²REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES



Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de Master

En Sciences de la nature et de la vie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

- **Bakhti Nour ELhouda**
- **Benyahia Zoubida**

Thème :

Etude des Entérobactéries productrices de béta-lactamases à spectre élargi dans les infections nosocomiales

Soutenue publiquement le : **02 /07/2025** Devant le jury composé de :

Abes Rachida	**MCA**	**Blida**	**Présidente**
Akloul Kamel	**MCB**	**Blida**	**Examinateur**
Bourahla Amel	**Médecin**	**Médéa**	**Encadreur**
Rahal Mohamed	**MCA**	**Médéa**	**Co Encadreur**

Année universitaire

2024-2025

DEDICACES

Je dédie ce travail ;

A "*Allah*"le Tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce travail….

À ma chère mère Louacine Khira ♡ Pour tout ton amour, ton soutien indéfectible et tes innombrables sacrifices. Merci pour ta patience, tes précieux conseils et ta présence constante à mes côtés. Vous avez été ma force dans les moments de doute, ma lumière dans l'obscurité.

Ce travail est le fruit de ton amour et de ta foi en moi. Je te le dédie de tout cœur, avec une infinie reconnaissance.

À mon père Abdelkrim♡ qui peut être fier de retrouver ici le fruit de longues années de sacrifices, de patience et de renoncements. Ton soutien infaillible, ta force silencieuse et ton amour discret ont tracé pour moi le chemin de la réussite.

A ma sœur FatimaElzhraa , avec tout mon amour et ma gratitude, pour ta bienveillance et ton appui sans faille

À mes très chers frères Kamel♡, *Mohamed*♡, Puisse Allah le Tout puissant vous réjouir, vous combler d'avantage, vous apporter du bonheur et vous protéger.

À l'épouse de mon oncle, *Kamli fatiha* ♡, que mille miséricordes descendent sur elle.

A tous mes amis *Nour*♡**, Mounira♡, Wissam♡, Anis♡, a toute ma famille et cousins et cousines. Tous mes amis que je n'ai pu citer,** pour leurs amours et leurs encouragements

A tous mes camarades de la promotion *microbiologie applique* ♡*2025* Merci pour les bons moments qu'on a passés ensemble.

À tous ceux qui ont été à mes côtés jusqu'à aujourd'hui.

MERCI A TOUS

ZOUBIDA ♡



Dédicaces

Avant tout, nous remercions Allah qui nous a donné le courage et la volonté poursuivre nos études.

Je dédie ce modeste travail à :

Ma chère maman Rahmani Houria

À celle qui m'a donné la vie et a empli mes jours de son amour inépuisable, À celle à qui je dois les plus belles choses de mon âme, ma chère mère. Tu m'as accompagnée de ton regard et de ton cœur à chaque instant, Veillant sans relâche à mon bien- être, me couvrant d'un amour, d'une patience et d'un dévouement incomparables. Tu as été mon refuge dans la peur, la lumière de mon chemin dans mes égarements, Et tes prières étaient le battement qui me portait à chaque chute.

Je sais que mes mots ne suffisent pas à exprimer ta gratitude, Mais j'espère que ce travail est le reflet sincère de tes sacrifices, Et l'accomplissement d'un rêve que tu as longtemps préservé pour moi.

Je t'offre cette réussite avec tout l'amour et toute la gratitude que porte mon cœur, en priant Dieu de te préserver d'allonger tes jours, de t'accorder bonheur et sérénité, Et de me permettre d'être toujours la fille qui réjouit ton cœur et fait ta fierté.

A mon cher père ELHADJ

En ce moment où s'achève un long chemin de fatigue et de veilles, ma joie ne serait complète sans toi. Toi qui as donné au temps un sens, à l'encouragement une voix, et dont le silence était une prière qui m'accompagnait à chaque pas.

Quand j'ai douté, tu étais ma foi. Quand j'ai eu peur d'avancer, tu étais la force qui me soutenait.

Tout ce que j'ai accompli aujourd'hui n'est que le prolongement de ta main qui ne m'a jamais lâchée.

Je demande à Dieu de t'honorer comme tu m'as honorée par ta tendresse, de t'accorder des bénédictions qui te comblent, et de te préserver une santé durable, ainsi qu'un bonheur qui illumine tes jours et remplit mon cœur de fierté pour toi. Ma réussite ne m'appartient pas seule… elle est une page parmi tant d'autres écrites par ton dévouement inépuisable.

A mon cher frère Abderrahmane et mes sœurs Aicha et Nesrine

Je ne peux exprimer à tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers vous.

A mes chères amies

Djamila, Ikram, Lina, Lilya, Sihem, Sarah, Houssem et Yasser

Que Dieu vous protège et prolonge votre vie

Merci

Nour ELhouda



Remerciements

El hamdoulillah, nous exprimons notre reconnaissance envers Dieu, le Miséricordieux, le Tout-Puissant, pour nous avoir accordé le courage, la patience et la volonté à l'aboutissement de ce travail.

Nous exprimons notre plus grande reconnaissance et nos plus vifs remerciements à nos promotrice **Dr. BOURAHLA AMEL** et Co promoteur **Dr. RAHAL MOHAMED**, pour leur soutien dans la direction du projet et pour avoir guidé ce travail en conjuguant habilement disponibilité, conseils et critiques constructives.

Nous vous remercions vivement de nous avoir fait l'honneur de diriger ce travail sans ne jamais Veuillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération et notre profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines.

Nous tenions à remercier la précédente **Mme Abes Rachida** et l'examinateur **Akloul Kamel** qui ont aimablement accepté de faire partie de nos jurys du mémoire. Sincères remerciements.

Nous tenons également à remercier tout le personnel du laboratoire de microbiologie de l'hôpital Mohamed BOUDIAF à Médéa pour leur gentillesse et pour nous avoir accueillir au sein de leur laboratoire pour leur bienveillance et leur éclaircissement et leur appui scientifique dans la recherche.

Nous tenons à saisir un remerciement assez spécial pour Nous-mêmes pour toute la patience qu'on a préservé le long de ce semestre et de pouvoir passer tous les obstacles et les difficultés qu'on a pu combattre ensemble tout en gardant le sourire et notre esprit éducatif qui a marqué notre trace durant toutes ces années d'étude.

À nos parents, à nos familles et nos amies qui par leurs prières leur amour leur soutien et leur patience ainsi qu'à leurs encouragements, nous avons pu surmonter tous les obstacles au cours de la réalisation de ce mémoire.

Merci

Résumé

Les entérobactéries productrices de Béta-Lactamase à Spectre Élargi représentent une cause fréquente d'infections nosocomiales, difficiles à traiter en raison de leur forte résistance aux antibiotiques. Malgré les mesures de prévention, leur présence en milieu hospitalier reste préoccupante.

L'objectif principal de ce travail, réalisé au laboratoire de l'hôpital de Médéa, était d'identifier ces Entérobactéries BLSE à partir de divers prélèvements pathologiques (urines, pus, LCR, hémoculture), d'évaluer leur profil de résistance aux antibiotiques et d'analyser la présence et la combinaison des gènes de résistance.

L'étude combine une analyse rétrospective des entérobactéries N = 550 souches, dont 53 (10 %) sont identifiés comme producteurs de BLSE, ainsi qu'une étude prospective de 25 souches intégrant des techniques moléculaires (PCR)

Les espèces les plus fréquemment identifiées sont *Escherichia coli* (38 %) et *Klebsiella pneumoniae* (27 %), retrouvées principalement dans les prélèvements de pus (51 %) et d'urines (38 %). La distribution touche divers services, notamment la chirurgie et la gynécologie. Les profils de résistance montrent une multi-résistante marquée aux β-lactamines et fluoroquinolones, mais une bonne sensibilité est conservée vis-à-vis de l'imipéneme et de l'amikacine.

Concernant le mécanisme de résistance, les souches EBLSE ont montré une résistance à plusieurs béta-lactamines, mais restaient sensibles à la céfoxitine (FOX) et aux pénèmes. Une résistance de 57% à la Gentamicine a été observée, tandis que l'Amikacine restait efficace. La résistance à la ciprofloxacine était de 64%.

L'étude génotypique a identifié la présence des gènes de résistance TEM (38%) et AAC (57%), avec une prédominance du gène TEM chez *E. coli* et *K. pneumoniae.*

En conclusion, cette étude révèle une prévalence notable des Entérobactéries productrices de BLSE dans les infections nosocomiales à Médéa, menaçant gravement les options thérapeutiques. Il est impératif d'intensifier la surveillance, la prévention et la détection rapide pour juguler la dissémination de ces résistances.

Mots-clés : Entérobactéries, Infections nosocomiales, β-lactamines, PCR.

Résumé

ملخص:

تمثل البكتيريا المعوية المنتجة للبيتا-لاكتاماز واسعة الطيف (BLSE) سببًا شائعًا للعدوى المكتسبة من المستشفيات، ويصعب علاجها بسبب مقاومتها القوية للمضادات الحيوية .على الرغم من تدابير الوقاية، لا يزال وجودها في البيئة الاستشفائية يثير القلق.

الهدف الرئيسي من هذا العمل، الذي تم إجراؤه في مختبر مستشفى المدية، هو تحديد هذه البكتيريا المعوية المنتجة BLSE من عينات مرضية مختلفة) البول، القيح، السائل الدماغي الشوكي، زراعة الدم(، وتقييم نمط مقاومتها للمضادات الحيوية، وتحليل وجود وتوليفة جينات المقاومة.

تجمع الدراسة بين تحليل استعادي للبكتيريا المعوية) ن 550 = سلالة(، تم تحديد 53 منها (% 10) كمنتجة BLSE، بالإضافة إلى دراسة مستقبلية لـ 25 سلالة تتضمن تقنيات جزيئية.(PCR)

الأنواع الأكثر شيوعًا التي تم تحديدها هي *Escherichia coli* (% 38) و *Klebsiella pneumoniae* (27 %)، والتي تم العثور عليها بشكل أساسي في عينات القيح (% 51) والبول .(% 38) يشمل التوزيع أقسامًا مختلفة، ولا سيما الجراحة وأمراض النساء .تظهر أنماط المقاومة مقاومة متعددة ملحوظة للبيتا-لاكتام والفلوكيروكسينونات، ولكن يتم الحفاظ على حساسية جيدة تجاه الإيميبينيم والأمينوغليكوزيدات.

فيما يتعلق بآلية المقاومة، أظهرت سلالات BLSE مقاومة للعديد من البيتا-لاكتام، لكنها ظلت حساسة للسيفوكسيتين (FOX) والبينيمات .لوحظت مقاومة بنسبة % 57 للجنتاميسين، بينما ظل الأميكاسين فعالًا .بلغت مقاومة السيبروفلوكساسين .% 64 وحددت الدراسة الوراثية الجينية وجود جينات المقاومة (% 38) TEM و AAC (% 57)، مع سيادة جين TEM في *E. coli* و*K. pneumoniae*

في الختام، تكشف هذه الدراسة عن انتشار ملحوظ للبكتيريا المعوية المنتجة BLSE في العدوى المكتسبة من المستشفيات في المدية، مما يشكل مشكلة صحية عامة رئيسية بسبب تقليل الخيارات العلاجية .من الضروري تكثيف المراقبة والوقاية واستراتيجيات الكشف السريع للحد من انتشار هذه المقاومات.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا المعوية، العدوى المكتسبة من المستشفيات، بيتا–لاكتام، تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR)

Résumé

Abstract:

Enterobacteriaceae producing Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) represent a frequent cause of nosocomial infections, difficult to treat due to their high antibiotic resistance. Despite prevention measures, their presence in the hospital environment remains a concern.

The main objective of this work, carried out in the laboratory of Medea Hospital, was to identify these ESBL-producing Enterobacteriaceae from various pathological samples (urine, pus, CSF, blood culture), to evaluate their antibiotic resistance profile, and to analyze the presence and combination of resistance genes.

The study combines a retrospective analysis of Enterobacteriaceae (N = 550 strains), of which 53 (10%) were identified as ESBL producers, as well as a prospective study of 25 strains integrating molecular techniques (PCR).

The most frequently identified species are *Escherichia coli* (38%) and *Klebsiella pneumoniae* (27%), found mainly in pus (51%) and urine (38%) samples. The distribution affects various departments, notably the surgery and gynecology. Resistance profiles show marked multi-resistant to β-lactams and fluoroquinolones, but good sensitivity is maintained towards imipenem and aminoglycosides.

Regarding the resistance mechanism, ESBL strains showed resistance to several beta-lactams but remained sensitive to cefoxitin (FOX) and carbapenems. A resistance of 57% to Gentamicin was observed, while Amikacin remained effective. Resistance to ciprofloxacin was 64%. Genotypic study identified the presence of TEM (38%) and AAC (57%) resistance genes, with a predominance of the TEM gene in *E. coli* and *K. pneumoniae.*

In conclusion, this study reveals a notable prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in nosocomial infections in Medea, highlighting a major public health problem due to the reduction of therapeutic options. It is imperative to intensify surveillance, prevention, and rapid detection to curb the dissemination of these resistances.

Keywords: Enterobacteriaceae, Nosocomial infections, β-lactams, PCR.

Liste des abréviations

- **AK :** Amikacine.
- **AMC :** Amoxicilline-acide clavulanique.
- **AMP :** Ampicilline.
- **API 20E :** Analytical profile index 20E (E= Entérobactéries).
- **ATB :** Antibiotique.
- **BGN :** Bacille gram négatif.
  BHIB: Brain Heart Infusion Broth
- **BLSE :** Béta-lactamase à spectre élargi.
- **C** : Chloramophénicol.
- **C1G :** Céphalosporine de première génération.
- **C2G :** Céphalosporine de deuxième génération.
- **C3G :** Céphalosporines de troisième génération.
- **C4G :** Céphalosporines de troisième génération**.**
- **C5G : :** Céphalosporines de cinquième génération.
- **CA-SFM** : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.
- **CIP :** Ciprofloxacine.
- **CMI :** Concentration minimale inhibitrice.
- **CN:** Gentamicine.
- **CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute.
- **CRO :** Céftriazone.
- **CT :** Colistine.
- **CTX :** Céfotaxime.
- **CTX-M :** Cefotaximase-Munich
- **DNTPs :** désoxynucléotides triphosphates.
- **E-BLSE :** Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi.
- **ECA :** Antigène de Kunin**.**
- **ECBU :** Examen cytobactériologique des urines.
- **EDTA :** Acide Ethylène-Diamine-Tétraacétique.
- **IAS :** Infections associées aux soins.
- **IN :** Infection nosocomiale
- **IPM :** Imipénème.
- **IRT :** TEM résistantes aux inhibiteurs.
- **ISO :** Infections du site opératoire.
- **GN :** Gélose nutritive.
- **GSC :** Gélose au sang cuit.
- **KZ :** Céfazoline.
- **LCR :** liquide céphalorachidien.
- **MH :** Gélose Muller Hinton.
- **$MgCl_2$:** Chlorure de magnésium
- **NA :** Acide nalidixique.

- **OMS :** Organisation Mondiale de la Santé.
- **PCR :** Réaction de polymérisation en chaîne
- **PLP :** Protéines liée aux pénicillines.
- **PRL :** Pipéracilline.
- **R :** Résistance.
- **S :** Sensible.
- **SARM :** Staphylococcus aureus méticillinorésistant.
- **Spp :** Species pluralis.
- **SHV :** Sulfhydryl variable.
- **SXT :** Triméthoprime-sulfaméthoxazole.
- **TBE :** Tris-Borate-EDTA**.**
- **TEM :** Temoneira : nom du malade chez qui la première souche a été isolée.
- **TIC :** Ticarcilline.
- **V. P+ :** Réaction de Voges-Proskauer positive.
- **UPEC :** *Escherichia coli* uropathogènes.

Liste des figures

Figure01 : Taux d'infections nosocomiales au CHU de Tizi Ouzou et en réanimation médicale (2010 - 2016) 7

Figure 02 : Caractères biochimiques de quelques entérobactéries …….…… ..14

Figure 03 : Structure chimique de noyau beta-lactame 16

Figure 04 : Principales structures des β-lactamines……..…..…16

Figure05 : Schéma d'hydrolyse de cycle β-lactame 19

Figure 06 : BLSE dérivées de TEM 22

Figure 07 : BLSE dérivées de SHV 23

Figure 08 : Phylogénie des β-lactamases chromosomiques de L'espace Klutvera spp. Et des CTX-M..... 24

Figure 09 : Prélèvements en cas normale……34

Figure 10 : Etat frais des urines et des LCR au microscope 35

Figure 11 : Colonies bactériennes sur milieu gélose nutritif et milieu hektoen.....36

Figure 12: *Escherichia coli* au microscope optique.....37

Figure13 : Test de catalase positif (+).....38

Figure 14 : Test d'oxydase négatif.....38

Figure 15: Identifications des souches BLSE par la galerie API 20 de deux différents prélèvements**.**.....40

Figure 16 : Antibiogramme d'entérobactérie.....42

Figure 17 : Test de synergie positif de différentes souches des entérobactéries…….....43

Figure 18 : Test espagnol positif d'Entérobactérie…….…...….44

Figure 19 : Souches conservées avant et après l'enrichissement……..……...…45

Figure 20 : Identification ses souches par Chromagar……..…..…...45

Figure 21 : Méthode de conservation…….…...47

Figure 22 : Repiquage des entérobactéries sur milieu Hektoen……...……48

Figure23 : solution d'extraction **……...….**49

Fegure24 : Appareil thermo-agitateur……..…....50

Figure 25 : Préparation des mix ……..……..51

Figure 26 : Manipulation sur la hotte Biocap ……52

Figure 27 : Amplification des souches dans le thermocycleur ……...52

Figure 28 : Migration d'ADN par la cuve d'électrophorèse ……55

Figure29 : Réparation des entérobactéries selon le type de prélèvements à Médéa de 2023 à 2025…… 57

Figure 30: Répartition des souches d'entérobactéries en fonction du sexe …….... 58

Figure 31 : Répartition des souches d'entérobactéries selon les services ……..58

Figure 32 : Répartition des souches d'entérobactéries selon l'espèce ……59

Figure 33 : Répartition des souches d'E-BLSE selon le type de prélèvement…….60

Figure 34 : Répartition des E-BLSE selon le sexe……. 60

Figure 35 : Répartition des souches selon le type services……..61

Figure36: Répartition des souches d'entérobactéries BLSE (+) selon l'espèce (n=53)..61

Figure 37 : Profil de résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries BLSE (+)(n=53)…… ……62

Figure 38 : Profil de résistance et de sensibilité *d'Escherichia coli* BLSE (+) (n=53) ……..……...… …63

Figure 39 : Profil de résistance et de sensibilité *de Klebsiella pneumoniae* BLSE (+) (n=53) …… …63

Figure 40 : Profil de résistance et de sensibilité *d'Enterobacter spp* BLSE (+) (n53) ...64

Figure 41 : Profil de résistance et de sensibilité de *Proteus spp* BLSE (+) (n=53)……..64

Figure 42 : Répartition selon le type de prélèvement (n=25) …….……65

Figure 43 : Répartition selon le sexe (n=25) …… ……....65

Figure 44 : Répartition selon du service (n=25) ……. …….....65

Figure 45 : Répartition selon l'espèce (n=25) …….……...66

Figure 46 : Profil de résistance de *E. coli* (n=25) …….……...….66

Figure 47 : Profil de résistance *de K. pneumonie* (n=25) ……..…67

Figure 48: Profil de résistance *d'Enterobacter spp (n*=25) ……67

Figure 49 : Profil de résistance de *Proteus spp* (n=25) ……..…….…..……...…..67

Figure 50 : La répartition des isolats selon les gènes de résistances…… …...……68

Figure 51 : Résultat d'électrophorèse du gène TEM……...…69

Figure 52 : Résultat d'électrophorèse du gène……69

Figure 53 : Résultat négative d'électrophorèse du gène QNR……...……...70

Figure 54 : Clades de différentes souches des entérobactéries BLSE +) ……..…….71

Liste des tableaux

Tableau	Titre du tableau	Page
Tableau 1	Prévalences des infections nosocomiales dans différents établissements de soins en Algérie.	**6**
Tableau 2	Caractères biochimiques de quelques entérobactéries.	**14**
Tableau 3	Classification moléculaire et fonctionnelle des bêta-lactamases.	**21**
Tableau 4	Matériels utilisés dans notre travail	**33**
Tableau 5	Milieux utilisés dans la PCR pour un seul échantillon.	**49**
Tableau 6	Amorces utilisées dans La réaction de PCR standard	**52**
Tableau 7	Répartition spécifique des clades E-BLSE	**69**
Tableau 8	Répartition des isolats selon le génotype et le phénotype des souches par rapport aux différents antibiotiques.	**70**
Tableau 9	Répartition des isolats selon des souches *E. coli* par rapport aux différents antibiotiques.	**70**
Tableau 10	Répartition des isolats selon des souches *Klebsiella pneumoniae* par rapport aux différents antibiotiques	**71**
Tableau 11	Répartition des isolats selon des souches *Enterobacter spp* par rapport aux différents antibiotiques	**71**

Table des matières :

DEDICACES

REMERCIEMENTS

RESUME

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

PRIEMIERE PARTIE : Revue Bibliographique

CHAPITRE 01 : Les Infections nosocomiales

1. **Définition**……01
2. **Les différents sites d'infection nosocomiale**……01
   - 2.1.Infection du site opératoire……01
   - 2.2.Bactériémie……...02
   - 2.3.Infection urinaire ……..…02
   - 2.4.Infection respiratoire ……...02
   - 2.5.Infection sur cathéter…….……03
   - 2.6. Autres sites……...…03
3. **Facteurs de risques** ……03
   - 3.1.Les facteurs de risque liés au germe ……03
   - 3.2. Les facteurs de risque liés aux patients……....03
   - 3.3.Les facteurs de risque liés aux l'environnement ……..04
4. **Modes de transmission**……...04
   - 4.1.Auto-infection ……..04
   - 4.2.Hétéro-infection……04
   - 4.3.Xéno-infection……..05
   - 4.4.Exo-infection……05
5. **Epidémiologie des infections nosocomiales**……..….05
   - 5.1 Au monde ……..….05
   - 5.2 En Algérie……..05
   - 5.3 En Tunisie……..07
   - 5.4 En France ……08
6. **Les bactéries responsables des infections nosocomiales**.....08

6.1.Les Cocci à Gram positif……..……08
6.2. Les bacilles à Gram négatif ……09
6.3.Autres bactéries…….…09

CHAPITRE 02 : Généralités sur les Entérobactéries……..…10

1. **Historique** …… ……..…11
2. **Définition**……11
3. **Classification taxonomique**……...12
4. **Habitat et pouvoir pathogène**……...12
5. **Caractères bactériologiques** ……12
   - 5.1. Caractères morphologiques……...12
   - 5.2. Caractères culturaux……..13
   - 5.3. Caractères biochimiques……....13
   - 5.4. Caractères antigéniques…….14
6. **Les différentes espèces des entérobactéries** ……14
   - 6.1. L'espèce *Escherichia coli*……..14
   - *6.2.* Le genre *Klebsiella* ……...15
   - 6.3. Le genre *Proteus* ……...…15
   - 6.4. Le genre *Enterobacter* ……..15
   - 6.5. Le genre *Sarratia* ……15

CHAPIITRE 03 : Les bêtalactamines

1. **Définition** ……16
2. **Structure des β-lactamines** ……16
3. **Classification** ……...16
   - 3.1. Les pénicillines ……17
   - 3.2. Les céphalosporines ……17
   - 3.3. Les carbapénèmes ……18
   - 3.4. Les monobactames ……...18
   - 3.5. Les inhibiteurs des β-lactamases……..18
4. **Résistance des entérobactéries aux β- lactamines**……18
   - 4.1. Diminution de la perméabilité membranaire ……18
   - 4.2. Hyperproduction de système d'efflux……..18
   - 4.3. Modification des protéines liées aux pénicillines ……18
   - 4.4. Résistance enzymatique par production de β-lactamase……18
     - 4.4.1. Classification β-lactamases……19
     - 4.4.2. Les bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE)…….21
     - 4.4.2.1. Définition ……...……21
     - 4.4.2.2. Les différents types de β-lactamases à spectre élargi……...…22
     - 4.4.2.2.1. Les BLSE de type Temoneira (TEM)……....22

4.4.2.2.2. Les BLSE de type Sulfhydryl variable (SHV)…… …23
4.4.2.2.3. Les BLSE de type Cefotaximase-Munich (CTX-M) ……....23
4.4.2.3. Détection des BLSE …… …....24
4.4.2.3.1. Techniques microbiologiques ……..….24

DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE

I. Méthodologie ……..32
1. L'objectif principal ……..…32
2. Type d'étude ……32
3. **Lieu d'étude et** période d'étude ……..…..32
4. Critère d'inclusion ……..…...32
5. Matériels utilisés ……..32
II. Méthode……...33
1. Prélèvements……33
2. Analyses du prélèvement……33
2.1.Examen direct ……...33
2.1.1. Examen macroscopique……..33
2.1.2. Examen microscopique ……34
2.2.Mise en culture……..35
3. Isolements et identification ……36
3.1. Coloration de gram ……36
3.2.Tests d'orientation……..…..37
3.3.La galerie API 20^{E}…… 39
4. Etude de la sensibilité aux antibiotiques…… …..40
5. Recherche de bêtalactamases à spectre élargi ……..…….… .42
5.1. Test se synergie……...42
5.2. Test double disque (test espagnol) ……43
6. Technique moléculaire (PCR) ……..…..44

TROISIEME PARTIE : Résultats et discussion

I. **Résultats**……..…….57
1. **Etude rétrospective** ……...57
1.1. Répartition globale des souches d'entérobactéries isolées……57
1.1.1. Répartition des entérobactéries selon le type de prélèvement ……..57

1.1.2. Répartition des entérobactéries selon le sexe ……57
1.1.3. Répartition des entérobactéries selon le type du service ……58
1.1.4. Répartition des entérobactéries selon l'espèce……..…59
1.2. Répartition des souches d'entérobactéries BLSE (+) ……..59
1.2.1. Répartition des souches d'entérobactéries BLSE (+) selon le type de prélèvement……..59
1.2.2. Répartition des souches d'entérobactéries BLSE (+) selon le sexe…….60
1.2.3. Répartition des souches d'entérobactéries BLSE (+) selon le type du service.....61
1.2.4. Répartition des souches d'entérobactéries BLSE (+) selon l'espèce ……..61
1.2.5. Profil de résistance globale aux antibiotiques des souches d'entérobactéries BLSE (+) ……..62
1.2.5.1. Profil de résistance *d'Escherichia coli* BLSE (+) ……62
1.2.5.2. Profil de résistance de *Klebsiella pneumoniae* BLSE (+)…….63
1.2.5.3. Profil de résistance *d'Enterobacter spp* BLSE (+)……..63
1.2.5.4. Profil de résistance de *Proteus spp* BLSE (+)…….64
2. **Etude prospective des souches E-BLSE** ……64
2.1. **Etude phénotypique des E-BLSE**……64
2.1.1. Répartition des souches E-BLSE selon le type de prélèvement……...64
2.1.2. Répartition des souches E-BLSE selon le sexe…….……...65
2.1.3. Répartition des souches E-BLSE selon type du service…….……..65
2.1.4. Répartition des souches E-BLSE selon l'espèce …….……65
2.1.5. Profil de résistance globale aux antibiotiques des souches E-BLSE (+) …….....……..…66
I.1. Etude Génotypique des E-BLSE ……..…67
I.1.1. La répartition des isolats selon les gènes de résistance…….……67
I.1.2. Les clades circulent de différentes espèces des souches E-BLSE ……...69
I.1.3. Répartition des souches selon le génotype et le phénotype ……..70
II. **DISCUSSION**……72
CONCLUSION……..…….76
REFERENCES BIBIOGRAPHIQUES ……..…76
ANNEXES……86

INTRODUCTION

Les entérobactéries forment une vaste famille de bactéries à Gram négatif retrouvées partout dans le sol, dans l'eau et surtout dans l'intestin de l'homme et des animaux, qui sont à l'origine de plusieurs maladies épidémiques et pandémiques **(Chanoine, 2012).** Elles sont parmi les souches les plus fréquemment isolées chez les patients hospitalisés. et responsables d'infections urinaires, pulmonaires, de septicémies mais également d'autres infections intra-abdominales **(Paterson, 2006).** Ces infections nosocomiales représentent aujourd'hui un problème majeur de santé publique lorsque ces bactéries constituent des complications préoccupantes de l'hospitalisation et aussi acquièrent des gènes de résistance aux antibiotiques.

À l'échelle mondiale, Selon les statistiques étrangères, essentiellement américaines, 5 à 7 % des malades hospitalisés contractent une infection nosocomiale **(Berthelot et *al.*, 2005)**

Les βéta-lactamines sont une famille d'antibiotiques largement utilisés pour traiter les infections causées par les entérobactéries. Cependant, l'utilisation massive et excessive de cet antibiotique a fortement modifié l'écosystème microbien et semble faciliter à l'augmentation du taux de bactéries résistantes. Les mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques ont beaucoup évolué depuis leur introduction, tant en termes de quantité que de qualité. Cependant, le processus enzymatique (bêta-lactamases) responsable de l'hydrolyse les bêta -lactamines est ce qui suscite le plus d'inquiétude.

Une diversification rapide de ces bêta-lactamases a été mise en évidence, accompagnée d'un élargissement de leur spectre d'activité et d'une diffusion accrue parmi de nombreuses espèces bactériennes **(Ruppé, 2010 ; Giani et *al*., 2017)**

Les infections causées par les souches productrices de BLSE sont liées à une forte morbidité et une mortalité, à une prolongation du séjour de l'hospitalier et à une augmentation des coûts d'hospitalisation **(Doit et *al*., 2010 ; Chanoine, 2012).** Les souches résistantes aux bêtalactamines sont souvent résistantes aux autres familles d'antibiotiques laissant le champ thérapeutique très réduit (**Sekhri-Arafa, 2011).**

Notre travail, mené au laboratoire de l'hôpital de Médéa a pour but d'identifier les entérobactéries responsables d'infections nosocomiales, notamment celles produisant des bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE), à partir de prélèvements pathologiques variés. En plus de leur détection, elle vise à analyser leur profil de résistance aux antibiotiques et à analyser la présence, la signification et les combinaisons des gènes de résistance au sein de différentes souches de BLSE isolées d'infections nosocomiales.

PREMIERE PARTIE :

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.Définition des infections nosocomiales :

Les infections nosocomiales ont pris ces dernières années une importance médiatique notable dans notre pays. **(Gachot et *al*, 2019)**

Du grec v= maladie, komein= soigner, nosokomeion=hôpital.

Une infection nosocomiale est une pathologie provoquée par des micro-organismes, contractée dans un établissement de santé par un patient hospitalisé ou recevant des soins, que ce soit avant, après, ou durant l'hospitalisation **(Aoun et *al*., 2017).**

Aussi appelées infections associées aux soins (IAS), les infections nosocomiales apparaissent chez un patient durant son séjour à l'hôpital ou en clinique, alors qu'elles n'étaient ni présentes ni en incubation lors de son admission. Elles peuvent se déclarer aussi bien pendant l'hospitalisation qu'après la sortie de l'établissement **(Bereket et *al*., 2012).**

Selon la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), une infection nosocomiale est contractée au cours d'un séjour hospitalier et ne doit pas être présente ni en incubation lors de l'arrivée du patient. En cas d'incertitude sur l'état initial à l'admission, il est couramment admis qu'une infection apparue au moins 48 heures après l'admission, ou après une période supérieure à celle de l'incubation connue, peut être tenue pour nosocomiale **(Kakupa et *al*., 2016).**

Si l'infection survient dans les 48 premières heures suivant l'admission, elle est généralement attribuée à une incubation antérieure, donc considérée comme communautaire et non nosocomiale. En revanche, une infection qui se manifeste après la sortie de l'établissement peut être reconnue comme nosocomiale si elle est liée aux soins reçus **(Amrani, 2021).**

De manière générale, une infection est qualifiée associée aux soins si elle survient durant ou après un acte médical (diagnostique ou thérapeutique), sans qu'elle ait été présente ou en incubation au moment du début de la prise en charge. Lorsque l'état initial du patient n'est pas clairement établi, un délai d'au moins de 48 heures ou supérieur à la période d'incubation connue peut permettre de statuer sur le caractère nosocomial de l'infection **(Dicko et *al*., 2022).**

2. Les différents sites d'infection nosocomiale

2 Les infections du site opératoire :

L'Infection du Site Opératoire (ISO) est une complication courante qui peut se produire suite à une opération chirurgicale. C'est une infection causée par des microbes qui apparaît dans la région où l'opération a été réalisée. **(Caroline Di Benedetto ,2013)**

Les infections du site opératoire (ISO) représentent 14% des IN, les plaçant ainsi en 2ème positions des IN les plus fréquentes après les infections urinaires, soit une origine

endogène (flore cutanée ou flore présente sur le site opératoire ou, dans de rares cas, sang utilisé en préopératoires), soit exogène (air, matériel médical, chirurgiens et autres soignants) **(Madi et *al*., 2019).**

On différencie 3 catégories d'infection du site opératoire : **(Belil et *al*., 2020)**

- Infection cutanée superficielle de la plaie : qui est restreinte à l'épiderme et aux tissus sous-cutanés.

- Infection profonde de la plaie : qui affecte des tissus tels que les muscles de la paroi abdominale.

-Infection d'un organe ou d'un espace : qui se manifeste au niveau des viscères ou des cavités.

2.2. Bactériémie

La bactériémie nosocomiale était définie par la détection d'une hémoculture positive, au moins, confirmée par des signes cliniques **(Dali et *al.*, 2017).** Elles représentent environ 6% des infections nosocomiales.

La bactériémie est la cause majeure de décès attribuable à l'infection nosocomiale, bien que la mortalité due à la bactériémie ait régressé ces dernières années.

Les dispositifs intravasculaires sont la source principale, représentant environ un tiers des bactériémies nosocomiales **(Kelaiaia et *al*., 2014).**

2.3. Infection urinaire

Une infection urinaire se définit comme l'agression d'un tissu par un ou plusieurs micro-organismes, entraînant une réaction inflammatoire ainsi que des signes et symptômes de nature et d'intensité variables en fonction du terrain. Il est donc plus approprié d'utiliser l'expression « infection de l'appareil urinaire » plutôt que le terme courant « infection urinaire ».

C'est l'infection nosocomiale la plus courante : 80% des infections sont liées à l'emploi d'un cathéter vésical permanent. Les infections urinaires ont tendance à être moins graves que les autres infections nosocomiales, bien qu'elles puissent parfois entraîner une bactériémie et un décès. **(Bruyère ,2008)**

2.4. Les infections respiratoires (Pneumonies) :

C'est une infection des voies respiratoires et des poumons qui entraîne une respiration pénible, causée la plupart du temps par un virus ou une bactérie. Elles sont habituellement contractées après une intubation ou ventilation assistées. **(Zehhal, 2008)**

Elle comporte des signes comme la toux, un essoufflement, une fièvre parfois haute, des frissons et une douleur thoracique**. (Vrancken, 2018).**

2.5. Les infections sur cathéter :

Le cathéter peut être souillé par des bactéries qui migrent le long de la surface extérieure des tubulures, par contamination manuelle véhiculée par le personnel médical et paramédical ou par voie sanguine, c'est-à-dire par des germes présents dans la circulation sanguine qui viennent se fixer au cathéter **(Rabia et *al.*, 2024) (Tolsma, 2025).**

2.6. Autres infections

Ces infections représentent entre 10 et 30 % des infections contractées à l'hôpital, parmi lesquelles on retrouve les infections cutanées (au niveau de la peau et des tissus), les infections des voies génitales, les infections ophtalmiques et les infections gastro-intestinales **(Kelaiaia et *al.*, 2014).**

3. Facteurs de risques

3.1. Les facteurs de risque liés au germe

- **Facteur de virulence :** les infections nosocomiales affichent un niveau élevé de mortalité dépendant des propriétés des agents pathogènes et des patients **(Pezhman et al., 2021). Par exemple :** Production des Toxines, Capsule Polysaccharidique.
- **Résistance aux antibiotiques :** l'utilisation abusive et non contrôlée des antibiotiques a provoqué une résistance aux antibiotiques, de même qu'une hausse du taux de maladies et de décès **(Meziane., 2020). Par exemple :** production des enzymes (produisent des BLSE, des enzymes qui inactivent un large éventre d'antibiotiques bêtalactamines)

3.2. Les facteurs de risque liés aux patients

- **L'âge :** dans la plupart des études documentées, les individus de plus de 60 ans sont les plus vulnérables aux infections nosocomiales. Des résultats semblables à ceux de **(Haley et *al* ,1980)** démontrent que le risque d'infection nosocomiale croît avec l'âge. Le groupe des personnes âgées constitue un groupe particulier **(Taleb., 2019**).
- **Immunodépression :** certaines méthodes thérapeutiques peuvent causer une diminution des capacités de défense immunitaire, telles que l'utilisation de corticoïdes, d'antibiotiques et d'immunosuppresseurs **(Farsi et *al.*, 2021).**
- **L'État nutritionnel :** la malnutrition est un facteur qui augmente le risque d'infection en réduisant la production d'immunoglobulines, les niveaux de protéines sériques et les compléments par la diminution de la taille des tissus lymphoïdes, ainsi qu'en affaiblissant l'activité des cellules immunitaires telles que les macrophages, les monocytes et les lymphocytes B et T **(Barika et *al.*, 2019).**
- **Tabagisme, l'obésité, le sexe du patient (Latreche, 2012).**

- **La comorbidité :** en raison de leurs pathologies sous-jacentes, les individus admis en unité de soins intensifs présentent un risque anormalement élevé de contracter une infection du fait de leur sensibilité accrue **(Custovic et *al*., 2014).**

3.3. Les facteurs de risque liés aux l'environnement

- ✓ **Les dispositifs médicaux :** les cathéters veineux, tels que les voies veineuses centrales, sont des éléments médicaux invasifs qui présentent un risque important. Il est compliqué de différencier ce risque de l'utilisation des lipides intraveineux, car ils sont administrés par le biais du cathéter veineux **(Benabbas et *al*., 2018).**

- ✓ **Procédures de soins invasives :** des procédures médicales telles que le sondage urinaire, la pose d'un cathéter, la ventilation artificielle ou une intervention chirurgicale **(Farsi et *al*., 2021).**

- ✓ **L'environnement hospitalier :** l'environnement peut constituer un réservoir significatif pour des agents pathogènes tels que les bactéries à Gram négatif, qui possèdent la capacité de persister et de proliférer de manière autonome, sans dépendre de l'hôte humain **(Custovic et *al.*, 2014).**

4. Modes de transmission :

Au sein des structures hospitalières, le mode de transmission par contact direct ou indirect est largement prévalent. **(Berche et *al,* 1991)**

- **Auto-infection**

Il s'agit du moment où le patient peut être infecté soit par ses propres microbes sur place, soit par l'environnement immédiat dans lequel il les a dispersés (vêtements, surface de la peau, lit) **(Madi et *al.*, 2019).** Les lésions des muqueuses et cutanées représentent les portes d'entrée pour les infections ; quant aux germes infectieux potentiels, ce sont les bactéries cutanées, de la surface des muqueuses ainsi que les germes intestinaux dispersés sur la peau **(Othniel, 2002).**

Ces infections sont dues généralement aux germes saprophytes comme certaines bactéries ou levures qui deviennent pathogènes à la suite d'une antibiothérapie à spectre large (administrant un médicament sélectionnant) itérative ou d'un traitement immunosuppresseur ou corticostéroïdes (diminuant la résistance du patient) (**Samou Fosto , 2005).**

- **Hétéro infection**

On se réfère à une hétéro-infection lorsqu'un agent pathogène est transmis d'un individu infecté à un autre, entraînant ainsi une infection dite croisée ou hétéro-infection., la

contagion par l'agent pathogène se produit rarement par contact direct ou voie aérienne. Généralement, l'agent pathogène n'est pas transmis par contact direct ou transmission aérienne. Il est courant que le vecteur de transmission soit le personnel soignant, par l'intermédiaire de ses mains ou de ses outils professionnels. On évoque une infection portée à la main ou transmise par le matériel médical ou d'exploration. C'est la voie de transmission principale lors de plusieurs épidémies et sans doute la plus réceptive aux actions préventives. **(Tasseau et *al,* 1989)**

- **Xéno-infection**

Ces infections se présentent de façon endémique ou épidémique au sein de la population qui ne requiert pas une hospitalisation. Les agents pathogènes sont introduits à l'hôpital. Par les patients, le personnel médical ou les visiteurs affectés qui sont actuellement en cours d'incubation. Ils se diffusent par air, contact direct ou indirect, et il est à noter que les patients hospitalisés sont particulièrement réceptifs et que les conditions de transmission sont facilitées. Lorsqu'une infection se manifeste comme le seul motif d'hospitalisation, des actions immédiates d'isolement peuvent être mises en place. Toutefois, dans certaines circonstances, l'infection n'est pas liée à la raison de l'hospitalisation. **(Tasseau et *al*, 1989)**

- **Exo-Infection :**

Cette infection résulte de défaillances techniques (stérilisation insuffisante, filtre à air non stérile, eau contaminée). Les substances employées dans le secteur médical ou domestique On les utilise chez les individus malades ; elles pourraient être infectées. Cela peut conduire à des infections nosocomiales fréquemment épidémiques **(Pannof, et *al*, 2013).**

5. Epidémiologie des infections nosocomiales :

✓ Au monde :

Aujourd'hui, dans les établissements de soins aigus, sur 100 patients, 7 dans les pays à revenu élevé et 15 dans les pays à revenu faible ou intermédiaire contractent au moins une infection nosocomiale durant leur hospitalisation. En moyenne, un patient atteint sur 10 succombe à cette infection. **(OMS, 2022)**

Les individus en soins intensifs et les nouveau-nés sont particulièrement exposés. Le rapport révèle par ailleurs qu'environ un cas de septicémie pris en charge à l'hôpital sur 4 et presque la moitié de tous les cas de septicémie avec dysfonctionnement organique qui sont soignés dans les unités de soins intensifs pour adultes sont d'origine nosocomiale. **(OMS, 2022)**

✓ En Algérie :

La situation épidémiologique des infections nosocomiales est reconnue grâce à des enquêtes ponctuelles et à une surveillance systématique mise en place généralement par les comités de lutte contre les infections nosocomiales. **(Atif et *al*, 2006)**

Dans un hôpital universitaire à Blida, la prévalence des infections nosocomiales a diminué de 9,8% en2001 à 4% en 2005, suite à l'établissement d'un programme de lutte contre ces infections. **(Atif et *al*,2006)**

Au total, 2 200 patients ont été inclus et des infections nosocomiales ont été identifiées dans 8 enquêtes. De 2001 à 2008, les taux d'infection à l'hôpital étaient respectivement de 9,5 %, 7,0 %, 4,5 %, 3,9 %, 3,0 %, 5,3 % et 3,0 % **(Zahar, 2007**). Dans une étude menée dans 27 hôpitaux algériens, le taux de prévalence des patients infectés variait de 6,3% en Algérie. (**Amazian et *al,* 2010).** Une autre étude dans un hôpital universitaire à Annaba a montré que plus de 59% des prélèvements effectués contenaient des microbes responsables d'infections nosocomiales. **(Benzaid *et al,* 2022)**

Le tableau 01 représente les résultats de différentes enquêtes menées en Algérie.

Tableau N° 01 : Prévalences des infections nosocomiales dans différents établissements de soins en Algérie **(Hamadi et *al* .2012).**

Année	**Organisme**	**Type d'infection nosocomiale**	**Prévalence (%)**
2004	CHU de Tizi Ouzou	**ISO**	**7,56**
2004	CHU Mustapha(néonatalogie)	**ISO**	**11.,90**
2005	CHU de Beni Messous (CCI)	**ISO**	**14,40**
2006	CHU de Beni Messous (ORL)	**ISO**	**4,92**
2006	CHU de Blida (Néonatalogie	**Gastro-entérite**	**3,50**
2007	CHU de Tizi Ouzou	**ISO**	**5,55**
2007	EPH de Bologhine	**Toutes IN confondus**	**13 ,60**
2007	CHU Mustapha (Orthopédie, traumatologie	**ISO**	**24,00**

2007	CHU de Tlemcen	**Urinaire, ISO, septicémie**	**16,90**
2008	CHU de Constantine	**Toutes IN confondus**	**8,97**
2010	CHU de Constantine (Femmes césarisées)	**ISO**	**72,00**

- ✓ **Surveillance épidémiologique des infections nosocomiales au sein du CHU de Tizi-Ouzou, Algérie**

Le département d'épidémiologie du CHU de Tizi Ouzou réalise fréquemment des études de prévalence dans différents services. On présente ici les taux de prévalence estimés de 2010 à 2016 au sein du CHU de Tizi Ouzou et également dans le service de réanimation médicale **(SEMEP, CHU Tizi-Ouzou).**

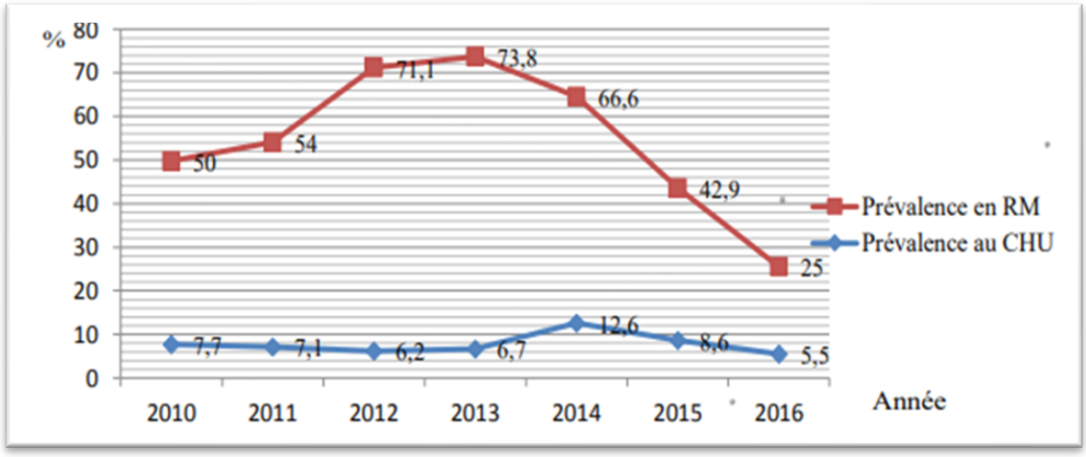


Figure N°01 : Taux d'infections nosocomiales au CHU de Tizi Ouzou et en réanimation médicale (2010 – 2016) **(SEMEP, CHU TiziOuzou).**

- ✓ **CHU d'Oran :**

Une étude de prévalence a révélé que les infections urinaires constituaient 41,3 % des cas, tandis que les infections du lieu de chirurgie représentaient 28,3 %. Les agents pathogènes le plus souvent isolés étaient les entérobactéries, en particulier *Escherichia coli*. **(Guetarni et *al*)**

- ✓ **En Tunisie :**

En 2005, une recherche multicentrique à l'échelle du pays impliquant 66 structures hospitalières (comprenant 21 CHU, 33 hôpitaux régionaux publics et 12 cliniques privées), avec un total de 7065 patients. Cette recherche a démontré une occurrence générale de 6,9 % d'infections nosocomiales. Les infections respiratoires étaient les plus

fréquentes, comptant pour 30,3 % des cas, après elles venaient les infections urinaires (16,9 %), puis les septicémies (13,4 %) et enfin les infections du lieu de l'opération (12,1 %). **(Kebir et *al*. ;2015)**

En 2021 le taux d'incidence des infections nosocomiales (IN) dans un hôpital militaire en Tunisie était de 38 %. Parmi ces infections, *Klebsiella pneumonie* était l'agent pathogène le plus fréquent, représentant 31 % des cas, suivi de près par *Staphylococcus aureus* (26 %). **(Ben Al et *al* 2021).**

Dans 80% des situations, les microorganismes étaient des BGN. **(Latifa, 2014)**

- ✓ **En France :**

Entre le 15 mai et le 30 juin 2022, une étude de prévalence à l'échelle nationale, conduite par Santé publique France, a été effectuée dans un total de 1 155 établissements de soins, englobant 151 676 patients. Les conclusions ont montré que 5,71 % des patients admis à l'hôpital avaient une infection nosocomiale, ce qui correspond environ à un patient sur dix-huit. À l'exception des cas de COVID-19 acquis en milieu hospitalier, cette prévalence demeurait haute à 5,35 %, comparativement à 4,98 % en 2017, signalant une petite hausse. Ces infections touchaient principalement les services de réanimation (23,17 %), les centres de lutte contre le cancer (15,81 %), ainsi que les services médicaux (6,84 %) et chirurgicaux (entre 5 % et 7 %).

Les infections nosocomiales les plus courantes identifiées étaient les infections urinaires, pulmonaires, les infections du site chirurgical (ISO) et les bactériémies, qui ensemble constituaient 70,7% des cas rapportés. *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis et Pseudomonas aeruginosa*, qui à eux seuls sont responsables de 48,3 % des infections, constituaient une part importante des agents pathogènes fréquemment isolés. **(Santé publique France, 2023).**

6. Les bactéries responsables des infections nosocomiales

La majorité des micro-organismes pathogènes à l'origine des infections nosocomiales sont des bactéries. Ils représentent 90% des motifs des infections nosocomiales.

- ❖ **Les Cocci à Gram positif**

Les bactéries sphériques dites Cocci gram-positifs forment une catégorie primordiale de microorganismes. Elles se distinguent par une épaisse paroi cellulaire, fortement enrichie en peptidoglycane, leur permettant ainsi de conserver la teinte violette durant le processus de coloration de Gram. Ce groupe inclut plusi0eurs genres de germes pathogènes pour l'homme, tels que *Staphylococcus, Streptococcus, Enterococcus et Micrococcus*. **(Murray et *al*,2021)**

- ***Streptocoque :*** Il s'agit de Cocci gram-positifs, ovoïdes, organisés en chaînes, non sporulés et immobiles, qui sont aérobies facultatifs **(Niangaly, 2007).**

- ***Staphylocoque :*** Les staphylocoques sont des bactéries de forme sphérique et Gram positives. Ils se présenteront sous forme de grappes de raisin à une échelle microscopique. Rosenbach a décrit deux catégories de staphylocoques en 1884 : *le Staphylococcus aureus* (jaune) est coagulase positive, tandis que le *Staphylococcus blanc* a coagulase négative**. (Todar, 2020)**

6.2. Les bacilles à Gram négatif

❖ **Bacilles non fermentaires à Gram négatif**

Selon leur définition, les bactéries non fermentaires constituent un ensemble qui comprend de 10 à 15% des bacilles Gram négatif. Ces derniers possèdent la forme d'un bâton microscopique asporulé qui, comme son nom l'indique, emploie des voies métaboliques autres que la fermentation pour générer de l'énergie (Martin et *al* ;2011). Ce groupe comprend une large variété de familles, divisées en plusieurs genres bactériens exemple *(Acinetobacter, Pseudomonas*). Ils sont classés principalement sur la base de données phénotypiques (caractères conventionnels ou nutritionnels) et de données génétiques (composition en bases de l'ADN, hybridations ADN-ADN, séquençage de l'ARNr16s). **(Monteil ; 2007)**

❖ **Bacilles à Gram négatif fermentaires (Entérobactéries)**

Le groupe des *Enterobacteriaceae* se caractérise par des bacilles Gram-négatifs, droits, asporulés et non exigeants. Ils se développent sur des milieux de culture standard à une température optimale de 37°C, bien qu'ils puissent croître entre 20°C et 40°C. Ce sont des organismes aérobies facultatifs qui sont immobiles (*Klebsiella spp, Shigella spp, Yersinia pestis)* ou mobiles grâce aux flagelles péritriches. Ils possèdent une catalase positive et une oxydase négative. Leur métabolisme est fermentaire, avec ou sans production de gaz. Habituellement, ils réduisent les nitrates en nitrites (mais pas en N2). Leur ARN ribosomique 16S appartient à la classe Gamma-Protéobactéries au sein de l'ordre Enterobacteriale. Sous l'angle antigénique, ce groupe se distingue par sa grande ressemblance, il comprend diverses espèces nuisibles pour les hommes et les animaux, qui induisent des pathologies dès leur introduction dans le système digestif, tandis que certaines présentent des traits opportunistes. Elles ne sont pathogènes que lorsqu'elles sont présentes en grande quantité sur un terrain d'immunodépression. (**Bidet et *al* 2016**)

❖ **Autres microorganismes** :

- **Les virus :** Une transmission nosocomiale est possible pour plusieurs types de virus. Les hépatites B et C se propagent lors des transfusions, des dialyses ou des piqûres. Le virus respiratoire syncytial, les rotavirus et les entérovirus se propagent par contact manuel buccal et par transmission féco-orale. Il est également possible de transmettre d'autres virus tels que le cytomégalovirus, le VIH, le virus Ebola, les virus de la grippe, les virus herpétiques et le virus varicelle-zona. **(OMS, 2002)**

- **Les champignons :** Il est notable que les champignons microscopiques se manifestent comme des agents pathogènes majeurs. Ils se développent dans un contexte d'immunodépression et/ou suite à une antibiothérapie à large spectre, et/ou à travers une alimentation parentérale. Les mycoses les plus fréquentes comprennent l'aspergillose d'origine externe et les candidoses, dont les sources peuvent être digestives ou issues de solutions contaminées (collyres, liquides nutritifs). **(Pittet et *al.*, 1994)**
- **Les parasites :** Ils peuvent également avoir une nature nosocomiale. On rencontre souvent le plasmodium lors des transfusions, le Sarcoptes scabiei (responsable de la gale) et le *Pneumocystis carinii* qui cause la pneumopathie nosocomiale en néonatologie et chez les patients immunodéprimés. **(Guérin et *al*, 1993)**

1.Historique :

La naissance de la famille des *Enterobacteriaceae* était en 1937, lorsque Otto Rahn proposa le genre Enterobacter pour regrouper des micro-organismes présentant des propriétés biochimiques et morphologiques communes et parmi lesquelles on trouvait déjà des noms tels que Escherichia, Salmonella, Klebsiella, Proteus, Serratia, ou Shigella.

Deux années après cette description qui concernait 112 espèces, ce nombre fut ramené à 67. Avec les travaux de Don Brenner et de Patrick Grimont, cette famille a connu beaucoup de nouveaux genres et d'espèces qui furent alors découvertes.

- En 1972, Edward et Ewing intégraient 11 genres et 26 espèces dans la famille des Enterobacteriaceae. Une année après, 31 genres et 139 espèces étaient caractérisés.
- En 1985, Farmer et Coll décrivaient 22 genres comprenant 69 espèces et 29 groupes entériques.
- En 1997, 31 genres et 139 espèces étaient caractérisés. **(Bakhoum, 2004)**

2. Définition

Les Entérobactéries forment une vaste famille bactérienne hétérogène très importante, qui regroupe plus d'une quarantaine de genres et de plusieurs dizaines d'espèces.

Le nom d'Entérobactéries fait référence aux Entérocytes (cellules intestinales), car les bactéries appartenant à cette famille sont généralement des hôtes commensaux ou pathogènes. **(Pilly .2013)**

On les trouve aussi au niveau des voies aériennes supérieures, sur les organes génitaux, la cavité buccale. Elles peuvent persister en dehors d'organismes vivants, Par exemple : dans le sol, l'eau et dans certaines denrées alimentaires. **(Fauchère et *Al,* 2002**)

Les entérobactéries sont parmi les souches les plus fréquemment isolées chez les patients hospitalisés, elles sont souvent responsables d'infections urinaires, pulmonaires, de septicémies mais également d'autres infections intra-abdominales. **(Baba Ahmed-Kazi *et al* ; 2014)**

3.Classification taxonomique

Selon la classification de Bergy's et Manual les entérobactéries sont classées :

(**Bergey's Manual of Systematic Bacteriology,2012).**

Domaine : Bacteria

Embranchement : Proteobacteria

Règne : Eubacteria

Classe : Gamma Proteobacteria

Ordre : Enterobacteriales

Famille : Enterobacteriacea

Les espèces les plus communément isolées en bactériologie clinique appartiennent à 12genre *Citrobacter, Enterobacter, Escherichia, Hafnia, Klebsiella, Morganella, Proteus, Providencia, Salmonella, Serratia, Shigella et Yersinia*.

D'autre genres peuvent être isolés rarement ou exceptionnellement chez l'homme : *Ewingella, Erwinia, Kluyvera, Leminorella et Pantoea.* **(Denis, 2007)**

4. Habitat et pouvoir pathogène

Les entérobactéries sont des bactéries ubiquitaires avec un habitat très large : eau douce, sol, végétaux, animaux (insectes jusqu'à l'homme) et peuvent contaminer des denrées alimentaires. Certaines espèces sont responsables de diarrhées et/ou d'infections opportunistes (infections urinaires, infections respiratoires, surinfections des plaies, septicémies, méningites.). Chez l'homme, les entérobactéries, notamment *Escherichia coli, Klebsiella spp., Enterobacter spp., Proteus spp., Providencia spp et Serratia marcescens subsp* sont responsables d'environ 50% des infections nosocomiales. **(Salah , 2009)**

5. Caractères biologiques

5.1. Caractère morphologique :

Les entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif, avec des tailles variant de 2 à 3 µm de long sur 0,4 à 0,6 µm de large. Les espèces mobiles, les plus nombreuses, le sont grâce à une ciliature péritriche tandis que certaines sont immobiles. Quelques une possède une capsule visible au microscope et la plupart des espèces pathogènes pour l'homme possèdent des fimbriae ou pili qui sont des facteurs d'adhésion**. (Gadou ,2019)** Ces bactéries se développent en aéro-anaérobiose et sur gélose nutritive ordinaire. Elles fermentent le glucose en produisant souvent des gaz et possèdent une catalase, sauf pour l'espèce *Shigella dysenteriae.* Elles ne possèdent pas d'oxydase et partagent un antigène commun appelé antigène de Kunin (ECA). **(Avril et *al.*,1992)**

5.2. Caractères culturaux :

Les Enterobacteriaceae se développent bien dans un bouillon ou sur une gélose ordinaire incubés 18 heures à 37°C.

Sur gélose, on peut obtenir différentes formes :

- Les formes S (smooth) : sont l'aspect habituel au sortir de l'organisme. Les colonies sont lisses, bombées, brillantes et humides, elles ont 2 à 4 mm de diamètre. Le bouillon est trouble de façon homogène.

- Les formes R (rough) : s'observent surtout avec des souches ayant subi plusieurs repiquages. Les colonies sont rugueuses, sèches, à contours irréguliers et de teinte mate. En bouillon, les formes R donnent un aspect grumeleux.

- Les colonies muqueuses : sont habituelles avec les Klebsiella. Leur diamètre peut dépasser 10 mm ; elles ont une tendance à la confluence. On peut les rencontres aussi avec d'autres espèces, notamment Salmonella paratyphi B.

- Les colonies naines : s'observent avec des souches déficientes dans certaines de leurs chaînes métaboliques. Elles ne sont pas exceptionnelles chez les Escherichia coli isolés d'infections urinaires. **(Avril et *al.*,1992)**

Sur un milieu liquide comme un bouillon nutritif la croissance apparait comme un trouble homogène. **(Dcemi ;2003)**

5.3. Caractères biochimiques

L'identification des Enterobacteriaceae repose sur l'étude des caractères essentiellement "biochimiques" et utilisent des tests qui étudient le métabolisme protéique (présence d'uréase, production d'indole, dégradation du tryptophane) ou la fermentation des sucres (glucose, lactose, saccharose etc..), la capacité d'utiliser le citrate, la présence d'enzymes (décarboxylases, désaminases), la production d'hydrogène sulfuré ou la formation de gaz. La famille des Entérobactéries est apte à fermenter le glucose (respiration aérobie le plus souvent et fermentation en anaérobiose), capable de réduire les nitrates en nitrites car elle dispose d'un complexe enzymatique appelé la nitrate réductase (**ex :** *Klebsiella spp* contrairement à d'autres **ex :** *Yersinia spp, Shigella spp).* Les Entérobactéries ont une catalase positive mais dépourvues d'oxydase. **(Kassama et *al* ,2013)**

Le tableau ci-dessous résume les caractères d'identification des genres des entérobactéries le plus fréquemment rencontrés. **(Bouazza et *al* ,**

2016).

Tableau N°02 : Caractères biochimiques de quelques entérobactéries **(Decoster, 2005)**

	Escherichia	Citrobacter	Enterobacter	Klebsiella	Serratia	Salmonella	Shigella	Proteus	Providencia	Yersinia
Glu	+	+	+	+	++		+	+	+	+
Lac	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	+	-	+/-	-	-	+
Indole	+	-	-	+/-	-	-	+/-	+/-	+	+/-
VP	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
Cit	-	+	+	+	+	+/-	-	+/-	+	-
Mob	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
Urée	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
H2S	-	+/-	-	-	-	+	-	+/-	-	-

Glu : Glucose. **Lac :** Lactose**. ONPG :** Ortho nitrophénol-bêta-galactosidase.

VP : Voges-Proskauer. **Cit :** Citrate**. Mob :** Mobilité. **H2S :** Sulfure d'hydrogène.

5.4. Caractères antigéniques :

Trois antigènes sont présents : Antigène O (présent dans la paroi), antigène H (flagellaires) et l'antigène K (capsulaire)

- **Antigène O :** thermostable (fraction protéique plus une fraction poly osidique) très toxique ; une fraction lipidique liée au polyoside est responsable de la toxicité (endotoxine), provoque des fièvres suivies de leucocytose.
- **Antigène H :** thermolabile de nature protéique réduit par l'alcool à 50% et les enzymes protéolytiques.
- **Antigène K :** entoure la paroi de certaines bactéries peut maquer l'antigène O. **(Avril et *al.*,1992)**

6. Les différentes espèces

6.1. L'espèce Escherichia coli

Escherichia coli, (colibacille) possède tous les caractères décrits plus haut comme étant communs aux Enterobacteriaceae. Cette espèce est la plus souvent impliquée dans les infections du système digestif, notamment la diarrhée du voyageur. Elle joue également un rôle prépondérant dans le développement des infections urinaire qui sont causées par la variété pathogène UPEC *(E. coli* uropathogènes). ***(Avril* et *al.*,1992) (Diallo ;2013)**

6.2. Le genre Klebsiella

Les espèces du *genre Klebsiella* sont des bactéries possédant toutes les caractéristiques des Enterobacteriaceae en forme de bâtonnet et font partie de la famille des Enterobacteriaceae. Elles caractérisés par la fermentation de nombreux glucides et la production de gaz. *Klebsiella pneumoniae* parmi les espèces responsables d'infection urinaire communautaires et surtout d'infection nosocomiales chez l'Homme. **(Avril et *al.*,1992) (Najiby, 2012)**

6.3. Le genre *Proteus*

Le genre *Proteus* sont très répandus retrouvent dans l'environnement et dans le tube digestif de l'Homme. *Proteus mirabilis* est parmi les espèces responsables d'infection urinaires, lié aux pathologies gastro intestinales comme les gastro entérites, maladie de crohn, aussi des maladies hépatobiliaires et pancréatiques et des infections nosocomiales et autre extra intestinales comme les infections respiratoires, auriculaires etc.…. Plusieurs facteurs de virulence sont responsables de cette diversité de pathologies **(Fauchère et *al*., 2002) (Hamilton et *al.,* 2018)**

6.4.Le genre *Enterobacter*

Les espèces du genre *Enterobacter* sont des hôtes habituels du tube digestif, et sont des pathogènes opportunistes trouvées dans le milieu hospitalier. *Enterbacter Cloacae*, est parmi les espèces les plus fréquemment isolées et est impliquée dans diverses infections opportunistes telles que les infections urinaires, les septicémies, et d'autres affections nosocomiales. **(Fauchère et *al.*, 2002)**

6.5.Le genre *Serratia*

Les bactéries du genre *Serratia* sont peu pathogènes pour les sujets sains. Cependant elles sont responsables d'infection hospitalière particulièrement *S. marcesens* qu'on rencontre souvent dans les infections urinaires, les infections respiratoires et la septicémie. **(Nauciel, 2000)**

1. Définition

Les β-lactamines sont une famille d'antibiotiques largement utilisés pour traiter les infections causées par les entérobactéries. Ce choix est principalement lié à leur pouvoir bactéricide, à leur faible taux de toxicité, et à la diversité de leurs structures**. (Robin et *al.*,2012)**

2. Structure

Les β-lactamines ont en commun une structure appelée noyau β-lactame (**figure 03)**, qui est formé de quatre membres : trois atomes de carbone et un atome d'azote. Ce noyau constitue la portion responsable de l'activité de ces molécules. **(Fisher et *al.*, 2005)**

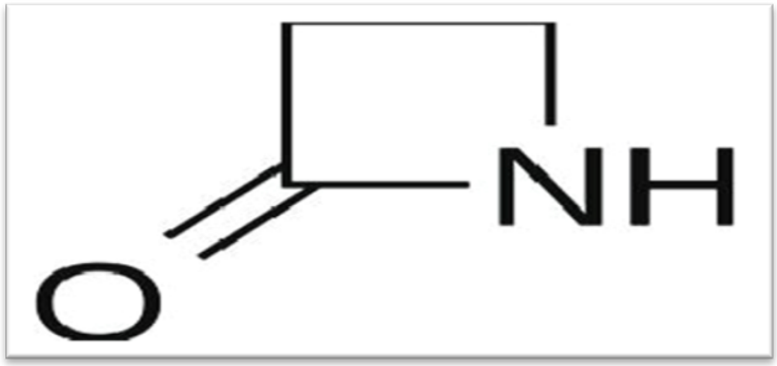


Figure N°03 : Structure chimique de noyau beta-lactame **(Tidwell.,2008)**

3. Classification

À partir de structure, cinq groupes ont été développés par adjonction d'un cycle latéral **(Figure 04)** : les pénames, les céphèmes, les pénèmes, les monobactames et les inhibiteurs de β-lactamases. **(Cavallo, 2004)**

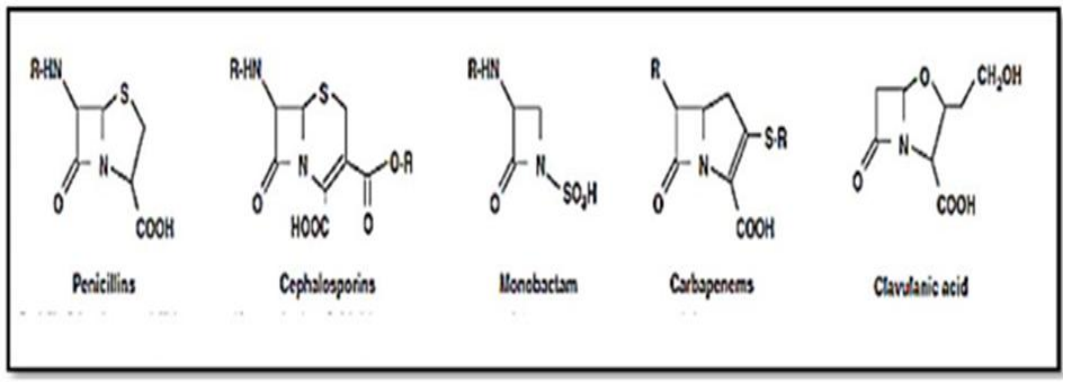


Figure N° 04 : Principales structures des β-lactamines. **(Nordmann et al., 2012)**

3.1. Pénames (Pénicillines)

Il s'agit d'un groupe de molécules, ayant en commun le noyau péname, qui est caractérisé par un pentacycle saturé (cycle thiazolidine) associé au noyau β-lactame. Selon la nature de la chaine latérale, on a défini plusieurs sous-classes, dont les plus utilisées sont les aminopénicillines (ampicilline, amoxicilline), les carboxypénicillines (ticarcilline) les uréidopénicillines (pipéracilline) et les amidinopénicillines (pivmecillinam). Le spectre d'activité des pénicillines varie d'une molécule à une autre, tout en agissant sur les bactéries à Gram positif et/ou à Gram négatif. Cependant, les pénicillines originelles n'ont que peu d'effet sur les bactéries à Gram négatif, parce qu'elles traversent difficilement la membrane externe. **(Singleton, 2005) (Ruppé, 2010)**

3.2. Céphèmes (Céphalosporines)

Leur noyau de base associe un cycle β-lactame à un cycle dihydrothiazine pour former l'acide 7 aminocéphalosporanique ou (7-ACA) (noyau céphème), qui distingue les céphalosporines des pénicillines. La particularité du noyau céphème et les nombreux radicaux de substitution proposés expliquent les différentes propriétés antibactériennes des céphalosporines, justifiant leur distinction fonctionnelle en plusieurs générations, de spectre et d'intérêt clinique variables. **(Cavallo et *al.*, 2004)**

On distingue 5 générations :

- **Les céphalosporines de première génération (C1G : céfalotine, céfalexine)** sont plutôt actives sur les bactéries à Gram positif.
- **Les céphalosporines de deuxième génération (C2G : céfuroxime, céfamandole)** ont un spectre étendu vers les bactéries à Gram négatif. Parmi les céphalosporines se situe une sous-famille que sont les céphamycine ou 7-a-méthoxy-céphalosporines.
- **Les céphalosporines de troisième génération (C3G ou oxyimino-céphalosporines : céfixime, céfotaxime, ceftazidime)** ont un spectre étendu à la plupart des entérobactéries et sur Pseudomonas aeruginosa pour la ceftazidime. Les C3G sont les antibiotiques de choix dans le traitement des infections sévères à entérobactéries.
- **Les céphalosporines de quatrième génération (C4G : céfépime et cefpirome)** sont des oxyimino-céphalosporines zwitterionniques relativement stables à l'hydrolyse des céphalosporinases de type AmpC. **(Ruppé, 2010)**
- **Les céphalosporines de cinquième génération (C5G : céftaroline, ceftobiprole)** ont une activité puissante contre les bactéries multirésistantes comme SARM (Staphylococcus aureus méticillinorésistant). **(Aura et *al.*,2020) (Nabti, 2020)**

3.3. Pénèmes (Carbapénèmes)

Il s'agit d'une vaste famille de produits ayant en commun le noyau pénème qui est caractérisé par la présence d'un cycle penta-atomique insaturé associé au noyau β-

lactame **(Cavallo et *al.*, 2004).** Les carbapénèmes, représentés par l'imipenème, sont les membres les plus puissants de cette famille ; c'est pour cette raison qu'ils sont réservés typiquement pour l'hôpital **(Nicolau , 2008).** Ce sont des molécules utilisées en dernier recours, sur des bactéries multirésistantes**. (Ruppé, 2010).**

3.4. Monobactames

Ce groupe a noyau est limité au cycle β-lactame **(Cavallo et *al.*, 2004**). Ils se caractérisent par une structure monocyclique (hétérocycle azétidinone) différente du double cycle rencontré chez les pénicillines ou les céphalosporines. L'aztréonam, seul monobactame commercialisé, n'est actif que sur les bactéries à Gram négatif. **(Ruppé, 2010).**

3.5. Inhibiteurs de β-lactamases

Ce sont des β –lactamines de forte affinité pour certaines β-lactamases, mais qui ont une faible activité antibactérienne intrinsèque. L'acide clavulanique est utilisé avec l'amoxicilline dans l'Augmentin et la ticarcilline dans le Claventin, alors que le tazobactam est utilisé avec la pipéracilline dans la Tazocilline. L'acide clavulanique, le sulbactam et le tazobactam ont un spectre d'inhibition limité aux pénicillinases. **(Ruppé, 2010)**

4. Résistance des entérobactéries aux β- lactamines

De manière générale, les entérobactéries utilisent Quatre principaux mécanismes pour développer une résistance aux β-lactamines. (**Vora et *al.*, 2009)**

4-1 Diminution de la perméabilité membranaire

Il est courant que les entérobactéries modifient ou perdent des porines. Ces modifications sont liées à trois phénotypes de résistance :

- Une résistance de bas niveau à la céfoxitine, associée ou non à une résistance de bas niveau aux céphalosporines de 1ère et 2ème génération.
- Une résistance isolée aux céphalosporines de quatrième génération chez des souches fortement productrices de céphalosporinases.
- Une résistance aux carbapénèmes chez des souches hautement productrices de céphalosporinases ou de BLSE (**Robin et *al.*, 2012).**

4-2 Hyperproduction de système d'efflux

Les systèmes d'efflux sont des pompes qui expulsent activement les toxines, comme les antibiotiques, via une force proton-motrice. Leur hyperproduction cause une résistance croisée à différents antibiotiques, notamment les ß-lactamines, surtout chez *K. pneumoniae*. Ce mécanisme est souvent difficile à distinguer de la résistance due aux modifications des porines. **(Robin et *al.*, 2012)**

4.3. Modification des protéines liée aux pénicillines (PLP)

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

4.4. Résistance enzymatique par production de β-lactamase

Les β-lactamases sont des enzymes bactériennes qui catalysent de manière efficace et irréversible l'hydrolyse de la liaison amide des béta lactamines en ouvrant le cycle β- lactame et menant à la perte d'un groupement carboxyle, provoquant l'inactivation de L'antibiotique. **(Ambler, 1980).).**

Ces enzymes sont localisées au niveau de l'espace périplasmique chez les bactéries Gram négatif. **(Gangoue, 2007)**

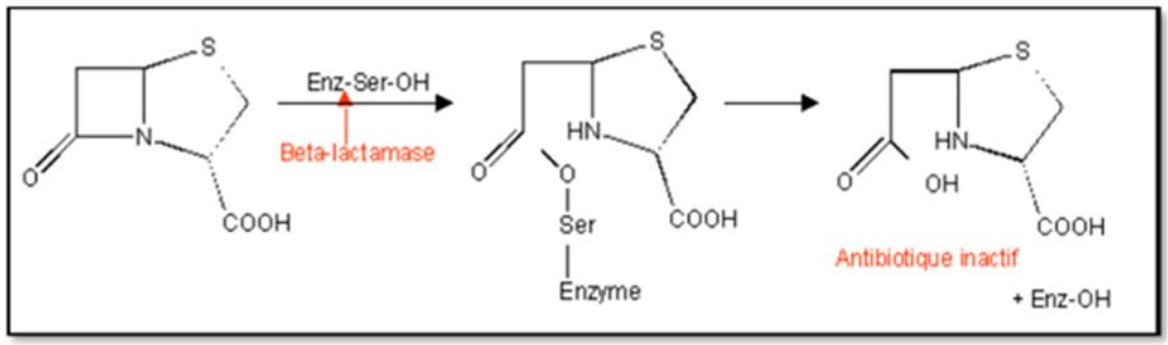


Figure N°05 : Schéma d'hydrolyse de cycle β-lactame **(Barriel et *al.*, 2006).**

Elles sont sécrétées de manière inductible ou constitutive dans le milieu de culture ou dans le périplasme respectivement par les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Leurs gènes sont portés par le chromosome ou les plasmides et parfois des transposons ou des intégrons **(Charlier et *al.*, 1998)**

4. 1. Classification β-lactamases

Généralement, les β-lactamases sont classées en deux schémas : la classification structurale d'Ambler **(Ambler et *al.*, 1980)** et la classification fonctionnelle de Bush-Jacoby-Medeiros **(Bush et *al.*, 1995) (Jacoby et *al.*, 2005)**

- ✓ **La classification d'Ambler :**

En1980 Ambler a dèvisè les β-lactamases en quatre groupes (d'A à D). Cette classification moléculaire, base sur la structure primaire des enzymes, plus précisément elle repose sur la similarité des séquences entre les différents membres des β-lactamases. De plus, elle reflète les relations fondamentales de chaque β lactamase et ne change pas à cause des mutations. Elle individualise quatre classes moléculaires de β lactamases : A, C et D (appelées enzymes à sérine) et B (dont les enzymes comportent deux atomes de zinc au niveau de leur site actif) **(Materon et *al.*, 2004) (Jacob, 2011) (Lagha 2015)**

- **Classe A :** elle comprend des pénicillinases, des céphalosporinases inductibles (AmpA) chromosomiques ou plasmidiques, et des ß-lactamases à spectre étendu (BLSE), sensibles à l'acide clavulanique.
- **Classe B :** cette classe constitue le groupe des métallo-enzymes zinc-dépendantes (AmpB), pouvant être inhibées par acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA).
- **Classe C :** elle est constituée de céphalosporinases (AmpC) chromosomiques ou plasmidiques, résistantes à l'acide clavulanique. **(Bush et *al,* 1995).**
- **Classe D :** oxacillinases (AmpD), le plus souvent plasmidiques, de phénotype pénicillinases qui sont faiblement inhibées par l'acide culvanique**. (Paterson et *al.,* 2005).**

➢ **La classification de Bush :**

En 1995 Bush-Jacoby-Medeiros a présenté le dernier système de classification qu'est basée sur : les propriétés fonctionnelles des enzymes, sur le spectre de substrats préférentiels de l'enzyme et enfin sur leurs comportements aux inhibiteurs et ont été dèvisès sur quatre groupes (1-4) et sous-groupes (A à F). Cependant, la limite évidente de cette classification est que des mutations ponctuelles des gènes de β-lactamases peuvent modifier significativement les spectres d'activité pour les différents substrats ou pour les inhibiteurs, ce qui n'est pas le cas pour la classification d'Ambler qui reste valable pour les enzymes mutées **(Bush et *al.,*1995) (Jacob, 2011)**

Tableau N°03 : Classification moléculaire et fonctionnelle des bêta-lactamases **(Vasseur, 2014)**

Type	Bush	Ambler	Inhibiteur	Exemple
Céphalosporinases de type AmpC	1	C	Cloxacilline	AmpC des entérobactéries du groupe 3et leurs dérivés plasmidique
Pénicillinases des bactéries Gram positifs	2a	A	Clavulanate	Pénicillinases de *staphylococcus aureus*
Pénicillinases à spectre étroit	2b	A	Clavulanate	TEM-1, SHV-1
β-lactamases à spectre élargi	2be	A	Clavulanate	TEM-3, SHV-2, CTX-M, PER, VEB, GES (170Gly)
Pénicillinases résistantes aux Inhibiteurs	2br	A	—	TEM-30
Complexe mutant TEM	2ber	A	—	TEM-50
Carbénicillinases	2c	A	Clavulanate	PSE-1
Oxacillinases	2d	D	—	OXA-1
Céfuroximases	2e	A	Clavulanate	Céphalosporinases de *Proteus vulgaris*
Carbapénémases	2f	A	Clavulanate	KPC, GES (170Ser et 170Asn)*
Métallo-β-lactamases	3	B	EDTA	NDM, VIM, IMP
Autresβ-lactamases non classées	4	—	—	Pénicillinase de *Burkholderiacepacia*

4.2. Les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE)

4.1. Définition

Les BLSE sont définies comme des bêta-lactamases, appartenant à la classe A ou D de la classification d'Ambler **(Rodriguez et *al.*, 2006),** capables d'hydrolyser les pénicillines, les céphalosporines de première, deuxième, troisième et quatrième génération (céfépime ou cefpirome) et les monobactames (aztréonam**). (Boujemaa, 2015).**

Les bactéries produisant une BLSE n'hydrolysent pas les céphamycines (céfoxitine et céfotétan) ni les carbapénèmes (imipéneme) et elles sont inhibées par l'acide clavulanique, le tazobactam et le sulbactam. **(Vora et *al.*, 2009)**

Les bactéries possédant des BLSE sont dites multirésistantes **(Paterson et *al.*, 2005).**

4.2. Différents types de β-lactamases à spectre élargi

Les BLSE sont classées selon leurs différences moléculaires et les plus fréquentes sont les BLSE de types TEM, SHV et CTX-M **(Jacoby et *al.*, 2005)**

4.2.1. Les BLSE de type Temoneira (TEM)

La première bêta-lactamase plasmidique de type TEM a été isolée en 1965 en Grèce à partir d'souche *d'Escherichia coli* isolée chez un patient nommé Temoneira, d'où la nomination **(Paterson et *al.*, 2005).**

Les BLSE de type TEM dérivent TEM-1 et TEM-2 par substitution d'un ou de plusieurs acides aminés. Cependant, les enzymes dérivées par mutations permettant d'hydrolyser à la fois les C3G et les inhibiteurs sont de plus en plus fréquentes **(Rodriguez et *al.*, 2006)**

Ce type de β-lactamases a été retrouvés principalement chez les *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* au cours d'épidémies hospitalières, mais également en milieu communautaire **(Chavane, 2011).**

L'émergence d'enzymes de type TEM résistants aux inhibiteurs mais inactif contre les céphalosporines est apparue suite à l'utilisation clinique d'associations pénicillines et inhibiteurs de β-lactamases **(Robin et *al.*, 2007)**

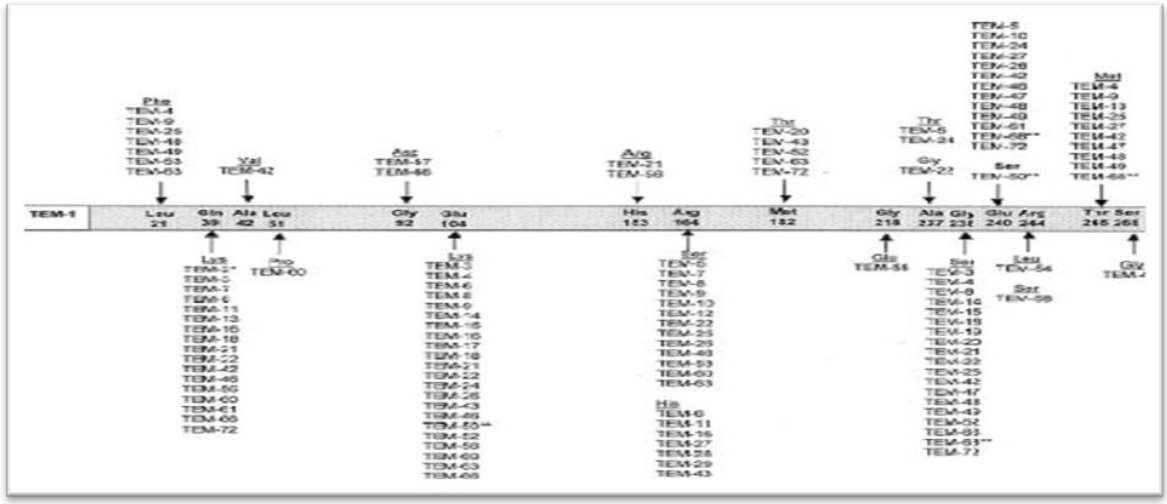


Figure N°06 : BLSE dérivées de TEM **(Ambler et al. 1991).**

4.2.2. Les BLSE de type Sulfhydryl variable (SHV)

La majorité des BLSE de type SHV (très fréquentes chez *Klebsiella pneumoniae*) est dérivées par mutations ponctuelles de l'enzyme originale SHV-1 **(Ruppé, 2010).**

Le nom (SHV) est lié au groupe thiol variable car l'inhibition de l'activité SHV par le p-chlorobenzoate mercurique varie en fonction du substrat utilisé.

Les BLSE SHV-2, SHV-5 et SHV-12 sont les mutants les plus courants. Ces BLSE ont été détecté chez de nombreuses Entérobactéries, mais aussi *Pseudomonas aeruginosa et Acinetobacter*. **(Philippon ;2013)**

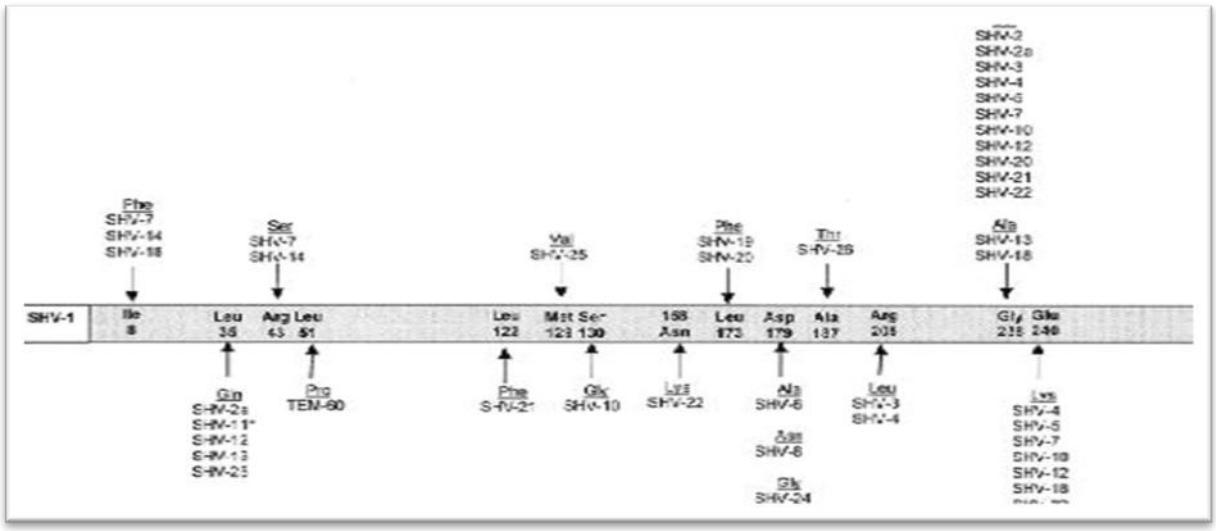


Figure N°07 : BLSE dérivées de SHV **(Bradford. 1999)**

4.2.3. Les BLSE de type Cefotaximase-Munich (CTX-M)

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

Les CTX, d'où leur nom, se caractérise par leur activité hydrolytique potentielle sur le céfotaxime **(Paterson et *al.*, 2005).** Et **« M »** pour leur lieu d'isolement (Munich) puisque la dénomination CTX était déjà occupée (aujourd'hui TEM-3). Elles n'hydrolysent ni les céphamycines ni les carbapénèmes. Ces enzymes ne sont donc pas inductibles. **(Www.lahey.org/studies).**

CTX-M-3 et CTX-M-15 ont été rapportées pour la première fois en Algérie par Touati et al, en 2006 chez les souches E. coli, Enterobacter cloacae et K. pneumoniae isolées dans les hôpitaux de Béjaia (**Touati *et al.*, 2006).**

Phylogénétique de nombreux dérivés de CTX-M et de leurs séquences acides aminées ont montré une agrégation au sein de cinq groupes **(Bonnet , 2004)**

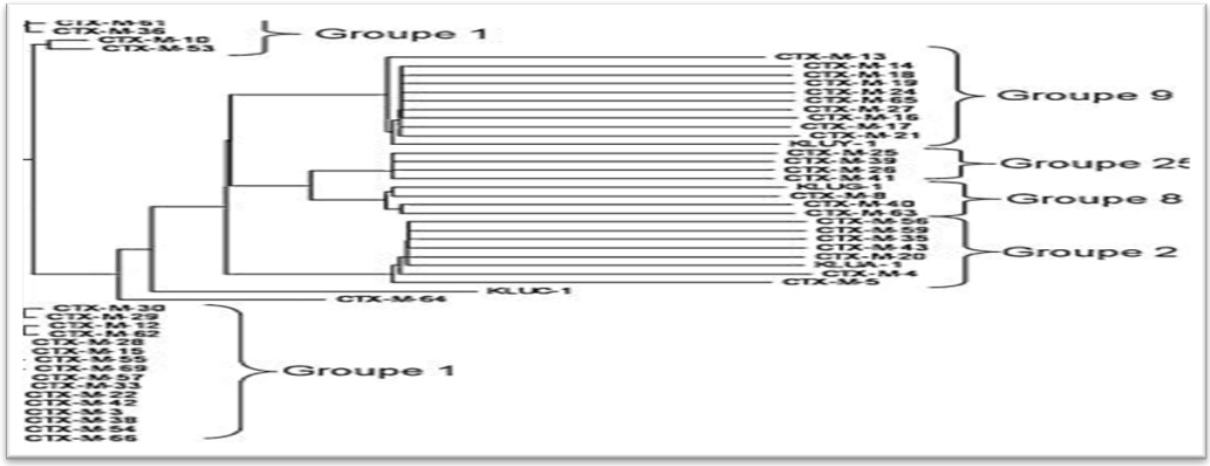


Figure N°08 : Phylogénie des β-lactamases chromosomiques de L'espace *Klutvera spp*.et des CTX-M **(Bonnet ;2004)**

3. 3. Détection des BLSE

Depuis leur émergence en 1983, les BLSE sont devenus un enjeu majeur pour la santé publique. Il est donc essentiel de disposer des méthodes efficaces pour leur détection. Ces techniques sont classées en deux catégories : les techniques microbiologiques et les techniques moléculaires.

3.4.1. Techniques microbiologiques

La majorité des tests de détection des BLSE sont basés sur la méthode de diffusion. Ainsi plusieurs méthodes ont été décrites parmi lesquelles : le test de double synergie, la méthode de confirmation du CLSI (Clinical Laboratory Standards Institue), et le test espagnol **(Nordmann et *al.*, 2012).**

3.4.1.1. Test de double synergie

C'est le test le plus utilisé et le plus recommandé car il ne nécessite pas de matériel et est de réalisation facile. La synergie s'effectue entre un disque de céphalosporine de 3ème génération et un inhibiteur de bêta-lactamase tel que l'acide clavulanique. Ce test possède plusieurs variantes et est basé sur la mise en évidence d'une restauration de l'activité des céphalosporines de 3ème génération en présence d'un inhibiteur enzymatique **(Drieux et *al.*, 2008).**

3.4.1.2. Test espagnol (double disque)

Ce test est fait pour les souches qui ne présentent pas une image de synergie, avec diminution des diamètres des céphalosporines de 3ème génération et pour déterminer s'il y a production d'une BLSE.

Il consiste à déposer un disque d'AMC et un disque de céphalosporine de 3ème génération à une distance de 30mm (centre à centre), de laisser diffuser les antibiotiques

pendant une heure, à la température ambiante. Après diffusion, on enlève le disque d'AMC et le remplacer par un disque de CTX.

Le test du double disque est positif quand le diamètre d'inhibition du disque de céphalosporine de 3eme génération appliqué après diffusion du disque AMC est supérieur ou égal à 5mm par rapport au diamètre d'inhibition du disque de céphalosporine de 3eme génération seul, ce qui indique une production d'une BLSE. **(Nordmann et *al.*, 2012)**

3.4.2. Techniques moléculaires

1.Extraction d'ADN :

La technique d'extraction de l'ADN (acide désoxyribonucléique) consiste à isoler l'ADN d'une cellule en quantité et qualité adéquates pour faciliter son analyse. Voici les étapes clés pour l'extraction de l'ADN :

- Rupture des tissus pour extraire l'ADN du noyau (et de la mitochondrie).
- Elimination de la protéine et des peptides.
- Précipitation et purification de l'ADN **(Muscle et *al.*, 2010)**

2.Les composants utilisés dans le protocole d'extraction d'ADN :

2.1Tampon Tris-EDTA (TE) :

Il forme un complexe avec les ions métalliques et contribue à la protection de l'ADN contre les nucléases. Conserve le pH de la solution pour prolonger la stabilité de l'ADN et sa conservation. **(Dna et *al.*, 2021)**

2.2 Tris-Cl :

Il utilisé pour maintenir le pH du milieu réactionnel au niveau optimal pour l'activité de la taq ADN polymérase. https://www.gazettelabo.fr/

2.3 EDTA :

EDTA forme des complexes avec les ions métalliques comme le Ca2+ et le K+ (éléments essentiels de la structure cellulaire qui préservent l'intégrité de la paroi). Leur capacité à chélater contribue à altérer la membrane cellulaire et empêche aussi la rupture de l'ADN en chélatant les ions Mg2 +, qui sont des cofacteurs indispensables pour le fonctionnement des nucléases. **(Dna et *al.*, 2021)**

3.La réaction de polymérisation en chaine (PCR) :

La PCR, mise au point par Mullis en 1983, est une méthode enzymatique in vitro qui permet de multiplier spécifiquement et massivement de courts segments de séquences d'acides nucléiques (ADN ou ARN). Les produits issus de la PCR peuvent par la suite

être examinés en les séparant par électrophorèse sur gel, facilitant ainsi leur visualisation et leur identification (**Bhanothu et *al.*, 2019).**

Le concept de base de la PCR se fonde sur la multiplication répétée, en dehors du milieu cellulaire, du matériel génétique ciblé où un segment d'ADN peut être spécifiquement amplifié grâce à l'enzyme ADN polymérase dans une démarche semi-conservatrice. Cette enzyme produit une séquence d'ADN complémentaire en se servant d'un amorce spécifique fixée à l'un des brins d'ADN à des emplacements précis choisis pour initier la synthèse. Les amorces servent à diriger la séquence à amplifie et à générer des milliards de répliques du segment d'ADN désiré **(Bhanothu et *al.*, 2019).** En général, un cycle de PCR comprend trois phases spécifiques :

A. Dénaturation :

Le fragment d'ADN renfermant la séquence visée est soumis à une température élevée, généralement autour de 95 °C. Cela facilite la séparation des deux brins d'ADN, conduisant à la formation de brins simples (**Ahrberg et *al.*, 2016).**

B. Hybridation (ou annealing) :

Dans cette phase, la température est réduite (≈56 °C) afin de favoriser l'attachement spécifique des amorces (de petits segments d'ADN qui se complètent à la séquence cible) aux brins d'ADN simple (**Ahrberg et *al.* 2016).**

C. Élongation :

Une enzyme nommée ADN polymérase, généralement extraite d'organismes thermophiles tels que Thermus aquaticus, se lie au complexe. L'ADN polymérase produit un nouveau brin d'ADN en incorporant des nucléotides complémentaires à la séquence désirée, se basant sur les amorces comme points de référence. Pour stimuler l'activité de la polymérase, on élève la température lors de cette phase, généralement autour de 72°C (**Ahrberg et *al.* 2016).**

Les trois phases (dénaturation, hybridation et élongation) sont itérées plusieurs fois, afin d'amplifier de manière exponentielle la séquence d'ADN visée (**Ahrberg et *al.* 2016).**

4.Les composants du Mix PCR :

4.1. Matrice ADN :

Avant d'entamer le processus de PCR, l'extraction de l'ADN doit être effectuée à partir de l'échantillon que l'on désire examiner. Ce processus d'extraction permet de séparer et de purifier l'ADN de l'échantillon, assurant ainsi que le segment d'ADN ciblé se trouve dans un échantillon prêt à être utilisé pour la PCR (**DEBAB et *al.*, 2020).**

4.2. Polymérase de l'ADN :

La fonction de la polymérase de l'ADN est la duplication des nucléotides d'ADN. Quand l'enzyme se lie à l'ADN simple brin, elle produit un brin d'ADN complémentaire au brin initial. Cependant, pour débuter ce processus de synthèse, les ADN polymérases ont besoin d'une petite portion d'ADN bicaténaire, appelée amorce (**DEBAB et *al.*, 2020).**

4.3. La Taq ADN polymérase :

Elle extraite de thermus aquaticus (Taq), est résistante à des températures élevées et requiert des amplifications spécifiques, contrairement à d'autres ADN polymérases qui se dénaturent. Ainsi, les ADN polymérases thermostables se répartissent en deux catégories : celles dotées d'une activité exonucléase (correction des erreurs) de 3′ ⟶ 5′, à l'instar de la Pyrococcus furiosus (Pfu) ADN polymérase, et celles qui ne possèdent pas cette fonction, comme la Taq ADN polymérase. Les ADN polymérases de correction d'erreurs présentent une plus grande précision que les ADN polymérases sans correction, grâce à leur activité exonucléase 3′ ⟶ 5′ qui leur permet de retirer les nucléotides incorrectement incorporés d'une chaîne d'ADN en cours de construction **(Bhanothu et *al.*, 2019).**

4.4. Les amorces :

A la fois complémentaires et inverses, sont de courts oligonucléotides d'environ 17 à 30 bases. De manière optimale, elles devraient être parfaitement en adéquation avec la séquence cible à examiner et posséder une composition globale de 50% de bases G et C. Il est primordial d'éviter que ces amorces s'hybrident entre elles (création de dimères d'amorces) ou avec elles-mêmes (auto-hybridation), et qu'elles ne forment de boucles (structures en forme de pin). La sensibilité de la PCR peut être réduite par la présence de dimères d'amorces indésirables **(DEBAB et *al.*, 2020).**

4.5. Hot Fire :

C’est une ADN polymérase FIER modifiée chimiquement, permettant une PCR à démarrage à chaud qui améliore la spécificité et la précision. Réduisez les imperfections d'amorçage ainsi que l'extension des amorces et des dimères d'amorces non chauffés spécifiquement. (https://solisbiodyne.com/)

4.6. Buffer :

Les tampons de chargement sont des solutions à haute densité, qui facilitent le chargement de solutions contenant de l'ADN ou de l'ARN dans les puits de gel d'agarose. Le tampon de charge PCR contient deux colorants, le bleu de bromophénol et le cyanol de xylène, qui permettent de surveiller la migration des fragments d'ADN pendant l'électrophorèse en gel d'agarose. Top-bio (https://www.top-bio.com/)

4.7. Mg cl2 :

C'est un cofacteur essentiel de la Taq Polymérase. Ce cation bivalent interagit également avec les charges négatives de la chaîne d'ADN, limitant ainsi les forces de répulsion entre brins d'ADN et favorisant donc la stabilité de l'hybridation. (https://www.gazettelabo.fr/)

4.8. DNTPs :

Les dNTPs sont les 4 nucléotides de base : dATP, dCTP, dGTP, et dTTP. Les dNTPs sont les briques nécessaires à la construction de nouveaux brins d'ADN. Ces 4 nucléotides sont typiquement ajoutés à la réaction de PCR à des niveaux équimolaires pour une incorporation optimale. (https://www.clinisciences.com/en/)

4.9. Nucléase free water :

L'eau PCR est une eau ultra pure, dont il est prouvé qu'elle est exempte de nucléases, d'ADN et d'ARN. L'eau ultrapure est une eau particulièrement purifiée, dont la pureté est supérieure à celle de l'eau déminéralisée et distillée. Carlroth (https://www.carlroth.com/fr/fr/)

5.Electrophorèse

5.1 Définition :

L'électrophorèse est une méthode de séparation des molécules en fonction de leur charge électrique et de leur taille. Lorsqu'un courant électrique est appliqué, les molécules chargées migrent à travers un gel, les plus petites se déplaçant plus rapidement. Cette technique est utilisée principalement pour analyser les protéines et les acides nucléiques. Elle permet de visualiser la composition d'un échantillon et de détecter des anomalies. L'électrophorèse est un outil fondamental en biologie médicale et en génétique. (**Alberts et *al*… (2014).**

5.2. Concentration du gel d'agarose :

La concentration d'agarose employée est déterminée en fonction de la dimension des fragments à séparer. Plus le pourcentage d'agarose est bas, plus les morceaux d'ADN se déplacent rapidement. Habituellement, pour séparer de grands fragments d'ADN, il est préférable d'utiliser une faible concentration d'agarose, tandis que pour la séparation de petits fragments d'ADN, une concentration plus élevée d'agarose est conseillée.

6.Visualisation de l'ADN :

Après l'électrophorèse, diverses techniques peuvent être employées pour rendre visibles les variétés d'ADN distinctes dans le gel à l'œil nu Les visualisations ont été réalisées à la fin de la migration grâce au trans-luminateur. (**Derveaux et *al.*, 2010)**

7.Les gènes de résistances :

- ✓ **Le gène de résistance à la tétracycline : Tet(A) :**

Ce gène est situé sur des plasmides de conjugaison de différents groupes d'incompatibilité **(Bokaeian et *al.,* 2014).** Le gène codant tetA chez les bactéries de Klebsiella peut être utilisées pour transférer la résistance TET à d'autres bactéries comme E. coli via la médiation plasmidique (**Safika et *al.,* 2022**).

Le gène tetA codifie pour le transporteur proton-[tc·Me] + et pour la pompe d'efflux, mais surtout, il code pour la protéine membranaire de résistance TetA. Cette protéine exporte la tétracycline envahissante hors de la cellule bactérienne avant qu'elle ne puisse toucher sa cible, qui est le ribosome. (**Saenger *et al.,* 2000**). TetA est une protéine agissant comme un anti-transporteur tétracycline/métal-proton, localisée au niveau de la membrane cytoplasmique **(Hillen et *al.,* 1994)**. Chiu et al. (2017) ont aussi souvent identifié des gènes tetA chez K. pneumoniae qui résiste à la tigécycline**. (Du et *al.,* 2018)**

✓ Le gène de résistance de beta lactamine : TEM :

Le gène TEM est à l'origine de la synthèse d'une enzyme nommée bêta-lactamase de type TEM, conférant une résistance aux bêtalactamines. Ces enzymes ont été initialement extraites en 1965 d'une souche d'E. coli, issue d'un patient dénommé Temoneira, à Athènes en Grèce, ce qui a donné lieu à leur appellation TEM (**Rahman et *al.* 2018).**

Les bêta-lactamases TEM, qui font partie de la classe A des bêta-lactamases, ont la capacité d'hydrolyser les pénicillines et les céphalosporines de première génération, à l'instar de la céphaloridine. L'acide clavulanique et les tazobactams inhibent fortement ces dernières. D'après un rapport de 2005, on a recensé 138 variétés de bêta-lactamases TEM, généralement médiées par des plasmides. Ces variantes proviennent de modifications dans les gènes TEM traditionnels (TEM-1 et TEM-2), qui engendrent des remplacements d'un ou plusieurs acides aminés au niveau du site actif. **(Rahman et *al.* 2018).**

✓ Le gène de résistance de triméthoprime : dfrA1 :

Le gène dfrA1 encode une dihydrofolate réductase (DHFR) qui offre une forte résistance au triméthoprime, augmentant la résistance de 1000 fois chez E. coli. Il est le plus courant parmi les gènes DFR extra- chromosomiques, retrouvé dans 38 % des souches porteuses de ces gènes, et est fréquemment lié à des intégrons de type I et II. (**Lombardo et *al.* 2016).**

✓ Le gène de résistance des quinolones : QNR :

On a découvert les PMQR (Résistance aux quinolones à médiation plasmidique) lactamase, issu d'une souche de Klebsiella pneumoniae hautement résistante. Ce plasmide offre une résistance subclinique contre divers quinolones et fluoroquinolones, en provoquant une multiplication par 8 de la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour l'acide nalidixique et d'une plage de 8 à 64 fois pour différentes fluoroquinolones.

Ce plasmide favorise l'identification des souches mutantes présentant une résistance forte aux fluoroquinolones **(Muylaert et *al.*, 2012).**

✓ Le gène de résistance des aminoglycosides : AAC (3) II :

On retrouve généralement les allèles AAC (3) -II sur des éléments génétiques mobiles (comme les plasmides et les transposons), ce qui leur permet d'être transférés horizontalement entre divers agents pathogènes (Hospital, n.d.). Ce gène se distingue par sa résistance à la gentamicine, à la tobramycine, au dibékacine, à la nétilmicine, au 2'-N-éthylnetilmicine, au 6'-N- éthylnetilmicine et à la sisomicine. On a cloné les gènes suivants de l'AAC (3) -II AAC (3) -IIa, AAC (3) -IIb, AAC (3) -IIc et AAC (3) -IId. (**Shaw et *al.*, 1993)**

✓ Le gène de résistance des phenicoles : CMLA

Le gène CMLA (fréquemment référencé comme cmlA1) est un gène conférant une résistance au chloramphénicol, qui code pour une pompe d'efflux (famille MFS) permettant l'expulsion de l'antibiotique hors des cellules bactériennes. Il est principalement centré sur les plasmides et fréquemment lié à des intégrons de classe 1, ce qui favorise sa transmission horizontale et sa Co-sélection avec d'autres gènes de résistance (sulfamides, tétracyclines, aminoglycosides…). On retrouve ce cas dans plusieurs espèces *E. coli, K. pneumoniae*. **(Bischoff et *al.*, 2005)**

DEUXIEME PARTIE :

Partie expérimentale

1. Matériel

1.1. Objectifs :

Cette étude a pour objectif d'identifier et de caractériser les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) impliquées dans les infections nosocomiales à l'hôpital Mohamed Boudiaf de Médéa. Elle vise à déterminer leur fréquence, leur profil de résistance aux antibiotiques ainsi que leur répartition au sein des différents services hospitaliers. La détection de la production de BLSE sera réalisée à l'aide de tests phénotypiques. L'analyse des données permettra d'évaluer les risques associés à ces souches multirésistantes et de formuler des recommandations en matière de prévention et de contrôle afin de limiter leur dissémination.

1.2 Type d'étude :

Ce travail s'appuie sur l'analyse des échantillons prélevés au sein de l'hôpital, complétée par une étude descriptive des résultats des antibiogrammes issus des archives du laboratoire de l'EPSP de Médéa.

1.3 Lieu et période d'étude

Notre étude a été réalisée au niveau de laboratoire bactériologique à l'hôpital de

Mohamed BOUDIAF, pendant 02 mois.

1.4 Critères d'inclusion

1. Patients hospitalisés depuis plus de 48 heures avec un diagnostic d'infection nosocomiale avéré.

2. Isolement d'entérobactérie à partir d'un prélèvement clinique (sang, urine, expectorations, liquide céphalo-rachidien, pus, etc.)

3. Résistance aux β-lactamines suggérant la production de BLSE (confirmée par antibiogramme)

1.5 Matériels utilisés :

Le Tableau ci-dessus résume les matériels utilisés.

Tableau N°04 : Les matériels utilisés

Instruments et appareillage	Réactifs et colorants	Milieux de culture
• Boites de pétri. • Pipettes pasteur. • Anse de platine. • Lames et lamelles. • Pince métallique. • Cellule de Malassez. •Cellules de Nageotte • Disques d'antibiotiques. •Galerie API20E • Ecouvillons • Microscope optique. •-Eppendorf •Agitateur • Étuve • Réfrigérateur • Becs Bunsen. •portoirs à tubes •Bains marie	•Eau Oxygène • Eau physiologique. • Violet de Gentiane. • Alcool. • Lugol. • Fuchsine basique • Huile à immersion. • Huile de paraffine •glycérol	• Gélose nutritive. • Milieu de Müller – Hinton. • Milieu de Hektoen. • Milieu de Chapman. •Milieu gélose au sang. •Milieu BHIB •Milieu de Chromagar

2. Méthodes

1. Prélèvements

Les prélèvements analysés dans cette étude ont été reçus au laboratoire de l'hôpital de Médéa en fonction des sites infectieux ciblés. Ils ont été réalisés chez des patients hospitalisés depuis plus de 48 heures. Il s'agissait principalement d'échantillons d'urine, de pus, de liquide céphalorachidien (LCR) et d'hémocultures, chacun accompagné d'une fiche comportant les informations suivantes : nom et prénom du patient, date, âge, sexe, service hospitalier et nature du prélèvement

Les différents prélèvements ont été analysés selon les techniques suivantes**.**

2. Analyses des prélèvements

2.1. Examen direct

2.1.1. Examen macroscopique

L'examen macroscopique est la première étape fondamentale d'identification effectuée où l'on vérifie l'aspect, la couleur et la consistance des prélèvements reçus dans une seringue ou dans un récipient stérile.

Couleur

- **En cas normale**

La couleur des prélèvements qui sont majoritairement du pus, des urines, des liquides céphalorachidiens et des crachats va clair.






L'urine **LCR** **PUS**

Figure N°09 : Prélèvements en cas normale (photo personnelle, 2025)

- **En cas d'anomalie**

Les prélèvements peuvent devenir troubles, jaunâtres, rougeâtres, ou brunâtres. La couleur rougeâtre indique souvent la présence de sang.

Consistance

Les prélèvements peuvent être : épais, visqueux, élastiques ou fluides. Ils peuvent être homogènes ou granuleux.

2.1.2. Examen microscopique (cytologique)

L'examen microscopique est une étape clé dans la démarche de diagnostic des infections bactériennes. Il permet d'observer des structures invisibles à l'œil nu.

- **Examen direct à l'état frais**

Cette méthode permet d'observer la morphologie des bactéries ; leur mode de regroupement et leur mobilité.

Technique :

- A partir d'un prélèvement liquide et à l'aide d'une pipette Pasteur, déposer une goutte sur une lame propre, puis recouvrez- la avec une lamelle.

- Placez la lame sur la platine du microscope au grossissement X 40. **(Zenati, 2024).**

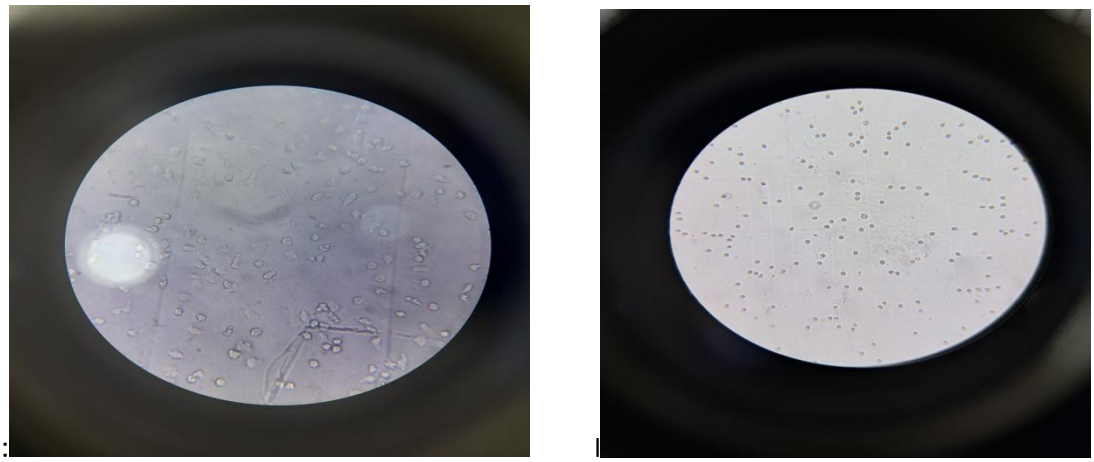


Figure N° 10: L'état frais des urines et des LCR au microscope (photo personnelle, 2025)

2.2. Mise en culture

Méthode :

- À proximité du bec Bunsen, le prélèvement est ensemencé dans les milieux de culture appropriés à l'aide d'une pipette Pasteur stérile.

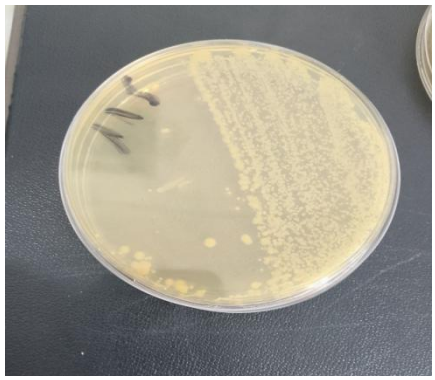
  - ✓ **Gélose Nutritive (GN) :** milieu ordinaire, qui convient à la culture des bactéries non exigeantes.
  - ✓ **Gélose au sang cuit (GSC) :** milieu d'enrichissement, qui permet la culture des bactéries exigeantes comme (Streptococcus, Neisseria).
  - ✓ **Milieu Chapman :** C'est un milieu destiné pour l'isolement des staphylocoques.
  - ✓ **Milieu Hektoen :** c'est un milieu sélectif permettent les isolements et différenciation des entérobactéries pathogènes et autres bacilles à Gram (-).

- Après l'ensemencement, les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 24 heures.

- Au cas où les germes ne poussent pas pendant les 24 heures d'incubation dans le milieu Chapman, continuer jusqu'aux 48 heures.

- La gélose au sang cuit mise en atmosphère riche en CO2 (en anaérobiose) l'incubation peut aussi continuer jusqu'aux 48 heures.

- Après l'incubation, l'observation de colonies bactériennes sur les milieux de culture permet d'orienter vers les tests d'identification



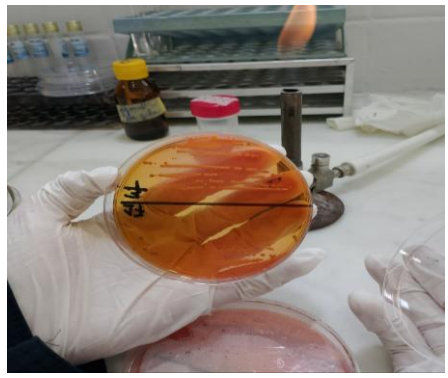


Figure N°11 : Colonies bactériennes sur milieu gélose nutritif et milieu hektoen (photo personnelle ,2025)

3. Isolement et Identification

3.1. Coloration de Gram (double coloration)

C'est la coloration de base en bactériologie qui permet de classer les bactéries selon leur structure paroi cellulaire en deux groupes distincts basés sur des propriétés de coloration : les Gram positifs et les Gram négatifs.

Principe

Cette coloration permet de l'affinité tinctoriale des bactéries, leur l'aspect morphologique et leur mode de regroupement.

Technique

La coloration de Gram comporte plusieurs étapes successives :

- Préparation du frottis : A l'aide d'une pipette Pasteur on prélève quelques gouttes d'une suspension bactérienne puis on dépose sur une lame propre ; on étale de centre à la périphérie et on laisse sécher.

- Fixation : Se fait par la chaleur pour le but de stabilise les bactéries, protège leurs structures cytologiques et facilite la diffusion des colorants tout en évitant leur destruction.

- Coloration : Recouvrir le frottis avec le violet de gentiane et laisser agir pendant une minute.

- Rincer doucement à l'eau

- Recouvrir la préparation avec le Lugol, laisser agir pendant 1 minute.

- Rejeter le Lugol puis rincer à l'eau.

- Décoloration : qui se fait par l'alcool 95° pendant 30 secondes.

- Rincer à l'eau courante et recouvrir la lame avec la Fuchsine, laisser agir une minute.

- rejeter la fuchsine, laver abondamment, égoutter, sécher entre deux feuilles de papier absorbant propres.

Lecture

L'observation s'effectue au microscope optique, à l'objectif ×100 avec de l'huile à immersion. Cette étape permet d'identifier la morphologie des bactéries telles que les bacilles (bâtonnets) et les coques (sphériques), ainsi que leur réaction à la coloration de Gram : les bactéries Gram positif apparaissent en violet, tandis que les bactéries Gram négatif se colorent en rose. **(Tortora et *al.*, 2018).**

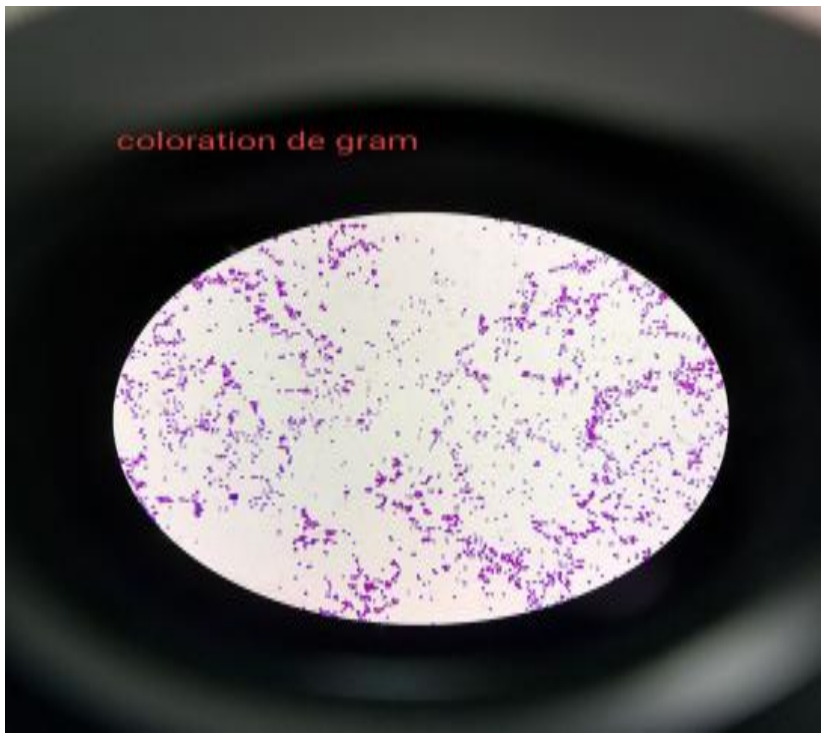


Figure N° 12: *Escherichia coli* au microscope optique

3.2. Test d'orientation

- ✓ **Test de catalase**

Ce test est à la base utilisée pour l'identification des bactéries à Gram positif.

Principe :

Détection la présence de l'enzyme catalase qui décompose le peroxyde d'hydrogène

(H2O2) avec dégagement d'oxygène.

Technique :

Quelques gouttes d'eau oxygénée (H2O2) sont déposées sur une lame propre et sèche, puis à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée, l'inoculum bactérien est rajouté. **(Tortora et *al.*, 2018).**

Résultat :

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



Figure N°13 : Test de catalase positif (+)

✓ **Test d'oxydase**

La recherche d'oxydase est une technique d'identification en bactériologie concernant les bactéries à Gram négatif.

Principe

Le test consiste à mettre en évidence la capacité que possède la bactérie à oxyder un réactif incolore (la NN-diméthyl-paraphénylène diamine) en un dérivé rose violacé.

Technique

Placer un morceau de papier imprégné du réactif sur une lame et à l'aide d'une pipette Pasteur prélever une colonie bactérienne bien isolée et la déposer doucement sur le papier. **(Tortora et *al.*, 2018).**

Résultats

- Si la colonie prend une teinte rose, violette, le germe possède une oxydase : le test est positif.

- Si la colonie reste incolore, le germe ne possède pas d'oxydase, le test est négatif



Figure N°14 : Test d'oxydase négatif

3.3. Galerie API 20E (Appareils et Procédés d'Identification pour les entérobactéries)

Api 20E comporte 20 micros tubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée en Api 20E Médium qui reconstitué les tests.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés Spontanés ou révéler par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est

Obtenue à l'aide du tableau d'identification.

Technique :

• Préparation de la galerie

Assembler le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide ;

Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

• Préparation de l'inoculum

Utiliser un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérile ou d'eau distillée stérile sans additif.

A l'aide d'une pipette pasteur, prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé ;

Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu.

•Inoculation de la galerie :

À l'aide d'une pipette Pasteur stérile, introduire la suspension bactérienne dans chaque tube.

Appliquer la pointe de la pipette contre la paroi intérieure pour éviter la formation de bulles.

•Incubation

Incuber la boite pendant 24 heures à 37°C.

•lecture et interprétation :

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Interpréter les résultats à l'aide du tableau de lecture présent dans la notice ou sur le site de bio Mérieux.

Identifier la souche bactérienne à l'aide du Catalogue Analytique. **(Biomérieux. 2024).**



Figure N°15 : Identifications des souches BLSE par la galerie API 20 de deux différentes prélèvements (LCR, PUS) (Photo personnelle, 2025)

4.Etude de la sensibilité aux antibiotiques

- **Antibiogramme**

- **Principe**

L'antibiogramme est une analyse de laboratoire réalisé par la méthode de diffusion en gélose (méthode des disques), selon Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Il repose sur la connaissance du phénotype sauvage caractéristique de l'espèce et de différents phénotypes de résistance acquis. Ces dernières sont définies non seulement par des caractères de résistance en termes de catégories clinique ("I", " S " ou "R"), mais aussi en termes de diminution significative de sensibilité et par des images typiques (Synergie).

_Milieu pour antibiogramme :

Le milieu utilisé pour réaliser l'antibiogramme est la gélose Muller Hinton (MH), il doit être coulé en boites de Pétri sur une épaisseur de 4 mm puis séchées avant l'emploi.

_Préparation de l'inoculum :

À partir d'une culture pure âgée de 18 à 24 heures, obtenue sur un milieu d'isolement approprié (notamment pour la revivification des souches conservées par ensemencement sur gélose GN), quelques colonies bien isolées et morphologiquement identiques sont

prélevées à l'aide d'une anse de platine. Celles-ci sont ensuite mises en suspension dans 5 ml d'eau physiologique stérile, puis homogénéisées de manière à obtenir une suspension bactérienne uniforme.

_Ensemencement :

Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum. L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum. Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.

Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boite à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boites de Pétrie, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

_Application des disques d'antibiotiques :

À l'aide d'une pince stérile, les disques sont retirés de l'étui, et placés sur la gélose, idéalement ne pas placer plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boite de 90 mm, presser légèrement chaque disque d'antibiotique à l'aide de la pince et ne pas déplacer après application. La liste des antibiotiques à tester selon la bactérie isolée.

_Incubation :

Les boîtes sont mises à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24h.

_Choix des antibiotiques

Les antibiotiques testés lors de la réalisation de l'antibiogramme des entérobactéries sont :

Ampicilline (AMP), Amoxicilline-acide clavulanique (AMC), Ticarcilline (TIC), Pipéracilline (PRL), Céfazoline (KZ), Céfotaxime (CTX), Céftriazone (CRO), Imipénème (IPM), Amikacine (AK), Gentamicine (CN), Acide nalidixique (NA), Ciprofloxacine (CIP), Colistine (CT), Triméthoprime-sulfaméthoxazole (SXT), Chloramophénicol(C).

_Lecture et interprétation :

Les résultats sont exprimés en mm après lecture des diamètres des zones d'inhibition et sont interprétés en trois catégories : S = sensible et R= résistant en se référant aux normes CLSI**. (Pelczar et *al.*, 1993).**

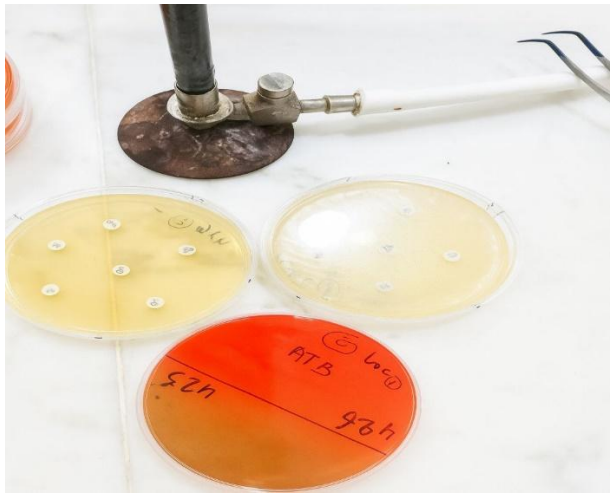


Figure N°16 : Antibiogramme

5.Recherche de la bêta-lactamase à spectre élargi

5.1. Test de synergie

Il consiste à rechercher une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de bêta-lactamases tel que (amoxicilline-acide clavulanique) et un disque C3G (ceftriaxone, ceftazidime, et céfotaxime) ou un monobactame (aztréonam). L'image de synergie dite en bouchon de champagne est caractéristique de la présence de BLSE. **(Bourjilat et *al.,* 2009).**

• Technique

Selon la technique du CLSI de l'antibiogramme, un inoculum est préparé à partir d'une culture jeune de 18h. La gélose Mueller-Hinton est ensemencée selon la méthode préconisée par CLSI, puis deux disques, l'un contenant l'association amoxicilline-acide clavulanique et l'autre une céphalosporine de troisième génération, sont placés côte à côte à 3cm de distance mesurés centre à centre. Les boîtes de Pétri sont incubées 18h à 37°C. L'image de synergie peut-être en bouchon de champagne caractéristique de la BLSE, ou bien en entonnoir correspondant souvent à une hyperproduction de bêta-lactamases naturelles. **(Jarlier et *al.,* 1988) (Sirot, 1996).**

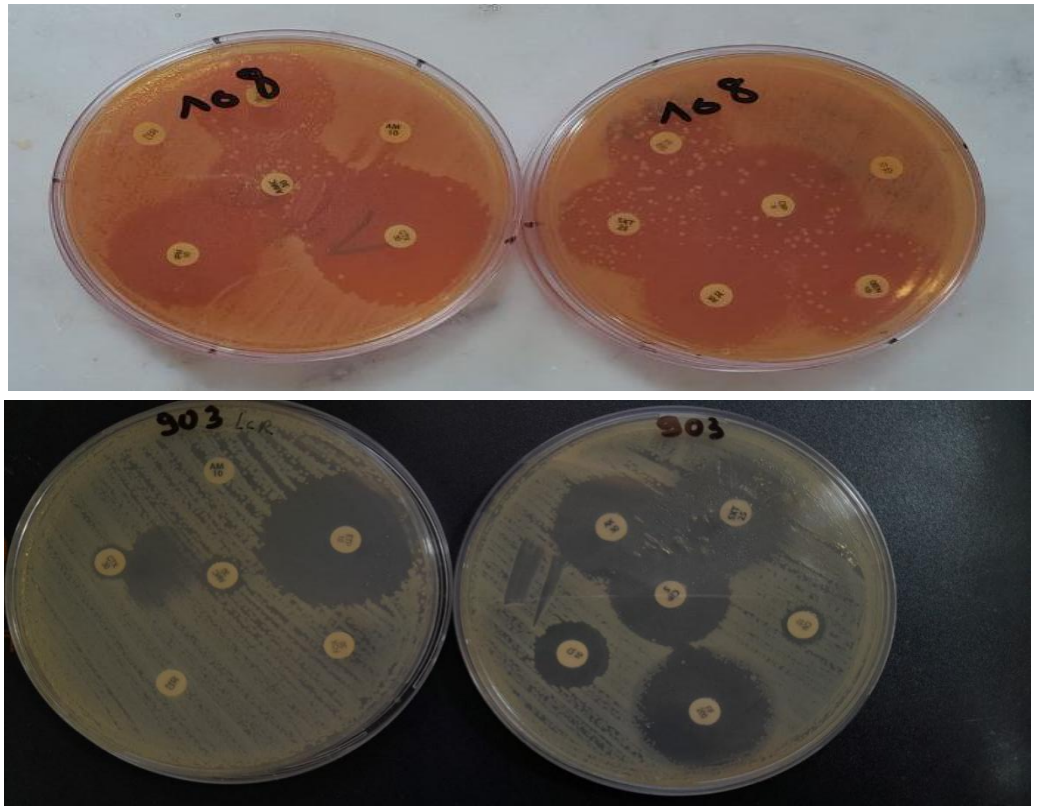


Figure N°17 : Test de synergie positif de différentes souches des entérobactéries

5.2. Test du double disque (test espagnol)

La détection de la bêta-lactamase à spectre élargi (étendu) peut être confirmée par le test du double disque. Ce test plus sensible consiste à rechercher une augmentation de la zone d'inhibition d'un disque de C3G.

_La technique est la suivante :

A partir d'une culture de 18h une suspension est préparée avec une opacité égale à 0.5 McFarland, une gélose Mueller-Hinton est ensemencée selon la technique de l'antibiogramme. Deux disques sont déposés, un disque AMC et un disque de C3G (CTX ou CAZ). On laisse diffuser à température ambiante pendant une heure, puis le disque AMC est ôté et remplacé par un disque de C3G (CTX ou CAZ). Les boites sont incubées18h à 37°C.

Le test est considéré positif, si le diamètre de la zone d'inhibition du disque de C3G est supérieur de 4 à 5 mm, comparé à celui observé autour du disque de C3G appliqué après pré diffusion du disque de l'AMC. **(OMS 2020)**

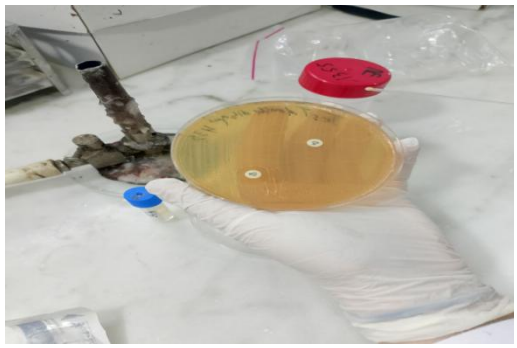




Figure N°18 : Test espagnol positif d'Entérobactérie

6. Technique moléculaire ; PCR

6.1. Cadre d'étude :

Cette étude vise à réaliser la caractérisation, moléculaire des souches de BLSE afin de rechercher les gènes de résistance aux antibiotiques. Les souches ont été isolées à l'hôpital de Médéa, à partir de différents prélèvements dans les infections nosocomiales.

6.2. L'isolement des souches BLSE :

Parmi les 25 souches BLSE isolées, il y a aussi des souches déjà conservées dans Milieu solide. Celles-ci ont été enrichies en ajoutant quelques gouttes de milieu BHIB (Brain Heart Infusion Broth), puis incubées pendant 2 heures afin de favoriser leur reprise de croissance. Après cette incubation, un ensemencement a été effectué sur les milieux sélectifs GN et Hektoen, permettant l'obtention de cultures jeunes adaptées à la poursuite des analyses microbiologiques.

Les souches préalablement conservées ont été réactivées par un enrichissement, réalisé en ajoutant quelques gouttes de milieu BHIB dans les tubes contenant les souches. Ces tubes ont ensuite été incubés pendant 2 heures à 37°C, afin de stimuler la reprise de la croissance bactérienne après l'incubation, un ensemencement a été effectué sur deux milieux de culture sélectifs : le milieu GN et le milieu Hektoen. À l'aide d'une anse stérile, une petite quantité de la culture enrichie a été prélevée, puis étalée soigneusement à la surface de la boîte de Pétri Les boîtes ont ensuite été incubées à 37°C pendant 24 heures, ce qui a permis l'obtention de cultures jeunes et pures.

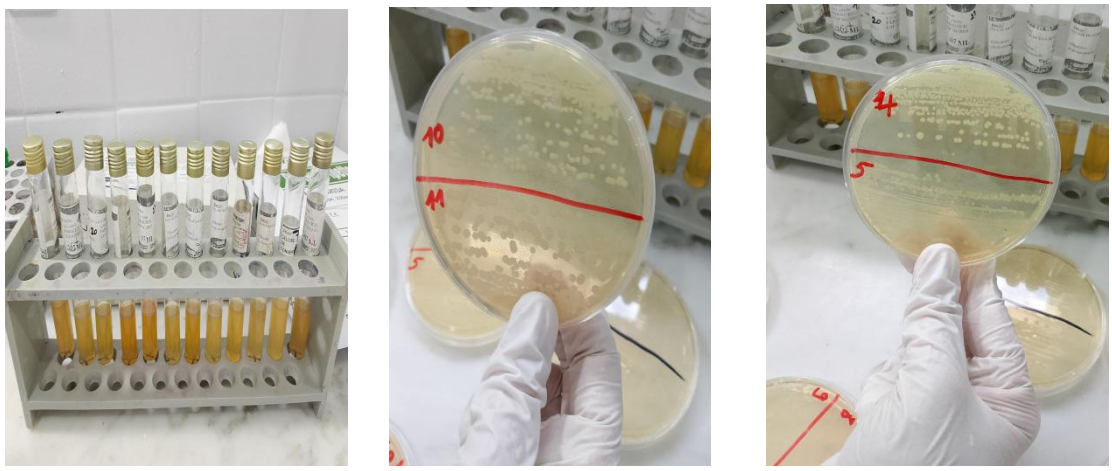


Figure N°19 : Souches conservées avant et après l'enrichissement

6.3. Identification des souche BLSE

Les souches ont été isolées et identifiées par les méthodes biochimiques. L'identification des souches d'Entérobactéries a été réalisée à l'aide de méthodes biochimiques classiques, notamment grâce à la galerie API 20E, qui permet une identification précise basée sur les réactions enzymatiques spécifiques à chaque espèce. Parallèlement, l'ensemencement sur le milieu Chromagar a été utilisé comme outil complémentaire pour détecter rapidement la présence de souches potentiellement productrices de β-lactamases à spectre élargi (BLSE), en se basant sur la couleur et l'aspect des colonies obtenues.



Figure N°20 : Identification ses souches par Chromagar (photo personnelle,2025)

6.4. Méthode de conservation

Deux à trois colonies de culture bactérienne ont été rassemblées dans des tubes contenant un mélange de 50% de glycérol et 50% de BHIB.

Les souches BLSE ont été conservés dans un milieu de conservation préalablement préparé (dans un Eppendorf de 1,5 ml mettre 50%de glycérol avec 50% de milieu BHIB).

Deux à trois colonies bien isolées ont été mis dans l'Eppendorf et elles ont été mélangées avec un vortex jusqu'à l'homogénéisation complète et conservées à -20°C.

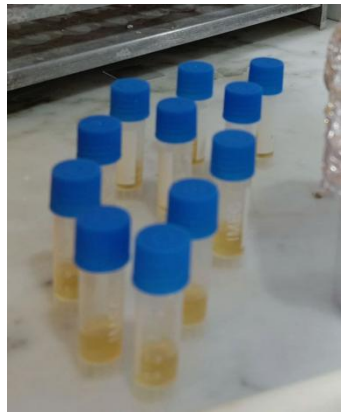
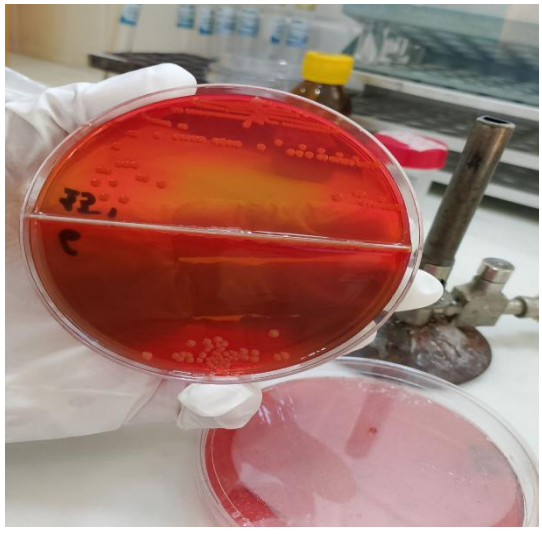




Figure N°21 : Méthode de conservation (photo personnelle , 2025)

6.5. Repiquage sur milieu Hektoen :

La suspension bactérienne obtenue à partir de milieu de conservation sur le milieu Hektoen à l'aide d'une anse de platine, puis incubée à 37°C pendant 24 heures.



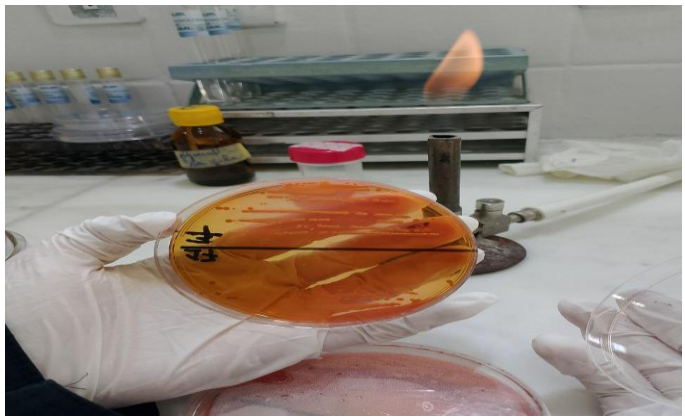



Figure N° 22: Repiquage des entérobactéries sur milieu Hektoen (photos personnelle 2025)

6.6. Extraction d'ADN :

A. Préparations des milieux pour l'extraction d'ADN :

- **EDTA**

Pour préparation la solution d'EDTA, on commence par dissoudre 1,8 g d'EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique) dans 8 ml d'eau distillée sous agitation. Étant donné que l'EDTA ne se dissout pas complètement à pH acide, on ajoute ensuite progressivement de la soude (NaOH) tout en agitant, afin d'ajuster le pH de la solution jusqu'à atteindre un pH de 8. Une fois le pH corrigé, l'EDTA se dissout entièrement. Enfin, on complète la solution avec de l'eau distillée jusqu'à obtenir un volume final de 100 ml.

- **TRIS**

Afin de préparer une solution tampon de Tris, on dissoudre 1,2 g de Tris dans 8 ml d'eau distillée sous agitation. Ensuite, on ajuste le pH de la solution à la valeur souhaitée en ajoutant progressivement de l'acide chlorhydrique (HCl), tout en maintenant l'agitation. Une fois le pH ajusté, on complète le volume avec de l'eau distillée jusqu'à obtenir un volume final de 100 ml.

- **TE (Tris-EDTA)**

Dans un bécher de 100 ml on prépare la solution tampon TE (Tris-EDTA), on utilise 1 ml de la solution de Tris, auquel on ajoute 0,2 ml de solution d'EDTA. Le mélange est ensuite complété avec 98,9 ml d'eau distillée afin d'obtenir un volume final de 100 ml.

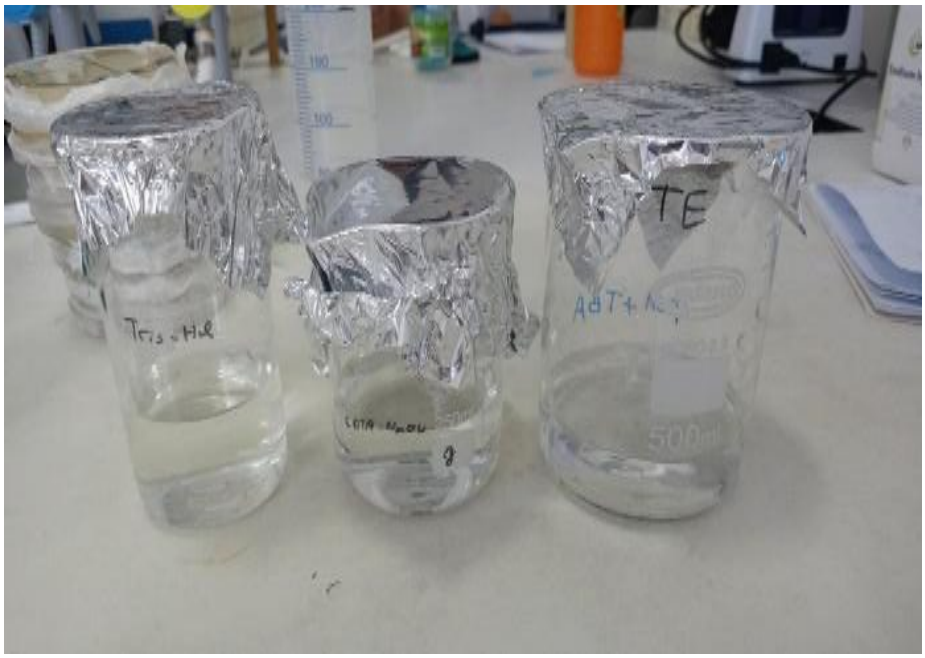


Figure N°23 : Solutions d'extraction

B. Procédure d'extraction d'ADN :

Toutes les étapes d'extraction d'ADN ont été effectuées sous une hotte microbiologique décontaminée préalablement par les radiations ultra-violet (UV) pendant 20 minutes.

3 ou 4 colonies isolées à partir de la culture sur milieu Hektoen à l'aide d'une anse de platine stérile ont été suspendu dans un tube incurvé de 2 ml contenant 150 µL de tampon TE (Tris-EDTA) à pH 8 bien mélangées par un vortex. Ensuite, soumettre la suspension bactérienne à une ébullition à 100 °C pendant 10 minutes à l'aide d'un thermo-agitateur (choc thermique). Cette étape permet la lyse des cellules et la libération de l'ADN. Les tubes ont été centrifugés à 12 000 tours par minute pendant 14 minutes. On obtient finalement un surnagent et un culot blanc.

_Le surnageant, contient l'ADN libre (génomique ou plasmidique), qui est utilisé ensuite pour la PCR

_ Le culot blanc contient principalement les débris cellulaires.



Figure N°24 : Appareil thermo-agitateur (photo personnelle , 2025)

6.7. Amplification en Chaîne par Polymérase (PCR) :

❖ Reconstitution des amorces :

Les amorces ont été centrifugées pendant 1 minute à une température ambiante. On prendre 1 µL d'amorces directe ou inverse, auquel on a ajouté 49 µL d'eau distillée stérile. Cette dilution a été soigneusement homogénéisée à l'aide d'un vortex, puis brièvement centrifugée. Les amorces diluées ont été conservées à -20 °C jusqu'à leur utilisation dans les réactions de PCR.

Préparation du Mix de PCR standard :

Tableau N°05 :-Milieux utilisés dans la PCR pour un seul échantillon

Composants	**Volume (µl)**
GC Rich	0.2
Buffer BD	2
Mg cl2	2
DNTP	0,2
FIRE	0,2
Forwarde primer	0,5
Reverse primer	0,5
L'eau distillée	9,4

ADN	5



Figure N°25: Préparation des mix (photo personnelle, 2025)

❖ Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) :

La préparation de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) commence Sous une hotte Biocap dans un milieu stérile par la sélection d'amorces spécifiques aux gènes de résistance ciblés, notamment TEM, tet(A), qnr, cmlA, dfrA1 et aac(3)II Pour chaque réaction, une combinaison de réactifs est ajoutée, comprenant un tampon (buffer BD), un agent d'enrichissement en bases GC riches (Rich GC), une ADN polymérase thermostable (Fire), des désoxynucléotides triphosphates (dNTPs) et du chlorure de magnésium ($MgCl_2$), pour un volume total de 5,6 µL. Ensuite, on ajoute 5 µL d'ADN extrait et 9,4 µL d'eau distillée stérile pour compléter le mélange réactionnel. L'ensemble est brièvement centrifugé puis homogénéisé à l'aide d'un vortex afin d'assurer une bonne répartition des composants.

Le mélange réactionnel a été versé dans des barrettes à PCR ensuite, les barrettes ont été placés dans le thermocycleur pour l'amplification, et ce dernier a été réglé selon le processus suivant :

La première étape consistait en une dénaturation initiale à une température de 95°C pendant 15 minutes. Ensuite, les étapes de dénaturation (95°C pendant 30 secondes), en maintenant une température d'hybridation selon chaque gène pendant 30 secondes et d'élongation (à 72°C pendant 1 minute) ont été répétées 40 fois pour effectuer un total de 40 cycles d'amplification. Après les 40 cycles, une étape d'élongation finale a été réalisée à 72°C pendant 5 minutes pour garantir une complète extension des amplicons. Ces cycles répétés entraînent une amplification exponentielle de la séquence d'ADN cible, conduisant à une accumulation suffisante d'amplicons pour les détecter et les analyser par la suite **(Nguyen et *al.*, 2016).**

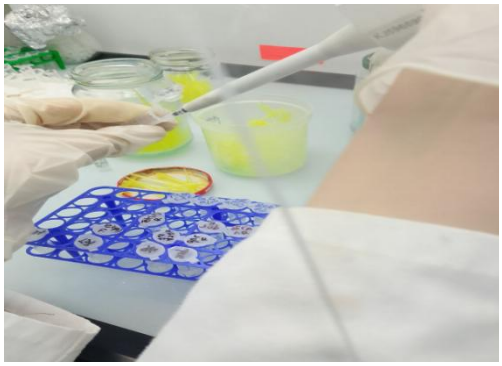




Figure N°26 : Manipulation sur la hotte Biocap



Figure 27 : Amplification des souches dans le thermocycleur

Tableau N°06 : Amorces utilisées dans la réaction de PCR standard

Gene	Amorce	Séquence oligonucléotide (5′–3′)	Souches BLSE	Tm (° C) Utilisé	Temps d'élongation	*Référence*
Bêta-lactames	**TEM**	(F)CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC (R)CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	*Escherichia coli* *Klebsiella pneumoniae*	56	1min	**(Acces et *al.*, 2022)**
Tétracycline	**Tet(A)**	(F)GGTTCACTCGAACGACGTCA (R)CTGTCCGACAAGTTGCATGA	*Escherichia coli* *Klebsiella pneumoniae* *Proteus sp* *Enterobacter sp*	60	1min	**(Ali, 2020)**
Quinolones	**Qnr**	(F)GGGTATGGATATTATTGATA AAG (R)CTAATCCGGCAGCACTATTTA	*Escherichia coli* *Klebsiella pneumoniae* *Proteus sp* *Enterobacter sp*	55	1min	**(Wang et *al.*, 2004)**
Triméthoprime	**DfrA1**	(F)GGAGTGCCAAAGGTGAACAGC (R)GAGGCGAAGTCTTGGGTAAAAAC	*Escherichia coli* *Klebsiella pneumoniae* *Proteus sp*	55	1min	**(Ali, 2020)**
Aminoglycosides	**aac(3)II**	(F)ACTGTGATGGGATACGCGTC (R)CTCCGTCAGCGTTTCAGCTA	*Escherichia coli* *Klebsiella pneumoniae* *Enterobacter sp*	60	1 min	**(Ma et *al.*, 2015)**

Chloramphenicol	**CmlA**	(F) CCGCCACGGTGTTGTTGTTATC (R) CACCTTGCCTGCCCATCATTAG	*Escherichia coli* *Klebsiella pneumoniae* *Enterobacter sp*	56	1 min	**(Momta et *al* 2012)**

6.8. Electrophorèse du produit de PCR :

A. Préparations pour l'électrophorèse :

- ✓ **TBE(Tris-Borate-EDTA)**

La préparation du tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) consiste à dissoudre 0,389 g d'EDTA dans 2 ml d'eau distillée sous agitation, puis on ajuste le pH à 8 à l'aide de NaOH. Ensuite, on mélange cette solution avec 2 ml d'EDTA supplémentaire, 5,9 g de Tris et 2,75 g d'acide borique dans 1 litre d'eau distillée, ce qui donne une solution de TBE 0,5 M prête à l'emploi.

- ✓ **Préparation de gel d'agarose :**

6g d'agarose ont été pesés et versés dans une bouteille en verre puis 400 ml de tampon TBE 0.5x ont été fondé aux micro-ondes et mélangé délicatement (la bouteille doit être sans bouchon). Sous une hotte chimique le mélange a été par la suit verser dans deux tubes coniques de 50ml puis 1ul de SYBR Safe a été ajouté dans les deux tubes. Le mélange des deux tubes a été versé dans un plateau de support et laissé refroidir pendant 15 min.

B.L'électrophorèse :

Le gel a ensuite été placé dans une cuve d'électrophorèse et submergé de tampon de migration TBE. Dans le premier puit du gel µl de poids moléculaire (Ladder) ont été ajoutée, ensuite, 6 µl du produit de PCR ont été mélangé avec 2µl de Bleu de charge dans le but de donner un poids à l'ADN. Ce mélangé a été versé dans le 2 -ème puit et ainsi de suite pour les autres échantillons.

La séparation des produits de PCR a été réalisée par électrophorèse à une tension de 135V pendant 20 minutes. Par la suite, la visualisation des bandes d'ADN a été effectuée à l'aide d'un Trans illuminateur UV.

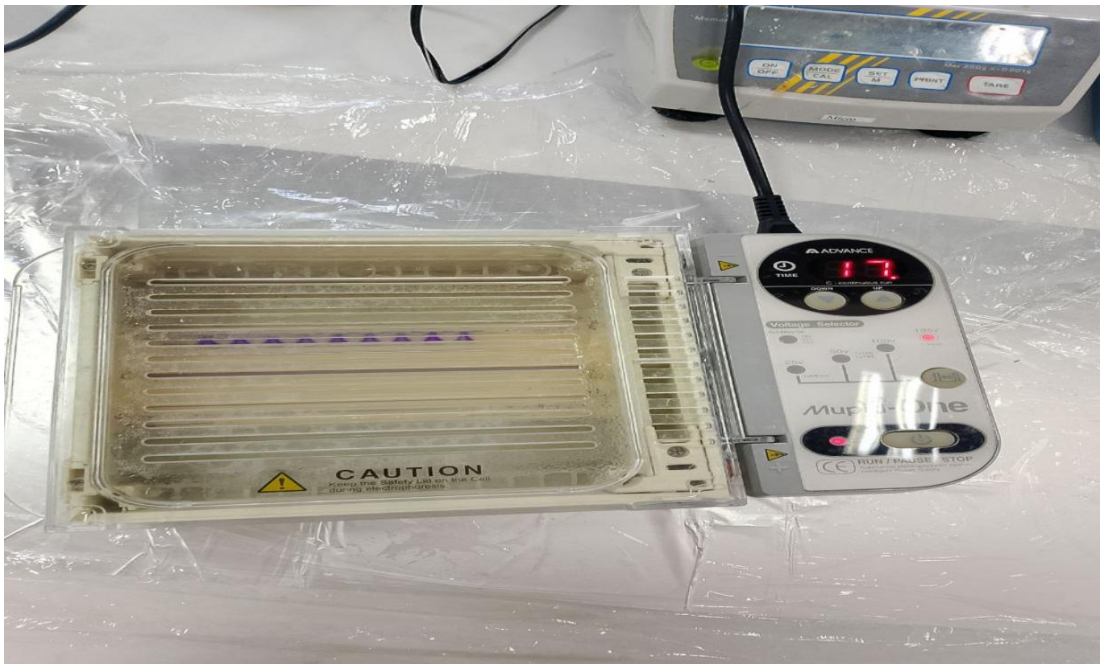


Figure 28 : Migration d'ADN par la cuve d'électrophorèse

TROISIEME PARTIE :

Résultats et Discussions

2. Résultats

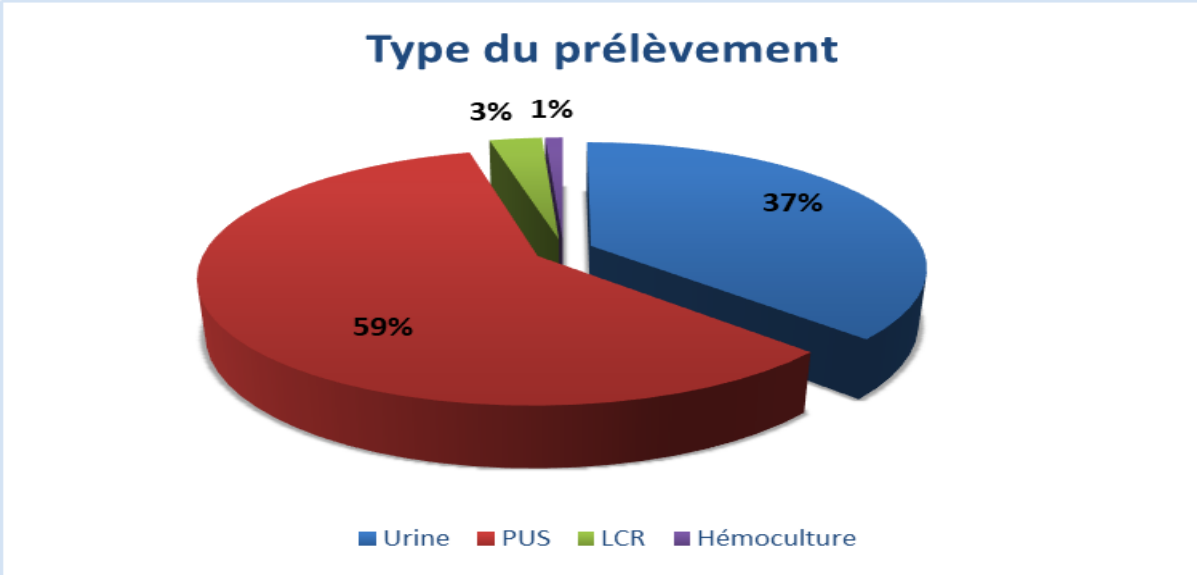
Notre étude est basée sur les entérobactéries isolées à partir des différents prélèvements (urines, pus, LCR, hémoculture) qui sont collectés au niveau de laboratoire de l'hôpital de MEDEA.

Au cours de la période de stage, un total de 550 entérobactéries et 53 souches productrices de β-lactamases à spectre étendu (EBLSE) ont été identifiées, sur la base des données issues des études rétro prospectives.

1.1. Répartition globale des souches d'entérobactéries isolées

1.1.1. Répartition selon le type de prélèvement :

Les entérobactéries isolées selon le type de prélèvements sont illustrées dans la figure suivante (figure 27)



FigureN°29 : Réparation des entérobactéries selon le type de prélèvements à Médéa de 2023 à 2025.

La majorité des prélèvements réalisés concernent le pus, représentant 59 % des cas, suivis par les prélèvements urinaires (37 %). Les prélèvements de liquide céphalorachidien (LCR) ne constituent que 3 %, tandis que les hémocultures avec un taux de (1 %).

1.1.2. Répartition selon le sexe :

La répartition des souches d'entérobactéries en fonction du sexe sont démontrés dans une figure dessous

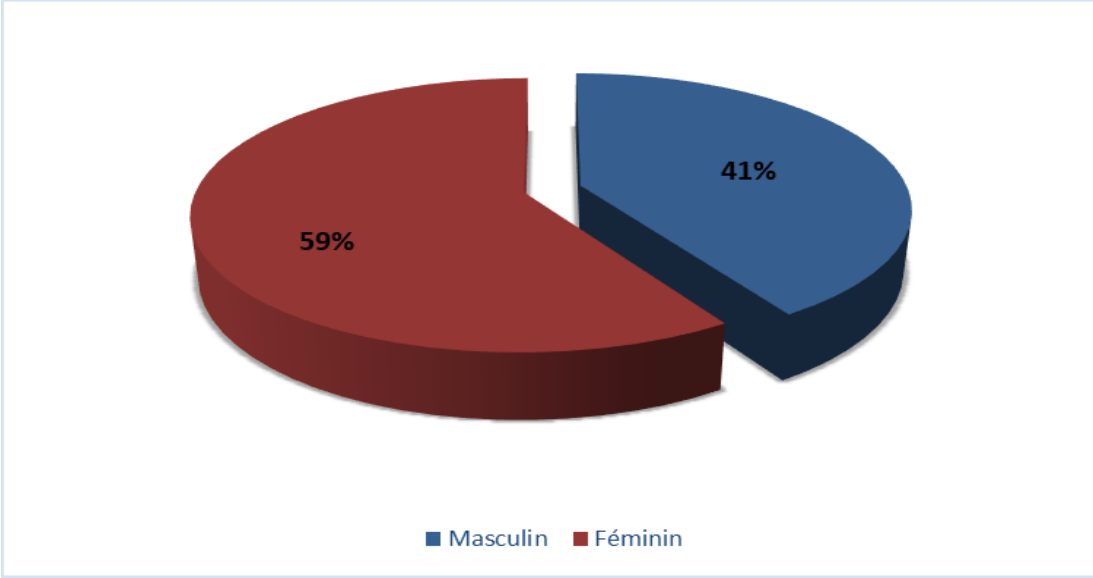


Figure N°30 : Répartition des souches d'entérobactéries en fonction du sexe

Comme l'indique la figure 28 la répartition des souches isolées selon le sexe montre que les patients de sexe féminin sont plus touchés avec une fréquence de 59% que les patients de sexe Masculin avec 41% avec une sex-ratio Homme/Femme de 0,69%.

1.1.3. Répartition selon le type du service :

La figure ci-dessous illustre la répartition des entérobactéries en fonction des différents types de services hospitaliers.

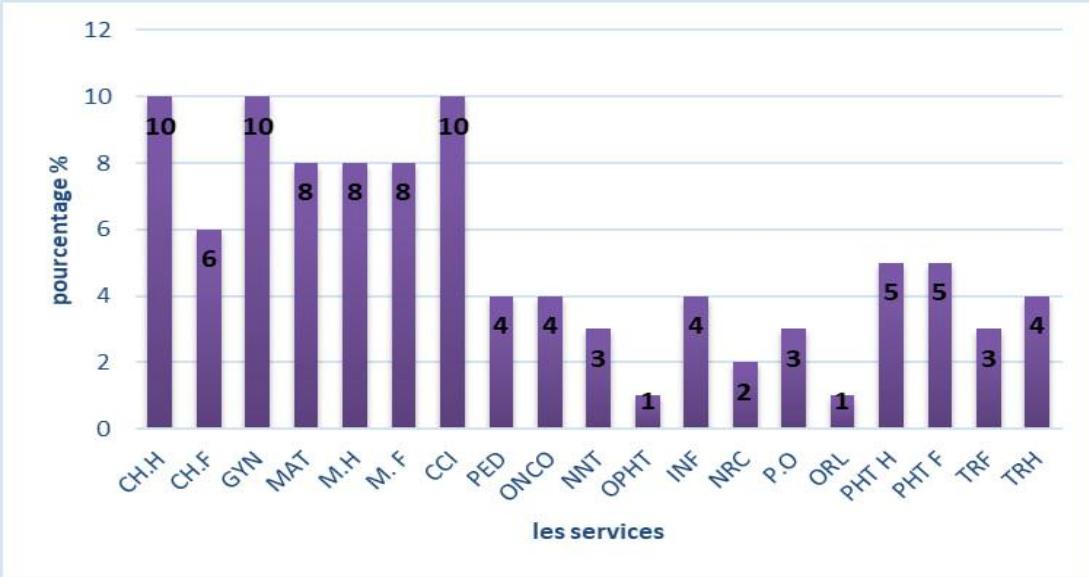


Figure N°31: Répartition des souches d'entérobactéries selon les services

CH.H : chirurgie homme / **CH. F :** chirurgie femme /**GYN :** gynécologie / **MAT :** maternité / **M.H** : médecine homme / **M.F :** médecine femme / **CCI :** chirurgie infantile / **PED :** pédiatrie /**ONCO :** oncologie / **OPHT :** ophtalmologie /

INF : infectieux / P.O **:** poste opératoire / ORL : oto- rhino- laryngologie /**PHT.H :** pneumologie et physiologie homme **/ PHT.F:** pneumologie et physiologie femme.

Selon la répartition des entérobactéries en fonction des différents services la montre que la fréquence plus élevée est enregistrée dans les services chirurgie homme ; gynécologie et chirurgie infantile avec un taux (10%), suivi du service de maternité, services de médecine homme et femme avec (8%) et enfin la fréquences Moyenne des entérobactéries dans les services restés.

1.1.4. Répartition selon l'espèce :

Les germes identifiés sont illustrés dans la figure (figure 30)

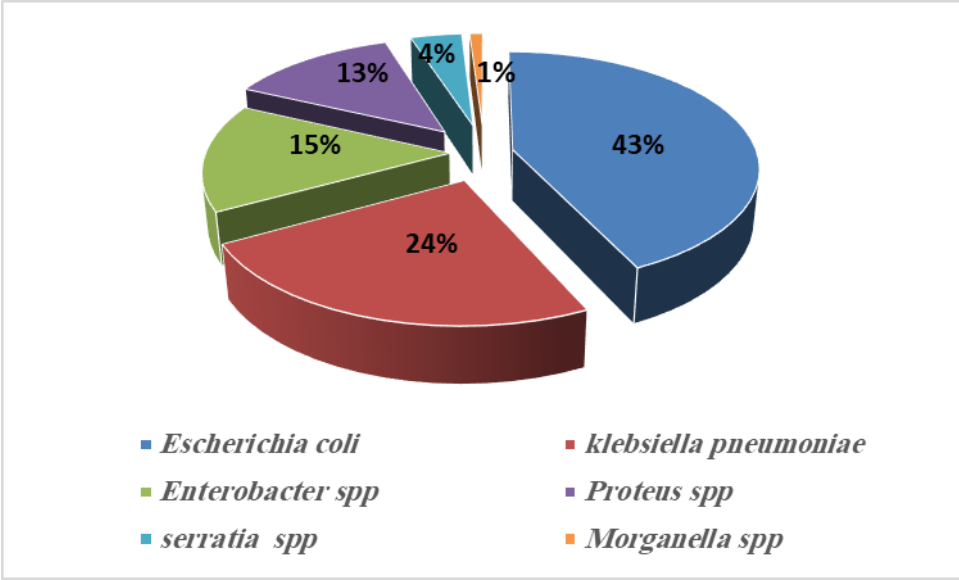


Figure N°32 : Répartition des souches d'entérobactéries selon l'espèce.

L'espèce *Escherichia coli* reste le germe le plus fréquemment isolé (43%), suivi par *Klebsiella pneumoniae* avec un pourcentage de 24%, suivi d'Enterobacter spp avec 15%, Proteus spp avec 13%, Serratia avec 4% et *Morganella spp* avec un taux 1%.

1.2. Répartition des souches d'entérobactéries BLSE (+)

Sur un total de 550 souches d'entérobactéries isolées, 53 souches ont montré une entérobactérie productrice de BLSE soit une fréquence de 10 %.

1.2.1. Répartition des souches d'entérobactéries BLSE (+) selon le type de prélèvement

La figure ci-dessous indique la répartition des entérobactéries productrices de b-lactamase à spectre élargi en fonction de différents types de prélèvements.

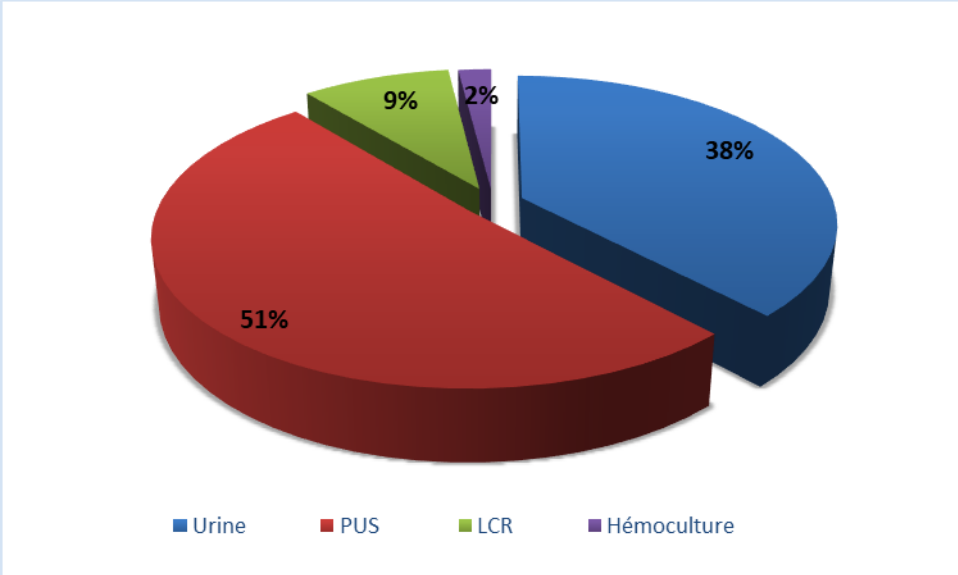


Figure N° 33 : Répartition des souches d'E-BLSE selon le type de prélèvement

Les résultats illustrés dans la figure indiquent que la fréquence des souches BLSE isolées à partir du pus 51% est plus élevée que celles des souches isolées des urines 38% et celles des souches isolées des autres prélèvements comme LCR 9% et Hémoculture 2%.

1.2.2. Répartition des souches d'entérobactéries BLSE (+) selon le sexe

La figure ci-dessous montre le pourcentage de deux sexes à partir des souches E-BLSE.

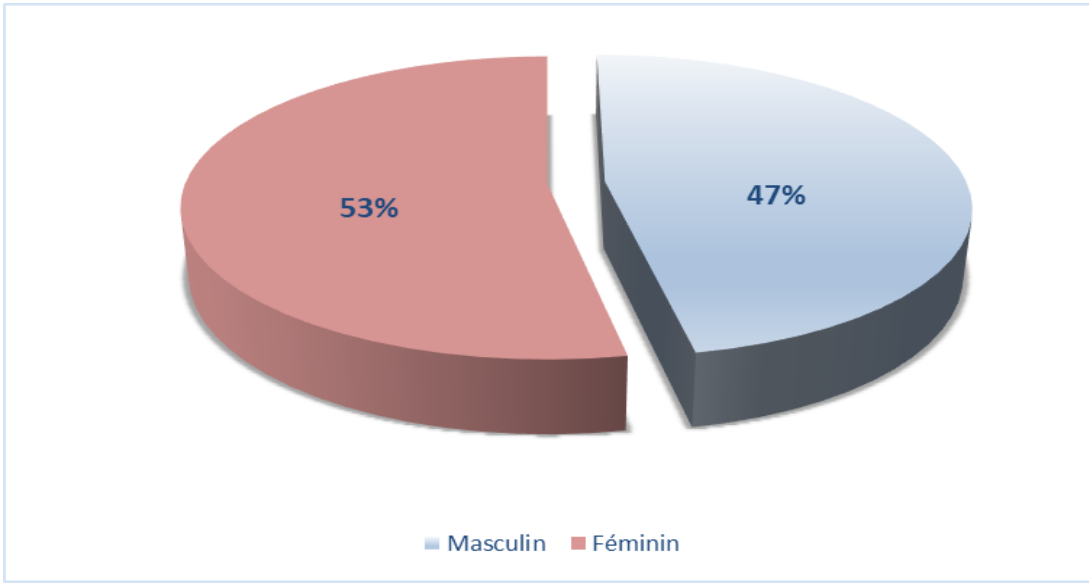


Figure N°34 : Répartition des E-BLSE selon le sexe.

Nos résultats montrent une prédominance des souches isolées chez les patients du sexe féminin avec 53% (n=28), par apport à 47 % (n= 25) des souches isolées chez les patients du sexe masculin, avec une sex-ratio de 0.47.

1.2.3. Répartition selon les différents types de services :

La figure (14) représente la distribution des souches BLSE dans différents services.

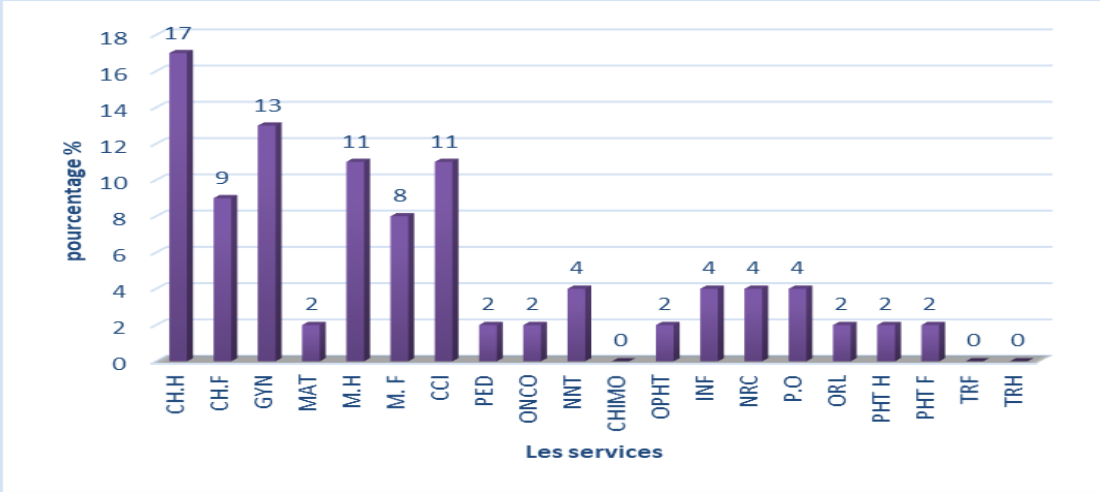
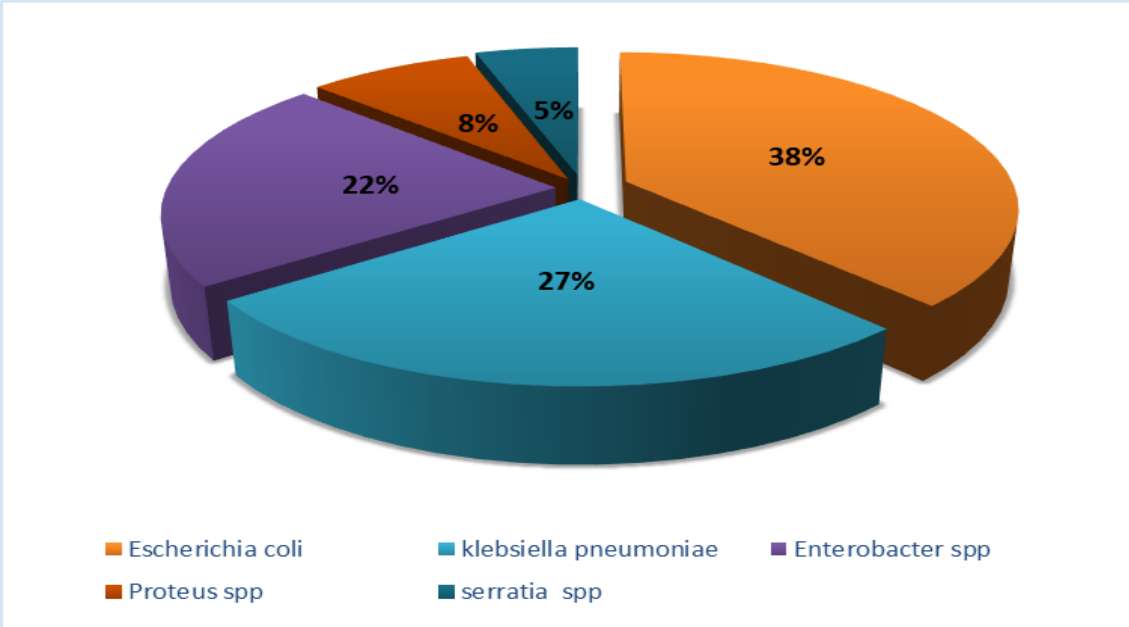


Figure 35 : Répartition des souches selon les différents types de services

La figure 33 montre que les services les plus concernés sont la chirurgie hommes (17 %), la gynécologie (13 %), la médecine homme et la chirurgie infantile (CCI) également à (11 %), la chirurgie femme (9%), service médecine femme (8%). En comparaison, les autres services affichent des taux plus faibles, entre (4 %) et (2 %).

1.2.4. Répartition des souches d'entérobactéries BLSE (+) selon l'espèce



FigureN°36 : Répartition des souches d'entérobactéries BLSE (+) selon l'espèce (n=53)

La répartition des souches d'entérobactéries productrices de BLSE rapporte que *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* sont les bactéries qui occupent toujours les premières classes avec les plus fortes proportions (38% et 27% respectivement).

1.2.5. Profil de résistance globale aux antibiotiques des souches d'entérobactéries BLSE (+)

Les pourcentages de sensibilité et de résistance des différentes souches d'entérobactéries BLSE sont donnés dans (la figure 35).

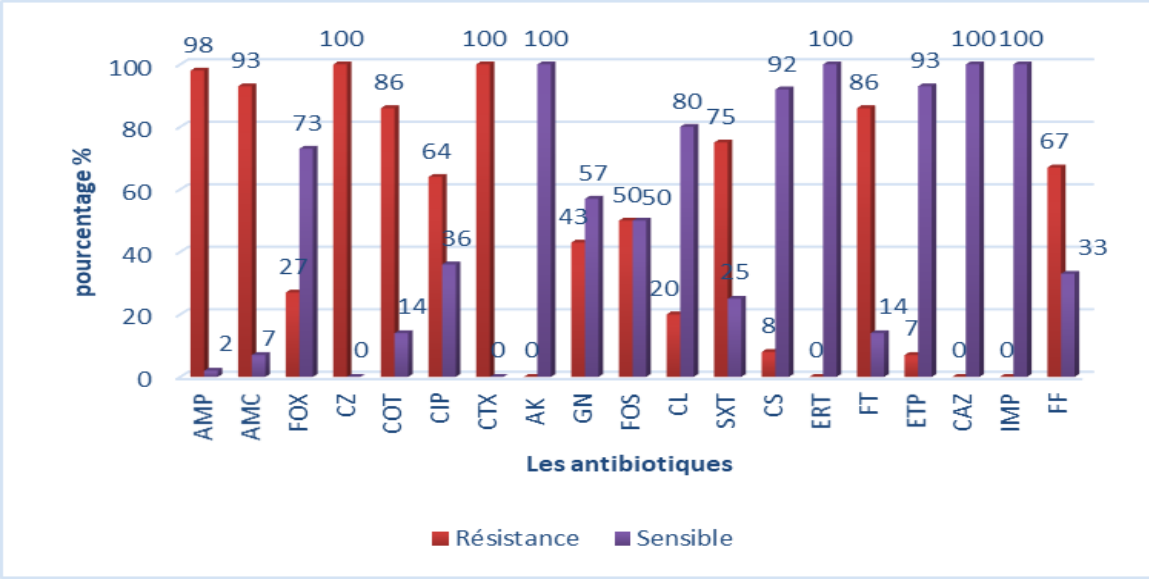


Figure N°37 : Profil de résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries BLSE (+) (n=53)

La figure 35 démontre une résistance élevée des souches d'entérobactéries productrices de BLSE aux AMP, AMC, CZ, CTX, COT, FT et SXT et une sensibilité élevée des souches aux AK, ERT, CAZ, IMP, CS, CL, FOX.

1.2.5.1. Profil de résistance d'Escherichia coli BLSE (+)

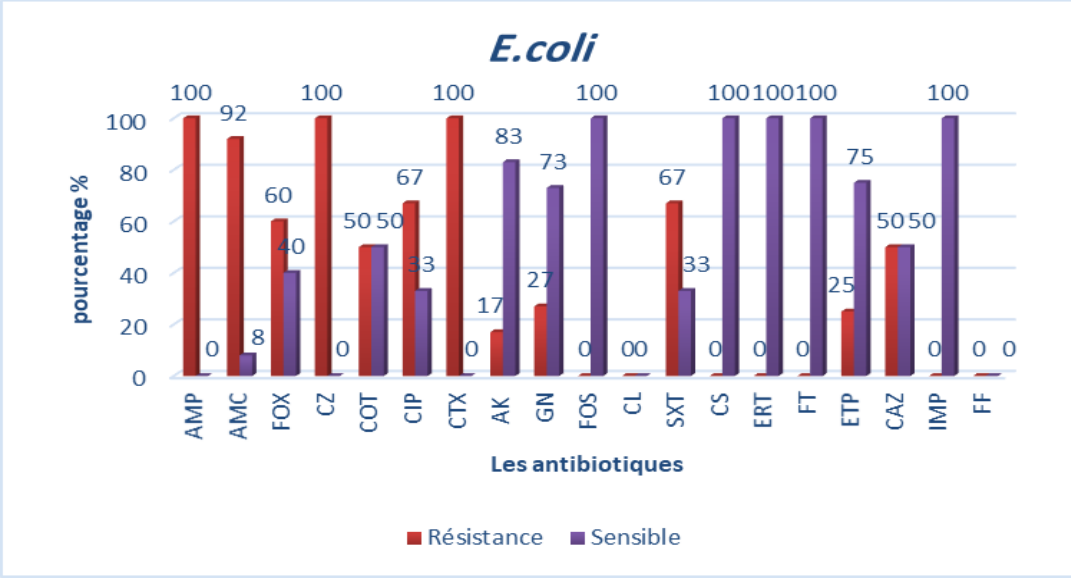


Figure N°38 : Profil de résistance et de sensibilité *d'Escherichia coli* BLSE (+) (n=53)

L'analyse du profil de résistance des souches *d'Escherichia coli* montre un taux de résistance élevées avec un pourcentage de (100%) vis à vis de l'ampicilline, Cefazoline, Céfotaxime, Une résistance importante vis-à-vis de l'association de l'amoxicilline et l'acide clavulanique (92%). Également pour la Céfoxitine (60%) et un taux de Ciprofloxacine (67%). Et pour la sensibilité démontre qu'un pourcentage total (100%) dans 'amikacine, Ceftazidime, imipenème.

Profil de résistance Klebsiella pneumoniae BLSE (+)

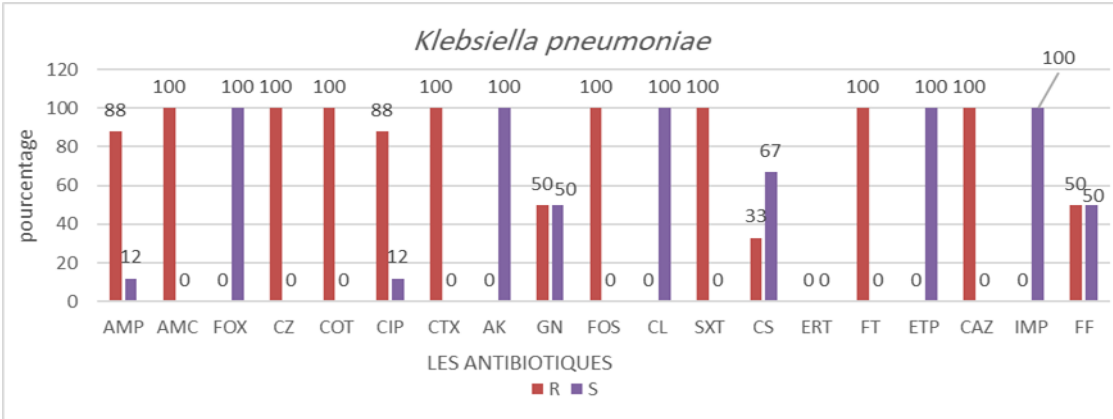


Figure N°39 : Profil de résistance et de sensibilité *de Klebsiella pneumoniae* BLSE (+) (n=53)

L'analyse du profil de résistance des souches de Klebsiella pneumoniae montre un taux de résistance totale vis à vis de AMC, CZ, CTX, SXT, COT et CAZ. Et en revanche une sensibilité complète vis-à-vis de IMP, AK, CL, ETP.

Profil de résistance Enterobacter spp BLSE (+)

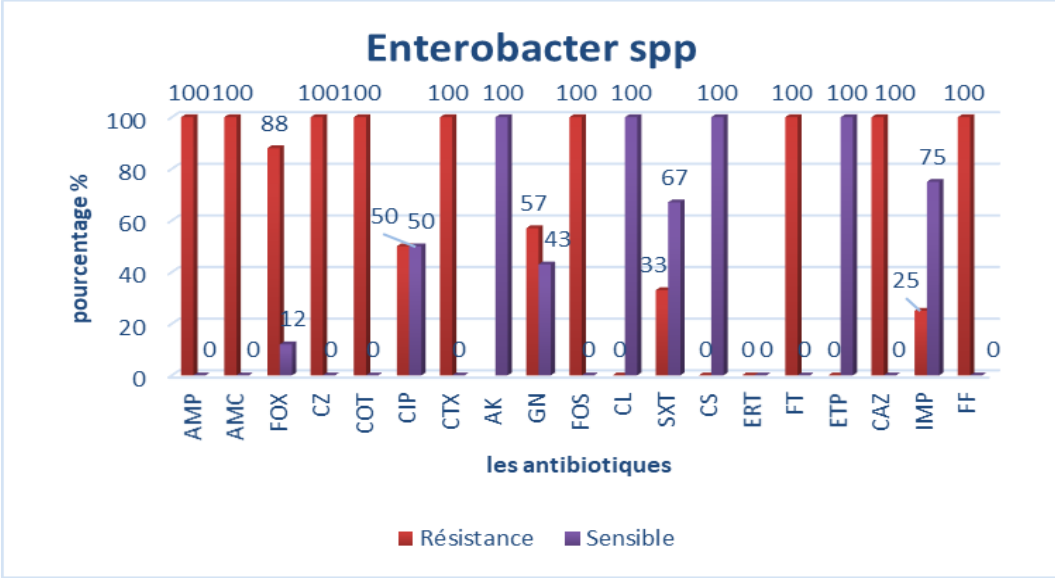


Figure N°40 : Profil de résistance et de sensibilité *d'Enterobacter spp* BLSE (+) (n =53)

Chez les Enterobacter spp BLSE, on observe une résistance a béta lactamines notamment aux céphalosporines de3ème générations tel que : AMP, AMC, CZ, CTX et COT. Avec un taux total de AK et CL.

1.2.5.2. Profil de résistance de Proteus spp BLSE (+)

Profil de résistance et de sensibilité de Proteus spp BLSE (+) présente une résistance complète dans les antibiotiques suivants :

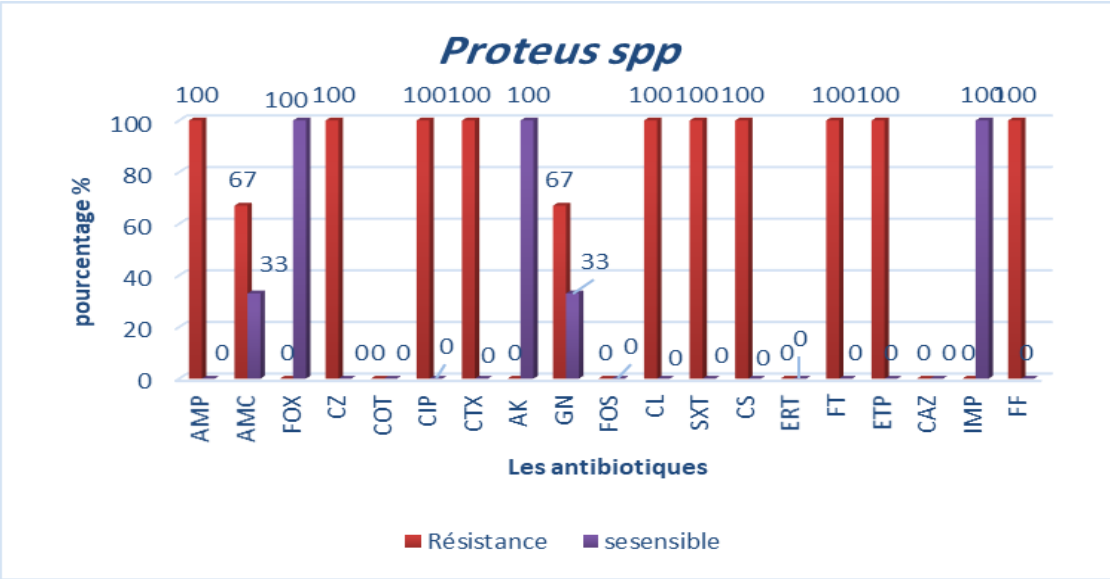


Figure N°41 : Profil de résistance et de sensibilité de *Proteus spp* BLSE (+) (n=53)

Profil de résistance et de sensibilité de Proteus spp BLSE (+) présente une résistance complète dans les antibiotiques suivants : AMP, CZ, CTX, CIP et SXT. Et les souches conservent une sensibilité totale à IMP, FOX et AK.

1.3. Etude prospective des souches E-BLSE

1.3.1. Etude phénotypique des E-BLSE

1.3.1.1. Répartition des souches selon le type de prélèvement

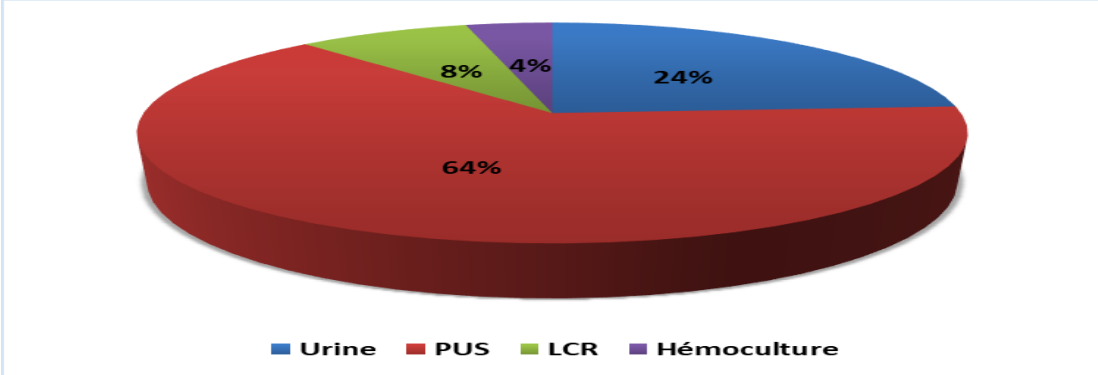


Figure N°42 : Répartition selon le type de prélèvement (n=25)

1.3.1.2. Répartition selon le sexe

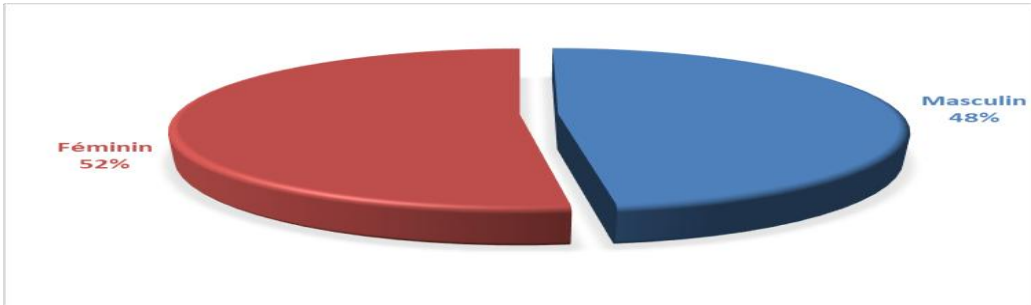


Figure N°43 : Répartition selon le sexe (n=25)

1.3.1.3. Répartition selon le type du service

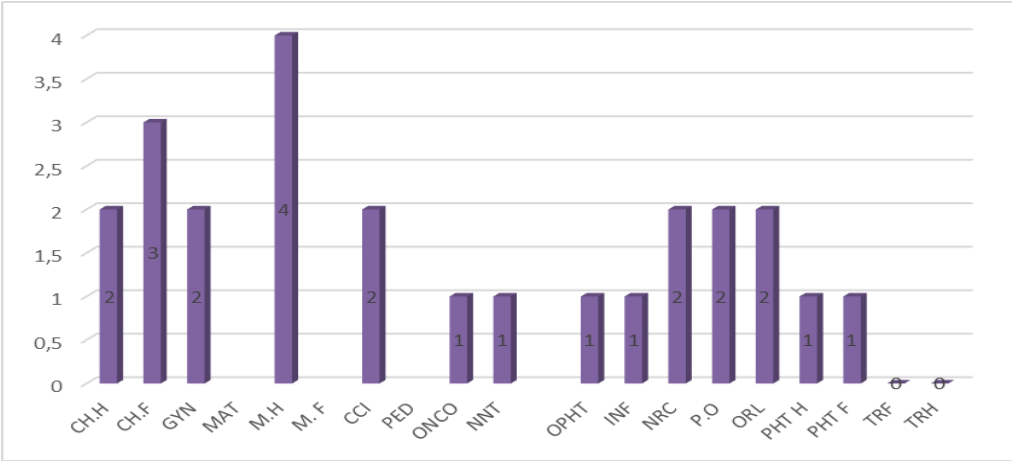


Figure N°44 : Répartition selon du service (n=25)

1.3.1.4. Répartition selon l'espèce

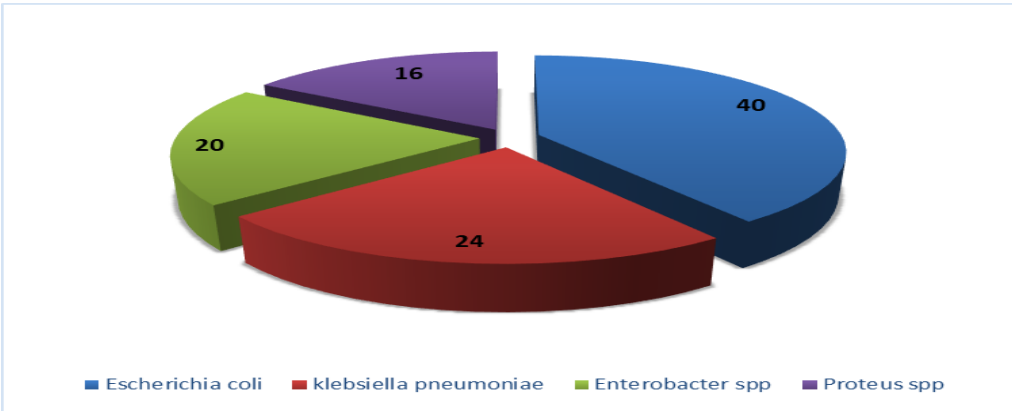


Figure N°45 : Répartition selon l'espèce (n=25)

1.3.1.5. Profil de résistance des souches BLSE

1.3.1.5.1. Profil de résistance d'Escherichia coli

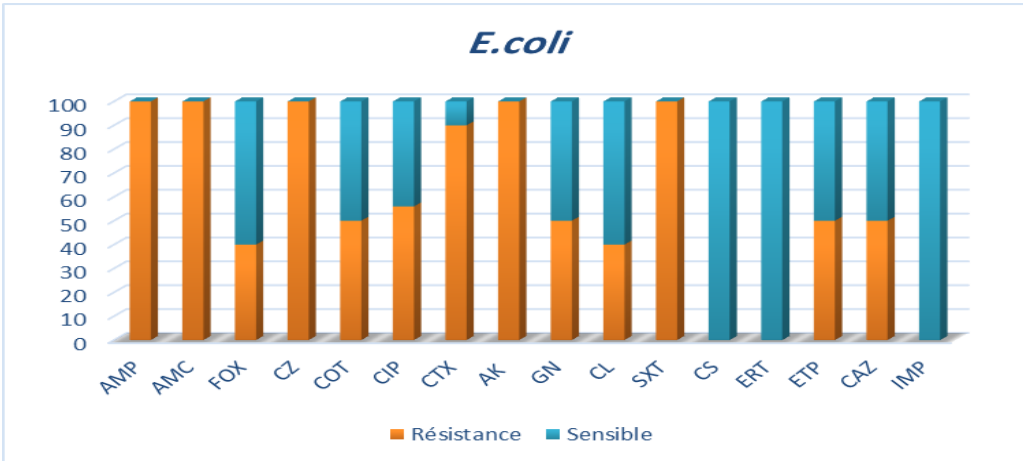


Figure N°46 : Profil de résistance de *E. coli* (n=25)

1.3.1.5.2. Profil de résistance de Klebsiella pneumonie

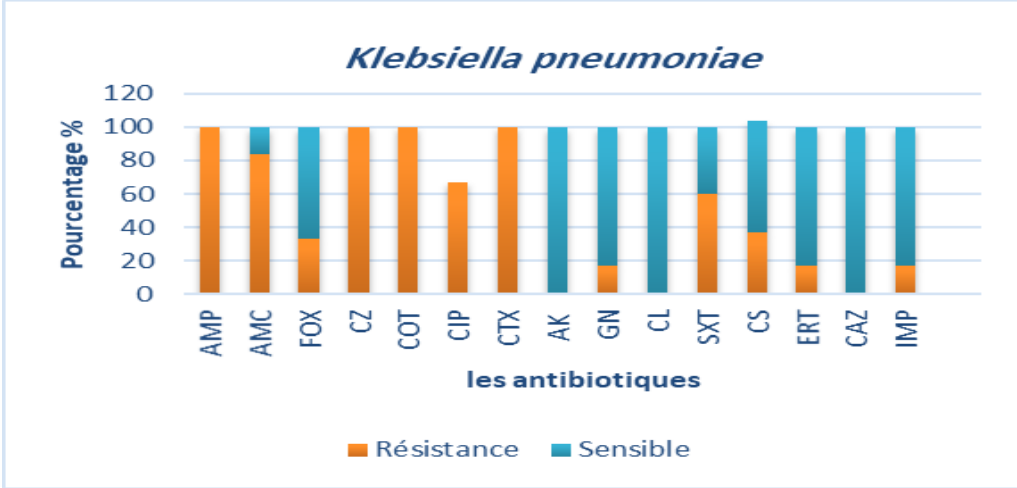


Figure N°47 : Profil de résistance de *K. pneumonie* (n=25)

1.3.1.5.3. Profil de résistance d'Enterobacter spp

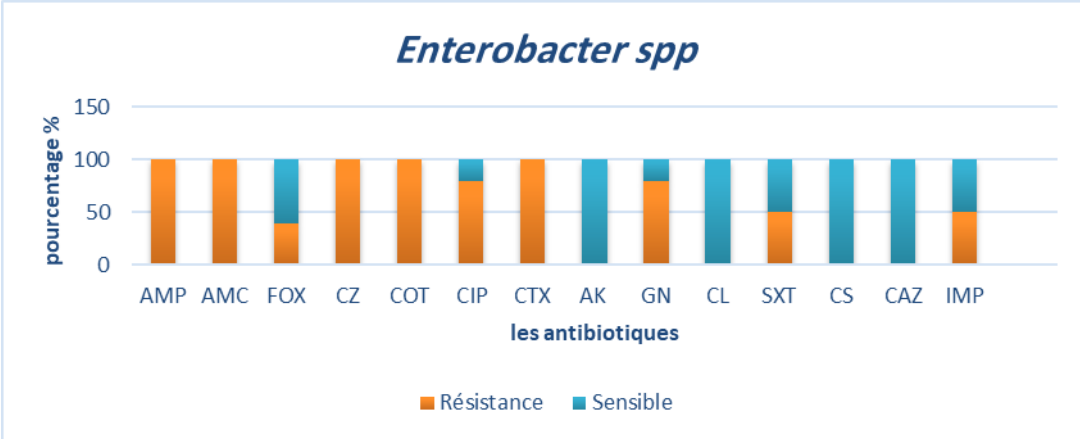


Figure N°48 : Profil de résistance *d'Enterobacter spp* (n=25)

1.3.1.5.4. Profil de résistance de Proteus spp

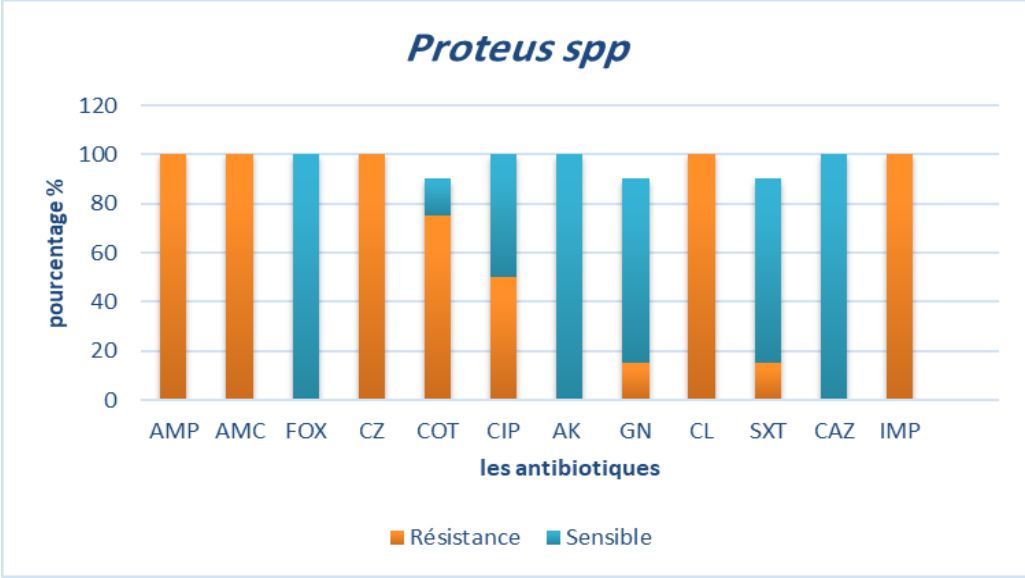


Figure N°49 : Profil de résistance de *Proteus spp* (n=25)

1.3.2. Etude Génotypique des E-BLSE

Sur un total de 53 souches d'entérobactéries productrice BLSE isolées, 25 souches ont été retenues pour les études de la PCR.

1.3.2.1. Répartition des isolats selon les gènes de résistance

La figure (48) montre les isolats étudiés de différentes souches des entérobactéries BLSE (+) (n= 25)

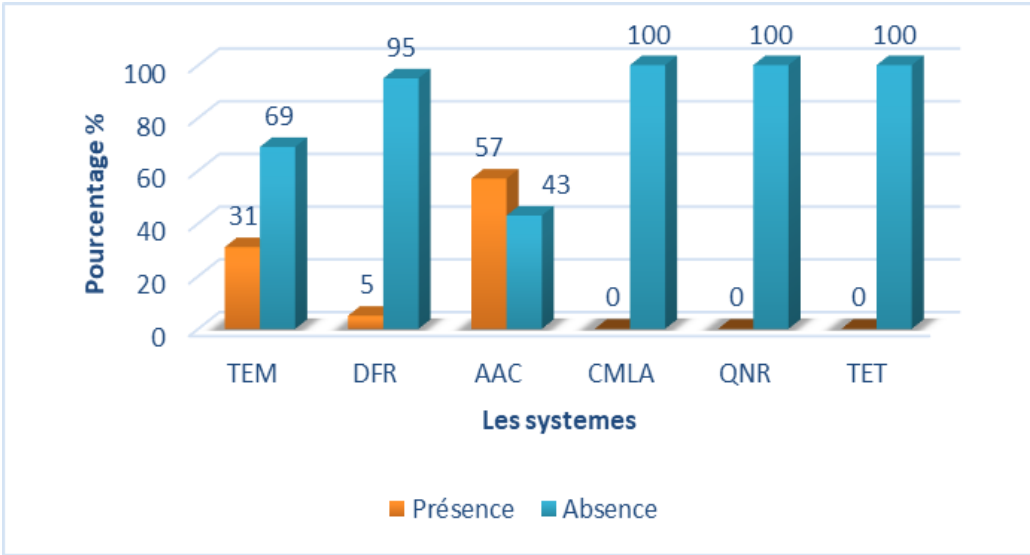


Figure N°50: Répartition des isolats selon les gènes de résistances

La figure montre que les systèmes de résistance AAC (57 %) et TEM (31 %) sont les plus présents, tandis que DFR est faiblement détecté (5 %) et les systèmes CMLA, QNR et

TET sont totalement absents (0 %). Cela indique une prédominance de la résistance aux aminoglycosides et aux bêtalactamines.

- **Gène TEM**

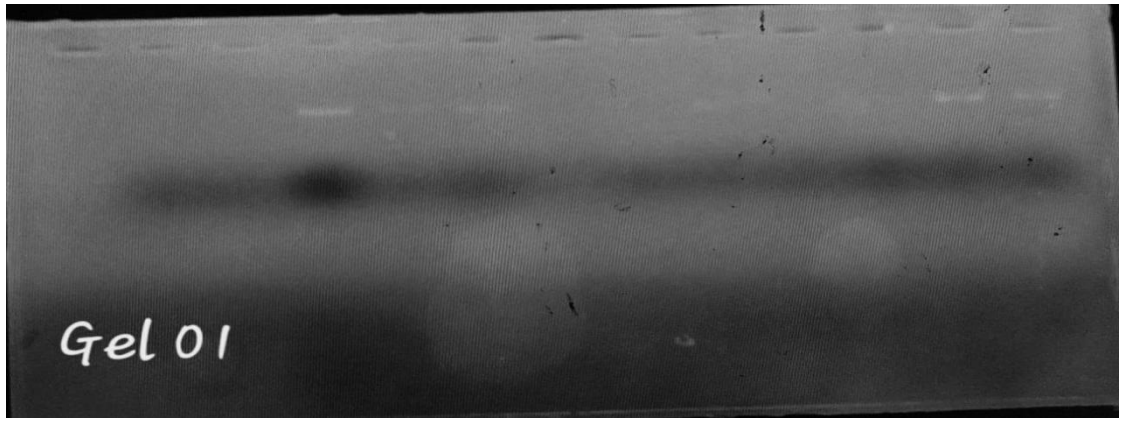


Figure N°51 : Résultat d'électrophorèse du gène TEM (photo originale, 2025)

- **Gène CMLA**

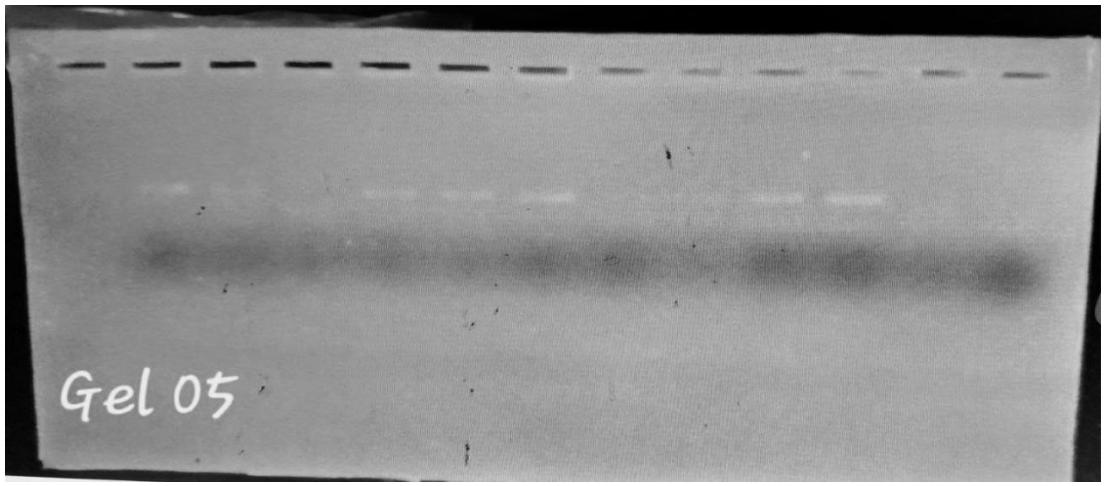


Figure N°52 : Résultat d'électrophorèse du gène CMLA (photo originale ,2025)

- **Gène QNR**

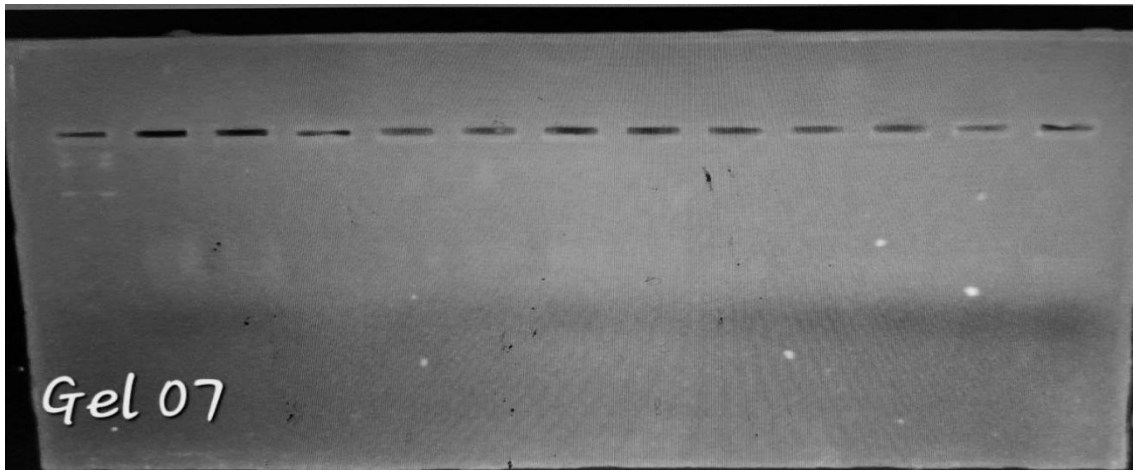


Figure N°53 : Résultat négatif d'électrophorèse du gène QNR (photo originale ,2025)

1.3.2.2. Répartition Spécifique des Clades E-BLSE

Tableau N° 07 : Répartition spécifique des clades E-BLSE

Type des clades	TEM	DFR	AAC	CMLA	QNR	TET	Nombre des souches
1	-	-	-	-	-	-	10
2	-	-	+	-	-	-	9
3	+	-	-	-	-	-	2
4	+	-	+	-	-	-	3
5	-	+	-	-	-	-	1

Le tableau montre la répartition de 25 souches E-BLSE en cinq clades selon leurs profils génétiques. Le clade 1 (10 souches) est totalement dépourvu de gènes de résistance. Le clade 2 (9 souches) présente uniquement le gène AAC. Le clade 3 (2 souches) exprime TEM, le clade 4 (3 souches) TEM et AAC, et le clade 5 (1 souche) DFR. Cette répartition met en évidence une grande diversité génétique entre les souches, avec une prédominance notable des souches dépourvues de gènes de résistance étudiés.

- Figure ci-dessous représente les différents clades des différentes souches des entérobactéries BLSE (+)

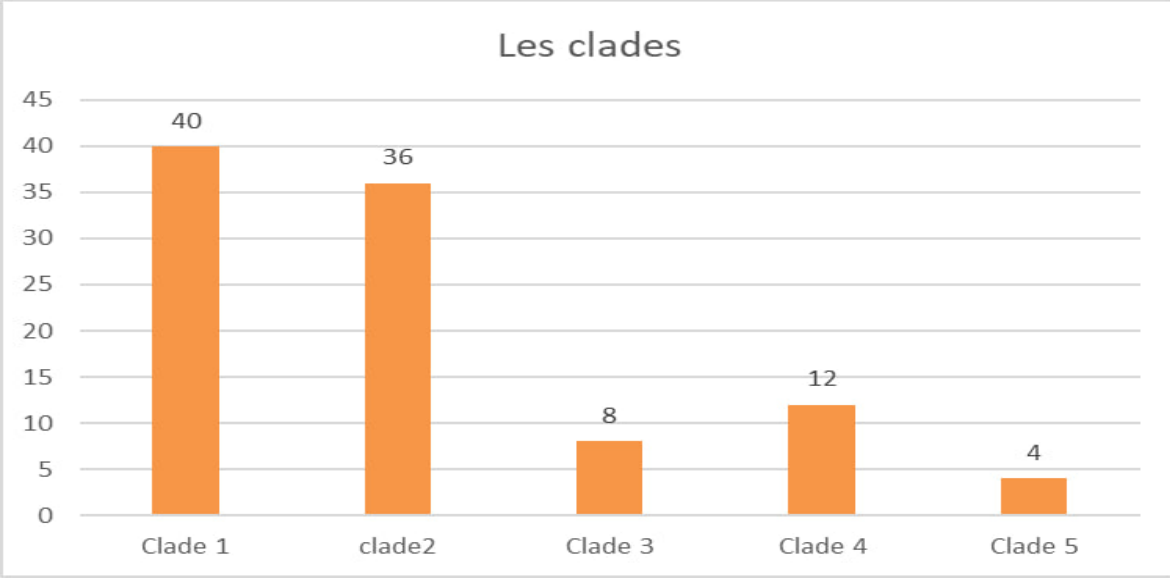


Figure N°54 : Les clades de différentes souches des entérobactéries BLSE (+)

La figure montre une répartition inégale des souches entre les clades. Les clades 1 et 2 sont les plus dominants avec respectivement (40 %)et (36%), tandis que les clades 3, 4 et 5 sont beaucoup moins représentés (8%, 12% et 4%). Cette distribution reflète une prédominance des profils génétiques associés aux deux premiers clades.

1.3.2.3. Répartition des souches selon le génotype et le phénotype

- ***E. coli***

Tableau N°08 : Répartition des isolats selon le génotype et le phénotype des souches par rapport aux différents antibiotiques.

Nombre de souches	TEM	AMP	AMC	CZ	CTX	FOX	CAZ	IMP	AAC	GN	AK	QNR	CIP	DFR	SXT	CMLA	CL	TET	TE
1	A	R	R	R	R	S	/	S	A	S	S	A	S	A	S	A	/	A	/
2	A	R	R	R	/	S	S	S	A	S	S	A	S	A	/	A	S	A	/
3	P	R	R	R	/	S	/	S	P	S	S	A	S	A	/	A	/	A	/
4	P	R	R	R	S	S	/	S	P	S	S	A	R	A	/	A	/	A	/
5	A	R	R	R	S	S	/	S	A	S	S	A	R	A	S	A	/	A	/
6	A	R	R	R	R	S	/	S	A	R	S	A	R	A	/	A	/	A	/
7	A	R	R	R	R	S	/	/	A	S	S	A	S	A	R	A	/	A	/
8	A	R	R	R	R	R	/	/	P	R	S	A	R	A	R	A	/	A	/
9	A	R	S	R	R	S	/	/	A	S	S	A	S	A	/	A	S	A	/
10	P	R	R	R	R	/	/	/	A	S	S	A	R	A	/	A	S	A	/

P : Présence **A : Absence**
R : Résistance **S : Sensible**

Le tableau montre une forte prévalence de résistance chez les souches *d'E. coli,* notamment aux bêtalactamines, avec plusieurs cas de multirésistance. Certaines souches portent des gènes de résistance **(**génotype **"P")** corrélés à une résistance phénotypique **("R").** La présence de souches probablement productrices de BLSE est suspectée.

- ***Klebsiella pneumoniae***

Tableau N°09 : Répartition des isolats selon le génotype et le phénotype des souches par rapport aux différents antibiotiques

Nombre de souches	TEM	AMP	AMC	CZ	CTX	FOX	CAZ	IMP	AAC	GN	AK	QNR	CIP	DFR	SXT	CMLA	CL	TET	TE
1	P	R	R	R	R	R	/	R	A	S	S	A	S	A	S	A	S	A	/
2	A	R	R	R	R	S	/	/	A	R	S	A	R	A	R	A	S	A	/
3	A	R	R	R	R	R	/	R	P	S	S	A	R	A	R	A	/	A	/
4	A	R	R	R	R	S	/	/	A	R	S	A	R	A	S	A	S	A	/
5	P	R	R	R	R	S	/	/	P	R	S	A	R	A	R	A	/	A	/
6	A	R	R	R	R	S	/	/	P	S	S	A	R	A	R	A	/	A	/

Ce tableau montre que la majorité des souches de *Klebsiella pneumoniae* présentent une multirésistance, notamment aux bêtalactamines (AMP, CAZ, CTX). Les gènes de résistance comme TEM et CTX-M sont détectés, surtout chez les souches 1 et 5. Une corrélation est observée entre la présence de ces gènes et le profil phénotypique résistant. La seule souche 6 présente une sensibilité plus marquée, suggérant l'absence de mécanismes majeurs de résistance.

- ***Enterobacter spp***

Tableau N°10 : Répartition des isolats selon le génotype et le phénotype des souches par rapport aux différents antibiotiques.

Nombre des souches	TEM	AMP	AMC	CZ	CTX	FOX	CAZ	IMP	AAC	GN	AK	QNR	CIP	DFR	SXT	CMLA		TET	TE
1	A	R	R	R	/	S	R	S	P	R	S	A	R	A	R	A	S	A	/
2	A	R	R	R	R	S	/	/	P	S	S	A	S	A	/	A	/	A	/

3	A	R	R	R	R	R	/	S	P	S	S	A	S	A	/	A	S	A	/
4	A	R	R	R	R	R	/	/	P	R	S	A	R	A	R	A	/	A	/
5	A	R	R	R	R	R	/	S	P	R	S	A	S	A	S	A	/	A	/

Le tableau montre que toutes les souches *d'Enterobacter spp* sont multi-résistantes, notamment aux β-lactamines (CTX, CAZ, TEM). L'imipénème reste globalement efficace, ce qui indique l'absence de carbapénèmes. La présence de profils "R" sur plusieurs familles suggère la production de BLSE.Cela complique la prise en charge thérapeutique et nécessite un bon choix d'antibiotiques. Une corrélation génotype/phénotype est essentielle pour confirmer les mécanismes de résistance.

- ***Proteus spp***

Tableau N°11 : Répartition des isolats selon le génotype et le phénotype des souches *Proteus spp* par rapport aux différents antibiotiques.

Nombre des souches	TEM	AMP	AMC	CZ	CTX	FOX	CAZ	IMP	AAC	GN	AK	QNR	CIP	DFR	CIP	CMLA	SXT	TET	TE
1	A	R	R	R	R	S	/	S	A	S	S	A	S	A	S	A	/	A	/
2	A	R	R	R	R	S	/	/	A	S	S	A	/	A	R	A	/	A	/
3	A	R	R	R	R	R	/	S	A	S	S	A	R	A	R	A	/	A	/
4	A	R	R	R	R	S	/	S	A	R	S	A	R	A	R	A	R	A	/

Le tableau montre que les souches de *Proteus spp* sont toutes résistantes aux β-lactamines (TEM, AMC, CAZ, CTX). Elles restent majoritairement sensibles aux fluoroquinolones (CIP) et aux aminosides (GM, AK). Certaines souches sont également résistantes au chloramphénicol (C) et à la triméthoprime (TMX). L'imipénème (IMP) n'a pas été testé, ce qui limite l'évaluation des carbapénèmes.

2. Discussion

Durant notre étude (prospective et rétrospective), 550 souches d'entérobactéries ont été isolées dont 53 souches d'E-BLSE (10%).

Selon les résultats de notre étude, La distribution des espèces isolées selon les sites de prélèvement montre que l'infection du site opératoire est la pathologie la plus fréquente en pratique quotidienne (59%), Cela pourrait s'expliquer par le fait que la plupart des prélèvements reçus sont issus des patients post opérés présentant des tares(patients fragilisés) ce qui favorise le sepsis de paroi, principalement le site opératoire (abdominal) qui permet le passage des entérobactéries vers les plaies.

Nos résultats concordent avec ceux rapportés par **Nait Amara (2012**), où les prélèvements de pus représentaient un pourcentage de 42 %.

Nos résultats montrent également la présence des entérobactéries isolées dans les urines avec un taux (37%). Ces résultats sont proches avec les travaux de **Bouzeraa et Berrhil, 2018** qui ont trouvés une prédominance des entérobactéries dans les prélèvements urinaires (30,1 %).

Une prédominance féminine a été observée dans les infections à entérobactéries, avec un taux de 59 % chez les femmes contre 41 % chez les hommes, soit un sex-ratio de 0,69. Cette tendance est également retrouvée dans les cas d'entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (E-BLSE). Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette prévalence féminine, notamment des caractéristiques anatomiques (urètre court, proximité de l'anus), hormonales (grossesse, ménopause), ainsi que des facteurs liés à l'hygiène. À l'inverse, chez l'homme, la longueur de l'urètre et son éloignement de l'anus réduisent le risque de contamination bactérienne. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés en Algérie par **Balahouane (2013)** et par **Ould Baba Ali** et **Taibi** (2019), qui ont observé une prédominance féminine dans les isolements d'entérobactéries avec des taux respectifs de 54 % et 85 %. Des données similaires ont également été rapportées au Sénégal **par Lo et *al.* (2014)** et au Maroc par **Benhiba et *al.* (2015).**

Dans notre étude, nous avons constaté un taux élevé d'infections nosocomiales dans deux services en particulier, où les entérobactéries ont été majoritairement isolées. Il s'agit du service de chirurgie hommes et du service de gynécologie, chacun enregistrant un taux d'infection de 10 %. Cette situation pourrait s'expliquer, d'une part, par le fait que les patients du service de chirurgie hommes sont souvent exposés à des risques traumatiques plus importants (accidents de travail, blessures sportives, etc.) et peuvent nécessiter des interventions spécifiques, notamment en chirurgie urologique. D'autre part, la fréquence élevée d'infections dans le service de gynécologie pourrait être liée au fait que notre Établissement Public Hospitalier (EPH) est le seul de la wilaya de Médéa à assurer les accouchements, ce qui entraîne un afflux important de patientes.

Les résultats de notre étude, selon les espèces bactériennes isolées, révèlent qu'*Escherichia coli* demeure le germe le plus fréquemment retrouvé, avec une fréquence

de 43 %, suivi de *Klebsiella pneumoniae* avec 24 %. Cette prédominance *d'Escherichia coli* a également été rapportée dans plusieurs études. En Algérie, **Chouh et *al.* (2019**) ont observé une fréquence de 65,1 % pour *Escherichia coli*, suivie de *Klebsiella pneumoniae* à 20,7 %. **En Tunisie, Péan et *al.* (2001)** ont également identifié *Escherichia coli* comme l'espèce dominante avec un taux plus élevé de 81,7 %, contre seulement 3,7 % pour *Klebsiella pneumoniae*. **Au Maroc, Lahlou et *al.* (2009)** ont rapporté une prédominance de *Escherichia coli* dans 80 % des cas, suivie de *Klebsiella pneumoniae* à 10 %. De même, une étude menée en Côte d'Ivoire sur l'épidémiologie moléculaire des entérobactéries par **Gado (2019)** a montré une fréquence de 46,4 % pour *Escherichia coli* et de 37,2 % pour *Klebsiella pneumoniae*

Cela pourrait être expliqué le fait que l'espèce *E. coli* elle fait partie de la flore intestinale normale de l'être humain, et se transmet facilement par la voie fécale et possède une grande capacité d'adaptation et de résistance aux antibiotiques, ce qui favorise sa survie dans les milieux hospitaliers.

Les bactéries productrices de BLSE constituent une préoccupation majeure en milieu hospitalier en raison de leur diffusion épidémique et de leur multirésistance aux antibiotiques.

Selon notre étude, l'incidence des E-BLSE est de 35%. Ce taux reste proche de celui rapporté à Tlemcen (39.2%) **(Baba Ahmed-KaziTani et *al.*, 2013)**, et 31.4% à Annaba **(Nedjai et *al.*, 2012**). Ceci pourrait être expliqué par le niveau d'hygiène et la manière dont les règles des hygiènes y sont appliquées dans chaque établissement, ainsi que par le nombre de patients présents dans l'hôpital et les types des services existants.

La répartition des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (E-BLSE) selon le type de prélèvement montre que 51 % des souches ont été isolées à partir de prélèvements de pus, tandis que 38 % proviennent d'infections urinaires. Ces proportions sont comparables à celles rapportées à Constantine par **Agabou et *al.* (2014)**, qui avaient observé des taux respectifs de 49 % et 39 %.

D'après les résultats de notre étude, le profil de résistance a montré une résistance a plusieurs molécules de bêta lactamines testées à l'exception de la céfoxitine (FOX) et pénèmes. Ce résultat est caractéristique des BLSE. les mêmes données été rapporté par **(Ramdani-Bouguessa et *al.*, 2011).**

La résistance des souches BLSE à la Gentamicine est de 57%, tandis que la résistance nulle à l'Amikacine, Celle-ci reste l'aminoside la plus efficace, comme cela a été rapporté dans plusieurs études **(Wu et *al.*, 2007).**

Le taux de résistance à la ciprofloxacine rapporté dans notre étude est de 64%. Ce taux n'est pas proche de ceux rapportés en Suisse qui indique un taux de 93% **(Foulal et Zouhdi, 2013).**

Le taux de résistance à l'Imipenème observé dans notre étude est presque proche de ceux rapportés en Iran : 0%, au Benin 3,40% **(Foulal et Zouhdi, 2013 ; Gholipour et *al.*, 2014)**. En revanche, en Suisse, le taux de résistance rapporté avec 80% d'entérobactéries BLSE résistantes à l'Imipenème **(Cherkaoui et *al.*, 2014).**

En ce qui concerne les résultats de la PCR visant à détecter les gènes de résistance aux antibiotiques, l'étude met en évidence la présence des gènes de résistance TEM dans 38 % des cas, AAC dans 57 % et DFR dans 5 %. En revanche, les gènes CMLA, QNR et TET n'ont été détectés dans aucune des souches analysées.

Les résultats de la PCR montrent que le gène de résistance TEM est largement répandu chez les espèces *E. coli* et *K. pneumoniae* avec un taux de 37%., Ces résultats sont cohérents avec d'autres études menées en Egypte **(Elafify et *al.* 2022)** et en Jordanie avec un taux de 33,33% de souches porteuses du gène TEM. **(Tarazi et *al.* 2021)**

Dans notre résultat et avec la comparaison le phénotype et le génotype on observe que la PCR confirme celle du l'antibiogramme tandis que quelques discordances étaient observées dans le cas la présence des gènes avec une bactérie phénotypiquement sensible, Cela était expliqué par : contamination lors du la manipulation ou présences d'un gène non codon ou mutation .

Dans le cas ou la PCR est négative et l'antibiogramme on observe que la molécule est résistance pourrait être expliqué les disques d'antibiotiques déchargés ou primées (de l'intérêt des contrôles de la qualité régulièrement) soit la non spécificités des amorces. Et pour quelque antibiotique tel que la colistine pour les bacilles gram négatif. L'antibiogramme n'est pas la méthode standardisée. Pour les études de sensibilité on utilise la méthode de CMI en microdilution qui n'est pas disponible au niveau de notre EPH.

C'est pour cela la biologie moléculaire et l'étude de sensibilité pour les antibiotiques par les méthodes phénotypiques (antibiogramme) font une complémentarité diagnostic.

Conclusion

Notre étude au niveau de l'hôpital de Médéa Mohamed Boudiaf a permis de mettre en évidence le taux d'infections à entérobactéries isolées ainsi que leurs profils de résistances aux antibiotiques

La propagation rapide de ce phénomène illustre l'urgence de renforcer les mesures de surveillance et de prévention.

Les résultats de cette étude montrent que les souches les plus fréquemment isolées sont *Escherichia coli et Klebsiella pneumoniae*, qui ont présenté une multirésistance aux différentes classes d'antibiotiques, en particulier aux bêtalactamines

La propagation de ces souches multi-résistantes, d'entérobactéries productrices de βlactamases à spectre élargi (BLSE) dans nos hôpitaux constitue un enjeu de santé publique, réduisant de manière importante les alternatives thérapeutiques pour le traitement des infections sévères.

A l'issu de cette étude et vu l'émergence de la résistance des bactéries aux antibiotiques, il convient de formuler les perspectives suivantes :

- Respecter les règles d'hygiène individuelle et collective et faire comprendre les risques liés à l'utilisation abusive des antibiotiques.
- Etudier le potentiel de virulence des souches bactériennes dans le but de mieux appréhender le problème de la multirésistance bactérienne.
- Sensibiliser la population à éviter l'automédication qui constitue un risque des échecs thérapeutiques et facilitent l'émergence des résistances bactériennes.
- Les laboratoires cliniques doivent se munir des stratégies convenables pour la détection rapide des BLSE et des micro-organismes producteurs de BLSE.

A

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2014). Biologie moléculaire de la cellule (6e éd., pp. 126–128). De Boeck Supérieur.

Agabou A, Pantel A, Ouchenane Z, Lezzar N, Khemissi S, Satta D, Lavigne J.P. 2014. First description of OXA-48-producing Escherichia coli and the pandemic clone ST131 from patients hospitalized at a military hospital in Algeria. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 33(9): 1641–1646. Akortha E.E, Filgona J. 2009.

Ambler. R P. (1980). The structure of B-lactamase. Philo. Trans R soc Lond : 289 ,321-331

Amrani, A., 2021. Incidence et profil des infections urinaires nosocomiales au service d'urologie du CHU Hassan l'Fès. Université Sidi Mohamed Ben.

Aoun, F.Z., Hadri, N., 2017. Etude de la résistance aux antibiotiques de quelques souches bactériennes isolées dans le service de Chirurgie de l'hôpital de Ouargla. 91.0.

Aura RUSU, Ioana-Andreea Lungu, (2020). The new fifth-generation cephalosporins –a balance between safety and efficacy. https://scispace.com/papers/the-new-fifth-generation-cephalosporins-a-balance-between-58fqvn2i5z.

Ahrberg, C. D., Manz, A., & Chung, B. G. (2016). Polymerase chain reaction in microfluidic devices. Lab on a Chip, 16(20), 3866–3884 Artcle. https://doi.org/10.1039/C6LC00532E

Atif, M.-L., Bekhoucha, S., Mahcene, S., & Lounnas-Mokrani, Z. (2006). Résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées dans un hôpital algérien. Médecine et Maladies Infectieuses, 36(7), 423–428. https://doi.org/10.1016/j.medmal.2006.04.003

Avril, J.-L., Dabernat, H., Denis, F., & Monteil, H. (1992). Bactériologie clinique (2e éd.). Paris : Éditions Ellipses-Marketing. ISBN 2-7298-9218-4. P:149

B

Bereket, W., Hemalatha, K., Getenet, B., Wondwossen, T., Solomon, A., Zeynudin, A., Kannan, S., 2012. Update-t-on bacterial nosocomial infections 1039–1044.bdellah.

Bakhoum, I. (2004). Contrôle de qualité et validation de différent micro méthodes d'identification bactérienne. Thèse : pharmacie. Université Cheikh Anta Diop de Dakar. Faculté de médecine, de pharmacie et d'odonto – stomatologie. P119.

Bouazza S, Bouakka N. (2016). Recherche des entérobactéries productrices de β-lactamases à spectre élargi dans la viande rouge. Mémoire de Master : Microbiologie appliquée à la sante et à l'environnement. Université larbi tebessi, Tébessa : 57 P

Bidet, P et Bingen, E (2016) Enterobacteriaceae (à l'exception du genre Yersinia) dans : Denis, F ; Cattoir, V ; Martin, C ; Ploy, M. C et Poyart, C. Bactériologie médicale : techniques usuelles. Elsevier Masson. France. P 331- 336.)

Baba Ahmed-Kazi Tani Z. et Arlet G. (2014). Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie. J. Path. Bio. 62: 169–178.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (2012). Editors: Whitman W, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo, M, Ludwig, W, Suzuki KI, Parte A. (Eds.). 2083 P.

Bradford, P.A. 1999. Automated thermal cycling is superior to traditional methods for nucleotide sequencing of blaSHV genes. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 2960 29631 Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob Agents Chemother 2004 ; 48 : 1-4

Boujemaa, D. 2015. Etude multicentrique de la résistance aux antibiotiques chez Enterobacter cloacae. Thèse de doctorat. Tlemcen : Université Abou Bekr Belkaïd– Tlemcen. 133p

Biomérieux. (2024). Notice technique API 20E – Système d'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux (Réf. 20 100 / 20 160). https://microbiologiemedicale.fr/wp-content/uploads/2019/02/Fiche-technique-API-20E.pdf

Bush K., Jacoby G.A. et Medeiros A.A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents chemother. 39, 1211-12333.

Bhanothu, Venkanna, and Vijayalakshmi Venkatesan. 2019. "Conventional Polymerase Chain Reaction and Amplification Refractory Mutation System Multi-Gene/ Multi-Primer PCR in the Diagnosis of Female Genital Tuberculosis." Archives of Microbiology 201(3):267–81. doi: 10.1007/s00203-019-01631-1

Barika, N. E. H., & Boussaidi, D. (2019). Étude de la résistance aux antibiotiques des bactéries isolées à partir des plaies chirurgicales infectées. Revue des Sciences Biologiques, 30(2), 112–120

Bilel, A., Mazouzi, K., Benkousas, A., 2020. Contribution à l'étude des infections nosocomiales dans l'environnement hospitalier. 81.

Barabbas, D.R., Kara, S., 2018. Etude rétrospective sur les infections nosocomiales au niveau du service de néonatologie du CHU de Constantine. 92.

Benali, A., 2014. Méningite bactérienne nosocomiale : Etude épidémiologique, diagnostique et thérapeutique 196

Berche P., Gallard J. L, Simonnet M. (1991). Les infections nosocomiales d'origine bactérienne et leur prévention. Bactériologie des infections humaines de la biologie à la clinique. Paris : Flammarion. Pp 64-71.

C

Chouh, F. Chater A. Siad R. 2018 Profil de résistance aux antibiotiques des bacilles Gram négatif isolés à partir des urines au laboratoire de microbiologie au CHU Nedir Mohammed de Tizi-Ouzou durant l'année

Chanoine N. 2012. Les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi : où sont les dangers ? Réanimation 21(3), 260–267.

Cavallo, J.D., Fabre, R., Jehl, F., Rapp, C., and Garrabé, E. (2004) Bêtalactamines. EMC-Mal Infect 1 : 129–202

Charlier P., Coyette J., Dehareng D., Dive G., Duez C., Dusart J., Fonzé E., Fraipont C., Frère J. M., Galleni M., Goffin C., Josette B. et Martine L. B. N. (1998). Résistance bactérienne aux β-lactamines. Médecine/sciences. 14 : 544-555

Chavane de Dalmassy– Prioux E. (2011). Infections invasives à bactéries productrices de béta-lactamases à spectre étendu chez l'enfant. Etude rétrospective dans un Centre Hospitalier Universitaire parisien. Thèse de Doctorat en médecine. Université PARIS DESCARTES(Paris5), Faculté de médecine, 92p

Chahrazed Benzaid, Lazhari Tichat, Mahmoud Rouabhia, Sonia Akil Dahdouh. (2022). Prévalence des infections nosocomiales d'origine microbienne au service de réanimation du Centre hospitalo-universitaire d'Annaba-Algérie. Taleb A, (2019). Incidence et facteurs de risques des infections nosocomiales en réanimation

Clinisciences. (https://www.clinisciences.com/) Clinisciences, "Fast PCR mix", descriptif produit, Clinisciences, consulté le 15 juillet 2025 – « dNTPs are building blocks of new DNA strands. These four nucleotides are typically added to the PCR reaction in equimolar amounts for optimal base … »

Chiu, S., Huang, L., Chen, H., Tsai, Y., & Liou, C. (2017). crossm Roles of ramR and Tet (A) Mutations in Conferring Tigecycline Resistance in. 61(8), 1–10.

Carlroth. (https://www.carlroth.com/fr/fr/) Carl Roth, « PCR water, 125 ml », fiche produit PCR water, Ultrapure water (Type I), sterile, nuclease-free, free of DNA and RNA, consulté le 15 juillet 2025.

Custovic, A., Smajlovic, J., Hadzic, S., Ahmetagic, S., Tihic, N., Hadzagic, H., 2014.

D

Dali Ali, A., Beldjilali, H., Aggag, F., Zina, M., Ouhadj, S., Dali Yahia, R., Meddeber,Decoster. A, L. Dehecq. E, Gontier. P, Duhamel. M. (2005). Cours de

microbiologie à la faculté libre de médecine de Lille ,website: http://anne. decoster. free. fr/d1viro/indexvir. Html.

Di Benedetto, C., Bruno, A., & Bernasconi, E. (2013, 9 octobre). Infection du site chirurgical : facteurs de risque, prévention, diagnostic et traitement. Revue Médicale Suisse, 9, 1832–1839 Articles thématiques .

Diallo Alpha A. 2013. Escherichia coli pathogènes et résistantes aux antibiotiques dans les effluents d'origine humaine et animale : Prévalence et caractérisation avant et après traitement épuratoire. (En ligne), thèse de doctorat : microbiologie. Université de Toulouse, 191p.

Dicko, H., Al, Et., 2022. Prévalence des infections associées aux soins en réanimation au Mali. Rev. Malienne Infect. Microbial. 17, 77–83. https://doi.org/10.53597/remim.v17i1.2231.

Denis, F. 2007. Bactériologie médicale : Techniques usuelles. Edition Masson. Pp : 531 – 573

DCEM1,1 année 2002-2003.Université Paris-VI. Bactériologie –Paris : Faculté de médecine Pierre et Marie Curie, Service de Bactériologie; 2003. Mise à jour : 24 mars 2003.

Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. 2008. Phenotypic detection of extended spectrum β-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. Clinical Microbiology and Infection. 14(1) :90–103.

Du, X., He, F., Shi, Q., Zhao, F., Xu, J., Fu, Y., & Yu, Y. (2018). The rapid emergence of tigecycline resistance in blaKPC-2 harboring Klebsiella pneumoniae, as mediated in vivo by mutation in tetA during tigecycline treatment. Frontiers in Microbiology, 9(APR), 1–7. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00648

Derveaux, S., Vandesompele, J., & Hellemans, J. (2010). How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. Methods, 50(4), 227–230. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.11.001

Dna, G., & Mycelium, F. (2021). Genomic DNA extraction from Fungal Mycelium using the modified Cenis, 1992 method. 51–56. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824449-4.00009-8

E

Elafify, Mahmoud, Basma Badawy, Mohamed Ahmed, Radwa Shata, Marwa Toukhy, and Mayada Gwida. 2022. "Genetic Characterization of Pathogenic Escherichia Coli Isolated from Smallholding Dairy Buffaloes, Their Products, and Some Environmental Sources." Alexandria Journal of Veterinary Sciences 74(1):31. doi: 10.5455/ajvs.7695.

Custovic, A., Smajlovic, J., Hadzic, S., Ahmetagic, S., Tihic, N., Hadzagic, H., 2014.

Epidemiological surveillance of bacterial nosocomial infections in the surgical intensive care unit. Mater. Socio Médical 26, 7. https://doi.org/10.5455/msm.2014.26.7-11.

F

Fauchere J-L, Avril J-L. « Bactériologie générale et médicale ». Edition Ellipses. Paris. 2002. 543p.

Farsi, I., Merad, Z., 2021. Etude de la résistance aux antibiotiques des bactéries nosocomiales à l'hôpital Mohamed Boudiaf à Ouargla. 93.

Fisher, J.F., Meroueh, S.O., and Mobashery, S., 2005. Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. Chem Rev, 105, 395-424

Foulal L. 2013. Profil Épidémiologique Des Entérobactéries Sécrétrices De Bêta Lactamases À Spectre Élargi Diagnostiquées Au Sein Du Laboratoire De Microbiologie Du Chu De Rabat. Thèse de doctorat : Pharmacie. Rabat Université Mohammed V-Souissi. 110p

G

GADOU V. (2019). Epidémiologie moléculaire des Entérobactéries productrices de β-lactamases à spectre élargi résistantes aux aminosides et aux fluoroquinolones dans les districts d'Abidjan, CÔTE D'IVOIRE. Thèse de doctorat. Université Félix HOUPHOUET BOIGN

Guetarni N1, Zouagui S2, Besbes F1, Derkaoui A1, Hanba M3, Ahmed Fouatih Z.2016 Infections Nosocomiales (IN) : Enquête de prévalence et d'identification des facteurs de risque dans un centre hospitalier universitaire de la région ouest d'Algérie, 2016 Disponible En ligne sur www. atrss.dz et sur www. mdn.dz / RM de l'HMRUO, Volume 4, N 2, page 584-590.

Gangoue-pieboji J.2007.caractérisation des bêta-lactamase et leur inhibition par les extraits des plantes médicinales [En ligne]. Thèse de doctorat : biochimies. France : Université de liège104p.

Gholipour A, Soleimani N, Shokri D, Mobasherizadeh S, Kardi M, Baradaran A. 2014. Phenotypic and Molecular Characterization of Extended-Spectrum β-Lactamase Produced by Escherichia coli, and Klebsiella pneumoniae Isolates in an Educational Hospital. Jundishapur Journal of Microbiology 7(10): 11-758.

H

Hamadi N., Gada S. Les infections nosocomiales dans le service des urgences chirurgicales [mémoire de fin d'étude]. Tizi Ouzou : Université de médecine Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou ; 2012 : 6 - 7.

Haley, R. W., Quade, D., Freeman, H. E., & Bennett, J. V. (1980). The SENIC Project. Summary of study design. American Journal of Epidemiology, 111(5), 472–485

Hospital in Ireland from2006 -2012. Thèse de magister : Sciences biomédicales. Islande : université d'Islande, 44 p

Hillen, W., & Berens, C. (1994). EXPRESSION OF TNIO Wolfgang Hillen and Christian Berens. Annual Reviews of Microbiology, 48, 345–369.

J

Jacob G. (2011). Implication des gènes de régulation de la céphalosporinases chromosomique d'Enterobacter cloacae dans le phénotype hyper-producteur d céphalosporinases. Thèse de Doctorat en médecine (diplôme d'étude spécialisé en biologie médicale), université PARIS-DESCARTES (Paris 5),

Jacoby G.A, Munoz-Price L.S. 2005. The New β-Lactamases. New England Journal of Medicine 352(4): 380–391.

Jacoby G. A. et Munoz-Price L.S. (2005). Mechanisms of disease: The New beta Lactamases. 91, 352-380.

Jarlier, V., Nicolas, M.H., Fournier, G., and Philippon, A. (1988) Extended-broad spectrum βlactamases transferable resistance to newer β-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis 10: 867–78.

Jean Ralph Zahar, 2007. Lutte contre les infections nosocomiales en France Où en sommes-nous en 2007, Medecine sciences : M/S 23(6-7) :644-5

L

Lahlou Amine I, Chegri M, L'Kassmi H. 2009. Épidémiologie et résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées d'infections urinaire à l'hôpital militaire Moulay-Ismail de Meknès. Antibiotiques, 11 : 90–96.

Latreche, A.S., 2012. Contribution à l'étude des infections nosocomiales (service de chirurgie a) CHU Tlemcen. Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen.

Lo S, Ka R, Ba Diallo A, Diallo OF, Diagne R, Día ML, Sarr AM, Sow A .2014. Sensibilité aux antibiotiques des Entérobactéries isolées d'urines au Centre Hospitalier Régional de Saint Louis (Sénégal) de juin 2011 à juillet 2012. Revue CAMES SANTE 2(2): 25-28.

Lombardo, M. N., G-Dayanandan, N., Wright, D. L., & Anderson, A. C. (2016). Crystal Structures of Trimethoprim-Resistant DfrA1 Rationalize Potent Inhibition by Propargyl-Linked Antifolates. ACS Infections Diseases, 2(2), 149–156. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00129

K

Kakupa, D.K., Muenze, P.K., Byl, B., Dramaix, M., 2016. Etude de la prévalence des infections nosocomiales et des facteurs associes dans les deux hôpitaux universitaires de Lubumbashi, République Démocratique du Congo : cas des cliniques universitaires de Lubumbashi et l'Hôpital Janson Sendwe. Pan Afr. Med. J. 24. https://doi.org/10.11604/pamj.2016.24.275.7626.

Kassama M, Hamadi S 2013, medical CHU Tizi-Ouzou. Thèse de doctorant en science médical. Université d'Alger 1 Ben Youcef Benkhedda. Département de médicine. 321p1

Kebir D., Malloum M., Bouakiz L. Impact des infections nosocomiales sur le système de santé en Tunisie. Edition 2015 : 94 - 8.1ère journée maghrébine d'hygiène hospitalière, service d'hygiène hospitalière Sahloul (Sousse, Tunisie), en collaboration avec l'OMS, 29 Nov. 2008 : 41- 43.

Kelaiaia, H., Zoufoul, A., 2014. Isolement des bactéries responsables de l'infection nosocomiale à partir un milieu hospitalier. 77

M

Meziane, M. (2020). Analyse moléculaire et étude de la résistance aux antibiotiques des souches d'Escherichia coli productrices de β-lactamases à spectre étendu (BLSE) isolées au CHU de Constantine [Mémoire de Master, Université Frères Mentouri Constantine 1]. 153 p.

Madi, S., & Djema, K. (2019). Isolement et Caractérisation des Bactéries Multirésistantes Impliquées Dans les Infections Nosocomiales et L'environnement Hospitalier au Niveau de L'hôpital de Lakhdaria. Bouira, Algeria : Université Akli Mohand Oulhadj Bouira.

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

Muylaert, A., & Mainil, J. (2012). Résistances aux fluoroquinolones : la situation actuelle. Ann.Méd. Vét, 157, 15–26

Monteil, H (2007) Bacilles à Gram négatif non fermentantaires. EMC - Biologie médicale, France. 2(1), P 01

Murray P.R, et al Microbiologie médicale, ELESEVIER 10e édition ,2021)

Midoun k , N., 2017. Facteurs de risque et mortalité associés aux infections nosocomiales en unité de soins intensifs : étude cas-témoins. J. Fac. Médecine Oran. https://doi.org/10.51782/jfmo.v4i2.108.

MEBARKI F., « La PCR et les règles générales de son optimisation », *Gazette du laboratoire*, n° 24, janvier 1998. Gazettelabo. (https://www.gazettelabo.fr/)

N

Nait Amara Lydia. Caractérisation d'entérobactéries isolées des prélèvements pathologiques en médecine de ville. Université de Béjaïa, 2011/2012.

Nabti, L. Z. (2020). Sensibilité aux antibiotiques et aux huiles essentielles d'origanum glandulosumDesf : des souches d'Escherichia coli isolées d'infection urinaire au CHU de Sétif (Doctoral dissertation).

Naseer U, Sundsfjord A. 2011. The CTX-M Conundrum: Dissemination of Plasmids and Escherichia coli Clones. Microbial Drug Resistance 17(1): 83–97.

Nauciel. C. Bactériologie médicale. Edition : Masson (Paris), 2000.p46-47

Nedjai S, Barguigua A, Djahmi N, Jamali L, Zerouali K, Dekhil M. 2012. Prevalence and characterization of extended spectrum β-lactamases in Klebsiella-Enterobacter-Serratia group bacteria, in Algeria. Médecine et Maladies Infectieuses 42(1): 20–9.

Nordmann P, Dortet L, Poirel L. 2012. Rapid detection of extended-spectrum-β-lactamase producing Enterobacteriaceae. Journal of Clinical Microbiology. 50: 3016–3022.

Nosocomial infections in an Iranien educational hospital: an evaluation study of the Iranian nosocomial infection surveillance system. BMC Infect. Dis. 21, 1256. https://doi.org/10.1186/s12879-021-06948-1.

P

PILLY E. (2013). Maladies infectieuses tropicales, 24 -ème édition. Paris : Groupe Burlat ;227pclinique. Paris : Editions EKA ;1107p

Paterson DL, Bonomo RA. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases. A clinical update. Clin Microbiol Rev. 18: 657-86.

Paterson D.L .2006. Resistance in Gram negative bacteria: Enterobacteriaceae. The American Journal of Medecine 119(6) : 62–70.

Philippon. REVUES GÉNÉRALES ET ANALYSES PROSPECTIVES ; Les bêta lactamases à spectre élargi ou étendu (BLSE). Paris : Immuno- -analyse et biologie spécialisée ; Elsevier Masson SAS, 2013.

Péan. Y, De Bels. F. (2001). Evolution de la sensibilité et épidémiologie de la résistance des entérobactéries de ville au cours des enquêtes Vigil 'Roc. Médecine et maladies infectieuse, 31, 609-621.

Pezhman, B., Fatemeh, R., Amir, R., Mahboobeh, R., Mohammad, F., 2021.PubMed – Kenneth M Bischoff et al., "The chloramphenicol resistance gene cmla is disseminated on transferable plasmids that confer multiple-drug resistance in swine Escherichia coli", FEMS Microbiology Letters 243(1): 285-291 (2005).

Pelczar, M. J., Chan, E. C. S., & Krieg, N. R. (1993). Microbiology: Concepts and Applications McGraw-Hill. ISBN: 978-0070492585. P: 151–227.

R

Rabia Djihen,.N., & Samai Malak, (2024). Les infections liées aux cathéters veineux au niveau du CHU de Constantine [Mémoire de Master, Université Constantine 1 Frères Mentouri]. Département de Microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. pp. 1–49.

Ramdani-Bouguessa N, Manageiro V, Jones-Dias D, Ferreira E, Tazir M, Caniça M. 2011. Role of SHV β-lactamase variants in resistance of clinical Klebsiella pneumoniae strains to βlactams in an Algerian hospital. Journal of Medical Microbiology 60(7): 983–987.

Robin F., Delmas J., Schweitzer C., Tournilhac O., Lesens O., Chanal C. and Bonnet R. (2007). Evolution of TEM-Type Enzymes: Biochemical and Genetic Characterization of Two New Complex Mutant TEM Enzymes, TEM-151 and TEM-152, from a Single Patient. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 51 / 1304–1309.

Robin F., Gi bold L., Bonnet R. (2012). Intrinsic or acquired resistant to β-lactams in Enterobacteriaceae: How to identify them in clinical practice. Rev Francoph Lab. 445 : 47 58.

Rodriguez-Villalobas H. et Struelens M-J. (2006). Resistance bactérienne par bêtalactamases à spectre étendu : implication pour le réanimateur. Reanimation. 15, 205-213.

Ruppé, E. (2010) Epidemiology of expanded-spectrum beta-lactamases: The rise of CTX-M. Antibiotiques 12: 3-16)

Reaction in Microfluidic Devices." Lab. on a Chip 16(20):3866–84. doi :10.1039/c6lc00984k

S

Salah H., 2009. Etude de la Métallo-résistance et du Halo-tolérance des Entérobactéries Isolées des Eaux de Surface de la Région de Sétif. Thèse du doctorat : Microbiologie Université : Ferhat Abbas.102)

Samou F. S. (2005). Les infections nosocomiales dans le service de chirurgie ‹‹ B › › de l'hôpital de point G. thèse de doctorat en Médecine. Université de Mali. Pp :33-57.

Santé publique France : Infections associées aux soins : où en sommes-nous en 2017, Nouvelles données, nouvelle organisation [en ligne] ;2018 [mise à jour 20 mai 2019 ; consulté le 10/01/2010]. Disponible sur : https://www.santepubliquefrance.fr/presse/2018/infections-associees-aux-soins-ou-en sommes-nous-en-2017-nouvelles-donnees-nouvelle-organisation.

Safika, S., Nilasari, Z., & Pasaribu, F. H. (2022). Detection of antibiotic resistance coding gene in Klebsiella pneumoniae bacteria isolated from broiler chickens in West Java, Indonesia. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 12(7), 190–198. https://doi.org/10.7324/JAPS.2022.120719

Shaw, K. J., Rather, P. N., Hare, R. S., & Miller, G. H. (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. Microbiological Reviews, 57(1), 138–163. https://doi.org/10.1128/mmbr.57.1.138-163.1993

Sirot, J. (1996) Detection of extend-spectrum plasmid mediated betalactamases by disk diffusion. Clin Microbiol Infect 2: 35–9.

T

Tassau, F., & Baron, D. (1989). Bêta-lactamases des entérobactéries : classification et intérêt clinique. Médecine et Maladies Infectieuses, 19(3), 117–123. https://doi.org/10.1016/S0399-077X(89)80003-4

Tarazi, Yasser H., Saeb N. El-Sukhon, Zuhair Bani Ismail, and Amani A. Almestarehieh. 2021. "Molecular Characterization of Enterohemorrhagic Escherichia Coli Isolated from Diarrhea Samples from Human, Livestock, and Ground Beef in North Jordan." Veterinary World 14(10):2827–32. doi: 10.14202/vetworld.2021.2827-2832.

Tolsma, V. (2025). Les infections sur cathéters : diagnostic et prise en charge Support de cours, Université Grenoble Alpes]. CH Annecy Genevois, DU de thérapeutiques anti-infectieuses. pp. 1–49

Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2018). Microbiology: An Introduction (13th ed., pp. 76–78). Pearson Education. ISBN: 978-0134605180.

Touati A, Benallaoua S, Forte D, Madoux J, Brasme L et De Champs C. (2006). First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 beta –lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Béjaia, Algeria. Antimicrobial Agents Journal. 27: 397-402.

Todar, K. (2020). Todar's Online Textbook of Bacteriology. University of Wisconsin–Madison. Consulté sur http://www.textbookofbacteriology.net .

U

Ur Rahman, Sadeeq, Tariq Ali, Ijaz Ali, Nazir Ahmad Khan, Bo Han, and Jian Gao. 2018. "The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Bêtalactamases." BioMed Research International 2018. doi:10.1155/2018/9519718

V

Vrancken Martin, 2017-2018, « Les pneumonies acquises sous ventilation mécanique : Implémentation et enregistrement des soins de prévention chez les patients intubés, au CHU de Liège », Université de Liège, Faculté de Médecine, Département des Sciences de la Santé Publique

Vora, S., and Auckenthaler, R. 2009. Que signifie « bêtalactamases à spectre élargi » en pratique ? Rev Med Suisse. 5: 1991-1994.

w

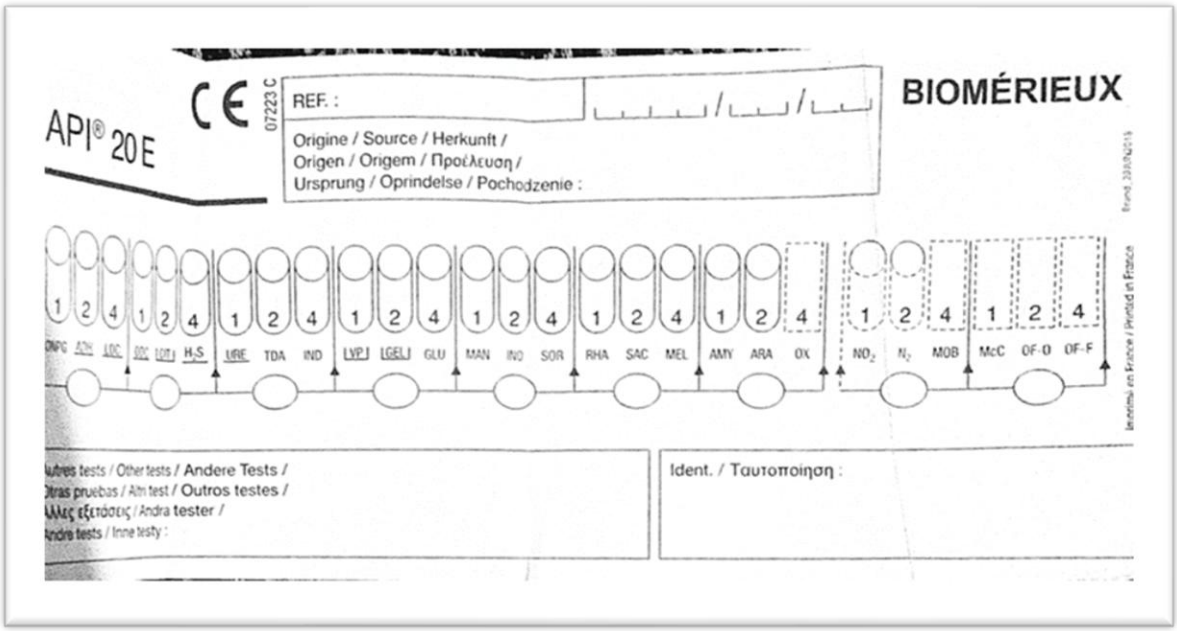
Wu J.J, Ko W.C, Tsai S.H, Yan J.J. 2007. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA, QnrB, and QnrS among clinical isolates of Enterobacter cloacae in a Taiwanese hospital. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 51(4): 1223–7.

Z

Zehhal Abdelatif ,2008, « Infections respiratoires aigües de nourrisson et de l'enfant »

Zenati, Fatima. (2024). Microbiologie Médicale – Cours et Travaux Pratiques. Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.

Annexe 01 : fiche d'identification de la galerie API 20E



Annexe 02 : tableau de lecture de la galerie API 20^{E}

Microtube	Substrat	Caractère recherché	Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	β-galactosidase	Lecture directe		
ADH LDC ODH	Arginine Lysine Ornithine	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H_2S	Thiosulfate de sodium	Production d'H2S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d'α-naphtol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		
NO_3 / N_2	Nitrates (NO_3^-)	Nitrate réductase	Lecture indirecte dans la cupule GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif		

Annexe 03 : Antibiotiques testes pour les bacilles à Gram négatif

Table de lecture 1* : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Entérobactéries*.

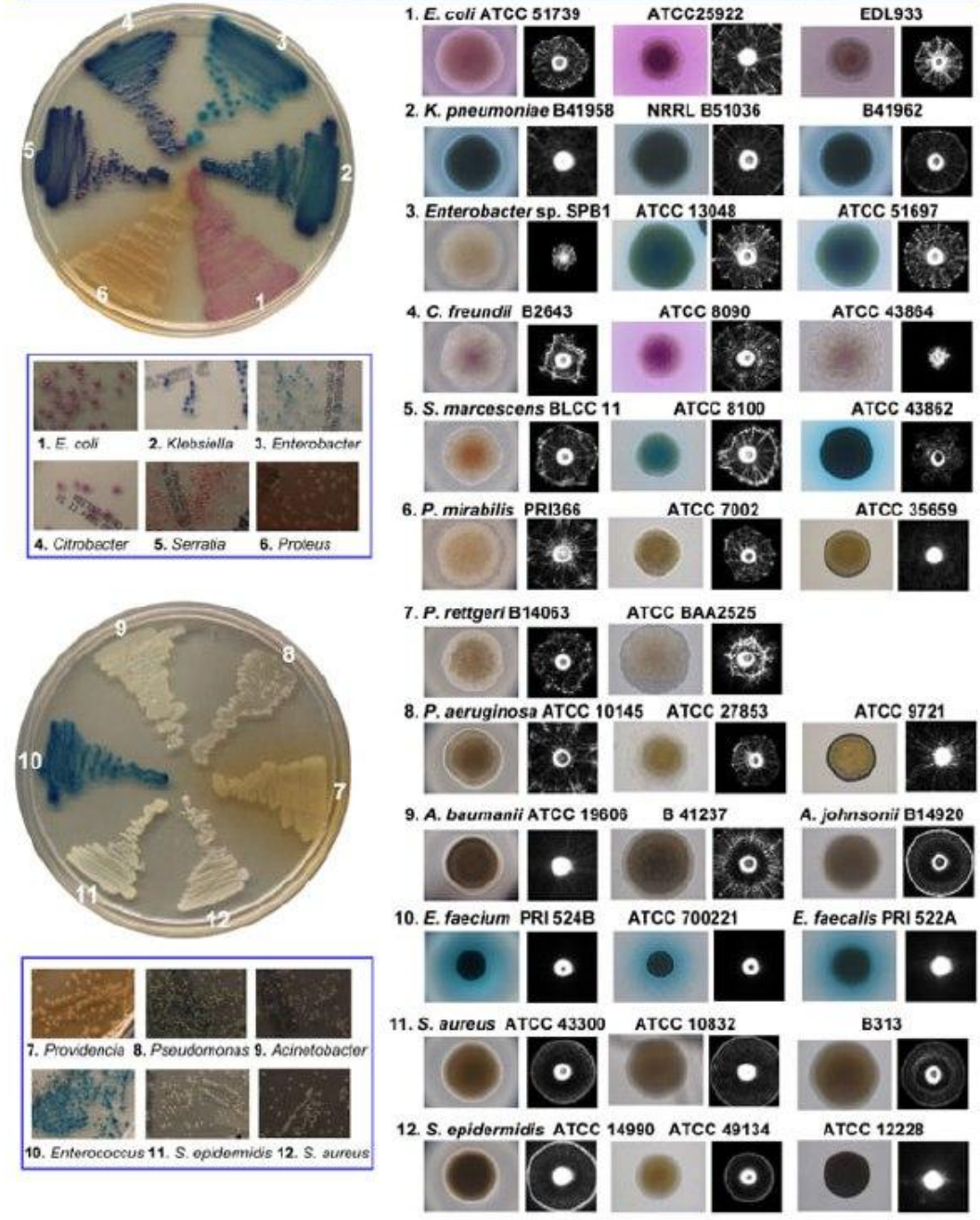
Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)			Commentaires
		R	I	S	R	I	S	
Ampicilline	10µg	≤ 13	14 – 16	≥ 17	≥ 32	16	≤ 8	La réponse à l'ampicilline est valable pour l'amoxicilline.
Amoxicilline +Ac.clavulanique	20/10µg	≤ 13	14 – 17	≥ 18	≥ 32/16	16/8	≤ 8/4	Les breakpoints des céphalosporines et de l'aztréonam ont été révisés en fonction des propriétés PK-PD et des données cliniques. Ainsi, l'application de ces breakpoints dépend du respect de posologies précises : céfazoline (2g toutes les 8h), céfoxitine (2g toutes les 6h), céfotaxime (1g toutes les 8h).
Céfazoline	30µg	≤ 19	20 – 22	≥ 23	≥ 8	4	≤ 2	Suite à la révision des breakpoints des céphalosporines, la lecture interprétative anciennement basée sur la détection ou non d'une BLSE, n'est plus nécessaire. La réponse R, I ou S se fait en se référant aux seuls diamètres mesurés.
Cefoxitine	30µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8	A souligner cependant que la détection phénotypique de la BLSE garde tout son intérêt dans les études épidémiologiques et en hygiène hospitalière.
Céfotaxime	30µg	≤ 22	23 – 25	≥ 26	≥ 4	2	≤ 1	
Céfazoline (Infections non compliquées du tractus urinaire)	30µg	≤ 14	—	≥ 15	≥ 32	—	≤ 16	Les résultats de la céfazoline permettent de prédire les résultats pour les céphalosporines orales : céfaclor, céfdinir, céfpodoxime, céfprozil, céfuroxime axétil, céfalexine et loracarbef quand elles sont utilisées pour le traitement des infections non compliquées du tractus urinaire dues à *E. coli*, *K. pneumoniae* et *P. mirabilis*. Céfpodoxime, céfdinir et céfuroxime axétil peuvent être testés individuellement car certaines souches peuvent être sensibles à ces antibiotiques alors qu'elles sont résistantes à la céfazoline. L'application de ces breakpoints dépend du respect des posologies suivantes : 1g toute les 12h.
Aztréonam	30µg	≤ 17	18 – 20	≥ 21	≥ 16	8	≤ 4	Les critères d'interprétation sont basés sur la posologie de 1g toutes les 8h.
Imipénème	10µg	≤ 19	20 - 22	≥ 23	≥ 4	2	≤ 1	Les breakpoints des carbapénèmes ont été révisés en fonction des propriétés PK-PD et des données cliniques. L'application de ces breakpoints dépend du respect des posologies suivantes : Imipénème : 500 mg toutes les 6h ou 1 g toutes les 8h, Ertapénème : 1g toutes les 24h. La détection phénotypique d'une carbapénémase par le test MHT est réservée aux études épidémiologiques
Méropenème	**10µg**	**≤ 19**	**20 - 22**	**≥ 23**	**≥ 4**	**2**	**≤ 1**	
Ertapénème	10µg	≤ 18	19 - 21	≥ 22	≥ 2	1	≤ 0,5	
Amikacine	30µg	≤ 14	15 – 16	≥ 17	≥ 64	32	≤ 16	
Gentamicine	10µg	≤ 12	13 – 14	≥ 15	≥ 16	8	≤ 4	
Acide nalidixique	30µg	≤ 13	14 – 18	≥ 19	≥ 32	—	≤ 16	La sensibilité diminuée aux fluoroquinolones est détectée chez les salmonelles isolées d'infections extra-intestinales en testant l'acide nalidixique à l'antibiogramme.
Ciprofloxacine	5µg	≤21	22 – 25	≥ 26	≥1	0,5	≤0,25	Valable pour les entérobactéries autres que *Salmonella* Typhi et *Salmonella* spp.
Ciprofloxacine *Salmonella* spp.	**5µg**	**≤ 20**	**21 – 30**	**≥ 31**	**≥ 0,06**	**0,12 - 0,5**	**≤ 1**	
Chloramphénicol	30µg	≤ 12	13 – 17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8	Ne pas reporter en routine pour les souches isolées d'ITU sauf pour les salmonelles. Valable pour *S.*Typhi et *Salmonella* spp. extra-intestinales.
Colistine	CMI	—	—	—	>2**	—	≤2**	**La détermination de la CMI par microdilution en milieu liquide, CBDE (technique d'élution des disques) et CAT (dilution en milieu gélosé) sont acceptables (voir tests complémentaires). Le disque et le E-test ne doivent pas être utilisés*. Pour l'usage thérapeutique des polymixines se referer à l'international consensus guidelines*** **
Furanes	300µg	≤ 14	15 – 16	≥ 17	≥ 128	64	≤ 32	Indiqué uniquement pour les souches d'*E.coli* isolées d'infections urinaires. Le disque de 200µg contient 50µg de glucose-6-phosphate. La CMI est déterminée par la technique de dilution en gélose supplémentée de 25µg/ml de glucose 6-phosphate.
Fosfomycine	200µg	≤ 12	13 – 15	≥ 16	≥ 256	128	≤ 64	
Triméthoprime+ Sulfaméthoxazole	1.25/ 23.75µg	≤ 10	11 – 15	≥ 16	≥ 4/76	—	≤ 2/38	

*Tableau extrait du Document M100. 30th ed. 2020. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. ** Extraits des recommandations de l'EUCAST 2020.
***Tsuji BT, Pogue JM, Zavaxcki AP, et al. International concensus guidelines for the optimal use of the polymyxins. (Pharmacotherapy 2019; 39 (1):10–39) doi: 10.1002/phar.2209)
Abréviations : PK-PD : Pharmacocinétique – pharmacodynamique. BLSE : β-Lactamase à Spectre Etendu.
MHT : Modified Hodge Test. ITU : Infection du Tractus Urinaire. CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.CBDE : Colistin Broth Disk Elution, CAT : Colistin Agar Test.

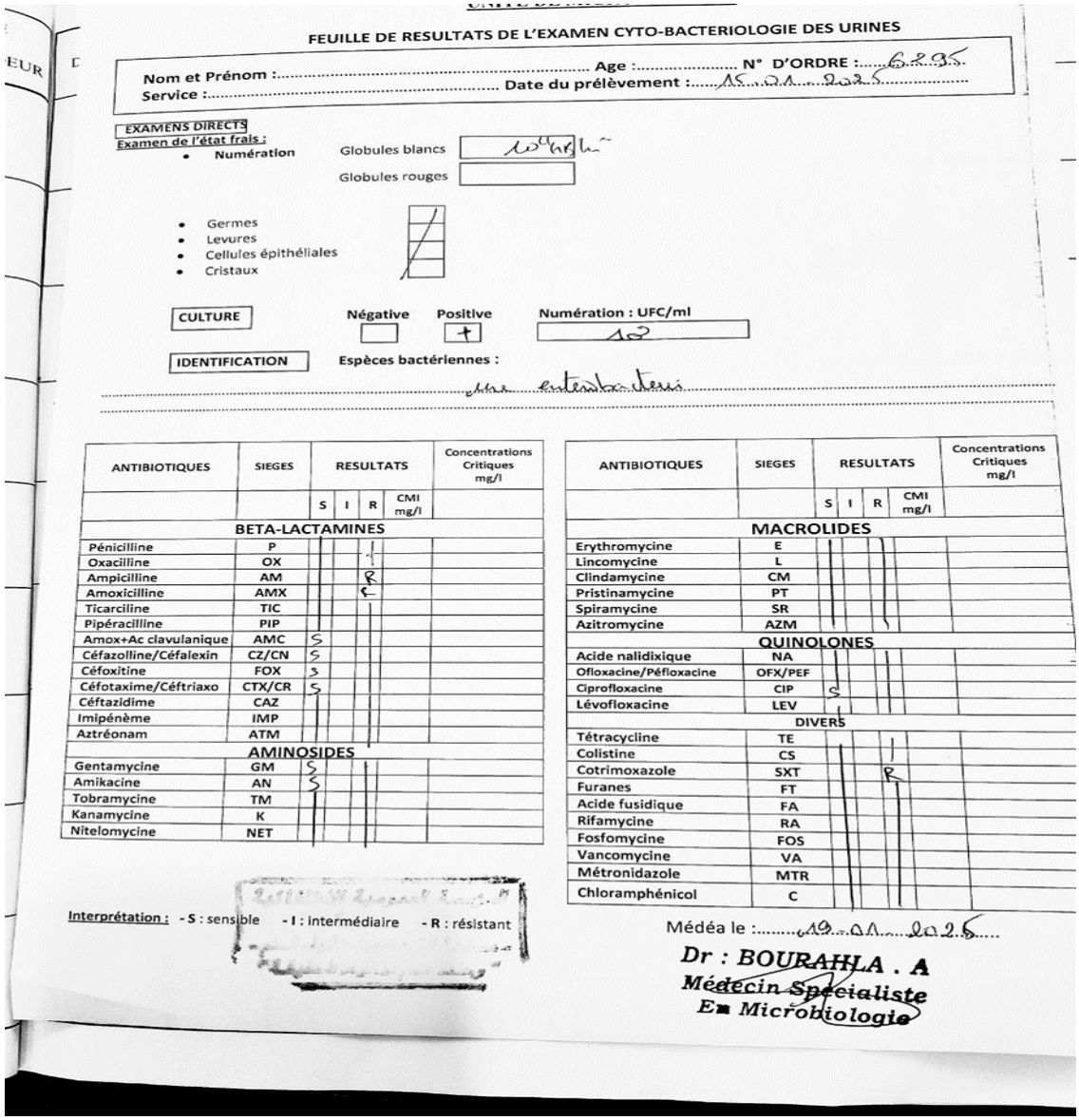
Bibliothèque ENSV

ANNEXE 04 : tableau de lecture de Chromagar

Chromogenic attributes, colony profile, and scatter pattern of *Enterobacteriaceae* and non-*Enterobacteriaceae* species on BBL® CHROMagar™ Medium



Annexe 05 : fiche de l'antibiogrammes des entérobactéries utilisées à l'hôpital de Médéa



FEUILLE DE RESULTATS DE L'EXAMEN CYTO-BACTERIOLOGIE DES URINES

Nom et Prénom :..... Age :..... N° D'ORDRE :.....6295.....
Service :..... Date du prélèvement :.....15.01.2025.....

EXAMENS DIRECTS
Examen de l'état frais :
- Numération — Globules blancs — Globules rouges
- Germes
- Levures
- Cellules épithéliales
- Cristaux

CULTURE — Négative — Positive (+) — Numération : UFC/ml

IDENTIFICATION — Espèces bactériennes : bac entérobacteries

ANTIBIOTIQUES	SIEGES	RESULTATS S	I	R	CMI mg/l	Concentrations Critiques mg/l
BETA-LACTAMINES						
Pénicilline	P					
Oxacilline	OX					
Ampicilline	AM			R		
Amoxicilline	AMX			R		
Ticarciline	TIC					
Pipéracilline	PIP					
Amox+Ac clavulanique	AMC	S				
Céfazolline/Céfalexin	CZ/CN	S				
Céfoxitine	FOX	S				
Céfotaxime/Céftriaxo	CTX/CR	S				
Céftazidime	CAZ					
Imipénème	IMP					
Aztréonam	ATM					
AMINOSIDES						
Gentamycine	GM	S				
Amikacine	AN	S				
Tobramycine	TM					
Kanamycine	K					
Nitelomycine	NET					

ANTIBIOTIQUES	SIEGES	RESULTATS S	I	R	CMI mg/l	Concentrations Critiques mg/l
MACROLIDES						
Erythromycine	E					
Lincomycine	L					
Clindamycine	CM					
Pristinamycine	PT					
Spiramycine	SR					
Azitromycine	AZM					
QUINOLONES						
Acide nalidixique	NA					
Ofloxacine/Péfloxacine	OFX/PEF					
Ciprofloxacine	CIP	S				
Lévofloxacine	LEV					
DIVERS						
Tétracycline	TE					
Colistine	CS					
Cotrimoxazole	SXT			R		
Furanes	FT					
Acide fusidique	FA					
Rifamycine	RA					
Fosfomycine	FOS					
Vancomycine	VA					
Métronidazole	MTR					
Chloramphénicol	C					

Interprétation : - S : sensible - I : intermédiaire - R : résistant

Médéa le :.....19.01.2025.....

Dr : BOURAHLA . A
Médecin Spécialiste
En Microbiologie

ANNEXE 06 : Répartition des entérobactéries selon le type de prélèvements à Médéa, de 2023 à 2025.

Type de prélèvement	ECBU	DIVERS	LCR	Hémoculture	TOTAL
Nombre	205	322	16	7	550
Pourcentage (%)	37	59	3	1	100

ANNEXE 07 : Répartition des souches d'entérobactéries BLSE (+) selon le type de prélèvement

Le type de prélèvement	ECBU	DIVERS	LCR	Hémoculture	TOTAL

Effectif	**20**	**27**	**5**	**1**	**53**
%	**38**	**51**	**9**	**2**	**100**

ANNEXE O8 : Réparation des entérobactéries selon le sexe

	NOMBRE	Pourcentage (%)
Masculin	**224**	**41**
Féminin	**326**	**59**

ANNEXE 09: Répartition des souches d'entérobactéries BLSE (+) selon le sexe

Sexe	Souches des E-BLSE	
	Effectif	%
Masculin	25	47
Féminin	28	53
Total	53	100