

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

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



Réf :.....

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

MASTER

Thème

**Etude de la flore bactérienne
résistante aux antibiotiques isolée chez les
insectes**

Présenté par :

Chalane Fairouz & Madi Nesrine

Soutenu le : **20 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

Mme ZENATI K.

Mme GHAROUT A.

Mme BOUCHERBA N.

MAA

MCB

MCA

Président

Encadreur

Examineur

Année universitaire : 2017 / 2018

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

*En second lieu, nous tenons à remercier notre encadreur « **Mme GHAROUT Alima** », Nous voudrions également lui témoigner notre gratitude pour sa patience et son soutien et sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils qui nous ont été précieux afin de mener notre travail à bon port.*

*Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury « **Mme Boucherba et Mme Zenati** » pour l'intérêt qu'elles ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail Et de l'enrichir par leurs propositions.*

Nous remercions aussi à l'équipe du laboratoire de l'hôpital d'Amizour spécialement les chefs de service Mr **Yessad** et Mr **Ait yahia** pour leur soutien et pour le matériel mis à notre disposition.

On remercie **Mme RAHMANI** pour la prise en charge qu'elle a assuré durant notre stage au Laboratoire.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Dédicaces

Je dédie ce mémoire :

A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études, je vous aime énormément

A ma chère sœur Houda pour son encouragement permanent, et son soutien moral,

A mes chers frères, DJAHID , Yanis , ZIAD pour leur appui et leur encouragement,

A mon fiancé et ma belle-famille pour leur aide, conseils, et encouragement,

A toute ma famille, pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,

A mes copines WARDA, KAHINA, SOUAD ; ainsi que ma chère binôme Nesrine,

A L'équipe du laboratoire d'Amizour BIBA, AKILA, RACHIDA, ZOUZA

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible,

Merci d'être toujours là pour moi.

Fairouz



Dédicaces

Je dédie ce mémoire

A ma précieuse famille, qui sans elle, je ne serais probablement pas où j'en suis aujourd'hui...

A ma mère, la femme la plus aimante, la plus solidaire et la plus protectrice; aucune parole ne saurait traduire la profondeur de ma gratitude et de mon amour envers toi maman.

A mon père, mon père, l'homme de ma vie... Merci d'être mon papouné chéri, merci d'être comme tu es et merci pour tout le bonheur que tu me procure.

A ma chère sœur Kahina

A mes frères: Lamine et Abderrahim je vous serais toujours reconnaissante pour ce que vous êtes et ce que vous faites pour moi.

A mes grandes parentes avec mes souhaits de bonheur de santé et de succès et tous les membres de mes familles Madi et Bellil.

A toute l'équipe du laboratoire de l'EPH d'Amizour

A mes chers amis Adel, Iyes et Aissa

A mes chères copines en particulier, Warda, Kahina, Souad et Ryma ; ainsi que ma binôme fairouz pour le parcours qu'on a fait ensemble

A tous qui me connaissent de près ou de loin.



Nesrine

Liste des abréviations

Liste de tableaux

Liste de figures

Introduction1

Matériel et méthodes

I. Collecte de prélèvements7

 I.1 Objectif et échantillonnage7

 I.2 Pré-enrichissement et isolement de la flore bactérienne8

II. Bactérie à Gram négatif8

 II.1 Recherche de bacille à Gram négatif résistant aux céphalosporines de 3ème génération8

 II.2 Recherche de bacille à Gram négatif résistants aux carbapénème8

 II.3 Identification8

III. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques11

 III.1 Détermination des phénotypes de résistances aux *β-lactamases* de bacilles à Gram négatif13

 III.1.1 Recherche de la production de *β-lactamases* à spectre étendu13

 III.1.2 Recherche de la production de carbapénèmase14

IV. Bactérie à Gram positif15

 IV.1 Recherche des entérocoques résistants à la vancomycine15

 IV.2 Isolement15

 IV.3 Caractérisation phénotypiques des entérocoques16

 IV.3.1 Critères morphologiques16

 IV.3.1.1 Examen macroscopique16

 IV.3.1.2 Examen microscopique16

 IV.3.2 Critère physiologiques et biochimiques16

V. Etude de la sensibilité des souches d'Entérocoques vis-à-vis de la vancomycine17

Résultats

| | | |
|------|--|----|
| I. | Souche bactérienne..... | 18 |
| | I.1 Détermination des phénotypes de résistance chez les bacilles à Gram négatif..... | 18 |
| | I.1.1 Production de β -lactamases à spectre étendu..... | 18 |
| | II.2 Recherche de la production de carbapénèmase..... | 20 |
| III. | Bactérie à Gram positif..... | 21 |
| | III.1 Sensibilité des souches d'entérocoques vis –à-vis de la vancomycine..... | 21 |
| | III. 2 Caractérisation des souches d'entérocoque..... | 22 |

Liste des abréviations

| | |
|------|--|
| CHU | Centre Hospitalo-Universitaire |
| EPH | Etablissement Public Hospitalier |
| EPSP | Etablissement Public de Santé de Proximité |
| TSI | Three Sugar Iron |
| KIA | Kligler-Hajna |
| BEA | Bille Esculine Azide |
| EMB | Eosine Bleu de Méthylène |
| MH | Muller Hinton |
| BHIB | Brain Heart Infusion Broth |
| Nacl | Chlorure de Sodium |
| VP | Voges-Proskauer |
| RM | Rouge de Méthyle |
| VAN | Vancomycine |
| NR | Nitrate Réductase |
| CAZ | Ceftazidime |
| FOX | Céfoxitine |
| FEP | Céfépime |

Liste des abréviations

| | |
|-------|--|
| ATM | Aztréonam |
| CTX-M | Céfotaximase-Munich |
| MEM | Méropénème |
| IMP | Imipénème |
| ERT | Ertapénème |
| CST | Colistine |
| AMC | Amoxicilline / Acide clavulanique |
| CLOX | Cloxacilline |
| OXA | Oxacillinase |
| CTX | Céfotaxime |
| BMR | Bactérie Multi-Résistance |
| BGN | Bacille à Gram Négatif |
| C1G | Céphalosporine de première génération |
| C2G | Céphalosporine de deuxième génération |
| C3G | Céphalosporine de troisième génération |
| C4G | Céphalosporine de quatrième génération |
| PLP | Protéine Liant la pénicilline |
| ERV | Entérocoques résistants à la vancomycine |
| NDM | New Delhi métallo- β -lactamase |
| MBL | Métallo- β -lactamase |
| TEM | Témocilline |

Liste des abréviations

| | |
|---------|--|
| BLSE | β -lactamase à spectre étendu |
| DD-test | Double-Disc Test |
| MCIM | Modified Carbapenem Inactivation Method |
| UFC | Unité Formant Colonie |
| KPC | <i>Klebsiella pneumoniae Carbapenemase</i> |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| CA-SFM | Comité de l'antibiogramme et de la société Française et de Microbiologie |
| EUCAST | European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing |
| BGNNF | Bacille à Gram Négatif Non Fermentaire |
| BGN | Bacille à Gram Négatif |
| SHV | Sulphydryl Variable |

Liste des figures

| | |
|--|-----------|
| Figure 01 : Différents sites de prélèvement. | 07 |
| Figure 02 : Disposition des disques d'antibiotiques dans le DD-test. | 13 |
| Figure 03 : Les étapes du test. | 15 |
| Figure 04 : Image de synergie d'une souche d' <i>Enterobacter cloacae</i> . | 18 |
| Figure 05 : Image de synergie d'une souche <i>klebsella pneumoniae</i> 152 MI sur MH additionné de la cloxacilline. | 20 |
| Figure 06 : Test mCIM positif pour la souche 126 ME avec les témoins positif et négatif. | 21 |
| Figure 07 : Isolement des Entérocoques sur gélose BEA. | 22 |
| Figure 08 : Aspect microscopique des Entérocoques. | 22 |
| Figure 09 : Antibiogramme de deux souches résistantes à la vancomycine. | 22 |
| Figure 10 : Croissance des Entérocoque sur bouillon hyper salé. | 23 |
| Figure 11 : Croissance des Entérocoques sur tellurite de potassium. | 23 |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau I : Galerie biochimique d'identification des bactéries à Gram négatif | 09 |
| Tableau II : Les diamètres critiques des zones d'inhibitions selon les recommandations actualisées de CA-SFM | 12 |
| Tableau III : Caractéristiques des souches productrices de BLSE | 19 |
| Tableau IV : Résultats du DD-test avec et sans cloxacilline | 22 |
| Tableau V : Résultats de l'antibiogramme pour les ERV | 21 |
| Tableau VI : Caractéristiques des souches sélectionnées probablement Enterococcus | 24 |

Introduction

Introduction

La découverte des antibiotiques au début du XXe siècle a constitué une véritable révolution dans le domaine médical. Ces molécules ont été considérées comme étant des armes puissantes qui sauraient éradiquer toute maladie infectieuse d'origine bactérienne (**Monnet et al., 2000**). Ils sont utilisés en médecine et en médecine vétérinaire. L'augmentation de la résistance aux antibiotiques pourraient contribuer à l'émergence de pathogènes humains multi-résistants qui menacent de plus en plus le succès du traitement antibiotique des infections bactériennes (**Jechalke et al., 2014**), et cette résistance est due à l'utilisation abusive ou à la mauvaise utilisation de ces molécules (**Ventola, 2015**). Les premières résistances sont apparues en 1940, à la pénicilline G, puis la streptomycine en 1947 et la première population résistante a été celle du *Staphylococcus aureus* à la pénicilline G, passant de 8% en 1945 à 60% en 1949 (**Bush, 2004**).

L'évolution continue de la résistance aux antibiotiques à l'hôpital et plus récemment dans la communauté menace de compromettre sérieusement la capacité à traiter les infections graves (**Rice, 2009**). Il existe deux grands types de résistance aux antibiotiques. La résistance intrinsèque (ou naturelle): est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce, dont les gènes de résistance font partie du patrimoine génétique de la bactérie (**Carle, 2009**) et la résistance acquise : les bactéries peuvent développer de la résistance à un antibiotique préalablement sensible, ce qui implique des changements génétiques. Cette résistance est souvent instable (**Yamashita et al., 2000**). Les bactéries résistent aux antibiotiques grâce à plusieurs mécanismes dont l'inactivation enzymatique par la sécrétion d'une enzyme ; l'efflux actif ; la modification de la cible et la diminution de la perméabilité (porines) à l'antibiotique (**Bevilacqua et al., 2011**). Parmi ces bactéries résistantes, les bacilles à Gram négatif y compris la famille des *Enterobacteriaceae* ; sont des causes majeures d'infections nosocomiales (**Mehrad et al., 2015**), notamment en milieu de réanimation. Ces bactéries sont ubiquitaires, commensales ou pathogènes du tube digestif de l'Homme et des animaux. La présence de ces bactéries dans les hôpitaux avec une multi-résistance engendre un risque sur la santé de l'Homme (**Loucif et al., 2016**).

Les β -lactamines sont les antibiotiques les plus utilisés dans la pratique clinique courante surtout dans le traitement des infections dues aux entérobactéries. La famille des β -lactamines comprend un grand nombre de molécules, toutes caractérisées par la présence d'un

cycle β -lactame indispensable à l'activité antibiotique, une faible toxicité, associées à un mode d'action sur des protéines de la membrane cytoplasmique, dénommées protéines liant la pénicilline (PLP) ou penicillin binding proteins. Ce sont des molécules qui inhibent la synthèse de la paroi bactérienne (**Ruppé, 2010**).

La résistance bactérienne aux β -lactamines est due principalement à la production d'enzymes β -lactamases capables d'hydrolyser l'anneau β -lactame commun à cette classe d'antibiotiques. Il existe aussi plusieurs autres mécanismes de résistance à cette classe d'antibiotiques dont l'imperméabilité, Systèmes d'efflux et Modification de PLP (**Philippon, 2013**).

Deux schémas de classification des β -lactamases sont actuellement utilisés. La classification moléculaire et la classification fonctionnelle. La classification moléculaire d'Ambler qui est fondée sur la séquence d'acides aminés et divise les β -lactamases en enzymes de classe A, C et D qui utilisent la sérine pour l'hydrolyse des β -lactamines et les métalloenzymes de classe B qui requièrent des ions zinc divalents pour l'hydrolyse des substrats (**Bush and Jacoby, 2010**). La classification fonctionnelle de Bush et al (1995) basée sur les profils de substrats et d'inhibiteurs (**Bush and Jacoby, 2010**).

Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) sont une grande famille très hétérogène d'enzymes bactériennes capables d'hydrolyser les pénicillines, céphalosporines de première, deuxième, troisième et quatrième génération (C1G, C2G, C3G et C4G) et l'aztréonam mais n'hydrolysent pas les céphamycines. Les BLSE appartiennent soit au groupe A (types TEM, SHV, CTX-M) et en plus petit nombre au groupe D (type OXA). Au début des années 1980, seules les enzymes plasmidiques TEM-1, TEM-2 et SHV-1 étaient connues. Les BLSE de type SHV-2 et TEM-3 ont été découvertes à cette époque chez *Klebsiella pneumoniae*, soit peu après l'introduction en clinique des céphalosporines de troisième génération (**Ruppé et al., 2015**). Les BLSE de type CTX-M ont été décrites initialement en 1986 (FEC-1) au Japon, Allemagne et France en 1989 (CTXM-1). Elles confèrent une résistance marquée au céfotaxime (origine de son nom) et au céfépime ; sont plus fortement inhibées par le tazobactam que par l'acide clavulanique (**Hammoudi et al., 2014**).

Les β -lactamases de la classe C (AmpC) sont codées par des gènes chromosomiques ou plasmidiques ; sont capables d'hydrolyser les céphalosporines y compris les céphamycines (céfoxitine) ainsi que les pénicillines, mais pas le céfépime ; elles sont résistantes aux inhibiteurs de β -lactamases (**Hammoudi et al., 2014**).

Les carbapénèmes sont des antibiotiques β -lactamines, tout comme les pénicillines et les céphalosporines, mais différent de ces autres classes par leur structure chimique. L'utilisation des carbapénèmes a augmenté en raison de la résistance croissante aux C3G chez les *Enterobacteriaceae*. Cette résistance est largement due à la propagation de BLSE. Les carbapénèmes sont les traitements de choix des infections sévères causées par les bacilles à Gram négatifs producteurs de BLSE (**Gülmez et al., 2008**).

Les carbapénémases sont des enzymes capables d'hydrolyser presque toutes les β -lactamines, y compris les carbapénèmes. Elles sont classées en différentes classes moléculaires (A, B et D). La plupart des carbapénémases sont à médiation plasmidique et ont été principalement signalées chez les *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*. et *Acinetobacterbaumanni* (**Cantón et al., 2012**). Les infections à entérobactéries productrices de carbapénémases sont difficiles à détecter et à traiter. OXA-48, KPC, VIM et NDM sont les carbapénémases les plus rapportées au monde (**Salehet al., 2018**).

Les β -lactamases de type A telle que les KPC ont été largement et presque exclusivement signalées chez *K. pneumoniae*. Plusieurs variantes de KPC différentes ont été décrites. Elles ont un profil de substrat étendu qui permet l'hydrolyse de toutes les céphalosporines, les pénicillines et l'aztréonam (**Rayamajhi et al., 2008**). Elles sont caractérisées par une sérine dans le site actif, (**Shah et al., 2004**) et une sensibilité à l'action de l'acide clavulanique, du sulbactam et du tazobactam (**Ruppé, 2010**).

Les métallo- β -lactamases (MBL) sont des β -lactamases de classe B qui hydrolysent presque tous les antibiotiques β -lactamines cliniquement disponibles à l'exception de l'Aztréonam (**Mojica et al., 2016**).

Métallo β -lactamases NDM-1 (new delhi métallo β -lactamases) a été identifié tout d'abord en Suède dans deux souches chez un patient d'origine indienne au début de l'année 2008. La première souche NDM-1 fut une souche de *K. pneumoniae* isolée d'un prélèvement urinaire (**Nordmann et al., 2011**). La grande majorité des bactéries productrices de NDM appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae* et aux bacilles à Gram négatif non fermentaires, y compris *Acinetobacter baumannii* (**Meletis, 2016**).

Les enzymes de classe D sont les pénicillinases de type oxacillinase (OXA) peu sensibles aux inhibiteurs et peuvent être inhibées par le NaCl. Ces enzymes confèrent la résistance à l'ampicilline et la céfalotine et sont caractérisés par leur forte activité hydrolytique contre l'oxacilline et la cloxacilline (**Varsha, 2007**).

La plus part de ces enzymes étaient décrites chez *A. baumannii* (OXA-23, OXA-24, OXA-58...). Certaines ont été isolées d'entérobactéries, notamment OXA-48 (Queenan *et al.*, 2007). Ces dernières les pénicillines à un niveau élevé et les carbapénèmes à des niveaux faibles, mais n'hydrolysent pas sensiblement les céphalosporines à large spectre. Leur activité n'est pas affectée par les inhibiteurs utilisés en clinique (**Queenan *et al.*, 2007**). Elles sont endémiques en Turquie, en Afrique du Nord et en Inde (**Poirel *et al.*, 2012**).

Les entérocoques sont des bactéries à Gram positif sous forme de cocci isolés ou arrangés en paires ou en courtes chainettes (**Pulsen *et al.*, 2003**), très répandus dans l'environnement (sol, plantes, eau) (**Teixeira *et al.*, 2007**), mais se trouvent préférentiellement au niveau du tractus intestinal de l'Homme et des animaux à sang chaud. Ils possèdent une résistance naturelle de bas niveau à de nombreux antibiotiques comme les β -lactamines (**Courvalin et Leclercq, 2016**), et une résistance acquise aux glycopeptides ou aux aminosides. La plus importante en clinique est la résistance à la vancomycine (ERV), surtout par l'acquisition du gène *vanA* (**Werner *et al.*, 2008**). Les glycopeptides agissent sur la synthèse de la paroi des bactéries à Gram positif en inhibant la trans-glycosylation. Il existe neuf phénotypes de résistance aux glycopeptides chez les entérocoques, le phénotype VAN A (résistance très élevée et inducible à la vancomycine et la téicoplanine), le phénotype VAN B (résistance variable et inducible à la vancomycine, sensible à la téicoplanine), le phénotype VAN D (résistance constitutive à des niveaux modérés pour les deux glycopeptides), les phénotypes C, E, G, L et N (résistance de bas niveau à la vancomycine et une sensibilité à la téicoplanine) (**Courvalin et Leclercq, 2016**). En Algérie, le premier cas d'*Enterococcus faecalis* résistant à la vancomycine a été rapporté en 2006 chez un patient de 24 ans souffrant d'une uropathie malformative (**Aggoune *et al.*, 2008**). La résistance aux antibiotiques chez les bactéries commensales comme les entérocoques est préoccupante ces dernières années chez la faune sauvage, qui peut porter et diffuser cette résistance dans l'environnement (**Santos *et al.*, 2013**).

Le milieu hospitalier est un lieu destiné à prendre en charge des personnes atteintes de pathologies variées, infectieuses ou non et des traumatismes trop complexes pour pouvoir être traités. Ces personnes sont en contact avec des individus sains. Chacun, en se déplaçant dans les locaux et en déplaçant du matériel, disperse des germes qui peuvent notamment se retrouver nombreux sur les surfaces, matériel médical et dans l'air faisant de l'environnement hospitalier une véritable « niche écologique » de germes. Ceux-ci évoluent selon leurs capacités intrinsèques de résistances, et selon les désinfectants et antiseptiques utilisés pour le nettoyage et les soins (**Lemmen et al., 2004**).

La classe des insectes représente le groupe le plus important du règne animal. Ce sont des invertébrés de l'embranchement des arthropodes. Ces derniers sont des vecteurs dangereux de maladies mortelles (**Benelli, 2015**). Parmi ces insectes, on peut citer les mouches qui peuvent être des vecteurs de transmission des bactéries résistantes à différents environnements à cause de leurs contacts avec les humains, les animaux et la nourriture (**Marc et al. 2015**). La transmission bactérienne peut se faire soit par régurgitation ou défécation (**Onwugamba et al., 2018**).

Les mouches sont des insectes volant familiers des habitations et parasites des aliments. Leurs structures morphologiques leur permettent de s'adhérer et marcher sur des surfaces non horizontales et cela grâce aux pulvillus qui est recouvert d'une substance collante libérée par poiles glandulaires. Cette substance favorise l'adhésion des micro-organismes qui peuvent être transporter directement à l'homme et aux animaux *via* le délogement mécanique de l'exosquelette, dépôt fécal et régurgitations (**Graczyk et al., 2001**).

Les blattes domestiques se trouvent dans différents milieux, lorsqu'ils sont en contact avec l'environnement humain cela peut engendrer une contamination alimentaire. Ce sont des organismes nuisibles persistant qui abritent des bactéries résistantes aux antibiotiques (**Menasria et al. 2015**), et sont classés parmi les ravageurs les plus répons dans les hôpitaux. Leur présence est favorisée par l'humidité, la nourriture et la température (**Carle, 2009**). Le rôle important des cafards comme réservoir potentiel de bactéries multi-résistantes a été démontré dans l'étude de LOUCIF et enquêtes antérieures avec leur présence dans les environnements hospitaliers, qui a déjà été signalé en Algérie et d'autres des pays comme la Turquie, le Japon et Cuba (**Loucif et al., 2016**).

L'augmentation remarquable de la résistance aux antibiotiques est devenue une préoccupation majeure pour les services de santé. Plusieurs études dans le monde ont rapporté des souches résistantes aux antibiotiques isolées chez les insectes. En Algérie, l'étude de LOUCIF en 2016 était, le premier rapport sur les blattes germaniques (*Blattella germanica*) en tant que réservoirs des entérobactéries productrices de carbapénèmases de type OXA-48 et des BLSE de type CTX-M-15 des souches de bacilles à Gram négatif isolées au niveau de l'hôpital universitaire de Batna ainsi les travaux de GHAROUT sur les fourmis ; mouches ; moustiques ; et cafards, réalisés au niveau des hôpitaux de Bejaia et d'Alger.

Dans ce cadre, nous proposons d'étudier la résistance aux antibiotiques isolées des souches bactériennes chez des insectes collectés au niveau de quelques services du CHU de Bejaia et de l'hôpital d'Amizour dont l'objectif est de :

- Isolement et identification des souches de bacilles à Gram négatif résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération.
- Isolement et identification des bactéries à Gram négatif résistantes aux carbapénèmes
- Isolement et identification des entérocoques résistants à la vancomycine.

Matériel

Et

Méthodes

I. Collecte de prélèvements

I.1. Objectif et échantillonnage

Le but de cette étude est de cribler des souches de Bacilles à Gram négatif résistants aux céphalosporines de troisième génération (C3G) et aux carbapénèmes et des souches d'entérocoques résistantes à la Vancomycine chez les insectes.

Nous avons réalisé un travail qui comporte deux parties durant la période allant du **25 février au 30 mai 2018**. La première partie a consisté en la collecte de 200 insectes au niveau de l'EPH d'Amizour et CHU de Bejaia, (Hôpital Khelil Amrane et Frantz fanon ainsi que la clinique mère et enfant de targa ouzemour) et l'établissement public de santé de proximité (EPSP) de Bejaia (**Figure 01**). La deuxième partie du travail (partie pratique) a été réalisée au sein du laboratoire de microbiologie de l'EPH d'Amizour.

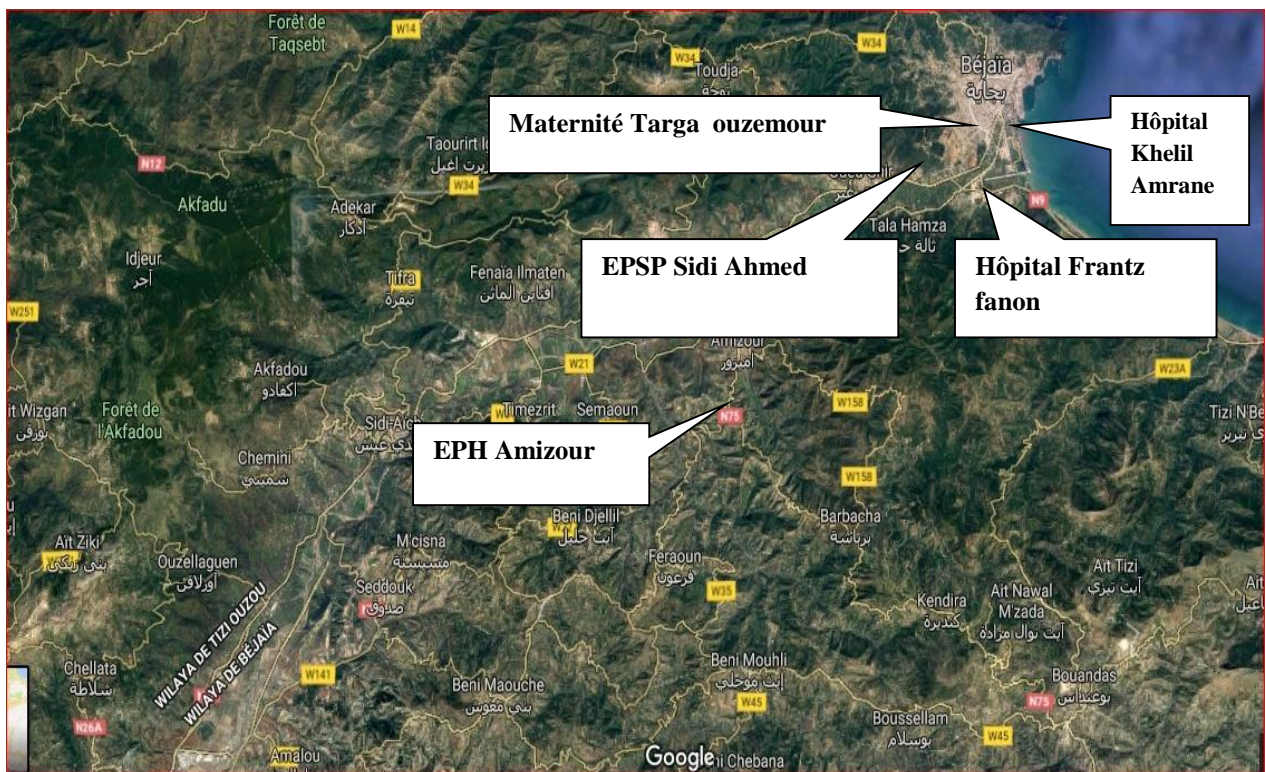


Figure 01: Sites de prélèvements

I.2. Pré-enrichissement et isolement de la flore bactérienne

Les prélèvements ont été enrichis dans le bouillon cœur-cervelle (BHIB), puis incubés à 37°C/24h (Loucif et al., 2016).

II. Bactéries à Gram négatif

II.1. Recherche de bacilles à Gram négatif résistants aux céphalosporines de troisième génération(C3G)

Un enrichissement a été réalisé en ajoutant 40µl du bouillon BHIB dans 160µl du BHIB additionné de céfotaxime et de vancomycine servant à éliminer les Gram positif. L'incubation a été réalisée à 37°C/24h.

A partir du bouillon d'enrichissement positif, un ensemencement de 50µl du BHIB a été effectué sur la gélose Mac Conkey additionnée de céfotaxime et de vancomycine. Les boîtes ont été incubées à 37°C/ 24h.

II.2. Recherche de bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes

Un enrichissement a été réalisé en ensemencant 40µl du bouillon BHIB dans 160µl du BHIB additionné de méropénème et de vancomycine. L'incubation a été effectuée à 37°C/24h. A partir du bouillon d'enrichissement, un ensemencement de 50µl du BHIB a été effectué sur la gélose Mac Conkey contenant le méropénème et de vancomycine. Les boîtes ont été incubées à 37°C/ 24h.

II.3. Identification

Après 24 h d'incubation, on analyse l'aspect des colonies ayant poussées sur les milieux de culture. Les cultures poly microbienne ont été purifiées sur la gélose Eosine bleu de Méthylène (EMB), puis ont été incubée à 37C° pendant 24h.

Les souches sélectionnées ont été identifiées en utilisant une mini-galerie biochimique classique (Urée/Indole, KIA, Citrate Simmons, Clark et Lubs, bouillon nitrate) (**tableau I**) (Denis et al., 2007). L'identification de certaines souches a été confirmée en utilisant des galeries Api 20E ainsi que le milieu chrom-Agar orientation. Les milieux de cultures utilisés

au cours de ce travail, les réactifs et la lecture des galeries biochimiques sont rapportés respectivement. Voir **l'annexe I**.

Tableau I : Galerie biochimique d'identification des bactéries à Gram négatif (**Denis et al. 2007**).

| Milieu | Mode D'ensemencement | Caractère Recherchés | Résultats |
|-------------------------|--|---|--|
| Bouillon Nitraté | Ensemencement du Milieu avec une suspension bactérienne, et l'incubation, est réalisée à 37°C/24h. | Réduction des Nitrates en Nitrites. | Nitrate réductase (+) : virage au rouge du milieu après l'ajout des deux réactifs NR I et NR II. Nitrate réductase (-) : Virage au jaune du milieu. L'absence de coloration rouge ne signifie pas que la bactérie étudiée ne possède pas de nitrate réductase, pour savoir il faut utiliser un composé capable de réduire les ions nitrates en ions nitrites comme la poudre de zinc . Cette dernière est alors ajoutée au milieu après l'ajout du réactif NR I et NR II. |
| KIA | Ensemencement de la pente de la gélose par des stries serrées, puis le culot par piqûre centrale et l'incubation est réalisée à 37°C | -Lactose. -Glucose. -Gaz. -Production d'H ₂ S | Lactose + : virage de la pente au jaune. Glucose+ : virage de culot au jaune. Gaz+ : apparition des bulles ou des poches gazeuses qui décalent la gélose de fond de |

| | | | |
|---------------------------|---|---|---|
| | pendant 24h. | | tube. Production d'H₂S: Noircissement du milieu. |
| Citrate de Simmons | Ensemencement de la pente de la gélose par des stries longitudinales. L'incubation est réalisée à 37°C/ 24h | Utilisation du citrate comme seule source de Carbone. | Citrate+ : virage du milieu au bleu et une culture sur la pente. |
| Urée / Indole | Ensemencement du milieu avec une suspension bactérienne, et l'incubation est réalisée à 37°C/24h | -Uréase. -Indole. -Tryptophane désaminase | Uréase+ : Virage du milieu au rouge/Rose. Indole+ : Apparition d'un anneau rouge en surface après l'ajout de quelques gouttes de réactif de kovacs. TDA+ : coloration marron après l'ajout de quelque goutte de réactif TDA. |
| Clark et Lubs | Ensemencement du milieu par l'ajout de quelques gouttes de la suspension bactérienne, l'incubation est réalisée 37°C/24h. | Type fermentaire | Test VP+ : virage au rouge/rose après l'ajout des réactifs VP I et VP II. (Formation d'acétoïne). Test RM+ : Coloration rouge après l'ajout de réactif RM. (formation des acides mixtes). |

❖ **Galerie API 20E**

C'est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries à Gram négatif, dont les entérobactéries.

Elle comporte 20 micro tubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Ces micro tubes ont été inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation (18h-24h à 37C°) se traduisaient par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (**Annexe II**).

III. Etude de sensibilité des souches aux antibiotiques

La sensibilité des souches aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de l'antibiogramme par diffusion sur gélose Mueller Hinton (MH) selon les recommandations du Comité d'antibiogramme de la société française de microbiologie (**CA-SFM**). L'interprétation des résultats en sensible (S), intermédiaire (I) et résistant (R) a été faite selon les recommandations de (**CA-SFM, 2013**) pour les disques de Cefotaxime : CAZ(30µg), Céfotaxime : CTX (30µg), Vancomycine : VAN (30µg), Colistine : CST (50µg) et (**CA-SFM-EUCAST, 2018**) pour les disques d'Amoxicilline+ acide clavulanique : AMC (20µg+10µg) , Céfépime : FEP (30µg), de Cefoxitine : Fox (30µg), d'Aztréonam : ATM (30µg), Meropénème : MEM, (10µg), Imipénème : IMP (10µg) et Ertapénème : ERT(30µg) (**tableau II**).

❖ Antibiogramme : (CA-SFM-EUCAST, 2018)

À partir d'une culture fraîche (18/24h), on prépare une suspension avec (3 à 4 colonies de la souche a testé) dans 5 ml d'eau physiologique stérile; Correspondant approximativement à 0.5 de l'échelle de Mc Farland = 10⁸UFC/ml.

L'ensemencement de la suspension bactérienne est effectué par écouvillonnage en stries serrées sur la totalité de la surface de la gélose dans trois directions. Ensuite, les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérile. L'incubation des boîtes est réalisé à 37°C /24 h.

Tableau II : les diamètres critiques des zones d'inhibitions selon les recommandations

actualisées du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.

| Famille | Antibiotique | Abréviation | charge du disque (μg) | La marque | Diamètre critère CA-SFM, 2013 et CA-SFM-EUCAST, 2018) | |
|------------------------|---|-------------|--|-------------------------------|---|-----------|
| | | | | | $S \geq$ | $R <$ |
| Pénicilline | Amoxicilline + acide clavulanate | AMC | (30μg) | Liofilchem | 19 | 19 |
| Céphalosporines | Céftazidime | CAZ | (30μg), | Liofilchem | 26 | 21 |
| | Céfotaxime | CTX | (30μg) | Liofilchem | 26 | 23 |
| | Céfoxitine | FOX | (30μg) | Liofilchem | 19 | 15 |
| | Céfépime | FEP | (30μg) | Liofilchem | 27 | 21 |
| Carbapénème | Meropénème | MEM | (10μg) | Liofilchem/ Biorad | 22 | 16 |
| | Ertapénème | ERT | (10μg) | Liofilchem/ Biorad | 25 | 22 |
| | Imipénème | IMI | (10μg) | Liofilchem | 22 | 16 |
| Monobactame | Aztreonam | ATM | (30μg) | Liofilchem | 23 | 21 |
| Glycopeptide | Vancomycine | VAN | (30μg) | Liofilchem | 17 | - |
| Polymixine | Colistine | CST | (50 μg) | Biorad | 15 | 15 |

III.1. Détermination des phénotypes de résistance aux β -lactamines de bacilles a Gram négatif

III.1.1. Recherche de la production de β -lactamase à spectre étendu

Les β -lactamase à spectre étendu (BLSE) ont été recherchées chez toutes les souches isolées sur gélose Mac Conkey additionnée de céfotaxime.

- **DD-Test**

Cette technique, sur gélose dite des « bouchons de champagne » recommandée par le CASFM, reste la plus utilisée. Elle consiste à rechercher une synergie sur gélose Mueller-Hinton entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de β -lactamases (Amoxicilline (20 μ g) + acide clavulanique (10 μ g)) placés à 30mm des disque de C3G (Céftazidime :CAZ(30 μ g), de Céfotaxime :CTX (30 μ g)(Jarlier et al., 1988).Ainsi que d'autre β -lactamines dont Céfoxitine : Fox (30 μ g), Céfépime : FEP (30 μ g), Aztréonam : ATM (30 μ g) (Imipenème : IMP (10 μ g) ou Meropénème : MEM (10 μ g) ont été testés sur la même boîte (**figure2**).

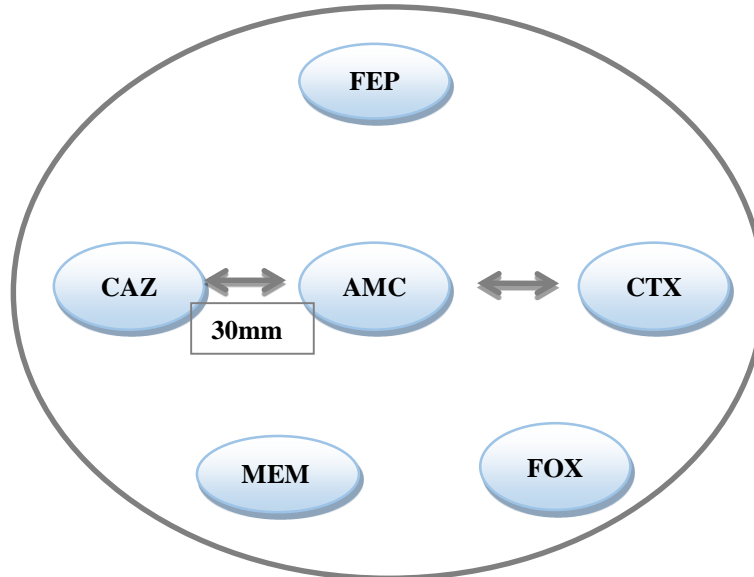


Figure 02:La Disposition des disques d'antibiotique dans le DD-test (Jarlier et al., 1988).

- **Test de synergie sur gélose MH additionnée de cloxacilline**

La cloxacilline ; est un inhibiteur des céphalosporinases de la classe C d'Amber chromosomique ou plasmidique. Pour certaines souches de bacille à Gram négatif, il est parfois difficile de distinguer sur l'antibiogramme habituel les hyperproductions de céphalosporinases des BLSE. En cas d'hyperproduction, les diamètres autour des disques de C3G très diminués peuvent masquer les images de synergies évocatrices de BLSE entre des disques de C3G et d'acide clavulanique. Dans ce cas, le test de synergie est refait en utilisant la gélose MH additionnée de cloxacilline (Orbénine® 250ug/ml) afin d'inhiber l'activité céphalosporinase. La comparaison des diamètres d'inhibition entre les boîtes avec et sans cloxacilline permet de mettre en évidence la présence d'une BLSE seule ou associée à une céphalosporinase (**Drieux et al., 2008**).

III.1.2 Recherche de la production de carbapénémases

- ❖ **Test de mCIM (Modified Carbapenem Inactivation Method)**

Modified carbapenem inactivation method (mCIM) est un test de dépistage phénotypique pour la recherche de la production de carbapénémases (**figure3**), il consiste à :

Préparer les suspensions dans des tubes Eppendorf contenant 500µl du bouillon cœur-cerveille stérile (souches bactériennes à tester, témoin positif : KPC, témoin négatif : *E. coli* ATCC 29522). Par la suite, immerger un disque de méropénème (10µg) dans chaque suspension et incubé pendant 4 h / 37°C. Après incubation, retirer le disque de la suspension et le déposer à la surface d'une boîte de gélose MH inoculée avec la souche *E. coli* sensible à tous les antibiotiques (ATCC 29522). Incubation des boîtes à 37° C /24h. .

- Un résultat positif se traduit par l'absence d'une zone d'inhibition autour du disque d'antibiotique(**Pierce et al., 2017**) .

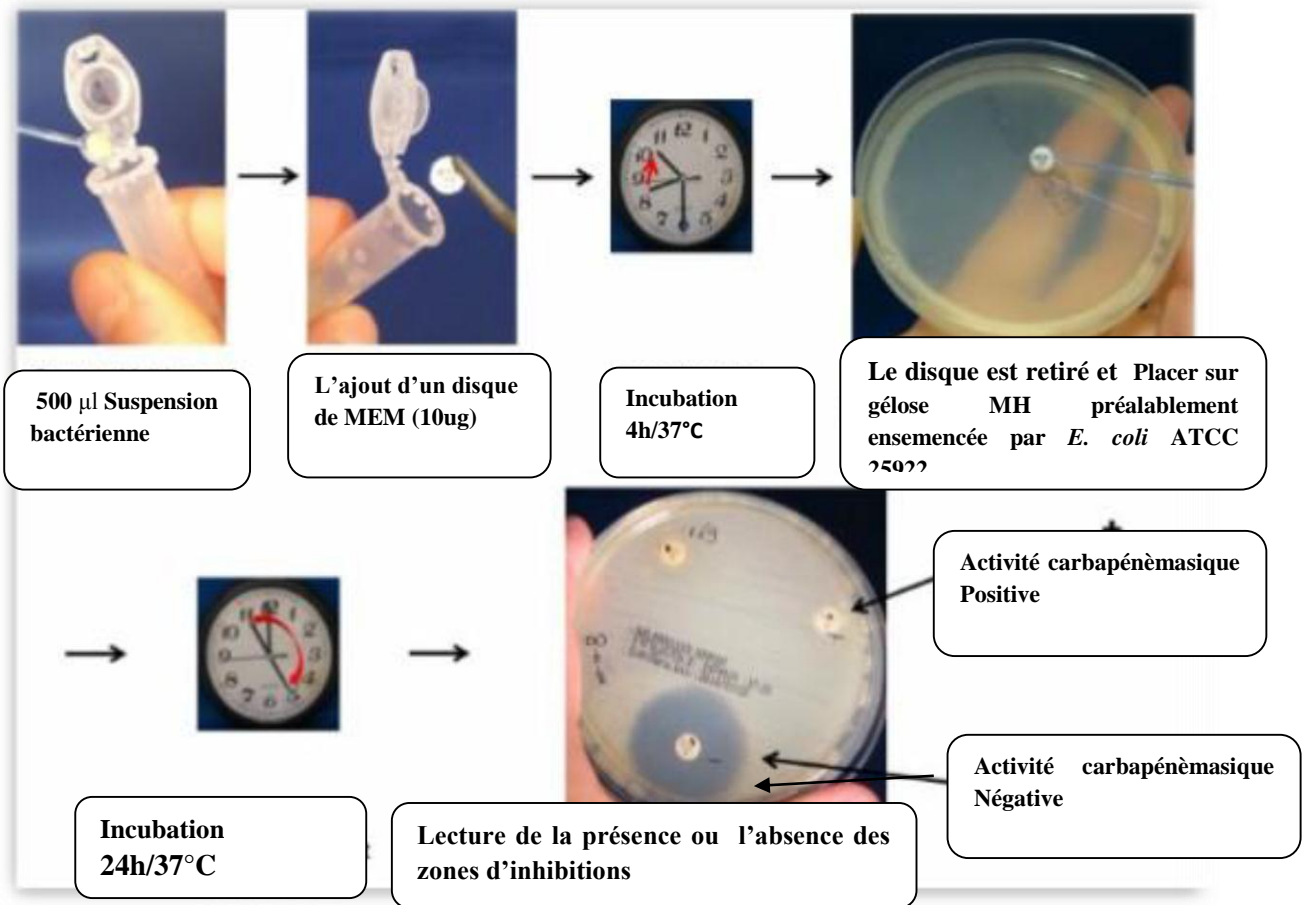


Figure 03 : Test mCIM (Modified Carbapenem Inactivation Method)(Pierce et al., 2017)

IV. Bactérie a Gram positif

IV.1. Recherche des entérocoques résistants à la vancomycine

Un enrichissement a été réalisé en ensemencant 40 µl de bouillon du milieu pré enrichissement dans 160 µl de bouillon hyper salé additionné de vancomycine (10 µg/ml) et de colistine (10 µg/ml), servant à sélectionner les souches d'ERV et d'éliminer les souches à Gram négatif. L'incubation a été effectuée à 37°C/24h.

IV.2. Isolement

L'isolement a été réalisé sur gélose bile esculine agar « BEA » à partir d'un bouillon d'enrichissement, 50µl de bouillon cœur -cervelle ont été ensemencée sur la gélose BEA additionnée de vancomycine (10 µg/ml) et de colistine (10 µg/ml). L'incubation a été réalisée à 37°C/24h.

IV.3. Caractérisation phénotypiques des entérocoques

IV.3.1. Critères morphologiques

IV.3.1.1.Examen macroscopique

Bile esculine agar est un milieu sélectif utilisé pour l'isolement et l'identification des entérocoques (**Chuard and Reller., 1998**). L'examen macroscopique des colonies isolées sur le milieu BEA montre des petites colonies translucides (de la couleur de milieu) entourées d'un halo noir. L'apparition de ces colonies sur le milieu montre qu'elles sont résistantes à la bile et à l'azide de sodium. Le noircissement est dû à l'hydrolyse de l'esculine en libérant de l'aglycone qui est repérée par une réaction en présence de sels de fer (**Balaei Gajan et al., 2013**).

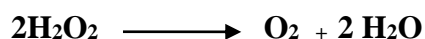
IV.3.1.2.Examen microscopique

La coloration de Gram (**Annexe III**) met en évidence la propriété de la paroi bactérienne et permet de distinguer et classer rapidement les bactéries présentes dans le milieu. Les entérocoques apparaissent sous forme de cocci à Gram positif (couleur violette) regroupés en diplocoques ou en courtes chainettes (**Lebreton et al., 2014**).

IV.3.2. Critères physiologiques et biochimiques

a) Test de catalase

La catalase est une enzyme qui est produite en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire qui peuvent détruire les peroxydes. Cette enzyme qui catalyse :



Ce test a pour but de différencier les bactéries à catalase négative et à catalase positive, par la mise d'une colonie en suspension avec un ou deux gouttes de solution de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sur une lame propre et sèche. Une réaction positive se traduit par une effervescence (**Toit et al., 2000**).

b) Croissance sur un Bouillon hyper salé

La croissance en présence de chlorure de sodium (NaCl) donne des renseignements précieux pour l'indentification. Généralement, les entérocoques sont capables de se développer en milieu hyper salé (6,5% de NaCl) contrairement aux streptocoques, Des tubes

de bouillon hyper salé ont été ensemencés puis incubés à 37°C/24h. La présence d'un trouble dans le tube indique un test positif (**Schleifer and Kilpper-Bälz, 1984**).

c) Croissance et résistance à la chaleur sur le Bouillon nutritif

A partir d'une boîte de BEA positive, nous avons ensemencé à l'aide d'une anse de platine le bouillon nutritif additionné de Glucose à 10% par quelques colonies. Les tubes ensemencés sont incubés à 60°/30min puis à 37°C/24 h. La présence d'un trouble indique que la souche résiste à la chaleur (**Terzaghi and Sandine, 1975**).

d) La résistance au tellurite de potassium

La croissance en présence de tellurite de potassium est une caractéristique des souches d'*E. faecalis*. Afin de mettre en évidence ce test, nous avons additionné 1ml de tellurite de potassium à 249 ml d'eau distillée, puis 0,5ml de cette solution est ajouté à 4,5ml de bouillon nutritif. Le tube a été ensemencé par la bactérie à tester puis incubé à 37°C° pendant 24h. L'apparition de colonies noires indique la présence *E. faecalis* (**Fazli and Hanifian, 2014**).

V. Etude de la sensibilité des souches d'entérocoque vis-à-vis de la vancomycine

Un antibiogramme a été réalisé sur ces souches, ce qui permet de détecter la sensibilité des souches des entérocoques à l'égard de la Vancomycine. Un disque de Vancomycine (VA, 30µg) a été déposé au centre d'une boîte de Muller Hinton inoculé préalablement avec la souche à tester. Les boîtes ont été incubées à 37°C/24h.

Les souches dont le diamètre d'inhibition est inférieur à 12 mm (pour un disque de VAN de 30µg) sont considérées résistantes (**CA-SFM, 2013**).

Résultats

I. Souches bactériennes

Au cours de cette étude, un total de 200 échantillons (insectes) a été collecté au niveau des hôpitaux de Bejaia. Sur l'ensemble des échantillons analysés, 92 souches ont été isolées sur gélose Mac-Conkey additionnée de Méropénème, 59 souches sur gélose Mac Conkey additionnée de Céfotaxime, 49 souches sur gélose BEA additionnée de Vancomycine.

L'identification a été réalisée en utilisant une mini-galerie biochimique classique, le milieu Chrom Agar orientation. La galerie API20E a été utilisée chez 03 souches.

I.1. Détermination des phénotypes de résistance chez les bacilles à Gram négatif

I.1.1 Production de β -lactamases à Spectre Etendu

➤ **DD-test**

Ce test a été effectué sur gélose Mueller-Hinton (59 souches) a révélé la présence d'une image de synergie chez 05 souches d'entérobactéries indiquant ainsi la production probable d'une BLSE chez ces souches (**Figure 04**).

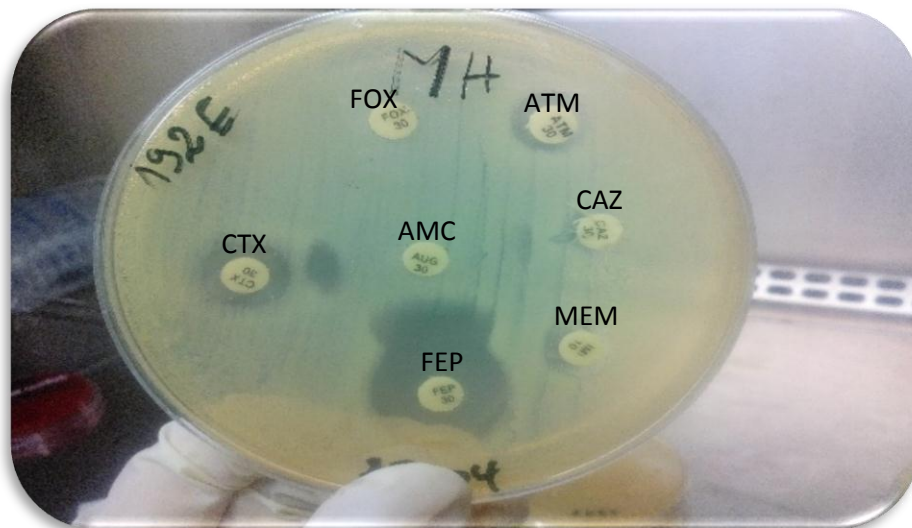


Figure 04: Image de synergie d'une souche d'*Enterobacter cloacae*.

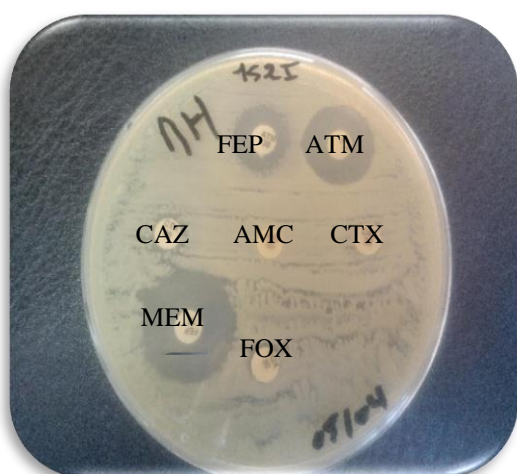
Les caractéristiques des 04 souches productrices de BLSE sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau III : caractéristiques des souches productrices de BLSE.

| Code | Diamètres des zones d'inhibition (mm) | | | | | | | Image de Synergie | Phénotype De résistance probable |
|---------------|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------------|----------------------------------|
| | AMC | CTX | CAZ | FOX | ATM | MEM | FEP | | |
| 192MQE | 06 (R) | 12 (R) | 07 (R) | 06 (R) | 09 (R) | 11 (R) | 19 (R) | Présence | BLSE |
| 124MqE | 06 (R) | 16 (R) | 07 (R) | 06 (R) | 09 (R) | 10 (R) | 22 (R) | Présence | BLSE |
| 191MqE | 06 (R) | 14 (R) | 06 (R) | 06 (R) | 10 (R) | 10 (R) | 23 (R) | Présence | BLSE |
| 176M (E+I) | 06 (R) | 07 (R) | 06 (R) | 11 (R) | 13 (R) | 26 (S) | 12 (R) | Présence | BLSE |
| 152 MI | 06 (R) | 06 (R) | 06 (R) | 06 (R) | 14 (R) | 17 (R) | 21 (R) | Présence | BLSE |

➤ **DD-Test avec cloxacilline**

La présence de l'activité céphalosporinasiq (chromosomique ou plasmidique) peut masquer l'image de synergie. Un DD-Test sur gélose Muller Hinton additionnée de cloxacilline à une concentration de 250µg/ml a été réalisée sur un total de 35 souches de bacilles à Gram négatif résistants aux C3G avec absence d'image de synergie.



DD-Test sur MH sans cloxacilline



DD-Test sur MH+Cloxacilline

Figure 05: Image de synergie d'une souche *Klebsiella pneumoniae* (152MI) sur MH additionné de cloxacilline

II.2. Recherche de la production de carbapénèmases

➤ **Test mCIM**

Sur un total de 92souches testées, le test mCIM a montré un résultat positif chez 20 souches indiquant ainsi la production probable d'une carbapénèmase. **La Figure 06** donne un exemple d'un résultat positif et négatif.

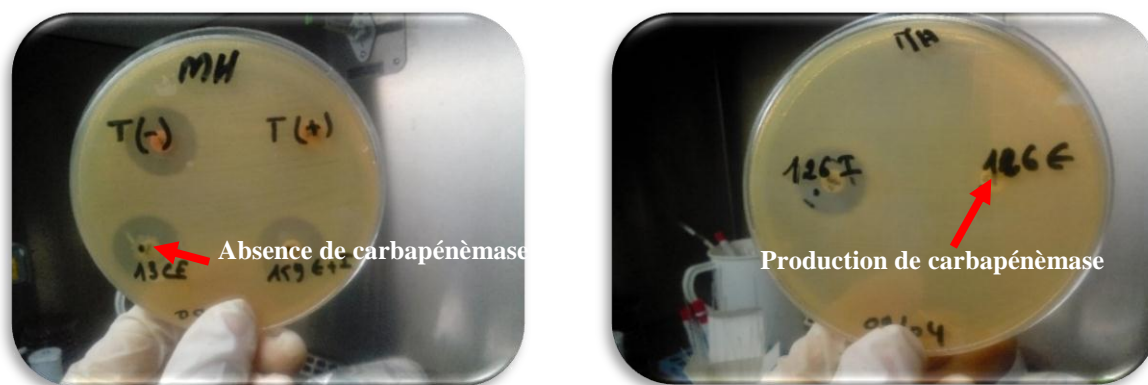


Figure 06: Test mCIM positif pour la souche 126ME avec les témoins positif (T+) et négatif (T-)

❖ Antibiogramme

Toutes les souches résistantes ou intermédiaires au test mCIM ont été testées avec un antibiogramme MH additionnée de Cloxacilline à raison de 250 µg/ml. Les résultats Obtenus sont rapportés dans le **tableau VI**.

III. Bactéries à Gram positif

III.1. Sensibilité des souches d'entérocoques vis-à-vis de la vancomycine

Sur un total de 49 souches isolées sur gélose BEA additionné de vancomycine, 04 souches ont été probablement résistantes à la vancomycine (**Figure 07**). Le résultat est monté dans le tableau suivant :

| Code | Hôpital | service | Date de prélèvement | Types de prélèvement | Diamètre de vancomycine (30µg) (mm) | Espèce |
|-----------------|---------|-----------|---------------------|--|-------------------------------------|------------------------------|
| 161MI | Amizour | Oncologie | 15/03/2018 | Mouche <i>Musca domestica</i> | 06 (R) | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| 199 CI | Amizour | Cuisine | 20/03/2018 | Cafard <i>Periplaneta americana</i> | 06 (R) | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| 152M E | Amizour | Oncologie | 15/03/2018 | Mouche <i>Musca domestica</i> | 12 (R) | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| 214(E+I) | Amizour | Cuisine | 08/05/2018 | Cafard <i>Periplaneta americana</i> | 06 (R) | <i>Enterococcus faecalis</i> |

Tableau VII : résultats de l'antibiogramme pour les ERV.

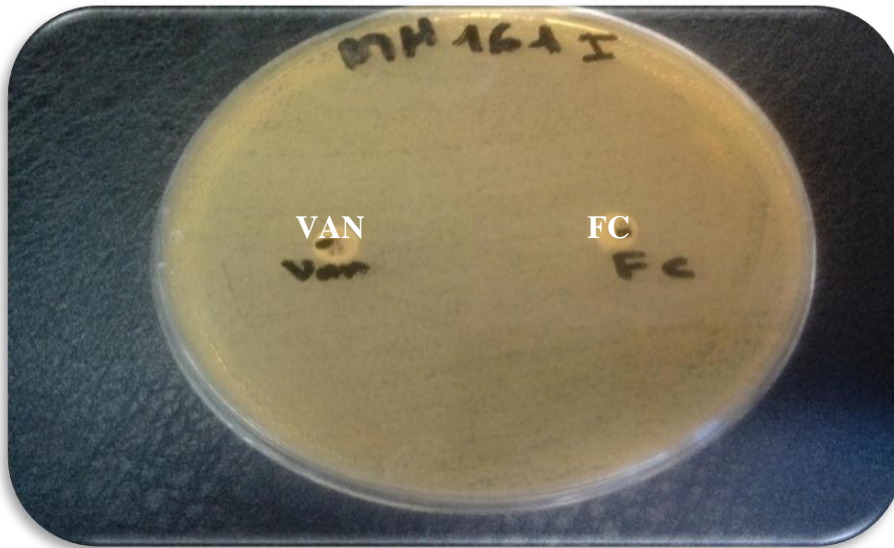


Figure 07 : Antibiogramme d'une souche *Enterococcus faecalis* résistante à la vancomycine.

III.2. Caractérisations phénotypiques des souches d'entérocoques

L'identification des entérocoques a été faite sur la base de l'aspect des colonies sur gélose BEA (**Figure 08**), ainsi que leurs aspects microscopiques après la coloration de Gram (**Figure 09**) et le test de catalase. L'identification est aussi basée sur les tests classiques comprenant la croissance sur bouillon hyper salé (**Figure 10**), la résistance à un traitement thermique de 60°C pendant 30 min et la résistance au tellurite de potassium (**figure 11**).

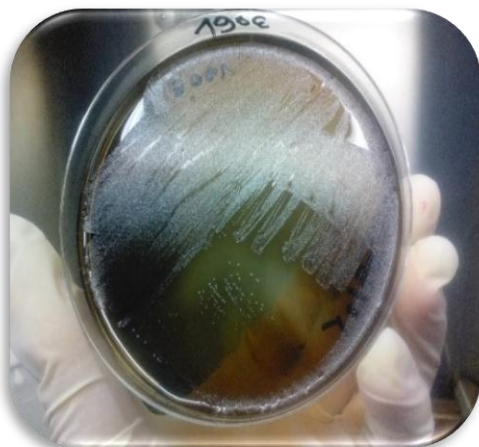


Figure 08: Isolement des entérocoques sur gélose BEA

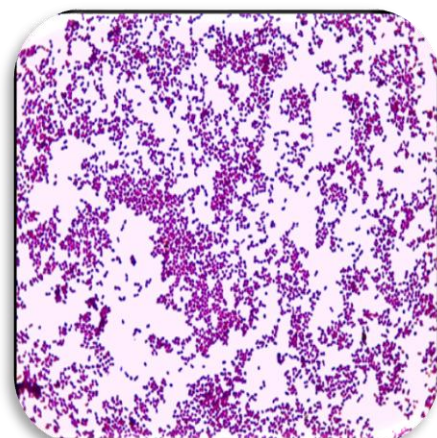


Figure 09 : Aspect microscopique Gx100

- L'aspect microscopique des entérocoques après la coloration de Gram révèle des formes cellulaires en cocci, de couleur violette, disposées en paire (diplocoque) ou en courtes chainettes.



Figure 10 : croissance sur bouillon hyper salé



Figure 11: croissance sur tellurite de potassium

- ❖ Les résultats de la caractérisation des souches sont rapportés dans le tableau ci- dessous

Tableau VIII: Caractéristiques des souches sélectionnées probablement *Enterococcus*.

| Code | Hôpital | Date du prélèvement | Isolement Sur gélose BEA | Test Catalase | Gram | Croissance sur bouillon hyper salé 6.5%NaCl | Résistance à la chaleur | Test de tellurite de potassium | Espèce | Chrom Agar |
|-----------|---------|---------------------|--------------------------|---------------|------|---|-------------------------|--------------------------------|------------------------------|----------------|
| 161M I | Amizour | 15/03/2018 | + | - | + | Trouble | Trouble | Trouble | <i>Enterococcus faecalis</i> | Bleu turquoise |
| 199 CI | amizour | 20/03/2018 | + | - | + | Trouble | Trouble | Trouble | <i>Enterococcus faecalis</i> | Bleu turquoise |
| 152M E | amizour | 15/03/2018 | + | - | + | Trouble | Trouble | Trouble | <i>Enterococcus faecalis</i> | Bleu turquoise |
| 214 (E+I) | Amizour | 21/05/2018 | + | - | + | Trouble | Trouble | Trouble | <i>Enterococcus faecalis</i> | Bleu turquoise |

Discussions

Et

Conclusion

Discussion et conclusion

L'émergence et la dissémination rapide de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries sont maintenant une préoccupation mondiale. La résistance acquise aux antibiotiques peut facilement être transférée entre les microorganismes dans différents écosystèmes, ceci à son tour, est responsable de propagation épidémique et endémique à grande échelle de bactéries multi résistantes (BMR). Maintenant, il est évident que des microorganismes résistants se trouvent dans les différents compartiments et réservoirs environnementaux en raison d'une mauvaise utilisation et d'une surutilisation d'antibiotiques. On estime que la majorité des infections nosocomiales sur le plan mondial sont provoquées par des bactéries résistantes **(Rashid et al., 2015)**. La prescription inappropriée d'antibiotiques semble être une cause importante de sélection de germes multi résistants dans les services hospitaliers, de ce fait les maladies nosocomiales ont connu une très forte augmentation parmi les maladies émergentes.

Actuellement, y a un nombre important de voies d'expositions qui pourraient entraîner la résistance chez la faune sauvage **(Santos et al., 2013)**. Les insectes peuvent servir de réservoirs et vecteurs de bactéries résistantes aux antibiotiques. En raison de leur mobilité fréquente et la facilite avec laquelle ils prennent la nourriture à partir de différents environnement, ils sont considérés comme des bioindicateurs environnementaux importants et des vecteurs de résistance aux antibiotiques chez les bactéries **(Rashid et al., 2015)**. Parmi ces insectes, les mouches, les cafards et les moustiques qui sont en contact avec des êtres humains. Ils sont porteurs de bactéries pathogènes humaines sur les zones extérieures de leur corps et/ou dans leur tractus-digestif **(Bouamamaa et al., 2010)**. Plusieurs études dans le monde ont rapporté la présence des bactéries productrices de carbapénémases et de BLSE chez ces insectes notamment chez les bacilles à Gram négatif (BGN). L'étude de Bouamamaa et al., 2010 au Maroc réalisée sur des cafards (*Periplaneta americana*) et des mouches (*Musca domestica*) a montré l'isolement de 184/251 bactéries à Gram négatifs et 29/251 des Entérocoques. En Allemagne, chez des insectes collectés à partir des régions urbaines et rurales **(Schaumburg et al., 2016)** et en Malaisie, 2005, Pai et al, ont montré l'isolement d'une *Klebsiella pneumoniae* productrice d'une BLSE. La production de BLSE de type TEM et SHV chez 47 souches de *K. pneumoniae* a été rapportée par **Doosti et ses collaborateurs en 2015**, dans leur étude effectuée sur 250 échantillons de cafards prélevés dans divers hôpitaux iraniens.

En Algérie, l'étude réalisée par Loucif et ces collaborateurs en 2016 a détecté des entérobactéries productrices de BLSE de type CTX-M-15 chez une souche *E. cloacae* isolées

chez les cafards (*Blattella germanica*) au niveau du CHU de Batna. Le but de notre étude était de cribler des souches de BGN productrices de BLSE, céphalosporinases plasmidiques et/ou de carbapénèmases et d'entérocoques résistantes à la vancomycine chez les insectes au niveau des hôpitaux de la wilaya de Bejaia. Sur un total de 200 prélèvements d'insectes collectés au niveau des hôpitaux de Bejaia

La propagation des bacilles à Gram négatif producteurs de carbapénèmases chez les insectes en particulier retrouvées dans l'environnement hospitalier est un phénomène émergent. Il y a eu peu de travaux internationaux publiés à ce sujet. En Algérie, seule l'étude de Loucif et ses collaborateurs en 2016 a été publiée sur les cafards allemands, qui ont un rôle important comme réservoir potentiel de bactéries multi résistantes. Dans leur étude, les auteurs décrivent des souches d'entérobactéries productrices de carbapénèmases de type OXA-48.

Les insectes étudiés sont aussi des réservoirs des *Entérocoques* probablement résistantes à la Vancomycine. L'étude réalisée par **Patience et ses collaborateurs** en **2013**, a rapporté une prévalence de 5% d'ERV isolées chez des cafards collectés au niveau de l'hôpital au Ghana. Une étude similaire réalisée par **Macrovei et ses collaborateurs** en **2006** a montré que les mouches domestiques (*Musca domestica*) portent une grande population d'entérocoques résistants à plusieurs antibiotiques tels que la vancomycine et la teicoplanine. **Ahmad et ses collaborateurs** en **2011**, ont comparé les entérocoques isolées des mouches domestiques (restaurants), des cafards allemands et des fèces de porcs provenant de deux élevages porcins commerciaux au Kansas et en Caroline du Nord. La majorité (97%) des mouches étaient positives pour les entérocoques dont *Enterococcus faecalis* était l'espèce la plus abondante (**Macovei et Zurek, 2006**). Les entérocoques résistants aux antibiotiques ont été associés de plus en plus aux infections nosocomiales. Ces bactéries sont dangereuses de part de leur multi résistance naturelle à de nombreuses familles d'antibiotiques aggravée ces dernières années par l'émergence des souches résistantes aux glycopeptides (**Courvalin, 2006**). Le mécanisme de résistance développé par les entérocoques à l'égard des glycopeptides est la modification de la cible de l'antibiotique au niveau du précurseur D-ala-D-ala (**Depardieu et al., 2007**). La résistance acquise à la vancomycine est due à l'expression par la bactérie d'un opéron de résistance (opéron *Van*) qui code des enzymes impliquées à la fois dans la synthèse d'un précurseur du peptidoglycane de faible affinité et dans l'élimination du D-ala-D-ala (**Courvalin, 2006 ; Cattoir et Leclercq, 2010 ; Xu et al., 2010**).

En conclusion, il semblerait que les bactéries multi-résistantes soient largement distribuées dans différents écosystèmes. Bien que les insectes ne soient pas en contact naturel

avec les antibiotiques, ces insectes peuvent être colonisés par des bactéries résistantes et peuvent être considérées comme un réservoir de souches d'entérobactéries multi-résistantes productrices de BLSE, d'EPC et d'*Enterococcus* résistants à la vancomycine.

L'utilisation élevée d'antibiotiques non seulement en médecine humaine, mais aussi en médecine vétérinaire, pourrait constituer une pression sélective pour la propagation des bactéries résistantes aux antibiotiques. Ceci est devenu une menace majeure pour la santé humaine dans le monde. Les insectes peuvent être considérés comme des vecteurs importants à la diffusion généralisée des gènes de résistance aux antibiotiques, en vue de leurs contacts innombrables avec l'homme, et représentent un réservoir considérable des souches résistantes aux antibiotiques. La connaissance des origines de la résistance aux antibiotiques chez les insectes est importante pour la santé humaine en raison de l'importance croissante des maladies infectieuses ainsi que pour la prédiction de l'émergence des pathogènes résistants.

En perspectives, les résultats obtenus restent préliminaires et méritent d'être approfondis et complétés par :

- L'étude d'un grand nombre d'espèces endémiques en Algérie et d'autres régions afin d'avoir une situation plus précise sur la résistance aux antibiotiques chez les insectes.
- L'étude d'un plus grand nombre de souches.
- Confirmer l'identification des souches
- Caractérisation moléculaire des gènes impliqués dans la résistance (PCR et séquençage).

Références bibliographiques

A

Ahmad A, Ghosh A, Schal C, Zurek L. (2011). Insects in confined Swine operations carry a large antibiotic resistant and potentially virulent enterococcal community. BMC Microbiol.11:23.<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-11-23>

Aggoune, N., Chabani A., Tiouit, D., Naim, M., Rahal, K. Premier cas d'*Enterococcus faecalis* résistant à la vancomycine en Algérie. Méd et mal infect ;(2008); **38**, 557-558.

B

BalaeiGajan, E., Shirmohammadi, A., Aghazadeh, M., Alizadeh, M., SighariDeljavan, A., and Ahmadpour, F. (2013). Antibiotic Resistance in *Enterococcus faecalis* Isolated from Hospitalized Patients. J. Dent. Res. Dent. Clin. Dent. Prospects 7, 102–104.

Benelli, G. (2015). Research in mosquito control: current challenges for a brighter future. Parasitology Research 114, 2801–2805.

Bevilacqua, S., Demoré, B., Boschetti, E., Doco-Lecompte, T., May, I., May, T., Rabaud, C., and Thilly, N. (2011). 15 years of antibiotic stewardship policy in the Nancy Teaching Hospital. Médecine et Maladies Infectieuses 41, 532–539.

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

Bush, K. (2004). Antibacterial drug discovery in the 21st century. Clinical Microbiology and Infection 10, 10–17.

Bush, K., and Jacoby, G.A. (2010). Updated Functional Classification of β -Lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 54, 969–976.

C

Cantón, R., Akóva, M., Carmeli, Y., Giske, C.G., Glupczynski, Y., Gniadkowski, M., Livermore, D.M., Miriagou, V., Naas, T., Rossolini, G.M., et al. (2012). Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. Clinical Microbiology and Infection 18, 413–431.

Carle, S. (2009). La résistance aux antibiotiques: un enjeu de santé publique important!

Courvalain, P. et Leclercq, R., B-lactamines et entérocoques. AntibioGramme, (2016) ; Edition ESKA

Coprophagous Insects and the Ecology of Infectious Diseases of Wildlife. *ILAR Journal* 1–7.

Courvalin, P.(2006). Vancomycin-resistance in Gram positive cocci. *Clin Infect* 42(1), S25–34.

Chuard, C., and Reller, L.B. (1998). Bile-Esculin Test for Presumptive Identification of Enterococci and Streptococci: Effects of Bile Concentration, Inoculation Technique, and Incubation Time. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1135–1136.

D

Denis, F., Ploy, M.C., Martin, C., et al. (2007). Bactériologie médicale. Ellipses. 2ème Edition. 573p.

Doosti, A ., Pourabbas, M ., Arshi, A ., Chehelgerdi, M et Kabiri, H. (2015) .Gènes TEM et SHV dans *Klebsiella pneumoniae* isolés des cafards et leur profil de résistance antimicrobienne. *Osong Public Health Res Perspect* ; 6 (1): 3-8.

Depardieu, F., Podglajen, I., Leclercq, R., Collatz, E., Courvalin, P. (2007). Modes and modulations of antibioticresistancegene expression. *Clin Microbiol*20, 79-114.

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

F

Fazli, N.A., and Hanifian, S. (2014). ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ENTEROCOCCUS SPECIES FROM TRADITIONAL DAIRY PRODUCTS IN EAST-AZERBAIJAN, Iran. *Iran. J. Public Health* 43, 120.

G

Gülmez, D., Woodford, N., Palepou, M.-F.I., Mushtaq, S., Metan, G., Yakupogullari, Y., Kocagoz, S., Uzun, O., Hascelik, G., and Livermore, D.M. (2008). Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. *Int. J. Antimicrob. Agents* 31, 523–526.

Graczyk, T.K., Knight, R., Gilman, R.H., and Cranfield, M.R. (2001). The role of non-biting flies in the epidemiology of human infectious diseases. *Microbes Infect.* 3, 231–235.

H

Hammoudi, D., Ayoub Moubareck, C., and Karam Sarkis, D. (2014). How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. *Journal of Microbiological Methods* 107, 106–118.

J

Jechalke, S., Heuer, H., Siemens, J., Amelung, W., and Smalla, K. (2014). Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends in Microbiology* 22, 536–545.

Jarlier, V., Nicolas, M.-H., Fournier, G., and Philippon, A. (1988). Extended Broad-Spectrum β -Lactamases Conferring Transferable Resistance to Newer β -Lactam Agents in Enterobacteriaceae: Hospital Prevalence and Susceptibility Patterns. *Rev. Infect. Dis.* 10, 867–878.

veterinary antibiotics in soil. *Trends in Microbiology* 22, 536–545.

Enterobacteriaceae in Batna University Hospital, Algeria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60, 6377–6380.

L

Lebreton, F., Willems, R.J.L., and Gilmore, M.S. (2014). Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. In *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*, M.S. Gilmore, D.B. Clewell, Y. Ike, and N. Shankar, eds. (Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary), p.

Lemmen S.W., Hafner H., Zolldann D., Stanzel S. and Lutticken R. (2004). Distribution of multi-resistant Gram-negative versus Gram-positive bacteria in the hospital inanimate environment. *Journal of Hospital Infection*. 56,191-197.

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

Loucif, L., Gacemi-Kirane, D., Cherak, Z., Chamlal, N., Grainat, N., and Rolain, J.-M. (2016). First Report of German Cockroaches (*Blattella germanica*) as Reservoirs of CTX-M-15 Extended-Spectrum- β -Lactamase- and OXA-48 Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Batna University Hospital, Algeria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 6377–6380.

M

Macovei L, Zurek L. (2006). Ecology of antibiotic resistance genes: characterization of enterococci from houseflies collected in food set-tings. *Appl . Environ. Microbiol.*72:4028 – 4035.

Mehrad, B., Clark, N.M., Zhanel, G.G., and Lynch, J.P. (2015). Antimicrobial Resistance in Hospital-Acquired Gram-Negative Bacterial Infections. *Chest* 147, 1413–1421.

Meletis, G. (2016). Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Therapeutic Advances in Infectious Disease* 3, 15–21.

Mojica, M.F., Bonomo, R.A., and Fast, W. (2016). B1-Metallo- β -Lactamases: Where Do We Stand? *Curr Drug Targets* 17, 1029–1050.

Monnet, D.L., Hemborg, H.D., Andersen, S.R., Scholler, C., Sorensen, T.L., and Bager, F. (2000). Surveillance of antimicrobial resistance in Denmark. *Euro Surveill.* 5, 129–132.

N

Nordmann, P., Poirel, L., Walsh, T.R., and Livermore, D.M. (2011). The emerging NDM carbapenemases. *Trends in Microbiology* 19, 588–595.

O

Onwugamba, F.C., Fitzgerald, J.R., Rochon, K., Guardabassi, L., Alabi, A., Kühne, S., Grobusch, M.P., and Schaumburg, F. (2018). The role of ‘filth flies’ in the spread of antimicrobial resistance. *Travel Medicine and Infectious Disease* 22, 8–17.

P

Paulsen, I. T., Banerjee, L., Myers, G. S., Nelson, K. E., Seshadri, R. S., Read, T. D. *et al.* Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science*, (2003);299, 2071-2074.

Philippon, A. (2013). Les bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu (BLSE). *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 28, 287–296.

Poirel, L., Pitout, JD et Nordmann, P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiology*, (2007), n°2, p.501-12.

Pierce, V.M., Simner, P.J., Lonsway, D.R., Roe-Carpenter, D.E., Johnson, J.K., Brasso, W.B., Bobenchik, A.M., Lockett, Z.C., Charnot-Katsikas, A., Ferraro, M.J., et al. (2017). The Modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM) for Phenotypic Detection of Carbapenemase Production among Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* JCM.00193-17.

Queenan, AM ., et Bush, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clinical Microbiology Review*, (2007); n°20, p.440-58.

R

Rashid, M., Rakib, M.M., and Hasan, B. (2015). Antimicrobial-resistant and ESBL-producing *Escherichia coli* in different ecological niches in Bangladesh. *Infect. Ecol. Epidemiol.* 5.

S

Santos, T., Silva, N., Igrejas, G., Rodrigues, P., Micael, J., Rodrigues, T., Resendes, R., Gonçalves, A., Marinho, C., Gonçalves, D., et al. (2013). Dissemination of antibiotic resistant

Enterococcus spp. and Escherichia coli from wild birds of Azores Archipelago. *Anaerobe* 24, 25–31.

Schleifer, K.H., and Kilpper-Bälz, R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 34, 31–34.

T

Terzaghi, B.E., and Sandine, W.E. (1975). Improved Medium for Lactic Streptococci and Their Bacteriophages. *Appl. Microbiol.* 29, 807–813.

Toit, M.D., Franz, C.M. a. P., Dicks, L.M.T., and Holzapfel, W.H. (2000). Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. *J. Appl. Microbiol.* 88, 482–494.

Résumé

Objectif : La dissémination mondiale de bactéries multi résistantes (BMR) représente une menace de santé publique majeure dans l'environnement hospitalier. Le but de cette étude était de rechercher des bactéries productrices de BLSE, de carbapénèmases et aussi des ERV dans l'environnement hospitalier isolées chez les insectes au niveau des hôpitaux de Bejaia.

Méthodes : Un total de 200 échantillons a été collecté au niveau des hôpitaux de Bejaia. Après isolement et identification, les phénotypes de résistance aux β -lactamines ont été déterminés par l'utilisation des tests phénotypiques incluant le DD-test, test à la cloxacilline et le test mCIM. La détermination de la sensibilité des souches d'entérocoques vis-à-vis la vancomycine est réalisée par la méthode de diffusion sur gélose MH puis l'identification par une série de tests classique.

Résultats : Sur un total de 13/219 souches résistantes isolées, la production probable des BLSE était déterminée chez 05 souches isolées chez 3 moustiques et 2 mouches. Le test mCIM a montré un résultat positif chez 4 souches isolées chez les mouches, les moustiques et les cafards indiquant ainsi la production probable d'une carbapénémase. 04 souches d'*Enterococcus faecalis*, isolées chez 02 mouches et 02 cafards, sont probablement résistantes vis-à-vis de la vancomycine des entérocoques.

Conclusion : Les insectes peuvent servir de réservoirs et de vecteurs de microorganismes résistants aux antibiotiques y compris les BLSE, les EPC et les ERV.

Mots-clés : Résistance aux antibiotiques, Entérocoques, Bacilles à Gram négatif, Insectes.

Abstract

Objective: The global spread of multidrug-resistant bacteria (MDR) represents a major public health threat in the hospital environment. The aim of this study was to search for ESBL-producing bacteria, carbapenemases and also VRE in the hospital environment isolated from insects at Bejaia hospitals.

Methods: A total of 200 samples were collected at Bejaia hospitals. After isolation and identification, β -lactam resistance phenotypes were determined by phenotypic tests including DD-test, cloxacillin test and mCIM test. The determination of the susceptibility of enterococci strains to vancomycin is carried out by the MH agar diffusion method and then by a series of standard tests.

Results: in total of 13/219 isolated resistant strains, the probable production of BLSE was determined in 5 strains isolated from 3 mosquitoes and 2 flies. The mCIM test showed a positive result in 4 strains isolated from flies, mosquitos and cockroches indicating the probable production of carbapenemase. 4 strains of *enterococcus faecalis*, isolated from 02 flies and 02 cockroches, are probably resistant to vancomycin from *enterococci*.

Conclusion: Insects can serve as reservoirs and vectors of antibiotic-resistant microorganisms including ESBL, EPC and VRE.

Keywords: Antibiotic resistance, Enterococci, Gram-negative bacilli, Insects.