

*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**

**Option : Microbiologie Moléculaire et Médicale**

**Réf : .....**

## Mémoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme

**MASTER**

***Thème***

Etude de la flore résistante aux antibiotiques  
isolée à partir des prélèvements pathologiques  
et de quelques espèces d'arthropodes dans  
différents environnements

Présenté par : ***FEHAM Abdelhamid*** et ***BAIDA Alaa***

***Soutenu le: Jeudi 22 juin 2017 à 9h00***

Devant le jury composé de :

Mr REDJDAL A.

MAA

Président

Mme GHAROUT A.

MCB

Encadreur

Melle YANAT B.

MCB

Examinatrice

**Année universitaire : 2016/2017**

# Remerciements

En rendant grâce au seigneur tous puissant, qui par sa volonté nous a offert cette chance de vivre et l'énergie qui nous a permis de réaliser ce travail.

Merci notre dieu.

Ça nous a fait un grand plaisir de prendre ces quelques lignes, si peu nombreuses pour remercier les personnes qui nous ont soutenu tout au long de ce projet.

D'une façon spéciale, on tient à remercier vivement **Mme GHAROUT** pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de nous encadrer, pour ses orientations précieuses, ses encouragements, le temps qu'elle nous a consacré durant ce travail et de nous avoir permis de mener ce dernier dans de bonnes conditions, son apport et son professionnalisme ont rendu possible la réalisation de ce projet.

Nous remercions les membres de jury **Mr REDJDAL**  
et

**Melle YANAT** pour l'examen de ce document.

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

Nos remerciements sont adressés à tous le personnel du laboratoire de prévention de la Wilaya de Chlef, d'une façon spéciale

**Dr OUECHAN** pour sa participation et sa collaboration  
durant notre stage.

Enfin d'une façon générale Merci à tous ceux qui ont  
contribué de près ou de loin à la réalisation de ce  
travail.

## *Dédicaces*

*A ma très chère mère :*

*Affable, honorable, aimable : Tu représente pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.*

*A mon très cher père :*

*Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consenti pour mon éducation et ma formation.*

*Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.*

*A mes très chers frères :*

*Fayçal et Mohammed.*

*A mes très chères sœurs et d'une façon spéciale:*

*RIHAB.*

*Je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.*

*A mes chers oncles ;*

*D'une façon spéciale mon très cher oncle Nourredine et sa petite famille :*

*Vous avez toujours été présents pour les bons conseils.*

*A tous les membres de ma famille, cousins et cousines; Sans oublier ma petite cousine 'BABITA' et ma grand-mère bien-sure*

*Veillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection.*

*A mes cher(e)s ami(e)s :*

*Youcef, Saad, Omar, Tarek, Billal, Khaled, Achref, Med Achraf, Aziz*

*A mon collaborateur : Alaa.*

*A tous qui me connaissent de près ou de loin.*

*Je dédie ce TRAVAIL...*

*\_\_\_\_\_Abdelhamid.*

# Dédicace

*A l'aide de DIEU, le tout puissant, ce travail est achevé ;*

*Je le dédie à toutes les personnes qui me sont chères ;*

*Au deux être les plus chères au monde qu'ont donné sens à mon  
existence,*

*en m'offrant une éducation digne de confiance et qui m'ont soutenu*

*nuit et jours et durant tout mon parcours.*

*vous mes très chers parents, je vous dis merci.*

*A mes chers frères et mes chères sœurs.*

*A mon binôme, Abdelhamid et à toute sa famille.*

*A mes adorables amis et frères qui n'ont jamais cessé de  
m'encourager.*

*A tous ceux qui ont contribué de près et de loin à la réalisation de ce*

*travail surtout Mme Gharout alima et Mme Rahmani.*

*Alaa...*

# Sommaire

## Liste des abréviations

## Liste de tableaux

## Liste de figures

<b>Introduction</b> .....	1
---------------------------	---

## Matériel et méthodes

I. Echantillonnage .....	7
II. Enrichissement et isolement de la flore bactérienne .....	7
II.1 Bactéries à Gram positif .....	8
II.1.1 Recherche des entérocoques résistants à la vancomycine .....	8
II.2. Bactéries à Gram négatif.....	10
II.2.1. Recherche de bacilles à Gram négatif résistants aux céphalosporines de troisième génération .....	10
II.2.2. Recherche de bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes .....	10
III. Identification.....	10
IV. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques.....	11
IV.1. Détermination de la sensibilité des souches d'entérocoques vis-à-vis de la Vancomycine .....	11
V. Détermination des phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines des bacilles a Gram négatif : .....	13
V.1. Recherche de la production de $\beta$ -lactamases à Spectre Etendu .....	13
V.2. Recherche de la production de carbapénémases .....	14

## Résultats

I. Souches bactériennes.....	16
II. Sensibilité des souches aux antibiotiques .....	16
II.1 Les entérocoques .....	16
II.1.1 Détermination des CMI chez les entérocoques résistants à la vancomycine sur milieu liquide.....	18
II.2. Etude de phénotypes de résistance des souches résistantes aux $\beta$ -lactamines.....	21
II.2.1. Recherche de la production de $\beta$ -lactamases à Spectre Etendu.....	21
II.2.2. Recherche de la production de carbapénémases.....	24
III. Dédution des phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines .....	26

## Discussion et conclusion

## Références bibliographiques

## Annexes

## Liste des Abréviations

---

<b>AMC</b>	Amoxicilline-clavulanate
<b>AmpC</b>	Céphalosporinases
<b>BEA</b>	Bile Esculine Azide de sodium
<b>BGNF</b>	Bacille à Gram Négatif Fermentaire
<b>BGNNF</b>	Bacille à Gram Négatif Non Fermentaire
<b>BLSE</b>	Bêta-Lactamases à Spectre Etendu
<b>BMH</b>	Bouillon Mueller Hinton
<b>C2G</b>	Céphalosporines de deuxième génération
<b>C3G</b>	Céphalosporines de troisième génération
<b>CA-SFM</b>	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
<b>CAZ</b>	Céftazidime
<b>CIM</b>	Carbapenam Inactivation Method
<b>CLOX</b>	Cloxacilline
<b>CFI</b>	Concentration Minimale Inhibitrice
<b>CTX</b>	Céfotaxime
<b>CTX-M</b>	Cefotaximase-Munich
<b>DD-test</b>	Double Disc synergie test
<b>EUCAS</b>	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
<b>FOX</b>	Céfoxitine
<b>IMP</b>	Imipénème
<b>KPC</b>	<i>Klebsiella Pneumoniae</i> Carbapenemase
<b>MβL</b>	Métallo-bêta-lactamases
<b>MER</b>	Méropénème
<b>MH</b>	Mueller Hinton
<b>NDM</b>	New Delhi Metallo-β-lactamases
<b>OXA</b>	Oxacillinase
<b>TSB</b>	Bouillon Trypticase Soja
<b>TSI</b>	Three Sugar Iron
<b>VA</b>	Vancomycine

# Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Aspect des colonies sur milieu Chromagar (CHROMagar™ Orientation) .....	11
<b>Tableau II</b> : Caractéristiques des souches isolées sur gélose BEA .....	17
<b>Tableau III</b> : Résultats du CMI des entérocoques vis-à-vis de la vancomycine .....	19
<b>Tableau IV</b> : Comparaison entre les diamètres (mm) des zones d'inhibition sur gélose mMueller-Hinton et Mueller-Hinton additionné de cloxacilline.....	22
<b>Tableau V</b> : Résultats du test CIM. ....	24
<b>Tableau VI</b> : Résultats de l'antibiogramme standard pour les souches productrices d'une carbapénémase.....	26



# Liste des tableaux

<b>Figure 1</b> : La disposition des disques d'antibiotique dans le DD-test.....	13
<b>Figure 2</b> : test CIM (Van Der Zwaluw et <i>al.</i> , 2015) .....	14
<b>Figure 4</b> : Aspect microscopique des entérocoques.....	16
<b>Figure 3</b> : Aspect des colonies d'entérocoques sur milieu BEA .....	16
<b>Figure 5</b> : Croissance des entérocoques sur bouillon hypersalé .....	17
<b>Figure 6</b> : Croissance en présence de tellurite de potassium pour <i>E. faecalis</i> .....	17
<b>Figure 7</b> : DD-test sans et avec cloxacilline pour la même souche (MP8).....	21
<b>Figure 8</b> : Test CIM positif pour les souches (F4, F5 et F7) avec les témoins positif et négatif. ....	24
<b>Figure 9</b> : Antibiogramme standard pour la souche (CP3) productrice d'une carbapénèmase.....	25

# **Introduction**

## **Introduction**

L'avènement de l'antibiothérapie dans les années 1940, a complètement révolutionné le domaine médical et entraîné une réduction du taux de mortalité associée aux maladies infectieuses. Malheureusement, toute utilisation d'antibiotiques entraîne un potentiel de développement de résistance sur certaines bactéries. Des transferts de gène de résistance des insectes vers l'homme sont possibles en raison de leur habitude de vivre dans des milieux où l'utilisation des antibiotiques est fréquente et leur contact fréquent avec les aliments de l'homme. Ce risque est plus grand quand il y a une surexposition ou des mauvaises pratiques d'utilisation des antibiotiques. La résistance aux antibiotiques est maintenant reconnue comme un problème majeur de santé. La résistance aux céphalosporines de première génération s'est développée dans les années 1970 et aux céphalosporines de troisième génération dans les années 1990. Au cours des dernières années, la fréquence et l'ampleur des infections causées par des bactéries résistantes ont augmenté. On peut maintenant observer de la résistance chez presque toutes les bactéries potentiellement pathogènes, et l'on considère que plus de 50 % des antibiotiques prescrits seraient inappropriés, il n'est donc pas surprenant de constater le développement de résistance (Carle, 2009).

Les insectes sont des petits animaux invertébrés ayant la capacité d'occuper presque tous les créneaux terrestres. On estime que les insectes représentent environ 75% du règne animal. Ils ne sont pas exposés directement aux antibiotiques, mais peuvent acquérir des bactéries résistantes par le contact fréquent avec l'humain, les aliments ou l'industrie alimentaire animale (Zurek et Ghosh, 2014), en raison de leur habitude alimentaire et de dépôts indiscriminés de leur matière fécale. Les insectes sont des agents bien connus pour héberger et transmettre des bactéries de leur surface et leur tractus gastro-intestinal (Dillon et Dillon, 2004).

Ils peuvent acquérir des bactéries résistantes aux antibiotiques de plusieurs manières. Premièrement, par l'environnement animalier, beaucoup d'antibiotiques utilisés comme promoteurs de croissance sont mal absorbés dans le tube digestif de l'animal et sont donc rejetés dans l'environnement par les excréments des animaux qui peuvent entraîner un contact indirect entre les insectes et ces antibiotiques, et donc l'acquisition des bactéries résistantes aux antibiotiques (Thi et *al.*, 2008; Zhu et *al.*, 2013). Deuxièmement, par les environnements urbains, selon Macovei et Zurek, 2006, des entérocoques résistants aux antibiotiques sont trouvés dans les voies digestives des moches recueillies dans des

fast-food en États-Unis. Troisièmement, par l'environnement hospitalier, Fowler et *all.*, en 1993 ont montré dans leur étude le potentiel de transmission et la dissémination de bactéries telles que *Klebsiella*, *Acinetobacter* et Entérocoques dans les hôpitaux par les insectes de type fourmis au Brésil.

Les  $\beta$ -lactamines sont les antibiotiques les plus utilisées dans le traitement des infections causées par les bactéries à Gram négatif. Cependant, ces bactéries peuvent développer plusieurs mécanismes de résistance vis-à-vis de ces molécules tels que les  $\beta$ -lactamases. Parmi elles, les  $\beta$ -lastamases à spectres étendu (BLSE) hydrolysant la majorité des  $\beta$ -lactamines en n'épargnant que les céphamycines et les carbapénèmes. Les souches productrices de BLSE sont souvent multi-résistantes aux antibiotiques, compliquant ainsi le traitement des infections dues à ces bactéries (Paterson et Bonomo, 2005).

Les BLSE sont définies comme des enzymes produites par certaines bactéries qui peuvent hydrolyser les céphalosporines à spectre étendu tel que la ceftazidime, et le céfotaxime, les pénicillines et l'aztréonam mais pas les céphamycines ou les carbapénèmes. Généralement, les BLSE sont inhibées par l'acide clavulanique et le tazobactame. Ces enzymes se retrouvent chez les bactéries à Gram négatif, en particulier chez l'entérobactérie et chez *Pseudomonas aeruginosa*. Les plus importantes  $\beta$ -lactamases qui prévaut sont les TEM (Ghafourian et *al.*, 2015), ainsi que BLSE de type SHV, un BLSE a été rapporté au début des années 2000, les CTX-M qui ont modifié l'épidémiologie de la résistance à l'échelle mondiale, au cours de la dernière décennie, l'enzyme CTX-M est devenue le type de BLSE la plus dominante dans le monde (Hasan et *al.*, 2014).

Les enzymes de type AmpC sont des céphalosporinases de classe C et sont inhibées par la cloxacilline. Leur spectre d'activité inclut les pénicillines, les céphalosporines et les monobactames. Elles peuvent êtres chromosomiques mais également plasmidiques telles que CMY et DHA (Jacoby et Jacoby, 2009).

Les carbapénèmes tels que l'imipénème ou méropénème possèdent un très large spectre antibactérien notamment contre les souches d'entérobactéries productrices de BLSE. Ils sont considérés comme les antibiotiques de choix dans le traitement des infections dues à des bactéries productrices de BLSE (Nordmann et *al.*, 2011).

Les carbapénémases ont été connues depuis l'introduction de l'imipenem dans les années 1980. Au cours des dernières années, il y a eu une augmentation importante des

rapports sur les carbapénémases, notamment les métallo- $\beta$ -lactamases (MBL) et, dans une moindre mesure, les enzymes de classe A (Walsh, 2010). Chez les bacilles à Gram négatif, la résistance enzymatique est liée à la production de carbapénémases regroupées en 3 classes A, B et D (Wolff et Pajot, 2009).

Les carbapénémases, telles que la New Delhi métallo-bêta-lactamase 1 (NDM-1) appartenant à la classe B d'Ambler hydrolyse toutes les  $\beta$ -lactamines y compris les carbapénèmes à l'exception de l'aztréonam. Leur large et rapide diffusion constitue une grande menace pour la santé publique et clinique (Nordmann et *al.*, 2009, Nordmann et *al.*, 2011). Les premières NDM-1 en Algérie ont été identifiées chez des souches d'*A. baumannii* (Boulangier et *al.*, 2012).

Les carbapénémases de type KPC appartiennent à la classe A d'Ambler, elles hydrolysent toutes les  $\beta$ -lactamines, y compris l'aztréonam, sont faiblement inhibées par l'acide clavulanique *in vitro* et sont inhibées par l'acide boronique (Pitout, 2012). Les souches productrices de KPC sont très fréquentes en Amérique latine, en Norvège, Suède et la Belgique (Skutlaberg et *al.*, 2009 ; Bogaerts et Montesinos, 2010).

Les carbapénémases de type OXA-48 appartiennent à la classe D d'Ambler et entraînent relativement une faible baisse de sensibilité aux  $\beta$ -lactamines. Ces enzymes hydrolysent les pénicillines, céphalosporines et les carbapénèmes et ne sont que faiblement actifs contre les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> générations (C3G) et monobactames. Les carbapénémases de type OXA-48 ont été isolées le plus souvent chez *E. coli* et *K. pneumoniae*, et sont endémiques en Turquie, en Inde et en Afrique du Nord (Munoz-price et *al.*, 2013). En Algérie, la première carbapénémase de type OXA-48 produite par une souche d'*E. Coli* a été isolée chez des patients hospitalisés dans un hôpital militaire à Constantine (Agabou et *al.*, 2014), Tafoukt et *al.*, en 2017 ont rapporté des EPC isolées de l'eau de rivière en Algérie, également l'étude de Touati et *al.*, en 2017 rapporté l'isolement du *K. pneumoniae* productrice de carbapénémase de type OXA-48 dans des légumes frais en Algérie.

Les espèces *Acinetobacter sp.* et *Pseudomonas sp.* sont connues par leur résistance intrinsèque aux antibiotiques et par leur capacité à acquérir des gènes codant pour les déterminants de la résistance. Parmi les mécanismes de résistance dans ces deux agents pathogènes est la production de  $\beta$ -lactamases et les enzymes modificateuses d'aminoglycosides.

En outre, une diminution de l'expression des protéines membranaires externes, des mutations dans les topoisomérases et une régulation ascendante de système d'efflux jouent un rôle important dans la résistance aux antibiotiques (Bonomo et Szabo, 2006).

Les entérocoques sont des bactéries cocci à Gram positif aéro-anaérobies facultatif, se classent parmi les germes responsables des maladies nosocomiales dans différents pays.

La résistance à la vancomycine s'est répandue avec une rapidité imprévue et est maintenant rencontrée dans les hôpitaux dans la plupart des pays. Trois types, VanA, VanB et VanD, avec une résistance acquise aux glycopeptides vancomycine et teicoplanine au moyen de la production de précurseurs de peptidoglycannes se terminant par le depsipeptide D-alanyl-D-lactate (D-Ala-D-Lac) au lieu du dipeptide La D-Ala-D-alanine (D-Ala-D-Ala) ont été caractérisés, VanA et VanB sont les phénotypes les plus répandus et ont été trouvés principalement chez *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis*. Le VanD n'a été trouvé que dans quelques souches de *E. faecium* (Depardieu et al., 2009).

La résistance aux antibiotiques chez les insectes représente un domaine de recherche important, notamment à cause des nombreux cas rapportés de dissémination de bactéries multi-résistantes chez des cafards (Loucif et al., 2016), les mouches (Boulesteix et al., 2005), ainsi que des moustiques (Hleba et al., 2016).

Ces problèmes de résistance ont en premier lieu un coût humain, ils peuvent engendrer des échecs thérapeutiques et donc conduire à une augmentation des taux de mortalité et de morbidité. De plus, les résistances les plus courantes sont celles qui touchent les molécules les plus anciennes, or ce sont ces molécules qui sont les plus abordables d'un point de vue financier. Les résistances aux antibiotiques obligent donc à utiliser des molécules plus récentes, et donc plus coûteuses, mais qui ne sont pas toujours accessibles en quantité suffisante dans les pays en voie de développement.

L'Algérie maintenant connue comme une zone affectée par la diffusion des BLSE de type CTX-M-15 et de carbapénémase de type OXA-48. La transmission des bactéries multi-résistance dans l'environnement est habituellement liée au contact manuel et aux instruments mal stérilisés. Cependant, les insectes qui colonisent ces environnements peuvent héberger des bactéries résistantes aux antibiotiques.

Des autres études hors de la résistance aux antibiotiques ont été réalisées sur les insectes tel que l'étude de Morakchi et *al.*, en 2010 au Maroc qui a analysé les effets de divers groupes de pesticides chez *Blattella germanica*.

Plusieurs études dans le monde ont rapporté des souches résistantes aux antibiotiques isolées chez les insectes tel que l'étude de Rahuma et *al.*, 2005 ont rapporté dans leur étude (en Libye) la présence de 6 souches de *Pseudomonas sp* et 3 souches d'*Acinetobacter sp* chez les mouches résistantes aux céphalosporines, des souches de *Pseudomonas sp* et d'*Acinetobacter sp* productrices de carbapénémase ont également été isolées. Minard et *al.*, 2012 ont détecté des souches d'*Acinetobacter sp* isolées des moustiques en Madagascar. Très récemment, la présence de bactéries productrices de carbapénémase ont été isolées chez des cafards allemands (*Blattella germanica*) en Algérie par Loucif et *al.*, en 2016.

Ces études nous ont guidés à réaliser ce travail pour isoler et déterminer les phénotypes de résistance des bactéries chez des prélèvements pathologiques, des insectes et des myriapodes.

L'objectif principal de ce travail était d'étudier la flore bactérienne résistante aux antibiotiques chez différents insectes. Pour cela nous avons adopté la démarche expérimentale suivante :

- Isolement et identification des souches hébergées par les insectes.
- Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques (antibiogramme et CMI) et caractérisation phénotypique des mécanismes de résistance (DD-test, test CIM, test à la vancomycine, ...etc.),

# **Matériel et méthodes**



## **I. Echantillonnage**

Des prélèvements pathologiques (hôpitaux 'chlef'), des insectes et des myriapoda ont été collectés au niveau des différents environnements (hôpitaux, jardins, restaurants ...) des trois Wilayas (Chlef, Biskra et Bejaia) et acheminés au laboratoire de la microbiologie de l'université de Bejaïa pour être analysés.

## **II. Enrichissement et isolement de la flore bactérienne**

Les prélèvements ont été enrichis dans le bouillon Trypticase de Soja (TSB) (Loucif et *al.*, 2016).

- **Chez les cafards**

Chez les cafards, la flore externe et interne ont été étudiées séparément, le protocole utilisé est le suivant :

- A-** Immobilisation de l'échantillon (cafard) par congélation à 0°C pendant 10 minutes.
- B-** Imbiber chaque cafard dans 5ml de solution de Tween 80 (0,05%).
- C-** Vortexer vigoureusement pendant 2 minutes. La suspension obtenue est utilisée en tant qu'échantillon du corps externe.
- D-** Pour éliminer la contamination du corps externe : immerger le cafard dans de l'eau de javel pendant 2 minutes, dans du sérum physiologique stérile pendant 2 min, puis dans de l'éthanol à 70% pendant 5 min, et enfin lavage de chaque échantillon dans de l'eau physiologique stérile.
- E-** Tremper le cafard dans un récipient stérile contenant 5 ml de solution de Tween 80 à 0,05%.
- F-** Broyer à l'intérieur à l'aide d'un pilon stérile.
- G-** Vortex rigoureusement pendant 2 minutes. La suspension obtenue est utilisée en tant qu'échantillon du corps interne.
- H-** Chaque échantillon (5ml) est incubé pendant 18h à 24h/37°C dans 5ml du Bouillon Trypticase Soja.

- **Chez les autres insectes**

- A-** Imbiber chaque insecte (moche, fourmis...etc) dans 5ml de TSB.
- B-** Vortexer vigoureusement pendant 2 minutes. La suspension obtenue est utilisée en tant qu'échantillon du corps externe et interne.
- C-** Incubé l'échantillon pendant 18 à 24h dans 5ml de TSB.

- **Les autres prélèvements pathologiques**

Les prélèvements pathologiques suivant (ECBU, Coproculture, Pus) ont été analysés selon les recommandations du référencier en microbiologie clinique (Remic, 2010).

## **II.1 Bactéries à Gram positif**

### **II.1.1 Recherche des entérocoques résistants à la vancomycine**

Un enrichissement a été réalisé en ensemençant 40µl du bouillon TSB dans 160µl du Bouillon Rothe additionné de vancomycine (10µg /ml) et de colistine (10µg/ml). L'incubation a été effectuée 37°C/24h.

#### **1- Isolement**

A partir du bouillon d'enrichissement, un ensemencement de 50µl du bouillon Rothe a été effectué sur la gélose Bile Esculine Azide de sodium (BEA) additionnée de vancomycine (10µg/ml) et de colistine (10µg /ml). Les boîtes ont été incubées à 37°C/ 24h.

#### **2- Lecture**

L'examen macroscopique des colonies isolées sur le milieu BEA montre de petites colonies translucides (de la couleur de milieu) entourées d'un halo noir. L'apparition des colonies sur le milieu BEA indique la résistance de ces bactéries à la bile et à l'azide de sodium. L'apparition de couleur noir est due à l'hydrolyse du polyside complexe (esculine) (Chuard and Reller, 1998).

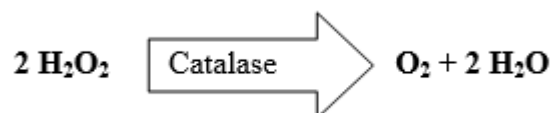
#### **3- Caractérisation phénotypiques des entérocoques**

##### **a- Coloration de Gram**

La coloration de Gram est une coloration différentielle qui permet de différencier entre deux grands groupes bactériens : bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif. L'aspect microscopique des bactéries après la coloration de Gram révèle des formes cellulaires en cocci, disposées en paire (diplocoque) ou en courtes chainettes de couleur violet (Toit et *al.*, 2000).

##### **b- Test de catalase**

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



Sur une lame propre et sèche, quelques colonies prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur, ont été déposées, puis une goutte d'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a été ajoutée. Une réaction positive se traduit par une effervescence (Toit et *al.*, 2000).

**c- Croissance et résistance à la chaleur sur le Bouillon nutritif**

A partir d'une boîte de BEA positive, on a ensemencé à l'aide d'une anse de platine le bouillon nutritif avec quelques colonies. Les tubes ensemencés ont été incubés à 60°C/30min, puis incubés à 37°C/24h. La présence d'un trouble dans le tube indique que la souche pousse et résiste à la chaleur (Freeman et Kearns, 1995).

**d- 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 hypersalé (6,5% de NaCl) contrairement aux streptocoques. Des tubes de Bouillon hypersalé ont été ensemencés puis incubés à 37°C/24h. La présence d'un trouble dans le tube indique un test positif (Devriese et *al.*, 1987)

**e- 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 249ml 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 et *al.*, 2014).

## **II.2. Bactéries à Gram négatif**

### **II.2.1. Recherche de bacilles à Gram négatif résistants aux céphalosporines de troisième génération**

Un enrichissement a été réalisé en ensemençant 40µl du bouillon TSB dans 160µl du TSB additionné de Céfotaxime (4µg/ml) et de vancomycine (32µg /ml). L'incubation a été effectuée à 37°C/24h.

A partir du bouillon d'enrichissement, un ensemencement de 50µl du TSB a été effectué sur la gélose Mac-Conkey additionnée de Céfotaxime (4µg/ml) et de vancomycine (32µg /ml). Les boîtes ont été incubées à 37°C/ 24h.

### **II.2.2. Recherche de bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes**

Un enrichissement a été réalisé en ensemençant 40µl du bouillon TSB dans 160µl du TSB additionné de Meropénème (1µg/ml) et de vancomycine (32µg/ml). L'incubation a été effectuée 37°C/24h.

A partir du bouillon d'enrichissement, un ensemencement de 50µl du bouillon TSB a été effectué sur la gélose Mac-Conkey additionnée de Meropénème (1µg/ml) et de vancomycine (32µg /ml). Les boîtes ont été incubées à 37°C/ 24h.

## **III. Identification**

Après 24 h d'incubation, on analyse l'aspect des colonies ayant poussées sur le milieu de culture. Les cultures polymicrobiennes sont purifiées sur la gélose sélective, puis incubés à 37°C° pendant 24h.

Lorsque la culture est pure, l'identification des souches isolées a été réalisée sur la base de l'aspect des colonies sur milieu Chromagar (CHROMagar™ Orientation) (tableau I) et aussi les caractères biochimiques par la réalisation d'une galerie biochimique classique. Cette dernière comprend plusieurs tests présentés dans le tableau I, Annexe I.

**Tableau I :** Aspect des colonies sur milieu Chromagar (CHROMagar™ Orientation)

<b>Espèce</b>	<b>Couleur de colonies</b>
<i>Escherichia coli</i>	Colonies rose à pourpre
<i>KES-C (Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter)</i>	Colonies bleu vert à bleues avec ou sans auréole violette
<i>Proteus mirabilis, Morganella, Providencia</i>	Colonies pâles à beiges, cernées d'une auréole ambre à marron.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Colonies muqueuses blanches brunâtres
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Colonies muqueuses blanches opaques
<i>Enterococcus Sp.</i>	Petites colonies bleu turquoise

#### **IV. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques**

La sensibilité des souches aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton (MH) selon les recommandations du Comité d'antibiogramme de la société française de microbiologie. Les antibiotiques testés sont donnés dans le tableau II (annexe I). L'interprétation des résultats a été faite selon les recommandations de (CASFM, 2013) et (CA-SFM-EUCAST, 2017) en sensible (S), intermédiaire (I) et résistant (R).

##### **IV.1. Détermination de la sensibilité des souches d'entérocoques vis-à-vis de la Vancomycine**

###### **IV.1.1. Antibiogramme standard**

Ce test permet de détecter la sensibilité des souches des entérocoques à l'égard de la Vancomycine. Un disque de Vancomycine (VA, 5µg) 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 sont considérées comme résistantes à la Vancomycine (CA-SFM-EUCAST, 2017).

#### **IV.1.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des Entérocoques résistants à la Vancomycine**

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la plus faible concentration d'antibiotiques pour laquelle il n'y a pas de croissance visible. La détermination de la CMI a été effectuée par la méthode de microdulution.

##### **– Préparation de la microplaque**

Dans chaque cupule de la microplaque, on a déposé 50 $\mu$ l du bouillon MH (BMH) à l'aide d'une micropipette, dans la deuxième colonne, on y ajoute un volume 50 $\mu$ l de Vancomycine pour une concentration finale de 256 $\mu$ g/ml. La première cupule contient uniquement le BMH et considéré comme un témoin négatif pour le control de l'inoculum.

##### **– Dilutions**

Bien mélangé la solution avec le BMH à l'aide de la micropipette et prélever 50 $\mu$ l de ce mélange et l'ajouter à la cupule adjacente et ainsi de suite jusqu'à la dernière cupule et jeter les 50 $\mu$ l restant (dilution de 256 $\mu$ g/ml à 0,125 $\mu$ g/ml c'est-à-dire de la cupule 2 à la cupule 12).

##### **– Préparation de l'inoculation**

Inoculation de 50 $\mu$ l de la suspension dans chaque cupule à commencer par la colonne 12 jusqu'à la colonne cupule contenant la concentration de Vancomycine la plus élevée (cupule 2) (sans inverse la dilution). La cupule témoin sera inoculée aussi avec 50 $\mu$ l de la suspension. Incubation des microplaques à 37°C/24h.

##### **– Lecture**

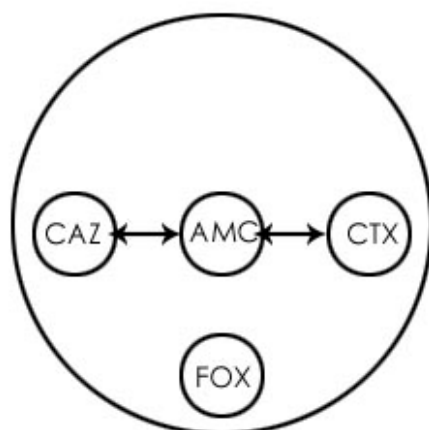
S'il y a croissance dans la cupule témoin (sans antibiotique) (présence de culot). La CMI étant la plus faible concentration où il n'y a plus de croissance.

## V. Détermination des phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines des bacilles à Gram négatif

### V.1. Recherche de la production de $\beta$ -lactamases à Spectre Etendu

#### V.1.1. DD-test (test de synergie)

La détection des souches à Gram négatif productrices de  $\beta$ -lactamases à Spectre Etendu (BLSE) a été réalisée par le test de synergie (DD-test) qui repose sur la mise en évidence d'une image de synergie entre le disque d'AMC (amoxicilline 20 $\mu$ g /acide clavulanique 10 $\mu$ g) et les disques de céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G) (céfotaxime : CTX, céftazidime : CAZ). Les disques de CTX (30  $\mu$ g), CAZ (30  $\mu$ g), céfoxitine (FOX (30  $\mu$ g):C2G), ont été placés sur la même boîte à une distance de 30 mm (centre à centre) d'un disque d'AMC (Figure 1) (Jarlier et *al.*, 1988).



**Figure 1** : La disposition des disques d'antibiotique dans le DD-test

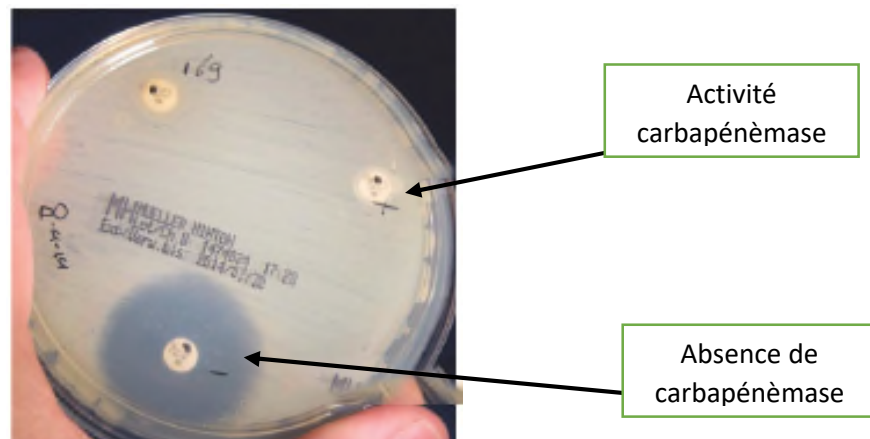
#### V.1.2. Test de synergie sur gélose MH additionnée de cloxacilline

Chez les souches naturellement productrices de céphalosporinases et chez les souches productrices de céphalosporinases plasmidiques, la présence d'une BLSE peut être masquée du fait de l'induction de la céphalosporinase par l'acide clavulanique. Ces souches ont été testées vis-à-vis du céfotaxime, céftazidime et céfoxitine en utilisant la gélose MH additionnée de cloxacilline (250  $\mu$ g/ml). La comparaison des diamètres d'inhibition entre les boîtes avec et sans cloxacilline permet de mettre en évidence la présence d'une BLSE (Drieux et *al.*, 2008).

## V.2. Recherche de la production de carbapénémases

### V.2.1. Test de CIM (Carbapenem inactivation method)

Le test CIM est un test de dépistage phénotypique pour la recherche de la production de carbapénémases. Il consiste à immerger trois disques de méropénème (10 $\mu$ g) ou d'imépénème (10 $\mu$ g) dans trois tubes d'ependorfs contenant 500 $\mu$ l d'eau physiologique stérile, le premier est ensemencé avec une souche productrice de carbapénémase considéré comme un témoin positif (*K. pneumoniae.KPC3*), le deuxième est ensemencé avec une souche sensible à tous les antibiotique (*E.coli ATCC 25922*) considéré comme un témoin négatif et l'autre tube est ensemencé avec la souche à tester. Après incubation à 37°C pendant 2h au minimum, les disques de méropénème ou d'imépénème ont été placés sur une gélose MH préalablement ensemencée avec la souche *Escherichia coli (ATCC 25922)*. L'incubation a été réalisée à 37°C/24h. Un résultat positif se traduit par l'absence d'une zone d'inhibition autour du disque d'antibiotique (Van Der Zwaluw et al., 2015). (Figure 2)



**Figure 2** : test CIM (Van Der Zwaluw et al., 2015)

### V.2.2. Antibiogramme standard

Un antibiogramme standard a été réalisé pour les souches ayant montré un test CIM positif utilisant les disques de Témocilline (TEM, 30 $\mu$ g), Méropénème (MEM, 10  $\mu$ g), Ertapénème (ERT, 10 $\mu$ g) et de Colistine (CST, 50 $\mu$ g).



# Résultats

## I. Souches bactériennes

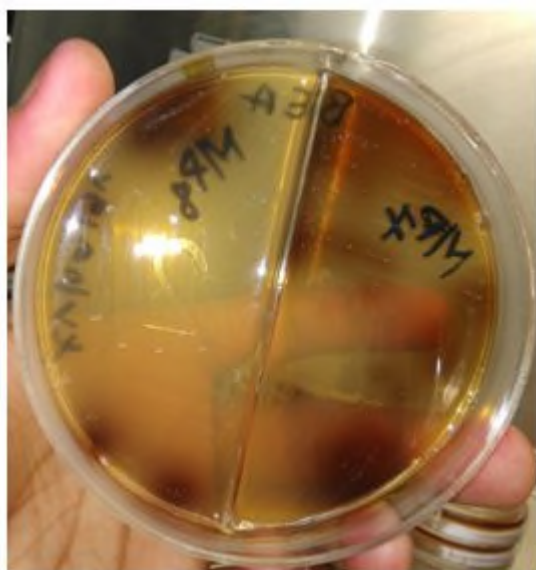
Au cours de cette étude, un total de 89 échantillons ont été prélevés à partir de différents insectes, 31 mouches (*Musca domestica*) ; 10 fourmis (*Lasius niger*) ; 10 *coleoptera sp* ; 10 myriapoda (*Glomerida*) ; 14 cafards (*Periplaneta americana* et Blatte orientale) et 14 prélèvements pathologiques incluant (10 ECBU ; 03 coprocultures ; 01 pus). Les origines et les espèces de ces prélèvements sont présentées au Tableau I (Annexe II).

Un total de 30 souches ont été isolées sur gélose MacConkey additionnée de céftazidime, 17 souches sur gélose MacConkey additionnée de méropénème et 27 souches isolées sur gélose BEA additionnée de vancomycine.

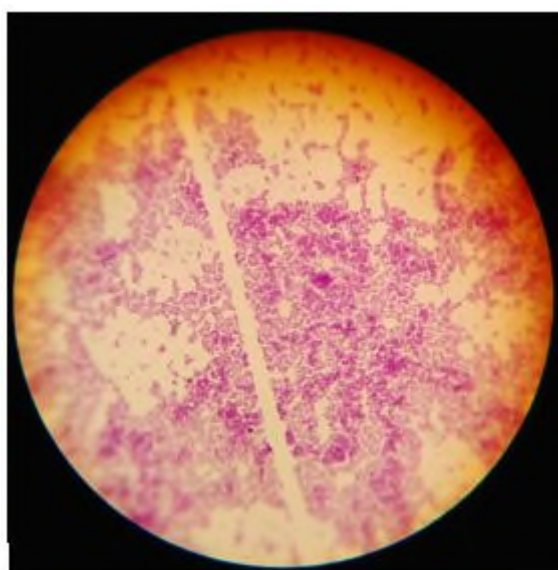
## II. Sensibilité des souches aux antibiotiques

### II.1 Les entérocoques

L'identification des entérocoques a été faite sur la base de l'aspect des colonies sur gélose BEA (Figure 3), ainsi que leurs aspects microscopiques après la coloration de Gram (Figure 4) et le test de catalase. L'identification a été basée encore sur les tests classiques comprenant la croissance sur bouillon hypersalé (Figure 5), la résistance à un traitement thermique de 60°C pendant 30 min et la résistance au tellurite de potassium pour *E. faecalis* (Figure 6). Le tableau II résumé les résultats d'identification.



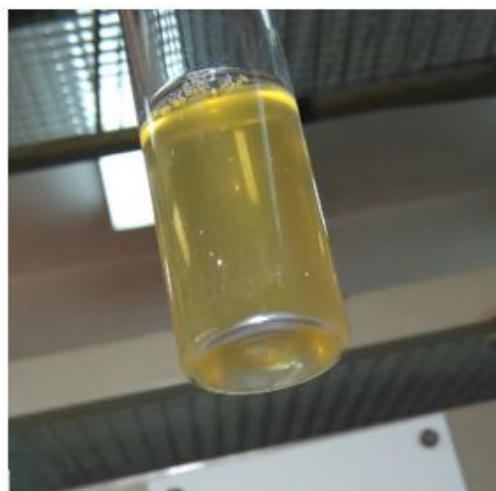
**Figure 3** : Aspect des colonies d'entérocoques sur milieu BEA



**Figure 4** : Aspect microscopique des entérocoques



**Figure 5** : Croissance des entérocoques sur bouillon hypersalé



**Figure 6** : Croissance en présence de tellurite de potassium pour *E. faecalis*

De ce fait, au cours de cette étude, nous avons isolé et identifié 24 souches d'entérocoques sur milieu BEA additionnée à la vancomycine, dont 8 seraient probablement des *E. faecalis*. La provenance des souches isolées sur gélose BEA ont été notées dans le tableau II (annexe I).

**Tableau II** : Caractéristiques des souches isolées sur gélose BEA

Tests Codes	VA (5µg)	Catalase	Test de la chaleur	Tellurite de K	B. Hypersalé	Aspect sur Chromagar
<b>M01</b>	6mm (R)	-	+	-	+	bleu turquoise
<b>M02</b>	6mm (R)	-	+	+	-	bleu turquoise
<b>M03</b>	6mm (R)	-	+	-	-	bleu turquoise
<b>M04</b>	6mm (R)	-	+	-	+	bleu turquoise
<b>M06</b>	6mm (R)	-	+	-	-	bleu turquoise
<b>M07</b>	6mm (R)	-	+	-	-	bleu turquoise
<b>M08</b>	6mm (R)	-	+	-	-	bleu turquoise
<b>M14</b>	6mm (R)	-	NT	+	+	bleu turquoise
<b>M17</b>	6mm (R)	-	NT	+	+	bleu turquoise
<b>M27</b>	6mm (R)	-	NT	+	+	bleu turquoise
<b>FX1</b>	6mm (R)	-	+	-	-	bleu turquoise
<b>FI1</b>	6mm (R)	-	+	-	-	bleu turquoise
<b>FX2</b>	6mm (R)	-	+	-	-	bleu turquoise
<b>FXI4</b>	6mm (R)	-	+	-	-	bleu turquoise
<b>CP6</b>	6mm (R)	-	NT	+	+	bleu turquoise
<b>CP7</b>	6mm (R)	-	NT	+	+	bleu turquoise

<b>CP10</b>	6mm (R)	-	NT	+	+	bleu turquoise
<b>MP2</b>	8mm (R)	-	+	+	-	bleu turquoise
<b>MP5</b>	6mm (R)	-	+	-	+	bleu turquoise
<b>MP6</b>	6mm (R)	-	+	-	+	bleu turquoise
<b>MP7</b>	6mm (R)	-	+	-	-	bleu turquoise
<b>MP8</b>	6mm (R)	-	+	-	+	bleu turquoise
<b>MP9</b>	6mm (R)	-	+	-	+	bleu turquoise
<b>MP10</b>	6mm (R)	-	+	-	-	bleu turquoise

**Légende :** (S) : Sensible ; (R) : Résistante ; (+) : Positif ; (-) : Négatif ; NT : Non testé

### **II.1.1 Détermination des CMI chez les entérocoques résistants à la vancomycine sur milieu liquide**

Les CMI ont été déterminées pour 24 souches vis-à-vis de la vancomycine. Les résultats obtenus sont montrés dans le tableau IV.

Ces souches ont été isolées chez 10 mouches (*Musca domestica*) (08 collectées d'une oasis à Biskra et 02 collectées d'un poulailler à Chlef), 04 cafards (*Periplaneta americana*) collectés à Bejaia, 03 *Coleoptera sp* et 07 Myriapoda (*Glomerida*) collectés d'une oasis à Biskra.

Les résultats obtenus montrent que 13 souches sont probablement résistantes à la vancomycine avec des CMI allant de 32 à >256µg/ml dont 4 souche seraient probablement *E. faecalis*.

Tableau III : Résultats du CMIs des entérocoques vis-à-vis de la vancomycine

Codes	Insecte ( <i>Espèce</i> )	256 µg/ml	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	CMI	Interprétation
M01	Mouche ( <i>Musca domestica</i> )	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	4 µg/ml	S
M02	Mouche ( <i>Musca domestica</i> )	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	> 256 µg/ml	R
M03	Mouche ( <i>Musca domestica</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1 µg/ml	S
M04	Mouche ( <i>Musca domestica</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1 µg/ml	S
M06	Mouche ( <i>Musca domestica</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1 µg/ml	S
M07	Mouche ( <i>Musca domestica</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1 µg/ml	S
M08	Mouche ( <i>Musca domestica</i> )	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	> 256 µg/ml	R
M14	Mouche ( <i>Musca domestica</i> )	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	64µg/ml	R
M17	Mouche ( <i>Musca domestica</i> )	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	64 µg/ml	R
M27	Mouche ( <i>Musca domestica</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1 µg/ml	S
FX1	Cafard( <i>Periplaneta americana</i> )	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	32 µg/ml	R
FI1	Cafard( <i>Periplaneta americana</i> )	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	4 µg/ml	S
FX2	Cafard( <i>Periplaneta americana</i> )	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	>256 µg/ml	R
FX14	Cafard( <i>Periplaneta americana</i> )	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	> 256 µg/ml	R
CP6	<i>Coleoptera sp</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	2 µg/ml	S
CP7	<i>Coleoptera sp</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	2 µg/ml	S

Codes	Insecte ( <i>Espèce</i> )	256 µg/ml	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	CMI	Interprétation
CP10	<i>Coleoptera sp</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	> 256 µg/ml	<b>R</b>
MP2	Myriapoda ( <i>Glomerida</i> )	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	4 µg/ml	S
MP5	Myriapoda ( <i>Glomerida</i> )	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	> 256 µg/ml	<b>R</b>
MP6	Myriapoda ( <i>Glomerida</i> )	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	4 µg/ml	S
MP7	Myriapoda ( <i>Glomerida</i> )	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	128 µg/ml	<b>R</b>
MP8	Myriapoda ( <i>Glomerida</i> )	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	128 µg/ml	<b>R</b>
MP9	Myriapoda ( <i>Glomerida</i> )	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	32 µg/ml	<b>R</b>
MP10	Myriapoda ( <i>Glomerida</i> )	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	32 µg/ml	<b>R</b>

**Légende : S** : Sensible ; **R** : Résistante

## II.2. Etude de phénotypes de résistance des souches résistantes aux $\beta$ -lactamines

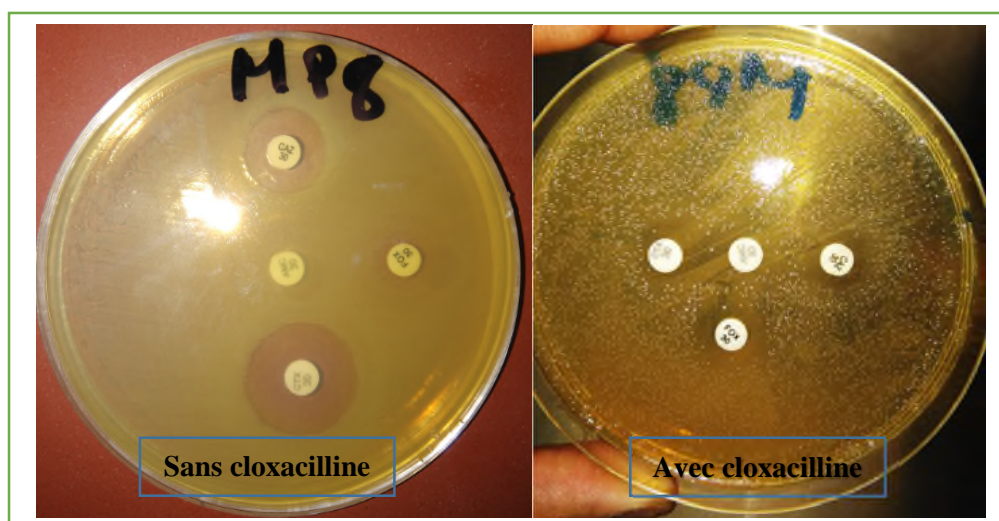
### II.2.1. Recherche de la production de $\beta$ -lactamases à Spectre Etendu

#### II.2.1.1. DD-test

Toutes les souches sont testées pour la production de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu en utilisant la méthode du double disque (DD-test) sur Mueller-Hinton. Les résultats obtenus ont montré l'absence de cette image (figure 7) chez toutes les souches testées.

#### II.2.1.2. DD-test sur gélose Mueller Hinton additionnée de cloxacilline

L'image de synergie peut être masquée par présence de l'activité céphalosporinase (chromosomique ou plasmidique), un DD-test est alors effectué sur gélose MH additionnée de cloxacilline à une concentration de 250 $\mu$ g/ml. Le test était positif pour seulement 1 souche.



**Figure 7** : DD-test sans et avec cloxacilline pour la même souche (Bacille à Gram négatif fermentaire)

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau V ci-dessous.

**Tableau IV** : Comparaison entre les diamètres (mm) des zones d'inhibition sur gélose Mueller-Hinton et Mueller-Hinton additionné de cloxacilline.

Codes	Espèces	Diamètres (mm)	AMC	CTX	CAZ	FOX	Image de synergie	Phénotypes de résistance
M25	<i>Pseudomonas sp</i>	Ø MH	6	6	6	6	NON	Hyperproduction d'AmpC
		Ø MH+Clox	23	21	20	6	NON	
		≠mm	17	15	14	0		
M26	<i>Acinetobacter sp</i>	Ø MH	6	6	6	6	NON	Hyperproduction d'AmpC
		Ø MH+Clox	10	11	10	6	NON	
		≠mm	4	5	4	0		
F01	<i>Acinetobacter sp</i>	Ø MH	6	6	6	6	NON	Hyperproduction d'AmpC
		Ø MH+Clox	25	40	30	25	NON	
		≠mm	19	34	24	19		
F02	<i>Pseudomonas sp</i>	Ø MH	6	6	6	6	NON	Hyperproduction d'AmpC
		Ø MH+Clox	20	35	30	25	NON	
		≠mm	14	29	24	19		
F03	<i>Pseudomonas sp</i>	Ø MH	6	6	6	6	NON	Hyperproduction d'AmpC
		Ø MH+Clox	9	25	17	6	NON	
		≠mm	3	19	11	0		
F04	<i>Pseudomonas sp</i>	Ø MH	6	6	6	6	NON	Hyperproduction d'AmpC
		Ø MH+Clox	6	14	11	24	NON	
		≠mm	0	8	5	18		
F06	<i>Pseudomonas sp</i>	Ø MH	6	6	6	6	NON	Hyperproduction d'AmpC
		Ø MH+Clox	15	30	28	15	NON	
		≠mm	9	24	22	9		
F07	<i>Acinetobacter sp</i>	Ø MH	6	6	6	6	NON	Hyperproduction d'AmpC
		Ø MH+Clox	25	38	30	25	NON	
		≠mm	19	32	24	19		
F08	<i>Pseudomonas sp</i>	Ø MH	6	6	6	6	NON	Hyperproduction d'AmpC
		Ø MH+Clox	15	30	25	25	NON	
		≠mm	9	24	19	19		
F09	<i>Acinetobacter sp</i>	Ø MH	6	6	6	6	NON	Hyperproduction d'AmpC
		Ø MH+Clox	21	30	26	20	NON	
		≠mm	15	24	20	14		
F10	<i>Pseudomonas sp</i>	Ø MH	6	6	6	6	NON	Hyperproduction d'AmpC
		Ø MH+Clox	20	30	24	23	NON	
		≠mm	14	24	18	17		
CP8	<i>Pseudomonas sp</i>	Ø MH	6	6	6	6	NON	Hyperproduction d'AmpC
		Ø MH+Clox	12	10	10	10	NON	
		≠mm	6	4	4	4		
CP10	<i>Acinetobacter sp</i>	Ø MH	6	6	6	6	NON	Hyperproduction d'AmpC
		Ø MH+Clox	8	9	9	10	NON	
		≠mm	2	3	3	4		
MP5	<i>Acinetobacter sp</i>	Ø MH	6	6	6	6	NON	Hyperproduction d'AmpC
		Ø MH+Clox	32	20	20	15	NON	
		≠mm	26	14	14	9		



MP8	BGNF1	Ø MH	6	20	15	8	NON	BLSE
		Ø MH+Clox	10	20	23	6	OUI	
		≠mm	4	0	8	2		
FIX8	<i>Acinetobacter sp</i>	Ø MH	6	6	6	6	NON	Hyperproduction d'AmpC
		Ø MH+Clox	22	35	30	27	NON	
		≠mm	16	29	24	21		
C102	BGNF2	Ø MH	6	20	21	6	NON	ND
		Ø MH+Clox	6	22	16	6	NON	
		≠mm	0	2	5	0		
C103	<i>Pseudomonas sp</i>	Ø MH	6	20	20	6	NON	Hyperproduction d'AmpC
		Ø MH+Clox	6	22	20	6	NON	
		≠mm	0	2	0	0		
U153	<i>Acinetobacter sp</i>	Ø MH	6	9	6	9	NON	Hyperproduction d'AmpC
		Ø MH+Clox	6	13	11	6	NON	
		≠mm	0	6	5	3		
U173	<i>Pseudomonas sp</i>	Ø MH	6	13	9	10	NON	Hyperproduction d'AmpC
		Ø MH+Clox	6	21	15	11	NON	
		≠mm	0	8	6	1		
U198	BGNF3	Ø MH	6	10	10	6	NON	ND
		Ø MH+Clox	6	14	12	26	NON	
		≠mm	0	4	2	20		
U208	<i>Klebsiella sp</i>	Ø MH	6	6	6	10	NON	ND
		Ø MH+Clox	6	10	6	6	NON	
		≠mm	0	4	0	4		

**Légende :** **MH** : Mueller Hinton ; **Ø** : Diamètre sur gélose Mueller-Hinton et sur Mueller-Hinton additionnée de la cloxacilline ; **BGNF** : Bacilles à Gram négatif fermentaire. **ND** : Non Déterminé

Le tableau ci-dessus mentionne les diamètres des zones d'inhibitions autour des disques de CAZ, CTX, FOX et AMC sur la gélose Mueller-Hinton et Mueller-Hinton additionnée de 250g/ml de cloxacilline.

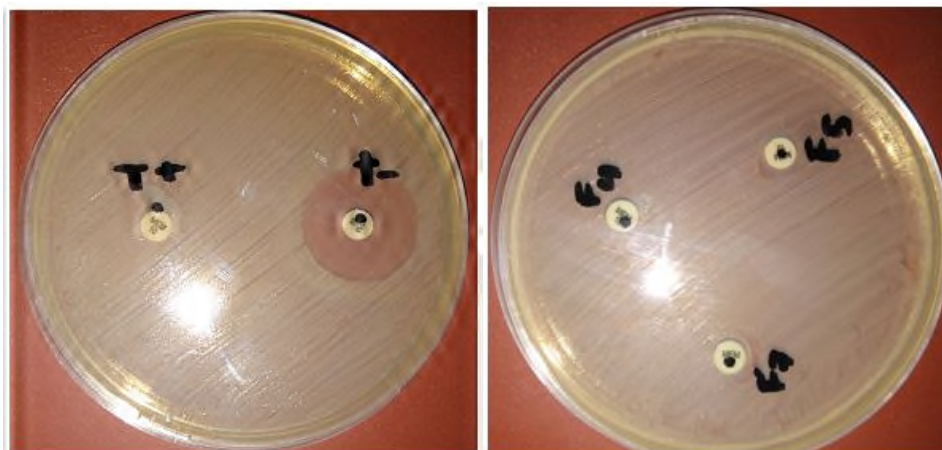
L'augmentation des diamètres des zones d'inhibition autour des disques de céfoxitine et la présence d'une image de synergie indique la production probable d'une BLSE.

Chez certaines souches nous n'avons pas observé de récupération de diamètre de zones d'inhibition de la céfoxitine qui est probablement due à l'hyperproduction de céphalosporinase chez les bactéries non fermentaires nécessitant une concentration de 500µg/ml de cloxacilline.

## II.2.2. Recherche de la production de carbapénèmases

### II.2.2.1. Test de CIM (Carbapenem inactivation method)

Le test de CIM a été positif chez 05 souches résistantes au méropénème, indiquant la production probable d'une carbapénèmase (Figure 8). Les diamètres obtenus sont rapporté dans le tableau VI.



**Figure 8** : Test CIM positif pour les souches (F4, F5 et F7) avec les témoins positif et négatif.

**Tableau V** : Résultats du test CIM.

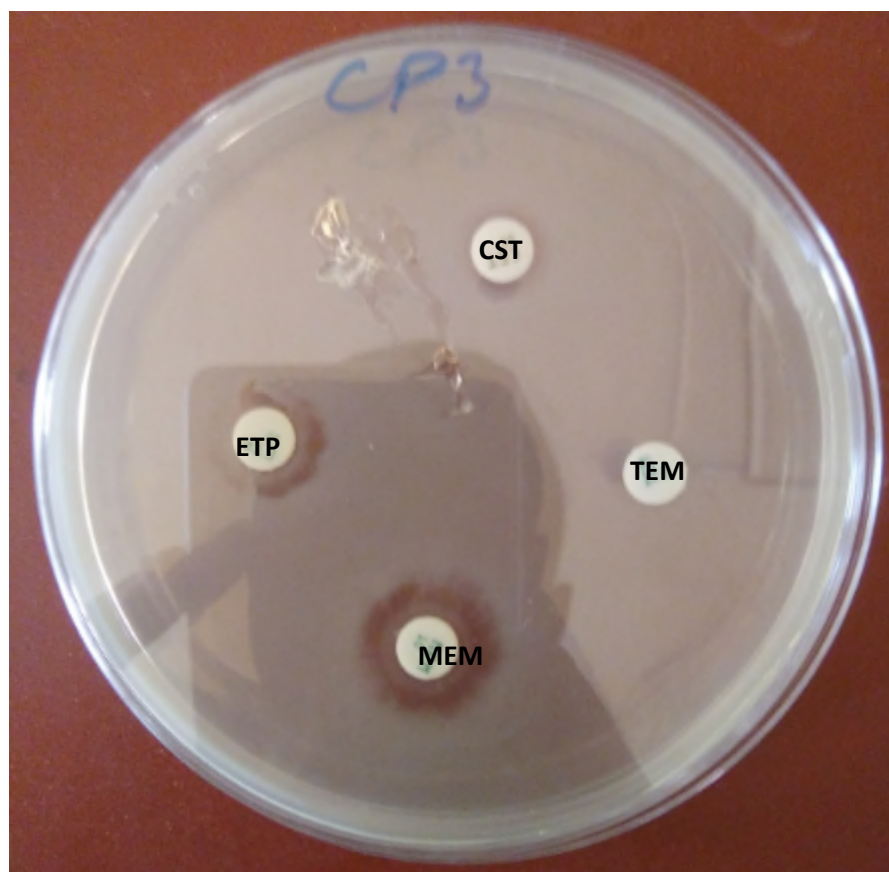
Codes	Espèces	MEM (10µg) (mm)	Test CIM
Témoin (+)	KPC	6 (R)	
Témoin (-)	E.coli ATCC 29522	30 (S)	
M01c	NI	25 (S)	-
M02c	NI	26 (S)	-
M03c	NI	25 (S)	-
M04c	NI	23 (S)	-
M05c	NI	26 (S)	-
M06c	NI	26 (S)	-
M08c	NI	25 (S)	-
M19c	<i>Acinetobacter sp</i>	6 (R)	+
U208c	<i>Klebsiella sp</i>	12 (R)	+
CP3c	<i>Pseudomonas sp</i>	6 (R)	+
F07c	<i>Pseudomonas sp</i>	6 (R)	+
F04c	<i>BGNF</i>	6 (R)	+
CP5c	<i>Acinetobacter sp</i>	18 (I)	-

M13c	<i>Pseudomonas sp</i>	20 (I)	-
MP3c	NI	22 (S)	-
CP4c	NI	23 (S)	-
M28c	NI	25 (S)	-
MP4c	<i>Acinetobacter sp</i>	19 (I)	-
MP5c	<i>BGNF</i>	20 (I)	-

**Légende :** **S** : Sensible ; **R** : Résistante ; **I** : Intermédiaire ; **BGNF** : Bacille à Gram négatif fermentaire ; **NI** : Non identifier.

### II.2.2.2. Antibiogramme standard

Toutes les souches résistantes ou intermédiaires au test CIM ont été testées avec un antibiogramme standard (figure 9). Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau VII.



**Figure 9 :** Antibiogramme standard pour la souche (CP3) productrice d'une carbapénèmase.

**Tableau VI** : Résultats de l'antibiogramme standard pour les souches productrices d'une carbapénémase.

ATB CODES	Espèce	MEM (10µg) (mm)	ETP (10µg) (mm)	TEM (30µg) (mm)	CST (50µg) (mm)
M13c	<i>Pseudomonas sp</i>	16 (I)	06 (R)	06 (R)	14 (R)
M19c	<i>Acinetobacter sp</i>	08 (R)	29 (S)	06 (R)	12 (R)
MP4c	<i>Acinetobacter sp</i>	20 (I)	16 (R)	06 (R)	11 (R)
MP5c	<i>BGNF</i>	06 (R)	06 (R)	06 (R)	06 (R)
F4c	<i>BGNF</i>	06 (R)	06 (R)	06 (R)	12 (R)
F7c	<i>Pseudomonas sp</i>	13 (R)	06 (R)	09 (R)	10 (R)
CP3c	<i>Pseudomonas sp</i>	12 (R)	06 (R)	06 (R)	10 (R)
CP5c	<i>Acinetobacter sp</i>	13 (R)	08 (R)	06 (R)	11 (R)
U208c	<i>Klebsiella sp</i>	12 (R)	15 (R)	6 (R)	18 (S)

### III. Déduction des phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines

Le tableau VIII résume les phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines des souches étudiées.

Elle repose sur l'analyse du phénotype de résistance, des tests de détection des BLSE, céphalosporinases et des carbapénèmases et le comportement de ces enzymes qui diffèrent vis-à-vis des antibiotiques. La mise en évidence des BLSE est effectuée par le test de synergie (DD-test), le test à la cloxacilline et les carbapénèmases par le test de CIM et l'antibiogramme standard.

Les différents phénotypes de résistance sont décrits dans le tableau III (annexe II)

# **Discussion et conclusion**

Les mouches et les cafards sont deux insectes en contact étroit avec des êtres humains. Ils sont porteurs de bactéries pathogènes humaines sur les zones extérieures de leur corps ou dans leur tractus-digestif (Bouamama et al., 2010). Des études ont montré que les cafards peuvent héberger des bactéries productrices de BLSE et/ou carbapénémase. En Algérie, l'étude réalisée par Loucif et al., en 2016 a signalé des entérobactéries productrices de BLSE de type CTX-M-15 isolées chez les cafards (*Blattella germanica*) au niveau du CHU de Batna. Au cours de notre étude, 1 souche est probablement productrice de BLSE isolée chez myriapoda.

L'étude de Bouamama et al., en 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. Au Malysie, en 2005, Pai et al., ont montré l'isolement d'une *Klebsiella pneumoniae* productrice d'une BLSE.

Pour la résistance à la céfoxitine par production d'AmpC, trois mécanismes peuvent être évoqués chez les souches de *Pseudomonas sp.* et d'*Acinetobacter sp.* : imperméabilité membranaire, système d'efflux ou par l'hyperexpression de la céphalosporinase naturelle (Bonomo et Szabo, 2006).

Dans ce travail, on a étudié les flores bactériennes de plusieurs insectes : mouches (*Musca domestica*), fourmis noires (*Lasius niger*), cafards (Blatte orientale et *Periplaneta americana*), myriapoda et *Coleoptera sp* collectés respectivement dans des différents environnements.

Les souches de *Pseudomonas sp* isolées durant cette étude ont montré une résistance aux  $\beta$ -lastamines (céphalosporines et carbapénèmes). Le principal mécanisme par lequel *Pseudomonas* acquiert une résistance aux carbapénèmes est la réduction de la perméabilité par la perte de la porine OprD, voie préférentielle de pénétration des carbapénèmes (Livermore, 2002). Bien que le mécanisme de résistance aux carbapénèmes le plus répandu chez *Acinetobacter sp* corresponde à la production d'une AmpC associé à une acquisition d'une carbapénémase ou à la surexpression de l'oxacillinase naturelle (OXA-51).

La résistance aux antibiotiques chez les isolats des insectes étant acquise à partir des aliments qu'ils consomment d'après l'expérience de Zurek and Ghosh, 2014 et de l'environnement (Macovei et Zurek, 2006).

Durant cette étude nous avons isolées 5 souches probablement productrices de carbapénémase dont 2 *Pseudomonas sp* isolées chez des fourmis (*Lasius niger*) et *coleoptera sp*, 1 *Acinetobacter sp* isolée chez une mouche (*Musca domestica*), 1 bactérie à Gram négatif fermentaire isolée chez une fourmi et 1 *Klebsiella sp* isolée à partir un prélèvement pathologique (ECBU).

Plusieurs études dans le monde ont rapporté la présence des bactéries productrices de carbapénémases notamment chez les bacille à Gram négatif chez les animaux et dans l'environnement (Fischer et al., 2012, 2013; Guerra, 2013; Wang et al., 2012; Woodford et al., 2014; Zhang et al., 2013 ; Yousfi et al., 2016). Les insectes sont aussi considérés comme un réservoir, une seule étude a signalé l'isolement des souches productrices de carbapénémase chez les insectes en Algérie. Loucif et al., en 2016 ont rapporté la production de carbapénémase de type OXA-48 chez une souche *E. cloacae* isolée chez des cafards dans le CHU de Batna.

La production des MBLs est un mécanisme important de résistance aux carbapénèmes chez *Pseudomonas sp*. Chez *Acinetobacter sp*. le mécanisme enzymatique le plus fréquent est la production d'enzyme oxacillinases (OXA-23, OXA-24) (Noyal et al., 2009; Zenati et al., 2016). Les bactéries à Gram négatif non fermentaires sont considérées comme des pathogènes opportunistes, émergents et multirésistants. Le plus souvent, ils sont responsables d'infections nosocomiales difficiles à contrôler et à traiter, en particulier dans les unités des soins intensifs (Peleg et al., 2008).

Les insectes étudiés sont aussi réservoirs des *Entérocoques* probablement résistantes à la vancomycine, 13 ERV a été isolées chez 4 mouches collectés dans une oasis à Biskra et d'un poulailler à Chlef, 3 cafards (*Periplaneta americana*) collectés à Bejaia, 1 *coleoptera sp* et 5 myriapoda (*Glomerida*) collectés de la même oasis à Biskra.

Plusieurs études rapportent la fréquence d'isolement des Entérocoques résistantes aux antibiotiques chez les mouches par Macovei et Zurek en 2006 au États-Unis, également chez les fourmis montré par Fowler, et al., en 1993 au Brésil.

Les entérocoques sont naturellement résistants à de nombreuses classes d'antibiotiques dont les  $\beta$ -lactamines et les aminosides. Les entérocoques peuvent acquérir la résistance aux antibiotiques de façon croisée, soit par l'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques codés par des plasmides ou des transposons provenant d'autres

microorganismes, soit par des mutations spontanées leur donnant ainsi un niveau de résistance plus élevée (Kak et Chow, 2002).

La résistance acquise des entérocoques aux glycopeptides est médiée par divers mécanismes. En Europe, *vanA* et *vanB* sont des gènes les plus répandus chez les ERVs (aussi le gène *vacC* comme une propriété intrinsèque chez quelques espèces des ERVs).

Les réservoirs de gènes de résistance à la vancomycine sont en majorités composés de l'espèce *E. faecium* et causent des infections nosocomiales.

La résistance à la vancomycine chez *E. faecalis* est rare. Aucun isolat d'*E. faecalis* ayant une résistance à la vancomycine n'a été observé chez les mouches dans l'étude réalisée par Macovei et Zurek en 2006 aux Etats-Unis. Ahmad et al., 2011 ont rapporté l'absence des souches d'ERV chez les mouches et les cafards dans leur étude.

Au cours de notre étude, nous avons isolées 13 souches d'entérocoques chez les insectes étudiés, ayant des CMI allant de 32µg/ml à >256µg/ml dont 4 souches seraient probablement *E. faecalis*.

L'utilisation élevée d'antibiotiques non seulement en médecine humaine, mais aussi en médecine vétérinaire ou même dans l'agriculture, 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 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 des insectes afin d'avoir une situation plus précise sur la résistance aux antibiotiques chez les insectes en Algérie.
- ✓ Confirmer l'identification des souches ;
- ✓ Caractérisation moléculaire des gènes impliqués dans la résistance.



# **Références bibliographiques**

1. **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 hospitalised at a military hospital in Algeria. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **33**, 1641.
2. **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 microbiology*, **11**, 23.
3. **Binh, C. T. T., Heuer, H., Kaupenjohann, M., & Smalla, K. (2008).** Piggery manure used for soil fertilization is a reservoir for transferable antibiotic resistance plasmids. *FEMS microbiology ecology*, **66**, 25-37.
4. **Bogaerts, P., Montesinos, I., Rodriguez-Villalobos, H., Blairon, L., Deplano, A., & Glupczynski, Y. (2009).** Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing KPC-2 carbapenemase in Belgium. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, **65**, 361-362.
5. **Bonomo, R. A., & Szabo, D. (2006).** Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases*, **43** (Supplement\_2), S49-S56.
6. **Bouamama, L., Sorlozano, A., & Laglaoui, A. L. 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.
7. **Boulanger, A., Naas, T., Fortineau, N., Figueiredo, S., & Nordmann, P. (2012).** NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* from Algeria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **56**, 2214-2215.
8. **Boulesteix, G., Le Dantec, P., Chevalier, B., Dieng, M., Niang, B., & Diatta, B. (2005, April).** Role of *Musca domestica* in the transmission of multiresistant bacteria in the centres of intensive care setting in sub-Saharan Africa. In *Annales francaises d'anesthesie et de reanimation* (Vol. 24, No. 4, pp. 361-365).
9. **Carle, S. (2009).** La résistance aux antibiotiques: un enjeu de santé publique important!. *Pharmactuel*, **42**.
10. **Chuard, C., & Reller, L. B. (1998).** Bile-esculin test for presumptive identification of *enterococci* and *streptococci*: effects of bile concentration, inoculation technique,

- and incubation time. *Journal of clinical microbiology*, **36**, 1135-1136.
11. **Depardieu, F., Foucault, M. L., Bell, J., Dubouix, A., Guibert, M., Lavigne, J. P., ... & Courvalin, P. (2009)**. New combinations of mutations in VanD-Type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, and *Enterococcus avium* strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **53**, 1952-1963.
  12. **Devriese, L. A., Van de Kerckhove, A., Kilpper-Bälz, R., & Schleifer, K. H. (1987)**. Characterization and identification of *Enterococcus* species isolated from the intestines of animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **37**, 257-259.
  13. **Dillon, R. J., & Dillon, V. M. (2004)**. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annual Reviews in Entomology*, **49**, 71-92.
  14. **Drieux, L., Brossier, F., Sougakoff, W., & Jarlier, V. (2008)**. Phenotypic detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. *Clinical Microbiology and Infection*, **14**, 90-103.
  15. **Fazli, N. A., & Hanifian, S. (2014)**. Isolation and identification of *enterococcus* species from traditional dairy products in east-azerbaijan, Iran. *Iranian Journal of Public Health*, **43**, 120.
  16. **Fowler, H. G., Bueno, O. C., Sadatsune, T., & Montelli, A. C. (1993)**. Ants as potential vectors of pathogens in hospitals in the state of São Paulo, Brazil. *International Journal of Tropical Insect Science*, **14**, 367-370.
  17. **Kearns, A. M., Freeman, R., & Lightfoot, N. F. (1995)**. Nosocomial enterococci: resistance to heat and sodium hypochlorite. *Journal of Hospital Infection*, **30**, 193-199.
  18. **Ghafourian, Soheili, S., , S., Sekawi, Z., Neela, V. K., Sadeghifard, N., Taherikalani, M., ... & Hamat, R. A. (2015)**. The mazEF toxin–antitoxin system as an attractive target in clinical isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Drug design, development and therapy*, **9**, 2553.
  19. **Hasan, B., Islam, K., Ahsan, M., Hossain, Z., Rashid, M., Talukder, B., ... & Kashem, M. A. (2014)**. Fecal carriage of multi-drug resistant and extended spectrum  $\beta$ -lactamases producing *E. coli* in household pigeons, Bangladesh. *Veterinary microbiology*, **168**, 221-224.

20. Hleba, L., Kmet', V., Tóth, T., & Kačániová, M. (2017). Resistance in bacteria and indirect beta-lactamase detection in *E. coli* isolated from *Culex pipiens* detected by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, **52**, 64-69.
21. Jacoby, G. A. (2009). AmpC  $\beta$ -lactamases. *Clinical microbiology reviews*, **22**, 161-182.
22. Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G., & Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Clinical Infectious Diseases*, **10**, 867-878.
23. Livermore, D. M. (2002). Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare?. *Clinical infectious diseases*, **34**, 634-640.
24. Loucif, L., Gacemi-Kirane, D., Cherak, Z., Chamlal, N., Grainat, N., & Rolain, J. M. (2016). First report of German cockroaches (*Blattella germanica*) as reservoirs of CTX-M-15 extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-and OXA-48 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Batna University Hospital, Algeria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **60**, 6377-6380.
25. Macovei, L., & Zurek, L. (2006). Ecology of antibiotic resistance genes: characterization of *enterococci* from *houseflies* collected in food settings. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 4028-4035.
26. Morakchi, S., Aribi, N., Farine, J. P., & Soltani, N. (2010). Analyse des hydrocarbures cuticulaires chez *Blattella germanica*: Effets de divers groupes de pesticides. *Travaux de l'Institut Scientifique, Série Zoologie, Rabat*, (47), 141-145.
27. Munoz-Price, L. S., Poirel, L., Bonomo, R. A., Schwaber, M. J., Daikos, G. L., Cormican, M., ... & Kumarasamy, K. (2013). Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *The Lancet infectious diseases*, **13**, 785-796.
28. Nordmann, P., Naas, T., & Poirel, L. (2011). Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging infectious diseases*, **17**, 1791.
29. Nordmann, P., Cuzon, G., & Naas, T. (2009). The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet infectious diseases*, **9**, 228-236.

30. Noyal, M. J. C., Menezes, G. A., Harish, B. N., Sujatha, S., & Parija, S. C. (2009). Simple screening tests for detection of carbapenemases in clinical isolates of nonfermentative Gram-negative bacteria.
31. Pai, H. H., Chen, W. C., & Peng, C. F. (2005). Isolation of bacteria with antibiotic resistance from household cockroaches (*Periplaneta americana* and *Blattella germanica*). *Acta tropica*, **93**, 259-265.
32. Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews*, **18**, 657-686.
33. Peleg, A. Y., Seifert, H., & Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical microbiology reviews*, **21**, 538-582.
34. Samuelsen, Ø., Naseer, U., Tofteland, S., Skutlaberg, D. H., Onken, A., Hjetland, R., ... & Giske, C. G. (2009). Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **63**, 654-658.
35. Tafoukt, R., Touati, A., Leangapichart, T., Bakour, S., & Rolain, J. M. (2017). Characterization of OXA-48-like-producing *Enterobacteriaceae* isolated from river water in Algeria. *Water Research*, **120**, 185-189.
36. Toit, M. D., Franz, C. M. A. P., Dicks, L. M. T., & Holzappel, W. H. (2000). Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. *Journal of Applied Microbiology*, **88**, 482-494.
37. Touati, A., Mairi, A., Baloul, Y., Lalaoui, R., Bakour, S., Thighilt, L., ... & Rolain, J. M. (2017). First detection of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 in fresh vegetables from Béjaïa city, Algeria. *Journal of global antimicrobial resistance*, **9**, 17.
38. Walsh, T. R. (2010). Emerging carbapenemases: a global perspective. *International journal of antimicrobial agents*, **36**, S8-S14.
39. Wolff, M., Joly-Guillou, M. L., & Pajot, O. (2009). Les carbapénèmes. *Réanimation*, **18**, S199-S208.
40. Zhu, Y. G., Johnson, T. A., Su, J. Q., Qiao, M., Guo, G. X., Stedtfeld, R. D., ... & Tiedje, J. M. (2013). Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**, 3435-3440.

41. **Zurek, L., & Ghosh, A. (2014).** Insects represent a link between food animal farms and the urban environment for antibiotic resistance traits. *Applied and environmental microbiology*, **80**, 3562-3567.
42. **van der Zwaluw, K., de Haan, A., Pluister, G. N., Bootsma, H. J., de Neeling, A. J., & Schouls, L. M. (2015).** The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS One*, **10**, e0123690.
43. **Zenati, K., Touati, A., Bakour, S., Sahli, F., & Rolain, J. M. (2016).** Characterization of NDM-1-and OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates from inanimate surfaces in a hospital environment in Algeria. *Journal of Hospital Infection*, **92**, 19-26.

## ANNEXES I

**Tableau I :** Galerie biochimique d'identification des souches.

Milieux	Mode d'ensemencement	Caractères recherché	Résultats
<b>Bouillon nitraté</b>	Ensemencement du milieu avec une suspension bactérienne, et l'incubation est réalisée à 37°C/24h.	Réduction des Nitrates en Nitrites.	<b>Nitrate réductase (+) :</b> virage au rouge du milieu après l'ajout des deux réactifs NR I et NR II. <b>Nitrate réductase (-) :</b> Virage au jaune du milieu.
<b>TSI</b>	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/24h.	-Lactose. -Glucose. -saccharose. -production de gaz. -Production d'H <sub>2</sub> S.	<b>Lactose (+) :</b> virage de la pente au jaune. <b>Saccharose (+) :</b> Virage au jaune au milieu de tube. <b>Glucose (+) :</b> virage de culot au jaune. <b>Gaz (+) :</b> apparition des bulles ou des poches gazeuses qui décalent la gélose du fond de tube. Production d'H <sub>2</sub> S : Noircissement du milieu.
<b>Urée-Indole</b>	On ensemence le milieu avec une suspension bactérienne, l'incubation est effectuée à 37°C/24h.	-Uréase. -Indole. -Tryptophane désaminase	<b>Uréase (+) :</b> Virage du milieu au rouge/ rose. <b>Indole (+) :</b> Apparition d'un anneau rouge en surface après l'ajout de quelques gouttes de réactif de Kovacs. <b>TDA (+) :</b> apparition d'un précipité brun
<b>Clark et Lubs</b>	Ensemencement du milieu par l'ajout de quelque goutte de la suspension bactérienne, l'incubation est réalisée 37°C/24h.	Type fermentaire.	<b>Test VP (+) :</b> virage au rouge cerise après l'ajout des réactifs VP I et VP II. <b>Test RM (+) :</b> Coloration rouge après l'ajout de réactif RM.
<b>Citrate de Simmons</b>	Ensemencement de la pente de la gélose par des stries longitudinales et incuber à 37°C/ 24h.	Utilisation du citrate comme seule source de Carbone.	<b>Citrate (+) :</b> virage de milieu au bleu et une culture sur la pente.

**Tableau II : Antibiotiques testés.**

Antibiotiques	Abréviation	Charge du disque (µg)	Famille	Diamètre critère EUCAST 2017 et 2013	
				S≥	R<
<b>Amoxicilline+ acide clavulanate</b>	AMC	20+10	β-lactamine	19	19
<b>Céftazidime</b>	CAZ	30		26	21
<b>Céfotaxime</b>	CTX	30		26	23
<b>Céfoxitine</b>	FOX	30		19	15
<b>Ertapénème</b>	ERT				
<b>Meropénème</b>	MEM	10		22	16
<b>Témocilline</b>	TEM	30		20	20
<b>Vancomycine</b>	VA	10		Glycopeptide	
<b>Colistine</b>	CST	50	Polymixine	15	15



## ANNEXE II

**Tableau I :** Répartition des prélèvements par origine en fonction des souches isolées sur les géloses additionnées aux antibiotiques

Types de prélèvements	Origine et nombre des prélèvements		Nombre des souches isolées su les géloses			
			MacConkey+C3G	MacConkey+MEM	BEA+VAN	
<b>Moches</b> ( <i>Musca domestica</i> )	Poulailler (CHLEF)	20	02	02	04	
	Oasis (BISKRA)	10	01	07	08	
	Laboratoire (BEJAIA)	01	01	00	00	
<b>Fourmis</b> ( <i>Lasius niger</i> )	Champ de blé (CHLEF)	10	09	02	00	
<i>Coleoptera sp</i>	Oasis (BISKRA)	10	02	02	03	
<b>Myriapoda</b> ( <i>Glomerida</i> )	Oasis (BISKRA)	10	02	03	09	
<b>Cafards</b> (Blatte orientale) ( <i>Periplaneta americana</i> )	Hôpital (CHLEF)	2	00	00	00	
	(BEJAIA)	12 (08 FX, 07 FI, 06 FIX)	04	01	03	
<b>Pathologiques</b>	ECBU	Hôpitaux (CHLEF)	10	05	01	00
	Copro		03	02	00	00
	Pus		01	01	00	00

FX : flore externe ; FI : flore interne ; FXI : flore externe et interne

**Tableau VII** : Répartition des souches d'enterocoques selon la provenance des prélèvements

<b>Codes</b>	<b>Espèce d'insecte</b>	<b>Lieu de prélèvement</b>	<b>Date de prélèvement</b>
<b>M01</b>	Mouche ( <i>Musca domestica</i> )	Oasis (Biskra)	30 mars 2017
<b>M02</b>	Mouche ( <i>Musca domestica</i> )	Oasis (Biskra)	30 mars 2017
<b>M03</b>	Mouche ( <i>Musca domestica</i> )	Oasis (Biskra)	30 mars 2017
<b>M04</b>	Mouche ( <i>Musca domestica</i> )	Oasis (Biskra)	30 mars 2017
<b>M06</b>	Mouche ( <i>Musca domestica</i> )	Oasis (Biskra)	30 mars 2017
<b>M07</b>	Mouche ( <i>Musca domestica</i> )	Oasis (Biskra)	30 mars 2017
<b>M08</b>	Mouche ( <i>Musca domestica</i> )	Oasis (Biskra)	30 mars 2017
<b>M14</b>	Mouche ( <i>Musca domestica</i> )	Poulailler (Chlef)	29 avril 2017
<b>M17</b>	Mouche ( <i>Musca domestica</i> )	Poulailler (Chlef)	29 avril 2017
<b>FX1</b>	Cafard ( <i>Periplanita amiricana</i> )	Restaurant (Bejaia)	10 mars 2017
<b>FX2</b>	Cafard ( <i>Periplanita amiricana</i> )	Restaurant (Bejaia)	10 mars 2017
<b>FXI4</b>	Cafard ( <i>Periplanita amiricana</i> )	Laboratoire (Bejaia)	03 avril 2017
<b>CP6</b>	<i>Coleoptera sp</i>	Oasis (Biskra)	22 mars 2017
<b>CP7</b>	<i>Coleoptera sp</i>	Oasis (Biskra)	22 mars 2017
<b>CP10</b>	<i>Coleoptera sp</i>	Oasis (Biskra)	22 mars 2017
<b>MP2</b>	Myriapoda ( <i>Glomerida</i> )	Oasis (Biskra)	22 mars 2017
<b>MP5</b>	Myriapoda ( <i>Glomerida</i> )	Oasis (Biskra)	22 mars 2017
<b>MP6</b>	Myriapoda ( <i>Glomerida</i> )	Oasis (Biskra)	22 mars 2017
<b>MP7</b>	Myriapoda ( <i>Glomerida</i> )	Oasis (Biskra)	22 mars 2017
<b>MP8</b>	Myriapoda ( <i>Glomerida</i> )	Oasis (Biskra)	22 mars 2017
<b>MP9</b>	Myriapoda ( <i>Glomerida</i> )	Oasis (Biskra)	22 mars 2017
<b>MP10</b>	Myriapoda ( <i>Glomerida</i> )	Oasis (Biskra)	22 mars 2017



**Tableau III** : Les phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines

Codes	Espèces	AMC (30 $\mu$ g)	CTX (30 $\mu$ g)	CAZ (30 $\mu$ g)	FOX (30 $\mu$ g)	DD-test	Clox	MEM (10 $\mu$ g)	ERT (10 $\mu$ g)	TEM (30 $\mu$ g)	Phénotype
<b>F1</b>	<i>Acinetobacter sp</i>	25(S)	40(S)	30(S)	25(S)	-	+	NT	NT	NT	Hyperproduction d'AmpC
<b>F2</b>	<i>Pseudomonas sp</i>	20(I)	35(S)	30(S)	25(S)	-	+	NT	NT	NT	Hyperproduction d'AmpC
<b>F3</b>	<i>Pseudomonas sp</i>	9(R)	25(I)	17(R)	6(R)	-	+	NT	NT	NT	Hyperproduction d'AmpC
<b>F4</b>	<i>Pseudomonas sp</i>	6(R)	14(R)	11(R)	24(S)	-	-	NT	NT	NT	Hyperproduction d'AmpC
<b>F6</b>	<i>Pseudomonas sp</i>	15(R)	30(S)	28(S)	15(I)	-	+	NT	NT	NT	Hyperproduction d'AmpC
<b>F7</b>	<i>Acinetobacter sp</i>	25(S)	40(S)	30(S)	25(S)	-	+	NT	NT	NT	Hyperproduction d'AmpC
<b>F8</b>	<i>Pseudomonas sp</i>	15(R)	30(S)	25(I)	25(S)	-	+	NT	NT	NT	Hyperproduction d'AmpC
<b>F9</b>	<i>Acinetobacter sp</i>	20(I)	30(S)	25(I)	20(S)	-	+	NT	NT	NT	Hyperproduction d'AmpC
<b>F10</b>	<i>Pseudomonas sp</i>	20(I)	30(S)	25(I)	23(S)	-	+	NT	NT	NT	Hyperproduction d'AmpC
<b>M25</b>	<i>Pseudomonas sp</i>	23(S)	21(R)	20(R)	25(S)	-	+	NT	NT	NT	Hyperproduction d'AmpC
<b>M26</b>	<i>Acinetobacter sp</i>	10(R)	10(R)	10(R)	9 (R)	-	-	NT	NT	NT	Hyperproduction d'AmpC
<b>FIC1</b>	ND	10(R)	21(R)	25(I)	6(R)	-	NT	NT	NT	NT	Hyperproduction d'AmpC
<b>FXC1</b>	ND	25(S)	20(R)	6(R)	6(R)	-	NT	NT	NT	NT	Hyperproduction d'AmpC
<b>FXIC4</b>	ND	24(S)	28(S)	22(I)	26(S)	-	NT	NT	NT	NT	Hyperproduction d'AmpC
<b>FXIC8</b>	<i>Acinetobacter sp</i>	22(S)	35(S)	30(S)	27(S)	-	+	NT	NT	NT	Hyperproduction d'AmpC
<b>CP8</b>	<i>Pseudomonas sp</i>	12(R)	10(R)	10(R)	10(R)	-	-	NT	NT	NT	Hyperproduction d'AmpC

<b>CP10</b>	<i>Acinetobacter sp</i>	9(R)	9(R)	9(R)	9(R)	-	-	NT	NT	NT	Hyperproduction d'AmpC
<b>MP5</b>	<i>Acinetobacter sp</i>	32(S)	30(S)	20(R)	15(I)	-	+	NT	NT	NT	Hyperproduction d'AmpC
<b>MP8</b>	<i>BGNF</i>	10(R)	20(R)	23(I)	10(R)	-	+	NT	NT	NT	BLSE
<b>U153</b>	<i>Acinetobacter sp</i>	6(R)	13(R)	11(R)	6(R)	-	-	NT	NT	NT	Hyperproduction d'AmpC
<b>U173</b>	<i>Pseudomonas sp</i>	6(R)	21(R)	15(R)	11(R)	-	-	NT	NT	NT	ND
<b>U198</b>	<i>BGNF</i>	6(R)	14(R)	12(R)	26(S)	-	-	NT	NT	NT	ND
<b>U208</b>	<i>Klebsiella sp</i>	6(R)	10(R)	10(R)	6(R)	-	-	NT	NT	NT	Hyperproduction d'AmpC
<b>C102</b>	<i>BGNF</i>	6(R)	22(R)	16(R)	6(R)	-	-	NT	NT	NT	ND
<b>C103</b>	<i>Pseudomonas sp</i>	6(R)	19(R)	17(R)	6(R)	-	-	NT	NT	NT	Hyperproduction d'AmpC
<b>F4c</b>	<i>BGNF</i>	NT	NT	NT	NT	NT	NT	6(R)	6(R)	6(R)	Carbapénémase
<b>F7c</b>	<i>Pseudomonas sp</i>	NT	NT	NT	NT	NT	NT	13(R)	6(R)	9(R)	Carbapénémase
<b>M13c</b>	<i>Pseudomonas sp</i>	NT	NT	NT	NT	NT	NT	16(I)	6(R)	6(R)	Carbapénémase
<b>M19c</b>	<i>Acinetobacter sp</i>	NT	NT	NT	NT	NT	NT	8(R)	29(S)	6(R)	Carbapénémase
<b>CP3c</b>	<i>Pseudomonas sp</i>	NT	NT	NT	NT	NT	NT	12(R)	6(R)	6(R)	Carbapénémase
<b>CP5c</b>	<i>Acinetobacter sp</i>	NT	NT	NT	NT	NT	NT	13(R)	8(R)	6(R)	Carbapénémase
<b>MP4c</b>	<i>Acinetobacter sp</i>	NT	NT	NT	NT	NT	NT	20(I)	16(R)	6(R)	Carbapénémase
<b>MP5c</b>	<i>BNGF</i>	NT	NT	NT	NT	NT	NT	6(R)	6(R)	6(R)	Carbapénémase
<b>U208c</b>	<i>Klebsiella sp</i>	NT	NT	NT	NT	NT	NT	12(R)	15(R)	6(R)	Carbapénémase

**Légende :** **BGNF** : Bactérie a Gram Négatif fermentaire ; **ND** : Non Déterminée

## ANNEXE III

### Composition des milieux de culture et réactifs (en g/l)

#### Gélose Mac Conkey

Peptone de caséine	17 g
Peptone de viande	3 g
Lactose	10 g
Mélange de sels biliaires	1.5 g
Chlorure de sodium	5 g
Rouge neutre	0.03 g
Cristal violet	0.001 g
pH 7.3	

#### Gélose Mueller Hinton

Infusion de viande de bœuf	3 g
Hydrolysate de caséine	17.5 g
Amidon	1.5 g
Agar	17 g
pH 7.4	

#### Gélose TSI

Extrait de viande de bœuf	3 g
Extrait de levure	3 g
Peptone tryptique	20 g
Chlorure de sodium	5 g
Citrate ferrique	0.3 g
Thiosulfate de sodium	0.3 g
Lactose	10 g
Glucose	1 g
Saccharose	10 g
Rouge de phénol	0.05 g
Agar	12 g
pH 7.4	

### Milieu Urée-Indole

<b>L-tryptophane</b>	3 g
<b>Phosphate monopotassique</b>	1 g
<b>Phosphate bipotassique</b>	1 g
<b>Chlorure de sodium</b>	5 g
<b>Urée</b>	20 g
<b>Alcool à 90°</b>	10 ml
<b>Rouge de phénol</b>	0.025 g
<b>pH 7</b>	

### Milieu Clark-Lubs

<b>Peptone tryptique de viande</b>	5 g
<b>Phosphate bipotassique</b>	5 g
<b>Glucose</b>	6 g
<b>pH 7</b>	

### Milieu Citrate de simmons

<b>Citrate de sodium</b>	2 g
<b>Chlorure de sodium</b>	5 g
<b>Sulfate de magnésium</b>	0.2 g
<b>Phosphate monoammoniaque</b>	1 g
<b>Phosphate bipotassique</b>	1 g
<b>Bleu de bromothymol</b>	0.08 g
<b>Agar</b>	15 g
<b>pH 7.0</b>	

### Gélose mannitol-mobilité

<b>Peptone trypsique de viande</b>	20 g
<b>Mannitol</b>	2 g
<b>KNO<sub>3</sub></b>	1 g
<b>Rouge de phénol à 1%</b>	0.04 g
<b>Agar</b>	4 g
<b>pH 7.6</b>	

### Bouillon Trypticase soja

<b>Peptone trypsique de caséine</b>	17 g
<b>Peptone papainique de soja</b>	3 g
<b>Chlorure de sodium</b>	5 g
<b>Phosphate bipotassique</b>	2 g
<b>Glucose</b>	2 g
<b>pH 7.3</b>	

### Gélose EMB

<b>Peptone pancréatique de gélatine</b>	10,0 g
<b>Lactose</b>	10,0 g
<b>Phosphate dipotassique</b>	2,0 g
<b>Eosine Y</b>	0,4 g
<b>Bleu de méthylène</b>	65,0 mg
<b>Agar agar bactériologique</b>	15,0 g
<b>pH 7,0</b>	



## **Résumé :**

L'objectif de cette étude est d'évaluer la résistance aux antibiotiques de la flore bactérienne chez les insectes dans différents environnements.

Un total de 89 échantillons a été collecté au niveau de Chlef, Biskra et Bejaia. Après isolement et identification, les phénotypes de résistance aux antibiotiques ont été déterminés par l'utilisation des tests phénotypiques incluant le DD-test, test à la cloxacilline et le test CIM. Une caractérisation phénotypique et des CMI ont été réalisés chez les souches d'entérocoques.

Au total 17 souches de bactéries à Gram négatif ont été sélectionnées. La caractérisation phénotypique a montré que une souche était probablement productrice de BLSE, 11 souches étaient productrices d'AmpC naturelle, 5 produisaient des carbapénémases et 13 souches d'entérocoques résistantes à la vancomycine ayant une CMI supérieure à 32µg/ml.

Les insectes peuvent servir de réservoir et de vecteurs de bactéries multiresistantes aux antibiotiques.

**Mots-clés :** Insectes, BLSE, EPC, ERV, Algérie.

## **Abstract**

The objective of this study was to evaluate the antibiotic resistance of bacterial flora carrying by insects in different environments.

89 samples were collected at Chlef, Biskra and Bejaia. After isolation and identification, phenotypes of antibiotic resistance were determined by the use of phenotypic tests including DD-test, cloxacillin test, and CIM test. Phenotypic characterisation of enterococci and MICs to were determined.

A total of 17 strains of Gram-negative bacteria were selected. The phenotypic characterization showed that one strain was probably ESBL producing, 11 strains hyper-expressed AmpC, 5 were carbapenemases producing and 13 strains were vancomycin resistant Enterococci with MICs greater than 32 µg /ml.

Insects can serves as reservoir and vector of antibiotic resistant bacteria.

**Keywords:** Insect, ESBL, CPE, VRE, Algeria.

## ملخص:

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم المقاومة للمضادات الحيوية للبكتيريا المحمولة على الحشرات في بيئات مختلفة.

89 عينة تم جمعها في شلف، بسكرة و بجاية بعد عزل و تعريف البكتيريا، تم تحديد ظواهر المقاومة للمضادات الحيوية باستعمال عدة اختبارات منها : اختبار التآزر (DD-test) ، اختبار بالكلوكزاسيلين، اختبار تعطيل الكارباميد و كذلك تم تحديد المواصفات الظاهرية للمكورات المعوية و التركيز المثبط الأدنى لها.

في المجموع تم جمع 17 بكتيريا من السلالات السلبية، المواصفات الظاهرية أظهرت ان بكتيريا واحدة على الأرجح أنها منتجة لإنزيم بيتا-لاكتاماز واسع الطيف، 11 بكتيريا منتجة لإنزيم سيفالوسبوريناز طبيعي، 5 منتجة لإنزيم كارباينيماز و 13 مكورة معوية مقاومة للفانكوميسين مع وجود التركيز الأدنى المثبط لها أعلى من 32µg/ml.

يمكن للحشرات أن تكون بمثابة خزانات وناقلات للبكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية المتعددة.

الكلمات الدلالية: حشرة، BLSE، EPC، VRE ، الجزائر.