le manque de développement de nouveaux antibiotiques a conduit les scientifiques à réintégrer la colistine dans le traitement des infections. Elle est considérée l'une des premières molécules utilisées à l'époque ayant une activité sur les bacilles à Gram négatif multirésistants fermentaires et non fermentaires (Jayol, 2018). La résistance à la colistine a été globalement rapportée dans les agents pathogènes à Gram négatif (Wang *et al.*, 2018) notamment par des gènes *mcr-1* (Skov *et al.*, 2016). Les études récentes ont rapportées que les mouches domestiques sont également responsables de la propagation des gènes *mcr-1*, qui confèrent la résistance chez les entérobactéries (Wang *et al.*, 2018). En Algérie le premier signalement d'un isolat résistant à la colistine (résistance par mutations chromosomiques) est publié en 2015 chez la souche *Acinetobacter baumannii* isolée chez un patient à l'hôpital de Beni-Messous à Alger. A noter qu'en 2016 une nouvelle détection de la résistance à la colistine au niveau de l'hôpital universitaire d'Annaba en Algérie a été observée chez trois souches de *K.pneumoniae* productrices d'une carbapénémase OXA-48, ainsi que chez *E. coli* isolée dans les excréments de poulet dans la région de Skikda en Algérie. L'apparition de cette résistance est due à l'utilisation de la colistine comme agent thérapeutique et un facteur de croissance chez les animaux. Durant cette étude, nous avons isolé des souches résistantes à la colistine. L'identification probable a montré que la majorité des souches isolées sont naturellement résistantes. Il est nécessaire de vérifier les CMI en milieu liquide et l'identification des souches par méthodes fiables (Maldi-TOF) pour pouvoir tirer des conclusions.

Conclusion

Gouvernée par l'utilisation prodiguée et démesurée des antibiotiques, la résistance des microorganismes à l'égard de ces molécules ne cesse d'évoluer, la destination de la course contre la découverte de nouvelles molécules semble être en faveur des bactéries.

Notre étude consacrée à la recherche de bacilles à Gram négatif dans les espaces à restauration rapide dans trois wilayas en Algérie, a illustré la présence de BGN-NF probablement producteurs de carbapénèmases révélant ainsi une résistance au mérépénème. Ce phénomène est observé dans l'environnement hospitalier ainsi que dans l'environnement urbain. En effet, ces insectes peuvent parcourir des surfaces très vastes et capables de franchir toutes les barrières qui séparent des environnements différents, ainsi ils collaborent à la dissémination de bactéries résistantes.

Les pratiques d'hygiène dans les espaces à restauration rapide doivent être tenues à la rigueur, un nettoyage quotidien et régulier des cuisines et des salles permettra d'éliminer en premier lieu les débris qui sont en mesure d'attirer les nuisibles, en deuxième lieu d'éliminer les salissures qui agrément l'adhérence des microorganismes sur les surfaces. Les systèmes d'aération automatisés et les lampes à UV.

En perspective, nos résultats demeurent préliminaires, et méritent d'être approfondis par:

- L'étude d'un grand nombre d'espèces dans plusieurs régions en Algérie afin d'avoir une situation plus précise sur la résistance aux antibiotiques.
- Confirmer l'identification des souches par Maldi-TOF.
- Vérifier la résistance à la colistine par la méthode des dilutions sur milieu liquide.
- Identification des mécanismes de résistance par biologie moléculaire.

Références bibliographiques

Aghapour Z, Gholizadeh P, Ganbarov K, Zahedi Bialvaei A, Suhad Saad Mahmood, Asghar Tanomand, Yousefi M, Asgharzadeh M, Yousefi B and Samadi Kafil H. 2019. Molecular mechanisms related to colistin resistance in Enterobacteriaceae. Infection and Drug Resistance. Dove Press journal. 12: 965–975.

Aktaş Z, Kayacan C.B, Schneider I, Can B, Midilli K, Bauernfeind A. 2008, Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase, OXA-48, Persists in *Klebsiella pneumoniae* in Istanbul, Turkey. Chemotherapy. 54:101–106

Alves T, Lara G.H.B, Maluta R.P, Ribeiro M.G and Leite D.S. 2018. Carrier flies of multidrug-resistant *Escherichia coli* as potential dissemination agent in dairy farm environment. Science of the Total Environment. 633: 1345–1351.

Andere A and Picard C J. 2016. Genome sequence of *Phormia regina* Meigen (*Diptera: Calliphoridae*): Implications for medical, veterinary and forensic. BMC Genomics.17:842-859.

Anonyme. 2018. Les mouches sont de véritables risques d'hygiène ambulants Rentokil. <https://www.rentokil.fr/.../les-mouches-sont-de-veritables-risques-dhygiene-ambulants>. 2019. 22-03-2019.

Baba Ahmed-Kazi Tani Z, Arlet G. 2014. News of antibiotic resistance among Gram-negative bacilli in Algeria. Pathol Biol. 62:169-78.

Bouamama L, Sorlozano A, Laglaoui A, Lebbadi M, Aarab A and Gutierrez J. 2010. Antibiotic resistance patterns of bacterial strains isolated from *Periplaneta americana* and *Musca domestica* in Tangier, Morocco. J Infect Dev Ctries. 4:194-201.

Bush K and Jacoby G.A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 54: 969-76.

Bush K. 2013. Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. Ann. N.Y. Acad. Sci.1277: 84-90.

Cannatelli A, Principato S, Colavecchio O L and Pallecchi L. 2018. Synergistic Activity of Colistin in Combination With Resveratrol Against Colistin-Resistant Gram-Negative Pathogens. 9:1808.

Cantón R, González-alba J.M and Galán J.C. 2012. CTX-M enzymes : origin and diffusion. Antimicrobial Resistance Chemotherapp. 3: 1-19.

Carrër A., Poirel L, Yilmaz M, Akan O.A, Feriha C, Cuzon G, Matar G, Honderlick P. and Nordmann P. 2010. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. Antimicrobial Agents Chemotherappy. 54:1369-1373.

Cavallo J.D, Fabre R, Jehl F, Rapp C and Garrabé E. 2004. Bêta-lactamines. EMC-Maladies Infectieuses. 1: 129-202.

Djahmi N, Dunyach-Remy C, Pantel A, Dekhil M, Sotto A and Lavigne J.P. 2014. Epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean countries. Biomed. Res. Int. Volume 1-11.

Drioux L, Brossier F, Sougakoff W, and Jarlier V. 2008. Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. Clin Microbiol Infect.14:90-103.

Dortet L, Bonnin R A and Jousset G, Gauthier L. 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. 18:139-159.

Elhani D. 2011. Does the emergence of antibiotic resistance announce the return of the dark ages. Ann Biol Clin. 69: 637-46.

Graczyk TK, Knight R, Gilman RH, Cranfield MR. 2001.The role of non-biting flies in the epidemiology of human infectious diseases.Microbes Infect.3: 231-235.

Grall N, Andreumont A and Armand-Lefèvre L. 2011. Carbapenem resistance: Towards a new dead end. Journal des Anti-Infectieux. 13: 87-102.

Guessennd N.K, Ouattara M.B, Ouattara N.D, nevry R. K, gbonon V, Tiekoura K. B1, Dosso M and le Ger BMR. 2013. Etude des Bacteries multiresistantes Des effluents Hospitaliers D'un Centre Hospitalier et Universitaire CHU de la ville d'Abidjan (Cote d'Ivoire). *Journal of Applied Biosciences*. 69:5456-5464.

Hawkey PM. 2008. Prevalence and clonality of extended-spectrum beta-lactamases in Asia. *Clin Microbiol Infect*. 1:159-65.

Jarlier V, Nicolas M.H, Fournier G, and Philippon A. 1988. Extended Broad-Spectrum -Lactamases Conferring Transferable Resistance to Newer -Lactam Agents in Enterobacteriaceae: Hospital Prevalence and Susceptibility Patterns." *Clinical Infectious Diseases*. 10: 867-878.

Jayol A. 2018. Résistance à la colistine chez les bacilles Gram négatif. *Microbiologie et Parasitologie*. Thèse de doctorat Université de Bordeaux, n°:180p.

Jobayer M, Afroz Z, Nahar S., Begum A, Begum S.A and Shamsuzzaman S.M. 2017. Antimicrobial susceptibility pattern of extended-spectrum beta-lactamases producing organisms isolated in a Tertiary Care Hospital, Bangladesh. *Int. J. App. Basic. Mediated.Resistance*.7: 189-192.

Khamesipour F, Lankarani K B, Honarvar B and Kwenti T.E. 2018. A systematic review of human pathogens carried by the housefly (*Musca domestica L*). *BMC Public Health*. 18: 1049

Kuo S. C, Yang S. P, Lee Y.T, Chuang H.C, Chen C. P, Chang C. L, et al. 2013. Dissemination of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* with new plasmid-borne *bla_{OXA-72}* in Taiwan. *BMC Infection*. 13:319.

Lee Y.T, Wang Y-C, Kuo S-C, Chen C-T, Liu C-P, Liu Y-M, Chen T-L, and Yang Y-S. 2019. Multicenter Study of Clinical Features of Breakthrough *Acinetobacter Bacteremia* during Carbapenem Therapy. volume page

Loucif L, Gacemi-Kirane D, Cherak Z, N Chamlal N, Grainat N, and Rolain M. 2016. First Report of German Cockroaches (*Blattella Germanica*) as Reservoirs of CTX-M-15 Extended-Spectrum- β -Lactamase- and OXA-48 Carbapenemase-Producing

Enterobacteriaceae in Batna University Hospital, Algeria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 10: 6377–80.

Macovei L and Zurek L. 2006. Ecology of Antibiotic Resistance Genes: Characterization of *Enterococci* from Houseflies Collected in Food Settings. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. 72: 4028–4035.

Nazari M, Mehrabi T, Mostafa Hosseini S.M and Yousef Alikhani M.Y. 2017. Bacterial Contamination of Adult House Flies (*Musca Domestica*) and Sensitivity of these Bacteria to Various Antibiotics, Captured from Hamadan City, Iran. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 11: 04-07

Nordmann and Carrer. Les carbapénèmases des entérobactéries.2010. Elsevier Masson SAS. *Archives de Pédiatrie*. 17:154-162.

Nordmann P, Jayol A and Poirel L. 2016. A Universal Culture Medium for Screening Polymyxin-Resistant Gram-Negative Isolates. Emerging Antibiotic Resistance Unit, Medical and Molecular Microbiology, Department of Medicine, Faculty of Science, University of Fribourg,a and HFR-Hôpital .Cantonal,b Fribourg, Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*.54:1395- 1399

Nüesch-Inderbilen M, Zurfluh K, Hächler H and Stephan R. 2013. No evidence so far for the dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in the community in Switzerland. 2:23page.

Pitout J.D.D, Nordmann P and Poirel L. (2015). Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. (59): 5873-5884.

Ranjbar R, Morteza I, Taghi T, Hafshejani, Khamesipour F. (2016). Molecular detection and antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae* from house flies (*Musca domestica*). *Journal of Infection and Public Health*.

Rodríguez-Martínez JM, Poirel L and Nordmann P. 2009. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. VOLUME PAGE

Ruppé E.2010. Épidémiologie des bêta-lactamases à spectre élargi : l'avènement des CTX-M. *J Anti Infect*. 12: 3-16.

Ruppé E, Woerther PL and Barbier F. 2015. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Annals Intensive Care.* 5:21-36.

Sibhghatulla S., Jamale F., Shazi S., Syed M., Danish R. and Mohammad Amjad K. 2015. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases : Types, epidemiology and treatment. *Saudi J. Biol. Sci.* 1: 90–101.

Skov R.L and Monnet D.I. 2016. Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-Igene*): three months later, the story unfolds. *Euro Surveill.* 21: 3015.

Tafoukt R, Touati A, Leangapichart T, Bakour S and Rolain J.M. (2017). Characterization of OXA-48-like-producing *Enterobacteriaceae* isolated From river water in Algeria, *Water Research. Infection and Drug Resistance.* Volum page

Toumi S, Meliani S, Amoura K, Rachereche A, Djebien M and Djahoudi A. 2018. Multidrug-resistant Gram-negative bacilli producing oxacillinases and Metallo- β -lactamases isolated from patients in intensive care unit - Annaba hospital – Algeria. *Journal of Applied Pharmaceutical Science.* 07:107-113.

Van der Zwaluw k, De Haan A, Pluister G.N, Boostma H.J, De Neeling A.J and Schouls L.M. 2015. The carbapenem inactivation method(CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in Gram-negative rods. *PLoS One.* 10:

[Wang R](#), [Dorp L.V](#), [Liam P. Shaw](#), [Bradley P](#), [Wang Q](#), [Wang X](#), [Jin L](#), [Zhang Q](#), [Liu Y](#), [Rieux A](#), [Dorai-Schneiders T](#), [Weinert L.C](#), [Iqbal Z](#), [Didelot X](#), [Wang H](#) and [Balloux f](#). 2018. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-I*. *revu* 9:1179.

Wolff. M, Joly-Guillou M. L and Pajot O. 2009. Les carbapénèmes. Elsevier Masson SAS. 18: 199-208.

Zurek. L, Ghosh. H. 2014. Insects Represent a Link between Food Animal Farms and the Urban Environment for Antibiotic Resistance Traits. *Applied and Environmental Microbiology.* 80 : 3562–3567.

Annexe I

La composition des milieux de culture

1 .Milieu BHIB (bouillon au cœur cerveau)

Composition (g/L)	
1 litre	37g
pH	7.4
Cœur cerveau infusion	37

2. Gélose Mac conkey

Composition (g/L)	
1 litre	51.5g
pH	7.1
Peptone de viande	3g
Peptone de caséine	17g
Lactose	10g
Mélange de sels biliaires	1.5g
Chlorure de sodium	5g
Rouge neutre	0.03g
Agar bactériologique	13.5g
Crystal violet	0.01g

3. Gélose Mueller Hinton

Composition (g/L)	
1 litre	38g
pH	7.3
Hydrolysate de caséine	17.5g
Amidon soluble	1.5g
Agar	17g
Infusion de viande	2g

4. Gélose EMB (Eosine Bleu de Méthylène)

Composition (g/L)	
1 litre	36g
pH	7.2
Peptone bactériologique	10g
Lactose	10g
Eosine	0.4g
Agar	13g
Bleu de méthylène	0.065g
Hydrogène phosphate de potassium	2g
Sucrose	5g

5. Bouillon nutritifs

Composition (g/L)	
1 litre	20g
pH	7.2
Extrait de viande	5g
Peptone	10g

Chlorure de sodium	5g
--------------------	----

6. Gélose TSI (triple sugar iron)

Composition (g/L)	
pH	7.4
Extrait de viande de bœuf	3g
Extrait de levure	3g
Peptone tryptique	20g
Chlorure de sodium	5g
Citrate ferrique	0.3g
Thiosulfate de sodium	0.3g
Lactose	10g
Glucose	1g
Saccharose	10g
Agar	12g

8. Milieu citrate de simmonces

Composition (g/L)	
1 litre	29.28g
pH	6.6
Ammonium dihydrogenophosphate	1g
Phosphates dipotassique	1g
Chlorure de sodium	5g
Citrate de sodium	2g
Sulfate de magnésium	0.2g
Bleu de bromothymol	0.08g
Agar	20g

9. Milieu Urée Indole

Composition (g/L)	
Tryptophane	3g
Urée	20g
Phosphate monopotassique	1g
Phosphate bipotassique	1g
Chlorure de sodium	5g
Rouge de phénol	2.5g
Alcool à 95°	10g

10. Milieu Clark et Lubs

Composition (g/L)	
1 litre	17g
PH	6.9
Peptone tryptique de viande	5g
Phosphate bopotassique	5g
Glucose	6g

11. Bouillon nitrate

Composition (g/L)	
pH	7.2
Infusion de cœur servelle	25g
Nitrate de sodium	10g

Annexe II

La composition des réactifs

Tableau I: Liste des réactifs utilisés.

Réactif	Composition	Utilisation
NR1 et NR2	Acide sulfanilique et Acide acétique.....NR1 Diméthylamine et Acide acétique.....NR2	Révélation de nitrate réductase
Rouge de méthylène(RM)	Rouge de méthyle, Alcool éthylique à 60%	Révélation de la formation d'acides mixtes
Réactif de Kovac	p-diméthylaminebenzaldéhyde acidechloridrique, alcoolamylique	Mettre en évidence la production de l'indole
VP1	a-naphtol et alcool à 90°	Révélation de la formation d'acétoïne
VP2	NaOH 4N	Révélation de la formation d'acétoïne

Annexe III

Tableau II: Liste des antibiotiques utilisés pour étudier la sensibilité des souches BGN.

Antibiotique	Abréviation	La charge	La marque	Les diamètres critique		La classe
				Sensible ≥ S	Résistante < R	
meropénème	MER	10 µg	CYPRESS Diagnostic et Bio -rad	21mm	18mm	Carbapénème
Amoxicilline/AC. Clavulanique	AMC	30 µg	CYPRESS Diagnostic	19mm	19mm	aminopinicilline
Céfoxitine	FOX	30 µg	CYPRESS Diagnostic	19mm	15mm	Céphamycine
Ceftazidime	CAZ	30 µg	liofilchem	26mm	21mm	C3G
Céfotaxime	CTX	30 µg	liofilchem	20mm	17mm	C3G
Céfipime	FEP	30 µg	liofilchem	27mm	21mm	C4G

Résumé

Objectif : la transmission de bactéries multirésistantes dans le milieu communautaire engendre un problème de santé publique.

Méthodes : A partir de 136 échantillons, 231 souches ont été isolées et sont identifiées à l'aide d'une galerie biochimique classique. La résistance aux β -lactamines est révélée par l'utilisation du test CIM, d'antibiogramme classique incluant le DD-test avec et sans cloxacilline. Un criblage des souches résistantes à la colistine est réalisé.

Résultats : Sur un total de 231 souches, 6 souches révèlent une résistance probable aux carbapénèmes sont isolées de la région de sétif.

Conclusion : Leur contact étroit avec l'Homme constitue une voie de contamination pouvant conduire à des impasses thérapeutiques.

Mots clé : Résistance aux carbapénèmes, Bacilles à Gram négatif, espace à restauration rapide.

Abstract

Objective: Multidrug-resistant bacteria in the community creates a public health problem. The objective of this study was to search for carbapenem-resistant gram-negative bacilli in fast-food in three wilaya in Algeria.

Methods: From 136 samples, 231 strains were isolated and were identified using a conventional biochemical tests. β -lactams resistance is evaluated using CIM test, DD-test with and without cloxacillin. A screening of colistin-resistant strains is carried out.

Result : Six strains (BGN) are probably producing carbapenemases.

Conclusion: Their close contact with humans is a way of contamination that can lead to therapeutic impasses.

Key words: Carbapenem resistance, Gram-negative bacilli, Fast-food.